

Universidad de Costa Rica

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

**Análisis elemental y cromático: estudio fisicoquímico de  
escleritas de octocorales *Muricea fruticosa*  
de la Isla del Coco**

Elíizabeth Rodríguez Chavarría

Trabajo Final de Graduación para optar por el  
Grado de Licenciatura en Química

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2022

# UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

## ESCUELA DE QUÍMICA

Acta de la sesión N°015-2022 celebrada por la Escuela de Química, el 29 de junio de 2022, a las catorce horas, con el único propósito de proceder a la defensa pública del Trabajo Final de Graduación de la estudiante Elizabeth Rodríguez Chavarría, de manera virtual utilizando la herramienta Zoom, para optar por el grado de Licenciatura en Química.

### **El tribunal Examinador está constituido por las siguientes personas:**

1. Dra. Mavis Montero Villalobos. Directora de TFG
2. Odalisca Breedy Shadid Ph.D. Asesora I
3. Dr. Roberto Urcuyo Solorzano. Asesor II
4. Dr. Erick Castellón Elizondo. Miembro del Tribunal.
5. Juan José Araya Barrantes Ph.D. Presidente del Tribunal

### **Artículo I**

La persona que preside el Tribunal informa que el expediente de la estudiante contiene todos los documentos que exige el Reglamento de Trabajos Finales de Graduación de la Universidad de Costa Rica, a saber:

1. Copia del Expediente Académico, extendida por la Oficina de Registro e Información.
2. Certificación de delincuencia extendida por el Registro Judicial.
3. Estudio académico realizado por la Comisión de Currículo, sobre conclusión del plan de estudios.
4. Resumen del Trabajo Final de Graduación.

### **Artículo II**

La estudiante Elizabeth Rodríguez Chavarría realiza la exposición de su Trabajo Final de Graduación titulado: “ANÁLISIS ELEMENTAL Y CROMÁTICO: ESTUDIO FÍSICOQUÍMICO DE ESCLERITAS DE OCTOCORALES MURICEA FRUTICOSA DE LA ISLA DEL COCO”.

### **Artículo III**

Terminada la exposición, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la postulante durante el tiempo reglamentario, considerando que sus respuestas fueron: satisfactorias

#### Artículo IV

La persona que preside el Tribunal Examinador solicita a la postulante y al público, desalojar la sala para deliberar sobre el trabajo expuesto. Después de discutir los méritos de la estudiante Elizabeth Rodríguez Chavarría y la calidad de su trabajo, declara que la misma es:

**Aprobado de manera unánime**

#### OBSERVACIONES:

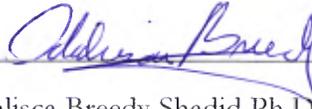
#### Artículo V

De nuevo en la sala, la persona que preside el Tribunal Examinador comunica el resultado de la deliberación, a saber, declarar a la postulante: Licenciada en Química en nombre de la Escuela de Química. Este acuerdo será firme cuando el postulante haya cumplido con los requisitos que impone el artículo 36 del Reglamento de Trabajos Finales de Graduación y con la obligación de juramentarse.

**Se da lectura al acta, la cual firman el postulante y los miembros del Tribunal a las 15:20 horas.**



Dra. Mavis Montero Villalobos.  
Directora del Trabajo Final de Graduación



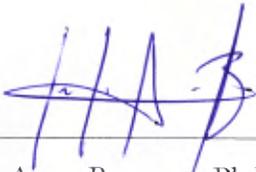
Odalisca Breed Shadid Ph.D.  
Asesora I



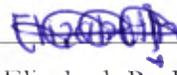
Dr. Roberto Urcuyo Solorzano  
Asesor II



Dr. Erick Castellón Elizondo  
Miembro del Tribunal



Juan José Araya Barrantes Ph.D  
Presidente del Tribunal



Elizabeth Rodríguez Chavarría.  
Postulante



## Resumen

Los octocorales son organismos coloniales marinos que han sido poco estudiados, en especial aspectos sobre su coloración y la relación con su estructura mineralógica. Esta investigación se centra en la especie *Muricea fruticosa* Verill, 1869 presente en el Parque Nacional Isla del Coco, un octocoral no fotosintético, en el cual hay presencia de dos cromotipos (blanco y blanco con puntas rojas). Este representa una oportunidad única para recolectar información sobre el origen de su coloración y su relación con la estructura morfológica (escleritas) y composición fisicoquímica.

En este trabajo diversas técnicas de análisis como espectroscopía FT-IR, XRD, SEM/EDS, indicaron una composición mineralógica de calcita magnésica para las escleritas, y no se encontró diferencias en su composición química mineralógica

entre las muestras pigmentadas y blancas.

La espectroscopía Raman si estableció claras diferencias entre las muestras con color y sin color. Los análisis realizados muestran la ausencia de pigmento en las escleritas blancas, y el mismo tipo de pigmento en las amarillas y rojas. Se propone que es un cambio en la concentración del pigmento el causante de los distintos colores. Además, estos pigmentos no son superficiales, sino parte integral de la esclerita y se incorporó posiblemente durante su génesis. A partir de los estudios Raman junto con bases de datos y literatura, se pudo concluir que el origen de la coloración del octocoral proviene principalmente de una matriz orgánica constituida mayoritariamente por polienos insaturados más no de carotenoides como se ha reportado para otros octocorales en la literatura.

Las observaciones con luz polarizada muestran la naturaleza mesocristalina de las escleritas, mostrando distintos espectros de luz reflejada ante luz polariza perpendicular y paralelamente al haz incidente, y diferencias también en los espectros de luz reflejada entre escleritas blancas y rojas. Observaciones con SEM de alta resolución muestran distintos anillos concéntricos en su estructura interna, mucho más pequeños para la esclerita blanca, que la roja. Esto podría ser un indicio de la asociación entre color y estructura. Se recomienda un mayor número de observaciones entre escleritas de la misma forma, tamaño y color, para continuar con esta investigación.

## **Dedicatoria**

*A mis padres, por todo el apoyo, esfuerzo, sacrificios, amor y enseñanzas que me han brindado en todo este proceso y a lo largo de mi vida, por impulsarme siempre a dar lo mejor en cada etapa.*

## Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que directa e indirectamente han estado involucradas en mi vida universitaria, gracias por todas las enseñanzas en este proceso.

- A mi directora de tesis, la profe Mavis, por toda su entrega, paciencia, entusiasmo y dedicación en este tema y todo el proceso, gracias por todas las enseñanzas.
- A mi asesora, Oda, por acoger a una estudiante de química en su mundo marino, gracias por abrirme las puertas a un mundo muy interesante en el que la química puede brindar muchos aportes y en el que disfruté aprender sobre la biología marina, por la paciencia y entrega en enseñarme y explicarme muchos conceptos biológicos.
- A mi asesor, Roberto, por el tiempo y dedicación en este proyecto y por la enseñanza y guía brindada en relación con la espectroscopía Raman.
- A Msc. Paula Calderón, por el compromiso y ayuda para con el proyecto.
- A Bach. Diego Jiménez, por el compromiso y ayuda para con el proyecto.
- A LASA, las horas asistente realizadas y el ambiente de compañerismo, además de todas enseñanzas brindadas fueron de gran impacto para mi vida profesional y académica.
- A mi familia, por todo el apoyo y ayudas brindadas.

# Índice general

Acta de la sesión N°015-2022 .....	ii
<b>Resumen</b> .....	iv
<b>Dedicatoria</b> .....	v
<b>Agradecimientos</b> .....	vi
<b>Índice general</b> .....	vii
<b>Índice de cuadros</b> .....	viii
<b>Índice de Figuras</b> .....	ix
<b>Antecedentes</b> .....	1
<b>Justificación</b> .....	9
<b>Objetivos</b> .....	11
<b>Capítulo I. Sección experimental</b> .....	12
<b>Metodología</b> .....	12
Sección experimental .....	12
Sección instrumental .....	14
<b>Capítulo II. Descripción general de la coloración de las escleritas <i>Muricea fruticosa</i></b> .	20
<b>Capítulo III. Composición química y estructural de las escleritas.</b> .....	25
<b>Composición química de las escleritas</b> .....	25
<b>Capítulo IV. ¿Qué es el color y cómo está distribuido en las esclerita?</b> .....	35
<b>Orientación cristalográfica de las escleritas</b> .....	48
<b>Composición estructural de las escleritas</b> .....	55
<b>Conclusiones y Recomendaciones</b> .....	63
<b>Bibliografía</b> .....	65

## Índice de cuadros

<b>Cuadro I.</b> Nomenclatura de las escleritas obtenidas después del proceso de separación....	13
<b>Cuadro II.</b> Configuración espacial de los polimorfos de carbonato de calcio presentes en los organismos marinos.....	26
<b>Cuadro III.</b> Análisis elemental por medio de la técnica EDS de la superficie externa de las escleritas blancas de la muestra UCR 2996 y de la superficie externa e interna de las escleritas blancas y rojas de la muestra UCR 3004.....	29
<b>Cuadro IV.</b> Señales obtenidas en los espectros IR para las muestras UCR 2996 y UCR 3004 y sus respectivos reportes en la literatura. ....	31
<b>Cuadro V.</b> Señales obtenidas en los espectros Raman para las escleritas de las muestras UCR 2996 y UCR 3004.....	41
<b>Cuadro VI.</b> Relación de intensidad entre las señales presentes en las escleritas rojas y amarillas mostradas en la Figura 30. ....	43

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Árbol filogenético del filo Cnidaria (Technau & Steele, 2011).....	1
<b>Figura 2.</b> Diagrama de un corte transversal de un octocoral (Grasshoff & Bargibant, 2001). .....	2
<b>Figura 3.</b> Escleritas embebidas en el tejido de la especie <i>Sinularia polydactyla</i> .(Vielzeuf et al., 2017).....	3
<b>Figura 4.</b> Tipos de escleritas que se encuentran en el género <i>Pacifigorgia</i> . (a) <i>Pacifigorgia adamsii</i> ; (b) y (c) <i>Pacifigorgia curta</i> ; (d) <i>Pacifigorgia cairnsi</i> (Vargas et al., 2010).....	4
<b>Figura 5.</b> Escleritas presentes en la especie <i>Bebryce parastellata</i> (Devictor & Morton, 2010). .....	5
<b>Figura 6.</b> Colonias de 2 cromotipos de <i>Muricea fruticosa in-situ</i> ubicada en el monte Everest en el Parque Nacional Isla del Coco entre 80 a 100 m de profundidad.....	7
<b>Figura 7.</b> Colonia de <i>Muricea fruticosa Verilll</i> . (a). Colonia in-situ en Islas Galápagos, Ecuador. (b). Colonia in-situ en el monte Everest, Isla del Coco a 95m de profundidad (Breedy & Guzman, 2016a). .....	8
<b>Figura 8.</b> (a) Cromotipo blanco con puntas rojas (UCR3004). (b) Cromotipo blanco (UCR2996). .....	12
<b>Figura 9.</b> Escleritas fijadas en resina y pulidas de las muestras: UCR 3004 (a, b y c) y UCR 2996 (d). (a) resina con escleritas rojas. (b) resina con escleritas amarillas. (c) resina con escleritas blancas. (d) resina con escleritas blancas. ....	14
<b>Figura 10.</b> Diagrama de polarización de la luz.....	15
<b>Figura 11.</b> Interacción del haz. (Subramanian & Rodriguez-Saona, 2009) .....	18
<b>Figura 12.</b> Octocoral <i>Muricea fruticosa</i> cromotipo blanco con puntas rojas (código UCR 3004). (a) Ramas apicales de la colonia de la especie de octocoral. (b) Acercamiento de una rama individual del octocoral. ....	20
<b>Figura 13.</b> Escleritas externas unidas por una matriz orgánica, especie <i>Muricea fruticosa</i> (UCR 3004). .....	21

<b>Figura 14.</b> Escleritas del cromotipo blanco con puntas rojas de la especie <i>Muricea fruticosa</i> (UCR3004) (Cámara profesional lente: Sony FE 90mmf/2.8 Macro G OSS). .....	21
<b>Figura 15.</b> Escleritas del cromotipo blanco con puntas rojas de la especie <i>Muricea fruticosa</i> (UCR3004) (Magnificación: 10x). .....	22
<b>Figura 16.</b> Escleritas individuales de la especie <i>Muricea fruticosa</i> (UCR3004) (Magnificación: 10x). (a) y (b) escleritas tomadas de la sección roja del octocoral, (c) escleritas blancas de la sección blanca del octocoral. ....	23
<b>Figura 17.</b> Escleritas de la especie <i>Muricea fruticosa</i> (UCR2996) (Cámara profesional lente: Sony FE 90mmf/2.8 Macro G OSS). (a) Colonia del octocoral, (b) Rama de la colonia. ...	23
<b>Figura 18.</b> Escleritas individuales de la especie <i>Muricea fruticosa</i> (UCR2996) (Magnificación: 10x). .....	24
<b>Figura 19.</b> Imágenes SEM para la ejemplificación del área de análisis tanto para (a) las escleritas fijadas en resina y pulidas (Magnificación: 150X), como para (b) las escleritas sin ese tratamiento (Magnificación: 400X). .....	27
<b>Figura 20.</b> Distribución de la composición elemental(wt%) de las escleritas de la muestra UCR 3004. ....	29
<b>Figura 21.</b> Espectro de absorbancia FT-IR para las muestras UCR 2996 y UCR 3004 de la especie <i>Muricea fruticosa</i> . .....	31
<b>Figura 22.</b> Diafractograma XRD para las escleritas blancas y rojas de la muestra UCR 3004 y escleritas blancas de la muestra UCR 2996, especie <i>Muricea fruticosa</i> . ....	32
<b>Figura 23.</b> Comparación de espectros con la calcita magnésica reportada en la base de datos de XRD. ....	34
<b>Figura 24.</b> Espectros de reflectancia para las escleritas rojas y las escleritas blancas de la muestra UCR 3004. ....	36
<b>Figura 25.</b> Ejemplo de la sección interna: borde y centro, donde se realizaron los análisis Raman a las escleritas de las muestras UCR 2996 y UCR 3004. ....	37
<b>Figura 26.</b> Espectro Raman de la muestra UCR 2996 correspondientes con las escleritas con tonalidades blancas. Superficie externe e interna (Borde y Centro). .....	38

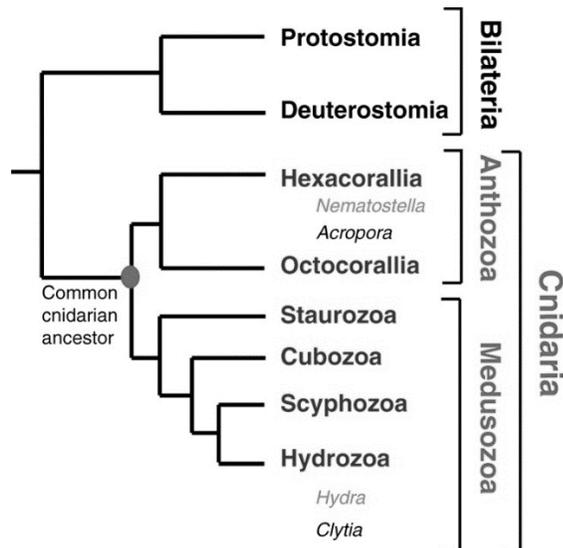
<b>Figura 27.</b> Espectro Raman de la muestra UCR3004 correspondientes con las escleritas con tonalidades blancas. ....	39
<b>Figura 28.</b> Espectro Raman de la muestra UCR3004 correspondientes con las escleritas con tonalidades amarillas. ....	40
<b>Figura 29.</b> Espectro Raman de la muestra UCR3004 correspondientes con las escleritas con tonalidades rojas. ....	40
<b>Figura 30.</b> Espectro Raman para la muestra UCR3004.....	42
<b>Figura 31.</b> Espectro Raman del patrón de (a) $\beta$ -caroteno y (b) Cantaxantina. ....	44
<b>Figura 32.</b> Mapeo Raman de la parte interna de la esclerita roja de la muestra UCR3004. (a) El cuadro verde representa el sector de la esclerita donde se realizó el mapeo. (b) imagen obtenida, color verde: alto en pigmento, color rojo: bajo en pigmento, color azul: polímero de la resina. ....	46
<b>Figura 33.</b> Mapeo Raman de la parte externa de la esclerita roja de la muestra UCR3004. (a) El cuadro verde representa el sector de la esclerita donde se realizó el mapeo. (b) imagen obtenida, muestra la distribución del pigmento a nivel externo. (c) espectro Raman del componente principal. ....	46
<b>Figura 34.</b> Micrografía en microscopio invertido para las escleritas de la especie <i>Muricea fruticosa</i> (a) Escleritas amarillas y (b) Escleritas rojas de la muestra UCR 3004.....	47
<b>Figura 35.</b> Polarización de la luz. Diseño de experimento utilizado para el análisis de las muestras. ....	48
<b>Figura 36.</b> Diagrama de la formación de un mesocristal (Sturm & Cölfen, 2016). ....	49
<b>Figura 37.</b> Imagen óptica con luz polarizada de la esclerita de la especie <i>Corallium rubrum</i> (Floquet & Vielzeuf, 2012). ....	50
<b>Figura 38.</b> Esclerita roja de la muestra UCR 3004 bajo un microscopio de luz polarizada.	51
<b>Figura 39.</b> Gráfico e imágenes de la esclerita roja (UCR 3004) utilizando un haz de luz polarizado en 3 direcciones (45°, paralelo y perpendicular). ....	52
<b>Figura 40.</b> Gráficos e imágenes tomadas al polarizar la luz en las escleritas blancas de la muestra UCR 3004. ....	53

<b>Figura 41.</b> Imágenes SEM de la estructura superficial de las escleritas blancas de la muestra UCR 2996. (Magnificación: 60X).....	56
<b>Figura 42.</b> Imágenes SEM de la estructura superficial de las escleritas blancas de la muestra UCR 2996. (Magnificación: 150-6000X).....	56
<b>Figura 43.</b> Imágenes SEM de la estructura superficial de las escleritas blancas de la muestra UCR 3004. (Magnificación: 60X).....	57
<b>Figura 44.</b> Imágenes SEM de la estructura externa de las escleritas blancas de la muestra UCR 3004. (Magnificación: 150-1000X).....	58
<b>Figura 45.</b> Imágenes SEM de la estructura interna de las escleritas blancas de la muestra UCR 3004. (Magnificación: 140X).....	58
<b>Figura 46.</b> Imágenes SEM de la estructura superficial de las escleritas rojas de la muestra UCR 3004. (Magnificación: 60X).....	59
<b>Figura 47.</b> Imágenes SEM de la estructura superficial de las escleritas rojas de la muestra UCR 3004. (Magnificación: 150-8000X).....	60
<b>Figura 48.</b> Parte interna de una esclerita roja (UCR 3004) procesada (Fijada en resina y pulida). (Magnificación: 150X).....	60
<b>Figura 49.</b> Parte interna de una esclerita roja (UCR 3004) procesada (Fijada en resina y pulida). (Magnificación: 400X).....	61
<b>Figura 50.</b> Escleritas recubiertas con oro de la muestra UCR3004. (Izquierda) Escleritas blancas. (Derecha) Escleritas rojas.....	62

# Antecedentes

Los octocorales son animales marinos invertebrados que pertenecen al filo Cnidaria, donde se encuentran gran variedad de animales como por ejemplo medusas, anemonas de mar, corales, entre otros. Siguiendo el árbol filogenético mostrado en la Figura 1, los octocorales pertenecen a la clase Anthozoa, subclase Octocorallia (El-Bawab, 2020; Technau & Steele, 2011).

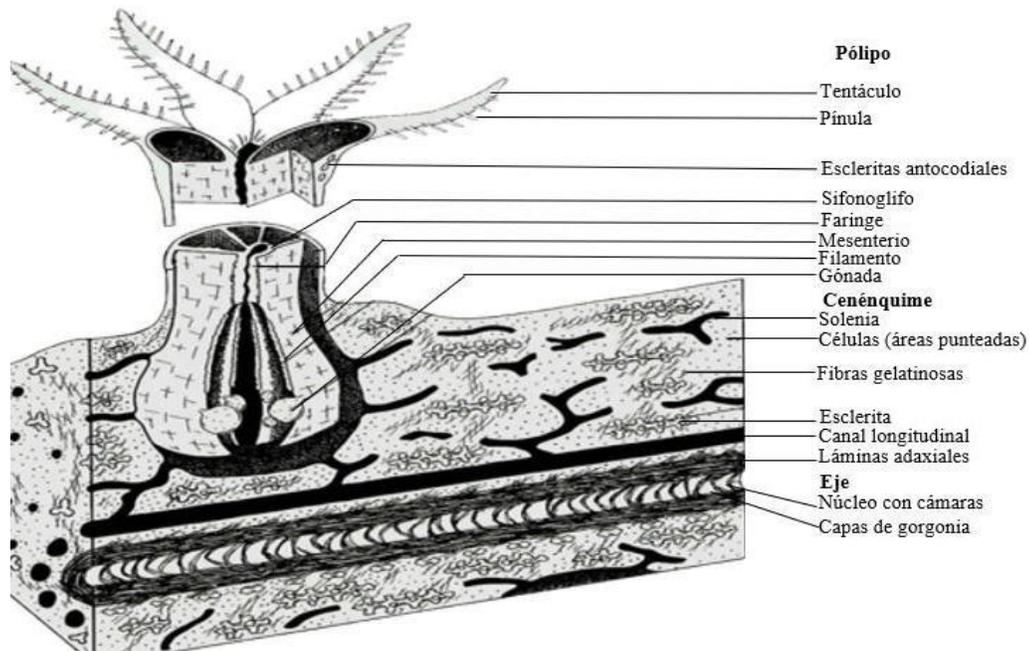
En Octocorallia se encuentran 3 órdenes: Helioporacea, Pennantulacea y Alcyonacea, este último orden cuenta con 3 subórdenes: Scleraxonia, Calcaxonia y Holaxonia. En el caso de Holaxonia se caracteriza por carecer de un esqueleto calcáreo, sus ramas están compuestas de escleritas de calcita y un eje de una sustancia córnea llamada gorgonina, dentro de este suborden hay una gran variedad de familias, y es en la familia Plexauridae donde se encuentra el género *Muricea*, de interés para este trabajo (Breedy & Cortés, 2014a; Horvath, 2019b).



**Figura 1.** Árbol filogenético del filo Cnidaria (Technau & Steele, 2011).

Los octocorales son animales invertebrados coloniales que forman gran variedad de colonias de colores muy vivos dependiendo de la especie. Están formados por numerosos individuos que se conocen como pólipos, el pólipo tiene una abertura que actúa como boca y ano, dicha estructura está rodeada por ocho tentáculos que contienen glándulas urticantes llamadas nematocistos, los cuales se usan para la defensa y la alimentación, en la Figura 2 se

observa un diagrama que representa un corte transversal de las partes generales de un octocoral (Breedy Shadid & Calvo Shadid, 2000).



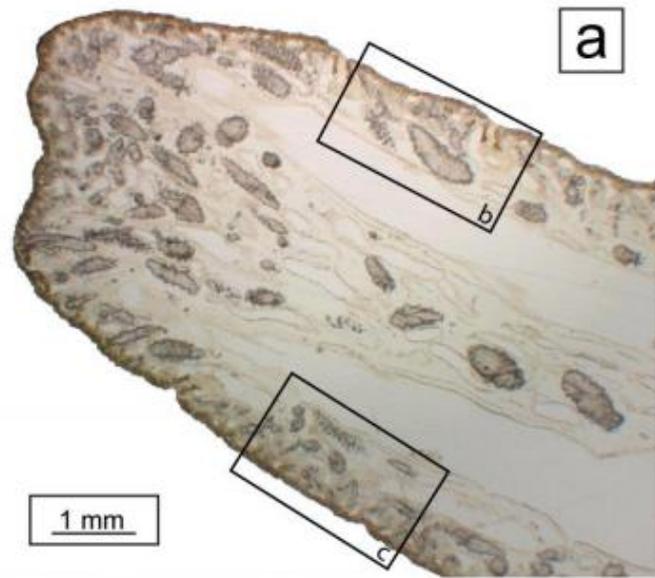
**Figura 2.** Diagrama de un corte transversal de un octocoral (Grasshoff & Bargibant, 2001).

Las colonias en el suborden Holaxonia cuentan con un eje central de un material córneo, flexible conocido como la gorgonina. Este eje tiene un cordón central con cavidades rellenas por filamentos orgánicos que en algunas especies están mineralizados con núcleos de hidroxapatita (Breedy & Cortés, 2014a). El eje está rodeado por una matriz orgánica o cenénquime, donde se encuentran sistema de tubos que conectan los pólipos entre sí, a la vez se encuentra rodeado y reforzado por escleritas calcáreas embebidas en dicha matriz (Breedy & Cortés, 2008; Breedy Shadid & Calvo Shadid, 2000).

Las escleritas son elementos esqueléticos calcáreos poliformes donde en la subclase Octocorallia se puede encontrar en su forma de calcita o aragonita, dos de las tres formas naturales de encontrar dicho mineral, en su estructura también se pueden encontrar mezclas con magnesio (Carlo et al., 2011; Conci, 2020; Pearson, 2014).

Las escleritas se encuentran en la superficie de las ramas incrustadas a lo largo de la mesoglea y alrededor de los pólipos individuales de la colonia, como se observa en la Figura 3, donde se tienen diferentes tamaños de escleritas distribuidas por todo el tejido, como en el caso de la especie *Sinularia polydactyla* (Vielzeuf et al., 2017). A nivel general la formación

inicia dentro de las vacuolas de los escleroblastos y se desarrollan como un agregado de fibras de carbonato de calcio, en la mayoría de los casos, el carbonato de calcio se presenta en forma de calcita, la cual se ha formado de la fusión de nanopartículas de calcita y que a la vez forman capas con cierta disposición cristalina (Carlo et al., 2011).

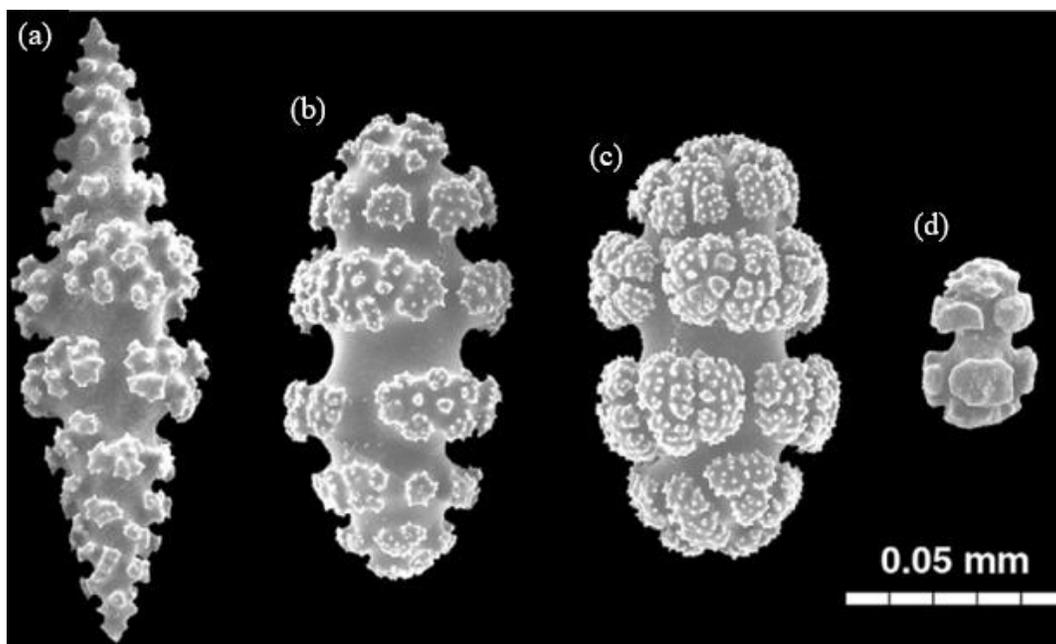


**Figura 3.** Escleritas embebidas en el tejido de la especie *Sinularia polydactyla*.(Vielzeuf et al., 2017)

Dependiendo de donde estén ubicadas y de la especie a la que correspondan van a variar su forma; según lo reportado en la literatura se considera que la formación de las escleritas es controlada por la matriz orgánica que se encarga de guiar la biomineralización (Joseph et al., 2014). En general las escleritas se encargan de dar dureza y rigidez al octocoral (Breedy & Cortés, 2014a; Tentori & van Ofwegen, 2011).

