

T
13
80

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

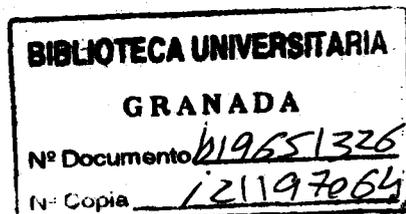
Departamento de Física Aplicada

ADSORCION DE PROTEINAS
SOBRE
MODELOS COLOIDALES

TESIS DOCTORAL

Francisco Galisteo González

Granada, 1992



ADSORCION DE PROTEINAS SOBRE MODELOS COLOIDALES

por

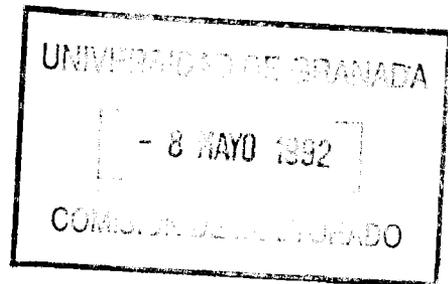
FRANCISCO GALISTEO GONZALEZ

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 20 MAYO 1992
ENTRADA NUM. 940

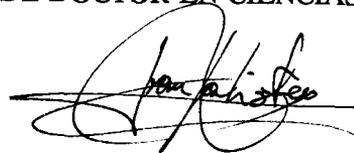
DIRECTOR DE LA TESIS



Dr. D. Roque Hidalgo Alvarez
Prof. Titular Dpto. de Física Aplicada



Trabajo presentado para aspirar al
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS FISICAS



Francisco Galisteo González

Granada, Abril de 1992

Quiero agradecer la colaboración prestada por mis compañeros del Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada, y muy especialmente al Dr. Roque Hidalgo Alvarez por la paciencia demostrada.

Quiero agradecer también la ayuda en todos los sentidos prestada por la empresa Biokit S.A. (Barcelona), especialmente a Josep Serra Domènech y al Dr. Josep Puig Oriol.

Agradezco al Departamento de Física Aplicada el haber permitido la realización de este trabajo.

INDICE

CAPITULO 1

INTRODUCCION

| | |
|------------------|---|
| 1.1 Introducción | 3 |
| 1.2 Referencias | 5 |

CAPITULO 2

SINTESIS Y CARACTERIZACION SUPERFICIAL DE MODELOS COLOIDALES

| | |
|-------------------------------------------|----|
| 2.1 Introducción | 7 |
| 2.2 Condiciones de síntesis | 11 |
| 2.3 Determinación del tamaño de partícula | 20 |
| 2.4 Densidad superficial de carga | 28 |
| 2.5 Referencias | 32 |

CAPITULO 3

CARACTERIZACION ELECTROKINETICA DE LOS MODELOS COLOIDALES

| | |
|-----------------------------------------------------------|----|
| 3.1 Introducción | 37 |
| 3.2 Dispositivo de electroforesis | 38 |
| 3.3 Caracterización electrocinética de látexes catiónicos | 49 |
| 3.4 Caracterización electrocinética de látexes aniónicos | 72 |
| 3.5 Conversión de datos de movilidad en potencial zeta | 77 |
| 3.6 Referencias | 90 |

CAPITULO 4

ADSORCION DE IgG

| | |
|----------------------------------------|-----|
| 4.1 Introducción | 95 |
| 4.2 Materiales y métodos | 98 |
| 4.3 Estructura de la IgG | 103 |
| 4.4 El sistema antes de la adsorción | 105 |
| 4.5 El sistema después de la adsorción | 106 |
| 4.6 Adsorción de IgG policlonal | 111 |
| 4.7 Adsorción de IgG monoclonal | 123 |
| 4.8 Referencias | 134 |

CAPITULO 5

CARACTERIZACION ELECTROKINETICA Y ESTABILIDAD COLOIDAL DE LOS COMPLEJOS LATEX-PROTEINA

| | | |
|-----|---------------------------------------|-----|
| 5.1 | Introducción | 139 |
| 5.2 | Materiales y métodos | 140 |
| 5.3 | Modelos teóricos | 141 |
| 5.4 | Complejos IgG policlonal - látex | 145 |
| 5.5 | Complejos IgG monoclonal - látex | 159 |
| 5.6 | Estabilidad coloidal de los complejos | 169 |
| 5.7 | Referencias | 172 |

APENDICE I

POLIMERIZACION EN EMULSION

| | | |
|-----|--------------------------------------------------------------|-----|
| I.1 | Introducción | 177 |
| I.2 | Mecanismo y cinética de la reacción | 179 |
| I.3 | Teoría cinética | 185 |
| I.4 | Transferencia de cadenas y modificación de la polimerización | 192 |
| I.5 | Grado de conversión y terminación | 197 |
| I.6 | Polimerización en emulsión sin emulsificante | 200 |
| I.7 | Predicción del tamaño de partícula | 202 |
| I.7 | Referencias | 204 |

APENDICE II

ESTRUCTURA DE LAS PROTEINAS

| | | |
|------|-----------------------------|-----|
| II.1 | Introducción | 209 |
| II.2 | Relación estructura-función | 212 |
| II.3 | Esqueleto polipeptídico | 213 |
| II.4 | Enlace de hidrógeno | 214 |
| II.5 | Interacción hidrofóbica | 217 |
| II.6 | Interacción iónica | 224 |
| II.7 | Puentes disulfuro | 227 |
| II.8 | Referencias | 231 |

APENDICE III

TEORIA ELECTROKINETICA

| | | |
|-------|------------------------------------|-----|
| III.1 | Introducción | 235 |
| III.2 | Teoría de Helmholtz-Smoluchowski | 238 |
| III.3 | Teoría de Gouy-Chapman | 240 |
| III.4 | Teoría de Stern | 247 |
| III.5 | Teoría de Henry | 252 |
| III.6 | Teoría de la doble capa polarizada | 255 |
| III.7 | Referencias | 264 |

APENDICE IV

DISPERSION CUASIELASTICA DE LUZ LASER

| | | |
|------|---------------------------------------------------------|-----|
| IV.1 | Introducción | 269 |
| IV.2 | Función de correlación | 269 |
| IV.3 | Luz dispersada por una solución de macromoléculas | 271 |
| IV.4 | Luz dispersada bajo la influencia de un campo eléctrico | 276 |
| IV.5 | Referencias | 279 |

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 INTRODUCCION

1.2 REFERENCIAS

CAPITULO 1

INTRODUCCION

El objetivo fundamental de este trabajo es el estudio de la adsorción de diversas proteínas en interfases sólido-líquido.

El interés que este tipo de sistemas tiene en el mundo de hoy es tan extenso y complejo que es difícil resumirlo en pocas palabras. Las proteínas están presentes en todas y cada una de las manifestaciones de la vida, y tienen una fuerte tendencia a adsorberse o acumularse en las interfases como consecuencia de su carácter anfotérico, es decir, por poseer en la mayoría de los casos zonas o regiones con un carácter más polar o hidrofílico y otras con un carácter más apolar o hidrofóbico. La interacción de éstas con las interfases sólido-líquido es para nosotros de fundamental importancia, no sólo para comprender aquellos casos en los que este fenómeno de adsorción se presenta en la Naturaleza, sino también para entender y perfeccionar la multitud de sistemas que la tecnología ha producido con participación de proteínas e interfases. Como ejemplo de los diversos campos de investigación en los que se presentan este tipo de fenómenos cabe citar la Biotecnología (inmovilización de enzimas, reactores industriales biológicos), Bioquímica (reacciones con proteínas), Química Analítica (técnicas de separación), industria alimentaria (estabilizadores de suspensiones), industria cosmética y farmacéutica (emulsificantes y estabilizantes), Medicina (prótesis, dosificadores de medicamentos, biosensores e inmunoensayos), etc.

Uno de los problemas más fascinantes y desafiantes que existen hoy día en la investigación científica es el encontrar la base física sobre la que se asienta la estructura tan específica y bien organizada de las proteínas. Esta cuestión tiene un interés muy particular para nosotros, puesto que se ha demostrado en numerosas ocasiones que la actividad biológica de estas macromoléculas es muy sensible a pequeñas variaciones en su conformación tridimensional.

El proceso de adsorción de una molécula de proteína desde la disolución hasta la interfase implica una alteración ambiental para aquella, y cabe esperar por tanto que sus interacciones tanto intra- como intermoleculares cambiarán también. Como resultado de este proceso la estructura tridimensional de la proteína se verá afectada, y dada la fuerte relación existente entre estructura y función en estas moléculas anteriormente mencionada, es lógico deducir que el estudio de los cambios estructurales que puedan ocasionarse como consecuencia de este proceso

de adsorción tiene un gran interés. Es más, los cambios estructurales sufridos por la proteína pueden, incluso, ser la principal causa que provoque su adsorción en una interfase de forma espontánea (1).

El material que se ha utilizado como adsorbente en este trabajo es un coloide polimérico de poliestireno, generalmente denominado como látex, y que se ha elegido por la facilidad con que se puede controlar el tamaño de las partículas y su carga superficial en la síntesis sin necesidad de añadir agentes emulsificantes o tensioactivos (2). Además, este tipo de coloide es la base de numerosos tests de inmunodiagnóstico, y aunque este trabajo tiene un fundamento de investigación básica, también se pretende conseguir un mayor conocimiento de este tipo de inmunoensayos que pudiera redundar en una mejora del diagnóstico de ciertas enfermedades.

Para un correcto análisis de este sistema, en el que intervienen de forma decisiva tanto la estructura de la proteína como la de la interfase sólido-líquido, la investigación debe realizarse comenzando por una caracterización lo más profunda posible de cada una de las partes que lo componen por separado. Siguiendo este criterio, en este trabajo se van a estudiar primero de forma independiente las características de la superficie adsorbente, que en nuestro caso será látex de poliestireno esférico y monodisperso, así como la influencia que sobre él tiene la disolución que lo rodea.

El estudio de las partículas de látex se va a realizar desde dos puntos de vista principalmente:

- Síntesis del poliestireno, tanto puro como copolimerizado con otros monómeros, que comprendería el aspecto químico de la polimerización en emulsión y todos los parámetros que influyen en el resultado final.
- Caracterización de la superficie, que implicaría por un lado la determinación de la carga superficial mediante valoración conductimétrica y potenciométrica, y por otro lado la determinación de la carga "electrocinética", responsable de los fenómenos macroscópicos que estas partículas presentan en disolución.

La estabilidad coloidal de estas suspensiones está supeditada al estado eléctrico de la interfase y a las características de la disolución que la rodea, por lo que intentaremos determinar las variables que influyen en el mantenimiento de esta estabilidad. Debido a la importancia que tiene por tanto la carga eléctrica presente en la superficie de las partículas, vamos a poner especial interés en estudiar las características que puedan variar en un látex por poseer carga superficial positiva o negativa, así como la influencia que este hecho pueda tener en el proceso de adsorción de proteínas. –

Una vez que conozcamos lo mejor posible la superficie adsorbente, vamos a estudiar el comportamiento en disolución de las proteínas que posteriormente se adsorberán sobre dicha superficie, e intentar distinguir que aspectos de ambos sistemas se ven afectados por el fenómeno de la adsorción. Las proteínas que se van a estudiar son inmunoglobulinas-G (IgG) policlonales preinmunes de conejo e inmunoglobulinas-G monoclonales de ratón, ya que éstas son las más utilizadas en la práctica para la fabricación de los tests de inmunodiagnóstico anteriormente mencionados.

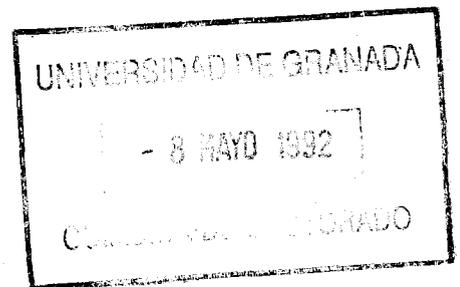
REFERENCIAS

- (1) Norde, W., *Adv. Colloid and Interface Sci.* **25**, 267 (1986).
- (2) Goodwin, J.W., Hearn, J, Ho, C.C. and Ottewill, R.H., *Colloid and Polymer Sci.* **252**, 464 (1974).

CAPITULO 2

SINTESIS Y CARACTERIZACION SUPERFICIAL DE MODELOS COLOIDALES

- 2.1 INTRODUCCION**
- 2.2 CONDICIONES DE SINTESIS**
- 2.3 DETERMINACION DEL TAMAÑO DE PARTICULA**
- 2.4 DENSIDAD SUPERFICIAL DE CARGA**
- 2.5 REFERENCIAS**



CAPITULO 2

SINTESIS Y CARACTERIZACION SUPERFICIAL DE MODELOS COLOIDALES

2.1 INTRODUCCION

Dentro de la rama de la Física que se dedica al estudio del estado coloidal, y que podríamos definir como aquella que estudia los sistemas mesoscópicos en que el tamaño de la fase dispersa tiene alguna de sus dimensiones comprendida entre 10^{-6} y 10^{-9} m, se puede considerar como fundamental la búsqueda de sistemas modelo con los que poder corroborar los estudios teóricos que tratan todo tipo de fenómenos relativos a este tamaño de la materia y su relación con el entorno que la rodea. Las dos condiciones principales que un sistema tiene que cumplir para poder considerarlo como tal son: que las partículas que lo formen tengan una geometría perfectamente definida y que sea monodisperso, es decir, que todas las partículas tengan el mismo tamaño.

En la actualidad existen dos grupos distintos de coloides modelo que cumplen estos requisitos: el primero está relacionado con las reacciones de condensación o copolimerización que dan lugar a la formación de polímeros orgánicos de alto peso molecular, siendo el más importante de ellos sin lugar a dudas el poliestireno, y que tanto en su forma aniónica como catiónica es el que hemos utilizado en este trabajo. El segundo se refiere a los coloides inorgánicos que se pueden obtener haciendo crecer cristales de óxidos metálicos (TiO_2 , Fe_2O_3 , etc.), en condiciones tales que sea posible la obtención de partículas esféricas con un alto grado de monodispersión. Los coloides formados por polímeros orgánicos tienen la ventaja de que pueden obtenerse en mayor cantidad, frente a la limitada producción de cristales de óxidos metálicos, aunque presentan el inconveniente de que no se conocen con detalle sus características superficiales, existiendo incluso la posibilidad de que la superficie de estas partículas no sea rígida sino flexible. En apartados posteriores de este capítulo trataremos con más detalle esta hipótesis, según la cual la superficie de las partículas de poliestireno estaría formada por cadenas poliméricas que podrían conferirle unas características muy especiales, sobre todo en lo referente a la estabilidad de sus dispersiones coloidales.

En los últimos 50 años el campo de aplicación de los látex poliméricos se ha ampliado extraordinariamente (1), tanto a escala industrial como de laboratorio, y en especial de aquellos

que hemos definido como modelos coloidales por su homogeneidad de forma y tamaño. Entre las aplicaciones más destacadas que tienen estos últimos pueden citarse las siguientes:

- 1) Calibrado de instrumentos de precisión (microscopía electrónica, microscopía óptica, aparatos de dispersión de luz, conteo de partículas en aerosoles, conteo electrónico de partículas, difracción de pequeño ángulo de rayos X, etc..).
- 2) Pruebas de diagnóstico médico, como por ejemplo los tests de aglutinación de látex para detectar artritis reumatoide, embarazo, tuberculosis, triquinosis, etc..
- 3) Determinación del tamaño de poro en filtros y membranas biológicas.
- 4) Inmovilización de enzimas en sistemas catalíticos.
- 5) Investigación de los mecanismos y cinética de la polimerización en emulsión.
- 6) Formación de películas de látex.

En los últimos años existe en particular un creciente interés por las aplicaciones biomédicas que los látexes poliméricos tienen, en especial en pruebas serológicas, biorreactores, cirugía cardiovascular y en técnicas de separación de macromoléculas (2-12). Nuestra investigación está precisamente orientada en este campo, y se basa en el entendimiento de los fenómenos que acontecen cuando la superficie de estas partículas poliméricas entra en contacto con las macromoléculas más abundantes de los seres vivos: las proteínas.

En la actualidad se disponen ya de numerosos métodos para la síntesis de látex poliméricos (13-18), especialmente en el caso del poliestireno aniónico y de copolímeros de tipo también aniónico (es decir, con carga negativa en su superficie), que permiten obtener partículas con un tamaño comprendido entre 0.1 y 10 micras y una densidad de carga comprendida entre 4 y 70 mC m⁻² sin necesidad de utilizar agentes tensioactivos (emulsificantes) para estabilizar la dispersión, ya que estos contaminan la superficie del látex y son difíciles de retirar (véase Apéndice I). Existen métodos de preparación incluso para látexes muy pequeños, menores de 0.1 μm (19), y para partículas muy grandes (> 10 μm), que se sintetizan en el espacio en condiciones de ingravidez (20). El caso del poliestireno catiónico es diferente (21-24), pues hasta hace poco tiempo todos los métodos de síntesis usaban como iniciadores de la reacción de polimerización compuestos orgánicos de tipo azo-amidínico que confieren a la superficie del látex una carga

fuertemente dependiente del pH del medio y muy propensos a la hidrólisis, lo que hacía poco útil este tipo de látexes. Únicamente un trabajo publicado muy recientemente por Blackmeer y Fleer (25) en 1.991 habla de un látex catiónico con una densidad superficial de carga independiente del pH, preparado mediante un nuevo tipo de iniciador en el que el nitrógeno que produce la carga negativa no tiene ningún orbital libre para aceptar un protón, sino que dicho orbital está empleado en formar un enlace covalente y existe por tanto deficiencia de un electrón. Como esta carga no depende de la unión de un protón, no depende por consiguiente tampoco de la concentración de protones, es decir, es independiente del pH. En cualquier caso, estos sistemas no están muy estudiados, y aún no se conoce muy bien si presentan o no un comportamiento semejante al del poliestireno negativo. El objetivo principal de esta parte del trabajo ha sido, precisamente, estudiar el comportamiento electrocinético y superficial de dos muestras de látex catiónico preparadas en este laboratorio.

Además de los látexes catiónicos anteriormente mencionados, también hemos sintetizado varias muestras de látex copolimerizado de pequeño tamaño utilizando estireno y ácido acrílico como monómeros, de forma que pudiéramos comparar las características superficiales (tanto electrocinéticas como de adsorción de proteínas) de este tipo de polímeros con los aniónicos homogéneos y con los catiónicos.

2.2 CONDICIONES DE SINTESIS

Todos los reactivos utilizados en la síntesis de los látexes, así como aquellos utilizados en la preparación de tampones, ajuste del pH del medio o de la fuerza iónica han sido suministrados por la casa Merck o Sigma, y son de calidad de "reactivo puro para análisis".

El agua empleada ha sido bidestilada en un sistema de vidrio Pyrex, y posteriormente desionizada en un lecho mixto de resinas de intercambio iónico (Milli-Q, de Millipore).

El estireno y el ácido acrílico utilizados en las reacciones de polimerización han sido suministradas por la casa Merck, y antes de usarse se han purificado mediante destilación a 40°C con presión reducida (30 mm Hg). Esta purificación es necesaria con el objeto de retirar los inhibidores de tipo hidroquinona que estas sustancias traen de fábrica y que impiden que los monómeros polimericen por acción de la luz o del oxígeno atmosférico.

El sistema utilizado para la reacción de polimerización se muestra en la Figura 2.1, y básicamente está compuesto por un matraz de un litro con tres bocas inmerso en un baño termostático que mantiene constante la temperatura. En la boca central se sitúa un adaptador que permite agitar la mezcla de reacción en el interior del matraz a velocidad constante y sin pérdidas por evaporación; en una de las bocas laterales está la entrada para el termómetro que controla la verdadera temperatura de reacción junto con el sistema refrigerante de reflujo que evita la pérdida de materiales volátiles; y en la otra boca lateral se introduce el N_2 que mantiene una atmósfera inerte en el interior del matraz o se utiliza para extraer muestras de la mezcla reaccionante si se quiere comprobar el grado de conversión del monómero en polímero.

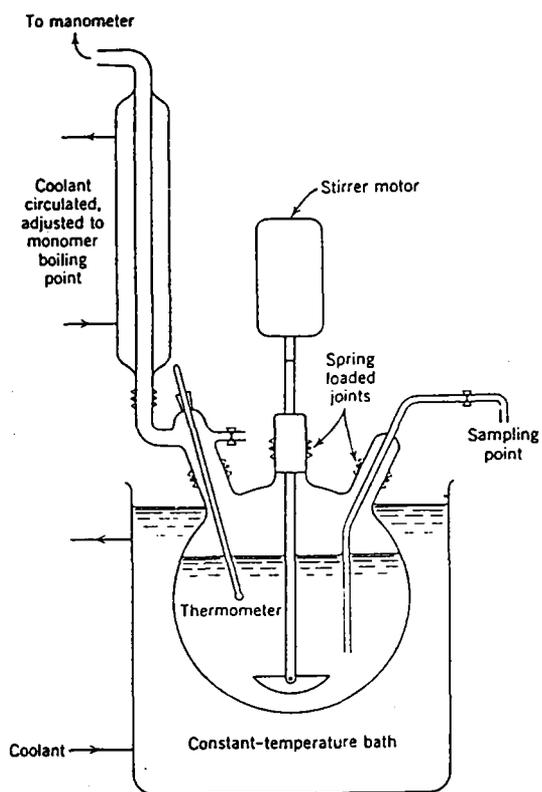


Fig. 2.1 Esquema del sistema de polimerización

La receta seguida en la síntesis de los látexes catiónicos está basada en el trabajo de Goodwin y col. (26) y las posteriores modificaciones realizadas por Hidalgo Alvarez y col. (27). Estas últimas se introdujeron con el objeto de adaptar el iniciador del azo-N,N'-dimetilén-isobutilamidina hidrocloreuro (ADMBA) al sistema de reacción (Figura 2.2). El mecanismo propuesto para la iniciación de la polimerización del estireno por descomposición térmica de esta sustancia se encuentra resumido en la Figura 2.3. Este compuesto fue generosamente suministrado por el Dr. J.W.S. Goossens, de la compañía Bayer AG, en Leverkusen (Alemania).

Sobre esta última receta nosotros hemos realizado nuevas modificaciones con el objeto de conseguir que la carga eléctrica positiva de la superficie fuera lo más estable posible tanto frente a la hidrólisis como a los cambios de pH del medio. Para ello hemos realizado la reacción de polimerización en un medio bastante ácido, siguiendo la receta descrita en la Tabla 2.1.

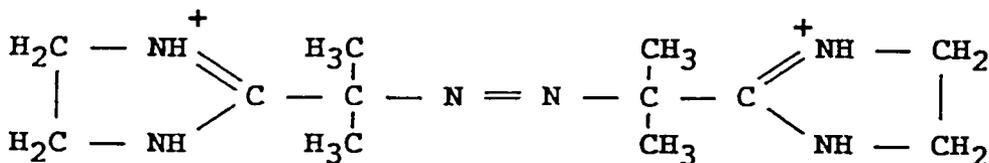


Fig. 2.2 Fórmula del iniciador ADMBA.

En ambos casos la temperatura de polimerización fue de 50°C, y la agitación se mantuvo constante durante todo el proceso a 350 r.p.m., situando la paleta agitadora a 1 cm del fondo para poder reproducir las condiciones hidrodinámicas de la síntesis de un caso a otro. La mezcla reaccionante se mantuvo durante 24 horas polimerizando, y transcurrido este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente. A continuación se filtró a través de lana de vidrio previamente lavada repetidas veces con agua destilada hirviendo, y se midieron entonces la conductividad, el pH y el contenido en sólido de ambos látexes. Los resultados de estas dos reacciones de síntesis están resumidos en la Tabla 2.2.

Tabla 2.1 Condiciones de síntesis de los látexes catiónicos

| Componente | Látex M-8 | Látex M-9 |
|-----------------------|-----------|-----------|
| HCl 10^{-3} M (ml) | 620 | 620 |
| Estireno (g) | 27 | 47.5 |
| ADMBA (mg) | 487 | 350 |
| HCl 0.2 M (ml) | 19.5 | 19.5 |
| H ₂ O (ml) | 80 | 80 |

Tabla 2.2 Resultado de la reacción de polimerización

| | Látex M-8 | Látex M-9 |
|----------------------------------------|-----------|-----------|
| Conductividad (μScm^{-1}) | 394 | 1800 |
| pH | 3.1 | 2.3 |
| Masa de látex (g) | 741.5 | 762.0 |
| % sólido | 2.87 | 4.42 |
| % Rendimiento | 77.4 | 70.4 |

Como se puede ver en la última fila de la Tabla 2.2, los rendimientos de ambas síntesis fueron relativamente bajos, lo que implica una gran cantidad de estireno que no ha polimerizado en forma de partículas (o que numerosas partículas han coagulado para formar grumos de plástico, y estos han sido retenidos en la lana de vidrio) y también una parte del estireno que no ha polimerizado, y que por tanto se encontrará en forma de monómero en el látex obtenido. Para retirar este resto de la fase orgánica se sometieron las dos muestras a un proceso de arrastre de vapor durante 12 horas, de modo que todo el estireno sin reaccionar fuera desplazado de la dispersión de polímero.

Tabla 2.3 Neutralización y limpieza iónica de los látexes catiónicos

| | Látex M-8 | Látex M-9 |
|----------------------------------------|-----------|-----------|
| NEUTRALIZACION | | |
| Conductividad (μScm^{-1}) | 240 | 720 |
| pH | 7.4 | 7.3 |
| LIMPIEZA IONICA | | |
| Conductividad (μScm^{-1}) | 6.8 | 4.4 |
| pH | 6.1 | 5.6 |
| % sólido | 2.6 | 4.2 |

Después de que ambos látexes fueron limpiados de los restos de monómero, se procedió a la limpieza iónica de estas dos muestras, ya que como se puede ver en los datos de conductividad de la Tabla 2.2 existen numerosos iones en la disolución acuosa procedentes tanto del iniciador como del HCl añadido. Puesto que el pH de ambas muestras es bastante ácido, lo primero que hicimos fue neutralizar con NaOH, de modo que todos los iones H^+ fueran retirados del medio. A continuación se trataron las suspensiones de látex con una mezcla de resinas intercambiadoras de iones tanto aniónicas como catiónicas, que en trabajos anteriores (28) habíamos demostrado como el método más eficaz en la limpieza iónica de látexes catiónicos. Estas resinas fueron previamente lavadas con agua destilada a 70°C varias veces hasta que dieron conductividad constante y menor de $1 \mu\text{S cm}^{-1}$. Tras este proceso de limpieza, en la que suponemos que además de los iones se han retirado las cadenas oligoméricas que posiblemente existan tanto en disolución como adsorbidas en la superficie de las partículas, las muestras de látex quedaron en las condiciones de pH, conductividad y peso seco que se muestran en la Tabla 2.3.

Una vez limpias las dos muestras de látex catiónico ya se puede proceder a la caracterización de las partículas que lo componen, tanto de su tamaño y monodispersión como de la carga eléctrica que presentan en la superficie.

Los látexes copoliméricos fueron sintetizados mediante un método diferente al anterior denominado "de siembra", ya que partimos de un látex ya sintetizado (núcleo) sobre el que añadimos los comonomeros y un iniciador para que éstos polimericen sobre la superficie de las partículas (envoltura). De esta forma se puede conseguir un control muy preciso sobre el tamaño, la carga y la composición superficial del látex, ya que sólo es necesaria una capa de algunos nanómetros alrededor de la partícula original para que la nueva superficie presente las características propias de los monómeros recién añadidos, independientemente del núcleo utilizado. En nuestro caso hemos realizado dos recubrimientos con proporciones diferentes de los monómeros estireno-ácido acrílico sobre un mismo núcleo para obtener dos látexes de semejante tamaño pero distinta densidad superficial de carga (refiriéndonos a la carga débil que aportan los grupos carboxilo del ácido acrílico). El núcleo del que hemos partido es un látex copolimérico también de estireno y estirén sulfonato sódico sintetizado según la receta descrita por Bastos González (29), con un tamaño de 180 ± 6 nm. Las condiciones de la síntesis sembrada están resumidas en la Tabla 2.4, en las que los ml de persulfato potásico están referidas a una disolución 94 mM en agua recién preparada. La velocidad de agitación fue de 350 r.p.m., y la temperatura de la reacción se mantuvo constante e igual a 70°C durante las 5 horas que duró el proceso de copolimerización.

Los resultados de estas dos síntesis se pueden ver en la Tabla 2.5, donde al igual que en el caso de los látexes catiónicos las muestras han sido filtradas a través de lana de vidrio limpia una vez que la reacción ha terminado y que la masa de líquido se ha enfriado hasta la temperatura ambiente.

Como se puede ver en la última fila de esta Tabla, donde aparecen los rendimientos obtenidos en cada una de las dos reacciones de copolimerización prácticamente todo el monómero añadido ha polimerizado, ya que los valores son superiores al 90%. El aspecto y el olor que presentaban los látexes demostraban además que no existían monómeros sin reaccionar, por lo que no fue necesario hacerles un tratamiento de arrastre de vapor como en el caso de los látexes catiónicos.

El siguiente paso en la preparación de estas dos muestras de látex carboxílico para el estudio de su superficie y sus propiedades interfaciales es evidentemente la limpieza iónica de la disolución, ya que como puede observarse por los datos de conductividad de ésta una vez terminado el proceso de polimerización existen gran cantidad de iones disueltos.

Tabla 2.4 Condiciones de síntesis de los látexes carboxílicos

| | Látex CC-2 | Látex CC-4 |
|---------------------------------------------------|------------|------------|
| Núcleo (ml) | 300 | 300 |
| % sólido | 5.37 | 5.39 |
| PS/PSSNa (g) | 16.12 | 16.18 |
| Estireno (ml) | 3.5 | 1 |
| Acido acrílico (ml) | 0.5 | 3 |
| K ₂ S ₂ O ₈ (ml) | 1.58 | 1.58 |

Puesto que este tipo de látexes presentan una carga superficial bastante grande (por la cantidad de grupos cargados que implica el que cada unidad monomérica tenga un grupo carboxílico, en contraposición de los otros látexes que sólo tienen una unidad de carga o dos por molécula de polímero), la limpieza de su superficie no se puede realizar mediante el uso de resinas de intercambio iónico como hicimos en el caso de los látexes catiónicos. Esto es debido a que la capacidad de intercambio de iones es superior en las partículas de látex que en las de resina, y por tanto sería el látex el que "limpiaría" de iones a la resina de intercambio iónico y a la disolución, lo que en definitiva supone no retirar los productos de desecho producidos en la reacción (sobre el látex con menor densidad superficial de carga, el CC-2, ya limpiado mediante tres centrifugaciones y redispersiones con agua destilada y que presentaba una conductividad de $17.7 \mu\text{S cm}^{-1}$ se intentó la limpieza con 25 g de resinas, y tras 2 horas de agitación el látex filtrado presentaba una conductividad de $34.4 \mu\text{S cm}^{-1}$, lo que quiere decir que en vez de retirar iones de la disolución y sustituirlos por H⁺ y OH⁻ el proceso ocurrido ha sido inverso).

La limpieza iónica de estos látexes se llevó a cabo entonces mediante ciclos de centrifugación y redispersión con agua destilada, aprovechando el hecho de que debido a la fuerte densidad superficial de carga que como ya comentamos antes presentan estas partículas es muy fácil su redispersión aunque hayan sido centrifugadas con velocidades muy grandes.

Tabla 2.5 Resultado de la reacción de polimerización

| | Látex CC-2 | Látex CC-4 |
|----------------------------------------|------------|------------|
| Conductividad (μScm^{-1}) | 875 | 3560 |
| pH | 3.11 | 2.71 |
| Masa de látex (g) | 305.9 | 306.2 |
| % sólido | 6.01 | 6.37 |
| % rendimiento | 92.7 | 96.4 |

Este fenómeno demuestra claramente que la estabilidad coloidal de este tipo de partículas está controlada por la repulsión electrostática entre cargas del mismo signo, y que para el caso de los látexes carboxílicos altamente cargados esta estabilidad supera la fuerza de compactación que supone el centrifugarlos a 22.000 r.p.m. durante una hora. En la Tabla 2.6 se puede ver como variaron la conductividad y el pH de ambas muestras de látex con los sucesivos procesos de centrifugación y redispersión, una vez que fueron neutralizados las dos suspensiones con NaOH.

La otra clase de látex que hemos utilizado en este trabajo ha sido una muestra comercial de la casa Rhône-Poulenc con un tamaño nominal de 297 ± 3 nm, cedido por Biokit, S.A. para realizar estudios de adsorción de proteínas sobre su superficie. Este látex es de tipo aniónico con grupos sulfato en su superficie, y presenta el inconveniente para nosotros de que ha sido sintetizado en presencia de agentes emulsificantes para asegurar su estabilidad coloidal. Aunque hemos realizado la limpieza de este látex mediante diferentes métodos de limpieza iónica, no se puede asegurar que hayan sido retiradas de la superficie de las partículas las moléculas de emulsificante adsorbidas sobre ella.

No obstante, el uso de este látex tiene para nosotros la ventaja de que conocemos muy bien sus características de adsorción para diferentes clases de proteínas, además de ser el tipo de látex generalmente utilizado en los tests de inmunodiagnóstico. Es por ello que consideramos fundamental el comparar las características tanto superficiales como de adsorción que tiene este látex muy bien conocido con las de las muestras nuevas que se están investigando, ya que la meta final de este trabajo de investigación es la búsqueda de resultados que mejoren la aplicación práctica de estas partículas en los tests de aglutinación de látex.

Tabla 2.6 Neutralización y limpieza iónica de los látexes carboxílicos

| | Látex CC-2 | Látex CC-4 |
|----------------------------------------|------------|------------|
| NEUTRALIZACION | | |
| Conductividad (μScm^{-1}) | 522 | 1640 |
| pH | 7.1 | 7.2 |
| 3 CENTRIFUGACIONES | | |
| Conductividad (μScm^{-1}) | 17.7 | 19.1 |
| pH | 6.2 | 6.0 |
| % sólido | 3.69 | 3.83 |

2.3 DETERMINACION DEL TAMAÑO DE PARTICULA

La determinación del tamaño de las partículas que componen estas muestras de látex se ha realizado mediante observación de las mismas con microscopio electrónico, tanto de transmisión como de barrido, en los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. Las fotografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido (M.E.B.) permiten una visualización directa de la superficie de las partículas, además de poder medir el tamaño de una partícula de forma aproximada mediante el cursor a escala que incorpora el sistema informático del instrumento (Figura 2.4a).

Con una amplificación de la imagen menor, como puede observarse en la Figura 2.4b, se puede hacer una estimación cualitativa de la monodispersión de la muestra, que para el caso del látex M-8 podemos considerar como bastante buena, ya que no se observa en la imagen diferencias de tamaño apreciables entre las numerosas partículas que aparecen en la fotografía. Para realizar un estudio cuantitativo de la distribución de tamaños en una dispersión de látex, sin embargo, es necesario realizar fotografías con el microscopio electrónico de transmisión (M.E.T.), ya que este sólo distingue los contornos de las partículas y presenta un contraste de imagen mucho mayor que el M.E.B. Para analizar los datos de tamaño de partícula a partir de

una fotografía de este tipo nosotros hemos utilizado un tablero gráfico informatizado que mide automáticamente el diámetro de cada partícula con sólo señalar con el puntero tres puntos diferentes de su contorno, y mediante un programa de ordenador diseñado en nuestro laboratorio por Francisco Martínez López se analizan estadísticamente estos datos. En la Figura 2.5 se puede ver una de las fotografías de M.E.T. del látex M-8 a partir de las que se ha obtenido la distribución de tamaños que se muestra en la Figura 2.6.