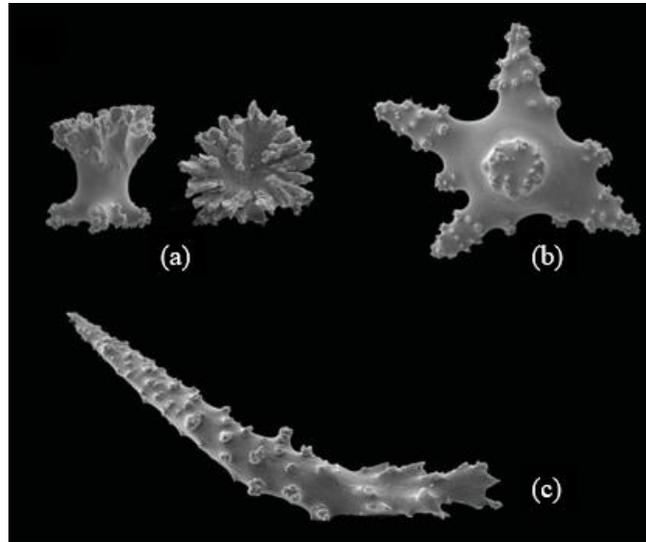
La morfología y ultraestructura de las escleritas son importantes para su funcionamiento mecánico, las escleritas superficiales modifican la flexión de las colonias para ayudar a resistir diversos factores como lo son las fuerzas de arrastre, las diferentes velocidades y direcciones del agua a las que están expuestas. Por lo que las propiedades mecánicas deben ajustarse específicamente a su entorno, otra de las funciones de su estructura es que han sido utilizadas para la identificación y clasificación taxonómica (J. C. Lewis & Wallis, 1991; Sánchez, 2007; Sethmann et al., 2007).

Al existir una gran variedad de estructuras de escleritas, se han establecido algunos nombres según su forma, los nombres más comunes son cabrestante, espícula, huso, doble cabeza, plato, varilla, entre otros (Bayer et al., 1983). Algunos de estos ejemplos se observan en la Figura 4, donde se tienen diferentes tipos de escleritas para el género *Pacifigorgia*. Como se mencionó anteriormente dependiendo de la especie y la ubicación geográfica va a variar la forma, y la abundancia relativa de los tipos de escleritas que formen la colonia. En la Figura 4, se muestran dos tipos de escleritas de *Pacifigorgia curta*: una con forma de huso (Figura 4.B) y otra con forma de cabrestante (Figura 4.C), un tipo muy común de esclerita en este género son los husos puntiagudos presentes en *Pacifigorgia adamsii* (Figura 4.A) y también se encuentran cabrestantes o radiados como en *Pacifigorgia cairnsi* (Figura 4. D). En un mismo género como se ve en este ejemplo, la composición de varios tipos de escleritas, tamaños y colores en cada especie varía considerablemente, es por esto que a nivel de identificación y clasificación taxonómica son de gran importancia (Vargas et al., 2010).



**Figura 4.** Tipos de escleritas que se encuentran en el género *Pacifigorgia*. (a) *Pacifigorgia adamsii*; (b) y (c) *Pacifigorgia curta*; (d) *Pacifigorgia cairnsi* (Vargas et al., 2010).

Existen otros tipos de formas de las escleritas, como por ejemplo las que se muestran en la Figura 5 para la especie *Bebryce parastellata*, perteneciente a la familia Plexauride del suborden Holaxonia; al igual que en el caso anterior se puede apreciar como una misma especie muestra diferentes morfologías de las escleritas (Devictor & Morton, 2010).



**Figura 5.** Escleritas presentes en la especie *Bebryce parastellata* (Devictor & Morton, 2010).

Por otra parte, estos organismos coloniales viven en mares tropicales, subtropicales y boreales, además crecen en pendientes o paredes verticales, por lo que generalmente están en forma perpendicular al flujo de la corriente o en el fondo (Breedy Shadid & Calvo Shadid, 2000).

Al ser animales que pertenecen al filo Cnidaria la formación inicia por medio de la larva plánula, la cual nada y se deposita sobre un sustrato por lo que es común que se encuentre sobre las superficies rocosas, arrecifes de coral y sedimentos blandos presentes en las aguas litorales hasta aguas profundas, a los pocos días de asentada se da la formación de la colonia (Breedy & Cortés, 2014a; El-Bawab, 2020; Wehrtmann & Cortés, 2009).

La alimentación para cada especie varía principalmente de sus habilidades fotosintéticas y ubicación geográfica, sin embargo, en general son organismos conocidos como alimentadores suspensívoros pasivos, es decir, los animales que están fijados en un sustrato filtran el alimento que flota libremente en el agua, como por ejemplo, fitoplancton, zooplancton y materia orgánica disuelta (Almeida et al., 2014; Rakka et al., 2021). Las colonias dependen de la capacidad de los pólipos para extraer de la columna de agua nutrientes de manera eficiente; factores como la velocidad del agua y la dirección del movimiento pueden cambiar rápidamente en respuesta a la acción de las olas, por lo que las

propiedades mecánicas de las colonias deben ajustarse específicamente a su entorno y así obtener los nutrientes respectivos (J. C. Lewis & Wallis, 1991).

Algunas especies de los octocorales tienen asociaciones endosimbióticas con dinoflagelado llamados zooxantelas, siendo esta la mejor fuente de energía. (Van Oppen et al., 2005). Las zooxantelas a través de la fotosíntesis producen sustancias que son aprovechadas por los organismos, además de que le brindan coloración al espécimen. Sin embargo, existen otras especies que puede sobrevivir sin simbiosis y se conocen como organismos azooxantelados, que existen en zonas someras, pero especialmente en aguas profundas donde no hay penetración de la luz solar por lo que no hay procesos fotosintéticos involucrados. Además, otras condiciones como la mezcla de agua fría y pH bajo provoca la ausencia de zooxantelas en los octocorales-(Almeidaa et al., 2014; Cortés, 2019) y probablemente características intrínsecas de cada especie.

El género *Muricea* se clasifica dentro del suborden Holaxonia, orden Alcyonacea en la familia Plexauride, el cual puede contener al menos una docena de especies que se encuentran específicamente en el Pacífico oriental, es por esto que se considera un género abundante y ampliamente distribuido en aguas pocas profundas (8 a 25 m), sin embargo, hay reportes de algunas especies a grandes profundidades como *Muricea midas* a 201 m, *Muricea fruticosa* Verill a 102 m y *Muricea galapagensis* a 94 m (Breedy & Guzman, 2016b; Horvath, 2019a).

Los octocorales son comunes en las costas de Costa Rica y sus islas, con un amplio rango de distribución y profundidad, algunos de los géneros que más han sido observados y recolectados son *Muricea*, *Heterogorgia* y *Psammogorgia*. El género *Muricea*, está representado por varias especies, distribuidas desde zonas someras hasta 100 m de profundidad aproximadamente (Cortés & Blum, 2008; Wehrtmann & Cortés, 2009).

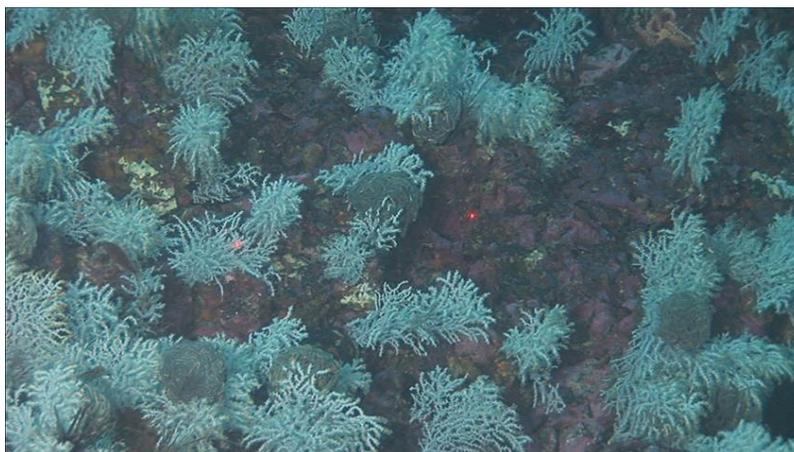
De acuerdo con la morfología de las colonias y de las escleritas se ha dividido el género en cuatro grupos: *Muricea squarrosa*, *Muricea fruticosa*, *Muricea austera*, *Muricea plantaginea* (Breedy & Guzman, 2016b). En este género se puede encontrar una gran variedad de especies con colores muy distintos, por ejemplo, la especie *Muricea californica*, tiene una colonia color marrón-rojizo, la especie *Muricea plantaginea*, tiene una colonia con pólipos blancos amarillentos, además una misma especie como la *Muricea fruticosa*, puede

tener distintas variantes dentro de una misma especie, para este trabajo la especie de interés es conocida como *Muricea fruticosa* (Horvath, 2019a).

Más específicamente, la colonia de nuestro interés se encuentra en el Parque Nacional Isla del Coco. Esta es una de las islas oceánicas del Pacífico Tropical Oriental, ubicada a unos 500 km al sur-suroeste de la costa Pacífica de Costa Rica y a 600 km de la Islas Galápagos, Ecuador; por lo que actúa como un puente de organismos para toda la región, a lo que se atribuye su alta biodiversidad de organismos marinos (Cortés, 2008, 2019; Wehrmann & Cortés, 2009).

La Isla del Coco es el único punto emergido de la Dorsal de Coco, que se extiende 1200 km entre el punto caliente de las Galápagos y la Península de Osa en el sur de Costa Rica. Esta isla es la primera zona somera entre el Pacífico Central y el Pacífico Oriental que toca la Contracorriente Ecuatorial del Norte, esta corriente transporta larvas y juveniles de organismos marinos. (Cortés, 2008).

Se han observado grandes asentamientos de la especie *Muricea fruticosa* en los pináculos submarinos de la Isla del Coco, como se observa en la Figura 6, específicamente en el monte submarino Everest, el cual se encuentra a 2-3 km del islote Manuelita con una profundidad de 180 m; una de las ventajas de este monte es que se encuentra monitoreado desde hace 10 años y presenta un entorno controlado a factores ambientales como la temperatura, en este periodo su temperatura promedio está entre los 14-16°C (Cortés & Blum, 2008).

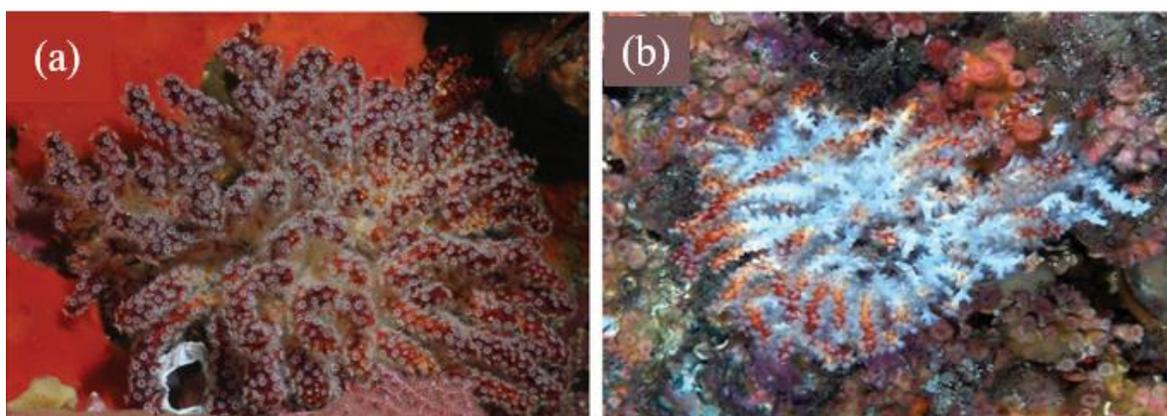


**Figura 6.** Colonias de 2 cromotipos de *Muricea fruticosa in-situ* ubicada en el monte Everest en el Parque Nacional Isla del Coco entre 80 a 100 m de profundidad.

Como se observa en la Figura 7, esta colonia cuenta con 3 colores: su base tiene una coloración blanca, luego hay una sección de su rama que es amarilla pálida y sus puntas son rojizas, generalmente su colonia es tupida e irregular además de que su cenénquime muestra la característica de ser delgado. Esta especie se puede observar en aguas claras o turbias y está presente en varias localidades, por ejemplo, en Islas Galápagos (Figura 7.a) donde está expuesta a corrientes moderadas y ubicada en cuevas, por otra parte, se ha reportado que el récord más profundo para la especie es de 102 m en los montes submarinos de la Isla del Coco (Figura 7.b) (Breedy & Guzman, 2016a).

Una de las características de la especie de interés, *Muricea fruticosa*, es que se le han realizado análisis PCR (prueba de reacción en cadena de la polimerasa) para comprobar la ausencia de zooxantelas, según los resultados brindados esta especie no es fotosintética (Van Oppen et al., 2005). Por lo que pertenece al grupo de organismos que se alimenta por medio de mecanismos de filtración de sustratos como fitoplancton y zooplancton que flotan en el agua (Almeida et al., 2014).

Aunque su coloración es característica en esta colonia no hay estudios sobre los pigmentos asociados, y su relación con la estructura mineral y composición química.



**Figura 7.** Colonia de *Muricea fruticosa* Verill. (a). Colonia in-situ en Islas Galápagos, Ecuador. (b). Colonia in-situ en el monte Everest, Isla del Coco a 95m de profundidad (Breedy & Guzman, 2016a).

## Justificación

Los octocorales en general son especies longevas, que han ido teniendo diversas aplicaciones, por ejemplo, ser utilizados como bio-indicadores de estrés ambiental, además de tener importancia ecológica, al ser organismos con gran diversidad de formas y colores (Abdelmohsen et al., 2017; Breedy & Cortés, 2014b; Kupka et al., 2010). A pesar de que estos organismos realizan diversas funciones, no han sido estudiados en gran detalle, solo se han realizado algunas investigaciones generales de su composición química, en la que se han señalado la presencia de gran cantidad de metabolitos secundarios, como por ejemplo los terpenoides (Coll, 1992). La literatura señala que los metabolitos secundarios tienen diversas funciones como alejar depredadores, excluir competencia, actuar como anti-incrustantes y en funciones reproductivas (Sammarco & Coll, 1992; Slattery et al., 1995).

Por otro lado, una de las características más llamativas e intrigantes es la diversidad de colores que tienen, sin embargo, son pocos los estudios sobre la relación de color con su estructura mineral y composición química (Bracco et al., 2016; Kupka et al., 2010; L. Maia et al., 2011). El enigma de la coloración se acrecienta en especial cuando esta coloración está asociada a las escleritas en organismos no fotosintéticos, como el caso de la colonia a estudiar.

A nivel general se han reportado para los corales, que los tonos rojizos, se debe a la presencia de carotenoides como derivados de  $\beta$ -carotenoides y cantaxantina determinados por medio de espectroscopia IR y Raman (Kupka et al., 2010).

Específicamente en los octocorales se han reportado algunas investigaciones sobre la identificación de pigmentos rojizos, enfocados en diferentes especies por medio de espectroscopia Raman, asociados a dos pigmentos comunes como lo son los carotenoides y parrodienos, a los cuales se les ha atribuido múltiples funciones biológicas: antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y cardio protectoras (L. Maia et al., 2011).

La especie *Muricea fruticosa* de la Isla del Coco, presenta dos cromotipos: uno blanco y uno blanco con puntas rojas; para ambos, los estudios que explican su coloración son escasos y esto representa una oportunidad única para llenar este vacío y su relación con la estructura morfológica (escleritas) y composición fisicoquímica.

Se utilizaron diversas técnicas de espectroscopía y difracción, para intentar generar relaciones entre el origen del color, su estructura mineralógica y su composición química, así

como su distribución radial dentro de las escleritas. Esto permitió realizar estudios con más profundidad sobre estos interesantes organismos y contrastar con investigaciones previas sobre diferentes pigmentos encontrados en otros corales y octocorales (Borisov et al., 2021; DeCarlo, 2018; L. Maia et al., 2011; L. F. Maia et al., 2013)

Finalmente, este trabajo, estará dividido por medio capítulos. El capítulo I, consiste en una descripción de la sección experimental basada en la metodología y técnicas a utilizar, el capítulo II, una descripción general de la coloración de las escleritas de *Muricea fruticosa* de la Isla del Coco.

Por otra parte, los dos últimos capítulos abordaran información acerca de su composición mineralógica, estructural y posible identificación del color. De forma que en el capítulo III se abordará la información correspondiente a la descripción de la composición química y estructural de las escleritas y en el capítulo IV se muestra cómo está distribuido el color en las escleritas y su posible identificación química.

## Objetivos

### Objetivo general

Caracterizar el color por medio de un estudio fisicoquímico de las escleritas de dos cromotipos de la especie *Muricea fruticosa* presente en la Isla del Coco.

### Objetivos específicos

1. Determinar el origen de la coloración en las escleritas de dos cromotipos de la especie *M. fruticosa* presente en la Isla del Coco.
2. Estudiar la composición química y mineralógica de las escleritas de *M. fruticosa* tanto coloreadas como no coloreadas.
3. Estudiar la relación entre la presencia o ausencia de color en las escleritas de *M. fruticosa* con su composición química y mineralógica.

# Capítulo I. Sección experimental

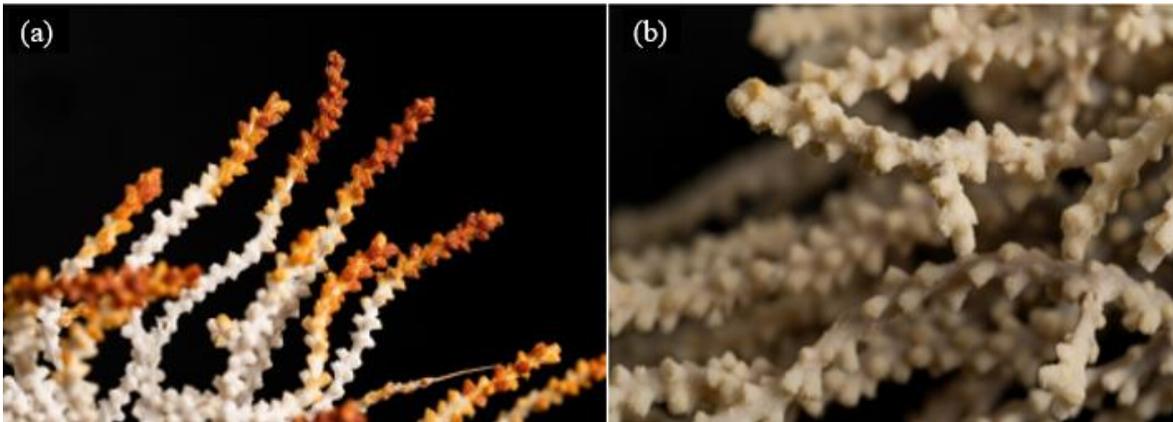
## Metodología

### Sección experimental

#### A. Selección de muestra

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó dos variantes de la especie *Muricea fruticosa*, ambas muestras están depositadas en el Museo de Zoología de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica.

Las dos variantes de la especie *Muricea fruticosa* se encuentran catalogadas en el Museo de Zoología con los siguientes códigos: UCR 3004, el cual tiene la característica de ser un cromotipo blanco con puntas rojas (Figura 8(a)) y UCR 2996, cromotipo completamente blanco, como se observa en la Figura 8(b).



**Figura 8.** (a) Cromotipo blanco con puntas rojas (UCR3004). (b) Cromotipo blanco (UCR2996).

La recolecta de estos organismos se realizó en ambos casos por la Dra. Odalisca Breedy en el submarino DeepSee. La muestra UCR 2996, fue recolectada el 23 de octubre del 2015 en el Pináculo Everest, Isla del Coco a 81,5m de profundidad y esta fue preservada en etanol. La UCR 3004 fue recolectada el 23 de octubre del 2013 en el Pináculo Everest, Isla del Coco a 78,2m de profundidad y esta fue preservada en etanol.

#### B. Proceso de separación de las escleritas

Se seleccionó una sección (rama) de las muestras UCR 2996 y UCR 3004. En el caso de la muestra UCR 3004 se dividió la rama en los 3 colores presentes (blanco,

amarillo y rojo), para obtener las escleritas dichas muestras recibieron el mismo tratamiento que la muestra UCR 2996, el cual se describe a continuación.

Se tomó la sección de interés de la muestra y se colocó en un vial con peróxido de hidrógeno al 50% con el fin de disolver la materia orgánica encargada de mantener unidas las escleritas, se dejó reposar aproximadamente una semana o hasta que se disolviera la materia orgánica presente encargada de contener las escleritas y se obtuviera completamente un polvo compuesto por escleritas. Posteriormente se realizaron 5 lavados con agua destilada y se dejó secar las escleritas de cada muestra en la estufa a 60°C por 12 horas.

Una vez secas las escleritas, se realizó la separación según su coloración de forma manual utilizando un estereoscopio. Por lo que a lo largo del trabajo se van a tener cuatro muestras, descritas en el cuadro I:

**Cuadro I.** Nomenclatura de las escleritas obtenidas después del proceso de separación.

Especie	Cromotipo	Código*	Descripción	Nomenclatura en el documento
<i>Muricea fruticosa</i>	Cromotipo blanco	UCR 2996	Escleritas con coloración blancas	Esclerita blanca (UCR 2996)
	Cromotipo blanco con puntas rojas	UCR 3004	Escleritas con coloración rojiza	Esclerita roja (UCR 3004)
			Escleritas con coloración amarilla	Esclerita amarilla (UCR 3004)
			Escleritas con coloración blanca	Esclerita blanca (UCR 3004)

\* Museo de Zoología de la Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

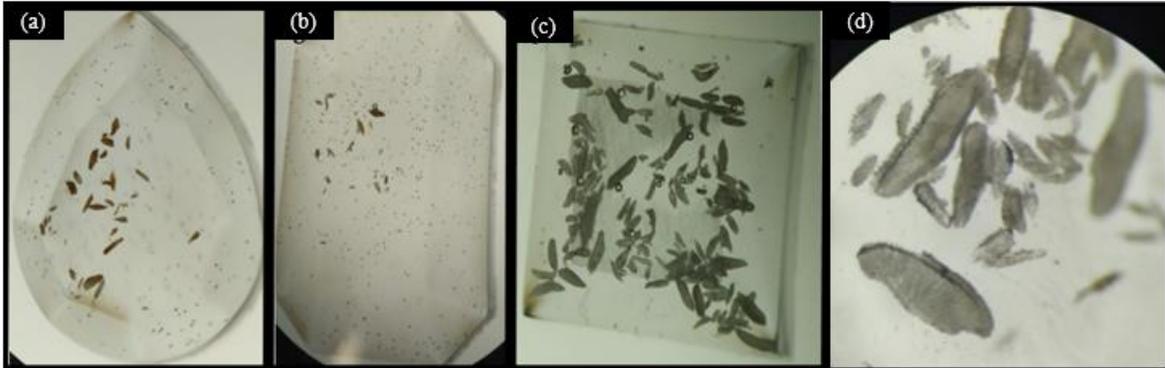
### C. Proceso de fijación de las escleritas

Una vez que se obtuvo las escleritas, se realizó a temperatura ambiente una mezcla de resina epóxica (Marca: Allied, Lot: 11301-EM-CAC) y endurecedor (Marca: Allied, Lot: 30067-EM/JG) en una proporción de 2:1.5, respectivamente. Esta mezcla se homogenizó por 5 minutos y se dejó reposar por otros 5 minutos, posteriormente se vertió en un molde de silicón, se colocó cada una de las muestras en moldes separados dejándolo secar por 24h.

### D. Proceso de lijado y pulido

Cada una de las muestras fijadas en resina se les realizó un proceso de lijado y pulido donde se utilizó primero una lija numero 1000 y luego una 1500, se lijó de

forma manual en presencia de agua y en una misma dirección, después se les aplicó un pulidor de diamante en una dirección como formando un número 8. El resultado final se muestra en la Figura 9 para las muestras correspondientes con ambos cromotipo: UCR 3004: donde (a) contiene las escleritas rojas, (b) contiene las escleritas amarillas y (c) contiene las escleritas blanca, UCR 2996 (d) contiene las escleritas blanca.



**Figura 9.** Escleritas fijadas en resina y pulidas de las muestras: UCR 3004 ((a) resina con escleritas rojas, (b) resina con escleritas amarillas, (c) resina con escleritas blancas) y UCR 2996 ((d) resina con escleritas blancas).

## Sección instrumental

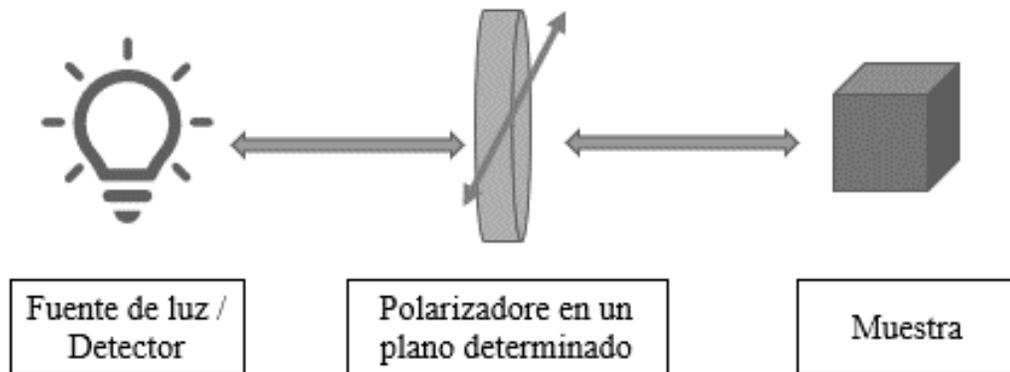
### 1. Microscopía de luz óptica

Es una técnica de microscopía que utiliza un haz de fotones y un sistema de lentes para ampliar la imagen de muestras pequeñas, la muestra se ilumina por medio de una fuente de luz y se observa con un lente objetivo de una magnificación adecuada a la muestra que se desea analizar (Di Gianfrancesco, 2017). En esta misma técnica se tienen variantes como:

#### a. Microscopía óptica con luz polarizada

La principal característica en esta técnica es que se utilizan lentes polarizadores, los cuales tienen la función de orientar el paso del haz de luz en una dirección determinada como se muestra en la Figura 10. Esta técnica es utilizada para obtener información relacionada con el acomodo cristalino y analizar el orden molecular en sistemas heterogéneos. Algunos compuestos inorgánicos cuentan con un alto grado

de orientación cristalina por lo que el haz de luz puede atravesar la muestra en un solo plano vibratorio, siendo de ayuda como complemento para la identificación de sustancias cristalinas (Carlton, 2011; Oldenbourg, 2013).



**Figura 10.** Diagrama de polarización de la luz.

b. Espectrofotómetro UV-Vis acoplado a un microscopio óptico

Esta técnica añade un valor significativo a los microscopios ópticos, ya que no lo limita a la observación, sino que de una forma no invasiva expande sus capacidades como medir absorbancia, reflectancia o transmitancia de una muestra (Orlando-Guerrero et al., 2019).

c. Microscopía óptica invertida

El microscopio de luz invertida es similar al microscopio tradicional, sin embargo, la luz proviene desde arriba de la platina y el objetivo se encuentra debajo de ella. Es una técnica muy utilizada para el análisis de tejidos vivos ya que la muestra se ve a través de lentes objetivos colocados debajo de la plataforma de la muestra (Hauch & Ratner, 2013).

**Condiciones utilizadas en los análisis:**

En este trabajo para el análisis de la estructura y distribución del color se utilizó el microscopio de luz óptica marca: Nikon, modelo: Eclipse LV100ND para la toma de imágenes ópticas, en el cual se utilizó principalmente los lentes de 5x, 10x y 20x. A la vez se utilizó las técnicas de luz polarizada en 3 direcciones (45°, 90° y paralelo al polarizador) y se acopló un aditamento para obtener espectros UV-Vis marca: CRAIC para la aplicación de la técnica UV-Vis, además antes de tomar los espectros UV-Vis se realiza un ajuste de blancos con un blanco de BaSO<sub>4</sub>, con el fin de corregir

las mediciones y asegurar la reflectancia total, este equipo está ubicado en el Centro de Investigaciones en Ciencias e Ingeniería de Materiales (CICIMA).

También se utilizó el microscopio invertido marca: Olympus, modelo: IX51, ubicado en el Centro de Investigaciones en Estructuras microscópicas (CIEMIC); se utilizó principalmente los lentes de 5x, 10x y 20x y sin presencia de filtros.

Se analizó tanto las escleritas pulidas y fijadas en resina, como las escleritas enteras sin previo tratamiento fijado en resinas y pulido, además al ser técnicas no invasivas no se requirió de una preparación previa de las muestras, para ambos análisis solamente se colocó la muestra de interés en el portamuestra correspondiente y se analizó.

## **2. Microscopia electrónica de barrido (SEM /EDS)**

Un microscopio electrónico de barrido (SEM) es un microscopio que produce imágenes de una muestra escaneándola con un haz de electrones en lugar de un haz de fotones como se utiliza en las técnicas anteriores. De forma que los electrones interactúan con los átomos de la muestra, produciendo varias señales que pueden ser detectados para que brinden información sobre la topografía de la superficie de la muestra (Di Gianfrancesco, 2017).

Esta técnica se puede complementar con el análisis de energía dispersada de rayos x (EDS), es un método de microanálisis elemental ampliamente aplicado capaz de identificar y cualificar todos los elementos de la tabla periódica excepto H, He y Li (Newbury & Ritchie, 2013).

### **Condiciones utilizadas en los análisis:**

A las muestras que están pulidas y fijadas en resina se les realizó un análisis EDS a tres escleritas de cada color, se analizó por triplicado tanto el borde como el centro de cada una para obtener un promedio de la composición elemental y además analizar si hay diferencias en el borde y centro de la esclerita.

Para este análisis EDS se utilizó el microscopio electrónico (HITACHI S-3700N) con un detector EDS (IXRF Systems), que se encuentra en el CIEMIC, por otra parte, no fue necesario realizarle ningún recubrimiento a la muestra ya que se trabajó a bajo vacío.

### **3. Fotografía con cámara profesional**

Para obtener una visión a escala macro de las colonias del octocoral y de sus escleritas se utilizó una cámara profesional.

#### **Condiciones utilizadas en los análisis:**

Las fotografías se tomaron con una cámara profesional marca: Sony, modelo:  $\alpha 7R III$ , con un lente: Sony FE 90mmf/2.8 Macro G OSS.

### **4. Raman**

La espectroscopía Raman es una técnica no invasiva que es utilizada para obtener información acerca de la estructura y propiedades de la molécula por medio de sus modos vibracionales ya que proporciona un espectro característico de las vibraciones específicas de una molécula actuando como una “huella” y permitiendo que se pueda utilizar esta técnica para la identificación de moléculas (I. Lewis & Edwards, 2001).

#### **Condiciones utilizadas en los análisis:**

El equipo Raman modelo WITec Alpha 300R Raman microprobe system, ubicado en el CICIMA, permitió realizar dos tipos de análisis: el primero consistió en estudiar la composición química de las escleritas tanto las escleritas pulidas como las no pulidas, además en esta misma línea de análisis se analizaron patrones de  $\beta$ -caroteno, cantaxantina y bixina, con el fin de realizar comparaciones entre los patrones y las muestras del octocoral. El segundo análisis es un mapeo que brinda información acerca de la distribución y homogeneidad del color dentro de la esclerita y en la superficie, este segundo análisis se realizó sobre la muestra de escleritas rojas.

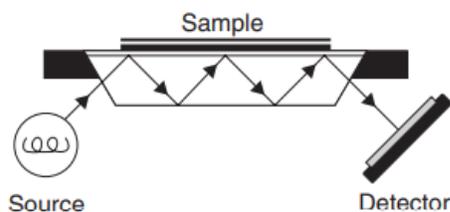
Para realizar estos análisis no fue necesario una preparación previa de las muestras, solo se colocaron en el portamuestra correspondiente, se realizó la calibración respectiva del equipo y su posterior medición.

## 5. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Es una técnica utilizada para la identificación de grupos funcionales y como complemento para la identificación de estructuras moleculares. La espectroscopía infrarroja es una técnica de análisis para obtener información acerca de los procesos de absorción y emisión sobre las moléculas, esta técnica cuenta con tres regiones: cercana, media y lejana. La sección de mayor utilidad es la región media que va desde 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , posteriormente la región lejana que se utiliza para el estudio de compuestos organometálicos e inorgánicos, dicha sección va de 650 a los 200  $\text{cm}^{-1}$ , por último, la región cercana entre los 12500 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ , se utiliza para una identificación más cuantitativa (Aparicio Marengo et al., 2012). En la espectroscopía infrarroja comúnmente se puede trabajar con varias técnicas como lo son reflectancia, transmisión y ATR, esta última es la que se utilizó en esta investigación.

La técnica de reflectancia total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés) es una de las técnicas más utilizadas ya que se puede analizar muestras sólidas y líquidas, además a diferencia de la técnica de transmisión, en ATR el paso de la luz es independiente del grosor de la muestra.

Como se observa en la Figura 11, esta técnica funciona midiendo las interacciones de un rayo IR reflejado internamente, es decir, cuando el rayo entra en contacto con la muestra y un cristal ópticamente denso a un cierto ángulo se crea una onda evanescente, en las regiones del espectro IR donde la muestra absorbe energía la onda evanescente se atenúa por lo que el rayo atenuado regresa al cristal y luego sale por el extremo opuesto del cristal y se dirige al detector, donde este registra el haz de infrarrojo atenuado como una señal de interferograma que resulta en un espectro (Müller et al., 2014; Subramanian & Rodriguez-Saona, 2009).



**Figura 11.** Interacción del haz. (Subramanian & Rodriguez-Saona, 2009)

### **Condiciones utilizadas en los análisis:**

Las muestras de las escleritas analizadas no recibieron ningún tratamiento de fijación en resina ni de pulido y fueron analizadas bajo la técnica de FTIR-ATR. Se tomó un grupo de escleritas de su respectivo color y se morterizó con el fin de homogenizar la muestra, una vez la muestra homogenizada se realizó la medición. Se utilizó un equipo PerkinElmer- Frontier, ubicado en el CICIMA.

### **6. Difracción de rayos X (XDR)**

Es una técnica no destructiva que se utiliza para el análisis cualitativo y cuantitativo de fases cristalinas, ya que es un método eficaz para determinar la composición de fases de materiales amorfos y cristalinos desconocidos.

La dispersión de los rayos X al interactuar con los átomos de los cristales produce un patrón de difracción que proporciona información sobre la estructura. Estos datos están representados en una librería de patrones de difracción de polvo de rayos X monofásicos para los tres valores  $D$  más intensos, en forma de tablas de espaciamentos interplanar ( $D$ ) e intensidades relativas ( $I/I_0$ ). Algunas de las muestras que se pueden analizar por esta técnica son: metales, aleaciones, minerales, compuestos inorgánicos y orgánicos, polímeros, materiales amorfos, líquidos, gases y las moléculas de proteínas y ácidos nucleicos (Rahman et al., 2013; Smodej et al., 2015).

### **Condiciones utilizadas en los análisis:**

Las muestras analizadas con esta técnica fueron únicamente las escleritas que no recibieron ningún tratamiento de fijación en resina ni pulido. Se tomó un grupo de escleritas de su respectivo color y se morterizó con el fin de homogenizar la muestra y realizar el análisis. Se utilizó un equipo marca: Bruker, modelo: D8 Advance Eco, ubicado en la Escuela de Química.

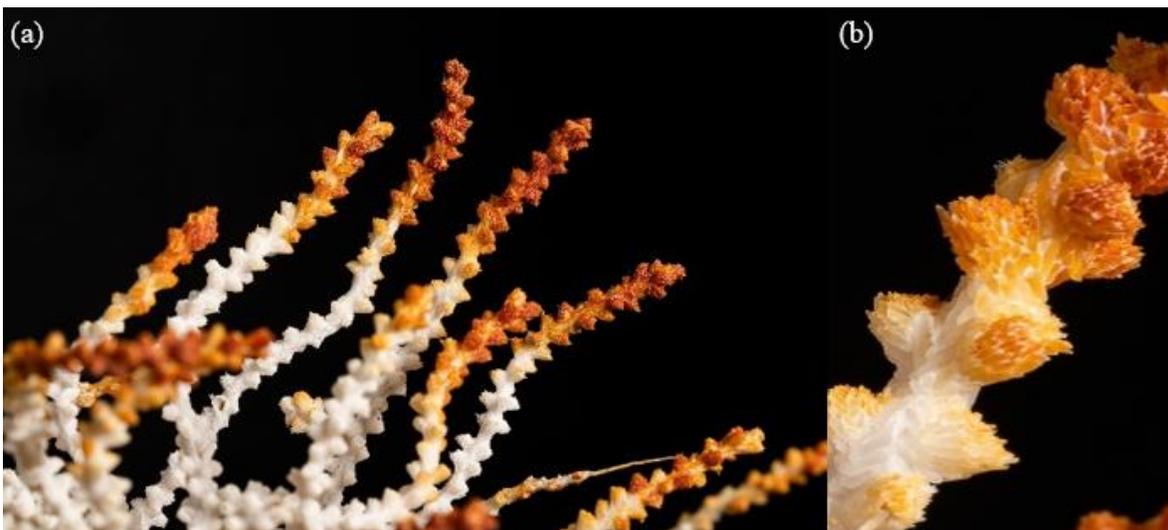
### **7. Procesamiento de datos:**

Todos los datos obtenidos de las técnicas a utilizar se van a procesar y graficar por medio del programa Origin Pro-9.0

## Capítulo II. Descripción general de la coloración de las escleritas *Muricea fruticosa*

La coloración en la especie *Muricea fruticosa* depende de sus variantes, en este trabajo como se mencionó se va a estudiar dos variantes: el cromotipo blanco con puntas rojas y el cromotipo completamente blanco.

En la Figura 12, se muestra el cromotipo blanco con puntas rojas característico de esta especie, si se observa la sección (a) de la imagen se muestra que cada una de las ramas de la colonia presenta un patrón de color, sus bases son blancas, posteriormente hay una parte ligeramente amarilla pálida y por último sus puntas son rojas. Sin embargo, si se observa a mayor magnificación y detalle, en la sección (b) se tiene que la distribución del color no es tan homogénea ya que en cada sección hay tonalidades mezcladas, es decir, en los tonos blancos y rojos también hay presencia de tonos amarillos, siendo estos como una degradación del color entre ambos tonos.



**Figura 12.** Octocoral *Muricea fruticosa* cromotipo blanco con puntas rojas (código UCR 3004). (a) Ramas apicales de la colonia de la especie de octocoral. (b) Acercamiento de una rama individual del octocoral.

En la imagen anterior y en la Figura 13, se observa que las escleritas no solo se encuentran en la parte interna como se menciona en la literatura, sino que también están ubicadas en la parte externa de la colonia. Conforme se va dando el crecimiento del

organismo, se da un acomodo de las escleritas externas de forma que se unen por medio de la matriz proteica de colágeno conocida como mesoglea, esta matriz junto con las escleritas son las que conforman el cenénquime. Además, se muestra como el color del organismo está dado por las escleritas. (Breedy & Cortés, 2008; J. C. Lewis & Wallis, 1991).



**Figura 13.** Escleritas externas unidas por una matriz orgánica, especie *Muricea fruticosa* (Escleritas rojas, UCR 3004).

Al aplicarle peróxido de hidrógeno a una rama del octocoral, se eliminó toda la materia orgánica que permite la unión de las escleritas y se logró obtener las escleritas (proceso de extracción explicado en la sección experimental del capítulo I). Como se observa la Figura 14, a escala macro un grupo al azar de escleritas del organismo UCR 3004, muestra una diversidad de colores, tamaños y formas de escleritas. El ejemplo más evidente es con las escleritas de tonos rojizos donde en el extremo izquierdo de la imagen se observan dos escleritas más grandes en comparación con las escleritas rojas del lado derecho de la imagen.



**Figura 14.** Escleritas del cromotipo blanco con puntas rojas de la especie *Muricea fruticosa* (UCR3004) (Cámara profesional lente: Sony FE 90mmf/2.8 Macro G OSS).

Para ver a mayor detalle de la coloración de las escleritas se utilizó un microscopio óptico; en la Figura anterior las escleritas de tono rojizo que fueron tomadas a escala macro con una cámara profesional (lente: Sony FE 90mmf/2.8 Macro G OSS), presentaron una coloración homogénea en cada esclerita, sin embargo, al verlas a mayor detalle (10x) se puede observar que esta regularidad a una mayor magnificación desaparece, como se observa en la Figura 15, el color no se encuentra distribuido homogéneamente en la esclerita.



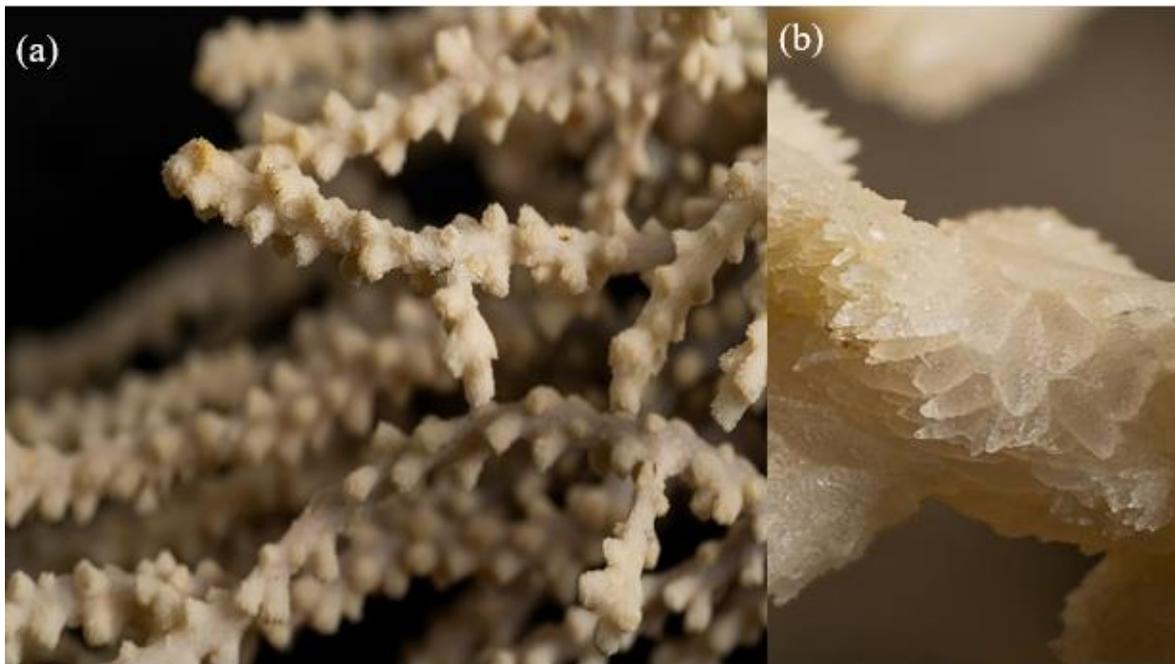
**Figura 15.** Escleritas del cromotipo blanco con puntas rojas de la especie *Muricea fruticosa* (UCR3004) (Magnificación: 10x).

Después de analizar de forma aleatoria diferentes escleritas de esta especie tanto de coloración amarilla- rojiza como blancas, se obtuvo que independientemente del color, la esclerita no es homogénea en su color en si misma ni entre distintas escleritas, como se ejemplifica en la Figura 16 (a) y (b). Para el caso de las escleritas blancas, como la que se muestra en la Figura 16 (c) no se observó ni a escala macro ni micro la presencia de ninguna coloración.



**Figura 16.** Escleritas individuales de la especie *Muricea fruticosa* (UCR3004) (Magnificación: 10x). (a) y (b) escleritas tomadas de la sección roja del octocoral, (c) escleritas blancas de la sección blanca del octocoral.

Al realizar los mismos análisis para la variante del cromotipo blanco (UCR 2996), en la Figura 17 (a) se observó a escala macro que la colonia tiene una coloración blanca homogénea y en la sección (b) de dicha imagen, se muestra que las escleritas, al igual que en la variante anterior, están situadas en la parte externa de la colonia, además al ver las escleritas de forma individual no presentan coloración (Figura 17) en su estructura similar a las escleritas anteriores (Figura 16).



**Figura 17.** Escleritas de la especie *Muricea fruticosa* (UCR2996) (Cámara profesional lente: Sony FE 90mmf/2.8 Macro G OSS). (a) Colonia del octocoral, (b) Rama de la colonia.



**Figura 18.** Escleritas individuales de la especie *Muricea fruticosa* (UCR2996)  
(Magnificación: 10x).

La coloración para esta especie de interés está dada por las escleritas, las cuales no solo están ubicadas a lo interno de la colonia, sino que también brindan soporte estructural a nivel externo, como se observó en las imágenes anteriores. A la vez se puede concluir que la especie *Muricea fruticosa* no cuenta con una coloración homogénea, tanto en su estructura macroscópica, es decir, al observar la rama / colonia completa, como a nivel individual de las escleritas.

Para el caso de la muestra UCR 3004 se observan zonas en la esclerita con una mayor intensidad de color, en tonalidades amarillas y rojizas, estas tendencias se observan de forma aleatoria en todo el espécimen. Además, no se encontró una relación entre color y forma de la esclerita. Las distintas formas pueden ser rojas, amarillas o incoloras.

## Capítulo III. Composición química y estructural de las escleritas.

### Composición química de las escleritas

Las escleritas están compuestas principalmente de carbonato de calcio, este mineral es uno de los más ampliamente utilizados por organismos marinos. Al igual que otros minerales, el carbonato de calcio forma diferentes estructuras polimorfas; en la naturaleza se encuentran en forma de: calcita, aragonita y vaterita; las primeras dos son las formas más abundantes y las más comunes reportadas en la subclase Octocorallia (Conci, 2020).

Dependiendo de la estructura de carbonato de calcio va a favorecerse más un filo de los invertebrados marinos que otros, por ejemplo, el filo Tunicata es más afín a las estructuras de vaterita, sin embargo, otros filos como Porifera, Cnidaria, Mollusca y Anthropoda son más afines a los polimorfos de calcita y aragonita (Conci, 2020).

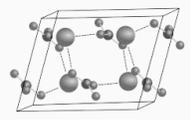
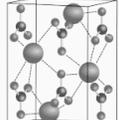
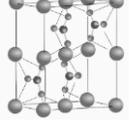
El carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) está compuesto por aniones de carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) que presentan enlaces covalentes entre sus átomos de carbono y oxígeno (C-O), los cuales mantienen una configuración trigonal plana, ya que su estructura contiene un átomo de carbono rodeado de un triángulo equilátero de tres oxígenos y a la vez está unido por medio de interacciones electrostáticas al ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Este mineral cristaliza en forma de capas alternas de iones de carbonato unidos por capas de cationes de calcio, donde los iones de calcio van a coordinar con diferentes configuraciones sus celdas unidad de acuerdo con el polimorfo formado (Dufresne et al., 2018; Ulian et al., 2021).

La formación de uno de los polimorfos de carbonato de calcio está relacionada con varios factores, entre ellos, la variación de condiciones ambientales como temperatura, pH y/o concentraciones de cationes más pequeños que el ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) como lo es el ion magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Estos diversos factores van a interaccionar con la estructura, por lo que van a propiciar la formación de una estructura cristalina u otra y con ello va a variar sus propiedades fisicoquímicas, así como de estabilidad y solubilidad en el océano (Chu et al., 2013; Kawano et al., 2016). La aragonita es un polimorfo de alta presión y la calcita es una estructura que termodinámicamente es estable a temperatura ambiente, sin embargo, si en los ecosistemas marinos la relación entre  $\text{Mg}^{2+} / \text{Ca}^{2+}$  es mayor a 1,5 y el pH > 8,2 propicia la formación de una aragonita metaestable (Conci et al., 2021; Németh et al., 2018).

Como se observa en el Cuadro II, el carbonato de calcio tiene una celda unidad que depende de su polimorfo, por ejemplo, la calcita tiene un sistema cristalino con forma romboédrica donde su centro de simetría es controlado por las orientaciones de dos iones de carbonato, mientras que la celda unidad de la aragonita es ortorrómbica, este es un polimorfo común en la naturaleza pero presenta inestabilidad ante procesos geológicos como la diagénesis por lo que rara vez es conservada en ejemplares como las rocas.

Por otra parte la fase menos conocida es la varita, que presenta una celda unidad con estructura hexagonal que forma cristales micrométricos y metaestables presentes especialmente en agua dulces y manantiales (Al Omari et al., 2016; Borisov et al., 2021; Borromeo et al., 2017; Skinner & Ehrlich, 2014). La simetría con la que cuenta cada estructura le va a brindar ciertas características, por ejemplo, entre más rígida son las posiciones atómicas en la estructura cristalina, más estable resulta (Borisov et al., 2021).

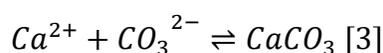
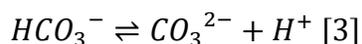
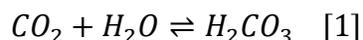
**Cuadro II.** Configuración espacial de los polimorfos de carbonato de calcio presentes en los organismos marinos (Al Omari et al., 2016; Borisov et al., 2021; Conci, 2020).

Polimorfo	Calcita	Aragonita	Vaterita
Celda unidad	Romboédrica	Ortorrómbica	Hexagonal
Grupo espacial	R3c	Pmcn	C2/c-
Diagrama de la estructura			

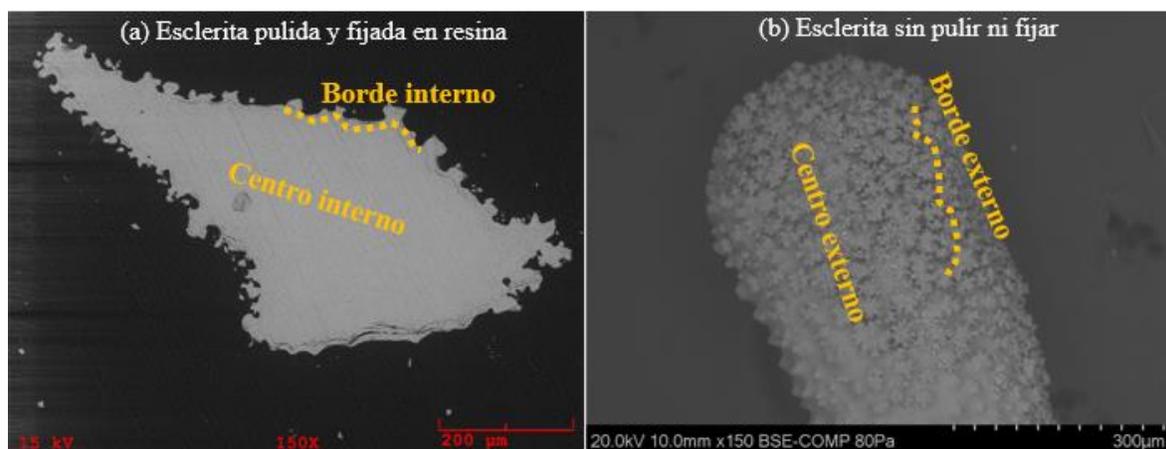
La calcificación en Octocorallia es un proceso biológicamente controlado, en general, este mecanismo se divide en dos procesos: la regulación del ion (calcio) en la célula junto con la concentración disponible en los sitios de calcificación y la segregación de la matriz orgánica que ha sido de gran interés dado que se ha demostrado en otros organismos que esta matriz orgánica regula la precipitación in vitro de diferentes polimorfos de carbonato de calcio (Conci et al., 2021).

Parte del carbonato se puede obtener por medio directo del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) producido en la glicolisis o bien puede ser absorbido del CO<sub>2</sub> o bicarbonato presente en el agua producto de la acidificación de los océanos, como se muestra en las ecuaciones [1] a la

[3]. Por otro lado, la mayor parte de calcio que utiliza el organismo para la formación de la esclerita, lo toma directamente del ambiente y lo transporta por medio de la célula axial epitelial, además algunos reportes en la literatura sugieren que la formación de la esclerita actúa como un mecanismo para reducir los iones de calcio ( $Ca^{2+}$ ) en la célula y así reducir la toxicidad de calcio en los tejidos (Hopley, 2011; Pearson, 2014; Rahman et al., 2011).



Con el fin de verificar la composición química de las escleritas de las dos variantes de la especie *Muricea fruticosa* que se están estudiando en este trabajo, se les realizó una serie de análisis con diversas técnicas como: EDS-SEM, IR, Raman y XDR.



**Figura 19.** Imágenes SEM para la ejemplificación del área de análisis tanto para (a) las escleritas fijadas en resina y pulidas (Magnificación: 150X), como para (b) las escleritas sin ese tratamiento (Magnificación: 400X).

En el Cuadro III, se muestra un análisis elemental utilizando la técnica de SEM-EDS, para determinar los principales elementos que están presentes en las escleritas de la especie de interés. Este análisis se realizó sobre las escleritas rojas y blancas de la muestra UCR 3004 tanto para las escleritas que fueron pulidas y fijadas en resina (como se muestra en la Figura 19(a)) como para escleritas sin tratamiento previo (Figura 19(b)), también se realizó para las

escleritas blancas de la muestra UCR 2996 en el área de la esclerita sin tratamiento previo de fijado y pulido.

El objetivo de este estudio para las muestras pulidas y fijadas fue analizar la composición elemental de forma interna, por lo que se analizó en dos secciones distintas, es decir, en los bordes y en el centro interno de cada esclerita, en cada sección se realizó la medición por triplicado y se reportó el promedio, posteriormente se comparó con los datos de las escleritas sin tratamiento previo también en el borde y centro externo de las escleritas.