Si llamamos n_i al número de partículas que tienen un diámetro determinado d_i , podemos obtener los siguientes valores promedio a partir de los datos obtenidos y almacenados por el sistema gráfico:

Diámetro promedio en número

$$d_n = \frac{\sum n_i d_i}{\sum n_i} \quad [2.1]$$

Diámetro promedio en peso

$$d_w = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad [2.2]$$

Diámetro promedio en volumen

$$d_v = \left(\frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i} \right)^{1/3} \quad [2.3]$$

Índice de polidispersidad

$$P = \frac{d_w}{d_n} \quad [2.4]$$

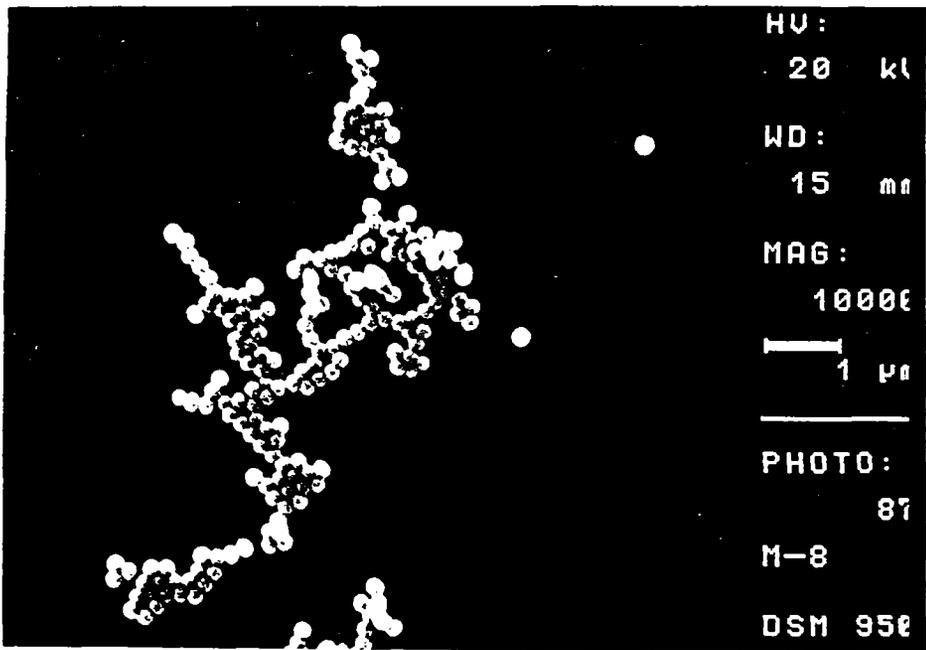
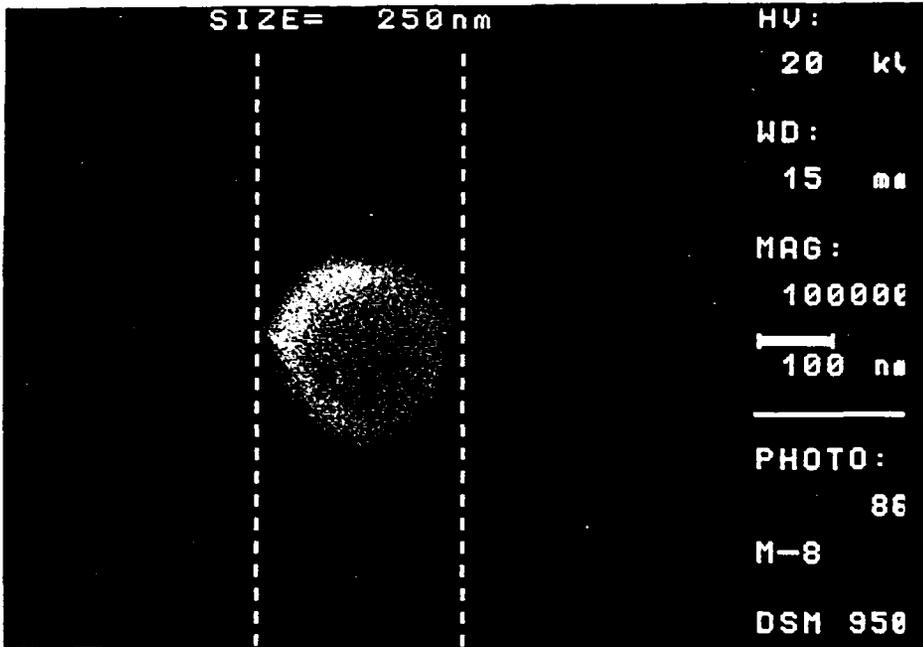


Fig. 2.4 Imagen del látex catiónico M-8 mediante M.E.B.

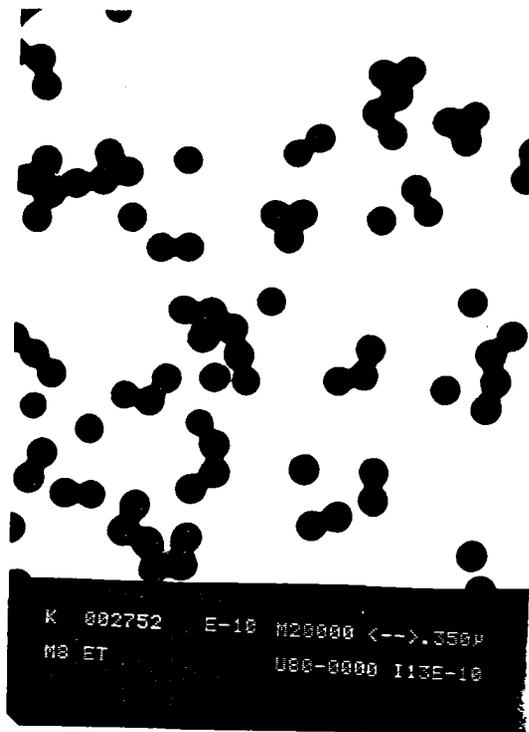


Fig. 2.5 Imagen del látex catiónico M-8 mediante M.E.T.

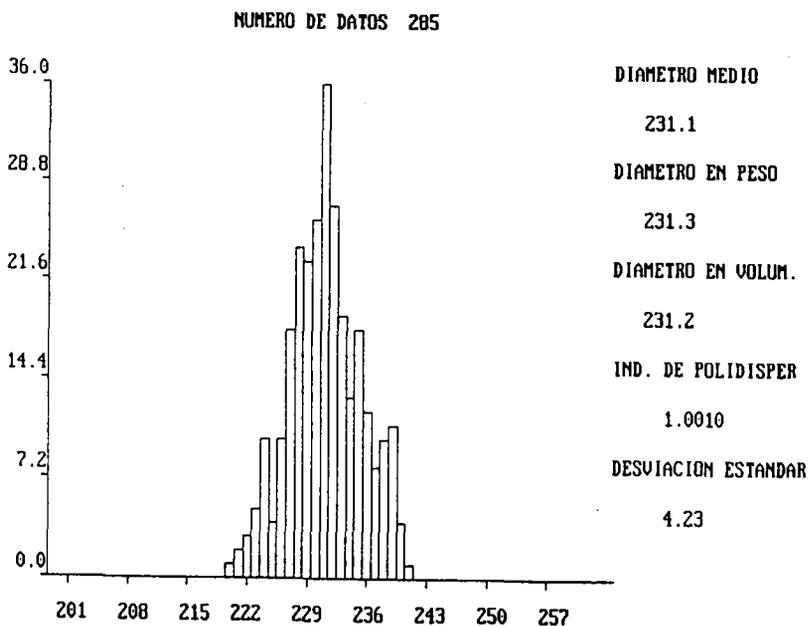
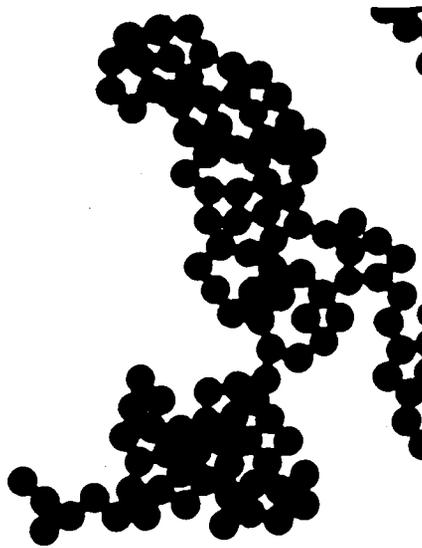


Fig. 2.6 Análisis estadístico de la distribución de tamaños en el látex M-8



```

K 002842 E-10 M12000 <-->.583P
M-9 U80-0000 I16S-16
  
```

Fig. 2.7 Imagen del látex catiónico M-9 mediante M.E.T.

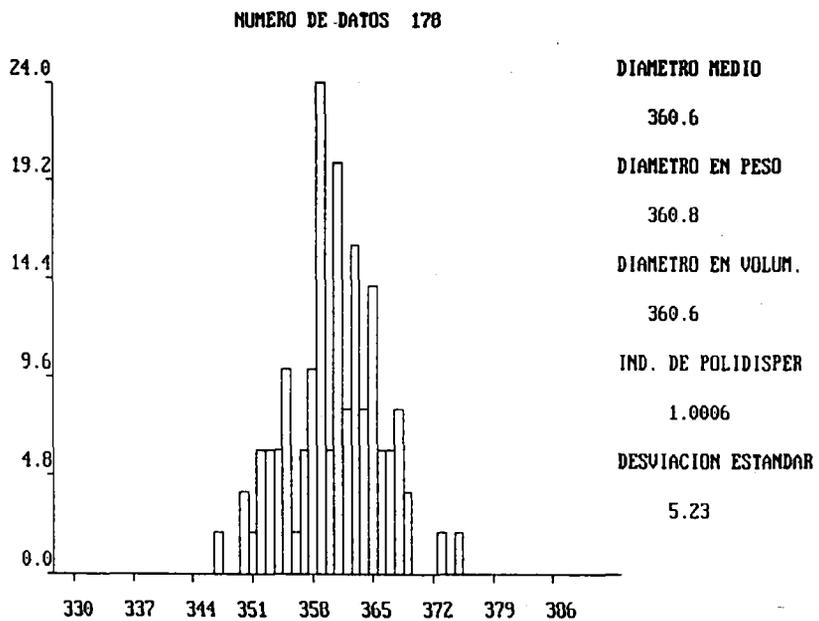


Fig. 2.8 Análisis estadístico de la distribución de tamaños en el látex M-9

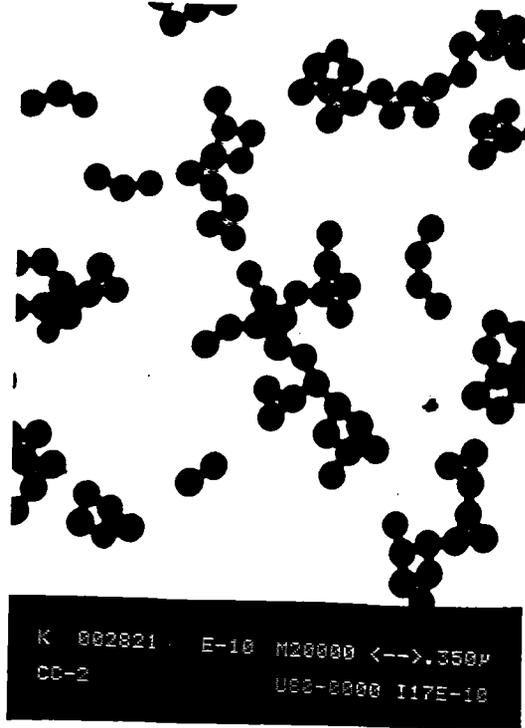


Fig. 2.9 Imagen del látex aniónico CC-2 mediante M.E.T.

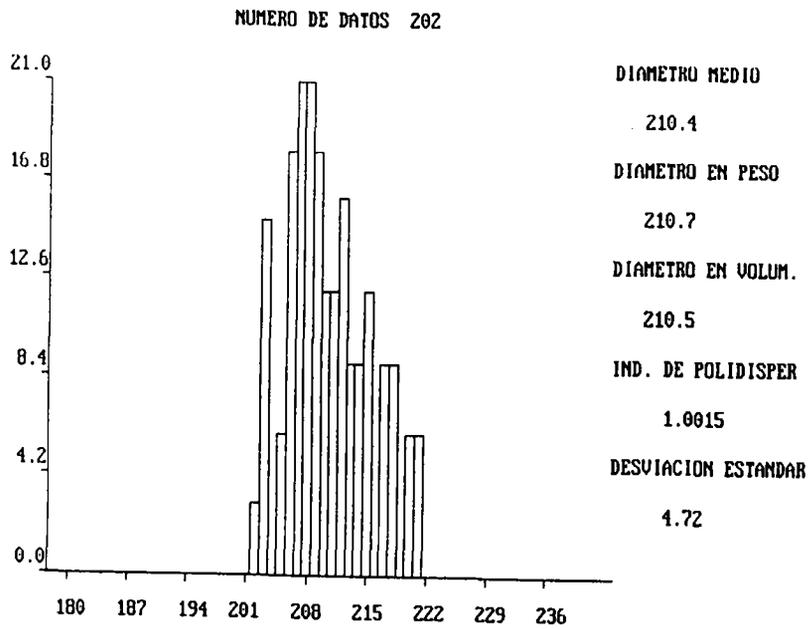


Fig. 2.10 Análisis estadístico de la distribución de tamaños en el látex CC-2

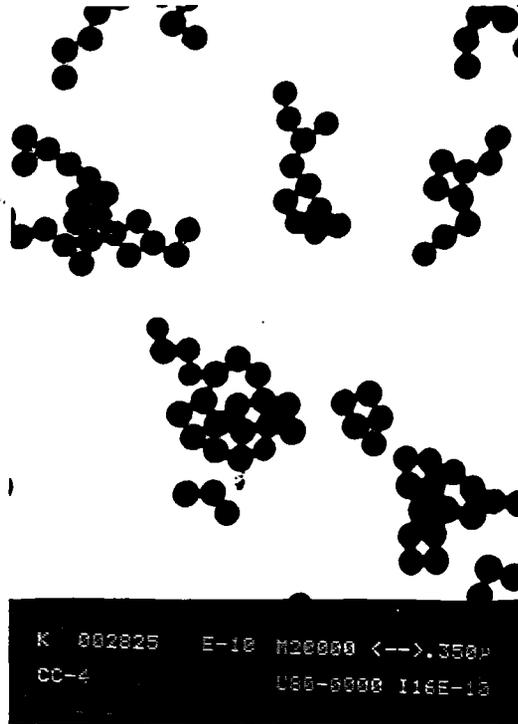


Fig. 2.11 Imagen del látex aniónico CC-4 mediante M.E.T.

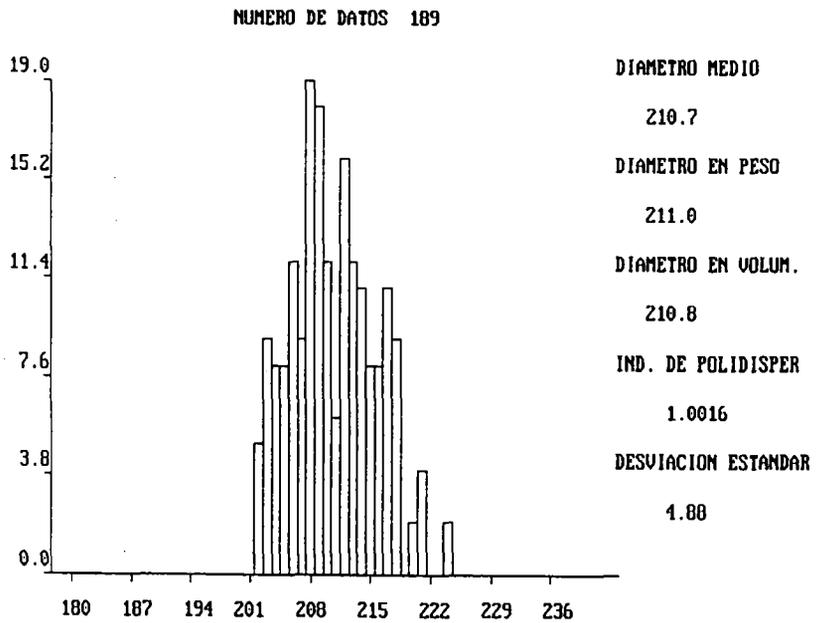


Fig. 2.12 Análisis estadístico de la distribución de tamaños en el látex CC-4

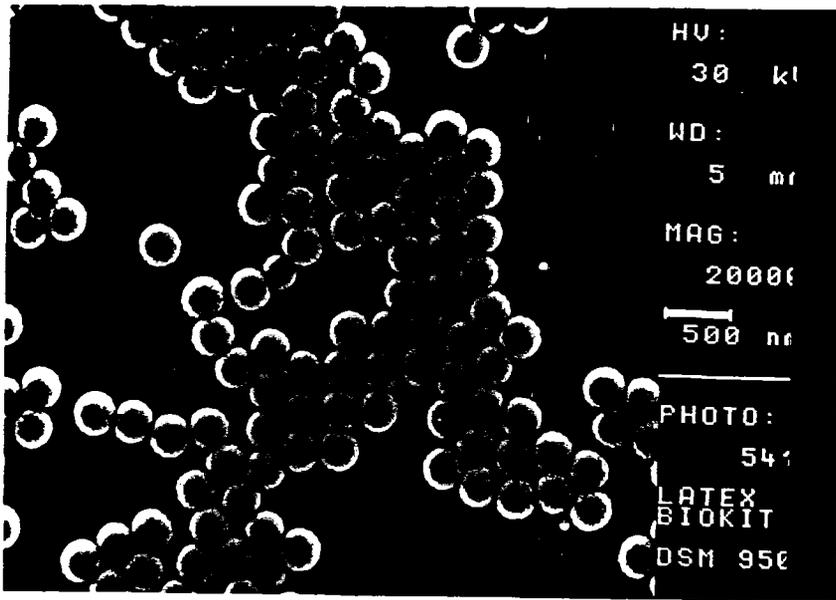


Fig. 2.13 *Imagen del látex aniónico Rhône-Poulenc mediante M.E.B.*

2.4 DENSIDAD SUPERFICIAL DE CARGA

Una vez que se ha determinado con exactitud el tamaño y el índice de polidispersidad de cada uno de los látexes con los que posteriormente vamos a trabajar, el siguiente paso en la caracterización de estas partículas es la determinación de la carga eléctrica que tienen en su superficie. Este parámetro es fundamental para poder interpretar todos los fenómenos que acontecen en la materia en estado coloidal, ya que en una esfera con un tamaño tan pequeño la relación superficie-volumen es tan grande que prácticamente todo lo que ocurra depende de las características de dicha superficie, y en particular la carga eléctrica presente en la interfase sólido-disolución acuosa es el parámetro principal a tener en cuenta para poder interpretar todo lo relacionado con estabilidad coloidal, propiedades electrocinéticas, procesos de adsorción, etc.

La densidad superficial de carga de un látex se determina mediante valoración conductimétrica o potenciométrica (30-32), es decir, añadiendo al látex limpio un ácido o una base y registrando la variación en la conductividad eléctrica o el pH, respectivamente. Nosotros hemos obtenido el valor de densidad superficial de carga a partir de los datos de conductividad, es decir, mediante una valoración conductimétrica. Para poder realizar este tipo de medida de forma rutinaria y reproducible, hemos desarrollado en nuestro laboratorio un sistema informatizado que controla automáticamente el dosificador que va añadiendo el ácido o la base a la muestra de forma controlada y va registrando a la par los valores de la conductividad y el pH. Este sistema está compuesto por un pHmetro modelo 2002 y un conductímetro modelo 525 ambos de la casa Crison Instruments, un dosificador modelo 665 Dosimat de la casa Metrohm, y un ordenador personal. Como ejemplo de este sistema de registro se puede ver en la Figura 2.14 la valoración tanto conductimétrica como potenciométrica de un blanco de NaOH con HCl, siendo estos la base y el ácido que utilizaremos siempre en la determinación de este parámetro de densidad de carga superficial.

Como se puede ver en esta Figura, una vez que se han obtenido los valores de conductividad eléctrica en función de la cantidad añadida de reactivo valorante el programa permite la determinación de los puntos de cambio de pendiente con sólo indicarle dos puntos cualquiera de las rectas correspondientes. Este programa realiza un ajuste mediante mínimos cuadrados de los puntos comprendidos entre los dos que nosotros le hemos dado, y una vez elegidas las rectas adecuadas aparece en el margen superior derecho la cantidad de mililitros de agente valorante que corresponden a este cambio de pendiente. En la misma Figura se observa como el punto de

inflexión de la curva donde se ha registrado la variación del pH, correspondiente con el punto de valoración ácido-base, coincide con el cambio de pendiente de las curvas conductimétricas.

Mediante este sistema automatizado se han valorado las suspensiones de los látexes previamente limpiados, y los datos obtenidos de cantidad de agente valorante necesarios para cambiar la pendiente en la recta de variación de la conductividad han sido traducidos a datos de carga eléctrica mediante otro programa desarrollado por nosotros. Este programa calcula los datos de superficie específica, superficie total y densidad superficial de carga eléctrica a partir de los valores de la cantidad de látex añadida, el porcentaje en sólido de dicho látex y los mililitros de agente valorante utilizados.

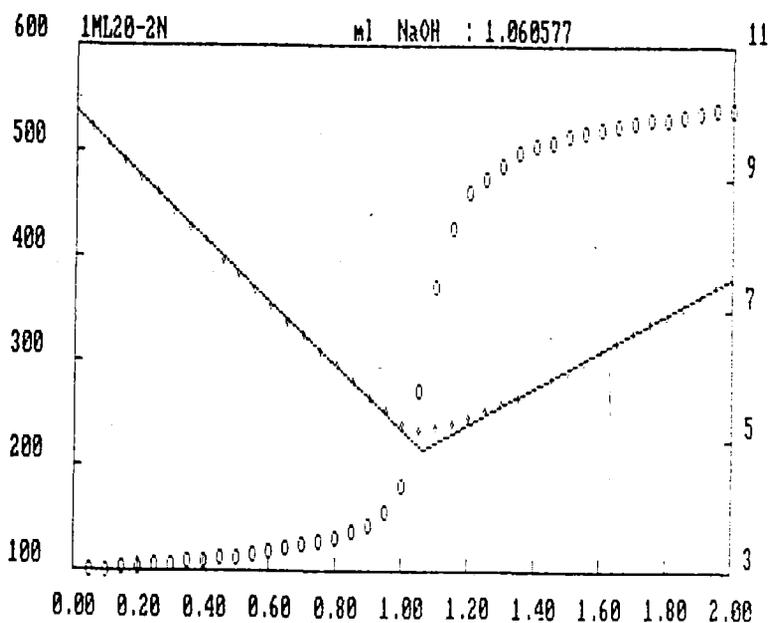


Fig. 2.14 Valoración de un blanco de NaOH con HCl

El cálculo de la densidad superficial de carga, σ_0 , de una suspensión de látex se realiza mediante la estimación de la superficie total de las partículas (a partir de consideraciones puramente geométricas) y del conocimiento del punto de neutralización de la valoración mediante la expresión

$$\sigma_0 = c \cdot f \cdot \frac{F}{S} \quad [2.5]$$

donde c es la cantidad de agente valorante utilizada hasta alcanzar el punto de neutralización (cambio de pendiente en las rectas de medida de la conductividad), expresada en moles; f es el factor de dicho agente valorante; F es la constante de Faraday expresada en $C\ mol^{-1}$; y S la superficie total de las partículas de látex en cm^2 .

Para resaltar la pendiente de la recta inicial de valoración (correspondiente al ácido o a la base fuerte presente en la superficie de las partículas) hemos añadido algo de NaCl a la muestra de látex siguiendo los resultados obtenidos por Labib y Robertson (31). Además de este aumento en la conductividad de la muestra, también hemos añadido algo de base fuerte (NaOH) en el caso de los látexes aniónicos y algo de ácido fuerte (HCl) en el caso de los catiónicos, con el objeto de asegurarnos que los grupos superficiales están en su forma cargada. Esta cantidad de ácido o de base se resta posteriormente de la cantidad correspondiente a la primera recta de la valoración, donde debe estar recogido el exceso añadido. En la Figura 2.15 se puede ver el resultado de una valoración de este tipo para el látex M-8, donde la cantidad de NaOH correspondiente a la primera recta de valoración coincide con el exceso de HCl añadido, e indica por tanto que la superficie del látex estaba en su forma iónica adecuada.

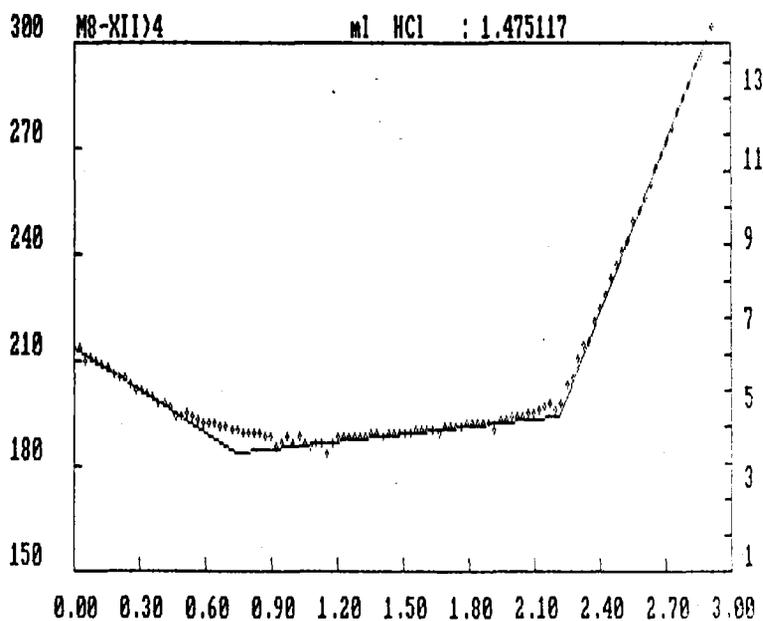


Fig. 2.15 Valoración conductimétrica del látex catiónico M-8

2.5 REFERENCIAS

- (1) Van den Hul, H.J. y Vanderhoff, J.W., *J. Electroanal. Chem.* **37**, 161 (1972).
- (2) Zsom, R.L.J., *J. Colloid Interface Sci.* **111**, 434 (1986).
- (3) Vaillier, J., Lematre, J., Vaillier, D. y Donner, M., *Life Sciences* **24**, 1183 (1979).
- (4) Dalglish, D.G., Dickinson, E. y Whyman, R.H., *J. Colloid Interface Sci.* **108** (1), 174 (1985).
- (5) Dickinson, E., Robson, E.W. y Stainsby, G., *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **79**, 2937 (1983).
- (6) Flerer, G.H. y Scheutjens, J.M.H.M., *J. Colloid Interface Sci.* **111** (2), 504 (1986).
- (7) Panitz, J.A., *J. Colloid Interface Sci.* **111** (2), 516 (1986).
- (8) Sharma, C.P. y Joseph, G., *J. Colloid Interface Sci.* **111** (2), 534 (1986).
- (9) Andrade, J.D. y Hlady, V., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **516** (1977).
- (10) Norde, W. y Lyklema, J., *J. Colloid Interface Sci.* **66** (2), 257 (1978).
- (11) Suzawa, T., Shirahama, H. y Fujimoto, T., *J. Colloid Interface Sci.* **86** (1), 144 (1982).
- (12) Clark, D.C., Smith, L.J. y Wilson, D.R., *J. Colloid Interface Sci.* **121** (1), 136 (1988).
- (13) Kotera, A., Furusawa, K. y Takeda, Y., *Kolloid Z. Z. Polym.* **239**, 677 (1970).
- (14) Goodwin, J.W., Hearn, J., Ho, C.C. y Ottewill, R.H., *Colloid and Polym. Sci.* **252**, 464 (1974).
- (15) Bagchi, P., Gray, B.V. y Birnbaum, S.M., *J. Colloid Interface Sci.* **69** (3), 502 (1979).
- (16) Tsaor, S.L. y Fitch, R.M., *J. Colloid Interface Sci.* **115** (2), 450 (1987).
- (17) Tsaor, S.L. y Fitch, R.M., *J. Colloid Interface Sci.* **115** (2), 463 (1987).
- (18) Bernhardt, C., *Adv. Colloid Interface Sci.* **29**, 79 (1988).
- (19) Bijsterbosch, B.H., *Colloid and Polym. Sci.* **256**, 343 (1978).
- (20) Vanderhoff, J.W., El-Aasser, M.S., Micale, F.J., Sudol, E.D., Tseng, C.M., Silwanowicz, A., Kornfeld, D.M. y Vicente, F.A., *J. Dispersion Science and Technology* **5**, 231 (1984).
- (21) Sakota, K. y Okaya, T., *J. Applied Polym. Sci.* **20**, 1725 (1976).
- (22) Goodwin, J.H., Ottewill, R.H. y Pelton, R., *Colloid and Polym. Sci.* **257**, 61 (1979).
- (23) van Streun, K.H., Belt, W.J., Piet, P. y German, A.L., *Eur. Polym. J.* **27**, 931 (1991).
- (24) van Streun, K.H., Belt, W.J., Piet, P. y German, A.L., *Eur. Polym. J.* **27**, 939 (1991).
- (25) Blaakmeer, J. y Flerer, G.J., *Colloids and Surfaces* **36**, 439 (1989).
- (26) Hidalgo Alvarez, R., de las Nieves, F.J., Van der Linde, A.J. y Bijsterbosch, B.J., *Colloids and Surfaces* **21**, 259 (1986).

El dato de densidad superficial de carga se obtiene finalmente promediando los valores obtenidos en al menos tres valoraciones distintas. En la Figura 2.16 está el resultado del cálculo de esta densidad superficial de carga para el caso del látex M-8 tal y como se obtiene del programa de cálculo antes mencionado.

```

LATEX M-8

RUN
Dame radio de la partícula en nanómetros
? 115
Dame gramos de látex utilizados
? 25
Porcentaje de sólido del látex???
? 2.71
Superficie total= 16.76842 m2
Superficie específica= 24.75044 m2/g
ClH (1) O NaOH (2) O AMBOS (3) ???
? 1
Volumen de ClH gastado (ml) ???
? 1.482
Densidad de carga superficial= .2012442 C/m2
Densidad de carga superficial= 20.12442 uC/cm2
Ok
  
```

Fig. 2.16 Superficie específica y densidad de carga del látex M-8

En la Tabla 2.7 están resumidos los datos de tamaño, índice de polidispersidad, superficie específica y densidad superficial de carga para los cinco látexes que se han empleado en este trabajo.

Tabla 2.7 Látexes empleados en este trabajo

| Látex | Tamaño (nm) | IPD | S_{osp} ($m^2 g^{-1}$) | σ_0 ($\mu C cm^{-2}$) |
|-------|-------------|--------|----------------------------|--------------------------------|
| M-8 | 231 ± 4 | 1.0010 | 24.8 ± 0.4 | 20.1 ± 0.5 |
| M-9 | 361 ± 5 | 1.0006 | 15.77 ± 0.22 | 16.4 ± 0.8 |
| CC-2 | 210 ± 5 | 1.0015 | 27.1 ± 0.7 | 31.0 ± 0.9 |
| CC-4 | 211 ± 5 | 1.0016 | 27.0 ± 0.7 | 163.2 ± 0.9 |
| R-P | 297 ± 3 | --- | 19.17 ± 0.19 | 6.9 ± 0.2 |

- (27) Galisteo González, F., de las Nieves, F.J., Cabrerizo, M. e Hidalgo Alvarez, R., *Progr. Colloid Polym. Sci.* **82**, 313 (1990).
- (28) Bastos González, Delfina, *Tesina de Licenciatura*, Granada (1992).
- (29) Sakota, K. y Okaya, T., *J. Applied Polym. Sci.* **21**, 1009, (1977).
- (30) Labib, M.E. y Robertson, A.A., *J. Colloid Interface Sci.* **77**, 151 (1980).
- (31) Everett, D.H., Gultepe, M.E. y Wilkinson, M.C., *J. Colloid Interface Sci.* **71**, 336 (1979).

CAPITULO 3

CARACTERIZACION ELECTROKINETICA DE LOS MODELOS COLOIDALES

- 3.1 INTRODUCCION**
- 3.2 DISPOSITIVO DE ELECTROFORESIS**
- 3.3 CARACTERIZACION ELECTROKINETICA DE LATEXES CATIONICOS**
- 3.4 CARACTERIZACION ELECTROKINETICA DE LATEXES ANIONICOS**
- 3.5 CONVERSION DE DATOS DE MOVILIDAD EN POTENCIAL ZETA**
- 3.6 REFERENCIAS**



CAPITULO 3

CARACTERIZACION ELECTROKINETICA DE LOS MODELOS COLOIDALES

3.1 INTRODUCCION

Como justificaremos posteriormente en el Apéndice dedicado a la teoría de los procesos electrocinéticos, la técnica que nosotros vamos a emplear en la caracterización de la carga eléctrica en el plano de deslizamiento de las partículas cuando se encuentran en movimiento es la electroforesis. Esta técnica se basa en la aplicación de un campo eléctrico a una dispersión muy diluida del látex, donde las partículas con carga eléctrica en su superficie se desplazarán hacia el electrodo de signo contrario a una velocidad que será mayor cuanto más grande sea dicha carga. A esta velocidad de desplazamiento dividida por el campo eléctrico aplicado es a lo que se denomina movilidad electroforética, y es el parámetro electrocinético que nosotros vamos a medir en diferentes condiciones para caracterizar el comportamiento de este tipo de partículas en suspensión. Mediante la aplicación de teorías que relacionan estos parámetros experimentales con el estado eléctrico de la interfase polímero-disolución acuosa intentaremos describir como es la doble capa eléctrica que rodea a estas partículas y como se verá afectada por los posibles cambios que puedan producirse en la disolución que los contiene.

El parámetro más importante a determinar en la caracterización de la doble capa eléctrica que rodea una partícula es el potencial zeta (ζ), que se puede definir como la diferencia de potencial eléctrico que existe entre el denominado plano de deslizamiento (ver Apéndice III). Este potencial es el responsable de los procesos electrocinéticos que se dan en las partículas coloidales y no coincide con el potencial superficial que podemos estimar conductimétricamente por la alteración que supone que el plano de deslizamiento no coincida con la superficie de la partícula.

La microelectroforesis es la técnica electrocinética más empleada en la caracterización eléctrica de interfases sólido-líquido, y esto se debe principalmente a la facilidad que supone la existencia de dispositivos comerciales adecuados. Para medir las movilidades electroforéticas hemos utilizado un sofisticado aparato basado en la tecnología láser que describiremos a continuación en el apartado de instrumentación.

El principal problema que presenta la técnica de la electroforesis es que el material objeto de estudio tiene que presentarse en forma de dispersión coloidal suficientemente diluida y

estable. En nuestro caso, donde el sistema coloidal a estudiar es látex de PS tanto aniónico como catiónico, se pueden conseguir perfectamente las condiciones de dilución y estabilidad de la muestra necesarias para realizar las medidas de movilidad electroforética. Se ha elegido por tanto este fenómeno electrocinético como el más adecuado para la caracterización interfacial de estas partículas, ya que presenta numerosas ventajas con respecto a las otras técnicas alternativas. Estas son, principalmente, la rapidez de ejecución y la práctica eliminación de efectos perturbadores (como conductancia superficial, solapamiento de dobles capas eléctricas, etc.) que, en cambio, si aparecen de forma habitual en los otros fenómenos electrocinéticos.

3.2 DISPOSITIVO DE ELECTROFORESIS

Como ya hemos señalado, la caracterización electrocinética de las partículas de látex, así como de los complejos látex-proteína, se ha llevado a cabo mediante medidas de movilidad electroforética en un dispositivo Zeta-Sizer IIc, de Malvern Instruments (Inglaterra), que vamos a describir a continuación (Fig. 3.1).

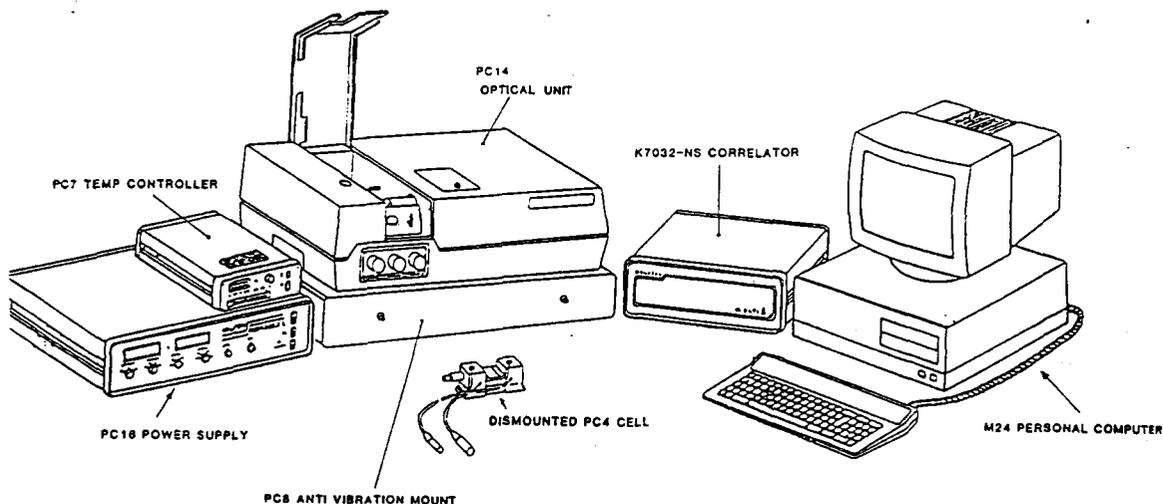


Fig. 3.1 Unidades que componen el Zeta-sizer IIc.

El instrumento completo comprende varias subunidades o módulos, siendo la principal la unidad óptica PC 14. Como se puede ver en la Figura 3.2, esta subunidad contiene una fuente de luz láser, célula de observación cuyo soporte es un sistema de termostatización Joule-Peltier,

mecanismo para el movimiento de la célula en las tres direcciones del espacio con el objeto de poder alinear ésta con el haz láser, y fotomultiplicador contador de fotones precedido de un sistema óptico de recepción de la luz dispersada por la muestra. Todo este complejo sistema se apoya en un soporte anti-vibración, el cual está formado por una estructura muy pesada que descansa sobre un sistema neumático de amortiguamiento.

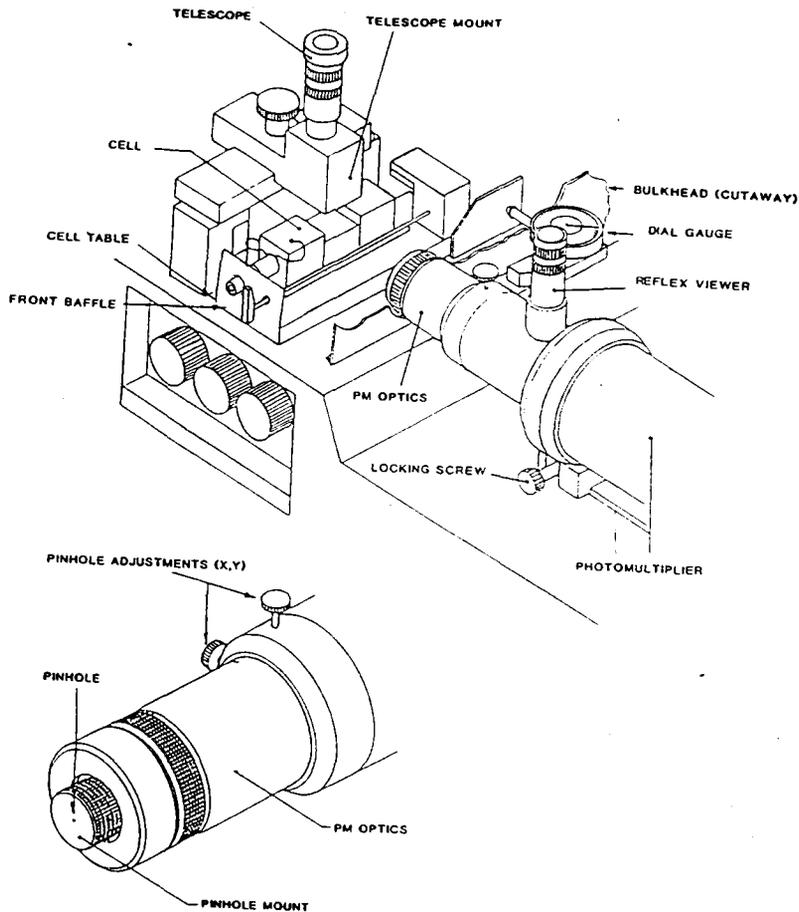


Fig. 3.2 *Unidad espectrofotométrica PC 14.*

Las señales emitidas por esta unidad óptica son recogidas y procesadas por el correlador digital, que a través de una interfase transmite la información digitalizada. Esta se recibe en un ordenador personal, que procesa estas señales y las presenta en forma de resultados (movilidad electroforética, potencial zeta estimado mediante la ecuación clásica de Smoluchowski, tamaño de partícula o coeficiente de difusión). Para la recogida de los datos obtenidos se adapta al

sistema una impresora electrónica, aunque también pueden grabarse estos resultados en un diskette a través del propio ordenador.

La fuente de alimentación para la unidad espectrofotométrica está en el generador eléctrico PC 16, que proporciona energía para la lámpara láser, el fotomultiplicador y la célula de electroforesis. Una fuente de energía adicional, montada en una subunidad aparte (PC 7), es la responsable de la regulación de la temperatura ejercida por un sistema Joule-Peltier en la base de la célula de observación, con el objeto de termostatar la muestra.

Para la medida de la movilidad electroforética bajo diferentes condiciones de conductividad en el medio existen varios tipos de células adaptables al sistema:

- PC 4: Es la célula de electroforesis más general, con un tubo para la recepción de la muestra de calibre ancho.

- PC 3: Célula de electroforesis especial para altas conductividades (fuerzas iónicas superiores a 0.1 M), en la que la muestra es analizada a través de un capilar de calibre muy estrecho.

- PC 26: Célula especial de baja conductividad, empleada para realizar las medidas en las que se utiliza como medio de dispersión disolventes no acuosos de baja constante dieléctrica.

- PC 11: Célula especial utilizada exclusivamente para la determinación de tamaños de partícula, con un recipiente de caras planas para el análisis de la muestra.

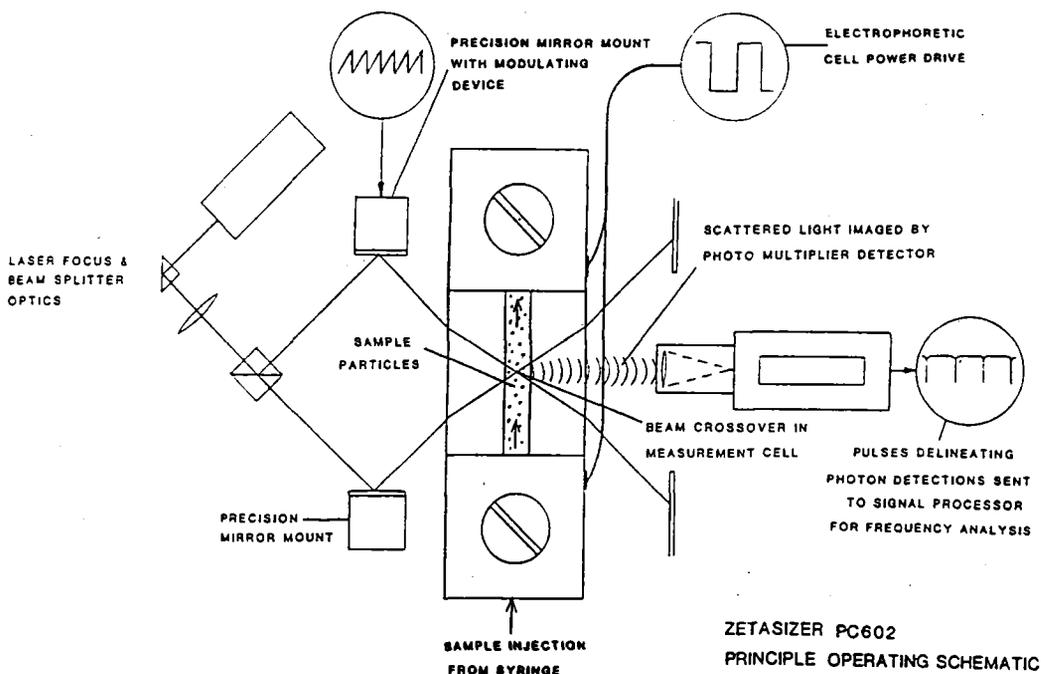


Fig. 3.3 Sistema óptico de iluminación de la muestra.

3.2.1 Modo de operación

En la Figura 3.3 se puede ver un diagrama esquemático de la configuración del sistema de iluminación láser que atraviesa la muestra. La luz procedente de una lámpara de He-Ne (con una potencia de 5 mW y una longitud de onda de 633 nm), se divide en dos haces mediante un separador de luz, y a través de una reflexión en espejo se hacen converger de nuevo ambos rayos en un punto que se sitúa en el interior de la cámara de electroforesis. Este punto de cruce, a nivel microscópico, representa una zona de 50 micras aproximadamente de tamaño nominal, definiendo así un volumen de prueba a partir del cual se extraerán los datos para el análisis (Fig. 3.4).

La luz que se dispersa en este volumen de prueba, como consecuencia del paso de partículas a través de él, es recogida por el sistema óptico de recepción de luz, y proyectada en el fotocátodo del fotomultiplicador. La luz detectada es procesada entonces por el correlador digital como pulsos correspondientes a fotones individuales, con una periodicidad aproximada de 50 ns.

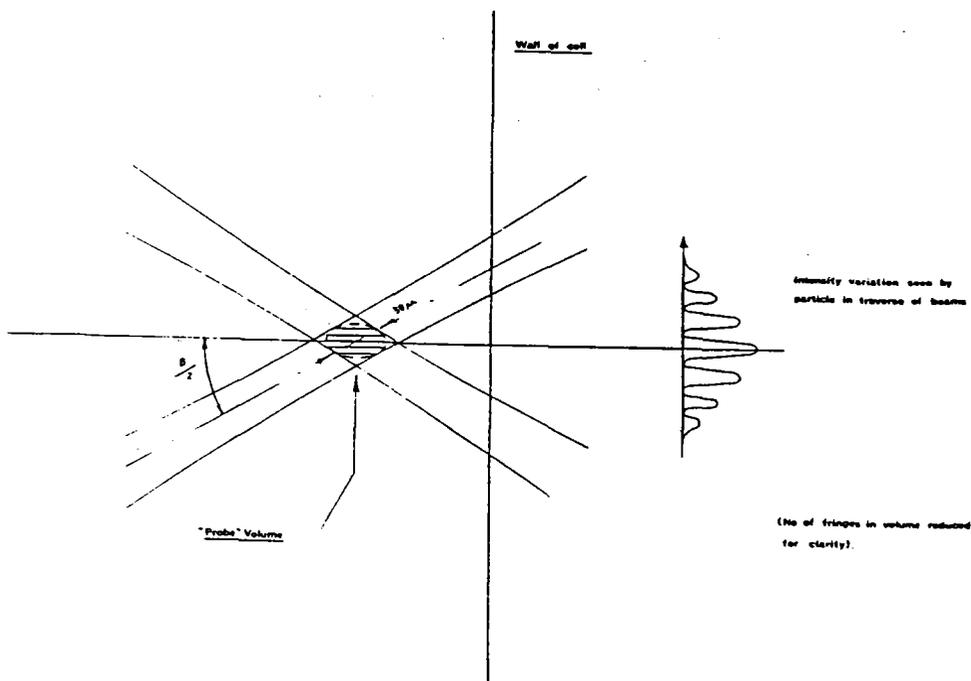


Fig. 3.4 Formación de las bandas de interferencia.

Este correlador puede calcular directamente la función de auto-correlación a partir de los datos de luz dispersada, y esta función es analizada en el ordenador para interpretar la distribución de velocidades de las partículas.

En la zona definida anteriormente como volumen de prueba, en la que ambos rayos láser se cruzan perpendicularmente, se forman una serie de bandas de interferencia. Como consecuencia de la intersección de dos haces luminosos de la misma frecuencia existen zonas en las que la intensidad de ambos se suma (cuando los dos haces interfieren con la misma fase), y zonas en la que la intensidad de ambas se anula (al interferir con fases opuestas). Estas zonas o bandas alternativas de mayor y menor intensidad se sitúan paralelamente al eje de bisección determinado por la dirección de propagación de los dos haces y forman, efectivamente, un espectro de bandas de interferencias de fase constante. La célula de electroforesis está situada de modo que al aplicar un campo eléctrico las partículas se desplazarán hacia uno u otro electrodo en una dirección perpendicular al espectro de bandas de interferencia. Cuando las partículas pasan a través de este volumen de prueba, experimentan una variación periódica en la iluminación con una frecuencia que depende del espaciado propio del espectro de bandas de interferencia, así como de la velocidad con la que éstas se están moviendo.

El espaciado entre las bandas de interferencia depende única y exclusivamente de la longitud de onda de la luz utilizada y del ángulo que definan ambos rayos al cruzarse. En nuestro caso, su valor es constante e igual a 448 nm:

$$\text{Espaciado} = \frac{\lambda}{2 \sin \frac{\beta}{2}} = \frac{633 \text{ nm}}{2 \sin 45^\circ} = 448 \text{ nm} \quad [3.1]$$

De esta forma, con sólo analizar el espectro de frecuencias que se encuentra en la función de autocorrelación de la luz dispersada, se puede deducir el espectro de velocidades de las partículas (ver Apéndice IV):

$$\text{Frecuencia} = \frac{\text{Velocidad}}{\text{Espaciado}} \rightarrow \text{Velocidad} = \text{Frec.} \times \text{Espac.} \quad [3.2]$$

Puesto que el campo eléctrico aplicado entre ambos electrodos se conoce, tanto la movilidad electroforética como el potencial zeta se pueden determinar fácilmente (en el caso del software de este dispositivo, a través de la ecuación clásica de Smoluchowski).

Con objeto de determinar tanto la dirección como la magnitud del movimiento de las partículas (especialmente cuando la movilidad electroforética está próxima a cero), a uno de los haces se le aplica una modulación. Esta consiste en un desplazamiento del rayo luminoso, lo que provoca que la Figura de bandas de interferencia se mueva en dirección paralela a la del campo eléctrico.

De esta forma, una partícula que se encuentre en reposo dará lugar a una función de correlación cuyo término de frecuencia será igual al de la frecuencia de modulación, mientras que una partícula que se desplace en el mismo sentido que el espectro de bandas de interferencia producirá un término de frecuencia en la función de autocorrelación menor que el propio de la modulación. Por el contrario, una partícula moviéndose en sentido contrario producirá un término de frecuencia mayor que el correspondiente a la modulación. Mediante esta modulación, el espectro de velocidades observado en una muestra puede ser interpretado sin ambigüedades.

En el Zeta-sizer IIc, el campo eléctrico aplicado en los electrodos se invierte periódicamente con una frecuencia aproximada de 1 Hz, evitando de esta manera los posibles efectos de polarización de los electrodos que pudieran producirse. Puesto que al cambiar el sentido de aplicación del campo eléctrico cambia también el sentido del movimiento de las partículas, la fase del modulador es invertida simultáneamente, de modo que la función de correlación que se obtiene pueda ser integrada tanto tiempo como sea necesario hasta producir un espectro de frecuencias estable.

3.2.2 Presentación de resultados

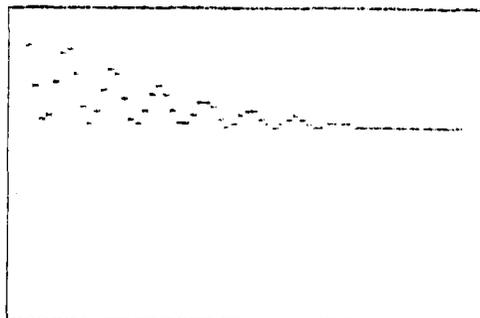
La función de correlación que se observa durante la recogida de datos por parte del sistema óptico tiene la forma de una función coseno amortiguada (Fig. 3.5). La periodicidad de esta función refleja la distribución de velocidades, apareciendo un término de amortiguamiento como consecuencia de los diversos factores que influyen en los valores de velocidad, como pueden ser la desigual distribución de cargas, el diferente tamaño de las partículas o el movimiento browniano (agitación térmica) de estas partículas en el medio. Esto produce, consecuentemente, un difuminado de valores en el espectro de movilidades

electroforéticas. El término de amortiguamiento tiene, en general, la forma de una función exponencial, aunque ésta no suele ser simple ni fácil de interpretar.

ACCUMULATING DATA on sample :demonstration data

Run : counts/1000 : % merit : % in-range

| | | | |
|---|--------|-------|------|
| 1 | 5794.8 | 103.7 | 99.9 |
|---|--------|-------|------|



CORRELATION FUNCTION

Measure 1 of 1 requested

Fig. 3.5 *Función de autocorrelación.*

Para obtener el espectro de velocidades, el sistema de procesamiento del Zeta-Sizer IIc empieza por analizar la función de correlación mediante un procedimiento de ajuste de polinomios, normaliza la nueva función obtenida (Fig. 3.6), y realiza entonces una transformada de Fourier inversa a dicha función. De esta forma se obtiene un espectro de frecuencias (Fig. 3.7), que mediante la aplicación de los parámetros ópticos y eléctricos correspondientes puede ser convertido en valores de movilidad electroforética o potencial zeta, siendo así presentado en la pantalla y posteriormente procesado para extraer el valor medio y la desviación standard de la magnitud elegida en el monitor, como se muestra en la Figura 3.8.

3.2.3 Efecto electro-osmótico

El principal fenómeno perturbador a tener en cuenta en las medidas de movilidad electroforética es la electro-osmosis. Esta se produce como consecuencia del movimiento de los iones presentes en la disolución al aplicar un campo eléctrico. De esta forma se origina un flujo

de electrolito en las proximidades de la pared de la célula. Al estar esta cerrada, entre los extremos se produce una diferencia de presión que provoca un contra-flujo de electrolito a través del centro de la célula, contrarrestándose así el flujo anterior. Como resultado de estos dos movimientos en sentido opuesto, en el interior de la célula se establece un flujo total electroosmótico cuyo perfil puede verse en la Figura 3.9.

MALVERN ZETASIZER II c Date is 23-02-1987 17:25:32

Auto-correlation Fundamental Sample Time (micro Sec) = 500.00

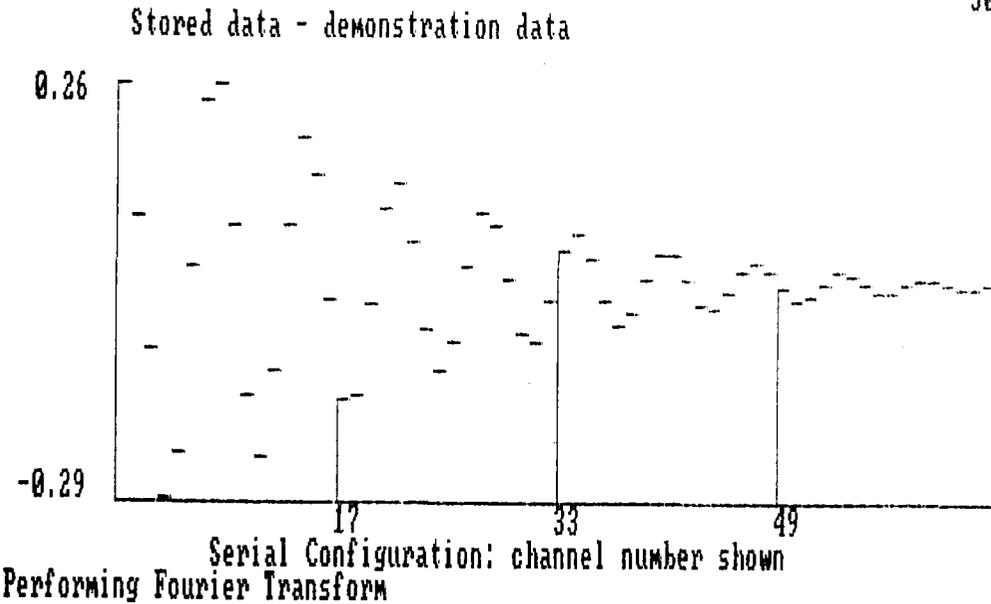


Fig. 3.6 Función normalizada.

El lugar idóneo para medir es, evidentemente, el anillo circular en el que ambos flujos se cancelan. A esta zona se la denomina nivel estacionario, y se puede calcular por simples consideraciones geométricas. La base de este cálculo reside en que la superficie circular correspondiente al flujo en un sentido tiene que ser igual a la superficie anular del flujo en sentido opuesto, o sea:

$$\pi a^2 = \pi R^2 - \pi a^2 \Rightarrow \pi R^2 = 2 \pi a^2 \Rightarrow a = \sqrt{\frac{R^2}{2}} = \frac{R}{\sqrt{2}} = \frac{R}{1.414} \quad [3.3]$$

sample : demonstration data

live data from correlator Cell type 1
 Refractive index 1.33 Viscosity 1.001 Dielectric const. 80.0 Temperature

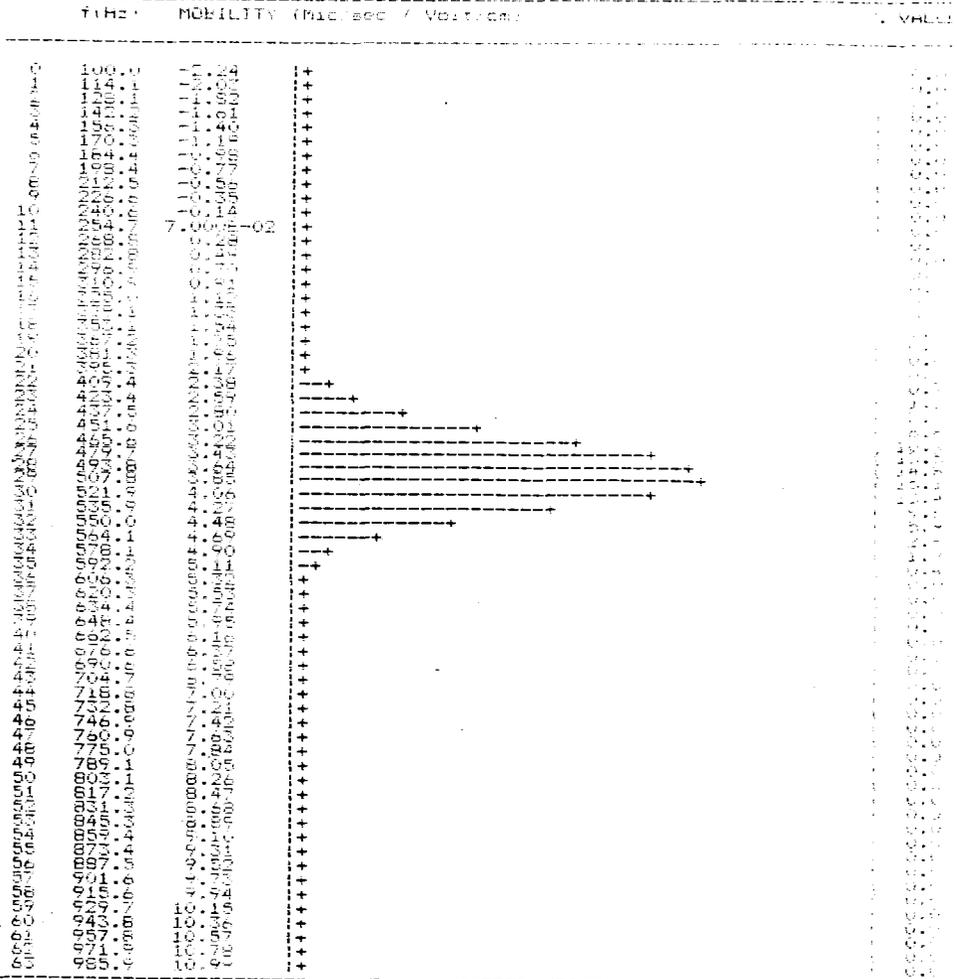


Fig. 3.7 Espectro de frecuencia-movilidad.

Si partimos de la pared de la célula, el nivel estacionario se encontrará a una distancia:

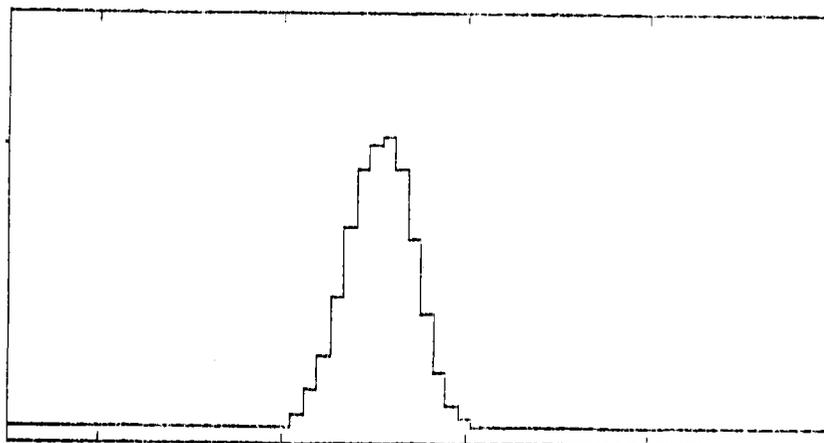
$$d = R - a = R - \frac{R}{1.414} = R \left(1 - \frac{1}{1.414} \right) = 0.293 R \quad [3.4]$$

Es en este nivel, lógicamente, donde se situará el punto de cruce de ambos rayos láser para la determinación de las correspondientes movilidades electroforéticas.

sample : demonstration data

Doppler Frequency Peak mean value 498.1 Hz.
200 400 600 800

Max 15.1 %



-0.75 2.24 5.23 8.21

Mean value 3.71 %width 13.2

Electrophoretic Mobility Distribution (mic cm/sec/Volt)

Select function F1 - F10 or MENU with SPACE

Fig. 3.8 Presentación del resultado en la pantalla.

El Zeta-sizer IIc dispone de la posibilidad de calcular directamente este nivel estacionario, sin más que introducir las lecturas correspondientes a los extremos laterales de la célula, obtenidas mediante un comparador de distancias incorporado al dispositivo. En el plano de medida, el nivel estacionario podrá encontrarse en dos posiciones diferentes, según nos situemos cerca de una u otra pared de la célula. Conocida dicha posición, la célula se desplazará hasta que el punto de cruce de los haces de luz se sitúe en el mencionado nivel.

En el caso de una célula electroforética del tipo PC 3, de pequeño diámetro capilar, las paredes están recubiertas con un polímero neutro e inerte, de forma que el perfil del flujo electro-osmótico es prácticamente imperceptible.

En este tipo de célula las medidas de movilidad electroforética se pueden realizar en el centro de la misma, dada la facilidad de alineación, aunque el recubrimiento de las paredes restringe las posibilidades de aplicación de la citada célula.

La célula de baja conductividad, PC 26, adopta una configuración de plato paralelo en la cual las paredes de la célula están alejadas del volumen de medida y poco afectadas por el campo eléctrico, por lo que de nuevo la electro-osmosis resulta inapreciable.

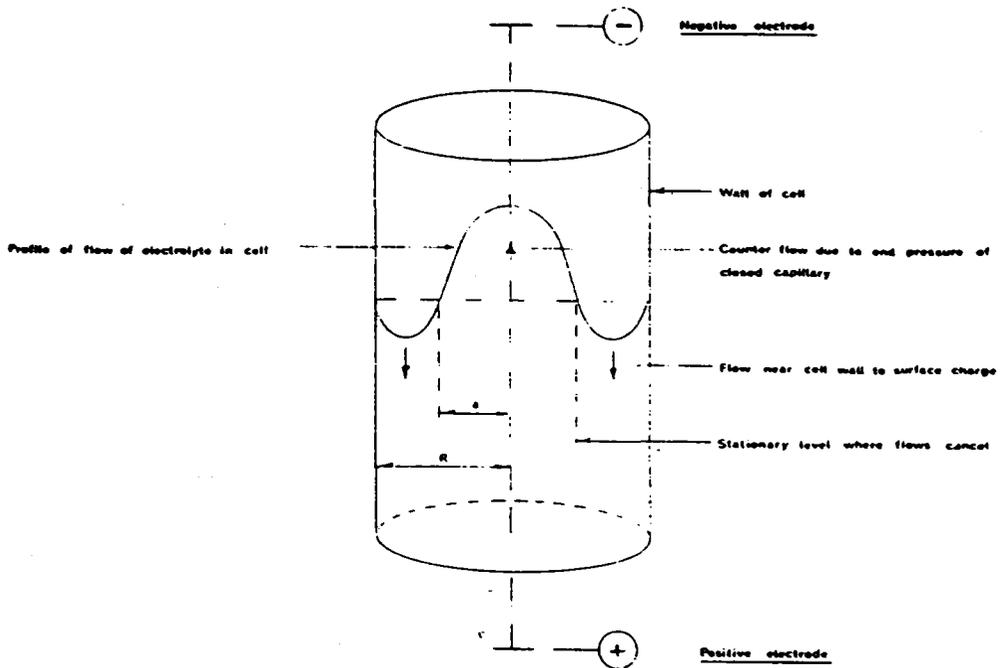


Fig. 3.9 Perfil del flujo electroosmótico.

3.3 CARACTERIZACION ELECTROKINETICA DE LATEXES CATIONICOS

Partiendo de los datos que ya habíamos obtenido en trabajos anteriores sobre las propiedades electrocinéticas de los látexes catiónicos (1,2) donde observamos que el grado de dispersión coloidal, el pH del medio y el tipo de recipiente usado para contener la muestra pueden influir de forma notoria en la contaminación de las partículas por parte de aniones como el silicato, el primer paso en la caracterización de estos látexes ha sido la determinación de las condiciones idóneas en las que realizar las medidas de movilidad electroforética sin que se alteren las características propias de la superficie de estas partículas.

En primer lugar, los recipientes utilizados para todos los experimentos donde se ensayaba con látexes catiónicos eran de polipropileno o polietileno, de modo que se evitara el contacto de la dispersión con el cristal de un recipiente normal, y puesto que para realizar la medida de movilidad electroforética era imprescindible el contacto de la dispersión con el tubo de cristal que debe contener la muestra en el interior del dispositivo de electroforesis, el tiempo de medida se redujo al mínimo (30 s). Evidentemente este descenso en la duración de la experiencia implica un descenso también en el número de datos recogidos por el instrumento, y por tanto en la precisión de la medida. A cambio de esto, sin embargo, realizamos tres medidas de cada muestra inyectando cada vez suspensión nueva en el dispositivo de electroforesis, y el valor final de movilidad electroforética se obtenía promediando estas tres medidas. La jeringas utilizadas para la inyección de la muestra eran también de polipropileno, y sólo se utilizaban con este fin para evitar contaminaciones de cualquier tipo.

Además del tipo de recipiente, también sabemos que tanto el pH del medio como el grado de dispersión de la muestra pueden afectar sensiblemente a las propiedades electrosuperficiales de estas partículas. La influencia que el pH tiene sobre la movilidad electroforética de estos látexes como consecuencia de la variación que produce en el grado de protonación de los grupos eléctricos cargados de su superficie es un tema de fundamental importancia que trataremos con posterioridad en este capítulo, pero aquí vamos a ver ahora otro efecto que se produce de modo general en todos los sistemas coloidales cuando se encuentran en un medio acuoso diluido: la adsorción preferencial de iones OH^- sobre la superficie de las partículas. Para el caso de los látexes catiónicos este efecto tiene una importancia fundamental, puesto que estos iones OH^- tienden a neutralizar la carga, y enmascaran por tanto las verdaderas propiedades electrocinéticas de la muestra. Puesto que este efecto depende evidentemente del pH del medio, todas las

experiencias en las que este parámetro no era la variable de estudio se han realizado a un pH ligeramente ácido (≈ 6), que se obtenía directamente de las disoluciones salinas de KBr usadas de modo general para dispersar la muestra, y puesto que este efecto negativo también depende del grado de dispersión coloidal de la muestra, el primer experimento que hemos realizado con estos látexes es determinar cual es la cantidad idónea de látex concentrado que hemos de añadir en una cantidad constante de medio dispersivo para obtener una suspensión que se muestre electrocinéticamente estable con respecto al tiempo y podamos establecer de esta forma las condiciones en las que realizaremos todas las experiencias posteriores.

En la Figura 3.10 se puede ver el resultado de este experimento, donde se midió la movilidad electroforética de una serie de muestras con diferentes diluciones del látex M-8 en función del tiempo. El volumen final de todas las muestras fue de 40 ml, y debajo de la gráfica aparecen los μl de látex concentrado (2.6%) que se añadieron en cada caso a una disolución de KBr 10^{-3} M (a partir de ahora 1 mM) y pH 6. Como puede verse por los resultados obtenidos, sólo las suspensiones con 30 y 50 μl de látex perdían paulatinamente su valor de movilidad electroforética con el tiempo, llegando al final incluso a hacerse. Esto hace pensar que efectivamente se está produciendo una adsorción de grupos OH^- en la superficie de estas partículas, ya que el otro ion negativo presente en el medio, el Br^- , veremos más tarde como no se adsorbe sobre estos látexes incluso en concentraciones muy superiores a ésta.

Como resultado de los datos obtenidos en esta experiencia, decidimos que la cantidad idónea de látex que debíamos añadir en una solución estándar de 40 ml era de 100 μl para el caso del látex M-8, y un experimento similar nos indicó que para el látex M-9 ésta cantidad debía ser de 50 μl . En ambos casos, la concentración final de las muestras estaba entre el 5.5 y el 6×10^{-3} % en peso de poliestireno sólido con respecto a la disolución acuosa, y como se puede ver en la Figura 3.10 mantenían un valor constante de movilidad electroforética incluso 6 horas después de ser preparadas. Con respecto al tiempo de espera entre que se preparan las muestras y se determina su movilidad electroforética decidimos que 15 min eran suficientes para alcanzar los equilibrios iónicos necesarios si estos estaban controlados por la difusión.

Para determinar con más exactitud la influencia que pueda tener sobre la movilidad electroforética de estas partículas el hecho de que entren en contacto con una superficie de cristal, sobre todo en el caso de que el pH del medio sea alcalino, hemos medido este parámetro electrocinético para una serie de suspensiones preparadas de la forma anteriormente expuesta y a las que se ha variado el pH de dos forma diferentes.

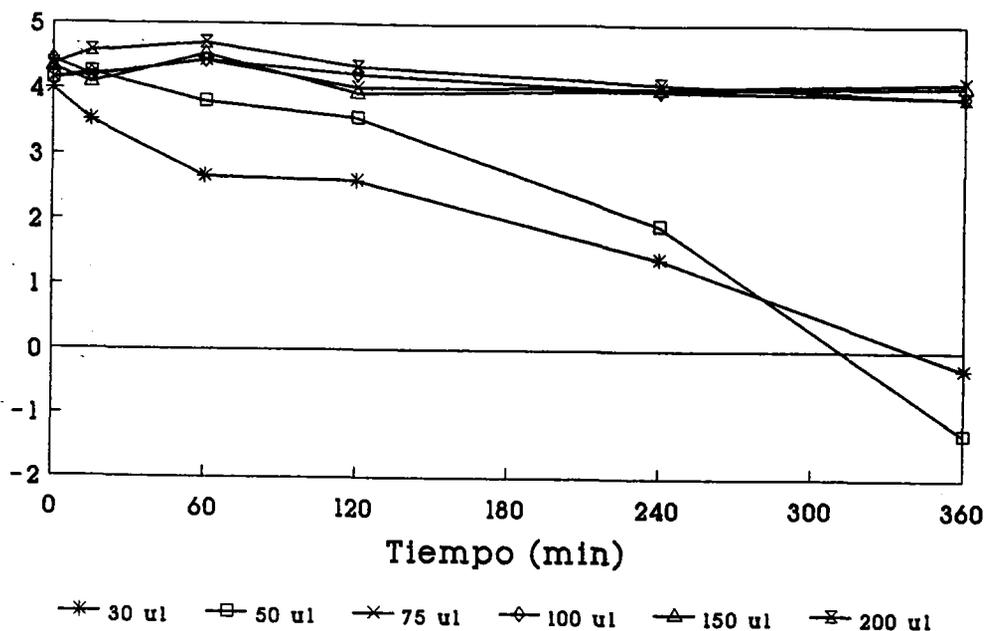


Fig. 3.10 Efecto de la concentración de partículas en la movilidad electroforética (látex M-8).