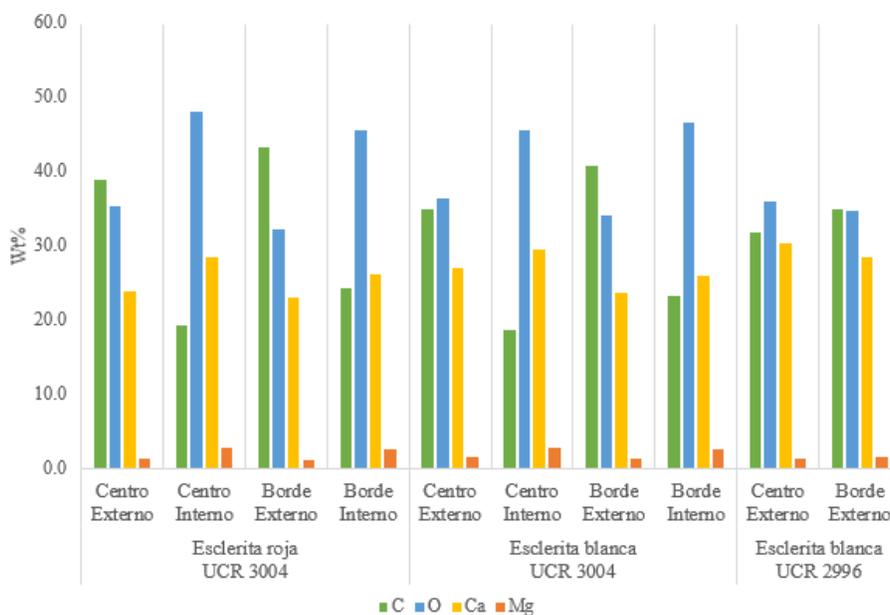
Con respecto a los resultados obtenidos los principales elementos encontrados fueron Oxígeno (O), Calcio (Ca), Carbono (C), Magnesio (Mg), los cuales eran elementos esperados debido a la composición común de las escleritas reportada en la literatura (Conci et al., 2021), por otra parte, en porcentajes menores a 0.2wt% se encontró elementos como Sodio (Na), Aluminio (Al), Azufre (S) y estroncio (Sr), sin embargo, estos elementos no fueron tomados en cuenta para la investigación debido a su nula relación con la muestra y baja concentración, que cae dentro de la incertidumbre del equipo.

En la Figura 20, se observa que las concentraciones más altas se deben al carbono, oxígeno y calcio, los cuales están relacionados a la estructura esperada de carbonato de calcio. El magnesio, a pesar de estar en pequeñas concentraciones con respecto a los elementos anteriores también presenta un papel importante, ya que dependiendo de las condiciones ambientales puede interaccionar con diversos factores, los cuales van a inducir la formación de una estructura u otra del polimorfo de carbonato de calcio, como se mencionó.

La presencia de magnesio en los octocorales también ha servido como marcador de temperaturas en el mar, por lo que ha permitido realizar la reconstrucción de las condiciones del paleoclima, ya que la incorporación de magnesio a las estructuras respectivas del organismo aumenta con respecto al aumento de la temperatura; a nivel estructural la presencia de este elemento también le ha servido al organismo para reforzar los ejes ya que le brinda mayor estabilidad y rigidez a la estructura cristalina (Conci et al., 2021; Lin & Singer, 2009).

Por otra parte, en el Cuadro III se muestran valores de concentración elemental (wt%) similares entre los bordes y centros para las escleritas analizadas independientemente si es

una esclerita fijada y pulida (superficie interna) como si es una esclerita sin pulir ni fijar (superficie externa), también es independiente del color de la esclerita. En cuanto a la relación de Mg/Ca entre las escleritas, como se indicó, los valores de dicha relación son similares entre cada esclerita, además ninguna presenta una relación de radio de  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  mayor a 1,5 en un ambiente de pH básico que propicie la formación de aragonita según lo reportado en la literatura (Hopley, 2011; Ries, 2010; Tanaka et al., 2019).



**Figura 20.** Distribución de la composición elemental (wt%) de las escleritas de la muestra UCR 3004.

**Cuadro III.** Análisis elemental por medio de la técnica EDS de la superficie externa de las escleritas blancas de la muestra UCR 2996 y de la superficie externa e interna de las escleritas blancas y rojas de la muestra UCR 3004.

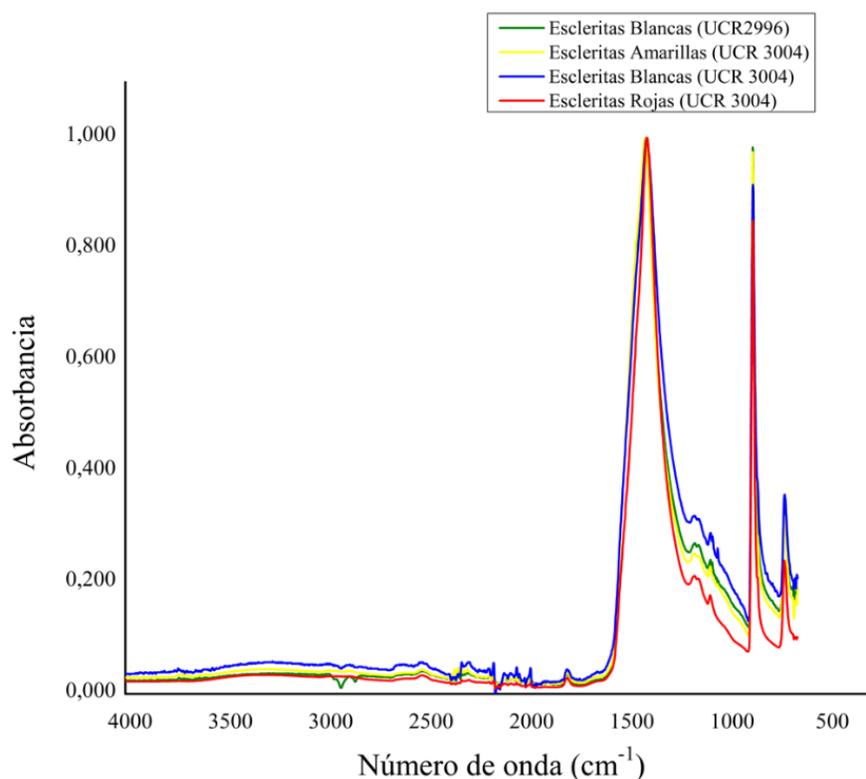
Composición elemental (Wt%)		Carbono (C)	Oxígeno (O)	Calcio (Ca)	Magnesio (Mg)	Mg/Ca
Esclerita roja UCR 3004	Centro Externo	39.0	35.5	23.9	1.3	0.05
	Centro Interno	19.2	48.1	28.5	2.8	0.10
	Borde Externo	43.3	32.2	23.0	1.1	0.05
	Borde Interno	24.4	45.5	26.1	2.6	0.10
Esclerita blanca UCR 3004	Centro Externo	34.9	36.4	27.0	1.5	0.06
	Centro Interno	18.7	45.6	29.6	2.9	0.10
	Borde Externo	40.8	34.0	23.7	1.3	0.05
	Borde Interno	23.3	46.7	25.9	2.6	0.10
Esclerita blanca UCR 2996	Centro Externo	31.8	36.1	30.3	1.4	0.05
	Borde Externo	34.9	34.7	28.6	1.5	0.05

En la Figura 21 se muestra el espectro IR obtenido para los dos cromotipos en estudio (UCR 2996 y UCR 3004), de forma general, tanto para las tres muestras del cromotipo blanco con puntas rojas (UCR 3004) como para la muestra UCR2996, una vez normalizados los datos obtenidos se obtuvo un espectro con picos de intensidades similares, sin embargo, al ser por la técnica de ATR no se puede brindar una comparación sobre el aumento o disminución de componentes, en general la mayoría de las señales se encuentran reportadas en la zona de infrarrojo medio entre 2000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ .

En el Cuadro IV, se muestran los valores para los picos de mayor predominancia de cada una de las muestras y su respectiva comparación con los diferentes valores reportados en la literatura para cada uno de los picos, coincidiendo entre sí. Para todas las muestras, como se observa en la Figura 21, la banda de absorción más ancha es la que se reporta aproximadamente a los 1400 $\text{cm}^{-1}$ , esta banda corresponde a la vibración ( $\nu_3$ ) de estiramiento asimétrico junto con la banda cercana a 871  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde a una vibración ( $\nu_2$ ) de flexión fuera de plano, ambas bandas son características del anión de carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) (Fleet, 2009).

En la literatura se reportan de 700 a 745 $\text{cm}^{-1}$ , señales características según el polimorfo de carbonato de calcio, para la calcita en dicha región se presenta un pico alrededor de los 713 $\text{cm}^{-1}$ , mientras que para la aragonita también se presenta un pico a 713 $\text{cm}^{-1}$ , sin embargo, debe de estar acompañado por uno a 700 $\text{cm}^{-1}$ , y por último para la vaterita el pico se presenta cercano a los 745 $\text{cm}^{-1}$ . (Loste et al., 2003; Stanienda-Pilecki, 2019; Stanienda, 2016; Vagenas et al., 2003). Como se puede apreciar en el gráfico de la Figura 21 solo se presenta un pico alrededor de los 714 $\text{cm}^{-1}$ , el cual corresponde a la fase calcita.

Otra banda característica del carbonato de calcio es la que se presenta aproximadamente a los 1087 $\text{cm}^{-1}$ , cuando esta señal se presenta en la fase calcita de forma débil, como lo es en este caso según se aprecia en el gráfico, señala que la calcita presenta una estructura cristalina defectuosa, esta señal se aprecia en todas muestras. Por otra parte, en la zona de 2000 a 2600 $\text{cm}^{-1}$ , la literatura señala que estos picos se pueden atribuir a la presencia de calcita magnésica, para todas las muestras en estudio se aprecian señales en dicha zona (Stanienda-Pilecki, 2018, 2019).



**Figura 21.** Espectro de absorbancia FT-IR para las muestras UCR 2996 y UCR 3004 de la especie *Muricea fruticosa*.

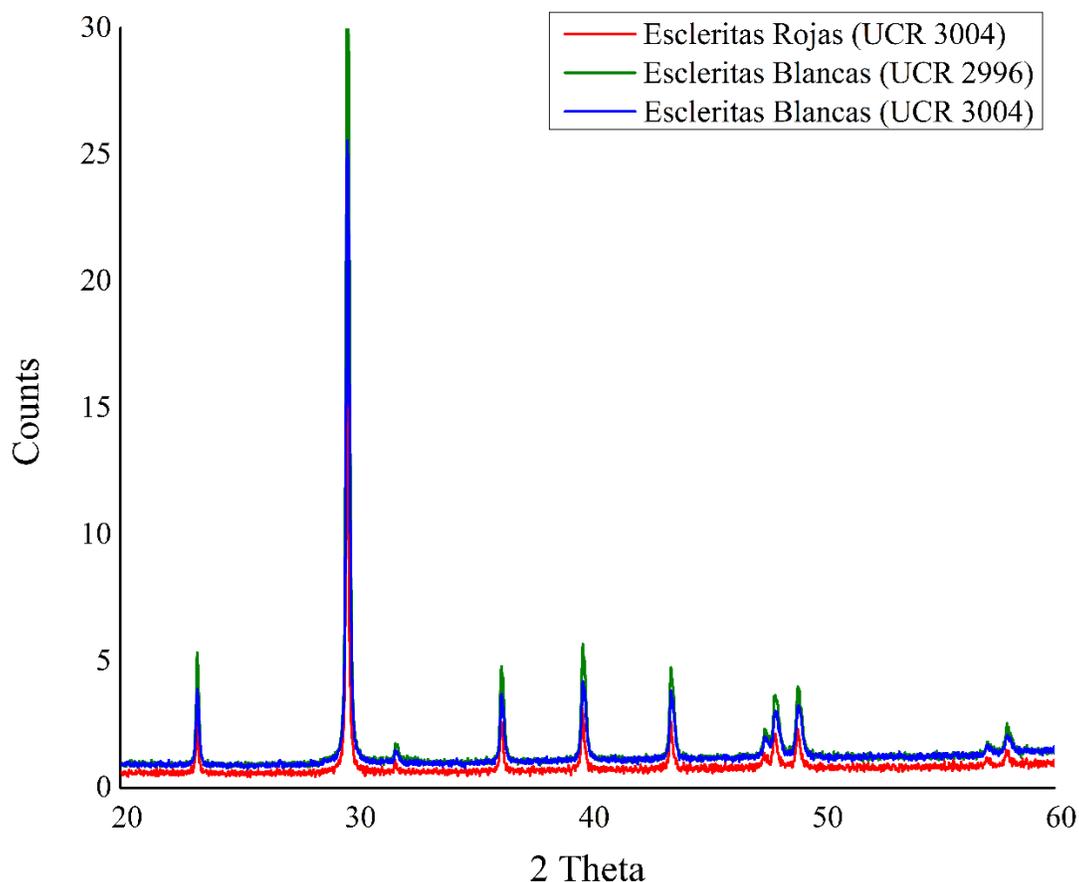
**Cuadro IV.** Señales obtenidas en los espectros IR para las muestras UCR 2996 y UCR 3004 y sus respectivos reportes en la literatura.

Señales	$\nu_4$ (cm <sup>-1</sup> )	$\nu_2$ (cm <sup>-1</sup> )	$\nu_1$ (cm <sup>-1</sup> )	$\nu_3$ (cm <sup>-1</sup> )	$\nu_1 + \nu_4$ (cm <sup>-1</sup> )
Literatura*	713	872	1087	1415	1797
Identificación de señales*	Característico de calcita cuando el pico es simple y en ausencia de pico a 700	Característico de carbonato	Característico de calcita, cuando la señal es débil	Característico de carbonato	Característico de calcita como la suma de $\nu_1 + \nu_4$
UCR 2996a	714,303	871,557	1084,262	1406,278	1798,647
UCR 3004b	714,303	871,558	1084,262	1401,880	1799,080
UCR 3004a	715,330	872,714	1085,393	1409,323	1798,647
UCR 3004r	715,330	871,459	1085,393	1401,617	1798,912

\* Literatura consultada (Fleet, 2009; Loste et al., 2003; Stanienda-Pilecki, 2019; Stanienda, 2016; Vagenas et al., 2003)

Otra de las técnicas utilizadas para confirmar la identidad de la estructura de la esclerita, es la difracción de rayos-X (XRD), este análisis se realizó sobre las escleritas que no han pasado por ningún proceso de fijado ni pulido, por lo que solamente se seleccionó un grupo de escleritas de interés y se morterizaron para la medición.

Como se muestra en la Figura 22 se graficaron los datos correspondientes para las escleritas blancas de la muestra UCR 2996 y para las escleritas blancas y rojas de la muestra UCR 3004, al sobreponer un espectro con otro se puede apreciar que los espectros coinciden entre sí, por lo que la estructura inorgánica que podemos obtener con esta técnica se muestra que es la misma para todas, por otra parte, las señales obtenidas coinciden con la calcita magnésica reportada en publicaciones de autores como Nash y Rahman (Nash et al., 2013; Rahman et al., 2013).

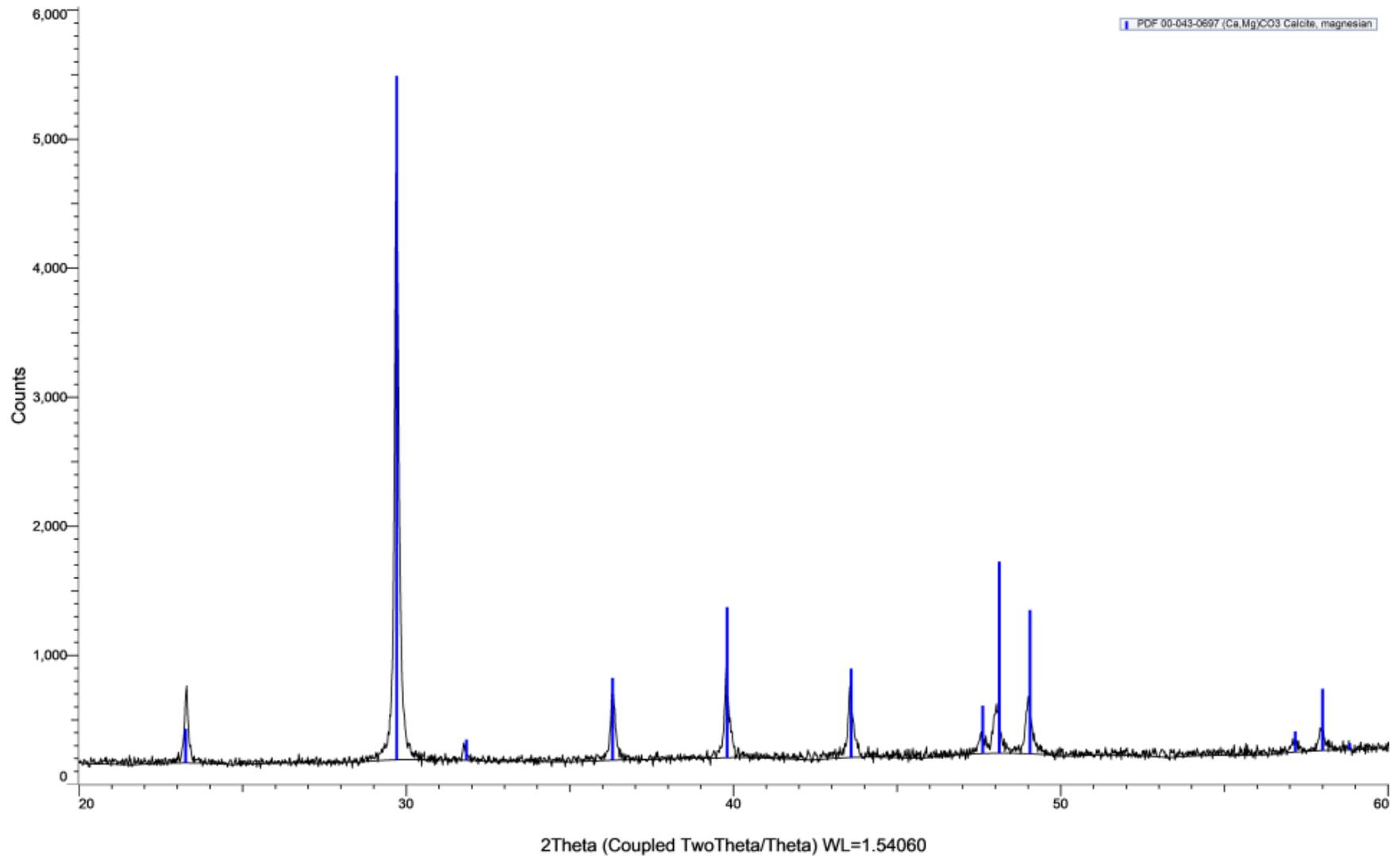


**Figura 22.** Diafractograma XRD para las escleritas blancas y rojas de la muestra UCR 3004 y escleritas blancas de la muestra UCR 2996, especie *Muricea fruticosa*.

Una vez obtenidos los difractogramas de las muestras analizadas se comparó los resultados con la base de datos de difracción; de dicha comparación se obtuvo que los picos no coincidían propiamente con las señales de calcita y aragonita, ya que mostraba señales que no correspondían, sin embargo, al compararlo con la fase calcita magnésica se obtuvo un espectro donde coincidían todas las señales, como se muestra en la Figura 23, para la muestra de las escleritas rojas (UCR 3004), así mismo las muestras de escleritas blancas (UCR 3004 y UCR 2996), presentaron las mismas señales.

La calcita magnésica es un mineral característico especialmente en el área geológica en el estudio de las rocas calizas (Stanienda-Pilecki, 2018). Sin embargo, a nivel marino se ha reportado que el agua contiene altas concentraciones de  $Mg^{2+}$  en relación con las concentraciones de  $Ca^{2+}$ , por lo que durante la cristalización in vivo en presencia de  $Mg^{2+}$  se produce una modificación de la morfología del carbonato de calcio alterando así las distintas fases de este mineral, por ejemplo,  $Mg^{2+}$  inhibe el crecimiento de la calcita (Lin & Singer, 2009; Rahman et al., 2011; Tanaka et al., 2019). Algunos de los organismos marinos que se conoce que contienen calcita magnésica son los foraminíferos, equinodermos, corales rojos, gusanos calcáreos, entre otros (Floquet & Vielzeuf, 2012; Long et al., 2014).

La espectroscopía Raman, es otra de las técnicas utilizadas para la identificación de compuestos, ya que dichos espectros son como una huella específica que sirvió para complementar los resultados obtenidos con el FTIR-ATR y el XRD. Por medio de esta técnica se confirmó la misma estructura mineralógica de calcita magnésica obtenida anteriormente, debido a que en los espectros Raman (mostrados en el siguiente capítulo, en las Figuras 26 a la 30) se reportó un pico característico a  $1080-1090\text{cm}^{-1}$ , correspondiente al estiramiento simétrico del enlace simple C-C de la estructura de carbonato, a la vez todas las muestras presentaron una señal simple por encima de los  $710\text{cm}^{-1}$  indicativo de calcita (Comeau et al., 2019; DeCarlo, 2018; Oliveira et al., 2013). Por lo tanto, todas las muestras UCR 3004 y UCR 2996, cuentan con una estructura mineralógica de calcita magnésica.



**Figura 23.** Comparación de espectros con la calcita magnésica reportada en la base de datos de XRD.

## Capítulo IV. ¿Qué es el color y cómo está distribuido en las esclerita?

Como se ha visto a lo largo del trabajo la coloración del octocoral está dada por las escleritas, ya que estas se encuentran distribuidas a lo interno y externo de la colonia. Al igual que se reporta en la literatura y como se pudo observar en el capítulo anterior, la estructura de carbonato de calcio no es la que brinda la coloración, sino que dentro de la estructura se encuentra un pigmento que da la coloración, cuando se da el proceso de acreción las diversas partículas de carbonato de calcio incorporan el pigmento respectivo (L. Maia et al., 2011).

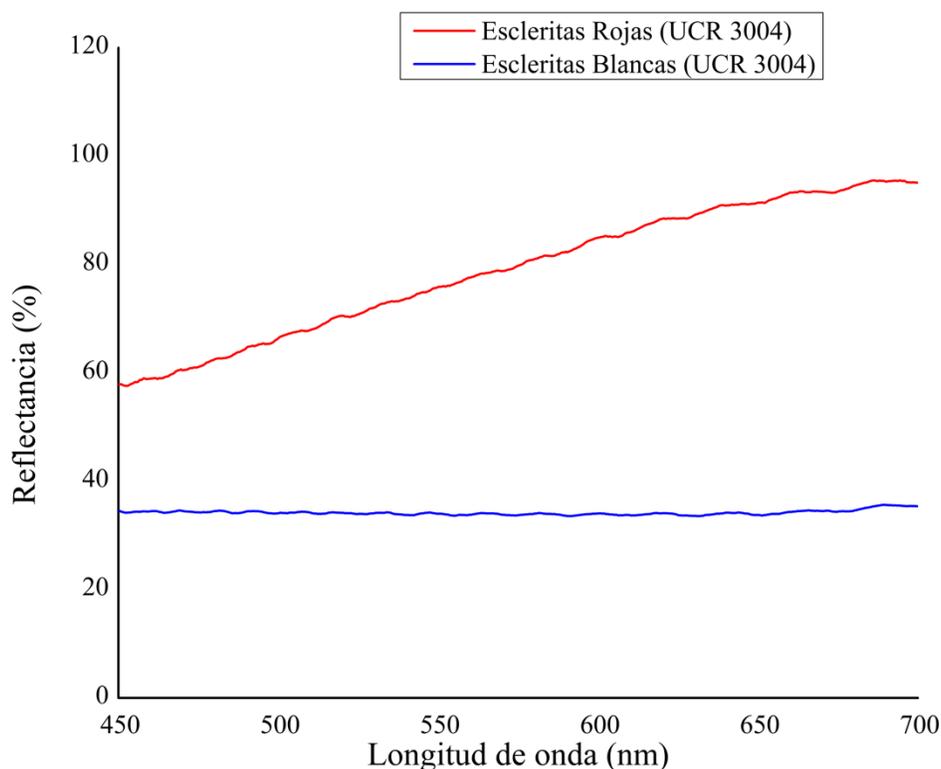
Los pigmentos orgánicos están compuestos de cadenas de carbonos conjugadas que son los responsables de dar el color rojizo, amarillo o naranja a octocorales y a diversos organismos, sin embargo, la estructura exacta de estos compuestos orgánicos está todavía en discusión, algunos estudios sugieren que esta coloración se debe a carotenoides o parrodienos (Fürst et al., 2016; L. Maia et al., 2011; Maoka et al., 2011).

Este tipo de pigmentos, en el caso de los octocorales que tienen zooxantelas puede ser tomado de procesos fotosintéticos, pero para aquellos que no realizan procesos fotosintéticos como es el caso de la especie en estudio, pueden capturar el pigmento de la dieta. En general los animales absorben los carotenoides por medio de su alimentación y los transforman en otras sustancias que logran incorporar a sus tejidos por medio de las células gastrodermales que se encargan de su distribución (Bracco et al., 2016; L. F. Maia et al., 2013; Maoka et al., 2011).

Para determinar cómo está distribuido el color y aproximar la identidad del pigmento de la especie *Muricea fruticosa* se le realizaron distintos análisis, entre ellos espectroscopia visible para comprobar que el color que refleja corresponda con la longitud de onda en el espectro visible, por otro lado se utilizó la espectroscopia Raman para aproximar la identidad del compuesto así como un mapeo de la superficie externa y la sección interna, por lo que se puede obtener información sobre la distribución del pigmento en la esclerita.

Las escleritas blancas de las muestras UCR 2996 y UCR 3004, no muestran ninguna coloración, caso contrario para las escleritas con coloración rojiza de la muestra UCR 3004. Por lo que se realizó un espectro de reflectancia para confirmar si las regiones del espectro

visible en la que se refleja coinciden con el color que se observa. En la Figura 24, se observa un espectro de reflectancia en el cual las escleritas blancas de la muestra UCR 3004 refleja completamente el haz de luz, sin absorber una longitud de onda específica. Con respecto a las escleritas rojas de la muestra UCR 3004, se muestra una reflectancia en las longitudes de onda entre los 600-700nm, siendo esta la zona de los tonos rojizos del espectro visible.