- A una serie se le han añadido primero los 100 μ l de látex M-8 a 40 ml de disolución 1 mM KBr, y entonces se ha introducido en su interior la membrana de vidrio del pH neutro para variar su pH de forma controlada mediante la adición de NaOH o HCl. En este caso, por tanto, existe contacto entre el látex y el vidrio del pHmetro durante el tiempo que se tarda en alcanzar un valor de pH determinado, aunque este tiempo fue el mínimo posible ya que no se buscaban valores exactos, sino aproximados de cada unidad de pH.

- A la segunda serie se la preparó de modo diferente, ajustando primero el pH mediante la adición de NaOH o HCl a la disolución de KBr 1 mM, y añadiendo posteriormente los 100 μ l de látex al medio ya preparado. Tras esperar los 15 minutos establecidos para todas las muestras, se inyectaba una parte en el dispositivo de electroforesis para medir su movilidad electroforética, mientras que el resto se ponía de nuevo en el pHmetro para determinar el verdadero pH al que se encontraba la suspensión tras haber añadido el látex y haber esperado este tiempo. Puesto que el látex está conservado en un medio ligeramente ácido (pH 6), los grupos amidino de la superficie están ya cargados, y el pH de las dispersiones no cambiaba antes y después de añadir el látex a las disoluciones alcalinas el pH disminuía ligeramente, ya que algunos protones del látex pasarían a neutralizar algo del exceso de OH^- de estas disoluciones.

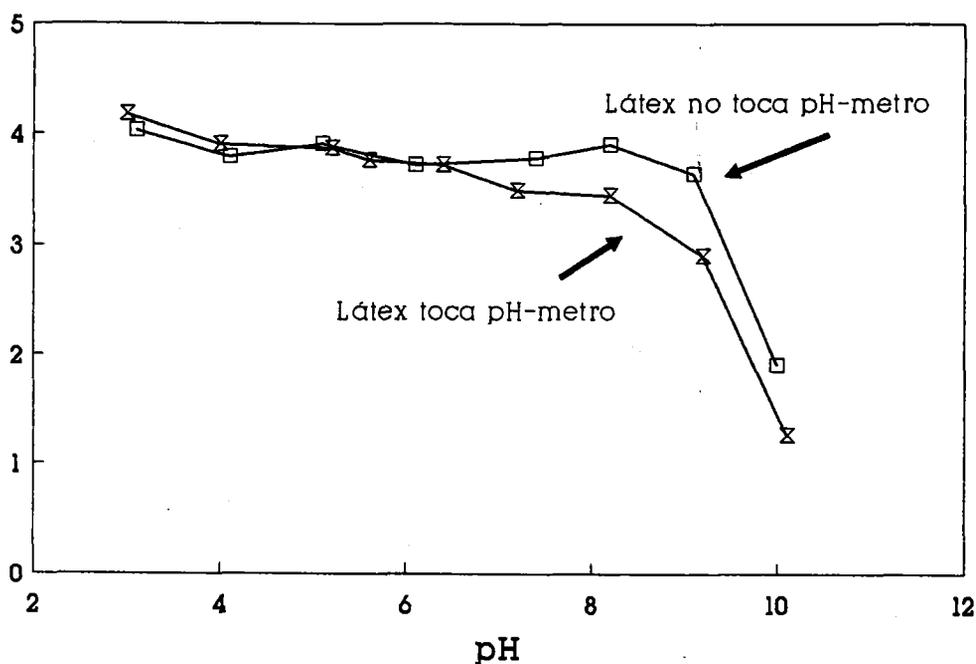


Fig. 3.11 *Movilidad electroforética del látex M-8 en función del pH.*

En la Figura 3.11 está reflejado el resultado de esta experiencia, en la que se ha representado la movilidad electroforética de estas dos series de muestras en función del pH. La primera serie corresponde con la curva que lleva el título de "látex toca pHmetro", ya que efectivamente en este caso las partículas han entrado en contacto con la membrana de vidrio del pHmetro, mientras que la segunda serie se corresponde con la curva bajo el título "látex no toca pHmetro", pues en este caso sólo ha habido contacto con el vidrio del dispositivo de electroforesis, pero no con el pHmetro.

Siguiendo la evolución de estas dos curvas se puede ver como sin lugar a dudas la presencia de vidrio contamina las suspensiones de látexes catiónicos en el caso de disoluciones neutras y alcalinas, ya que a partir de pH 7 las muestras que han entrado en contacto con la membrana del pHmetro empiezan a disminuir el valor de su movilidad electroforética con respecto a las que teniendo el mismo pH no lo han tocado. Este fenómeno está asociado con la liberación de iones silicato (SiO_3^{2-}) de la superficie del cristal, que efectivamente aumenta conforme lo hace el pH del medio. En otros trabajos nuestro anteriormente citados se aportan más pruebas sobre este fenómeno que acontece con los látexes catiónicos en medios básicos.

Como consecuencia de estos resultados, es evidente que debemos evitar el contacto de cualquier tipo de superficie de cristal con las suspensiones de látexes catiónicos, y en particular para el caso de que se necesite ajustar las disoluciones a un pH determinado se deben de hacer siguiendo las pautas correspondientes a la segunda serie de muestras de la experiencia anterior. Teniendo en cuenta, sin embargo, que posteriormente abordaremos como tema principal de este trabajo la adsorción de proteínas sobre la superficie de estas partículas, hay que plantearse ya el problema que representa el hecho de que en una suspensión que contiene proteína disuelta en el medio líquido no debe introducirse el pHmetro, ya que estas macromoléculas se adhieren a la membrana de vidrio impidiendo el intercambio iónico, y la limpieza es bastante complicada (se necesita un tratamiento prolongado con enzimas proteolíticas en medio ácido). Además de este problema de tipo práctico, existe también uno relacionado con la propia estabilidad de estas macromoléculas en disolución. Puesto que su medio nativo fisiológico es el suero sanguíneo (ya que tanto las inmunoglobulinas como la albúmina que vamos a estudiar son proteínas de las denominadas séricas o serológicas), y éste tiene una fuerza iónica de 154 mM, en el medio en el que nosotros vamos a estudiar su adsorción y sus propiedades una vez adsorbidas van a tener poca estabilidad estructural, pues los experimentos se realizan generalmente a fuerza iónica alrededor de 1 mM. Para solventar ambos problemas hemos introducido el uso de tampones capaces de mantener tanto un pH determinado como una fuerza iónica, de modo que una vez que uno de estos tampones se ajusta a un valor de pH, este no varía por la adición de látex ni de proteína, y por tanto no es necesario volver a introducir el pHmetro en la disolución. Con respecto al segundo problema de la estabilidad estructural de estas proteínas en disoluciones de baja fuerza iónica, la presencia de estos iones grandes en el medio favorece el mantenimiento de dicha estabilidad, principalmente por el hecho de que estos tampones están formados por ácidos y bases débiles en equilibrio con sus formas no ionizadas, lo que implica que para una fuerza iónica dada la concentración de especies moleculares es mucho mayor, y por tanto mayor también la estabilidad de las proteínas disueltas en ese medio.

El uso de estos tampones ya lo habíamos descrito en trabajos anteriores (3) para el caso de látexes aniónicos, usando el sistema ácido acético/acetato para pH 4 y 5, el sistema fosfato/fosfato monohidrógeno para pH 6 y 7, y el sistema borato monohidrógeno/borato dihidrógeno para pH 8, 9 y 10.

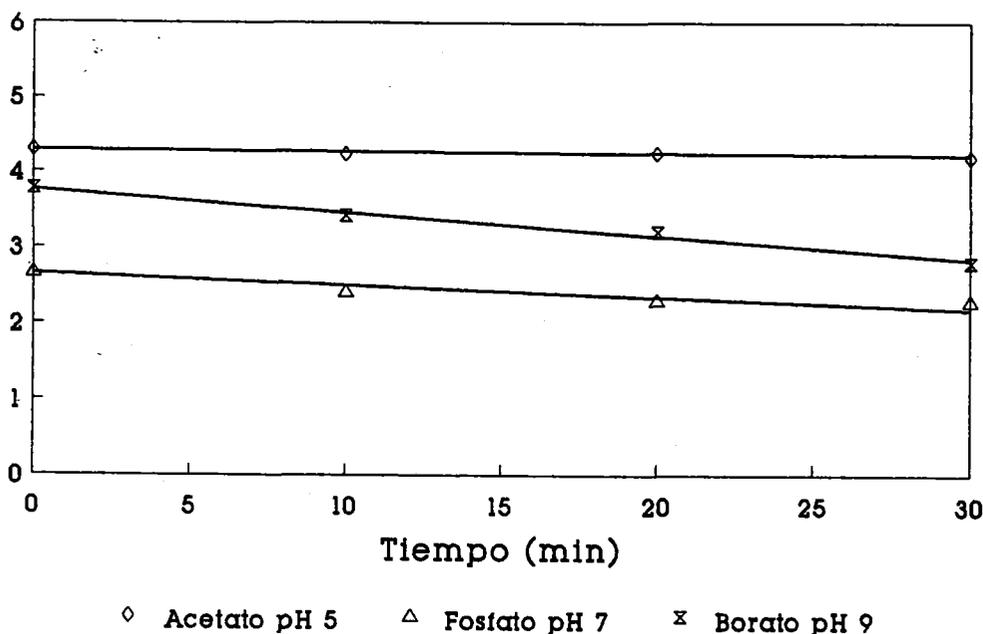


Fig. 3.12 *Movilidad electroforética del látex M-8 suspendido en tres tampones aniónicos diferentes.*

Posteriormente justificaremos de todos modos el uso de estos tampones en el caso de los látexes aniónicos, tanto de tipo sulfato como de tipo carboxilo. Estos tampones, sin embargo, al estar formados por aniones con una gran relación carga/masa, sobre todo en el caso del fosfato y del borato, que son aniones relativamente pequeños con cargas elementales de valor uno, dos o tres, según el estado de protonación, parecen indicar que se adsorberían sobre los grupos amidino positivos de los látexes catiónicos, neutralizando su carga superficial. Para comprobar este hecho se midió la movilidad electroforética de una serie de suspensiones de los látexes M-8 y M-9 en función del tiempo en una serie de tampones de fuerza iónica aproximadamente 1 mM: acetato de pH 5, fosfato de pH 7 y borato de pH 9. El resultado está representado gráficamente en las Figuras 3.12 y 3.13, y en ellas se puede ver como el anion acetato es un ion de los denominados "indiferentes", ya que no se adsorbe sobre la superficie de las partículas y por tanto no disminuye el valor de la movilidad electroforética con respecto al que tenía en las mismas condiciones de pH y fuerza iónica sin la presencia de este ion (ver Figura 3.11). Sin embargo se ve claramente para el caso de los otros dos aniones que estos no son indiferentes, es decir, que se adsorben específicamente sobre los grupos amidino positivos de la superficie del látex neutralizando su carga y enmascarando por tanto las propiedades electrocinéticas de estas

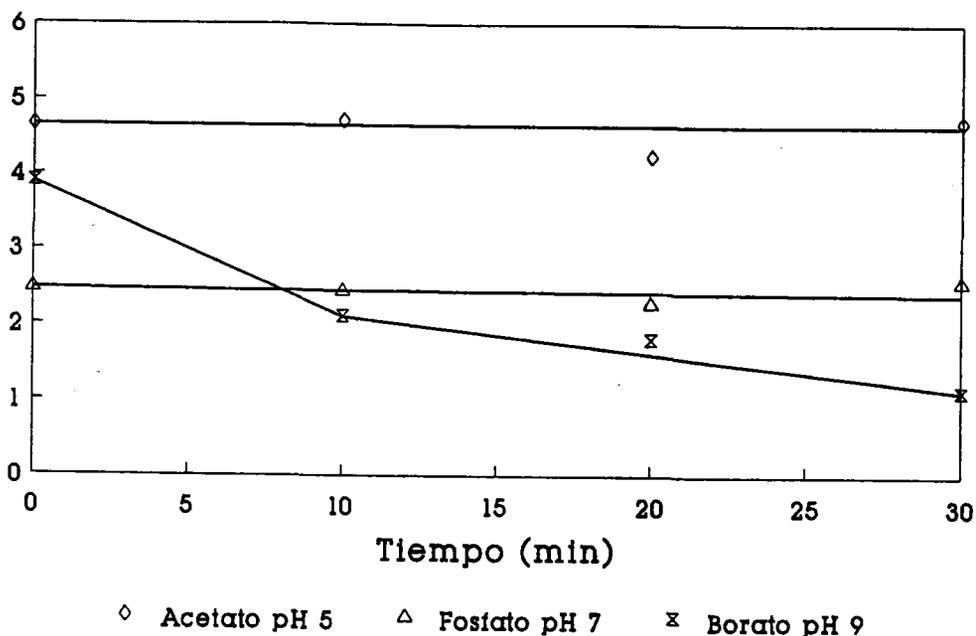


Fig. 3.13 *Movilidad electroforética del látex M-9 suspendido en tres tampones aniónicos diferentes.*

partículas. Para el anion borato esta unión es dependiente del tiempo, teniendo incluso una mayor incidencia en el caso del látex M-9, menos cargado. El anion fosfato, por el contrario, se adsorbe casi instantáneamente sobre la superficie de las partículas, ya que la movilidad electroforética de estas no varía con el tiempo de exposición del látex a dicho ión, y parece que se adsorbe con la misma afinidad, pues la movilidad en los dos casos es similar, cuando originalmente tanto la densidad superficial de carga como este parámetro de la movilidad electroforética eran diferentes para ambos látexes. Para estudiar mejor este fenómeno se midió de nuevo la movilidad de estas partículas, pero esta vez en función de la cantidad de ión fosfato presente en el medio de suspensión. Se puede ver en la Figura 3.14 el resultado de esta serie de medidas, donde podemos observar que incluso a una concentración (expresada en forma de fuerza iónica) de 0.1 mM la movilidad electroforética de estos látexes ha descendido en más de una unidad con respecto a los valores que presenta en ausencia de este anion. El hecho más sorprendente, sin embargo, es que hasta una fuerza iónica de 1 mM ambos látexes tienen un mismo valor de movilidad, pero que a partir de ese punto desciende más la movilidad del látex más cargado en una cantidad que se mantiene constante incluso cuando los valores de la movilidad electroforética se vuelven negativos para concentraciones altas del ion fosfato. Esto

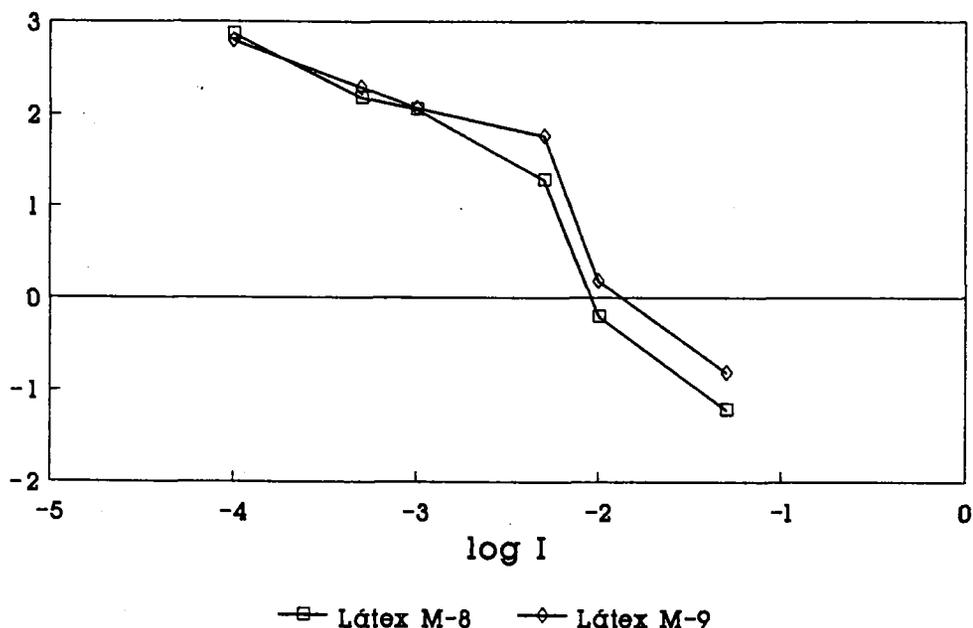


Fig. 3.14 *Movilidad electroforética de los látexes catiónicos en función de la fuerza iónica de ion fosfato*

parece indicar que la disminución en los valores de la movilidad electroforética que se producen inicialmente a bajas concentraciones de fosfato se deban más al desplazamiento hacia el exterior de la doble capa eléctrica producido por la adsorción de estos iones que a la propia neutralización de las cargas de la superficie, lo que además se ve reforzado por la menor pendiente de este descenso al principio de la gráfica. A partir de 1 mM de fuerza iónica, sin embargo, ya se detecta menos carga electrocinética en el látex más cargado y la pendiente de este descenso aumenta, lo que implica una mayor influencia de la propia carga negativa del ion fosfato en la movilidad electroforética del látex apantallado.

La conclusión general que podemos sacar de estos resultados es que los tampones formados por los iones fosfato y borato no son adecuados para su utilización con látexes catiónicos, ya que enmascaran la carga eléctrica positiva de la superficie de sus partículas. No podemos por tanto estudiar los procesos de adsorción de proteínas u otras macromoléculas sobre este tipo de látexes en presencia de estos iones, pues los resultados que obtuviéramos estarían falseados en la parte concerniente a la contribución electrostática, estérica o de cualquier otra clase de los grupos amidino que aportan la carga en la superficie de estas partículas.

El siguiente paso fue entonces la búsqueda de sistemas iónicos con los que poder tamponar la disolución a pHs superiores a 6 sin que estos interfirieran en las propiedades electrocinéticas de los látexes catiónicos. Para pH 4 y 5, el sistema ácido acético/acetato se había mostrado como útil tanto para estos látexes positivos como para los negativos. Los dos requisitos principales que debían cumplir los sistemas a probar eran: no interferir con las propiedades electrocinéticas de los látexes catiónicos, es decir, no interaccionar electrostáticamente con los grupos amidino cargados ni adsorberse específicamente sobre la superficie hidrofóbica, ya que esta unión también provocaría alteraciones de la doble capa eléctrica y del equilibrio de cargas en la zona. Para ello, el sistema en cuestión debe mantener una relación carga/masa pequeña si tiene que estar compuesto por aniones, pero puesto que también pueden ser cationes, es preferible que sea uno de estos para su uso con los látexes catiónicos; contribuir al mantenimiento de la estabilidad estructural de las proteínas en estudio cuando éstas se disuelvan en disoluciones tamponadas de baja fuerza iónica. Siguiendo este criterio, el primer sistema tampón a probar debía ser precisamente el que más se utiliza como estabilizador de estructuras proteicas en medios básicos, el tris(hidroximetil)-aminometano, vulgarmente conocido con el nombre más simple de tris. Este compuesto cumple con los requisitos antes expuestos, ya que además de ser un buen agente estabilizador como hemos comentado, su forma iónica en disolución es de tipo catiónico, pues el grupo que le confiere carga es una amina. Como el pK de este compuesto está en 8.1, quiere decir que su capacidad de tamponamiento nos será útil para pH 8 y 9. Para valores neutros de pH se puede utilizar un derivado de este compuesto, el bis(2-hidroxietil)imino-tris(hidroximetil)metano, conocido normalmente como bis-tris, y que al tener un pK más bajo de 6.5 a 25°C es útil para ser usado como sistema tampón a pH 6 y 7. Para pHs superiores a 9, el único compuesto de tipo catiónico que se puede utilizar es el 2-amino-2-metil-1-propanol, denominado AMP, y que con su pK de 9.7 se puede utilizar para preparar disoluciones tamponadas a pH 10.

Para comprobar la utilidad real de estos sistemas tamponadores, la primera experiencia a realizar es la medida de las propiedades electrocinéticas y de estabilidad coloidal de los látexes catiónicos en cada una de estas disoluciones con el mismo pH y fuerza iónica pero en ausencia de estas sustancias. En la Figura 3.15 puede verse el resultado de la primera de estas experiencias, en la que se ha representado la movilidad electroforética de una serie de suspensiones de los látexes M-8 y M-9 en cada uno de los sistemas tamponadores antes descritos, cada uno de ellos ajustado a una fuerza iónica de 1 mM:

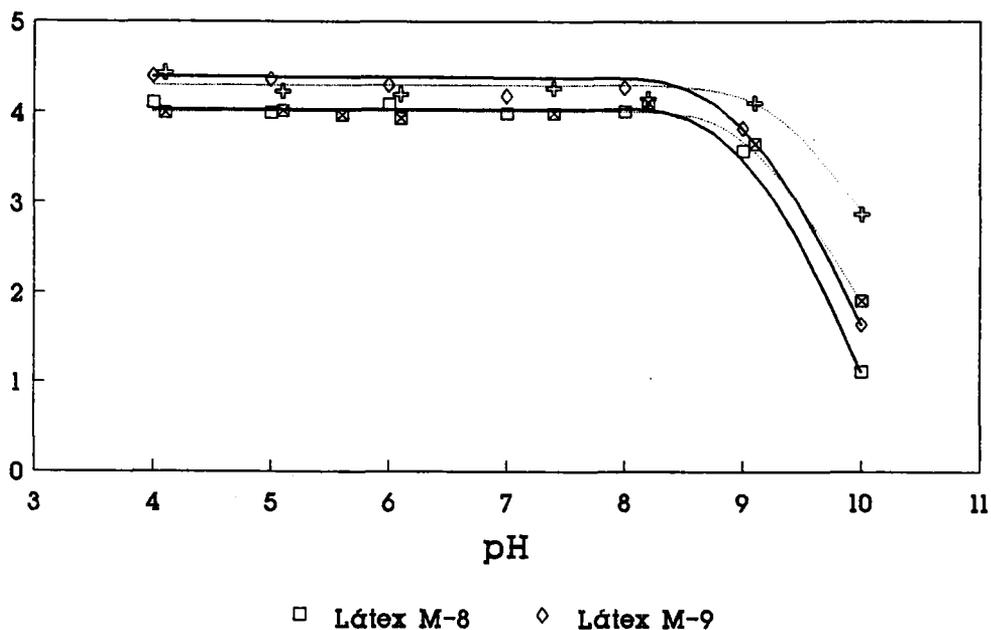


Fig. 3.15 *Movilidad de los látexes catiónicos en función del pH en suspensiones tamponadas (f. iónica 1 mM).*

- pH 4 y 5 : Acetato
- pH 6 y 7 : Bis-Tris
- pH 8 y 9 : Tris
- pH 10 : AMP.

En la misma gráfica y en línea discontinua pueden verse los datos similares para estas dos muestras obtenidas en las mismas condiciones de pH y de fuerza iónica pero sin la presencia de los agentes tamponadores. Puede verse como los resultados en ambos casos son prácticamente los mismos, excepto cuando el pH es ya muy alcalino (pH 10), donde la movilidad electroforética de las partículas en presencia del sistema tamponado disminuye ligeramente con respecto a sus similares que se encuentran en las mismas condiciones pero sin tampón. Este desplazamiento de la movilidad puede deberse a una adsorción de moléculas sin carga de AMP sobre la superficie de las partículas de látex en los que la carga eléctrica ha disminuido considerablemente debido a la desprotonación de sus grupos amidino, provocando un desplazamiento del plano de deslizamiento en la doble capa eléctrica. Esta adsorción sería de tipo hidrofóbico, y se provocaría

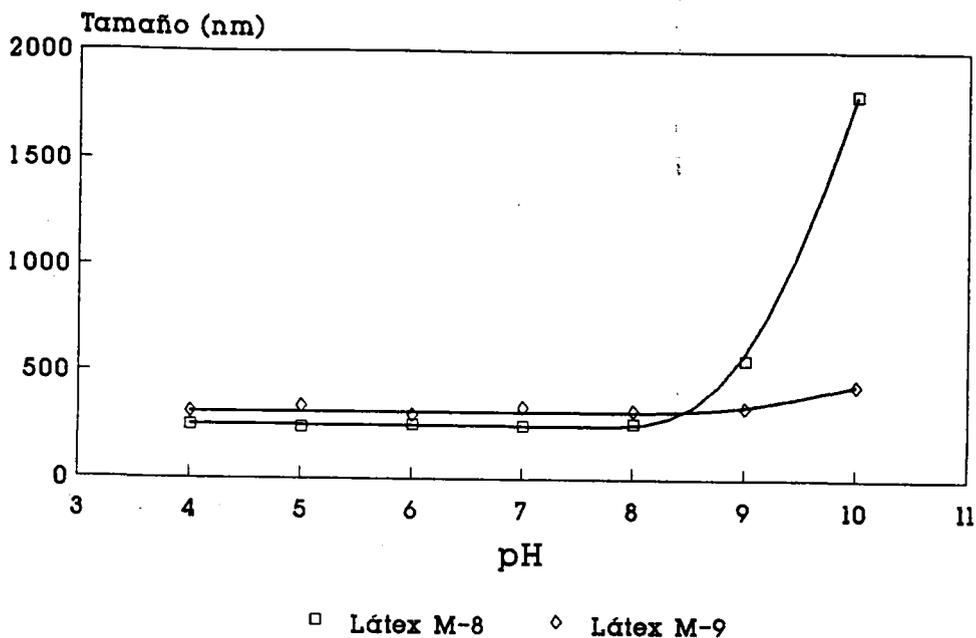


Fig. 3.16 *Tamaño de los látexes catiónicos en función del pH en suspensiones tamponadas (f. iónica 1 mM).*

al disminuir la repulsión electrostática entre el látex y las moléculas de AMP con el aumento del pH. En cualquier caso, este descenso de la movilidad no es muy acentuado, y también podría estar causado por el hecho de que el sistema presenta un cierto grado de coagulación (como se puede ver en la Figura 3.16).

Para comprobar igualmente la influencia que sobre la estabilidad coloidal de estas partículas pudiera tener la presencia en el medio de suspensión de los agentes tamponadores, hemos medido el tamaño de partícula de cada una de las muestras anteriores (también en el dispositivo de electroforesis) justo después de realizar las medidas de movilidad electroforética. Aunque este dato es sólo aproximativo a la hora de determinar el tamaño exacto de las partículas, es muy útil para detectar su coagulación, ya que si este proceso está ocurriendo el tamaño aparente de las partículas aumenta considerablemente. En la Figura 3.16 se pueden ver estos datos para los látexes M-8 y M-9, y como se comentó antes efectivamente se está produciendo la coagulación de las partículas a pH 10, más rápida en el caso del látex M-8, pero en los dos está ocurriendo este proceso. Es por tanto difícil el atribuir el anterior descenso de la movilidad electroforética de las partículas de látex catiónico a pH 10 cuando se encuentran en presencia del sistema

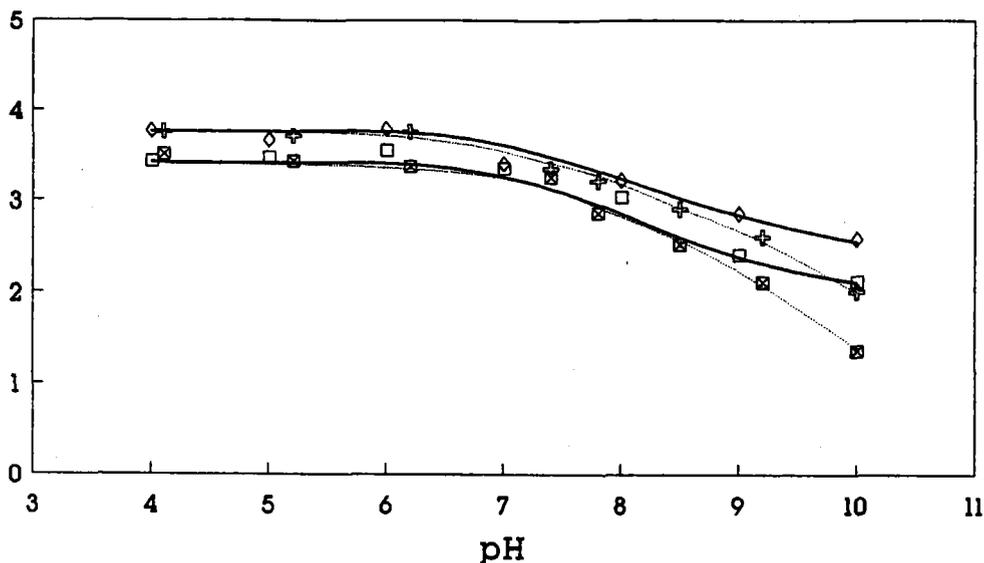


Fig. 3.17 *Movilidad de los látexes catiónicos en función del pH en suspensiones tamponadas (f. iónica 50 mM).*

tamponador AMP a una influencia de esta sustancia, y por tanto vamos a considerar que su uso es viable teniendo siempre en consideración todas las cuestiones aquí planteadas.

Con el objeto de asegurarnos de que el comportamiento electrocinético de los látexes catiónicos en presencia de los sistemas tamponadores se va a mantener también en condiciones diferentes de las antes ensayadas, hemos repetido estos mismos experimentos a fuerza iónica 50 mM, que es el límite superior que admite nuestra célula de medido estándar PC 4 en el dispositivo de electroforesis. Esta experiencia la hemos realizado porque los procesos de adsorción de proteínas también se realizarán en ocasiones a fuerzas iónicas mayores de 1 mM, e incluso mayores de 50 mM, pero hemos considerado que el ensayo de los tampones a esta fuerza iónica es suficiente para indicarnos si dichos tampones afectarán las propiedades electrocinéticas de los látexes catiónicos al aumentar la concentración salina del medio.

En la Figura 3.17 se ha hecho una representación análoga a la de la Figura 3.15, pero esta vez las disoluciones están formadas originalmente por sistemas tamponados con fuerza iónica 50 mM. En los datos correspondientes a las muestras preparadas en condiciones similares de pH y fuerza iónica pero sin sistemas tamponadores (línea punteada), la concentración salina corresponde con una disolución de KBr 50 mM cuyo pH se ha ajustado con NaOH o HCl. Una vez más, podemos

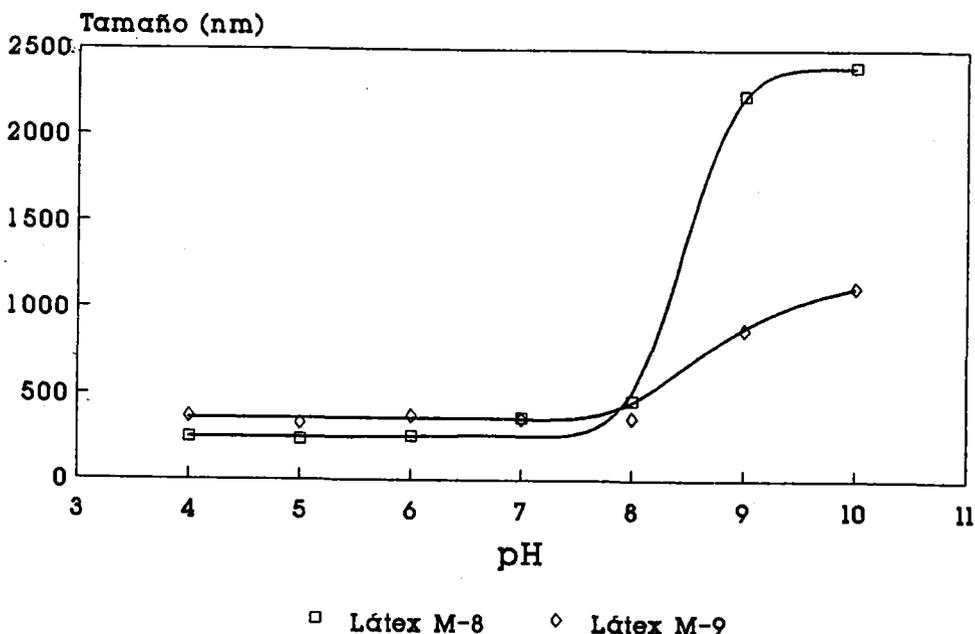


Fig. 3.18 *Tamaño de los látexes catiónicos en función del pH en suspensiones tamponadas (f. iónica 50 mM).*

afirmar que incluso a fuerzas iónicas altas la presencia de los sistemas tamponadores no afecta las características electrocinéticas de estas partículas, aunque al igual que en el caso de fuerza iónica baja hay un pequeño desajuste en el caso de disoluciones muy alcalinas. Efectivamente a pH 10 se observa de nuevo un ligero descenso en el valor de la movilidad electroforética de ambos látexes, lo que una vez más podemos atribuir a una posible adsorción de moléculas de AMP sobre la superficie hidrofóbica semidescargada de estas partículas o simplemente al proceso de coagulación que está teniendo lugar.

Para el caso de suspensiones de látex en disoluciones de fuerza iónica 50 mM el proceso de coagulación es aún más acentuado a pHs alcalinos que para fuerzas iónicas bajas de 1 mM. En la Figura 3.18 podemos ver como el tamaño de partícula empieza a crecer ya incluso a pH neutro para ambos látexes indicando la existencia de una cierta agregación entre las partículas. Este aumento de tamaño, sin embargo, no es significativo para el látex M-8 hasta pH 9 y 10, donde sí podemos afirmar ya que se está produciendo una verdadera coagulación del sistema disperso. El látex M-9, sin embargo, parece ser que empieza a coagular de una forma continua a partir de pH 8 a esta fuerza iónica, no de forma brusca como lo hace el látex M-8 entre los valores de pH 8 y 9, y cuando estudiemos su estabilidad coloidal veremos que efectivamente es capaz de

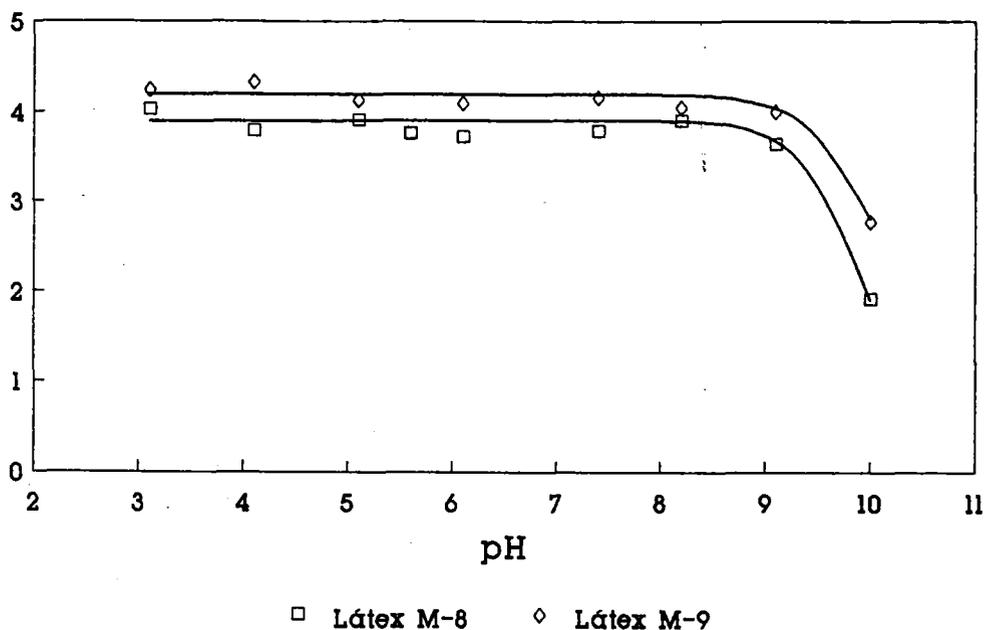


Fig. 3.19 *Movilidad de los látexes catiónicos en función del pH a fuerza iónica 1 mM sin tampones.*

soportar una concentración salina ligeramente mayor que el látex M-8 en unas mismas condiciones de pH. Este resultado no parece muy lógico si tenemos en cuenta la menor densidad superficial de carga del látex M-9, aunque sí lo es si observamos que en todos los casos vistos hasta ahora este látex presenta siempre una movilidad electroforética mayor que las partículas del látex M-8. Esta aparente contradicción entre la carga eléctrica presente en la superficie de las partículas y la movilizadas electrocinéticamente será estudiada más a fondo cuando planteemos el problema de la conversión de los datos de movilidad electroforética en valores de potencial zeta, así como la estimación del grosor de la doble capa eléctrica.

Una vez resuelto el problema de encontrar los sistemas tamponados que posteriormente utilizaremos cuando estudiemos la adsorción de proteínas sobre la superficie de estas partículas, debemos continuar con la caracterización electrocinética de estos látexes, ya que es fundamental tener un buen conocimiento de la interfase sólido-líquido y de sus propiedades eléctricas para poder interpretar después los fenómenos que acontecen en dicho proceso de adsorción.

La característica electrocinética más importante que tienen estos látexes con respecto a otros estudiados con anterioridad es precisamente la propiedad que hemos visto ya varias veces a lo largo de este capítulo: la movilidad electroforética de estas partículas prácticamente no varía con

el pH hasta que este es muy alcalino. Esto implica que los grupos amidino que aportan la carga positiva en la superficie del látex actúan como bases fuertes, manteniendo su estado de protonación hasta llegar a las proximidades del pK de este grupo. Las implicaciones que tienen esta característica de los látexes es fundamental, ya que hasta la fecha sólo se ha publicado un trabajo en 1991 de los autores Blaakmeer y Fleer (4) en el que se habla de un látex catiónico con una densidad superficial de carga independiente del pH (en el Capítulo anterior sobre la síntesis de los látexes catiónicos se comenta el trabajo de estos investigadores con más extensión). La importancia de este hecho se fundamenta básicamente en la posibilidad de comparar las propiedades tanto electrocinéticas como de estabilidad coloidal y de comportamiento en disolución de este tipo de látexes con las de los látexes aniónicos, que durante décadas han sido los utilizados como modelos coloidales en la comprobación de las teorías electrocinéticas y los fenómenos relacionados con los coloides en disolución. El uso de estas partículas con carga positiva en su superficie en condiciones similares a las utilizadas para los látexes aniónicos permite discernir cual es la aportación de las interacciones electrostáticas a los fenómenos de adsorción, e incluso encontrar nuevas aplicaciones para estos sistemas coloidales en circunstancias en las que las partículas con carga negativa no eran útiles. En nuestro caso particular, estudiaremos mediante este sistema de comparar látexes aniónicos y catiónicos cual es el aporte de la interacción electrostática de un signo o de otro al proceso de adsorción de proteínas, y de camino intentaremos buscar mejoras que faciliten el uso de este tipo de partículas en el desarrollo de tests de inmunodiagnóstico.

Toda la argumentación anteriormente expuesta sobre la utilidad de estos látexes como modelos coloidales se ha basado en la constancia que la movilidad electroforética de estas partículas presenta cuando variamos el pH del medio de dispersión. Sin embargo, sabemos por la teoría electrocinética que este parámetro de la movilidad depende no de la carga eléctrica presente en la superficie de la partícula, sino del potencial eléctrico que exista en un plano más exterior llamado "de deslizamiento", y que la situación de éste en el espacio depende de muchos factores. Es por esto que antes de continuar la caracterización electroforética de estos látexes tenemos que determinar como varía realmente la carga eléctrica presente en la superficie de estas partículas con el pH. Esta determinación se consigue realizando una valoración potenciométrica de una muestra de látex limpio a la que se añade una cierta cantidad de ácido o de base, valorando a continuación de la misma forma un blanco que contiene igual cantidad de ácido o

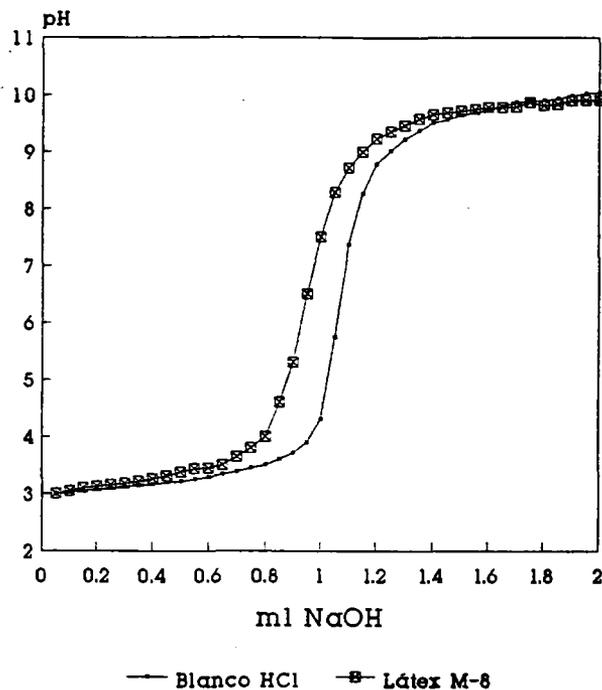


Fig. 3.20 Valoración potenciométrica del látex M-8 y de un blanco de HCl.

de base, y restando el resultado de ambas valoraciones. Como ejemplo de este proceso vamos a mostrar aquí como se ha realizado en el caso del látex M-8.

En la Figura 3.20 pueden verse las dos valoraciones potenciométricas antes descritas: a una cierta cantidad de látex concentrado se le añade 1 ml de HCl 20 mM y se diluye entonces la muestra hasta 20 ml, para facilitar la valoración. Mediante el sistema automatizado descrito ya en el apartado dedicado al cálculo de la densidad superficial de carga de los látexes se va añadiendo de forma controlada NaOH 20 mM hasta 20 ml y valorándolo igualmente con NaOH. La diferencia que existe en ml de agente valorante entre ambas curvas corresponderá también con la diferencia entre la valoración de los grupos cargados del látex positivo más el ácido añadido y el blanco, es decir, que debe corresponder con los protones que se encuentran asociados a los grupos amidino de la superficie de las partículas. Este dato de ml de agente valorante se puede obtener para cada valor de pH, y conociendo los datos de superficie específica, porcentaje en sólido del látex y cantidad de éste añadida se puede calcular la densidad superficial de carga para cada valor de pH utilizando de nuevo la expresión antes descrita para el cálculo de la densidad superficial de carga mediante valoración conductimétrica:

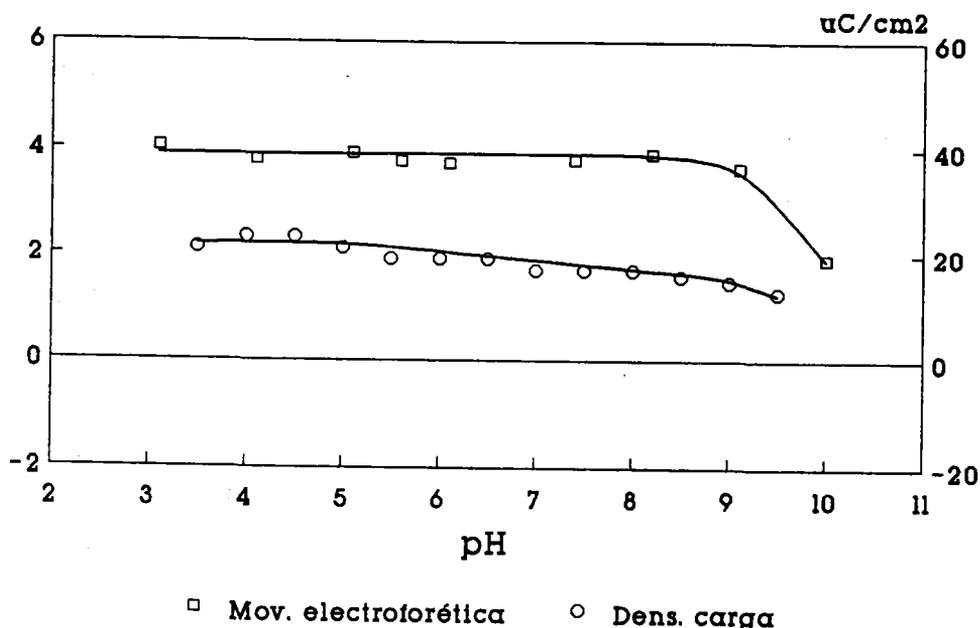


Fig. 3.21 *Movilidad electroforética y densidad superficial de carga del látex M-8 en función del pH.*

$$\sigma_0 = C \cdot F \cdot \frac{f}{S} \quad [3.5]$$

El resultado de este cálculo para el látex M-8 podemos resumirlo en la Figura 3.21, en la que se ha representado en el eje de la izquierda la densidad superficial de carga en función del pH, y en el eje de la derecha la movilidad electroforética. En esta gráfica tenemos resumido el comportamiento tanto superficial como electrocinético de las partículas de látex M-8, y aunque se observa un ligera tendencia de la densidad superficial de carga a disminuir a partir de pH neutro, podemos afirmar que efectivamente este látex tiene un comportamiento eléctrico bastante independiente del pH. El hecho de que no se observe la caída en el potencial superficial a partir de pH 9 que sí puede verse en el caso de la movilidad electroforética se debe a la inexactitud que en esos valores de pH existe ya a la hora de determinar los ml de agente valorante en la curva de valoración potenciométrica, y no deben de tenerse en cuenta.

La conclusión principal que sacamos de este tipo de experiencia es que efectivamente podemos confirmar la afirmación antes expuesta de que este tipo de látex es útil para su estudio

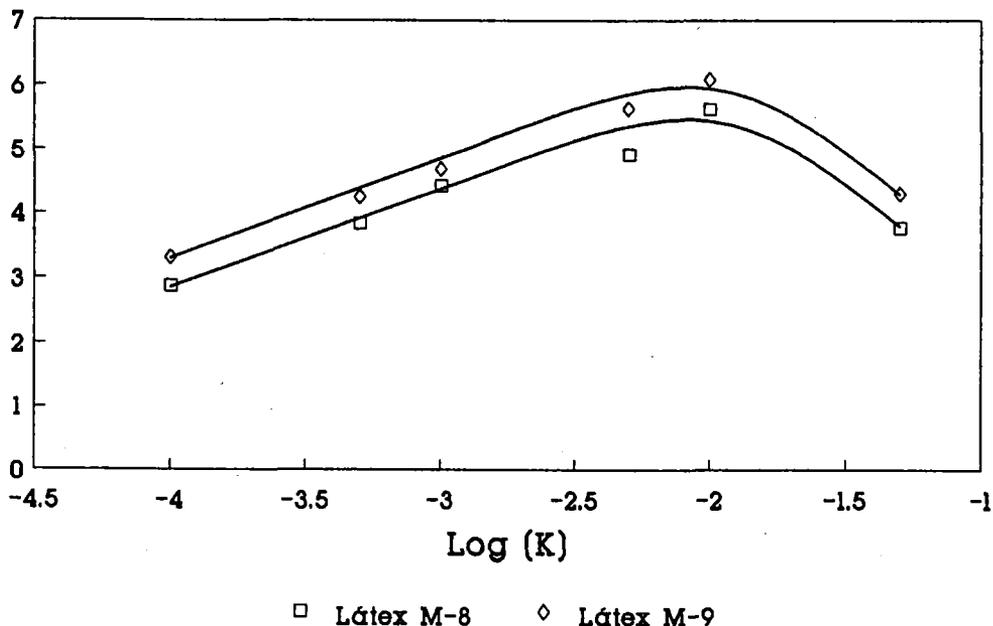


Fig. 3.22 *Movilidad electroforética de los látexes catiónicos en función de la fuerza iónica (KBr).*

como modelo coloidal, y que de modo general podemos comparar sus características de comportamiento con las de un látex aniónico de similares características, pero de signo contrario.

Para obtener una caracterización electrocinética completa de estos látexes además del estudio anteriormente mostrado sobre la variación de la movilidad electroforética μ_e y la densidad superficial de carga σ_0 con el pH hay que estudiar también la influencia que tiene la fuerza iónica del medio de dispersión en los parámetros electrocinéticos de estas partículas, así como el tipo de iones utilizados. En la Figura 3.22 se ha representado la movilidad electroforética de los látexes M-8 y M-9 en función de la concentración de KBr, que por ser un electrolito 1:1 coincide con la fuerza iónica de la disolución, y se observa una particularidad que ya se había presentado en gráficas anteriores pero que aún no habíamos comentado: el látex que tiene mayor densidad superficial de carga, que en este caso es el M-8, presenta sin embargo una movilidad electroforética menor. Esta discrepancia entre densidad de carga movilizada electrocinéticamente y densidad de carga superficial se debe a la diferente posición espacial que adopta el plano de deslizamiento de la doble capa eléctrica en función del equilibrio iónico de la superficie de la partícula. Esto quiere decir que cuando la densidad superficial de carga es baja, el plano interior de Helmholtz en el que se sitúan los contraiones (y posiblemente algunos co-iones) inmovilizados

junto a la superficie está en un valor promedio más próximo a dicha superficie que cuando la densidad superficial de carga es mayor, puesto que en esta caso el número de iones inmovilizados es también mayor y por tanto el valor promedio de distancia del plano de deslizamiento a la superficie de la partícula aumenta (para una mejor interpretación, ver Apéndice III). Estas diferencias en la posición del plano de deslizamiento se traducen en diferencias en la caída de potencial que se produce conforme nos alejamos de las cargas eléctricas superficiales: el látex con una densidad de carga superior, además de tener una caída de potencial inicial también mayor a consecuencia de los contraiones situados en el plano exterior de Helmholtz, tiene el plano de deslizamiento más lejos, por lo que dicha caída de potencial se acentúa, y da como resultado una carga movilizada electrocinéticamente menor que cuando el látex tiene menos densidad superficial de carga. Evidentemente, este fenómeno debe producirse sólo en cierto margen de densidades de carga, aunque en nuestras experiencias no hemos determinado los límites de este margen. Además, de acuerdo con la ecuación de Bikerman de la conductividad superficial (5), una mayor σ_0 implica también una mayor conducción superficial (λ_s), y por lo tanto un menor potencial electrocinético efectivo.

Además de esta aparente discrepancia, la otra característica importante a resaltar en la Figura 3.22 es la aparición de un máximo en la movilidad electroforética al aumentar la fuerza iónica del medio de dispersión. Este fenómeno es de particular importancia, ya que se presenta de modo general en todos los látexes poliméricos, tanto aniónicos como catiónicos, y ha llegado incluso a cuestionar la utilidad de este tipo de partículas como modelos coloidales (6-10). Como veremos más adelante en la sección dedicada a la conversión de datos de movilidad electroforética en valores de potencial ζ , este problema no es en realidad referente a un máximo en la movilidad, sino en el potencial electrocinético responsable de dicha movilidad electroforética. Cuando se utiliza la ecuación simple de Smoluchowski (o incluso la más compleja de O'Brien y White (11) que tiene en cuenta los efectos de distorsión de la doble capa causados por los iones del medio), aparece este máximo del potencial ζ en función de la fuerza iónica (Fig. 3.27) que está en franca contradicción con la disminución lineal del potencial difuso que prevee la teoría electrocinética de coloides (12). En dicha sección se comentará más detenidamente este problema, tratando los diferentes métodos que hay para la conversión de datos de movilidad en potencial ζ (13).

En cualquier caso, para responder a esta interrogante que ha llegado a poner en duda la utilidad de los polímeros orgánicos como sistemas coloidales modelo se han propuesto varias hipótesis, de las que podemos considerar como más acertadas las siguientes:

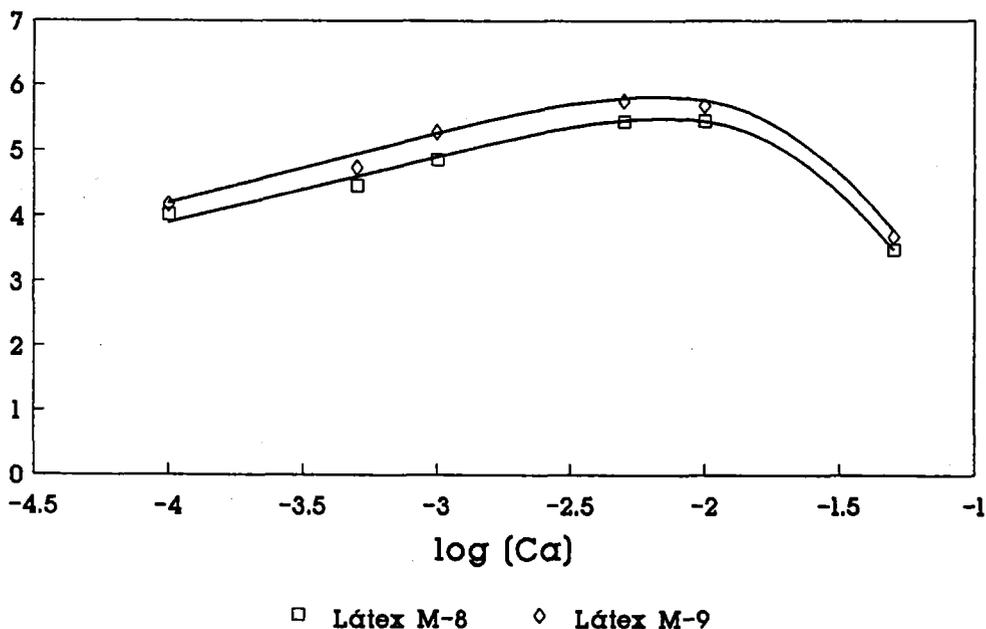


Fig. 3.23 *Movilidad electroforética de los látexes catiónicos en función de la fuerza iónica (CaCl₂).*

- Adsorción de co-iones en el plano interior de Helmholtz, con el consiguiente incremento de potencial en la doble capa de la superficie al aumentar la fuerza iónica (8).
- Movilidad iónica en dicho plano, lo que implicaría un fenómeno de conducción superficial no incluido en las teorías sobre potencial ζ , donde se supone que la capa de Stern es rígida (14-16).
- Separación del plano de deslizamiento de la superficie de la partícula como consecuencia de que ésta no es rígida, sino rugosa y flexible (en el caso de los polímeros orgánicos, posiblemente con cadenas de oligómero más o menos extendidas hacia la disolución (17-22).

Con el objetivo de aportar pruebas sobre la veracidad de la primera hipótesis del potencial en la región próxima a la superficie de la partícula (plano interno de la doble capa), se midió la movilidad electroforética de una serie de suspensiones de los látexes M-8 y M-9 a diferentes concentraciones de electrolito en las que variaba el tipo de co-ion, pero usando siempre el mismo contraion. Estas medidas se realizaron para los electrolitos KCl, CaCl₂ y LaCl₃, de modo que la

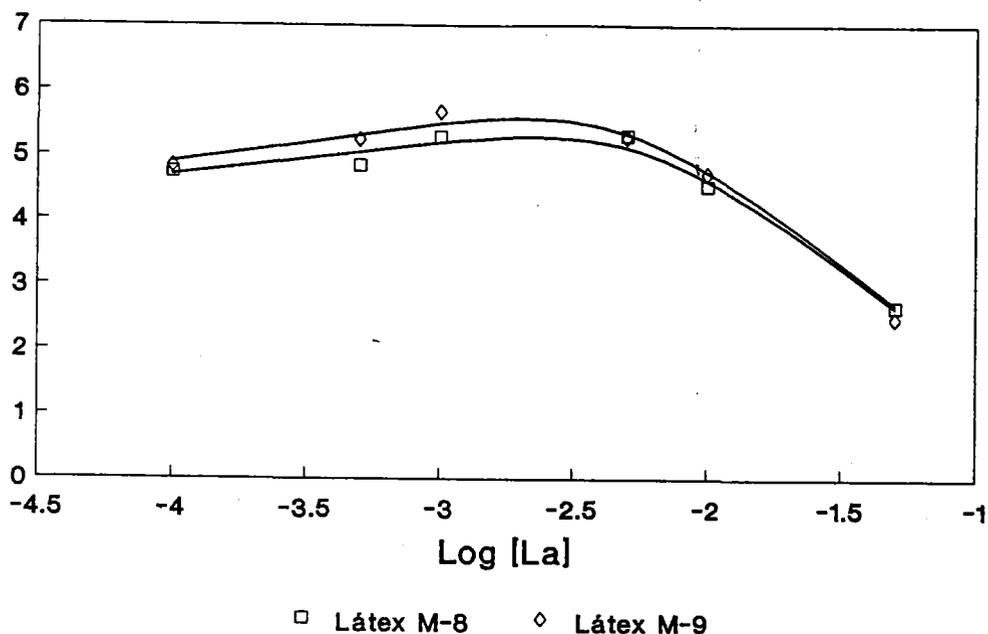


Fig. 3.24 *Movilidad electroforética de los látexes catiónicos en función de la fuerza iónica ($LaCl_3$).*

carga del co-ion fuera en aumento. Los resultados obtenidos al variar la concentración de KCl en ambos látexes fueron, dentro del error experimental, idénticos a los anteriormente expuestos para el caso del KBr (Fig. 3.22). En las Figuras 3.23 y 3.24 aparecen, respectivamente los resultados obtenidos para el caso del ion Ca^{2+} y del ion La^{3+} . En todas las representaciones se ha expresado la concentración de electrolito como fuerza iónica, de modo que las propiedades eléctrica de la disolución fueron para un valor dado independientes de la valencia del ion.

Lo primero que podemos observar en estas Figuras es que los resultados son bastante similares, aunque hay una tendencia a disminuir las diferencia en movilidad electroforética entre ambos látexes conforme aumenta la valencia del co-ion. Esta tendencia, además, se acentúa a fuerzas iónicas altas, donde podemos ver que en el caso del La^{3+} llegan a hacerse idénticas las movilidades a fuerzas iónica superiores a 10 mM. Este comportamiento evidencia que el tipo de co-ion utilizada en el mantenimiento de la fuerza iónica del medio afecta de algún modo a las propiedades electrocinéticas de estas partículas.

Para una mejor interpretación de estos resultados, hemos representado también en las Figuras 3.25 y 3.26 la movilidad electroforética por separado de los látexes catiónicos en función de la fuerza iónica correspondiente a cada uno de los electrolitos, de modo que se puedan comparar

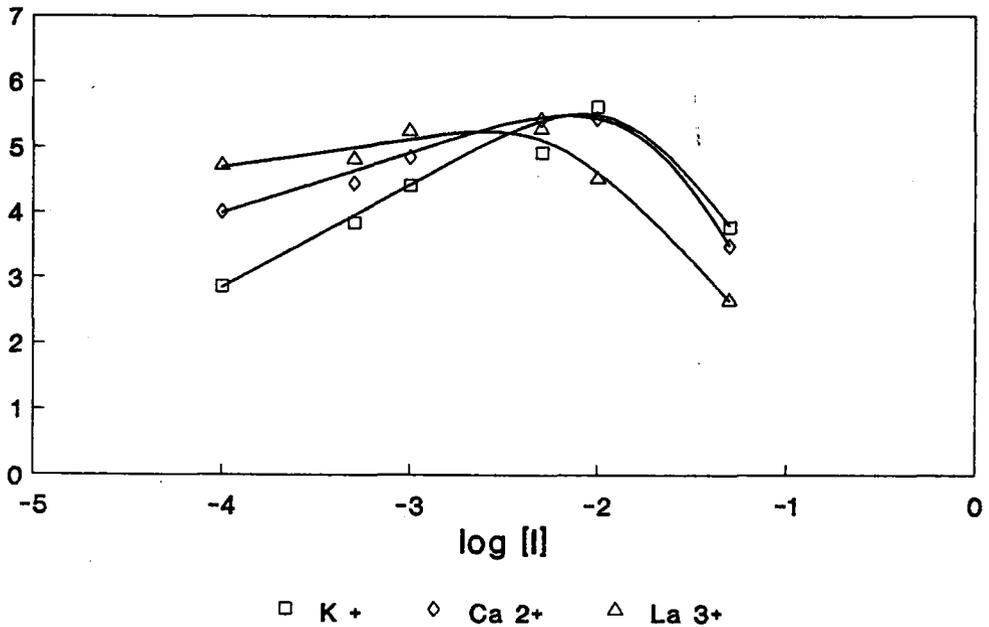


Fig. 3.25 *Movilidad electroforética del látex M-8 en función de la fuerza iónica con diferentes co-iones).*

los efectos que provoca cada ion sobre las propiedades electrocinéticas de estos látexes. En ambas Figuras se puede observar que, efectivamente, el tipo de co-ion utilizado afecta de modo significativo la movilidad electroforética de los látexes catiónicos, disminuyendo la pendiente inicial de la curva y también la fuerza iónica a la que se alcanza el máximo conforme aumenta la valencia del co-ion. Estas diferencias en el comportamiento de electrólitos con un mismo contraion parece avalar la hipótesis de que se produce adsorción de co-iones en la zona interna de la doble capa, principalmente a fuerzas iónicas bajas. En particular, si nos fijamos en los iones K^+ y Ca^{2+} , que en su estado de hidratación en solución deben tener prácticamente el mismo tamaño pero distinta carga, podemos ver que a fuerza iónica baja afectan de modo diferente al comportamiento electrocinético de las partículas, presentando mayor movilidad precisamente el co-ion de mayor valencia. Esta diferencia se reduce conforme aumentamos la fuerza iónica, y a partir de que se alcanza el máximo (y por tanto cuando el sistema coloidal empieza a comportarse de acuerdo con la teoría, con el potencial difuso ψ_d decreciendo linealmente con el aumento de fuerza iónica el comportamiento electrocinético de los látexes en presencia de ambos iones se hace muy similar.

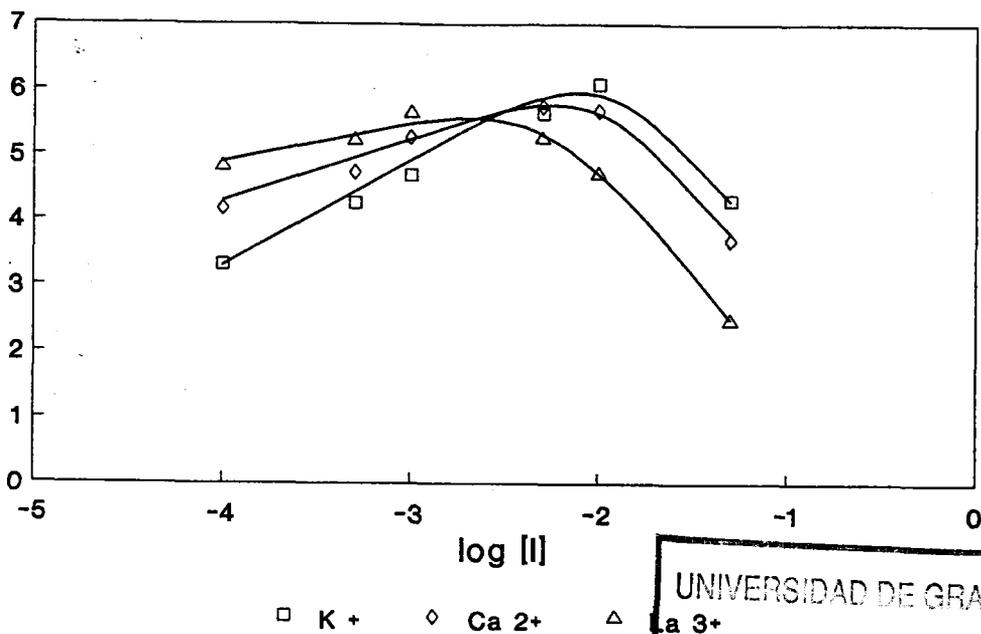


Fig. 3.26 Movilidad electroforética del látex M-9 en función de la fuerza iónica con diferentes co-iones)

UNIVERSIDAD DE GRANADA
 - 8 MAYO 1992
 COMISION DE ELECTROQUIMIA

En la Sección 3.5 sobre la conversión de los datos de movilidad electroforética en valores de potencial ζ continuaremos la discusión sobre el efecto de estos co-iones en los látexes catiónicos, así como todos los aspectos referentes a la segunda hipótesis, según la cual, independientemente de que exista o no adsorción de co-iones en la superficie de las partículas y de que dicha superficie sea rígida o flexible, el problema del máximo en la movilidad electroforética en función de la fuerza iónica estriba en la conductividad superficial anómala que se produce en la capa de Stern como consecuencia de que ésta tiene una cierta movilidad iónica, aunque no hidrodinámica.

El estudio electrocinético de estos látexes catiónicos variando el contraión del electrolito utilizado en la suspensión no lo hemos realizado aquí porque ya se hizo en un trabajo anterior sobre caracterización electrocinética de látexes catiónicos (1), donde observamos que, al igual que ocurría con los tampones formados por pequeños aniones con una fuerte carga negativa, estos se adsorbían sobre la superficie de las partículas disminuyendo su carga efectiva si la relación carga/masa de estos iones era suficientemente grande. El estudio se realizó con aniones de semejante tamaño pero diferente carga (NO_3^- , SO_4^{2-} y PO_4^{3-}), y se observó que el ión nitrato, al igual que el acetato en el estudio de los tampones, es indiferente para estos látexes, es decir, no le afecta en sus propiedades electrocinéticas, mientras que los aniones de más carga sí se unen

electrostáticamente a los grupos positivos de la superficie de las partículas, disminuyendo su carga electrocinética y volviéndola incluso negativa en el caso de una concentración relativamente alta del ión fosfato.

Con respecto a la tercera hipótesis antes enunciada, basada en la flexibilidad de la superficie de las partículas de látex, existen numerosas pruebas en la literatura que parecen confirmar la veracidad de esta afirmación (17-22). Esta interpretación se basa en la suposición de que las cadenas poliméricas que componen la parte más externa de las partículas no están fuertemente adheridas, sino que tienen cierta libertad de movimiento hacia el interior de la disolución. Esta posibilidad de desplazarse estaría determinada por el número y la posición que las cargas eléctricas pudieran tener en la cadena, o a la presencia de polielectrólitos adheridos a la superficie. En cualquier caso, el efecto que se provocaría en la doble capa sería un desplazamiento del plano de cizalladura, especialmente a baja fuerza iónica donde el fenómeno de contracción de la doble capa aún no es importante, y como consecuencia disminuirá el potencial ζ y por tanto la movilidad electroforética. Conforme se aumenta la fuerza iónica, la contracción de la doble capa se va haciendo más importante y el comportamiento electrocinético de las partículas se va aproximando al esperado.

3.4 CARACTERIZACION ELECTROKINETICA DE LATEXES ANIONICOS

Para poder comparar el comportamiento electrocinético de estas partículas con el de las catiónicas ya estudiadas en las secciones anteriores, vamos a seguir un orden similar en la presentación de los resultados obtenidos al medir la movilidad electroforética en función de las diversas variables que pueden afectar sus propiedades electrocinéticas. Siguiendo este criterio, la primera variable a estudiar es el efecto de la concentración de partículas y del tiempo de acondicionamiento de las suspensiones en la movilidad electroforética. Puesto que el problema principal en el caso de los látexes catiónicos era la contaminación producida por iones silicato procedentes del vidrio del recipiente, es de esperar que esto no ocurra en el caso de los látexes aniónicos, pues en estos no hay atracción electrostática entre estos iones y la carga eléctrica de su superficie. Efectivamente, en la Figura 3.27 podemos ver como ejemplo la movilidad electroforética de un látex aniónico de tipo carboxílico (CC-2) en función de la cantidad de látex añadida a 40 ml de disolución 1 mM de KBr para dos tiempos de espera, 0 y 15 minutos. Los recipientes eran de cristal, y sin embargo podemos observar que prácticamente no hay variación

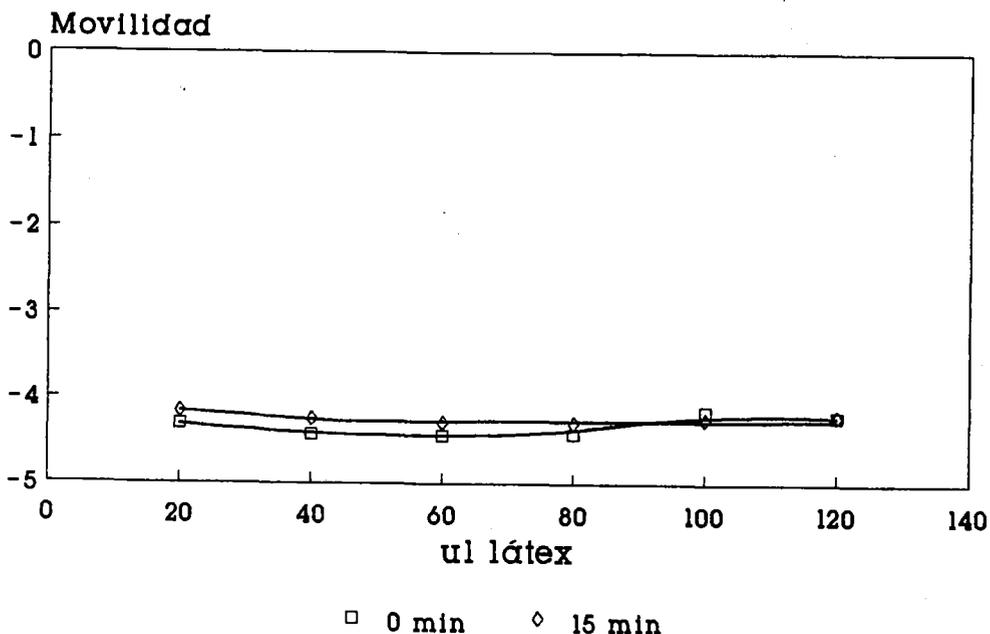
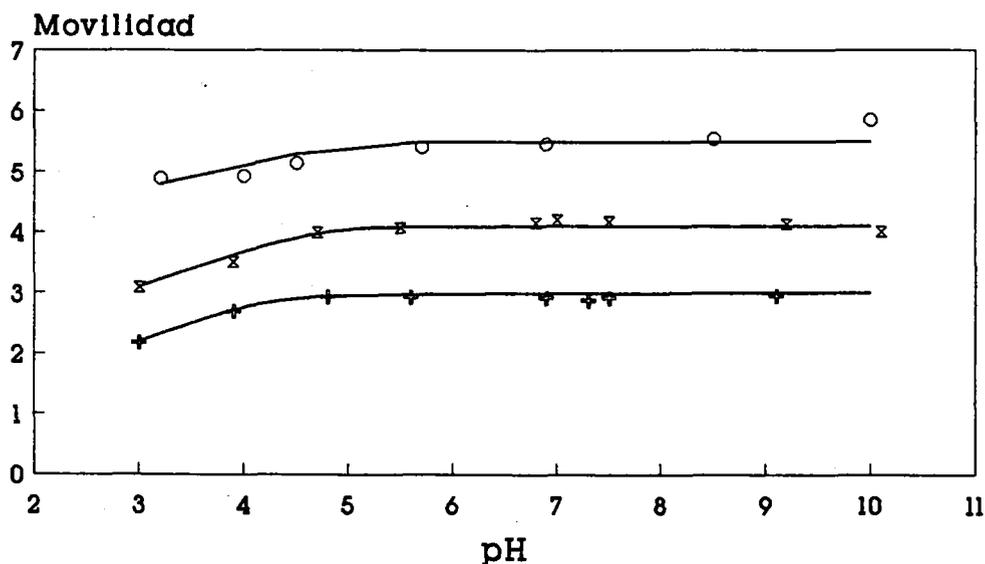


Fig. 3.27 *Movilidad del látex carboxílico CC-2 en función de la cantidad de látex concentrado añadida.*

en los valores de la movilidad en función de la concentración de látex, sobre todo cuando el tiempo de residencia en los frascos era de 15 min. Esto quiere decir que, como era de esperar, los problemas que presentan los látexes catiónicos asociados con el tipo de recipiente utilizado no ocurren para los aniónicos, y podemos elegir por tanto una concentración de partículas y un tiempo de acondicionamiento estándar similar al usado anteriormente para los látexes positivos, es decir, 6×10^{-3} % en peso de poliestireno sólido con respecto a la disolución acuosa y 15 min. para que se alcancen los posibles equilibrios iónicos en la suspensión.