**Figura 24.** Espectros de reflectancia para las escleritas rojas y las escleritas blancas de la muestra UCR 3004.

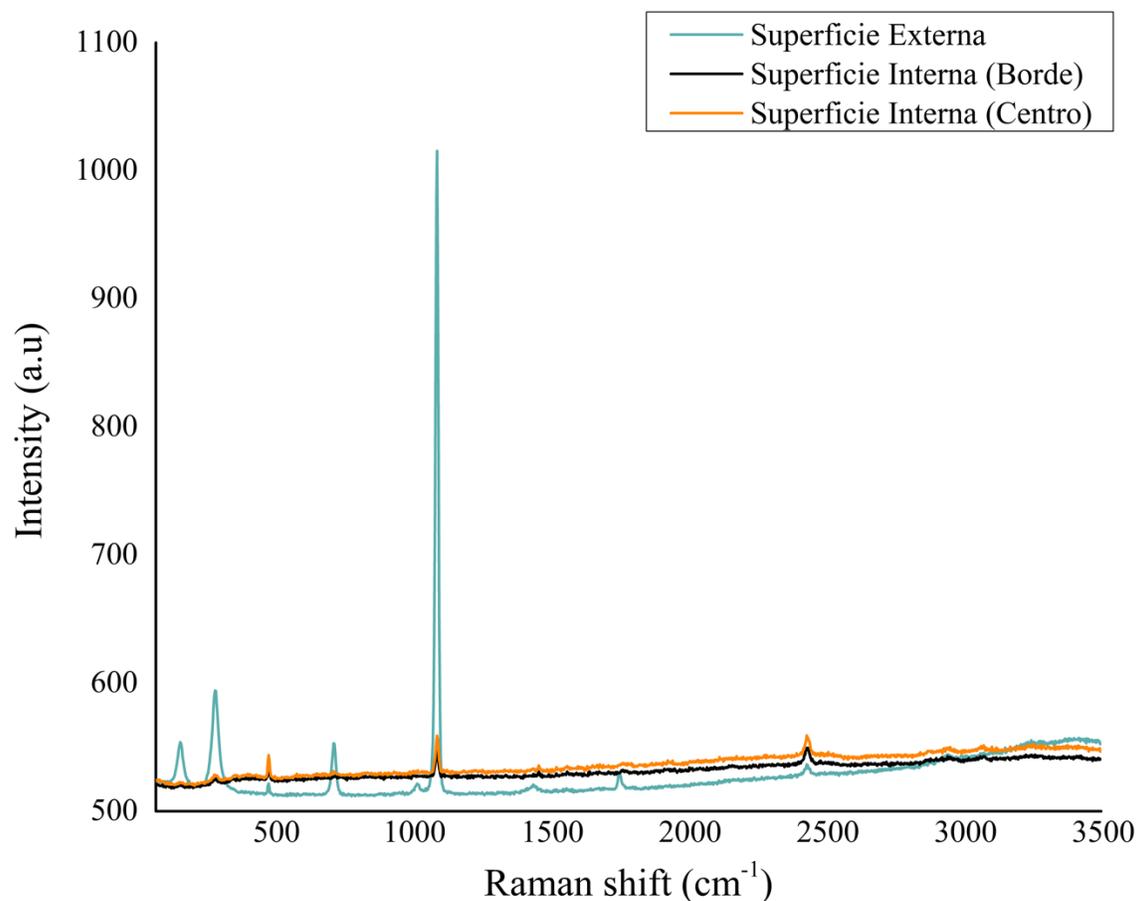
Para cada una de las muestras se realizó una medición Raman de las escleritas en dos áreas superficiales: externa e interna. Para la parte externa se utilizó una esclerita sin pulir ni fijar en resina, con el fin de considerar la capa externa de la estructura, por otra parte, para poder observar el interior de las escleritas, estas fueron fijadas y pulidas y se midió el interior tanto el borde como el centro de cada una de las muestras como se muestra en la Figura 25, esto con el fin de observar si hay diferencias entre la superficie externa e interna de la esclerita y entre el borde y centro de la parte interna.



**Figura 25.** Ejemplo de la sección interna: borde y centro, donde se realizaron los análisis Raman a las escleritas de las muestras UCR 2996 y UCR 3004.

En la Figura 26, se observan los espectros Raman obtenidos para la muestra UCR 2996, tanto de la superficie externa como interna (borde y centro), y en el cuadro V se muestran las señales obtenidas de cada espectro. Los espectros muestran similitud en varias señales, entre ellas las características del carbonato de calcio, como lo son las señales a  $1091\text{ cm}^{-1}$ , la cual está relacionada a un modo vibracional ( $\nu_1$ ) reportado como un estiramiento simétrico del enlace simple C-C, confirmando la presencia del ion carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) presente en todas las muestras. Por otra parte, para determinar de qué polimorfo se trata, se debe observar en la región a  $710\text{ cm}^{-1}$ . Si la señal se muestra por debajo de este valor y además tiene presencia de un pico doble junto con una señal a  $700\text{ cm}^{-1}$  es característico de la aragonita, sin embargo, en todos los espectros encontrados esa señal está por encima de los  $710\text{ cm}^{-1}$ , y es un pico simple, por lo que es indicativo de presencia de calcita, lo que coincide con lo obtenido por difracción de rayos X.

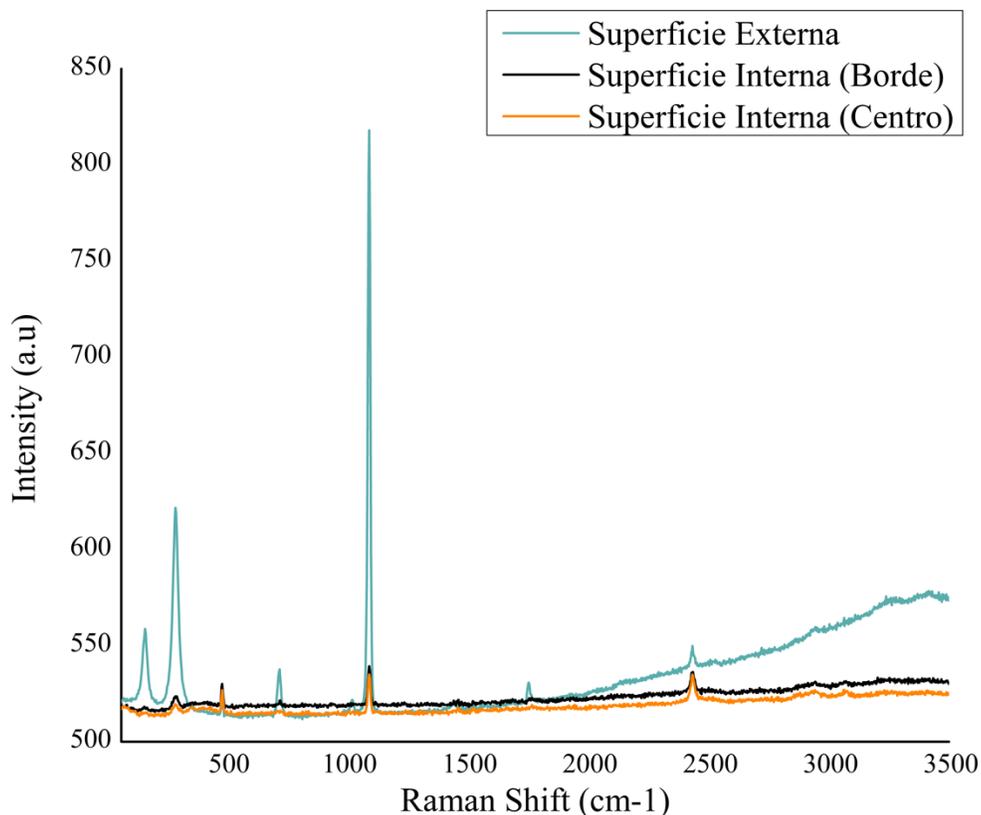
Entre las diferencias que se pueden observar entre las superficies externas e internas, se encuentra que hay 4 picos presentes en la superficie externa que no se encuentran en la superficie interna, estos son a ( $157, 1017, 1436$  y  $1753$ )  $\text{cm}^{-1}$ . Mientras que en la superficie interna tanto del borde como del centro hay una señal a  $1460\text{ cm}^{-1}$  que no se observa en la superficie externa de esta muestra.



**Figura 26.** Espectro Raman de la muestra UCR 2996 correspondientes con las escleritas con tonalidades blancas. Superficie externa e interna (Borde y Centro).

Con respecto al cromotipo blanco con puntas rojas (UCR 3004) como se ha mencionado anteriormente esta dividido en tres grupos de escleritas según su coloración: blanca, amarilla y rojas. En las Figuras 27-29, se muestra los gráficos correspondientes a las superficies externas e internas (borde y centro) de cada esclerita.

Los gráficos mostrados en la Figura 27 y los datos presentados en el Cuadro V, presentan una tendencia similar a las escleritas blancas de la muestra UCR 2996, ya que en la parte superficial las señales más intensas se encuentran en la zona de 157 a 1091  $\text{cm}^{-1}$ , pero al realizar la comparación con la parte interna se observa que ciertas señales relacionadas al carbonato de calcio como lo son las cercanas a 716  $\text{cm}^{-1}$  y 1017  $\text{cm}^{-1}$  cambian de intensidad disminuyendo a lo interno de la esclerita. Por otra parte, al comparar los espectros de la sección interna, se obtiene que presentan señales prácticamente idénticas entre el borde y el centro.

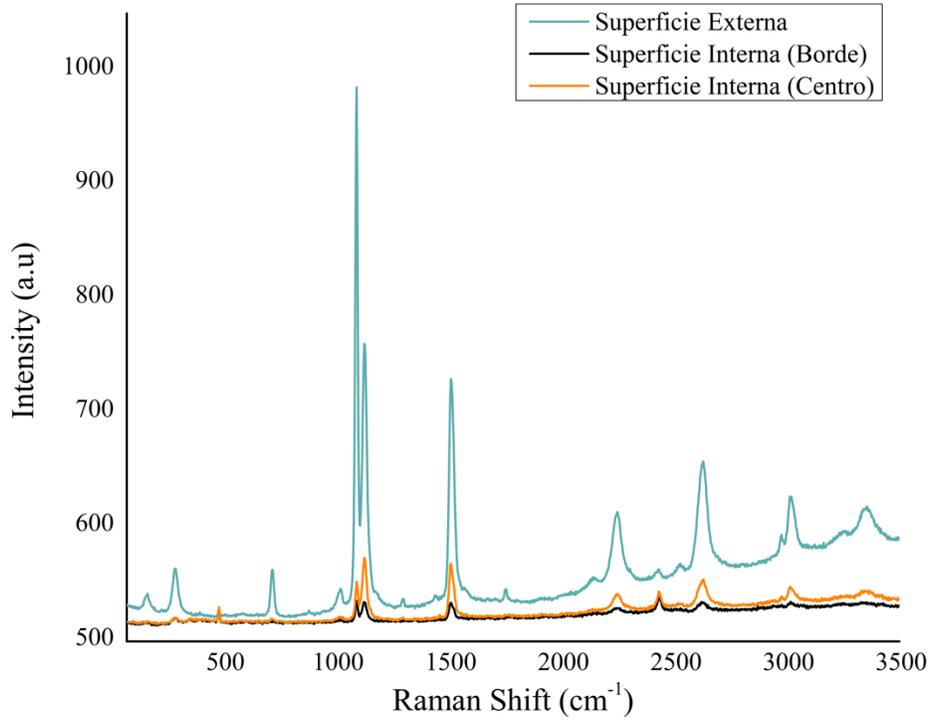


**Figura 27.** Espectro Raman de la muestra UCR3004 correspondientes con las escleritas con tonalidades blancas.

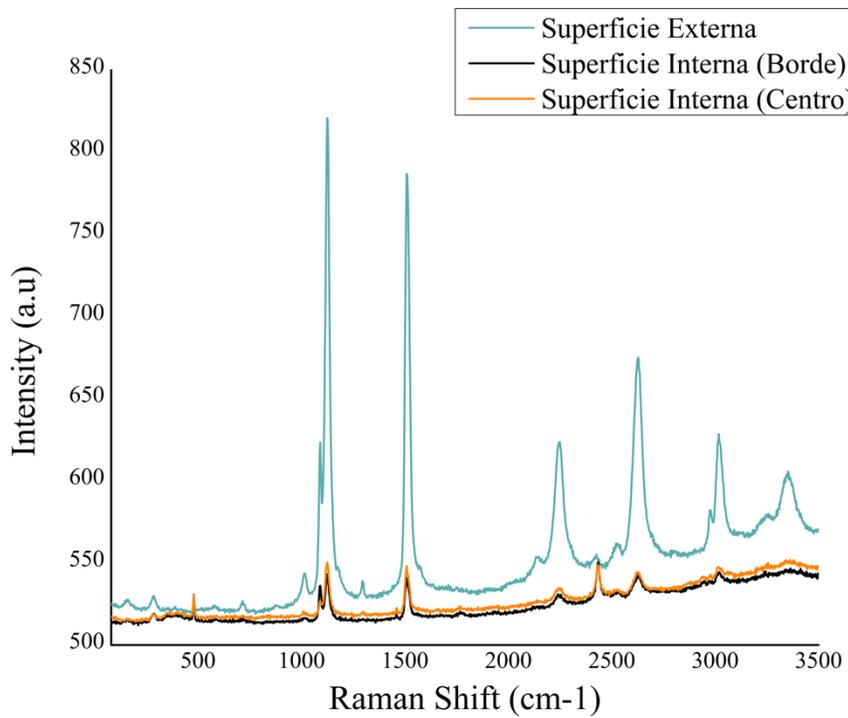
Tanto los gráficos de las Figuras 26 y 27 como los datos de las señales mostrados en el Cuadro V, muestran tendencias similares entre las escleritas blancas de las muestras UCR 2996 y UCR 3004, por lo tanto, al parecer las muestras blancas de ambos cromotipos son iguales en cuanto su espectro Raman.

Ahora bien, las muestras amarillas y rojas presentan espectros Raman diferentes, en general al comparar los espectros de las escleritas blancas con los espectros de las escleritas con color se observa una tendencia de que en los espectros de las escleritas con color muestran una disminución de las señales en la zona de  $100\text{ cm}^{-1}$  a  $2000\text{ cm}^{-1}$  y un aumento de la intensidad y número de señales en especial por encima de  $2000\text{ cm}^{-1}$ .

En las Figuras 28 y 29, se muestran los espectros Raman para las escleritas con coloraciones amarillo y rojo, respectivamente, de igual forma en el Cuadro V, se muestra la presencia o ausencia de las señales para cada esclerita.



**Figura 28.** Espectro Raman de la muestra UCR3004 correspondientes con las escleritas con tonalidades amarillas.



**Figura 29.** Espectro Raman de la muestra UCR3004 correspondientes con las escleritas con tonalidades rojas.

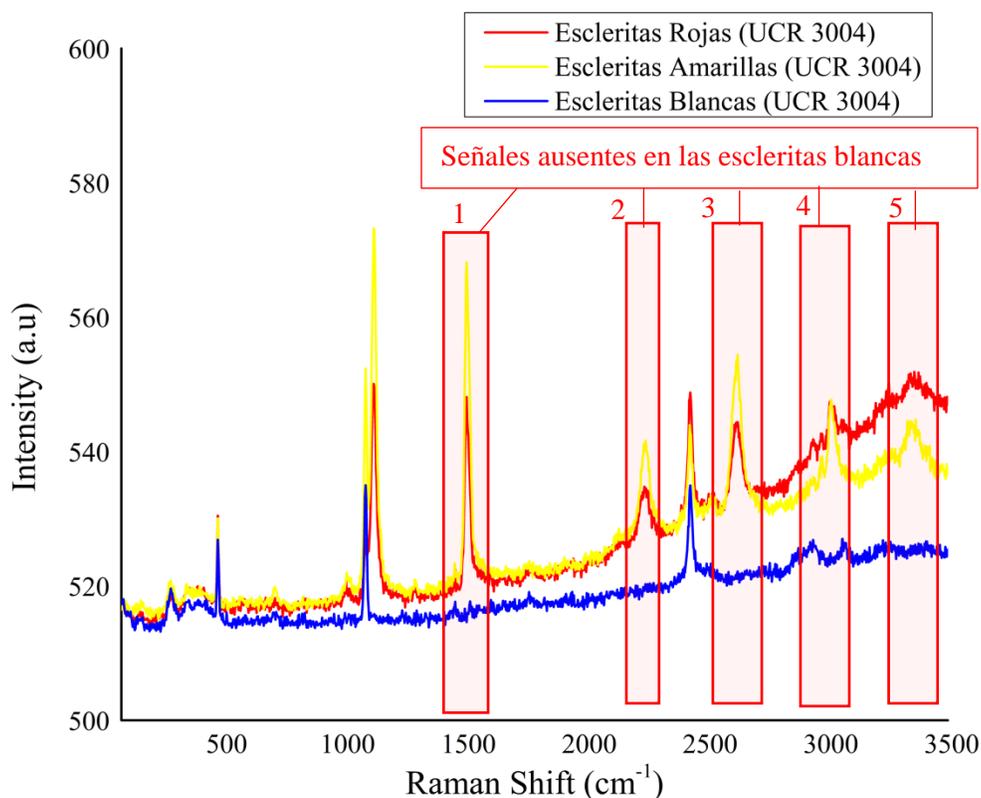
**Cuadro V.** Señales obtenidas en los espectros Raman para las escleritas de las muestras UCR 2996 y UCR 3004.

Señal (cm <sup>-1</sup> )	Escleritas blancas UCR 2996			Escleritas blancas UCR 3004			Escleritas Amarillas UCR 3004			Escleritas rojas UCR 3004			Identificación de señales
	S. Ext	S. Int (B)	S. Int (C)	S. Ext	S. Int (B)	S. Int (C)	S. Ext	S. Int (B)	S. Int (C)	S. Ext	S. Int (B)	S. Int (C)	
157	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	Modo vibratorio traslacional (T) del enlace O-C-O característico de Mg (CaCO <sub>3</sub> )
285	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Modo vibratorio libración (L) del enlace O-C-O característico de Mg (CaCO <sub>3</sub> )
480	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	No reportado en la literatura consultada
716	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Modo vibración $\nu_4$ en plano de flexión, característico de la fase calcita
1017	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	Señal en esta banda es atribuida a ion bicarbonato (HCO <sub>3</sub> )
1091	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Modo vibración $\nu_1$ en estiramiento asimétrico, característico de la fase calcita
1123	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Enlace simple (C-C) con modo vibracional $\nu_2$
1295	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	Modo vibración $\nu_4$ , identificado para enlaces CH=CH
1441	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Modo vibratorio traslacional (T) del enlace O-C-O característico de Mg (CaCO <sub>3</sub> )
1460	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Doble enlace (C=C) como modo de estiramiento ( $\nu_1$ )
1508	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Doble enlace (C=C) como modo de estiramiento ( $\nu_1$ ) asignado a compuestos como polienos
1753	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Modo vibracional correspondiente a un enlace doble C=O de compuestos como piridina.
2137	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	No reportado en la literatura consultada
2246	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	No reportado en la literatura consultada
2426	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Vibración orgánica sobretono
2435	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	No reportado en la literatura consultada
2527	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	No reportado en la literatura consultada
2626	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	No reportado en la literatura consultada
2946	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	No reportado en la literatura consultada
2975	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	No reportado en la literatura consultada
3017	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	No reportado en la literatura consultada
3069	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	No reportado en la literatura consultada
3353	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	No reportado en la literatura consultada

Simbología: (+): Presencia de señal, (+): Presencia de señales en todas las muestras, (+): Presencia de señales en escleritas con pigmento (-): Ausencia de señal, S. Ext: Superficie Externa, S. Int (B): Superficie Interna (Borde), S. Int (C): Superficie Interna (Centro)

En general ambos cromotipos (amarilla y roja) en estudio muestran un patrón muy similar, dado que todas cuentan con señales correspondientes a la fase calcita del carbonato de calcio. Asimismo, los espectros que fueron tomados en la superficie interna de la esclerita muestran un gráfico con menos señales y menos ruido en comparación con los tomados en la superficie externa, lo cual puede estar asociado a la rugosidad de la muestra, y cristalinidad de las muestras como se mencionó anteriormente. Además, las señales diferenciadoras que se pueden atribuir al pigmento se encuentran tanto dentro como en la superficie externa de la esclerita. Lo que indica que el pigmento no es algo superficial, y se incorporó dentro de la biogénesis de la esclerita.

Al superponer los gráficos de la muestra UCR 3004 se obtiene la Figura 30, en la cual, junto con los datos del Cuadro V, es posible distinguir cuales señales pueden ser asociadas al pigmento, ya que están ausentes en las escleritas blancas. Además, en primera instancia se puede indicar que el pigmento es el mismo en ambas muestras amarillas y rojas, puesto que presentan señales muy similares.



**Figura 30.** Espectro Raman para la muestra UCR3004.

Al observar en la Figura 30 que la intensidad de señal es mayor en las muestras rojas, se realizó una normalización de los datos utilizando como señal de referencia la intensidad brindada por el pico de calcita a  $1090\text{ cm}^{-1}$  (el cual está presente en todas las muestras). Al realizar dicho cálculo (Cuadro VI.) se pudo confirmar que la intensidad de señal es mayor en las escleritas rojas por lo que podría considerarse que la concentración de dicho pigmento es mayor en las escleritas rojas.

**Cuadro VI.** Relación de intensidad entre las señales presentes en las escleritas rojas y amarillas mostradas en la Figura 30.

<b>Esclerita</b>	<b>Señal</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>Relación de intensidad</b>
<b>Amarilla</b>	<b>Referencia</b>	1090.928	563.871	
	<b>1</b>	1508.290	561.759	0.996
	<b>2</b>	2245.953	541.164	0.960
	<b>3</b>	2626.828	550.790	0.977
	<b>4</b>	3015.508	547.289	0.971
	<b>5</b>	3347.156	551.578	0.978
<b>Roja</b>	<b>Referencia</b>	1090.137	526.693	
	<b>1</b>	1508.290	547.867	1.040
	<b>2</b>	2243.911	534.595	1.015
	<b>3</b>	2624.877	544.056	1.033
	<b>4</b>	3018.197	544.623	1.034
	<b>5</b>	3344.557	542.605	1.030

Para aproximar la identidad del pigmento, se utilizó la diferencia de señales entre las escleritas con color y las escleritas blancas las cuales son las señales que se muestran en las regiones a (1123, 1508, 2246, 2626 y 3017)  $\text{cm}^{-1}$ , de la Figura 30, a la vez se comparó con lo reportado en la literatura y bases de datos del equipo, junto con la comparación de espectros Raman realizados experimentalmente a muestras de carotenoides grado patrón.

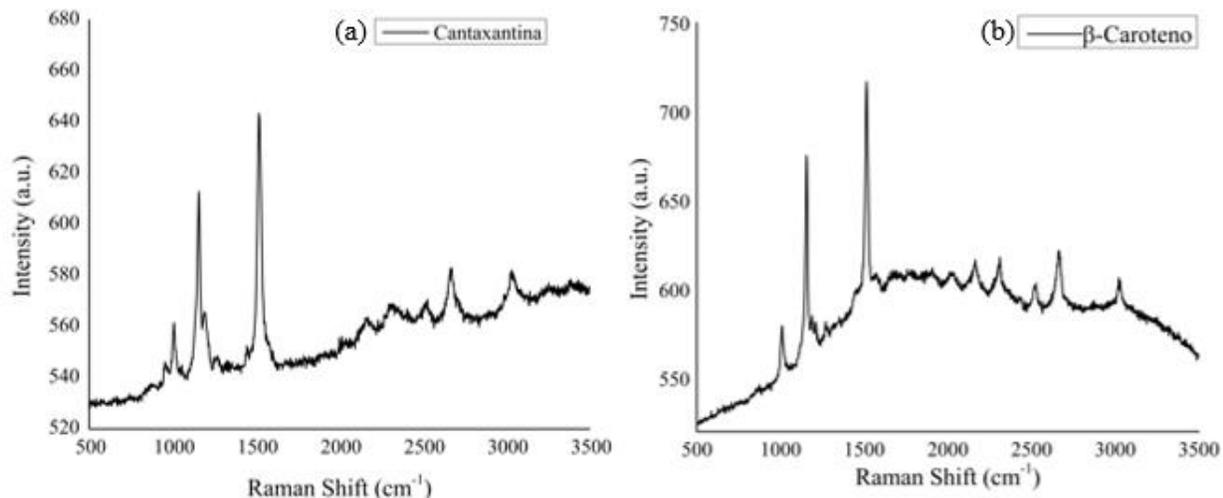
En la literatura se ha reportado algunas bandas principales, por ejemplo, en la región cercano a (1501-1520)  $\text{cm}^{-1}$  se da una señal correspondiente a un doble enlace (C=C) como modo de estiramiento ( $\nu_1$ ), también para la identificación de pigmentos las bandas en una zona cercana a (1130-1119)  $\text{cm}^{-1}$  hace referencia a un enlace simple (C-C) estas señales son asignadas en función de dobles enlaces de carbono en las cadenas de polienos insaturados; otra de las bandas reportadas en la literatura se da a  $1010\text{ cm}^{-1}$  derivada de deformaciones de

grupos metilo presentes en los carotenoides así como bandas a (1155-1160)  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a carotenoides (Fürst et al., 2016; L. Maia et al., 2011; Oliveira et al., 2013).

Por otra parte, L. Maia et al, 2011, reportaron la identidad de diferentes pigmentos que provocan la coloración en distintos octocorales, por ejemplo, para la especie *Gorgonia ventalina* se reportó que el pigmento morado se debe a una mezcla de polienos a partir de la identificación de aldehídos poliinsaturados no metilados como el pigmento violeta / púrpura (L. Maia et al., 2011).

En otras investigaciones del autor anterior (L. Maia et al., 2013) sugirió para las especies *Phyllogorgia dilatata*, *Muricea atlántica* y *Carijoa riisei*, la presencia de carotenoides debido a las bandas a (1540-1520, 1159 y 1005)  $\text{cm}^{-1}$  asignadas a los modos  $\nu_1(\text{C}=\text{C})$ ,  $\nu_2(\text{C}-\text{C})$  y  $\rho_3(\text{C}-\text{CH}_3)$ , respectivamente; en esa misma publicación señalan que las especies *Muricea flamma*, *Renilla muelleri* y *C. braziliensis*, cuentan con pigmentos que han sido identificados como polienos conjugados no metilados debido a las bandas a (1500 y 1120)  $\text{cm}^{-1}$  asignadas a las vibraciones  $\nu(\text{C}=\text{C})$  y  $\nu(\text{C}-\text{C})$ , respectivamente (L. F. Maia et al., 2013).

Se analizó dos patrones de diferentes familias de carotenoides, en la Figura 31 (a) se observa el espectro Raman para la cantaxantina y en la sección (b) el espectro para el  $\beta$ -caroteno, en ambos espectros se pueden observar las bandas características para los carotenoides reportadas en la literatura las cuales aparecen a (1007, 1155 y 1513)  $\text{cm}^{-1}$ .



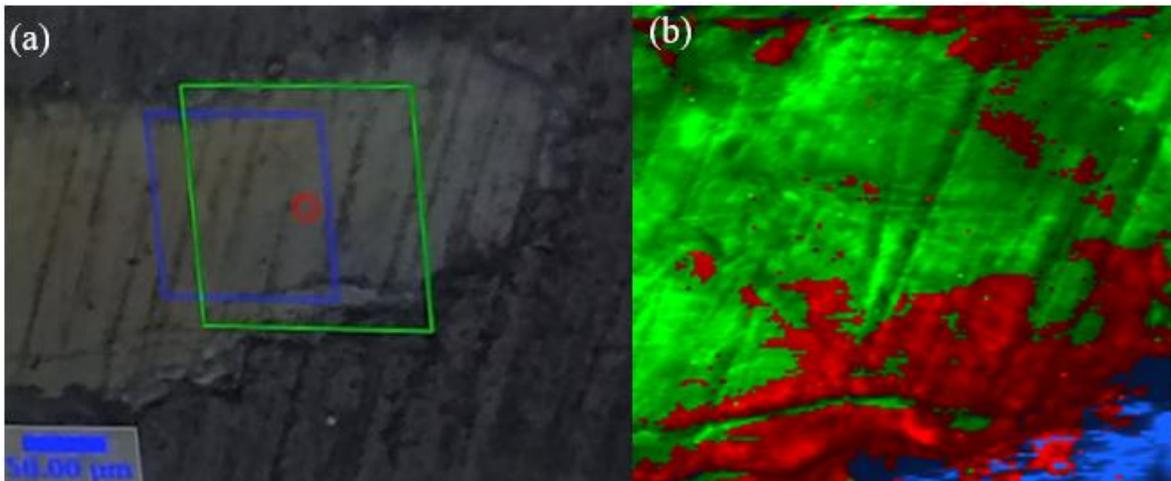
**Figura 31.** Espectro Raman del patrón de (a)  $\beta$ -caroteno y (b) Cantaxantina.