Una vez determinadas las condiciones estándar para la preparación de las muestras con el objeto de medir su movilidad electroforética, el siguiente paso es estudiar como varía esta propiedad electrocinética con el pH del medio, y en particular es necesario comprobar que tipo de tampones biológicos podemos utilizar en el estudio de la adsorción de proteínas que no afecten esta movilidad electroforética, de modo que no resulten alteradas las posibles interacciones electrostáticas entre las partículas de látex y las moléculas de proteína. En la Figura 3.28 está representada la movilidad electroforética de los látexes aniónicos en función del pH utilizando inicialmente HCl o NaOH para preparar las disoluciones. Podemos ver la diferencia que existe entre el látex comercial de Rhône-Poulenc, cuyos grupos superficiales deben ser del

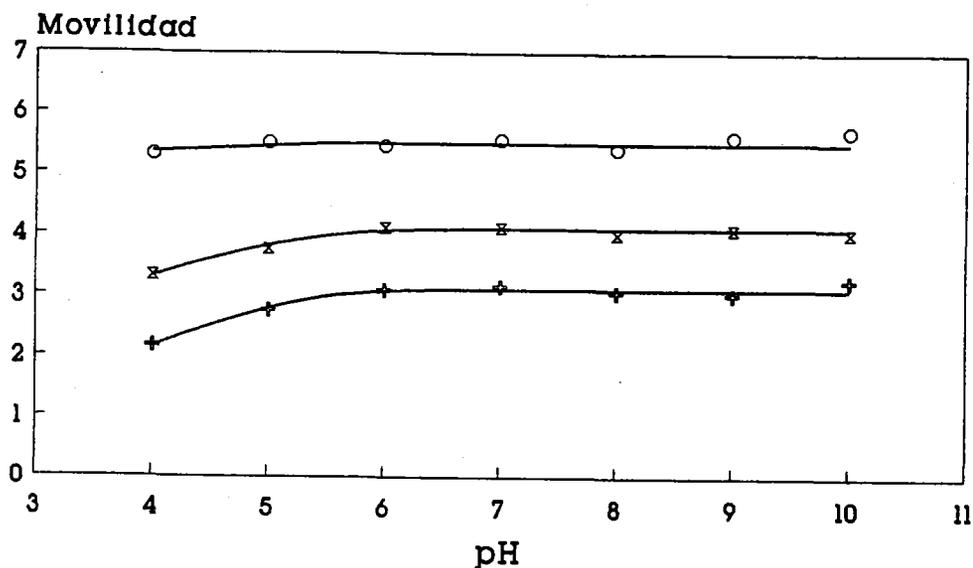


x Látex CC-2 + Látex CC-4 o Látex R-P

Fig. 3.28 *Movilidad electroforética de los látexes aniónicos en función del pH en ausencia de tampones.*

tipo $-\text{SO}_4^-$, es decir, ácido fuerte, y los látexes copoliméricos sintetizados por nosotros, en los que la carga superficial viene aportada básicamente por grupos carboxilo ($-\text{COO}^-$), o sea, ácido débil, aunque también debe existir algo de ácido fuerte en la superficie de estas partículas al haberse sintetizado usando persulfato potásico como iniciador. En el látex comercial de Rhône-Poulenc, no obstante, hay que tener en cuenta que posiblemente se haya sintetizado en presencia de agentes tensioactivos, por lo que no podemos conocer con seguridad el tipo de grupos químicos que puede haber en su superficie. En el caso de los látexes carboxílicos, la respuesta de la movilidad electroforética conforme variamos el pH es la que cabría esperar, o sea, tiene un valor constante a pHs neutros y alcalinos, en las que los grupos carboxilos están ionizados, pero al disminuir el pH a valores más ácidos estos grupos se van protonando, y el látex va perdiendo su carga. El látex de tipo sulfato, sin embargo, desciende menos su movilidad cuando el pH se vuelve ácido, y este pequeño descenso debe ser causado por algún tipo de grupos ácido más débiles que los sulfato procedentes posiblemente, como ya hemos indicado, de los tensioactivos que pueda haber en su superficie.

Al igual que ocurrió en el caso de los látexes catiónicos, podemos observar también aquí que los látexes con menor densidad superficial de carga son los que presentan una mayor movilidad



× Látex CC-2 + Látex CC-4 ○ Látex R-P

Fig. 3.29 *Movilidad electroforética de los látexes aniónicos en soluciones tamponadas de pH.*

electroforética, ya que el orden de estas densidades de carga aumenta en el sentido R-P < CC-2 < CC-4, que es precisamente el orden con el que descienden las movilidades. Este resultado confirma una vez más los resultados teóricos que predice la ecuación de Bikerman (5) de la conductividad superficial.

Con respecto al problema de los tampones que podemos usar en el caso de los látexes aniónicos para mantener un pH y una fuerza iónica constantes, ya se comentó cuando tratamos por primera vez este problema en la Sección de los látexes catiónicos que su validez en el caso de los látexes negativos ya había sido demostrada en trabajos anteriores (3), aunque en ese trabajo no se justificó su uso desde un punto de vista electrocinético. Es por esto que en este trabajo sí hemos medido la movilidad electroforética de las muestras de látex aniónico en función del pH utilizando como agentes tamponadores los mismos que originalmente usábamos para los experimentos de adsorción de proteínas, es decir, los sistemas siguientes:

- pH 4 y 5: Acetato
- pH 6 y 7: Fosfato
- pH 8, 9 y 10: Borato

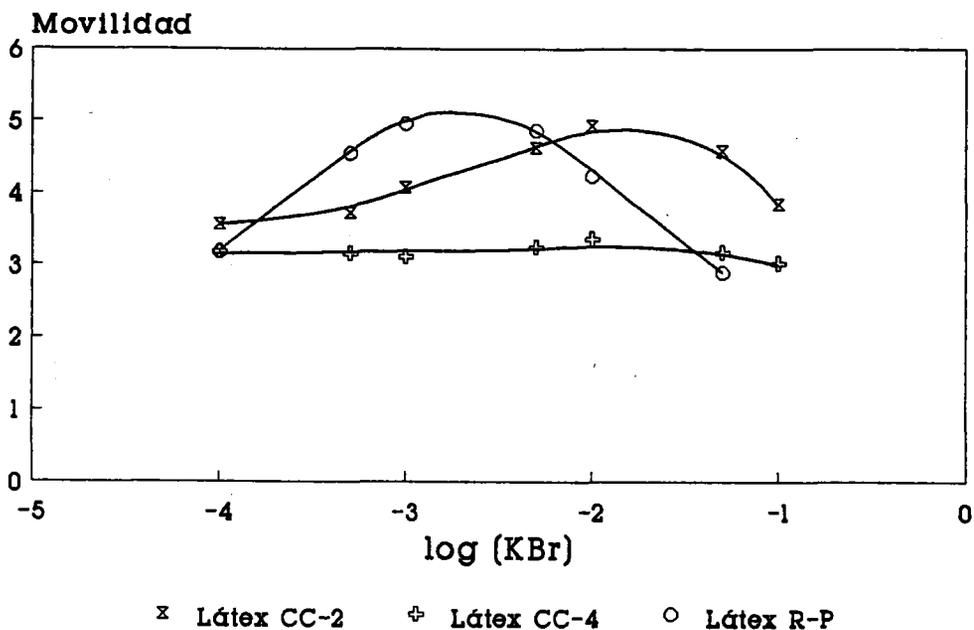


Fig. 3.30 *Movilidad electroforética de los látexes aniónicos en función de la fuerza iónica (KBr).*

En la Figura 3.29 podemos ver el resultado de estas medidas, que prácticamente coinciden con las que antes hemos expuesto para el caso de medir la movilidad electroforética en función del pH sin utilizar tampones. En la Sección de este Capítulo que trataba la caracterización electrocinética los látexes catiónicos explicábamos porqué algunos de estos sistemas tamponadores no podían usarse en ese caso, y la razón era el que se adsorbían específicamente en la superficie de las partículas al ser aniones con carga de signo contrario a la de los grupos superficiales. Dado que en este caso los látexes son aniónicos, no es de esperar adsorción específica de los iones del sistema tampón, y por tanto pueden ser usados en los experimentos de adsorción de proteínas con este tipo de látexes de carga negativa.

El siguiente paso en la caracterización electrocinética de estos látexes es el estudio de la variación de la movilidad electroforética con la fuerza iónica del medio de dispersión. En el caso de un electrólito indiferente, como el KBr, podemos ver en la Figura 3.30 el comportamiento de los tres látexes aniónicos en función de la concentración de dicho electrólito. En esta gráfica se observa como para un pH determinado (que en este caso es de 6), la respuesta de los látexes con diferentes tipos de grupos eléctricos en su superficie es también diferente. Mientras que el látex comercial de Rhône-Poulenc presenta un comportamiento más o menos simétrico en el rango de

fuerzas iónicas estudiadas, con un máximo de movilidad entre 1 y 5 mM, los látexes carboxílicos tienen el máximo muy desplazado a fuerzas iónicas mayores (entre 10 y 50 mM para el CC-2), e incluso el látex CC-4 fuertemente cargado no presenta casi máximo, con una movilidad constante en el margen de fuerza iónica estudiado. La explicación a este fenómeno debe proceder de la propia estructura de la doble capa eléctrica en un látex tan cargado ($169 \mu\text{C}/\text{cm}^2$), cuya rigidez y conducción superficial deben de hacerlo indiferente a la variación iónica producida en el medio en dicho margen de concentraciones.

A la vista de estos resultados, en los que podemos observar que la propiedad antes citada de que los látexes con menos densidad de carga superficial presentan una mayor movilidad sólo se cumple en todo el rango de fuerzas iónicas estudiadas para el caso de látexes con un mismo tipo de grupo eléctrico en su superficie, podemos presentar estos datos como una prueba más de que el potencial electrocinético efectivo responsable de movilidad electroforética de una partícula coloidal depende tanto de la densidad de carga de su superficie, σ_0 , como de la conductividad superficial de los grupos eléctricos responsables de dicha carga. La diferencia en este parámetro para el caso de los látexes carboxílicos y el látex sulfato aquí estudiados parece ser la razón de que se crucen sus curvas de movilidad electroforética en función de la fuerza iónica, ya que este fenómeno no lo habíamos observado para látexes del mismo tipo, aunque tuvieran cargas superficiales muy diferentes.

Para estos látexes no hemos realizado el estudio de la influencia de los diferentes tipos de aniones y cationes sobre sus propiedades electrocinéticas porque en el caso de partículas aniónicas, tanto de tipo sulfato como carboxilo, existen numerosos estudios en la literatura al respecto (22-26).

3.5 CONVERSION DE DATOS DE MOVILIDAD EN POTENCIAL ZETA

Una descripción detallada de la estructura de la doble capa eléctrica que rodea a las partículas que componen un polímero coloidal modelo no es una tarea fácil, pero es de fundamental importancia para poder abordar problemas como la estabilidad o la reología de sistemas dispersos, procesos electrocinéticos, filtración y electrofiltración de partículas, etc.

De acuerdo con el desarrollo teórico expuesto en el Apéndice III, una adecuada descripción de la estructura de la doble capa eléctrica que rodea una partícula necesita del conocimiento de al menos tres potenciales: el potencial superficial (ψ_0), el potencial en la capa de Stern (ψ_s) y

el potencial difuso (ψ_d). Si admitimos la no existencia de impurezas orgánicas ni de polielectrólitos adsorbidos en la superficie de la partícula, el potencial difuso ψ_d puede suponerse igual al potencial en el plano de deslizamiento electrocinético, es decir, el potencial zeta (ζ). Para simplificar aún más el problema, el potencial superficial ψ_0 puede suponerse igual al potencial en la capa de Stern ψ_s , cuando el electrólito usado en la disolución es indiferente, o sea, que ninguno de sus iones se adsorbe de modo específico sobre la superficie de la partícula. De esta forma, un estudio detallado de la estructura de la doble capa eléctrica asumiendo este modelo sólo necesita del conocimiento de los potenciales ζ y ψ_0 .

Los látexes de poliestireno esféricos y monodispersos han demostrado ser un sistema modelo muy útil para comprobar todo tipo de aproximaciones teóricas al problema de la descripción de la doble capa eléctrica (11,14,23,24). Puesto que la mayoría de estas teorías (ver Apéndice III) parten de la suposición de partículas esféricas y con igual tamaño, la fabricación de estos látexes monodispersos ofrece una excelente oportunidad para verificar de modo experimental los resultados obtenidos con dichas teorías. Sin embargo, y como ya mencionamos en la Sección anterior al estudiar las propiedades electrocinéticas de los látexes catiónicos, se está poniendo en duda la idealidad de estas partículas poliméricas como sistemas coloidales modelo a la vista del comportamiento anómalo que presentan cuando se mide su movilidad electroforética en función de la concentración de un electrólito indiferente (6-10). Partiendo de las teorías electrocinéticas hasta hoy desarrolladas, cuando estos datos de movilidad electroforética se transforman a valores de potencial ζ el máximo en la curva sigue apareciendo igualmente, y puesto que éstas predicen una disminución continua del potencial con la fuerza iónica del medio de dispersión, parece indicar que estas partículas contradicen experimentalmente los supuestos iniciales de dichas teorías.

Con respecto a este problema del máximo en las curvas de potencial ζ se han propuesto diferentes explicaciones de este fenómeno a nivel superficial, es decir, buscando la respuesta en los fenómenos de tipo físico o químico que acontecen en los grupos cargados de la superficie de las partículas o en los iones que neutralizan dicha carga cuando ésta se encuentra en un medio acuoso (6-8,10,17,22). Estas han sido ya enumeradas y comentadas en la sección anterior, e incluso algunos autores (14-16,25) han apuntado que la solución de este problema es de índole teórico, o sea, que aunque la movilidad electroforética de estas partículas en función de la concentración de electrólito presente un máximo, éste no tiene porqué implicar que el potencial ζ presente también el máximo, sino que el error radica en las teorías de la transformación de

unos valores en otros, e indicando que la conversión de los datos de movilidad en potencial ζ para la interfase microesfera de poliestireno - solución de electrólito debe de hacerse de acuerdo con una teoría que tenga en cuenta todos los posibles mecanismos de polarización de la doble capa. El término polarización implica que la doble capa eléctrica que rodea la partícula se ha de suponer con una estructura diferente de la que tiene cuando está en equilibrio estático debido al movimiento provocado por el fenómeno de la electroforesis. En este caso, la descripción de la estructura espacial de la doble capa eléctrica deformada esencial para poder deducir las expresiones propias de la electroforesis, se complica bastante como consecuencia de que no se puede utilizar a priori la distribución de Boltzmann para obtener las funciones $C^\pm(r)$ y $\psi(r)$, es decir, la distribución espacial de cationes y aniones alrededor de la partícula y la variación del potencial eléctrico conforme nos alejamos de la superficie hacia el interior de la disolución. Incluso cuando se alcanza el estado estacionario en el proceso de la electroforesis, los flujos iónicos en la doble capa parece ser que no desaparecen y que por tanto hasta en este supuesto la posibilidad de utilizar la ecuación de distribución de Boltzmann requiere una especial consideración (14).

Overbeek (26) y Both (27) fueron los primeros en incorporar la polarización de la doble capa eléctrica en la teoría electrocinética. Estos autores, sin embargo, consideraron que los procesos de transferencia y redistribución de cargas afectaban únicamente a la parte móvil de la doble capa, o sea, a la parte difusa, mientras que la zona más próxima a la superficie, por debajo del plano de deslizamiento, no era afectada como consecuencia del movimiento de la partícula en el seno de un campo eléctrico (ver Apéndice III). También O'Brien y White (11), partiendo del mismo conjunto de ecuaciones que Wiersema (28), han publicado una aproximación teórica al fenómeno de la electroforesis que tiene en cuenta cualquier combinación de iones en la disolución acuosa y la posibilidad de potenciales ζ muy altos (hasta 250 mV), que son superiores a los que cabría esperar incluso en las condiciones experimentales más extremas. Sin embargo, el método de O'Brien y White presenta el problema de que no toma en consideración la posibilidad de una conducción iónica en el interior del plano de deslizamiento, cuando Midmore y Hunter (8) han demostrado recientemente que este fenómeno ocurre en el sistema látex cargado negativamente - disolución de electrólito cuando la concentración de este último se encuentra por debajo de 1 mM. Si la influencia de esta conducción superficial es suficientemente alta, los desarrollos teóricos antes mencionados no serían válidos para la determinación del potencial ζ a partir de los datos de movilidad electroforética. Más aún, si asumimos la existencia

de esta conducción superficial, la componente tangencial del campo eléctrico en la doble capa disminuirá, y como consecuencia también lo haría la movilidad.

Podemos distinguir dos mecanismos diferentes de conducción eléctrica asociados a la doble capa cuando ésta se desplaza en el seno de un campo eléctrico: conducción superficial provocada por la transferencia de carga tangencial a través de la parte móvil de la doble capa, que correspondería con la conducción normal ya tomada en cuenta por la teoría de Overbeek-Booth-Wiersema, y conducción superficial anómala, relacionada con los movimientos de carga tangenciales que se producirían entre el plano de deslizamiento y la superficie de la partícula, es decir, en la capa de Stern.

La teoría electrocinética de Dukhin y Semenikhin (23) es la única que considera un caso particular de conducción superficial anómala asociada con la existencia de una capa iónica límite. En este trabajo hemos intentado comprobar si estas teorías sobre el comportamiento de una doble capa en movimiento bajo la influencia de un campo eléctrico explican de modo adecuado el comportamiento electrocinético de las partículas de poliestireno cargadas positivamente. Para ello vamos a prestar especial atención a la conversión de los datos de movilidad electroforética en valores de potencial ζ para diferentes concentraciones de electrolito, pues como ya hemos mencionado anteriormente, es en esta particular situación donde surge la controversia entre las diferentes teorías electrocinéticas.

Si examinamos la literatura referente a este tema podemos observar que, hasta ahora, la mayoría de los experimentos electrocinéticos encaminados a discernir la estructura de la doble capa en movimiento se han realizado con partículas cargadas negativamente, mientras que se ha prestado poca atención a las cargadas positivamente (6,29). Esto es así a pesar de la evidencia experimental existente que demuestra que el comportamiento electrocinético de los látexes catiónicos es diferente al de los aniónicos (17).

Aunque en el Apéndice III se encuentran desarrolladas con todo detalle las teorías electrocinéticas antes mencionadas, y en particular las que nosotros vamos a utilizar para la conversión de los datos de movilidad en potencial ζ , en este capítulo vamos a hacer un pequeño resumen de la formulación que vamos a utilizar posteriormente en el análisis y discusión de los resultados obtenidos.

Cuando una partícula cargada que se encuentra suspendida en una disolución es sometida a un campo eléctrico estático, ésta adquiere rápidamente una velocidad constante cuyo módulo dividido por el valor del campo aplicado es lo que denominamos movilidad electroforética. En

esta situación la suma de todas las fuerzas que actúan sobre la partícula debe de ser igual a cero. Dos son las fuerzas que actúan directamente sobre la partícula: la primera es de naturaleza eléctrica, y es debida al efecto del campo aplicado sobre las cargas situadas en la superficie (\vec{F}_e); la segunda procede del flujo de líquido de la disolución en movimiento relativo con respecto a la superficie de la partícula (\vec{F}_u). A valores de κa de aproximadamente 1, donde κ es la inversa del grosor de la doble capa eléctrica y a el radio de la partícula, es decir, cuando el tamaño de la esfera es similar al de la doble capa, la movilidad electroforética μ_e se ve disminuida por dos efectos que se suman a las fuerzas anteriores. Uno es el denominado retardo electroforético, causado por el hecho de que una partícula cargada de un signo tiene una nube iónica que la rodea de signo contrario. Es evidente entonces que el campo eléctrico ejercerá una fuerza sobre estos iones también de signo contrario a la ejercida sobre la partícula, y ésta será transferida a las moléculas de solvente que hidratan dichos iones. El resultado es un flujo de disolución que provocará una fuerza retardadora sobre la esfera. Como consecuencia también de este desplazamiento de la atmósfera iónica, cuyo centro quedará ahora desplazado con respecto al centro de carga de la partícula en movimiento, se producirá una nueva fuerza retardadora que intentará restablecer la posición de ambos centros de carga. Este es el denominado efecto de relajación.

Si llamamos \vec{K}_1 a la fuerza eléctrica que actúa sobre la partícula cargada, \vec{K}_2 a la fuerza de resistencia del líquido viscoso al movimiento de la partícula, \vec{K}_3 a la fuerza procedente del efecto de retardo electroforético, y \vec{K}_4 a la debida al efecto de relajación, entonces:

$$\vec{F}_e = \vec{K}_1 + \vec{K}_4 ; \quad \vec{F}_u = \vec{K}_2 + \vec{K}_3$$

$$\vec{F}_e + \vec{F}_u = \vec{K}_1 + \vec{K}_2 + \vec{K}_3 + \vec{K}_4 = 0 \quad [3.1]$$

Puesto que el término resistente \vec{K}_2 puede ser expresado mediante la fórmula de Stokes, proporcional a la velocidad de desplazamiento, tendremos:

$$\vec{U}_{of} = (6\pi\eta a)^{-1} (\vec{K}_1 + \vec{K}_3 + \vec{K}_4) \quad [3.2]$$

Como han demostrado Dukhin y col. (14), para calcular la movilidad electroforética, μ_e , es suficiente con determinar la dependencia radial de la componente asimétrica de la distribución de potencial en el espacio, $R(r)$:

$$\mu_e = \frac{\varepsilon}{6\pi\eta} \int_{-\infty}^a \left[\frac{R}{r} \frac{d\phi_{eq}}{dr} - 2r \int_{-\infty}^r \left(\frac{1}{r^2} \frac{dR}{dr} - \frac{R}{r^3} \right) \frac{d\phi_{eq}}{dr} dr \right] dr \quad [3.3]$$

donde η es la viscosidad, ε la constante dieléctrica del medio, y ϕ_{eq} la distribución de potencial inicial cuando la doble capa eléctrica se encuentra en equilibrio.

La dificultad matemática de la Ecuación [3.3] radica básicamente en la existencia de términos no lineales en las Ecuaciones referentes a la transferencia iónica. Con el propósito de solventar esta dificultad, la distribución de potencial en el espacio se expresa en forma de serie de potencias del parámetro adimensional $e\zeta/kT$ (también denominado potencial zeta adimensional, $\tilde{\zeta}$). En la teoría de Overbeek-Both solamente el primer término de esta serie es tenido en cuenta. De acuerdo con esta teoría, la movilidad electroforética adimensional, μ_e , para un electrólito simétrico puede escribirse en la forma:

$$\tilde{\mu}_e = \tilde{\zeta} f_1(\kappa a) - \tilde{\zeta}^3 \left[z^2 f_3(\kappa a) + \frac{m^+ + m^-}{2} f_4(\kappa a) \right] \quad [3.4]$$

donde

$$m^\pm = \frac{\varepsilon}{6\pi\eta D^\pm} \left(\frac{kT}{e} \right)^2 \quad [3.5]$$

La Ecuación [3.4] puede ser representada en forma generalizada por la expresión:

$$\tilde{\mu}_e = \tilde{\zeta} F(\kappa a, \tilde{\zeta}) \quad [3.6]$$

Wiersema (28) comprobó si estas expresiones daban unos resultados acordes con los datos experimentales numéricos y gráficos, y señala que cuando κa tenía un valor comprendido entre $2 < \kappa a < 50$, las diferencias estaban en torno al 20%. Siguiendo la teoría de Overbeek, Wiersema resolvió el problema utilizando métodos numéricos. El programa de cálculo ha sido posteriormente mejorado por O'Brien y White (11), siendo evidente que el uso de este programa facilita enormemente la tarea de la conversión de datos de movilidad electroforética en potencial ζ , que tradicionalmente se realizaba interpretando las tablas de Wiersema.

O'Brien y White han demostrado que la interpretación del fenómeno de la electroforesis es más sencillo si se divide en dos problemas más simples: la fuerza requerida para mover la

partícula con una determinada velocidad en ausencia de campo eléctrico y la fuerza requerida para mantener la partícula inmóvil cuando se aplica un campo eléctrico a la disolución. En el Apéndice III se encuentra más desarrollada la interpretación de estos autores y comentadas algunos de sus resultados.

En cualquier caso, todos los desarrollos teóricos hasta aquí citados para el problema de la conversión de datos de movilidad electroforética en potencial zeta suponen la ausencia de un mecanismo de conducción iónica en el interior del plano de deslizamiento. Para poder incorporar este fenómeno a la interpretación teórica de la electroforesis, Dukhin y Semenikhin (23) desarrollaron una ecuación para relacionar la movilidad electroforética adimensional de una partícula con la estructura eléctrica de la doble capa en la que no sólo intervenía el potencial ζ adimensional como en los otros desarrollos, sino que también incorporaba el potencial difuso adimensional, $\tilde{\Psi}_d$. Para el caso de una partícula esférica, la movilidad electroforética adimensional vendría dada por la siguiente expresión:

$$\mu = \frac{3}{2}\zeta - \frac{3}{2} \frac{\zeta [4(1+3m) \sinh^2(\zeta/4) + 2g_1] + [2(1+3m) \sinh(\zeta/2) - 3m\zeta + 2g_2] 4 \ln \cosh(\zeta/4)}{\kappa a + 8(1+3m) \sinh^2(\zeta/4) - 24m \ln \cosh(\zeta/4) + 4g_1} \quad [3.7]$$

donde

$$g_1 = p (\cosh (\tilde{\Psi}_d/2) - \cosh (\zeta/2))$$

$$g_2 = p (\sinh (\tilde{\Psi}_d/2) - \sinh (\zeta/2)) \quad [3.8]$$

siendo p la razón entre los coeficientes de difusión de los contraiones cerca de la pared y en el seno de la disolución, y m el coeficiente iónico de arrastre definido en la Ecuación [3.5]. En el caso de que tanto el potencial ζ adimensional como el potencial difuso $\tilde{\Psi}_d$ adimensional tengan valores elevados, como es el caso de nuestros látexes catiónicos altamente cargados, la Ecuación [3.7] puede simplificarse en la forma:

$$\tilde{\mu}_e = \frac{3}{2}\zeta \frac{1+R_{e1}}{1+2R_{e1}} \quad [3.9]$$

$$R_{el} = \frac{\lambda_s}{\lambda a} = \frac{\exp\left(\frac{\Psi_d}{2}\right) + 3m \exp\left(\frac{\zeta}{2}\right)}{\kappa a} \quad [3.10]$$

donde λ es la conductividad específica de la disolución, y λ_s es la conductividad superficial.

Dukhin (14) introdujo el parámetro de relajación adimensional R_{el} , como una medida del efecto de conducción superficial en el fenómeno de la electroforesis. Hay que hacer notar que este parámetro puede utilizarse con dos interpretaciones diferentes: una sería como un indicativo del grado de polarización en superficies cerradas (estado de no-equilibrio) y otra sería como una medida de la contribución relativa de la conducción superficial a la conducción total en sistemas no polarizados (estado de equilibrio). Un aumento de la conducción superficial y/o un descenso en el radio traen como consecuencia un aumento en el valor del parámetro R_{el} , y por tanto en el campo de polarización en la dirección de la corriente de electromigración inducida.

Los flujos iónicos tangenciales inducidos cerca de la superficie y causantes de esta conducción superficial se deben, según la teoría de Dukhin, a procesos de migración iónica radial y a flujos de difusión y de convección de iones desde la parte externa de la doble capa eléctrica, donde la concentración de co-iones y contraiones difiere notablemente de la que tienen cerca de la superficie. Contrariamente a los desarrollos matemáticos empleados por Overbeek, Booth y Wiersema, la principal ventaja del método utilizado por Dukhin y Semenikhin es la posibilidad de tener en cuenta el efecto producido por la conducción anómala superficial en la polarización de la doble capa.

Como resumen de la teoría de Dukhin y Semenikhin podemos decir que ésta asume, al igual que las teorías anteriores, que los iones situados entre la superficie y el plano interior de Helmholtz (capa de Stern), no contribuyen a la conducción eléctrica superficial, y que la ecuación de Boltzmann se puede utilizar para la distribución de iones y de potencial en la parte difusa de la doble capa siempre que se tengan en cuenta los fenómenos de polarización de ésta. La diferencia con las otras teorías estriba en la suposición de que los iones situados entre el plano interior de Helmholtz y el plano de deslizamiento conducen corriente, y esta conducción superficial anómala es la que reduce enormemente la movilidad electroforética de una partícula para un determinado valor del potencial ζ .

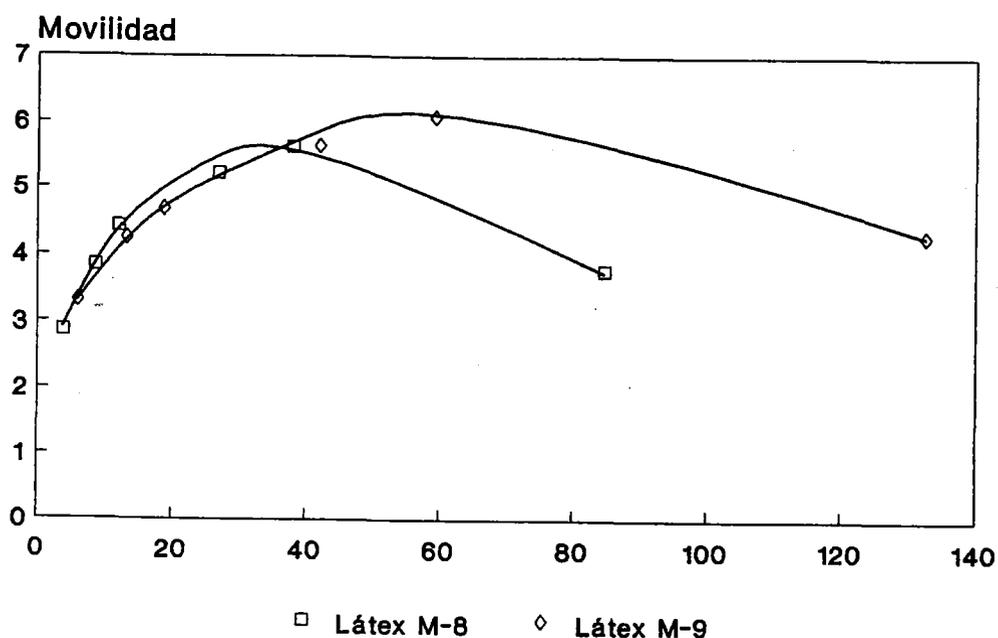


Fig. 3.31 *Movilidad electroforética de los látexes catiónicos en función del radio electrocinético.*

En la Figura 3.31 hemos representado la movilidad electroforética de los látexes catiónicos M-8 y M-9 en función del radio electrocinético κa . El pH de las suspensiones se mantuvo constante ($\text{pH} \approx 6$) y el electrólito utilizado para variar el radio electrocinético fue KBr.

Como ya se señaló anteriormente, la característica que más sobresale en esta Figura es, sin lugar a dudas, el hecho de que el látex que presenta mayor movilidad electroforética sea el que tiene menor densidad de carga superficial. Este comportamiento anómalo de la interfase látex - solución acuosa, observado igualmente en el caso de los látexes aniónicos, ha sido indicado por algunos autores (8) como otra consecuencia del mecanismo de conducción anómala en la superficie de las partículas, el cual aumentaría conforme lo hace la densidad de carga superficial de acuerdo con la ecuación de Bikerman (5). Van der Linde y Bijsterbosch (25) han llegado incluso a señalar que esta conducción anómala superficial es inherente a la estructura de la doble capa que rodea las partículas de látex, y que es especialmente importante cuando la concentración de electrólito o el radio electrocinético son pequeños.

Podemos ver que las curvas $\mu_e \kappa a$ de estos látexes pasan por un máximo para valores de κa de aproximadamente 40 para el caso del M-8 y de 60 para el M-9. Como ha sido señalado por

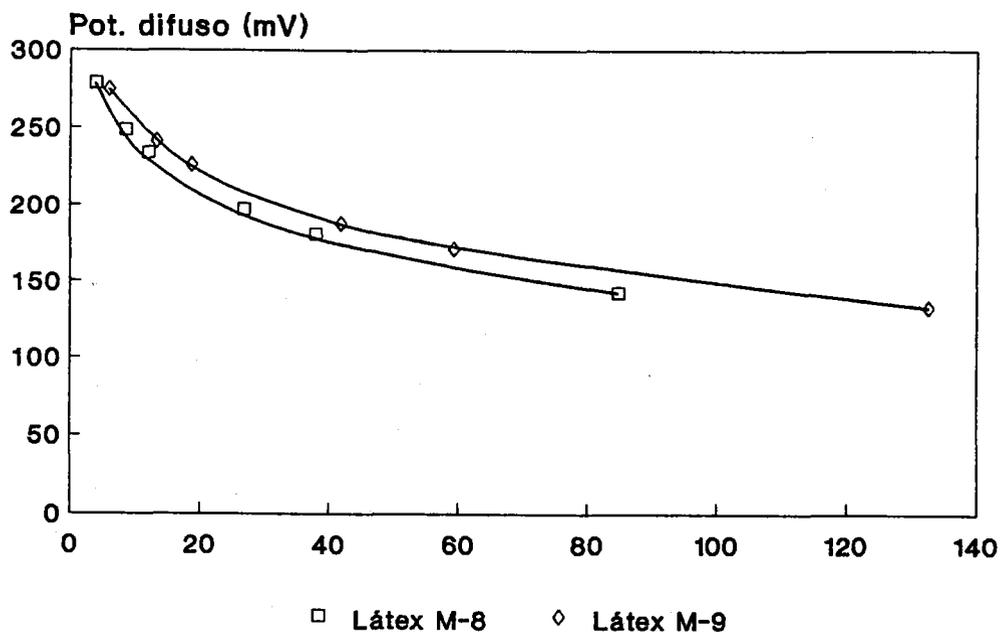


Fig. 3.32 *Potencial difuso de los látexes catiónicos en función del radio electrocinético.*

Baran y col. (9), es posible relacionar el aumento de la movilidad electroforética que ocurre a la izquierda del máximo en las curvas $\mu_e \kappa a$ al aumentar el radio electrocinético con un aumento en la carga de la partícula como consecuencia de la adsorción de co-iones sobre su superficie. Este fenómeno, del que ya habíamos hablado en la Sección anterior ha sido sugerido también por Elimelech y O'Melia (10) como una explicación al aumento de densidad de carga superficial encontrada en los látexes aniónicos cuando la fuerza iónica es baja. De acuerdo con estos autores, el acercamiento de co-iones hacia las proximidades de la superficie hidrofóbica de las partículas de látex no sería un proceso específico por el que los iones serían quimiadsorbidos sobre sitios determinados de la superficie. Por el contrario, los mecanismos responsables de este fenómeno y la influencia que sobre él tienen las características superficiales de la partícula o los grupos funcionales que aportan la carga permanece aún desconocida.