A pesar de que se han reportado la identidad de algunos pigmentos para la coloración de diversas especies de octocorales, aún no se ha identificado o aproximado el compuesto que brinde la coloración para la especie, *Muricea fruticosa*.

A partir de lo reportado en diferentes fuentes bibliográficas como en Kupka et al, 2010, Maia et al, 2011, Bracco et al, 2016, entre otros, y de los espectros de los patrones de carotenoides, se puede obtener ciertos detalles del pigmento que está presente en las escleritas con coloración rojiza y de la especie en estudio, el primero de ellos, se debe a que al comparar los espectros de la coloración rojiza-amarilla contra los espectros de los pigmentos de  $\beta$ -caroteno y cantaxantina, no hay similitudes entre ellos por lo tanto, el pigmento en estudio no presenta relación con estas familias de carotenoides (Bracco et al., 2016; Kupka et al., 2010; L. Maia et al., 2011).

Para la identificación de señales se tomó ámbitos de valores aproximados y se reportaron en el Cuadro V, se dejó de lado las señales correspondientes del carbonato de calcio, se tiene que hay una señal a  $(1122-1124) \text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la interacción de un enlace simple (C-C), a la vez se tiene otra señal común a  $(1502-1515) \text{ cm}^{-1}$  producida por la vibración  $\nu_1$  de los dobles enlaces (C=C) de la cadena, en la literatura consulta no se reportaron señales por arriba  $2000 \text{ cm}^{-1}$ , en el artículo reportado por Kupka et al, 2010, se muestran señales en esas zonas, sin embargo, solamente se identifican como sobretonos orgánicos. Un factor interesante es que hay ausencia de los picos característicos de los carotenoides los cuales corresponden a  $(1155-1160) \text{ cm}^{-1}$ , por lo que posiblemente la identidad de este compuesto este relaciona con mezclas de cadenas de polienos y no de carotenoides (Kupka et al., 2010).

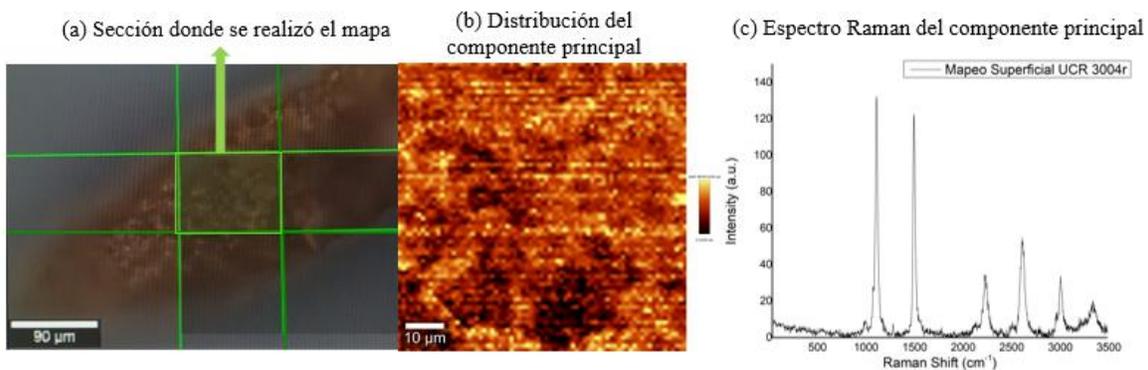
Para observar la distribución del color se realizó un mapeo por espectroscopia Raman de la parte interna y externa de la esclerita con tonos rojizos, como se observa en la Figura 32, en la sección (a) el cuadro verde señala la parte de la esclerita en la que se realizó la medición, al lado (b) de la Figura se realizó un mapeo de esa área de la esclerita en la que el color verde corresponde a la parte de la esclerita que tiene mayor concentración del pigmento, las partes rojas corresponde a una concentración baja del pigmento y las azules se atribuyen a la resina en la que están fijadas las escleritas. Al realizar este mapeo se pudo determinar que la coloración de la esclerita no está distribuida de forma homogénea, ya que hay una mayor intensidad en el centro por lo que se da la coloración desde el centro hacia los bordes.



**Figura 32.** Mapeo Raman de la parte interna de la esclerita roja de la muestra UCR3004.

(a) El cuadro verde representa el sector de la esclerita donde se realizó el mapeo. (b) imagen obtenida, color verde: alto en pigmento, color rojo: bajo en pigmento, color azul: polímero de la resina.

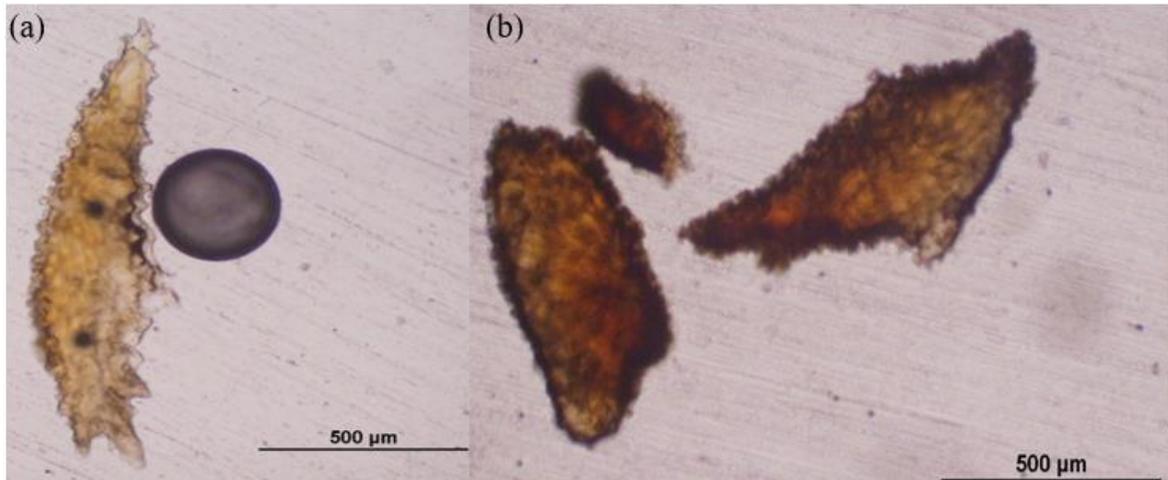
En la siguiente Figura se observa un mapeo Raman de la parte externa de la superficie de la esclerita, en la sección (b) de esta Figura se observa una distribución más homogénea del componente que en la parte interna, sin embargo, esto se puede deber a la superposición de las capas. Por otra parte, el espectro mostrado en la sección (c), muestra una tendencia similar a los gráficos mostrados en el capítulo anterior, por lo que la coloración que se observa a lo interno y externo está brindada por el mismo componente.



**Figura 33.** Mapeo Raman de la parte externa de la esclerita roja de la muestra UCR3004.

(a) El cuadro verde representa el sector de la esclerita donde se realizó el mapeo. (b) imagen obtenida, muestra la distribución del pigmento a nivel externo. (c) espectro Raman del componente principal.

En cuanto a la distribución heterogénea del pigmento en las escleritas, además de apreciarlo en el mapeo Raman, también se puede observar ópticamente, como se ejemplifica en la Figura 34, se puede ver como el pigmento está distribuido de manera no uniforme, en las áreas centrales hay una mayor concentración del pigmento con respecto a los bordes.

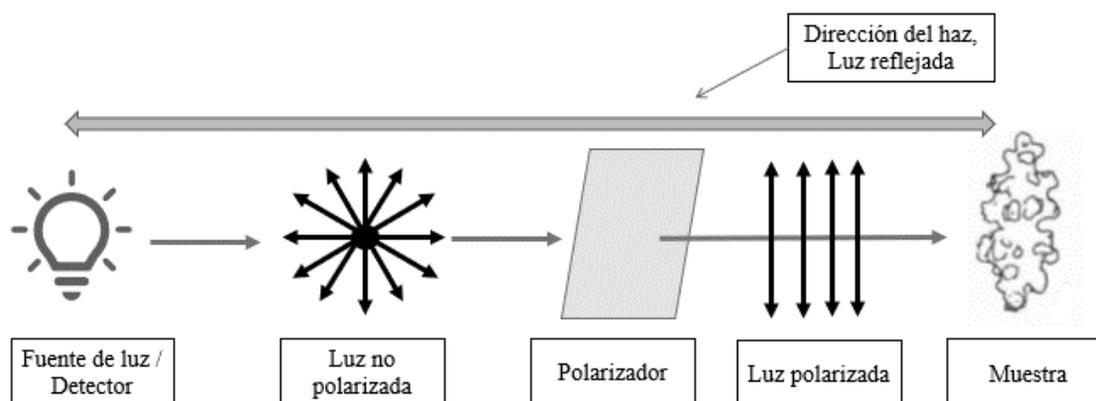


**Figura 34.** Micrografía en microscopio invertido para las escleritas de la especie *Muricea fruticosa* (a) Escleritas amarillas y (b) Escleritas rojas de la muestra UCR 3004.

## Orientación cristalográfica de las escleritas

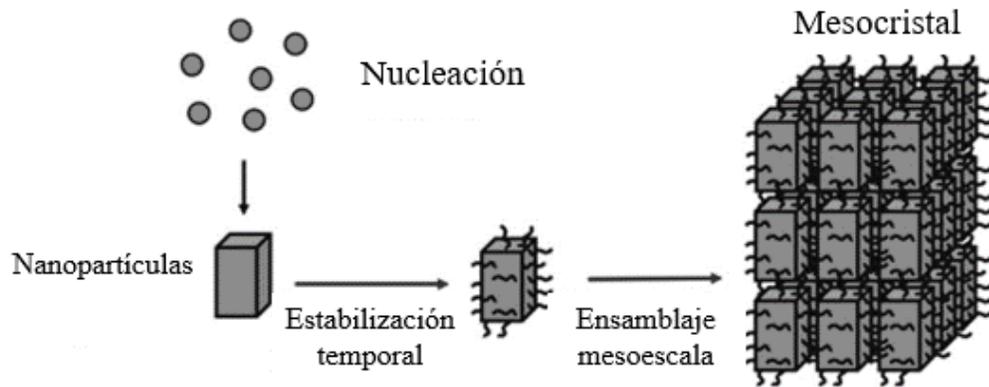
Los análisis presentados en los anteriores capítulos muestran una tendencia similar en la composición mineralógica de las distintas escleritas, así como su composición química. Por lo que se decidió observar si existen diferencias entre las escleritas rojas y blancas, frente a la luz polarizada. Se utilizó solamente de la muestra UCR 3004 para este análisis.

Las estructuras macroscópica de las escleritas están formadas por agregación de cristales submicrométricos de carbonato de calcio, estos cristales generalmente cuentan con una orientación espacial predispuesta (Carlo et al., 2011). Una de las técnicas que permite obtener información sobre la orientación cristalina es la luz polarizada, para la cual se utilizó un sistema como el mostrado en el diagrama de la Figura 35. En términos de cristalografía, la microscopía de polarización indicaría si las estructuras de las escleritas se comportan como un mesocristal con una extinción global homogénea.



**Figura 35.** Polarización de la luz. Diseño de experimento utilizado para el análisis de las muestras.

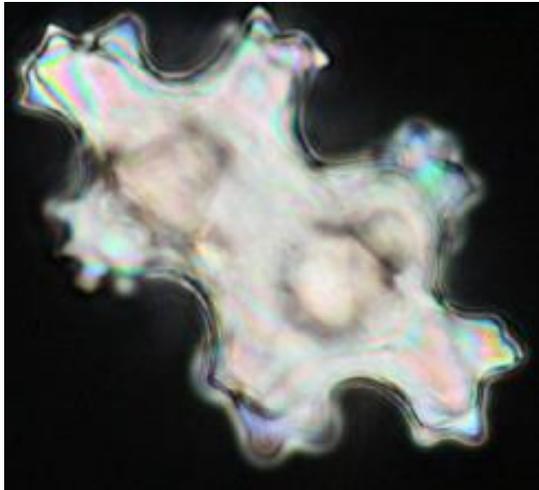
Un mesocristal es definido como una estructura compuesta por numerosos nanocristales de tamaño y forma similares, que se disponen en un patrón periódico regular. Es una forma de agregación orientada, en la que los pequeños cristales tienen una alineación cristalográfica, pero están separados espacialmente, en la Figura 36, se observa un diagrama de su conformación (Sturm & Cölfen, 2016, 2017).



**Figura 36.** Diagrama de la formación de un mesocristal (Sturm & Cölfen, 2016).

Otra característica asociada a este fenómeno de orientación cristalina dentro de la esclerita es la birrefringencia. La birrefringencia óptica describe la diferencia en el índice de refracción de la luz que viaja en diferentes estados de polarización dentro de materiales anisótropos, este fenómeno varía con el grosor y la ubicación en relación con el eje de giro. Las escleritas tanto rojas como blancas son birrefringentes, mostrando así su naturaleza anisotrópica en su ordenamiento mesocristalino, esta propiedad es atribuida a su estructura de carbonato de calcio (Chen et al., 2018; Cranston & Gray, 2008).

Estos fenómenos que implican ordenamiento cristalino ya han sido reportados en otros organismos marinos como los corales rojos (*Corallium rubrum*), los cuales también están conformados por escleritas que tienen una estructura cristalina de calcita magnésica. En la investigación publicada por Floquet y Vielzeuf, 2012, se ha reportado que las escleritas en presencia de luz transmitida son estructuras transparentes con complejos patrones de contraste birrefringentes, a la vez cuando se observan ante luz reflejada o polarizada se observa un contraste uniforme como el que se aprecia en la Figura 37, este contraste uniforme es el resultado de una única orientación cristalográfica, por lo que cada esclerita se comporta como un único cristal de calcita, aunque estén conformados por cristalitas de calcita separados (Floquet & Vielzeuf, 2012).



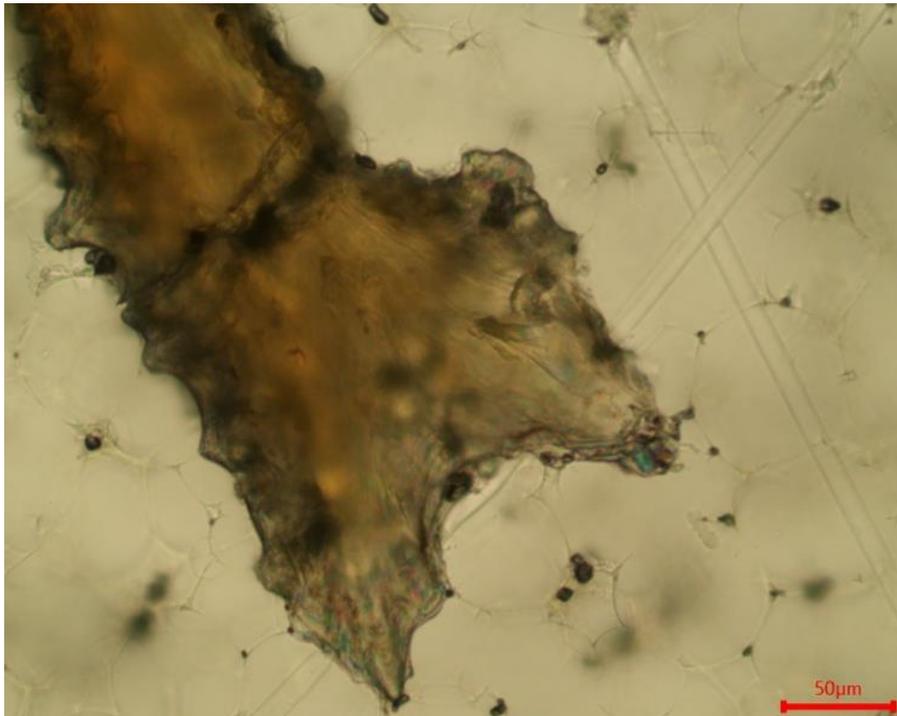
**Figura 37.** Imagen óptica con luz polarizada de la esclerita de la especie *Corallium rubrum* (Floquet & Vielzeuf, 2012).

El fenómeno mencionado anteriormente se confirmó debido a que las escleritas fijadas y pulidas en resina, fueron observadas con luz polarizada y se midió su espectro de reflectancia UV-Visible. El diagrama mostrado en la Figura 35, ejemplifica el esquema de experimento utilizado, en el cual se utilizaron 3 filtros polarizadores, para poder medir con esta técnica el fenómeno de coloración estructural.

Espectros de reflexión de la muestra se adquirieron colocando la muestra en una posición normal con respecto a un haz de luz blanca colimado, como se ve en Figura 35. Se colocó un polarizador tanto frente a la fuente de luz como en la luz que ingresa al detector. Diferentes espectros de reflexión fueron adquiridos girando el polarizador alrededor de la propagación del haz en 3 direcciones: luz polarizada a  $45^\circ$ , la luz polarizada paralelamente y por último el haz de luz polarizado perpendicularmente. La luz se reflejó en la muestra de esclerita y pasó nuevamente por el polarizador y luego fue registrado por un espectrómetro. También se obtuvo un espectro con luz sin polarizar.

En la Figura 38, se colocó una esclerita pulida y fijada en resina bajo un haz de luz polarizada, el cual permitió ver la estructura de formación de capas, además de que en las secciones donde no hay pigmento se aprecia el fenómeno de birrefringencia, por lo que se confirma que esta propiedad está dada por ese acomodamiento estructural y no por el pigmento, posiblemente estas escleritas presentan el mismo fenómeno mencionado por

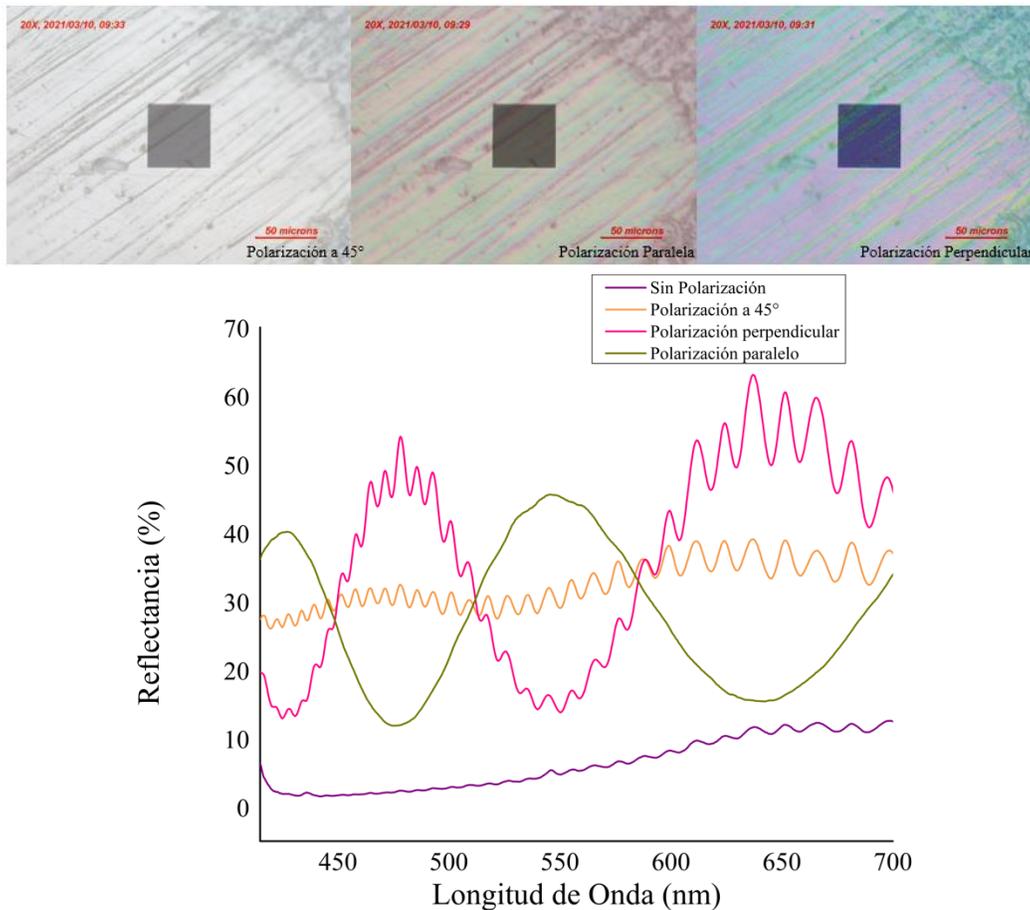
Floquet y Vielzeuf, 2012, donde la esclerita se comporta como un único cristal de calcita, aunque estén conformados por estructuras más pequeñas (Floquet & Vielzeuf, 2012).



**Figura 38.** Esclerita roja de la muestra UCR 3004 bajo un microscopio de luz polarizada.

La Figura 39 muestra los espectros para las escleritas rojas. En primera instancia podemos observar en las fotografías a los distintos ángulos de polarización, que los colores reflejados son distintos entre sí, para la luz polarizada perpendicular (tonos verdes) y paralelamente (tonos rojizos), y se extingue el color a  $45^\circ$ .

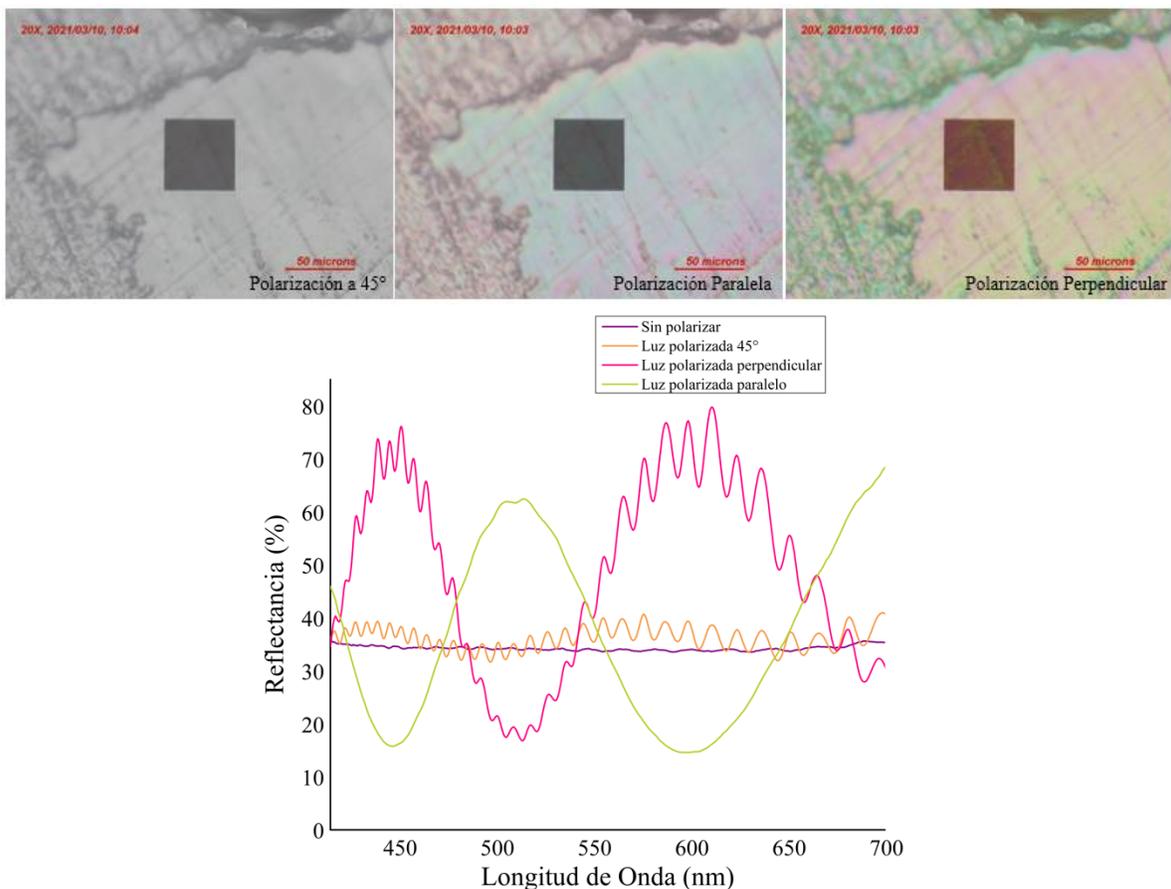
Un mineral y material anisotrópico puede variar la forma de reflejar diferentes longitudes de onda (y por lo tanto su color) en función de su orientación respecto al plano de polarización de la luz incidente. Ahora bien, el espectro de reflectancia demuestra claramente este fenómeno de birrefringencia, donde existe máximo a aproximadamente a 425 y 550 nm este último asociado al color violáceo y rojo respectivamente, para la luz polarizada paralelamente. Y para la luz perpendicular un máximo a 475 y 650 nm asociado a colores azules y verde respectivamente. Estos patrones de difracción son complementarios y pueden cancelarse entre sí, obteniéndose el patrón de ondas a  $45^\circ$  que muestra una reflectancia total que seguiría la misma tendencia que cuando no se polariza la luz.



**Figura 39.** Gráfico e imágenes de la esclerita roja (UCR 3004) utilizando un haz de luz polarizado en 3 direcciones (45°, paralelo y perpendicular).

A las escleritas blancas de la muestra UCR 3004, se les realizó el mismo proceso de medición que para las escleritas rojas antes mencionadas, como se observa en la Figura 40, tiene un comportamiento similar, pero con un periodo distinto. El máximo para el espectro de reflectancia para la luz polarizada paralelamente es de 510 nm, y para la luz polarizada perpendicularmente es de 600 y 410 nm, máximos de mayor energía. Igualmente, estos patrones son complementarios propiciando el fenómeno de interferencia destructiva, donde ambas ondas se cancelan y así cuando la luz polarizada está a 45° muestra una reflectancia total que seguiría la misma tendencia que cuando no se polariza la luz.

También es posible observar que, como las bandas están desfasadas en medio ciclo, ya que cuando la onda producida por la polarización del haz perpendicularmente para las muestras blancas está en su máximo, la onda perpendicular de las escleritas rojas se encuentra en un punto medio donde interacciona con la onda polarizada en dirección paralela.



**Figura 40.** Gráficos e imágenes tomadas al polarizar la luz en las escleritas blancas de la muestra UCR 3004.

Por lo tanto, como se observa las Figuras 39 y 40, tanto para las escleritas rojas como blancas presentan tendencia a un ordenamiento cristalino, ya que las imágenes ópticas muestran una variación al cambiar los lentes polarizadores, a la vez si definimos a los mesocristales como superestructuras 3D hechas de unidades cristalinas de tamaño nano o submicrómetro orientadas de manera similar, las escleritas estarían dentro de esta categoría de mesocristal.

Esta información nos indica la naturaleza mesocristalina de las escleritas, además es señal que los cristales submicrométricos mantiene un orden específico, ya que los espectros visibles muestran un patrón de las ondas periódico a la misma polarización de la luz, otra de las similitudes en los espectros, se debe a que cuando el haz de luz esta polarizado paralelamente presenta un patrón sinusoidal bastante regular, sin embargo, cuando la luz esta polarizada perpendicularmente, a pesar de complementarse con el haz de luz paralelo como

se mencionó anteriormente, presenta un patrón espectral anómalo que difiere de un patrón regular.

Por otro lado, el desfase entre los espectros y su corrimiento en los máximos de energía que se observa entre las escleritas rojas y blancas podría manifestar diferencias en el tamaño de esa periodicidad, así como posibles interacciones de la estructura de carbonato de calcio con el pigmento.