Partiendo de los valores encontrados para la densidad de carga superficial de estos látexes, σ_0 , y suponiendo una estructura difusa de la doble capa eléctrica que rodea la partícula, podemos calcular los valores de $\psi_d \approx \psi_0$ utilizando la fórmula de Baran (9) que incluye una corrección para la curvatura de la superficie.

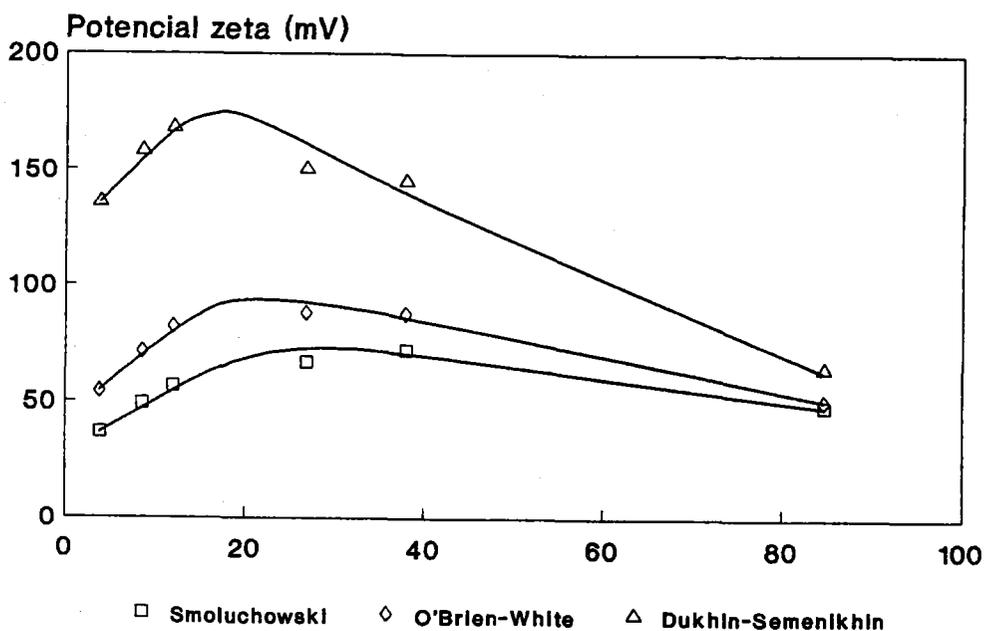


Fig. 3.33 Potencial ζ del látex M-8 en función del radio electrocinético.

$$\sigma_d = \left(\frac{2\epsilon n k T}{\pi} \right)^{1/2} \left[\sinh \frac{\Psi_d}{2} + \frac{2}{\kappa a} \tanh \frac{\Psi_d}{4} \right] \quad [3.11]$$

En la Figura 3.32 hemos representado la variación del potencial difuso Ψ_d con el radio electrocinético para ambos látexes, y podemos observar que, como era de esperar, este potencial disminuye continuamente conforme aumenta el radio electrocinético de la partícula.

De los diferentes desarrollos teóricos que existen para convertir los datos de movilidad electroforética en potencial ζ nosotros hemos elegido la ecuación clásica de Smoluchowski, la teoría de O'Brien y White (11), cuyo cálculo se realiza mediante un programa de ordenador, y la de Dukhin y Semenikhin (23), Ecuaciones [3.9] y [3.10]. En las Figuras 3.33 y 3.34 están representados estos tres potenciales, ζ_{sm} , ζ_{O-W} y ζ_{D-S} en función del radio electrocinético para los látexes M-8 y M-9, respectivamente. Podemos ver que los potenciales calculados de acuerdo con las teorías que tienen en cuenta los fenómenos de la polarización de la doble capa, es decir, las de O'Brien-White y Dukhin-Semenikhin, tienen valores muy superiores a los calculados según la ecuación clásica de Smoluchowski, sobre todo cuando el radio electrocinético es pequeño.

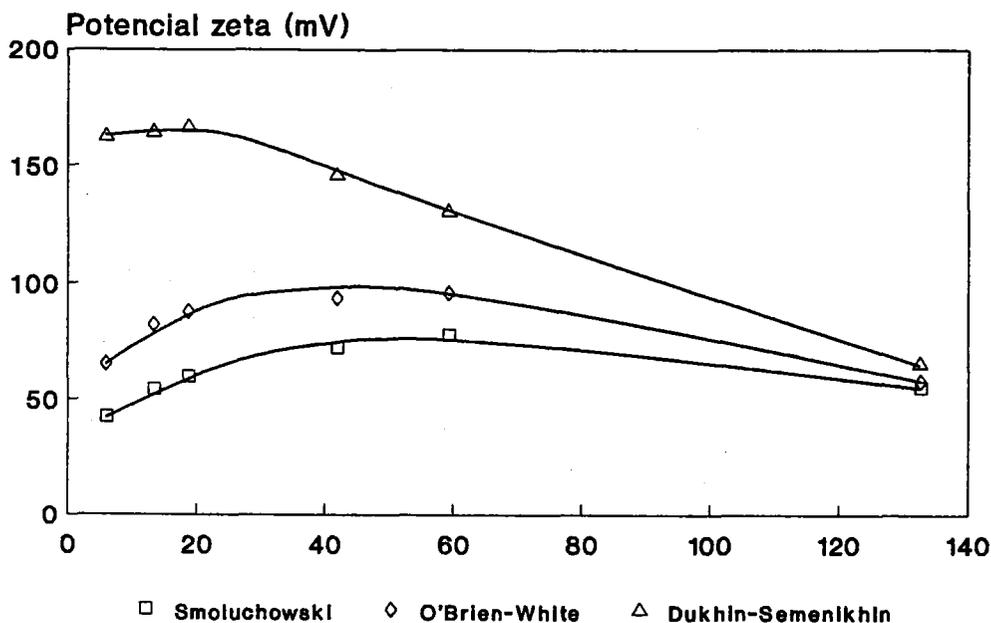


Fig. 3.34 Potencial ζ del látex M-9 en función del radio electrocinético.

Como era de esperar por la propia naturaleza del fenómeno de la polarización, estas diferencias disminuyen conforme el radio electrocinético se va haciendo mayor, o sea, conforme la doble capa se va haciendo más delgada.

La diferencia más destacada, sin embargo, es la que existe entre el potencial ζ_{D-S} y el potencial ζ_{O-W} , que tenemos que explicar sobre la base de que en la primera teoría, la de Dukhin y Semenikhin, se tiene en cuenta la contribución a la polarización de la doble capa no sólo de los iones de la parte difusa, sino también de los internos al plano de deslizamiento, mientras que la de O'Brien y White sólo incluye la debida a los iones situados en la parte hidrodinámicamente móvil de la doble capa. A la vista de los resultados tenemos que deducir que la influencia de esta conducción superficial anómala es muy importante, y para el caso del látex M-9, menos cargado en su superficie, podemos ver que el máximo en la curva de potencial ζ_{D-S} llega casi a desaparecer. Cálculos similares realizados también con látexes catiónicos pero de menor densidad de carga superficial (29) han demostrado que efectivamente este máximo desaparece cuando se utiliza la teoría de Dukhin-Semenikhin en la conversión de datos de movilidad electroforética en potencial ζ , por lo que podemos llegar a la conclusión de que presumiblemente es el fenómeno de la conducción superficial anómala el responsable de éste

máximo en las curvas de movilidad, pero que la teoría no está aún del todo desarrollada para el caso de látexes pequeños con una alta densidad de carga en su superficie y $\kappa a < 30$. Este sería el caso del látex M-8, con un tamaño de 231 nm y una carga de $20.1 \mu\text{C}/\text{cm}^2$. Como podemos ver en la Figura 3.33, el máximo de potencial ζ sigue apareciendo incluso al aplicar la teoría de Dukhin y Semenikhin.

El cálculo del potencial ζ de acuerdo con esta teoría que tiene en cuenta el fenómeno de conducción superficial anómalo requiere del conocimiento del potencial difuso ψ_d que, como ya hemos indicado, se ha calculado basándonos en la densidad superficial de carga, σ_0 (Ecuación [3.11]). Un importante resultado que se obtiene de estos cálculos es el hecho de que los valores del potencial ζ , incluso corregidos por la polarización de la doble capa, son menores que el potencial difuso ψ_d en todo el rango de radios electrocinéticos. Esto puede deberse a la formación de una capa de líquido en la superficie de la partícula de látex con poca movilidad hidrodinámica, en la que sin embargo los iones mantendrían su capacidad de polarización (29). El espesor de esta capa, Δ , puede estimarse a partir de una conocida relación de la teoría de la doble capa eléctrica difusa (24):

$$\tanh\left(\frac{\zeta}{4}\right) = \tanh\left(\frac{\psi_d}{4}\right) \exp(-\kappa\Delta) \quad [3.12]$$

Un cálculo basado en esta Ecuación con los valores encontrados para nuestros látexes del potencial difuso ψ_d y el ζ_{D-S} nos muestra que el grosor de esta capa de agua con baja movilidad hidrodinámica disminuye desde alrededor de 40 hasta 5 Å cuando el radio electrocinético aumenta desde 4 hasta 130. En comparación con los valores encontrados por otros autores (9, 30) para látexes aniónicos, nuestros látexes catiónicos tienen una policapa de agua de mayor espesor alrededor de las partículas.

Es también posible que el hecho de que el potencial difuso ψ_d obtenido por nosotros resulte mayor que el potencial ζ_{D-S} sea una consecuencia de la rugosidad de la superficie de las partículas de látex. Recientemente, Chow y Takamura (18) encontraron que el máximo en la movilidad electroforética puede deberse a esta rugosidad en las partículas de poliestireno cargadas negativamente, ya que esto resultaría en un desplazamiento hacia el exterior del plano de deslizamiento, y por tanto en un valor más bajo del potencial ζ . Con objeto de comprobar esta hipótesis, estos autores modificaron la superficie de un látex negativo calentándolo por encima de su temperatura de transición vítrea. Los resultados obtenidos al medir su movilidad

electroforética en función de la concentración para varios electrolitos indicaban que los valores de μ_e aumentaban a fuerzas iónicas bajas, confirmando el decisivo papel jugado por la rugosidad de la superficie en la estructura de la doble capa que rodea una partícula cargada. Es bastante difícil sin embargo relacionar cuantitativamente el mecanismo de conducción anómala antes descrito con la rugosidad de la superficie de la partícula.

Midmore y Hunter (8) han indicado que la explicación más posible para el problema del máximo de movilidad electroforética en función de la concentración de electrolito debe ser una combinación de los fenómenos encontrados. Efectivamente, conforme el radio electrocinético disminuye, el plano de deslizamiento se aleja de la superficie, lo que redundaría en dos efectos simultáneos: primero, disminuiría el potencial ζ en la forma normal, y segundo, disminuiría la movilidad electroforética en un porcentaje mucho mayor al introducir conducción iónica en el interior del plano de deslizamiento. Esta conducción anómala es la que se ha tenido en cuenta al utilizar las Ecuaciones [3.9] y [3.10] en el cálculo del potencial ζ_{D-S} , y efectivamente hemos visto en la Figura 3.34 que para densidades de carga no muy altas (látex M-9) este máximo casi desaparece (para densidades de carga menores, el máximo desaparece completamente, ref. 29). Esto demuestra que la teoría de no-equilibrio desarrollada por Dukhin (14,23) es la más adecuada para el cálculo del potencial ζ en coloides modelo de poliestireno. Debemos de hacer notar, sin embargo, que Mangelsdorf y White (31) han revisado y extendido recientemente la teoría de O'Brien y White, modificando las ecuaciones que gobiernan la distribución de iones, el potencial electrostático y el flujo hidrodinámico alrededor de la partícula, y teniendo en cuenta el movimiento lateral de los iones en el interior de la capa de Stern. La aplicabilidad de este nuevo desarrollo teórico para calcular el potencial ζ de coloides modelo de poliestireno será objeto de próximas investigaciones.

3.6 REFERENCIAS

- (1) Galisteo González, F., de las Nieves López, F.J., Cabrerizo Vilchez, M. e Hidalgo Alvarez, R., *Progr. Colloid Polym. Sci.* **82**, 313 (1990).
- (2) Galisteo González, F., Cabrerizo Vilchez, M. e Hidalgo Alvarez, R., *Colloid Polym. Sci.* **269**, 406 (1991).
- (3) Martín, A., Puig, J., Galisteo, F., Serra, J. e Hidalgo Alvarez, R., *Biocolloids and Biosurfaces* (en prensa).

- (4) Blaakmeer, J. y Fleer, G.J., *Colloids and Surfaces* **36**, 439 (1989).
- (5) Bikerman, J., en *Colloid Science II*, Ed. H.R. Kruyt, Elsevier Publishing Co. (1949).
- (6) Hidalgo Alvarez, R., de las Nieves, F.J., Van der Linde, A.J. y Bijsterbosch, B.J., *Colloids and Surfaces* **21**, 259 (1986).
- (7) Brouwer, W.H. y Zsom, R.L.J., *Colloids and Surfaces* **24**, 195 (1987).
- (8) Midmore, B.R. y Hunter, R.J., *J. Colloid Interface Sci.* **122** (2), 521 (1988).
- (9) Baran, A.A., Dubkina, L.M., Soboleva, N.M. y Chechic, O.S., *Kolloidn Zh.* **43**, 211 (1981).
- (10) Elimelech, M. y O'Melia, Ch., *Colloids and Surfaces* **44**, 165 (1990).
- (11) O'Brien, R.W. y White, L.R. *J. Chem. Soc., Faraday Trans II* **74**, 1607 (1978).
- (12) Lyklema, J., *J. Colloid Interface Sci.* **58** (2), 242 (1977).
- (13) Hidalgo Alvarez, R., *Adv. Colloid Interface Sci.* **34**, 217 (1991).
- (14) Dukhin, S.S. y Derjaguin, B.V., en *Surface and Colloid Science Vol. 7*, pg 1 (1974).
- (15) Dukhin, S.S. y Semenikhin, N.M., *Kolloidn. Zh.* **31**, 36 (1970).
- (16) Dukhin, S.S., *Spec. Discuss. Faraday Soc.* **1**, 158 (1970).
- (17) Bonekamp, B.C., Hidalgo Alvarez, R., de las Nieves, F.J. y Bijsterbosch, B.J., *J. Colloid Interface Sci.* **118**, 366 (1987).
- (18) Chow, R.S. y Takamura, K., *J. Colloid Interface Sci.* **125** (2), 226 (1988).
- (19) Chonde, Y. y Krieger, I.M., *J. Colloid Interface Sci.* **77** (1), 138 (1980).
- (20) Maron, S.H., Turnbull, D. y Elder, M.E., *J. American Chem. Soc.* **70** (1), 582 (1948).
- (21) Van de Ven, T.G.M., Dabros, T y Czarnecki, J., *J. Colloid Interface Sci.* **93** (2), 580 (1983).
- (22) Zukosky, C.F. y Saville, D.A., *J. Colloid Interface Sci.* **107** (2), 322 (1985).
- (23) Semenikhin, N.M., y Dukhin, S.S., *Kolloidn Zh.* **37**, 1127 (1975).
- (24) Hunter, R.J., en *Zeta Potential in Colloid Science*, Eds. R.H. Ottewill y R.L. Rowel, Nueva York (1974).
- (25) Van der Linde, A.J. y Bijsterbosch, B.H., *Croatica Chimica Acta*, en prensa.
- (26) Overbeek, J.Th.G., *Kolloidchem. Beih.* **54**, 287 (1943).
- (27) Booth, F., *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser. A **203**, 514 (1950).
- (28) Wiersema, P.H. en *On the Teory of Electrophoresis*, Rijkuniversiteit, Utrecht, Paises Bajos (1964).
- (29) Moleón Baca, J.A., Rubio Hernández, F.J., de las Nieves López, F.J. e Hidalgo Alvarez, R., *J. Non-Equilib. Thermodyn.* **16**, 187 (1991).

- (30) Chabalgoity, A., Martín, A., Galisteo, F., Hidalgo, R., *Prog. Colloid Polym. Sci.* **84**, 416 (1991).
- (31) Mangelsdorf, Ch. S. y White, L.R., *J. Chem. Soc. Faraday Trans* **86**, 2859 (1990).

CAPITULO 4

ADSORCION DE IgG

- 4.1 INTRODUCCION**
- 4.2 MATERIALES Y METODOS**
- 4.3 ESTRUCTURA DE LA IgG**
- 4.4 EL SISTEMA ANTES DE LA ADSORCION**
- 4.5 EL SISTEMA DESPUES DE LA ADSORCION**
- 4.6 ADSORCION DE IgG POLICLONAL**
- 4.7 ADSORCION DE IgG MONOCLONAL**
- 4.8 REFERENCIAS**



CAPITULO 4

ADSORCION DE IgG

4.1 INTRODUCCION

El estudio de la adsorción de moléculas de inmunoglobulina-G (IgG) sobre sustratos poliméricos coloidales tiene un interés muy especial en el campo del diagnóstico médico por cuanto que el sistema látex-IgG se puede considerar como un amplificador de la reacción antígeno-anticuerpo, y es por tanto un eficaz instrumento en la detección de ciertas enfermedades que pueden ponerse de manifiesto gracias a esta reacción antigénica. Las principales ventajas de este método de inmunodiagnóstico son la rapidez de ejecución, el bajo precio de los reactivos y la comodidad de observar el resultado por visualización directa o por análisis con un sistema óptico de lectura (espectrofotómetro, nefelómetro, etc.).

El primer trabajo publicado sobre la aplicación en sistemas de inmunodiagnóstico clínico de la adsorción de moléculas de IgG sobre la superficie de partículas poliméricas se debe a Singer y Plotz en 1.956 (1). Este reactivo se fundamenta básicamente en la adsorción física sobre la superficie de un coloide polimérico de anticuerpos específicos contra el antígeno buscado, la estabilización coloidal del complejo látex - proteína formado, la mezcla de éste con el suero sanguíneo del paciente al que se desea determinar la prueba, y la comprobación de si se ha producido agregación en dicho látex (Fig. 4.1.a). Si el resultado es positivo, es decir, si el suero del paciente contiene el antígeno en cuestión, este se unirá de modo muy específico a las moléculas de anticuerpo unidas a la superficie de las partículas, formando puentes entre ellas y provocando su coagulación. El aspecto uniforme del látex, antes estable coloidalmente, se convierte ahora en una solución acuosa transparente con flóculos blancos de látex que denotan la presencia del antígeno buscado en el suero del paciente.

De igual modo se puede realizar el procedimiento inverso, es decir, se une el antígeno a la superficie del látex y se evalúa entonces la presencia o no en el suero del paciente de un anticuerpo específico contra dicho antígeno (Fig. 4.1.b). Si se produce la agregación del complejo látex-antígeno quiere decir que la concentración de este anticuerpo es bastante alta, e implicaría posiblemente una fase aguda de la infección provocada por este antígeno.

Los principales problemas que se encuentran en este tipo de sistemas de inmunodiagnóstico es la sensibilidad (es decir, la cantidad mínima de antígeno que son capaces de detectar) y la

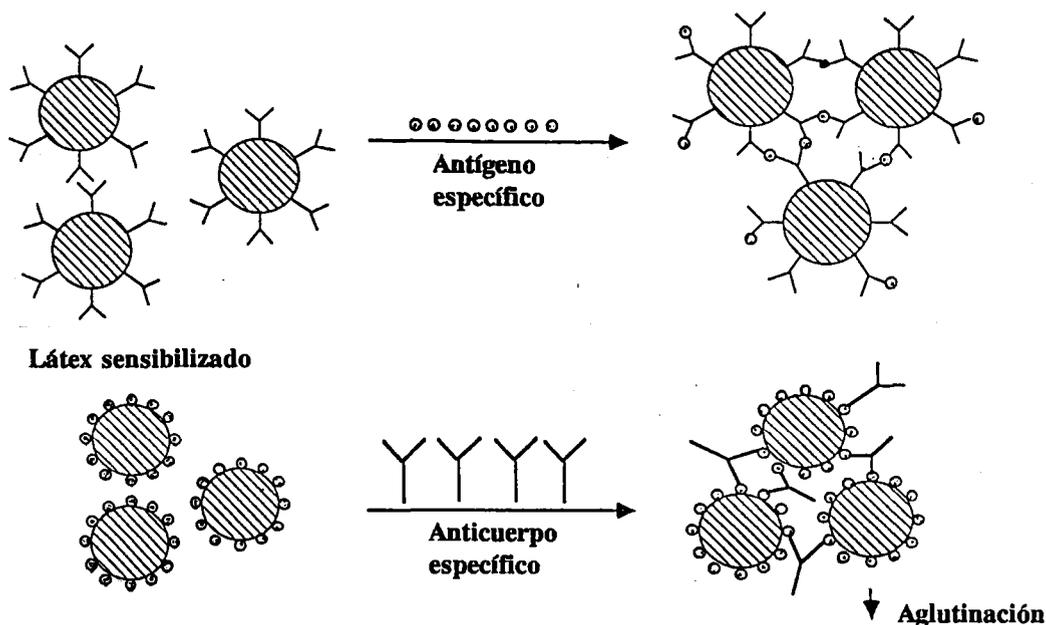


Fig. 4.1 Representación esquema de los ensayos de aglutinación de látex.

falta de una especificidad muy alta (el sistema puede coagular a causa de factores diferentes del antígeno en cuestión).

El primer problema, el de la sensibilidad, se debe principalmente al hecho de que la superficie de las partículas no está recubierta por completo de moléculas de anticuerpo, ya que, como explicaremos más adelante en la discusión de los resultados experimentales, si así fuera este complejo látex-IgG no soportaría las condiciones fisiológicas del suero sanguíneo (154 mM de fuerza iónica y pH aproximado de 7), y flocularía sin necesidad de que se produjera la reacción antígeno-anticuerpo. En consecuencia, parte de la superficie de la partícula debe de estar recubierta por otra macromolécula con un punto isoeléctrico lejano de la neutralidad, de modo que a pH 7 esté eléctricamente cargado e impida la floculación del complejo. Es evidente que este requisito restará sensibilidad al producto final, y uno de nuestros propósitos será precisamente el estudiar las condiciones en las que se pueda conseguir un máximo recubrimiento de moléculas de anticuerpo manteniendo un alto grado de estabilidad.

El segundo problema, el de la especificidad, se produce a causa de reacciones del anticuerpo con sustancias diferentes del antígeno buscado, pero a las que éste reconoce por tener en alguna parte de su estructura una configuración molecularmente similar a la del epítipo (zona del

antígeno que el anticuerpo reconoce y a la que se une de modo específico) o simplemente por algún tipo de reacción inespecífica. Este problema, por tanto, corresponde a la preparación de las moléculas de inmunoglobulina, y debe estudiarse desde un punto de vista bioquímico.

En este capítulo vamos a intentar profundizar en los mecanismos envueltos en la adsorción física de moléculas de inmunoglobulina sobre la superficie de partículas de poliestireno, tanto aniónico como catiónico, así como de látex copolimerizado con estireno y ácido acrílico. Las muestras de IgG que vamos a estudiar son de dos tipos:

- IgG policlonal de conejo, con un punto isoeléctrico (pI) que varía en un rango de 6.1 a 8.7. Esta es la fracción completa de inmunoglobulinas-G del suero de conejo, y puesto que el animal no ha sido previamente infectado no son inmunes frente a ningún antígeno específico.
- IgG monoclonal de ratón, obtenida a partir de ascitis y con dos muestras diferentes: una de pI ligeramente ácido, entre 5.5 y 5.8, y otra de pI ligeramente básico, entre 7.6 y 7.8.

Con el primer tipo de IgG estudiaremos de modo general la adsorción de estas moléculas sobre la superficie de las partículas, prestando especial atención a los mecanismos que puedan gobernar esta unión (electrostáticos, hidrofóbicos, específicos, etc.) y la estructura del complejo formado. En particular, vamos a estudiar el comportamiento electrocinético de estos complejos, e intentaremos discernir como varían las propiedades y la estructura de la doble capa eléctrica en torno a estas partículas.

Puesto que la muestra de IgG policlonal preinmune es en realidad una mezcla heterogénea de moléculas de anticuerpo, con diferentes propiedades físicas y químicas como demuestra la variedad de puntos isoeléctricos que pueden presentar, podría pensarse que no son un sistema ideal para el estudio básico de la adsorción de este tipo de proteínas. Sin embargo, el interés principal que presenta este estudio se debe al hecho de que numerosos tests de inmunodiagnóstico clínico se hacen hoy día mediante la adsorción del conjunto de inmunoglobulinas-G del suero de un animal previamente infectado con el antígeno que se desea reconocer en la prueba clínica. De esta forma, aunque habrá moléculas de IgG que no reconocerán al antígeno, habrá muchas que lo reconozcan por diferentes epítopos, y se ganará

así en sensibilidad del reactivo. Además, es un método mucho más barato que la obtención de anticuerpos monoclonales, lo que redundará en un menor coste de cada prueba clínica.

Con las muestras de IgG monoclonal haremos un estudio más profundo de la influencia que tiene sobre el fenómeno de la adsorción el estado eléctrico de la proteína, ya que al tener ésta un punto isoeléctrico determinado, mediante la variación del pH del medio de adsorción se puede valorar la contribución electrostática de la molécula, y con el uso de látexes aniónicos y catiónicos la influencia de la carga eléctrica en la superficie de las partículas.

Al igual que con la IgG policlonal, los complejos formados por la adsorción de IgG monoclonal sobre la superficie de los látexes serán estudiados desde un punto de vista electrocinético y coloidal, intentando determinar cuáles son las mejores condiciones para el mantenimiento de la estabilidad de estos sistemas.

4.2 MATERIALES Y METODOS

Todos los reactivos usados en este estudio han sido de grado analítico, y se han utilizado sin una posterior purificación. El agua usada en todos los experimentos era doblemente destilada y desionizada con un sistema de purificación Milli-Q de Millipore.

Los látexes utilizados en estos experimentos han sido ya descritos en el capítulo dedicado a la síntesis de los látexes, aunque en la Tabla 4.1 están resumidas sus características más importantes.

Tabla 4.1 *Látexes utilizados en los experimentos de adsorción.*

| Látex | Tamaño (nm) | σ_0 ($\mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$) | Grupo funcional |
|-------|-------------|-------------------------------------------------|-----------------|
| M-8 | 231 ± 4 | 20.1 ± 0.5 | Amidino |
| R-P | 297 ± 3 | 6.9 ± 0.2 | Sulfato |
| CC-2 | 210 ± 5 | 31.0 ± 0.9 | Carboxilo |

Las muestras de IgG, tanto policlonal como monoclonal, han sido generosamente cedidas por Biokit S.A. La IgG policlonal preinmune de conejo fue purificada a partir de suero normal de conejo mediante precipitación con sulfato amónico al 40%, seguido de un fraccionamiento mediante cromatografía de intercambio iónico en una columna de Q-Sepahrose a pH 6.5 (tampón PBK 30 mM, cloretone 0.5%). Su pureza fue comprobada mediante inmunolectroforesis usando el método descrito por Grabar y Williams (2) y mediante gel filtración en un sistema FPLC usando una columna de Superose 12 HR (Pharmacia) equilibrada en tampón fosfato 13 mM pH 7.2, conteniendo 0.14 M de NaCl y 0.1% de azida sódica como conservante. Esta muestra de IgG policlonal se guardó distribuida en alícuotas en el mismo tampón en el que se eluyó de la columna, congelado a -20°C. El día anterior a la realización de cada experimento se descongeló una alícuota y se dializó frente a 1 litro de agua bidestilada y desionizada durante 24 horas, realizando varios cambios del agua de diálisis.

Los anticuerpos monoclonales se obtuvieron a partir de ascitis de ratón. El anticuerpo monoclonal 1 (IgG m-1) es un isotipo IgG-1 dirigido contra el antígeno de superficie del virus de la Hepatitis-B (HBsAg), y fue purificado mediante precipitación con sulfato amónico al 40% seguido de fraccionamiento en una columna de cromatografía de intercambio iónico Q-Sepharose, igual que la IgG policlonal de conejo. El anticuerpo monoclonal 2 (IgG m-2) es un isotipo IgG-2a dirigido contra un lipopolisacárido componente de la membrana de una bacteria del tipo Chlamydia. Este anticuerpo se purificó mediante un gel de Proteína-A, y se conservó a -20°C.

Las concentraciones de proteína se midieron mediante lectura directa de la absorbancia a 280 nm, utilizando un coeficiente de extinción de 1.4 (absorbancia correspondiente a una disolución de 1 mg/ml de IgG en una cubeta de 1 cm de paso óptico). Cuando las concentraciones de proteína eran muy altas, se diluía previamente la muestra con agua destilada y después se multiplicaba la absorbancia por el factor de dilución. Todas las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Spectronic 601, de Milton-Roy.

Los puntos isoeléctricos de las preparaciones de IgG se determinaron mediante enfoque isoeléctrico en un equipo Phast-System de Pharmacia. El medio utilizado para el corrimiento eléctrico de las proteínas era un Phast Gel-1 de poliacrilamida (Pharmacia), que cubre un rango de pH entre 3 y 9. Los geles eran posteriormente tintados mediante el método del Coomassie Blue o con plata utilizando una modificación del método de Heukeshoven y Dernink (3). Tal y como había sido descrito en la literatura (4,5), el isoelectroenfoco de la muestra de IgG policlonal es bastante heterogéneo, presentando un rango de puntos isoeléctricos entre 6.1 y 8.7.

Las muestras de IgG monoclonal, por el contrario, tienen una banda bastante estrecha en el isoelectroenfoque, y sus puntos isoeléctricos varían entre 5.5 y 5.8 para el IgG m-1 y entre 7.6 y 7.8 para el IgG m-2.

En el Capítulo 3, dedicado a la caracterización electrocinética de los látexes utilizados en este trabajo, ya se trató con detalle el problema asociado al uso de tampones biológicos en suspensiones de partículas cargadas. El hecho de realizar los experimentos de adsorción de proteínas sobre la superficie del látex, tanto positivo como negativo, en diferentes condiciones de pH y fuerza iónica obligan a tener especial cuidado con el hecho de que ciertos aniones o cationes pueden adsorberse de modo específico sobre la superficie de este látex, variando las condiciones electrostáticas en la que se produce la adsorción de proteína y falseando por tanto los resultados. Los tampones que nosotros vamos a utilizar en nuestros experimentos son de uso generalizado en el manejo de soluciones protéicas a diferentes pHs, y su justificación electrocinética para cada tipo de látex utilizado en este trabajo se expone con detalle en el Capítulo anterior. En la Tabla 4.2 se encuentran enumerados los diferentes sistemas tamponadores usados para cada tipo de látex.

Los experimentos de adsorción de IgG se realizaron de modo estándar a una temperatura de $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ añadiendo 1 ml de una suspensión de látex de 20 mg/ml sobre 9 ml de una solución de IgG con una concentración variable entre 0 y 1250 mg/ml en los diferentes tampones. Las soluciones de IgG fueron agitadas suavemente antes y durante la adición del látex, y a continuación agitadas en un baño termostático durante las 2 horas que duraron los experimentos de adsorción. Transcurrido este tiempo, las muestras eran centrifugadas durante 1 hora a 18.000 r.p.m. en el rotor A8.24 de la centrifuga Centrikon de Kontron Instruments S.A. Se recogían entonces 7 ml del sobrenadante para analizar el contenido en proteína, y se desechaban los 3 ml restantes.

El precipitado obtenido, formado por el complejo látex-proteína, se resuspende en 4 ml del mismo tampón en el que se ha realizado la adsorción, sonicando durante 30 s si es necesario.

Esta suspensión se utilizará posteriormente para estudiar el comportamiento electrocinético de los complejos y su estabilidad coloidal.

Los sobrenadantes se filtraron a través de una membrana de policarbonato Nucleopore de $0.2 \mu\text{m}$ de diámetro de poro, despreciando los 3 primeros ml del filtrado. De esta manera se retiran las partículas o los agregados que pudieran permanecer en los sobrenadantes tras la centrifugación.

Tabla 4.2 *Tampones utilizados en los experimentos de adsorción.*

Látex catiónico

| pH | Tampón | Concentración (mM) | mg/l |
|----|----------|--------------------|------|
| 4 | Acetato | 13.5 | 811 |
| 5 | Acetato | 3.15 | 189 |
| 6 | Bis-Tris | 0.90 | 275 |
| 7 | Bis-Tris | 4.16 | 871 |
| 8 | Tris | 1.79 | 217 |
| 9 | Tris | 8.94 | 1083 |
| 10 | AMP | 2.99 | 376 |

Látex aniónico

| pH | Tampón | Concentración (mM) | mg/l |
|----|---------|--------------------|------|
| 4 | Acetato | 13.5 | 811 |
| 5 | Acetato | 3.15 | 189 |
| 6 | Fosfato | 1.79 | 247 |
| 7 | Fosfato | 1.13 | 156 |
| 8 | Borato | 15.0 | 927 |
| 9 | Borato | 5.14 | 328 |
| 10 | Borato | 2.20 | 136 |

Se mide entonces la absorbancia a 280 nm después de ajustar el espectrofotómetro a cero con el tampón usado en la sensibilización, y se calcula la cantidad adsorbida restando esta concentración de la obtenida al medir la solución de proteína antes de añadir el látex. Este procedimiento es básicamente el mismo que el descrito por Bagchi y Birnbaum (6).

Los experimentos de desorción se realizaron resuspendiendo el látex sensibilizado ya centrifugado en 10 ml de tampón con la fuerza iónica adecuada. Tras cuatro horas de agitación suave a 20°C, las suspensiones se centrifugaban de nuevo, el sobrenadante se filtraba y se medía su absorbancia a 280 nm.

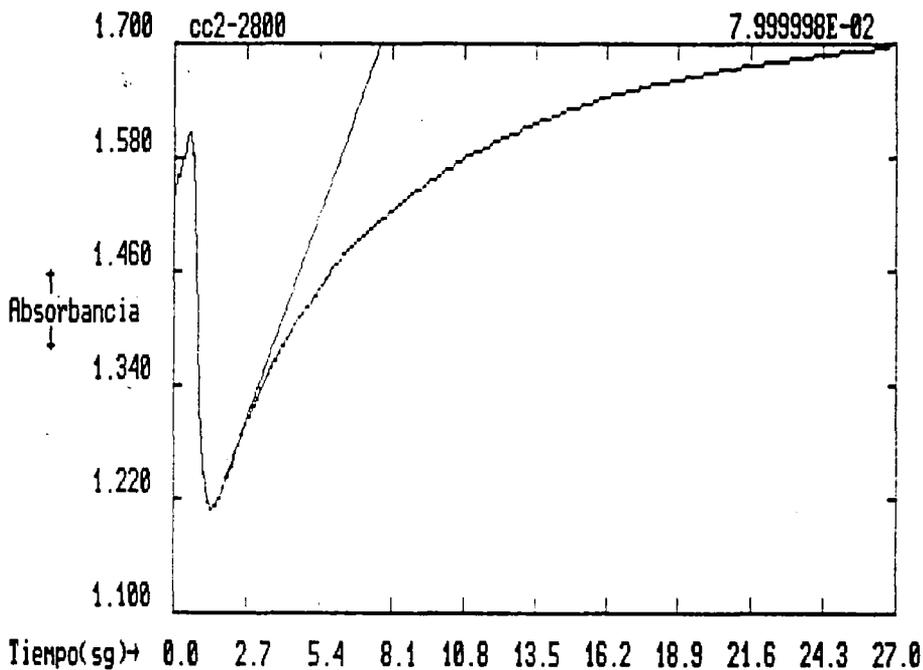


Fig. 4.2 *Seguimiento óptico de la aglutinación de látex y determinación de la pendiente inicial.*

La concentración crítica de coagulación (c.c.c.) de los complejos, que se puede definir como la mínima concentración de electrolito a la que coagulan rápidamente las partículas de látex, se determinó mediante dos métodos diferentes.