## Composición estructural de las escleritas

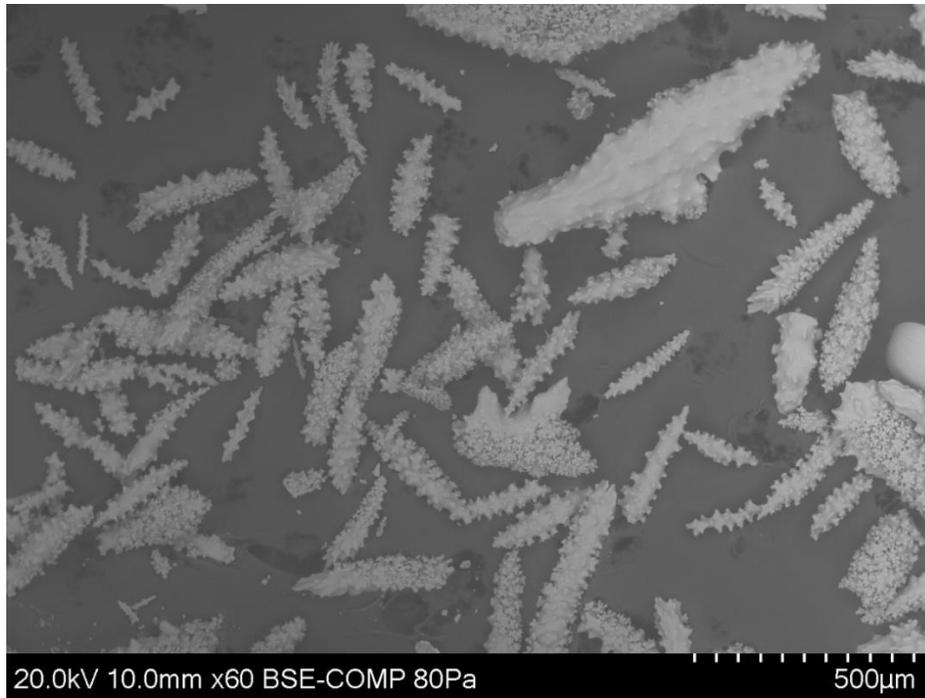
En general las escleritas se desarrollan como un agregado de fibras de carbonato de calcio principalmente en su fase de calcita, estos agregados se forman en capas concéntricas (Carlo et al., 2011; Sethmann et al., 2007). La forma y orientación de las escleritas contribuyen con diversas funciones, por ejemplo, cuando tienen forma de bastón ayudan a resistir la deformación debido a la tensión y compresión del medio en el que se encuentran, por otro lado, las escleritas más cortas y densas brindan resistencia para que los octocorales de poca profundidad resistan las aguas turbulentas que están más cerca de la costa (Pearson, 2014).

Una de las características comunes entre las escleritas es que todas cuentan con cierto nivel de rugosidad, según lo reportado por Vielzeuf, se cree que esta rugosidad podría permitir el acoplamiento mecánico entre la esclerita y los tejidos orgánicos con los que cuenta (Vielzeuf et al., 2017).

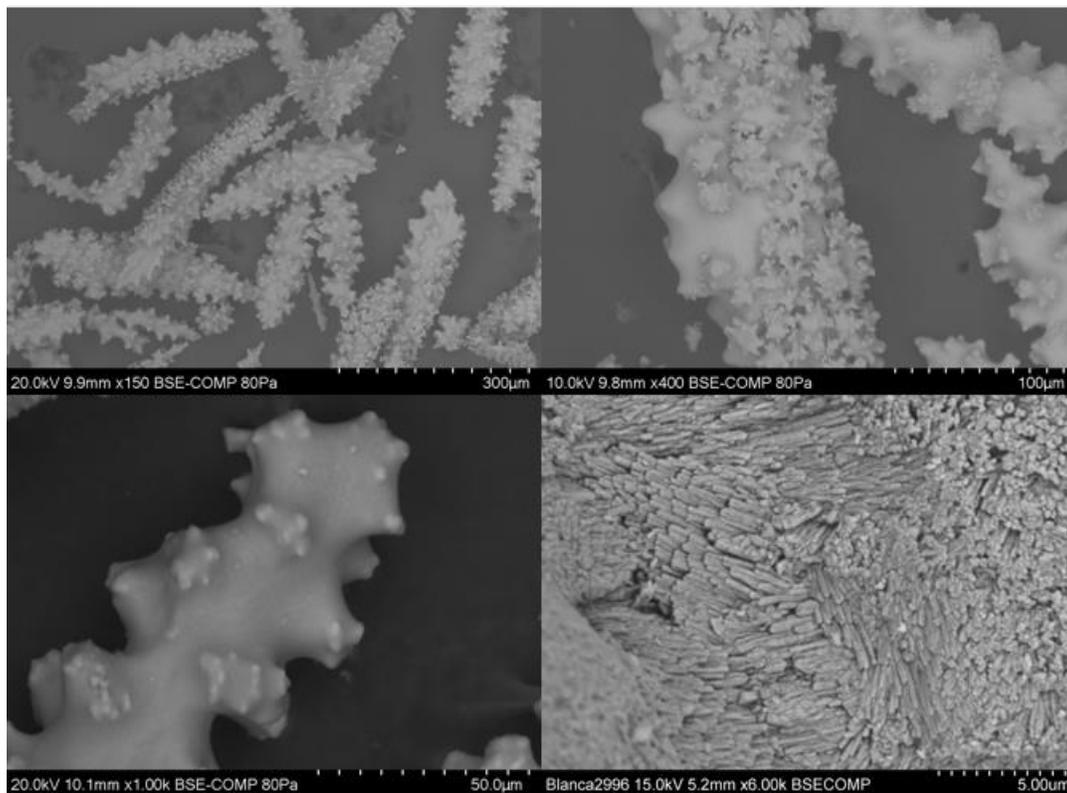
Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar la estructura de las diferentes escleritas en estudio. De igual forma que en los casos anteriores se analizó para ambas muestras (UCR 2996 y UCR 3004) la estructura superficial de la esclerita, es decir, se analizó la estructura externa directamente sin realizarle procesos de fijado ni pulido y la estructura interna se observó por medio de las escleritas pulidas y fijadas en resina.

Las escleritas blancas de la muestra UCR 2996 se observaron únicamente a nivel de superficie externa de la esclerita a través del SEM a una magnificación de 60X, donde se pudo obtener una visión general de esta muestra, la cual presenta variedad en el tamaño y estructuras, en un total de 14 escleritas medidas se obtuvo un tamaño promedio de 277 $\mu$ m, en general las escleritas tienen una apariencia alargada como se observa en la Figura 41.

En la Figura 42, al aumentar la magnificación (150-6000X) se logra apreciar mayor detalle de la estructura y orientación de cada uno de los cristales de carbonato de calcio formados, entre 150-500X se observa que las escleritas tienen una forma alargada y en una misma estructura presentan partes lisas y otras más rugosas, al aumentar considerablemente la magnificación, se observa un cierto orden al depositarse uno junto al otro, pero en diferentes direcciones.

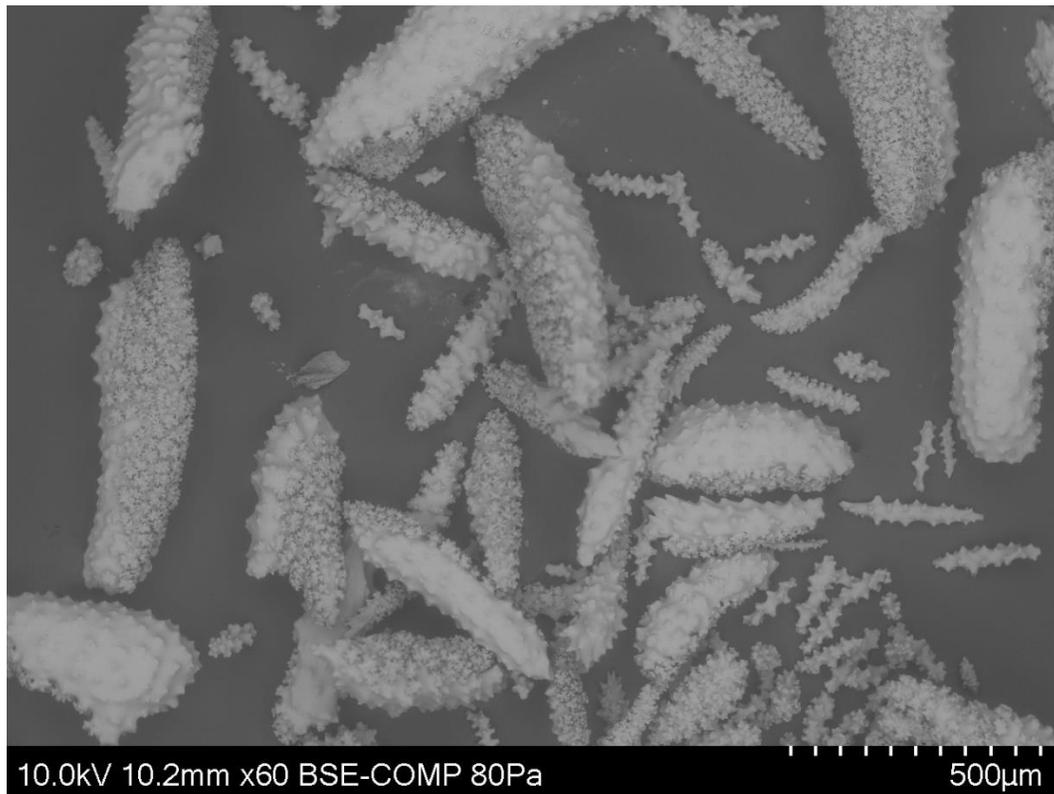


**Figura 41.** Imágenes SEM de la estructura superficial de las escleritas blancas de la muestra UCR 2996. (Magnificación: 60X).



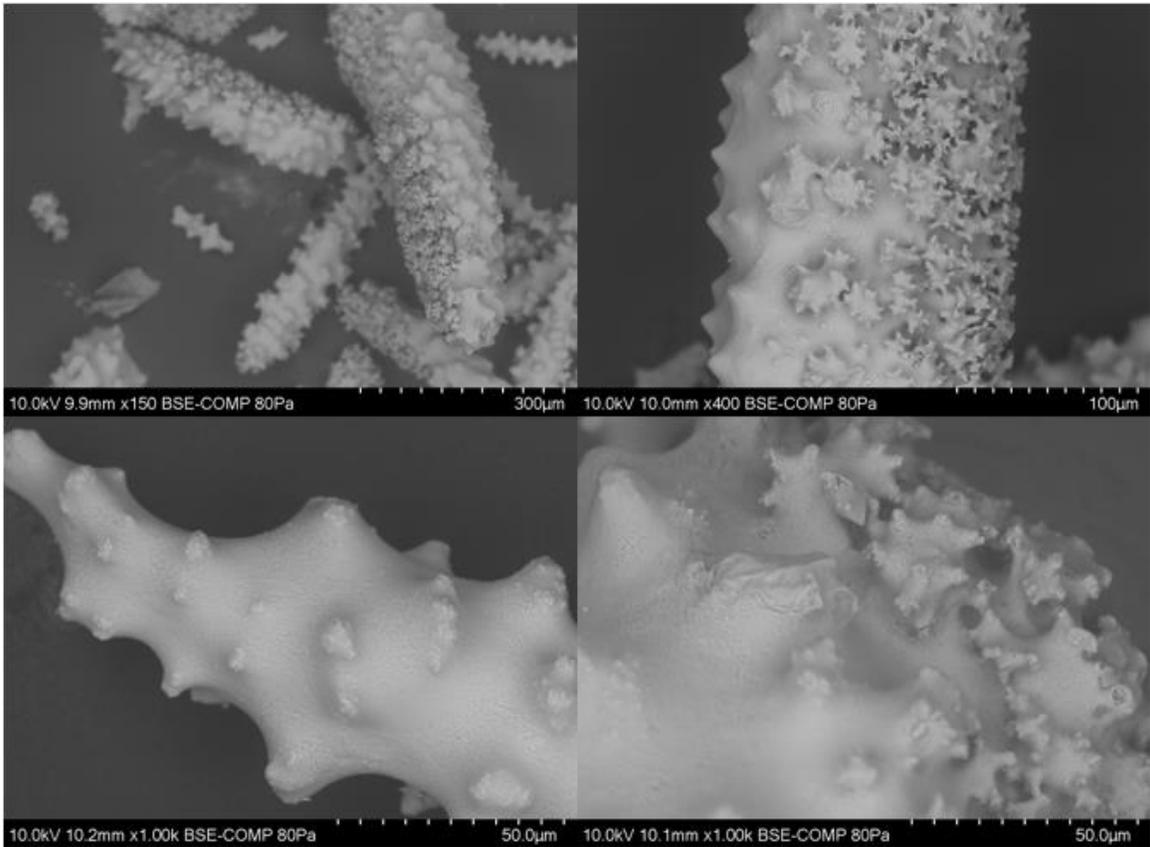
**Figura 42.** Imágenes SEM de la estructura superficial de las escleritas blancas de la muestra UCR 2996. (Magnificación: 150-6000X).

En la muestra UCR 3004, en la sección donde las escleritas son blancas se puede observar una visión general de las escleritas en la Figura 43, estas cuentan con formas y tamaños variados, se midieron un total de 14 escleritas y se obtuvo un tamaño promedio de  $358\mu\text{m}$ . En cuanto a su estructura se puede observar que hay unas escleritas más anchas y otras más delgadas y alargadas.

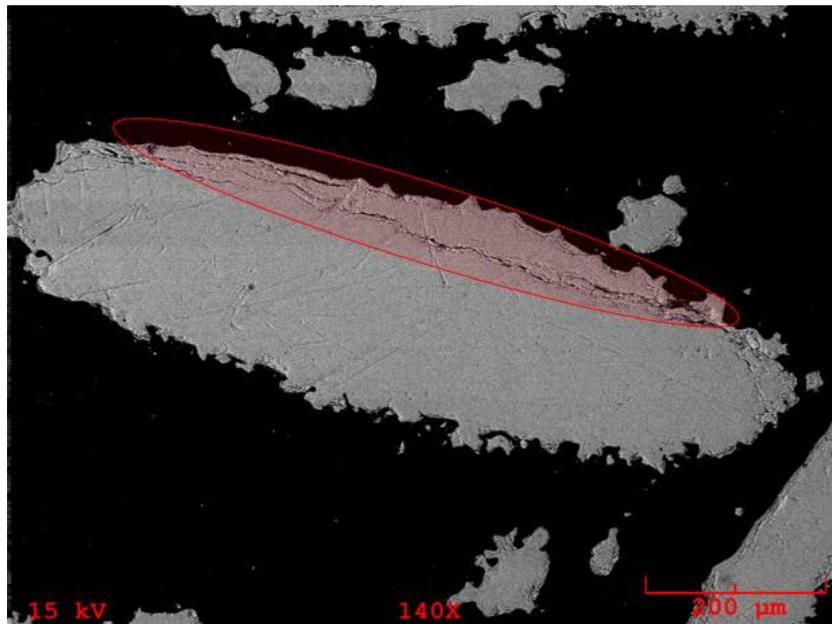


**Figura 43.** Imágenes SEM de la estructura superficial de las escleritas blancas de la muestra UCR 3004. (Magnificación: 60X).

A nivel de superficie externa, al aumentar la magnificación (150-6000X), se logra observar mayores detalles de la superficie, como se mencionó anteriormente esta muestra presenta más protuberancias, las cuales se pueden apreciar en la Figura 44. En comparación con la muestra anterior la superficie de estas escleritas también cuenta con una parte lisa y otra rugosa, sin embargo, estas estructuras son mucho más rugosas que las anteriores ya que cuentan con un mayor grado de protuberancias. A la vez, se analizó la parte interna de las escleritas, en la cual se observó una región lisa, que se puede atribuir a su proceso de pulido, sin embargo, uno de los detalles a relucir es la formación de capas en uno de sus extremos, como se observa en la Figura 45.

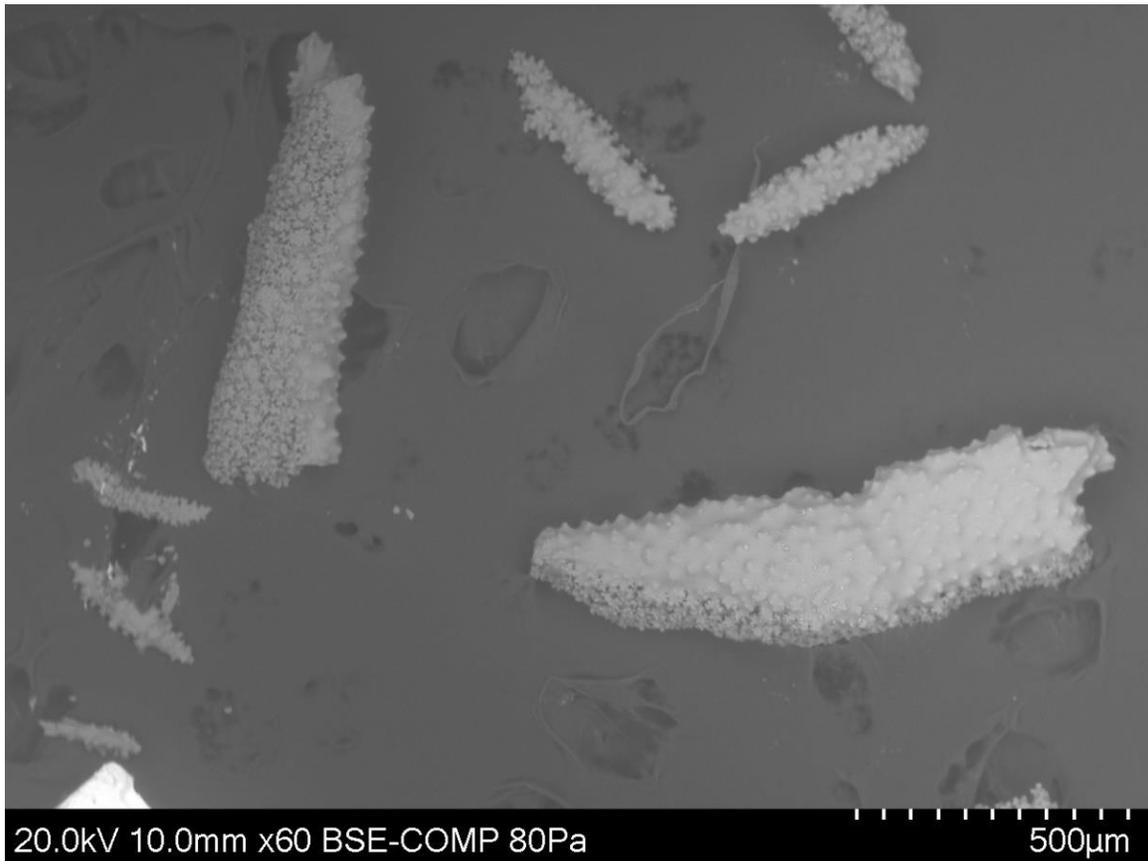


**Figura 44.** Imágenes SEM de la estructura externa de las escleritas blancas de la muestra UCR 3004. (Magnificación: 150-1000X).



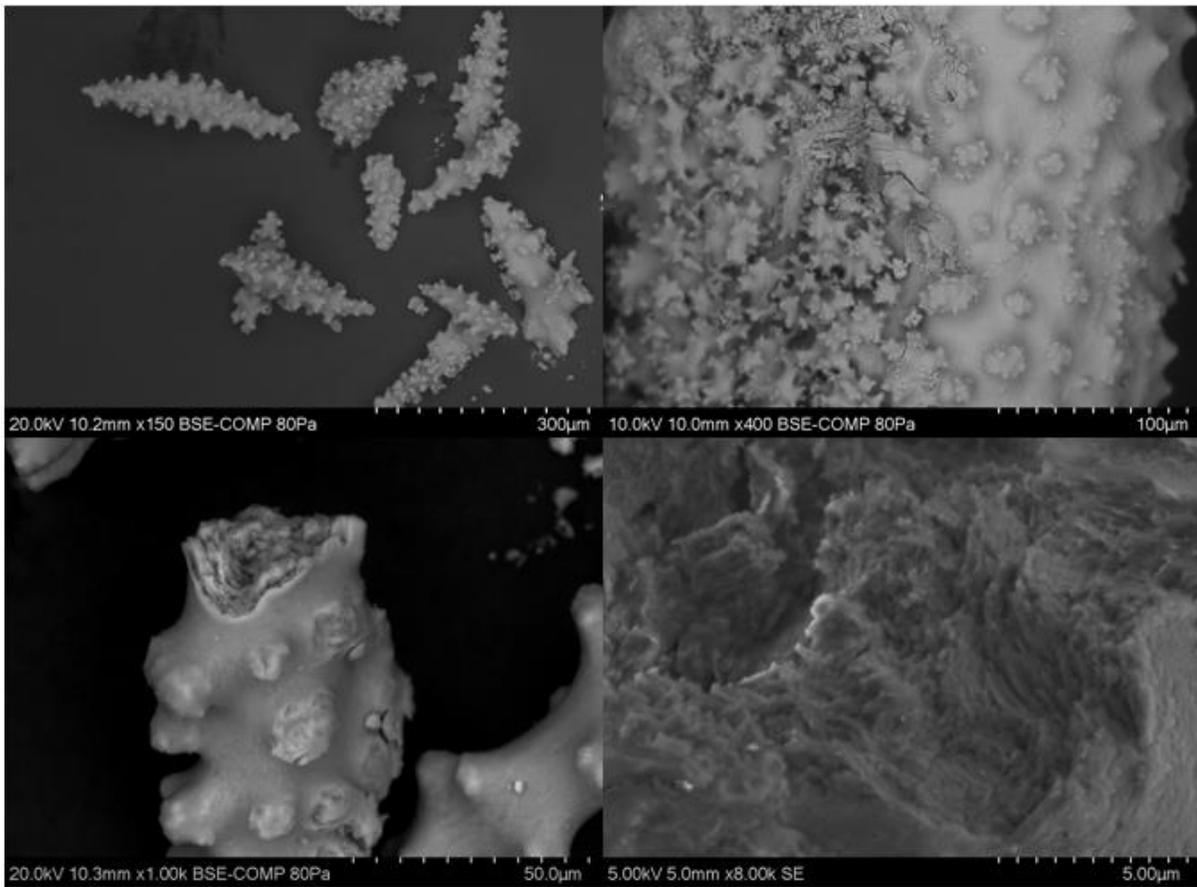
**Figura 45.** Imágenes SEM de la estructura interna de las escleritas blancas de la muestra UCR 3004. (Magnificación: 140X).

Para la muestra UCR 3004, correspondiente a las escleritas rojas se obtuvieron imágenes de la estructura tanto externa como interna, mostradas en la Figura 46- 48. Para este color de escleritas se presenta un patrón similar de tamaño (tamaño promedio es de  $606\mu\text{m}$ ) y forma variada, como se aprecia en la Figura 46, parte de su estructura al igual que en los casos anteriores, presenta una parte que es rugosa y la otra es lisa.

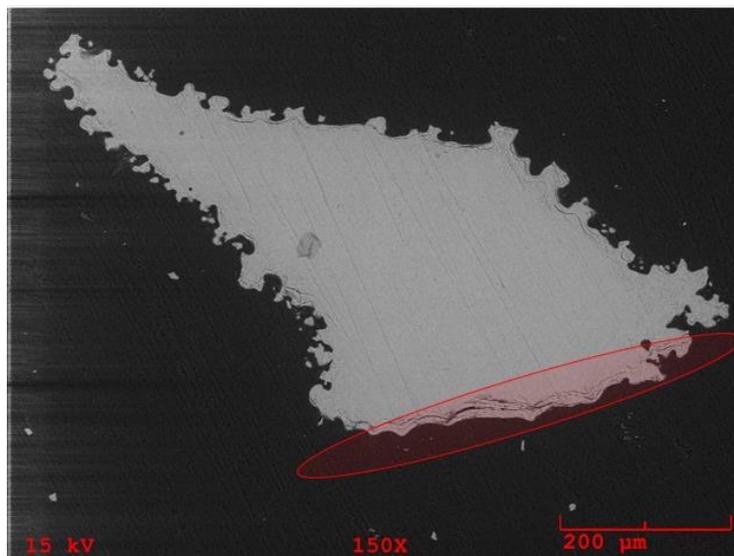


**Figura 46.** Imágenes SEM de la estructura superficial de las escleritas rojas de la muestra UCR 3004. (Magnificación: 60X).

En Figura 47, se muestra una esclerita roja a 1000X que se quebró, por lo que se puede apreciar el interior de la esclerita y su formación en capas concéntricas en una dirección, esta misma tendencia se observó en las escleritas que fueron fijadas y pulidas en resina, como se muestra en la Figura 48, donde en un borde de la esclerita forma capas, como las representadas en el círculo rojo, este comportamiento brinda información sobre el crecimiento de la esclerita, la cuál va formando capas conforme crece y aumenta su tamaño.



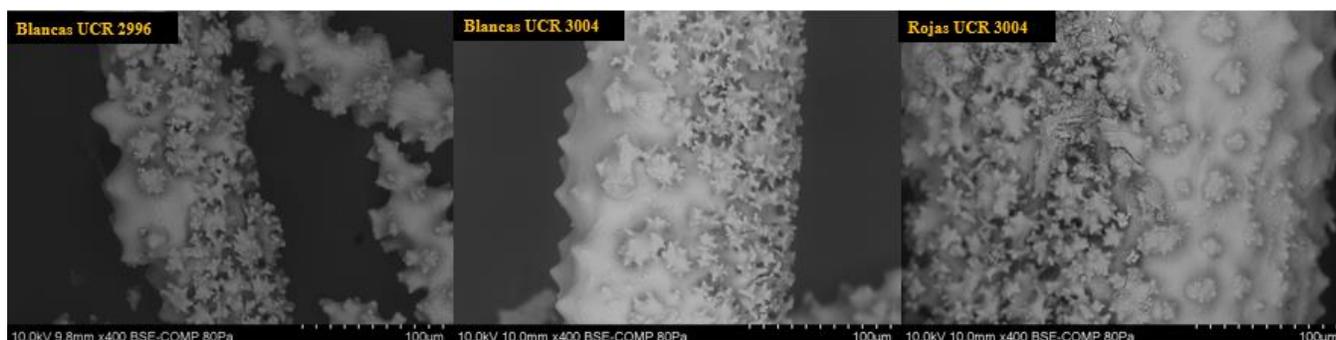
**Figura 47.** Imágenes SEM de la estructura superficial de las escleritas rojas de la muestra UCR 3004. (Magnificación: 150-8000X).



**Figura 48.** Parte interna de una esclerita roja (UCR 3004) procesada (Fijada en resina y pulida). (Magnificación: 150X)

En la Figura 49, se pueden comparar a una misma magnificación (400x) las diferencias o similitudes estructurales entre las escleritas blancas (UCR 2996 y UCR 3004) con una esclerita con color como lo es la roja (UCR 3004). En general se observa que independientemente de la ausencia o presencia de color, las escleritas cuentan con cierto grado de protuberancias además de que éstas protuberancias se encuentran por un lado de la esclerita y por el otro se encuentra liso, eso se podría atribuir a las propiedades mecánicas y las interacciones con las corrientes puesto que se presenta a mayor medida en las escleritas de mayor tamaño.

En esta misma línea, una de las diferencias se podría observar que las escleritas con coloración presentan una mayor rugosidad por lo que además de lo anteriormente mencionado se podría deber a el acoplamiento mecánico entre la esclerita y los tejidos orgánicos que brindan la pigmentación.

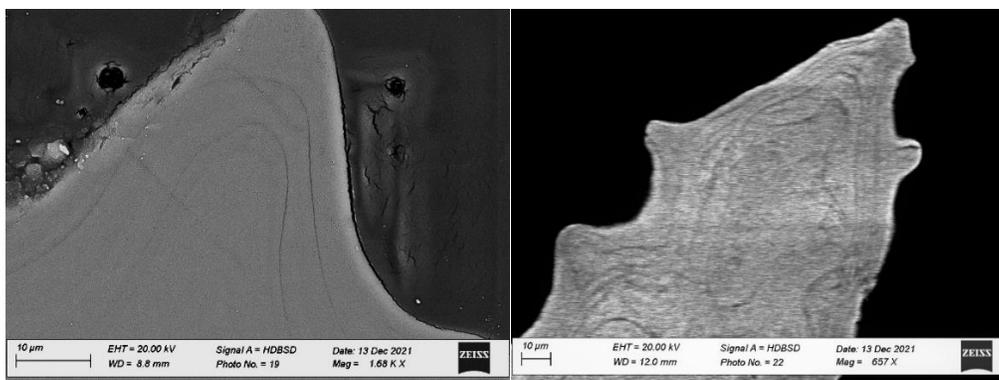


**Figura 49.** Parte interna de una esclerita roja (UCR 3004) procesada (Fijada en resina y pulida). (Magnificación: 400X)

La estructura interna se analizó con SEM de dos formas, la primera consiste en las escleritas que fueron fijadas en resina, pero sin recubrimiento (las cuales fueron mostradas anteriormente). Mientras que un segundo grupo de escleritas también fijadas en resina se recubrieron con oro, analizando ambos grupos. Las que se recubrieron con oro, se muestran en la siguiente Figura 50, con esta técnica se pudo observar con mayor detalle un comportamiento común en estos organismos. Este consiste en la formación de capas concéntricas, que se conocen como anillos de crecimiento.

Sin embargo, se aprecian diferencias importantes en las estructuras de las escleritas blancas de la muestra (UCR 3004) y las escleritas rojas (UCR 3004), por ejemplo, en la esclerita blanca es más difícil apreciar los anillos ya que se tuvo que ir a altas magnificaciones

por encima de los 1500X para poder ver esta característica; a la vez entre anillo y anillo se muestra una mayor separación que lo mostrado en las escleritas rojas. En las escleritas rojas los anillos son claramente visibles a una magnificación mucho menor cercana a 600X.



**Figura 50.** Escleritas recubiertas con oro de la muestra UCR3004. (Izquierda) Escleritas blancas. (Derecha) Escleritas rojas.

Es entonces que si bien los análisis realizados por medio del XRD, FTIR y Raman, permitieron confirmar que su estructura mineralógica está conformada por una calcita magnésica y que esta estructura se presenta en todas las escleritas, por otra parte, gracias a los resultados obtenidos con la luz polarizada y las imágenes SEM, es posible observar claras diferencias entre las escleritas rojas y blancas. Estas asociadas a su estructura interna y al tamaño de los anillos. Es posible que las moléculas que brindan el color al ser incorporadas en el proceso de génesis y crecimiento de las escleritas generen cambios en su ordenamiento espacial, que se manifiestan en los espectros de luz polarizada discutidos previamente.

## Conclusiones y Recomendaciones

Al realizar este trabajo de investigación sobre la especie *Muricea fruticosa* presente en la Isla del Coco, permitió iniciar con la investigación sobre la relación con el color y estructura mineralógica que no habían sido discutidos anteriormente en la literatura.

A partir de los estudios Raman junto con bases de datos y literatura, se pudo concluir que el origen de la coloración del octocoral está dado por las escleritas, donde dicha coloración proviene principalmente de una matriz orgánica constituida mayoritariamente por polienos insaturados más no de carotenoides como se ha reportado para otros octocorales en la literatura. Además, se obtuvo que para esta especie de octocoral la sección amarilla-roja que se observa a escala macro corresponde al mismo pigmento, pero su tonalidad cambia debido posiblemente a una menor concentración de pigmento en las regiones amarillas. Además, el pigmento no es superficial, sino está incorporado dentro de toda la estructura de la esclerita, probablemente formando parte de su génesis. Este además no está distribuido de forma homogénea y las primeras observaciones indican una mayor concentración del pigmento en el centro de la esclerita que en los bordes.

En cuanto a su composición mineralógica se pudo determinar a través de los análisis Raman, XRD y SEM-EDS, que las escleritas están constituidas por carbonato de calcio como se reporta en la literatura, además se determinó su polimorfo, el cual consiste en una calcita magnésica. Tanto para las escleritas con color como las sin color, la estructura mineralógica y composición química determinada es la misma.

Por observaciones al microscopio y espectros de reflectancia con luz polarizada, se puede establecer la mesoestructura anisotrópica de las escleritas. La información recopilada muestra diferencias en los espectros con luz polarizada que podría estar asociada a su periodicidad. Por otra parte, el crecimiento de la esclerita se da por medio de una formación concéntrica de capas, la cual fue observada por SEM de alta resolución. Donde las escleritas rojas mostraron estructuras concéntricas significativamente mayores que las blancas, lo cual sienta las bases de alguna relación entre la pigmentación y su estructura mesoscópica.

Al ser una especie y en general organismos poco explorado para investigaciones futuras se podrían realizar mediciones de campo en donde se monitoreen profundidades, temperatura, pH, velocidad de corrientes, columna de sedimentos y además factores ambientales que puedan alterar la pigmentación del octocoral conforme se dé el crecimiento. Además, es necesario un número mucho mayor de observaciones como las expuestas acá, tomando en cuenta forma y tamaño de las escleritas, para tener una muestra representativa de datos que permitan realizar pruebas estadísticas mucho más concluyentes.

## Bibliografía

- Abdelmohsen, U., Balasubramanian, S., Oelschlaeger, T., Grkovic, T., Pham, N., Quinn, R., & Hentschel, U. (2017). Potential of marine natural products against drug-resistant fungal, viral, and parasitic infections. *The Lancet Infectious Diseases*, *17*(2), e30–e41. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30323-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30323-1)
- Al Omari, M. M. H., Rashid, I. S., Qinna, N. A., Jaber, A. M., & Badwan, A. A. (2016). Calcium Carbonate. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, *41*, 31–132. <https://doi.org/10.1016/BS.PODRM.2015.11.003>
- Almeida, M. T. R., Moritz, M. I. G., Capel, K. C. C., Pérez, C. D., & Schenkel, E. P. (2014). Chemical and biological aspects of octocorals from the Brazilian coast. *Rev Bras Farmacogn*, *24*(4), 446–467. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.05.002>
- Aparicio Marengo, D., Ariza Daza, J., Calvo Trujillo, M., Daza Cuello, J., & Echávez Plata, E. (2012). Espectroscopia infrarroja: una técnica alternativa para la identificación de microorganismos. *Ciencia y Salud Virtual*, *4*(1), 123. <https://doi.org/10.22519/21455333.254>
- Bayer, F. M., Grasshoff, M., & Verseveldt, J. (1983). Illustrated trilingual glossary of morphological and anatomical terms applied to Octocorallia. *E.J. Brill/Dr. W. Backhuys*, 1–75. <http://repository.si.edu/xmlui/handle/10088/6237>
- Borisov, S. V., Magarill, S. A., & Pervukhina, N. V. (2021). CRYSTALLOGRAPHIC ANALYSIS OF THREE MODIFICATIONS OF CaCO<sub>3</sub>: CALCITE, ARAGONITE, VATERITE. *Journal of Structural Chemistry*, *62*(7), 1027–1037. <https://doi.org/10.1134/S0022476621070064>
- Borromeo, L., Zimmermann, U., Andò, S., Coletti, G., Bersani, D., Basso, D., Gentile, P., Schulz, B., & Garzanti, E. (2017). Raman spectroscopy as a tool for magnesium estimation in Mg-calcite. *Journal of Raman Spectroscopy*, *48*(7), 983–992. <https://doi.org/10.1002/jrs.5156>
- Bracco, S., Fumagalli, P., Fusi, P., Santambrogio, C., Rolandi, V., & Brajkovic, A. (2016). Identification of the chromophores in *Corallium rubrum* gem quality corals by HPLC/UV, ESI-MS and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *An International Journal of Mineralogy*,

- 85, 83–93. <https://doi.org/10.2451/2016PM598>
- Breedy, O., & Cortés, J. (2008). Octocorals (Coelenterata: Anthozoa: Octocorallia) of Isla del Coco, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, 56(2), 71–77. <https://doi.org/10.15517/rbt.v56i2.26942>
- Breedy, O., & Cortés, J. (2014a). Gorgonias (Octocorallia: Gorgoniidae) de las aguas someras del Pacífico Norte de Costa Rica. *Rev Geofísica*, 62(4), 43–62. <https://doi.org/10.15517/rbt.v62i4.20032>
- Breedy, O., & Cortés, J. (2014b). Gorgonias (Octocorallia: Gorgoniidae) de las aguas someras del Pacífico Norte de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 62, 43–62. <https://doi.org/10.15517/rbt.v62i4.20032>
- Breedy, O., & Guzman, H. (2016a). A revision of the genus *Muricea* Lamouroux, 1821 (Anthozoa, Octocorallia) in the eastern Pacific. Part II. *ZooKeys*, 581, 1–69. <https://doi.org/10.3897/zookeys.581.7910>
- Breedy, O., & Guzman, H. M. (2016b). A new *Muricea* species (Cnidaria, Anthozoa, Octocorallia) from the eastern tropical Pacific. *ZooKeys*, 2016(629), 1–10. <https://doi.org/10.3897/zookeys.629.10828>
- Breedy Shadid, O., & Calvo Shadid, A. (2000). La creación de léxico científico: Terminología aplicada a la subclase octocorallia (anthozoa: cnidaria). *Revista de Filología y Lingüística de La Universidad de Costa Rica*, 26(1), 81–98. <https://doi.org/10.15517/rfl.v26i1.21014>
- Carlo, J. M., Barbeitos, M. S., & Lasker, H. R. (2011). Quantifying complex shapes: Elliptical fourier analysis of octocoral sclerites. *Biological Bulletin*, 220(3), 224–237. <https://doi.org/10.1086/BBLv220n3p224>
- Carlton, R. A. (2011). Polarized Light Microscopy. In *Pharmaceutical Microscopy* (pp. 7–64). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8831-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8831-7_2)
- Chen, X., Zhang, B., Zhang, F., Wang, Y., Zhang, M., Yang, Z., Poepelmeier, K. R., & Pan, S. (2018). Designing an Excellent Deep-Ultraviolet Birefringent Material for Light Polarization. *Journal of the American Chemical Society*, 140(47), 16311–16319. [https://doi.org/10.1021/JACS.8B10009/SUPPL\\_FILE/JA8B10009\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/JACS.8B10009/SUPPL_FILE/JA8B10009_SI_001.PDF)

- Chu, D. H., Vinoba, M., Bhagiyalakshmi, M., Baek, I. H., Nam, S. C., Yoon, Y., Kim, S. H., & Jeong, S. K. (2013). CO<sub>2</sub> mineralization into different polymorphs of CaCO<sub>3</sub> using an aqueous-CO<sub>2</sub> system. *RSC Advances*, 3(44), 21722–21729. <https://doi.org/10.1039/C3RA44007A>
- Coll, J. (1992). The Chemistry and Chemical Ecology of Octocorals (Coelenterata, Anthozoa, Octocorallia). *Chem. Rev.*, 92(4), 613–631. <https://doi.org/10.1021/cr00012a006>
- Comeau, S., Cornwall, C. E., Pupier, C. A., DeCarlo, T. M., Alessi, C., Trehern, R., & McCulloch, M. T. (2019). Flow-driven micro-scale pH variability affects the physiology of corals and coralline algae under ocean acidification. *Scientific Reports*, 9(1), 12829. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49044-w>
- Conci, N. (2020). *Molecular Biomineralization of Octocoral Skeletons: Calcite versus Aragonite*. Universidad de Munich.
- Conci, N., Vargas, S., & Wörheide, G. (2021). The Biology and Evolution of Calcite and Aragonite Mineralization in Octocorallia. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9(February), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.623774>
- Cortés, J. (2008). Historia de la investigación marina de la Isla del Coco, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, 56(2), 1–18. <https://doi.org/10.15517/rbt.v56i2.26934>
- Cortés, J. (2019). Isla del Coco, Costa Rica, Eastern Tropical Pacific. In T. Bridge, K. Puglise, & Y. Loya (Eds.), *Mesophotic Coral Ecosystem* (p. 1003). <http://www.springer.com/series/7539>
- Cortés, J., & Blum, S. (2008). Life to 450 m depth at Isla del Coco, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 56(2), 189–206. <https://doi.org/10.15517/rbt.v56i2.27018>
- Cranston, E. D., & Gray, D. G. (2008). Birefringence in spin-coated films containing cellulose nanocrystals. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 325(1–2), 44–51. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2008.04.042>
- DeCarlo, T. M. (2018). Characterizing coral skeleton mineralogy with Raman spectroscopy. *Nature Communications*, 9(1), 1–3. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07601-3>

- Devictor, S. T., & Morton, S. L. (2010). Identification guide to the shallow water (0-200 m) octocorals of the South Atlantic Bight. In *Zootaxa* (Vol. 62, Issue 2599). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2599.1.1>
- Di Gianfrancesco, A. (2017). Technologies for chemical analyses, microstructural and inspection investigations. In *Materials for Ultra-Supercritical and Advanced Ultra-Supercritical Power Plants* (pp. 197–245). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100552-1.00008-7>
- Dufresne, W. J. B., Ruffledt, C. J., & Marshall, C. P. (2018). Raman spectroscopy of the eight natural carbonate minerals of calcite structure. *Journal of Raman Spectroscopy*, 49(12), 1999–2007. <https://doi.org/10.1002/JRS.5481>
- El-Bawab, F. (2020). Phylum Cnidaria. In *Invertebrate Embryology and Reproduction* (pp. 172–306). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814114-4.00005-9>
- Fleet, M. E. (2009). Infrared spectra of carbonate apatites: v<sub>2</sub>-Region bands. *Biomaterials*, 30(8), 1473–1481. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.12.007>
- Floquet, N., & Vielzeuf, D. (2012). Ordered misorientations and preferential directions of growth in mesocrystalline red coral sclerites. *Crystal Growth and Design*, 12(10), 4805–4820. [https://doi.org/10.1021/CG300528H/SUPPL\\_FILE/CG300528H\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/CG300528H/SUPPL_FILE/CG300528H_SI_001.PDF)
- Fürst, S., Müller, K., Gianni, L., Paris, C., Bellot-Gurlet, L., Pare, C. F. E., & Reiche, I. (2016). Raman investigations to identify corallium rubrum in iron age jewelry and ornaments. *Minerals*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/min6020056>
- Grasshoff, M., & Bargibant, G. (2001). Coral reef Gorgonians of new caledonia. In *Faune et Flore Tropicales* (Vol. 38, Issue 1). Institut Recherche pour le Développement. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Hauch, K. D., & Ratner, B. D. (2013). Microscopy for Biomaterials Science. In *Biomaterials Science: An Introduction to Materials* (3rd ed., pp. 677–692). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00058-9>
- Hopley, D. (2011). Encyclopedia of Modern Coral Reef: Structure, Form and Process. In *Encyclopedia of Modern Coral Reefs* (p. 920). <https://doi.org/10.1007/978-90-481-2639-2>

- Horvath, E. A. (2019a). A review of gorgonian coral species (cnidaria, octocorallia, alcyonacea) held in the santa barbara museum of natural history research collection: Focus on species from scleraxonia, holaxonia, and calcaxonia - Part I: Introduction, species of scleraxonia and holaxonia (family acanthogorgiidae). *ZooKeys*, 2019(860), 1–66. <https://doi.org/10.3897/zookeys.860.19961>
- Horvath, E. A. (2019b). A review of gorgonian coral species (cnidaria, octocorallia, alcyonacea) held in the santa barbara museum of natural history research collection: Focus on species from scleraxonia, holaxonia, calcaxonia - Part II: Species of holaxonia, families gorgoniidae and plexauridae. *ZooKeys*, 2019(860), 67–182. <https://doi.org/10.3897/zookeys.860.33597>
- Joseph, E. O., Carlo, J. M., & Lasker, H. R. (2014). Plasticity and conservatism in sclerites of a Caribbean octocoral. *Hydrobiologia*, 759(1), 109–118. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2153-5>
- Kawano, J., Maeda, S., & Nagai, T. (2016). The effect of Mg<sup>2+</sup> incorporation on the structure of calcium carbonate clusters: investigation by the anharmonic downward distortion following method. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(4), 2690–2698. <https://doi.org/10.1039/C5CP05139H>
- Kupka, T., Lin, H. M., Stobiński, L., Chen, C. H., Liou, W. J., Wrzalik, R., & Flisak, Z. (2010). Experimental and theoretical studies on corals. I. Toward understanding the origin of color in precious red corals from Raman and IR spectroscopies and DFT calculations. *Journal of Raman Spectroscopy*, 41(6), 651–658. <https://doi.org/10.1002/jrs.2502>
- Lewis, I., & Edwards, H. (2001). *Handbook of Raman Spectroscopy: From the Research Laboratory to the Process Line* (Vol. 28). CRC Press. <https://books.google.es/books?id=E9peWTnT9TgC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Lewis, J. C., & Wallis, E. V. (1991). The Function of Surface Sclerites in Gorgonians (Coelenterata, Octocorallia). *Biol. Bull*, 181(2), 275–288. <https://doi.org/10.2307/1542099>

- Lin, Y. P., & Singer, P. C. (2009). Effect of Mg<sup>2+</sup> on the kinetics of calcite crystal growth. *Journal of Crystal Growth*, 312(1), 136–140. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2009.09.041>
- Long, X., Ma, Y., & Qi, L. (2014). Biogenic and synthetic high magnesium calcite - A review. *Journal of Structural Biology*, 185(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.11.004>
- Loste, E., Wilson, R. M., Seshadri, R., & Meldrum, F. C. (2003). The role of magnesium in stabilising amorphous calcium carbonate and controlling calcite morphologies. *Journal of Crystal Growth*, 254(1–2), 206–218. [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(03\)01153-9](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(03)01153-9)
- Maia, L. F., De Oliveira, V. E., Oliveira, M. E. R., Reis, F. D., Fleury, B. G., Edwards, H. G. M., & De Oliveira, L. F. C. (2013). Colour diversification in octocorals based on conjugated polyenes: A Raman spectroscopic view. *Journal of Raman Spectroscopy*, 44(4), 560–566. <https://doi.org/10.1002/jrs.4226>
- Maia, L., Fleury, B., Lages, B., Barbosa, J., Pinto, À., Castro, H., De Oliveira, V., Edwards, H., & De Oliveira, L. (2011). Identification of reddish pigments in octocorals by Raman spectroscopy. *J. Raman Spectroscopy*, 42(4), 653–658. <https://doi.org/10.1002/jrs.2758>
- Maoka, T., Akimoto, N., Tsushima, M., Komemushi, S., Mezaki, T., Iwase, F., Takahashi, Y., Sameshima, N., Mori, M., & Sakagami, Y. (2011). Carotenoids in marine invertebrates living along the Kuroshio current coast. *Marine Drugs*, 9(8), 1419–1427. <https://doi.org/10.3390/md9081419>
- Müller, C. M., Pejčić, B., Esteban, L., Piane, C. D., Raven, M., & Mizaikoff, B. (2014). Infrared Attenuated Total Reflectance Spectroscopy: An Innovative Strategy for Analyzing Mineral Components in Energy Relevant Systems. *Scientific Reports 2014 4:1*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep06764>
- Nash, M. C., Opdyke, B. N., Wu, Z., Xu, H., & Trafford, J. M. (2013). Simple X-ray diffraction techniques to identify mg calcite, dolomite, and magnesite in tropical coralline algae and assess peak asymmetry. *Journal of Sedimentary Research*, 83(12), 1084–1098. <https://doi.org/10.2110/jsr.2013.67>

- Németh, P., Mugnaioli, E., Gemmi, M., Czippon, G., Demény, A., & Spötl, C. (2018). A nanocrystalline monoclinic CaCO<sub>3</sub> precursor of metastable aragonite. *Science Advances*, 4(12). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAU6178>
- Newbury, D. E., & Ritchie, N. W. M. (2013). Is Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive X-ray Spectrometry (SEM/EDS) Quantitative? *Scanning*, 35(3), 141–168. <https://doi.org/10.1002/sca.21041>
- Oldenbourg, R. (2013). Polarized light microscopy: Principles and practice. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2013(11), 1023–1036. <https://doi.org/10.1101/pdb.top078600>
- Oliveira, L. N. De, Oliveira, V. E. De, Sthefane, D., Edwards, H. G. M., Fernando, L., & Oliveira, C. De. (2013). Raman spectroscopy as a tool for polyunsaturated compound characterization in gastropod and limnic terrestrial shell specimens. *SPECTROCHIMICA ACTA PART A: MOLECULAR AND BIOMOLECULAR SPECTROSCOPY*, 114, 541–546. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.05.095>
- Orlando-Guerrero, I. J., Bravo-Delgado, C. H., Hernández-Paxtián, Z. J., & Aguilar-Felipe, A. A. (2019). Microscope as absorbance reader with utility in clinical analysis. *Revista Mexicana de Ingenieria Biomedica*, 40(1), 1–10. <https://doi.org/10.17488/RMIB.40.1.10>
- Pearson, H. (2014). Octocoral Physiology: Calcium Carbonate Composition and the Effect of Thermal Stress on Enzyme Activity [University of Mississippi]. In *Honors Theses*. [https://egrove.olemiss.edu/hon\\_thesis/358](https://egrove.olemiss.edu/hon_thesis/358)
- Rahman, M. A., Halfar, J., & Shinjo, R. (2013). X-Ray Diffraction Is a Promising Tool to Characterize Coral Skeletons. *Advances in Materials Physics and Chemistry*, 03(01), 120–125. <https://doi.org/10.4236/ampc.2013.31a015>
- Rahman, M. A., Oomori, T., & Wörheide, G. (2011). Calcite formation in soft coral sclerites is determined by a single reactive extracellular protein. *Journal of Biological Chemistry*, 286(36), 31638–31649. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.070185>
- Rakka, M., Maier, S. R., Van Oevelen, D., Godinho, A., Bilan, M., Orejas, C., & Carreiro-Silva, M. (2021). Contrasting metabolic strategies of two co-occurring deep-sea octocorals. *Scientific Reports 2021 11:1*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598->

- Ries, J. B. (2010). Review: Geological and experimental evidence for secular variation in seawater Mg/Ca (calcite-aragonite seas) and its effects on marine biological calcification. *Biogeosciences*, 7(9), 2795–2849. <https://doi.org/10.5194/bg-7-2795-2010>
- Sammarco, P., & Coll, J. (1992). Chemical adaptations in the Octocorallia: evolutionary considerations. *Marine Ecology Progress Series*, 88(1), 93–104. <https://doi.org/10.3354/meps088093>
- Sánchez, J. A. (2007). A new genus of Atlantic octocorals (Octocorallia: Gorgoniidae): systematics of gorgoniids with asymmetric sclerites. *Journal of Natural History*, 41(9–12), 493–509. <https://doi.org/10.1080/00222930701237315>
- Sethmann, I., Helbig, U., & Wörheide, G. (2007). Octocoral sclerite ultrastructures and experimental approach to underlying biomineralisation principles. *CrystEngComm*, 9(12), 1262–1268. <https://doi.org/10.1039/b711068e>
- Skinner, H. C. W., & Ehrlich, H. (2014). Biomineralization. *Treatise on Geochemistry*, 10, 105–162. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095975-7.00804-4>
- Slattery, M., McClintock, J. B., & Heine, J. N. (1995). Chemical defenses in Antarctic soft corals: evidence for antifouling compounds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 190(1), 61–77. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(95\)00032-M](https://doi.org/10.1016/0022-0981(95)00032-M)
- Smodej, J., Reuning, L., Wollenberg, U., Zinke, J., Pfeiffer, M., & Kukla, P. A. (2015). Two-dimensional X-ray diffraction as a tool for the rapid, nondestructive detection of low calcite quantities in aragonitic corals. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 16(10), 3778–3788. <https://doi.org/10.1002/2015GC006009>
- Stanienda-Pilecki, K. (2018). Magnesium calcite in Muschelkalk limestones of the Polish part of the Germanic Basin. *Carbonates and Evaporites*, 33, 801–821.
- Stanienda-Pilecki, K. (2019). The importance of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy in the Identification of Carbonate Phases Differentiated in Magnesium Content. *Spectroscopy*, 34(6), 32–42.

- Stanienda, K. J. (2016). Carbonate phases rich in magnesium in the Triassic limestones of the eastern part of the Germanic Basin. *Carbonates and Evaporites*, 31(4), 387–405. <https://doi.org/10.1007/s13146-016-0297-2>
- Sturm, E. V., & Cölfen, H. (2016). Mesocrystals: structural and morphogenetic aspects. *Chemical Society Reviews*, 45(21), 5821–5833. <https://doi.org/10.1039/C6CS00208K>
- Sturm, E. V., & Cölfen, H. (2017). Mesocrystals: Past, Presence, Future. *Crystals 2017, Vol. 7, Page 207*, 7(7), 207. <https://doi.org/10.3390/CRYST7070207>
- Subramanian, A., & Rodriguez-Saona, L. (2009). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, 145–178. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374136-3.00007-9>
- Tanaka, K., Okaniwa, N., Miyaji, T., Murakami-Sugihara, N., Zhao, L., Tanabe, K., Schöne, B. R., & Shirai, K. (2019). Microscale magnesium distribution in shell of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: An example of multiple factors controlling Mg/Ca in biogenic calcite. *Chemical Geology*, 511, 521–532. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.10.025>
- Technau, U., & Steele, R. E. (2011). Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria. *Development*, 138(8), 1447–1458. <https://doi.org/10.1242/dev.048959>
- Tentori, E., & van Ofwegen, L. P. (2011). Patterns of distribution of calcite crystals in soft corals sclerites. *Journal of Morphology*, 272(5), 614–628. <https://doi.org/10.1002/jmor.10942>
- Ulian, G., Moro, D., & Valdrè, G. (2021). Elastic properties of heterodesmic composite structures: The case of calcite CaCO<sub>3</sub> (space group R3̄c). *Composites Part C: Open Access*, 6, 100184. <https://doi.org/10.1016/J.JCOMC.2021.100184>
- Vagenas, N. V., Gatsouli, A., & Kontoyannis, C. G. (2003). Quantitative analysis of synthetic calcium carbonate polymorphs using FT-IR spectroscopy. *Talanta*, 59(4), 831–836. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00638-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00638-0)
- Van Oppen, M. J. H., Mieog, J. C., Sánchez, C. A., & Fabricius, K. E. (2005). Diversity of algal endosymbionts (zooxanthellae) in octocorals: The roles of geography and host relationships. *Molecular Ecology*, 14(8), 2403–2417. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

294X.2005.02545.x

- Vargas, S., Breedy, O., Siles, F., & Guzman, H. M. (2010). How many kinds of sclerite? Towards a morphometric classification of gorgoniid microskeletal components. *Micron*, *41*(2), 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.08.009>
- Vielzeuf, D., Floquet, N., Perrin, J., Tambutté, E., & Ricolleau, A. (2017). Crystallography of complex forms: The case of octocoral sclerites. *Crystal Growth and Design*, *17*(10), 5080–5097. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b00087>
- Wehrtmann, I., & Cortés, J. (2009). *Marine biodiversity of Costa Rica, Central America*. Springer.