En el primer método se medía la variación de turbidez (τ) a 20°C de las suspensiones de complejo látex-proteína al añadir sobre ellas una disolución de KBr con fuerza iónica creciente. Este proceso se realizaba rápidamente gracias a un dispositivo automático de adición y mezcla diseñado en nuestro departamento por el Dr. Miguel Cabrerizo Vílchez. La longitud de onda de la luz incidente variaba en función del látex utilizado, de modo que para cada uno de ellos se realizó un barrido de longitudes de onda para determinar la más adecuada en cada caso. La variación de la absorbancia óptica es seguida en función del tiempo por un ordenador que recoge los datos, y gracias a un programa diseñado por nosotros se puede determinar directamente sobre la figura cual es el valor de $(d\tau/dt)_{t=0}$, es decir, la pendiente inicial de la curva de turbidez en función del tiempo. En la Figura 4.2 puede verse como ejemplo un experimento típico de este tipo. Cuando el valor de esta pendiente se representa en función de la concentración de electrolito final en la suspensión de látex, se puede determinar la c.c.c. de ese complejo como la concentración a la que dicha pendiente alcanza un valor constante, o si se representan las

pendientes en la forma del logaritmo del factor de estabilidad de Fuchs, W , que se define como la relación entre la pendiente de coagulación rápida y de coagulación lenta, el valor de la c.c.c. se halla como la concentración de electrolito a la que el log W toma el valor 0.

El segundo método consistía en añadir la suspensión del complejo látex-proteína sobre disoluciones tamponadas con fuerza iónica creciente, agitar los tubos con la mezcla y dejarlos reposar durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, se determinaba visualmente si el complejo había floculado y sedimentado. La c.c.c. se obtenía como la menor concentración de electrolito que producía la coagulación del complejo.

4.3 ESTRUCTURA DE LA IgG

En el plasma sanguíneo de los mamíferos existen cinco clases principales de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE), entre las cuales las IgG globulinas son las más abundantes y mejor conocidas. Tienen un peso molecular aproximado de 150.000 y contienen cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas (H), con unos 430 restos aminoácidos, y dos cadenas ligeras (L), también idénticas entre sí, con unos 210 restos. Estas cadenas están unidas por enlaces disulfuro, constituyendo una estructura en forma de Y flexible, esquematizada en la Figura 4.3. Las cadenas pesadas poseen además un componente oligosacárido unido covalentemente. Cada una de las cadenas tiene una región de secuencia aminoácida constante, y otra cuya secuencia varía. La molécula del anticuerpo completa dispone de dos sitios de unión para el antígeno, uno en cada brazo de la Y; las porciones variables de las cadenas L y H contribuyen a esos centros de unión, que además se distinguen por poseer regiones hipervariables en las cuales se observa una elevada frecuencia de sustitución aminoácida. Los brazos de la Y pueden escindirse por acción de la papaína, enzima proteolítico que divide la molécula de anticuerpo en tres fragmentos: dos de ellos son idénticos y son capaces de combinarse con el antígeno para formar un complejo soluble que no precipita; éstos son, por tanto, fragmentos de anticuerpo monovalentes y se les denomina Fab ("fragment antigen binding", o sea, fragmento que se une al antígeno); el tercer fragmento no tiene capacidad para combinarse con el antígeno y se denomina Fc (fragmento cristalizable). Otra enzima proteolítica, la pepsina, separa la parte Fc del resto de la molécula de anticuerpo, dejando un fragmento grande que puede precipitar aún con el antígeno y que se representa como $F(ab')_2$, pues permanece claramente divalente.

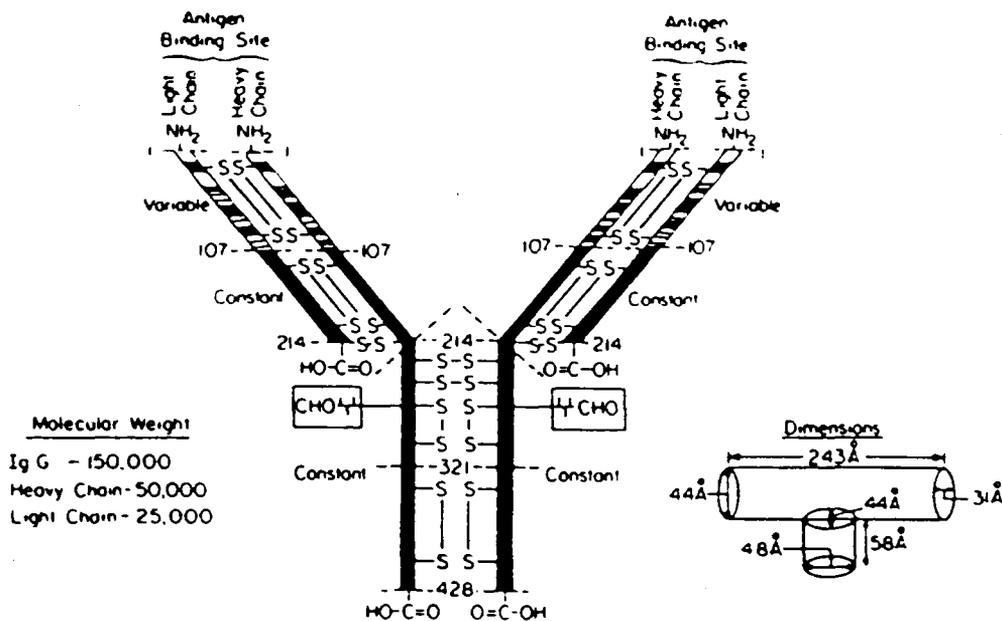


Fig. 4.3 Representación esquemática de la estructura de la molécula de IgG y dimensiones estimadas.

R.L. Poljak y col. han determinado la estructura de la IgG mediante análisis de rayos X. El suero sanguíneo de un mamífero contiene una mezcla de muchas inmunoglobulinas IgG diferentes, todas las cuales poseen la estructura mostrada en la Figura 4.3. Cada tipo individual de inmunoglobulina presenta una combinación específica con un determinado antígeno.

La porción de secuencia variable de cada cadena L y H representa el sitio de unión para el antígeno específico. Las cadenas de las inmunoglobulinas están codificadas por duplicación o repetición de genes precursores primitivos, puesto que existen homologías de secuencias entre las mitades variable y constante de las cadenas L, así como entre los cuatro segmentos de las cadenas H, cada una con unos 107 restos de longitud. Sin embargo, no existen homologías secuenciales entre las regiones variables de las cadenas L, y las variables de las cadenas H.

De los 107 restos de segmento de secuencia variable de las cadenas ligeras, se ha hallado que unos 40 difieren de una molécula de IgG a otra. En una cadena de 107 restos, de los cuales 40 pueden ser ocupados por dos aminoácidos distintos, se puede calcular que son posibles 2^{40} , o más de 10.000 millones de secuencias diferentes. Si cada uno de los 40 sitios variables puede estar ocupado por uno de los 20 aminoácidos, el número de secuencias distintas posible es mucho mayor. Dado que cada molécula de anticuerpo también contiene una cadena pesada en la cual

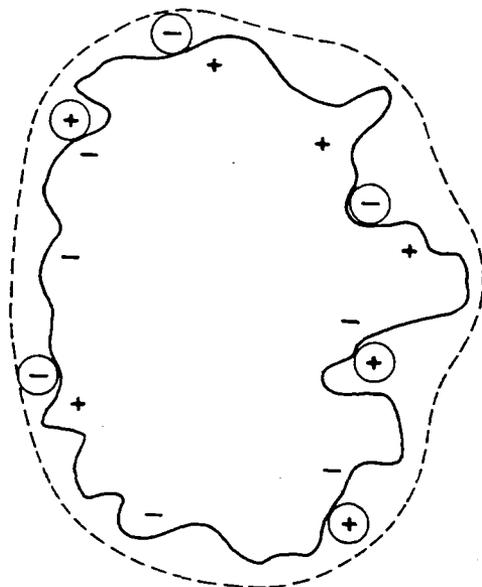


Fig. 4.4 *Representación esquemática de una proteína globular en disolución.*

muchos restos también pueden variar, se comprende inmediatamente que por sustitución de los restos aminoácidos variables se puede formar un número fantástico de anticuerpos.

4.4 EL SISTEMA ANTES DE LA ADSORCION

Las características de la interfase látex-disolución acuosa en los casos que nosotros vamos a estudiar, han sido ya descritas en los Capítulos 2 y 3, referentes a la síntesis de estos látexes y a su caracterización electrocinética. Para el estudio de la adsorción de proteínas sobre estas interfaces las características más importantes a tener en cuenta son su hidrofobicidad y su estado electroquímico.

En una disolución de proteína globular estable en medio acuoso, en la que sus moléculas no se agregan espontáneamente, debe de ser el exterior de dicha proteína predominantemente hidrofílico o, si es hidrofóbico, debe tener un número suficiente de cargas eléctricas en su superficie para impedir el acercamiento de otra molécula. Como se menciona en el Apéndice II dedicado a la estructura de las proteínas, la carga debida a la ionización de las cadenas laterales de los aminoácidos ácidos y básicos está situada principalmente en la superficie de la molécula

de proteína, en contacto con la disolución acuosa. La carga neta en esta superficie se encuentra neutralizada por los contraiones de la disolución, de los cuales una parte están específicamente unidos a la interfase proteína-disolución y los demás están distribuidos en forma difusa. Esta estructura iónica es, evidentemente, una doble capa eléctrica alrededor de la molécula de proteína similar a la que rodea a las partículas de látex, con la salvedad de que al no ser la molécula esférica, la doble capa que la rodea no tiene forma geométrica definida, y en consecuencia la distribución de iones y de potencial variará en cada punto de la superficie. Como se puede ver en la Figura 4.4, los contraiones situados por debajo del plano de deslizamiento pueden residir en huecos de la molécula de proteína o entre partes protuberantes, por lo que no tiene mucho sentido hablar en este caso de capa de Stern.

4.5 EL SISTEMA DESPUES DE LA ADSORCION

Basándose en una gran variedad de datos experimentales obtenidos mediante diferentes técnicas, algunos autores (7,8) han llegado a la conclusión de que el grosor de la capa de proteína que puede adsorberse sobre una superficie sólida es comparable al tamaño que la proteína nativa tiene en disolución. Recientemente, Nakamura y col. (9) han llegado a la misma conclusión a partir de consideraciones teóricas de tipo electrocinético, que ya comentaremos más ampliamente en el Capítulo siguiente dedicado a la caracterización de los complejos. Esta observación sugiere que el proceso de adsorción de una proteína trae consigo pocos cambios conformacionales. De modo más general, se podría concluir que aunque ocurran ciertos cambios conformacionales en la estructura de una proteína al adsorberse en una superficie sólida, la fuerte coherencia interna de ésta previene que el proceso de adsorción se convierta en un proceso de desnaturalización.

En la Figura 4.5 se puede ver esquemáticamente como quedaría una superficie sólida sobre la que se ha adsorbido una proteína, y donde las áreas sombreadas representan regiones hidrofóbicas. Anticipándonos a la discusión en Secciones posteriores, hemos de hacer notar aquí que la atracción electrostática es solamente una de las diversas fuerzas que gobiernan este proceso de adsorción. De hecho, observaremos más adelante que incluso cuando existe repulsión electrostática entre la proteína y la superficie sólida puede producirse la adsorción. Este antagonismo de cargas eléctricas puede ser eliminado por la co-adsorción de iones de bajo peso molecular procedentes de la disolución (10,11). Según estos autores, en el caso de que la carga

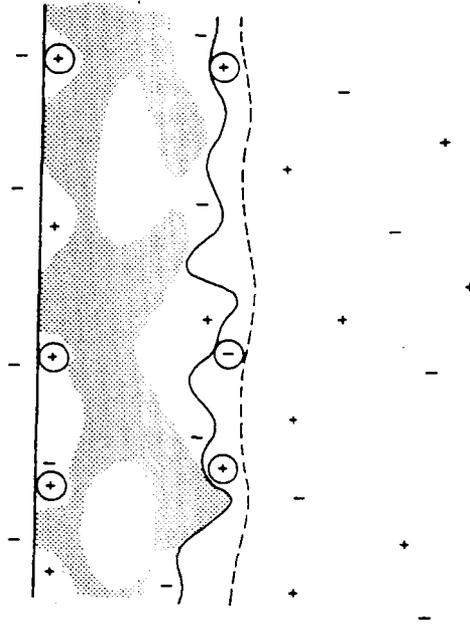


Fig. 4.5 *Equema de una superficie con proteína adsorbida (regiones hidrofóbicas sombreadas).*

eléctrica en la proteína iguale a la superficie adsorbente se necesita una cantidad mínima de iones co-adsorbidos para que el proceso de adsorción tenga lugar.

Norde y Lyklema (12) han concluido a la vista de numerosos experimentos que los factores principales que determinan si una proteína se va a adsorber sobre una superficie sólida son:

- a) Deshidratación de parte de la superficie adsorbente y de la moléculas de proteína.
- b) Superposición de las dobles capas eléctricas que rodean tanto a la superficie sólida como a la proteína, dando lugar a una redistribución de los grupos cargados.
- c) Variaciones estructurales en la molécula de proteína adsorbida.

La importancia relativa de estas contribuciones dependerá, evidentemente, de la naturaleza de la superficie sólida y de la proteína. Los puentes de hidrógeno y las interacciones dipolares entre grupos de la molécula de proteína y de la superficie adsorbente contribuyen en mucho menor grado, ya que estas interacciones ocurren a expensas de otras del mismo tipo en el interior

de las moléculas de proteína, entre la proteína y el agua de hidratación o entre la superficie adsorbente y el agua.

a) Deshidratación de parte de la superficie adsorbente y de la molécula de proteína

Como regla general, la deshidratación de zonas hidrofóbicas disminuye la energía libre de Gibbs de un sistema, y favorece por tanto la adsorción. Esta energía libre de Gibbs involucrada en el cambio del estado de hidratación de una sustancia puede ser estimada a partir del reparto de esa sustancia (o de un modelo semejante) entre una fase acuosa y otra no-acuosa (ver Apéndice II, para el caso de las proteínas). Para una superficie hidrofóbica de poliestireno, por ejemplo, las estimaciones para su deshidratación a 25°C son $\Delta_{hidr}G = -16.8 \text{ mJ m}^{-2}$, siendo este valor consecuencia de un gran aumento de entropía, $T\Delta_{hidr}S = +15.4 \text{ mJ m}^{-2}$, y un pequeño efecto de la entalpía, $\Delta_{hidr}H = -1.4 \text{ mJ m}^{-2}$ (12). Si suponemos un proceso en el que se adsorben 2 mg m^{-2} de una molécula de proteína con un peso molecular de 150.000 D sobre esta superficie hidrofóbica, la contribución de la deshidratación de la superficie adsorbente en las zonas ocupadas por la proteína sería de aproximadamente $-350 RT$ por mol de proteína. Esta variación tan grande de energía libre es la que explica porqué prácticamente todas las proteínas se adsorben sobre cualquier superficie que tenga regiones hidrofóbicas, incluso en los casos en los que las condiciones electrostáticas o de otro tipo no sean favorables.

Es de esperar también que la afinidad en el proceso de adsorción de una proteína esté relacionada con el número, o mejor aún, con el tamaño, de las zonas hidrofóbicas situadas en el exterior de la molécula de proteína. Este argumento es precisamente el utilizado por Horsley y col. (13) para explicar las diferencias encontradas en los experimentos de adsorción sobre superficies de sílica entre la lisozima humana y la de gallina. En este trabajo se relaciona la hidrofobicidad de la molécula de proteína con el comportamiento de ésta en el proceso de adsorción.

b) Redistribución de grupos cargados

El cambio en la energía libre de Gibbs electrostática, $\Delta_e G$, que resulta cuando se produce el solapamiento de dos campos eléctricos es igual, en nuestro caso, a la diferencia entre la parte eléctrica de la energía libre de Gibbs de las dobles capas eléctricas antes y después de la

adsorción. Por otro lado, la parte eléctrica de la energía libre de Gibbs de una doble capa eléctrica es igual al trabajo reversible, isotermo e isobárico necesario para cargarlo (8):

$$G = \int_0^{\sigma_0} \psi_0 d\sigma_0 \quad [4.1]$$

donde ψ_0 y σ_0 son, respectivamente, el potencial superficial y la densidad de carga superficial variables durante el proceso de carga. La ecuación [4.1] tendría que aplicarse tres veces, es decir, calcular la energía libre de Gibbs eléctrica de la superficie adsorbente, de la proteína en disolución y de la superficie recubierta de proteína, sustrayéndole a este último a continuación la suma de los otros dos. De esta forma se obtendría la variación de energía libre de Gibbs eléctrica, $\Delta_e G$, asociada al proceso de adsorción.

Para obtener el potencial superficial, ψ_0 , en función de la densidad superficial de carga, σ_0 , y poder así integrar la ecuación [4.1] es necesario hacer algunas suposiciones con respecto a la distribución de carga en las dobles capas de estos tres sistemas. Para la molécula de proteína en disolución y la superficie adsorbente se puede utilizar el modelo simple de doble capa eléctrica de Gouy-Stern (ver Apéndice III), en el que la distribución de potencial, $\psi(x)$, a lo largo de la doble capa está relacionada con la densidad superficial de carga, $\sigma(x)$, mediante la ley de Gauss para superficies planas:

$$\frac{d\psi}{dx} = - \frac{\sigma(x)}{\epsilon \epsilon_0} \quad [4.2]$$

donde $\epsilon \epsilon_0$ es la permitividad dieléctrica; para la superficie cubierta de proteína la aproximación más razonable es el modelo de triple capa propuesto por Norde y Lyklema (14).

Como ya mencionamos anteriormente, la redistribución de grupos cargados al solaparse las dobles capas eléctricas de la superficie sólida y de la proteína implica una transferencia de iones desde la disolución hacia la capa de proteína adsorbida. Puesto que estos iones transferidos experimentan un cambio de medio, la energía libre de Gibbs molar de transferencia, $\Delta_{tr} g_i$, de un ion i desde la solución s hasta la capa de proteína p no sólo contiene un término eléctrico, sino también uno químico:

$$\Delta_{tr} g_i = \Delta_{quím} g_i + \Delta_{el} i = (\mu_i^p - \mu_i^s) + z_i F (\psi_p - \psi_s) \quad [4.3]$$

donde μ_i es el potencial químico del ion i en la fase correspondiente, z_i es la valencia del ion (con su signo incluido) y F la constante de Faraday. El segundo término representa la contribución electrostática, y el primero la contribución química. Esta puede ser estimada a partir de estudios básicos sobre la transferencia de iones desde una disolución acuosa a un medio no acuoso (15-17). De modo general, tanto $\Delta_{quim} h_i$ como $\Delta_{quim} s_i$ son negativos. Para iones pequeños, sin embargo, $\Delta_{quim} g_i = \Delta_{quim} h_i - T\Delta_{quim} s_i$ resulta generalmente positivo, al ser superior en valor absoluto el término entrópico. Esto implica por tanto que la contribución química al efecto de incorporación de iones a la capa adsorbida se opone al proceso espontáneo de adsorción de la proteína. Puesto que ya hemos visto que bajo ciertas condiciones la co-adsorción de iones es favorable electrostáticamente, debemos de concluir que en este efecto de transferencia de iones desde la solución hasta la capa adsorbida existe competitividad entre los términos químico y eléctrico.

La cantidad de estos iones que se incorporan a la capa de proteína adsorbida sobre la superficie sólida puede ser estimada mediante la comparación de las densidades de carga movilizada electrocinéticamente, σ_{ek} , por unidad de área de la superficie adsorbente antes y después de la adsorción:

$$\Delta_{ads} \sigma_{ek} = \sigma_{ek}^{complejo} - (\sigma_{ek}^{sup} + \sigma_{ek}^{prot} \cdot \Gamma \cdot A) \quad [4.4]$$

donde σ_{ek}^{prot} está expresada por unidad de área de la superficie exterior de la proteína, Γ es la masa de proteína por unidad de área de superficie adsorbente, y A es el área ocupada por unidad de masa de la proteína.

c) Variaciones estructurales en la molécula de proteína

En el Apéndice II relativo a la estructura de las proteínas en disolución se llega a la conclusión de que la estructura tridimensional que una molécula de proteína adopta es el resultado neto de una serie de interacciones en el interior de dicha molécula y entre la proteína y el medio acuoso que la rodea. Además, se ha demostrado que la conformación que presenta una molécula de proteína en su estado nativo es generalmente más estable que la que presenta en otras situaciones diferentes.

El proceso de transferencia de una molécula de proteína desde la disolución acuosa hasta una interfase sólido-líquido trae consigo un cambio en el medio, y pueden producirse por tanto

cambios conformacionales. Zonas hidrofóbicas de la proteína que en el estado nativo en disolución se encuentran enterradas en el interior apolar de la proteína pueden, en el proceso de adsorción, ser expuestas a la superficie adsorbente, de modo que aún mantienen su situación de alejamiento del agua, o ser expuestas directamente a la disolución acuosa. Si es el primer caso el que ocurre, esta variación estructural será favorable si la estructura compacta que la proteína presenta en disolución está estabilizada por interacciones hidrofóbicas intramoleculares, aunque la suma de las demás interacciones favorezcan una estructura más expandida.

Puesto que las interacciones entre cadenas laterales hidrofóbicas favorecen la existencia de estructuras helicoidales ordenadas, una pérdida de interacción hidrofóbica intramolecular puede dar lugar a una reducción en el contenido de estas estructuras y, por tanto, aumentar la libertad rotacional a lo largo de la cadena polipeptídica. Ya se comentó anteriormente que las moléculas de proteína globulares no suelen desnaturalizarse en el proceso de adsorción en una superficie sólida, pero incluso una pequeña transformación de, por ejemplo, 50 residuos de aminoácidos desde una estructura ordenada de α -hélice u hoja- β a una disposición al azar, causaría un aumento de entropía de $\Delta S_{conf} = R \ln 4^{50} \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, que correspondería a unos 69 RT por mol de proteína. Este aumento de entropía puede ser, por tanto, una de las causas principales para que ocurra la adsorción espontánea de proteínas sobre una superficie sólida.

4.6 ADSORCION DE IgG POLICLONAL

La estabilidad conformacional en disolución de una proteína está determinada por factores intramoleculares e interacciones con el solvente (hidratación de los grupos periféricos). La solubilidad está determinada primordialmente, sin embargo, por interacciones intermoleculares (proteína-proteína), aunque como estas moléculas se encuentran solvatadas, los efectos de hidratación-deshidratación estarán también involucrados en los cambios de solubilidad.

La solubilidad es un buen índice de la desnaturalización, y suele presentar un mínimo en las proximidades del punto isoeléctrico. Desde el punto de vista de la adsorción de proteínas es de capital importancia tener en cuenta esta solubilidad, ya que el método usado para determinar la cantidad de proteína adsorbida sobre los látexes está basada en medidas de concentración en solución. Si las moléculas de proteína se desnaturalizan durante el proceso de adsorción se unirán entre ellas para formar agregados, los cuales precipitarán al centrifugar la muestra para separar

el complejo látex-proteína del sobrenadante. Esta cantidad de proteína aparecerá en los cálculos entonces como proteína adsorbida, y será causa de error.

Con este motivo hemos intentado conocer la estabilidad de la IgG en disolución a diferentes pHs. Para ello medimos la densidad óptica de una solución estándar de IgG policlonal a 320 nm y a 280 nm a pH 5, 7 y 9, y con una fuerza iónica de 2 mM (la densidad óptica a 320 nm es una medida de la desnaturalización de la IgG, puesto que los grupos químicos que absorben dicha longitud de onda se encuentran escondidos en el interior de la proteína, y sólo si la cadena polipeptídica se despliega absorben luz de esa longitud de onda aumentando también la absorbancia a 280 nm). En la Tabla 4.3 están resumidas estas medidas, y puede verse como la estabilidad de la IgG es más baja a pH 7 que a pH 5 y 9, quedando únicamente un 77% de proteína estable en el sobrenadante (después de centrifugar para retirar la proteína desnaturalizada) tras 20 horas. No obstante, a las 2 horas no es muy apreciable la desnaturalización de esta IgG en ninguno de los tres casos estudiados, por lo que si cinéticamente este tiempo es suficiente para que se alcancen los equilibrios se puede utilizar como el tiempo de residencia óptimo en el proceso de adsorción.

La adsorción de proteínas sobre superficies hidrofóbicas es, generalmente, un proceso irreversible que ocurre muy rápido, aunque hay que tener en cuenta que las condiciones experimentales (fuerza iónica, pH, temperatura, agitación, etc.) pueden variar sensiblemente la cinética de este proceso (18). Por esta razón hemos realizado primeramente algunos experimentos de adsorción de IgG policlonal sobre látex tanto aniónico como catiónico en diferentes condiciones de incubación y variando el tiempo de contacto entre la proteína y el látex. En todos los casos estudiados, a los 3 min se alcanzaban unos valores de cantidad adsorbida sobre los látexes que ya no variaban aunque se aumentara el tiempo de residencia. En la Tabla 4.2 se encuentran resumidos como ejemplo los datos obtenidos para el látex aniónico.

De acuerdo con los datos tanto cinéticos como de estabilidad obtenidos, elegimos un tiempo de 2 horas como el óptimo para realizar los experimentos de adsorción, aunque para los procesos de desorción permitimos 4 horas al ser éstos mucho más lentos, en caso de ocurrir.

Para estudiar la afinidad de la molécula de IgG hacia los diferentes sustratos usados como adsorbentes se realizaron isotermas de adsorción en diferentes condiciones para cada tipo de látex. En estas experiencias se variaban la cantidad inicial de proteínas presente en la disolución manteniendo constantes todas las demás variables. En general, todas las isotermas tenían las siguientes características en común:

Tabla 4.3 *Estabilidad en disolución de la IgG*

| | | pH 5 | | |
|--------------|----------|----------|--------------|--|
| Horas | O.D. 320 | O.D. 280 | O.D. 280-320 | |
| 0 | 0.004 | 0.355 | 0.351 | |
| 2 | 0.021 | 0.361 | 0.340 | |
| 4 | 0.059 | 0.406 | 0.347 | |
| 20 | 0.106 | 0.463 | 0.357 | |
| sobrenadante | 0.028 | 0.340 | 0.312 | |
| % IgG | | | 88.9 | |
| | | pH 7 | | |
| Horas | O.D. 320 | O.D. 280 | O.D. 280-320 | |
| 0 | 0.021 | 0.381 | 0.360 | |
| 2 | 0.067 | 0.410 | 0.343 | |
| 4 | 0.117 | 0.457 | 0.340 | |
| 20 | 0.251 | 0.598 | 0.347 | |
| sobrenadante | 0.021 | 0.292 | 0.271 | |
| % IgG | | | 77.2 | |
| | | pH 9 | | |
| Horas | O.D. 320 | O.D. 280 | O.C. 280-320 | |
| 0 | 0.008 | 0.363 | 0.355 | |
| 2 | 0.033 | 0.380 | 0.347 | |
| 4 | 0.059 | 0.409 | 0.350 | |
| 20 | 0.179 | 0.562 | 0.383 | |
| sobrenadante | 0.041 | 0.352 | 0.311 | |
| IgG | | | 88.6 | |

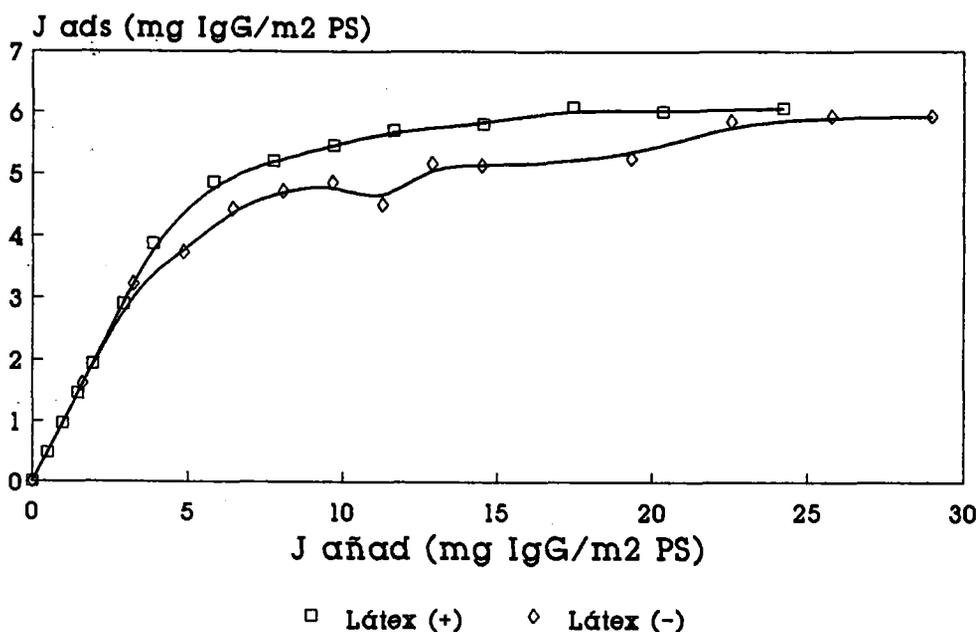


Fig. 4.6 *Isotermas de adsorción de IgG policlonal sobre látex aniónico y catiónico (pH 7, 2 mM).*

- (i) En todos los casos mostraban plateaus de adsorción bien definidos a altas concentraciones de IgG.
- (ii) Incluso cuando la proteína tiene el mismo signo que la superficie adsorbente, el proceso de adsorción ocurre espontáneamente.
- (iii) A bajas concentraciones de IgG la afinidad es muy alta, disminuyendo generalmente cuando se sobrepasa la mitad de la máxima cantidad que puede adsorber una superficie.

Es de particular interés observar estas isotermas de adsorción en el caso de que el proceso se realice a un pH que está dentro del rango de puntos isoeléctricos de la IgG policlonal, como es el pH 7, y realizar el experimento con látex aniónico y catiónico de similares características de hidrofobicidad (como es el caso del látex M-8 y el comercial de Rhône-Poulenc). En la Figura 4.6 se ha representado la cantidad de IgG adsorbida en mg por unidad de superficie (J_{ads}) en función de la cantidad añadida inicialmente ($J_{añad}$) para estos dos látexes en iguales condiciones de adsorción (pH 7, fuerza iónica 2 mM). Como puede verse en esta Figura, el plateau de adsorción que se alcanza en los dos casos es el mismo, por lo que podemos afirmar que a altas

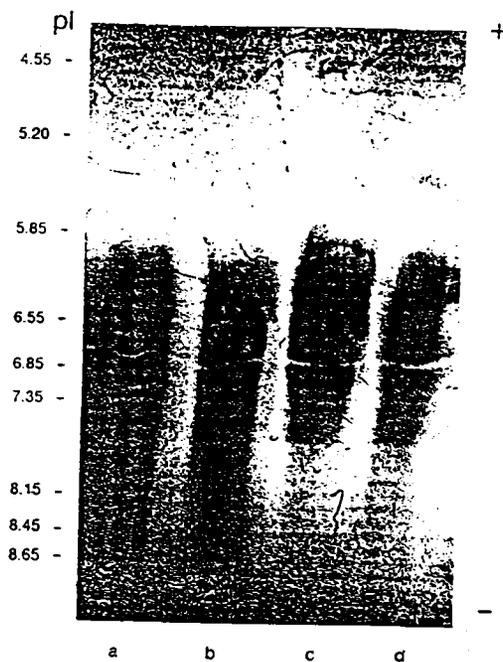


Fig. 4.7 Isoelectroenfoque de los sobrenadantes en látex aniónico: a) IgG pol.; b) pH 5; c) pH 7; d) pH 9.

concentraciones de IgG ambas superficies acomodan el mismo número de moléculas de proteína, a pesar de que el signo de la carga en estas superficies adsorbentes sea contraria en cada uno de los casos. Podríamos pensar por tanto que la fuerza principal de este proceso ha de ser de tipo hidrofóbico, más aún al encontrarnos en un pH en el que la IgG policlonal tiene un mínimo de solubilidad.

A concentraciones más bajas de IgG, sin embargo, la proteína presenta mayor afinidad por el látex catiónico, que precisamente tiene mucha más carga en valor absoluto que el látex aniónico ($+20.1 \mu\text{C cm}^{-2}$ frente a $-6.9 \mu\text{C cm}^{-2}$). Esta mayor carga eléctrica supone, a priori, menos zonas hidrofóbicas en la superficie de la partícula, por lo que cabría pensar que, independientemente del espacio ocupado por una carga de tipo amidino positivo frente al ocupado por un grupo sulfato negativo, el látex catiónico es más hidrofóbico que el aniónico. Esta conclusión está apoyada también por trabajos anteriores sobre adsorción de tensioactivos en ambos tipos de látexes (19).

No obstante, y puesto que los anticuerpos policlonales son en realidad una mezcla heterogénea de moléculas de IgG con diferentes propiedades físicas, hemos de investigar primeramente si lo que ocurre es que existe adsorción preferencial de unas fracciones de la IgG

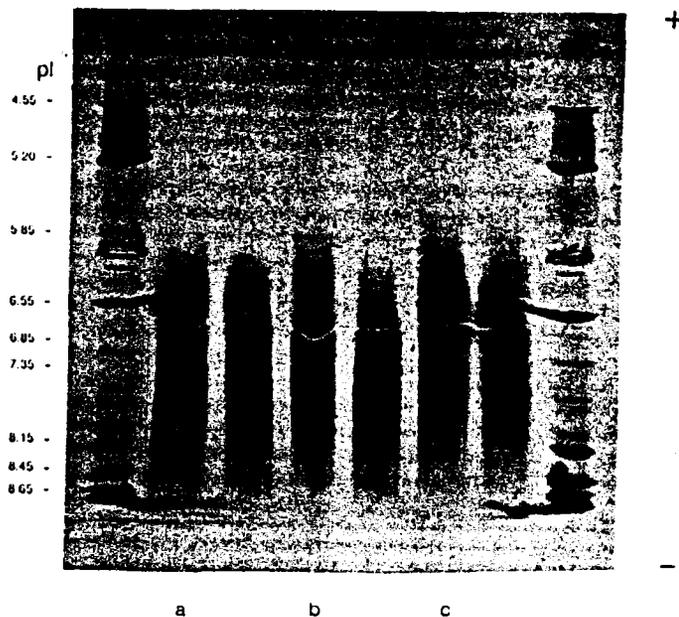


Fig. 4.8 *Isoelectroenfoque de los sobrenadantes en látex catiónico: a) pH 5; b) pH 7; c) pH 9.*

sobre otras. Para comprobar esta posibilidad hemos analizado mediante medidas de enfoque isoeléctrico (IEF) los sobrenadantes después de la adsorción de la IgG para un látex catiónico (M-8) y uno aniónico (Rhône-Poulenc) a tres pHs diferentes (5, 7 y 9). En la Figura 4.8 se puede ver ampliado el resultado de esta experiencia para el caso del látex aniónico, junto con el enfoque isoeléctrico de la IgG policlonal antes de la adsorción. Se observa que a pH 5 no hay adsorción preferencial de ninguna fracción, mientras que a pH 7 y 9 se adsorben preferentemente las moléculas de IgG con puntos isoeléctricos más básicos. Esto da a entender que hay cierta influencia de la atracción electrostática en este caso, ya que las moléculas de IgG cargadas con signo contrario al de la superficie adsorbente tienen preferencia con respecto a las que tienen el mismo signo.

Para el caso del látex catiónico era de esperar un comportamiento similar aunque simétrico, y sin embargo en la Figura 4.8 podemos observar que esto no es así. En este caso, a todos los pHs de adsorción estudiados, las diferentes fracciones de la IgG policlonal se adsorben por igual, dando a entender que no hay prácticamente influencia alguna de las fuerzas electrostáticas (a pesar de tener más carga en valor absoluto que el látex aniónico), y reforzando la hipótesis antes enunciada de que el látex catiónico tiene una superficie más hidrofóbica que el aniónico.

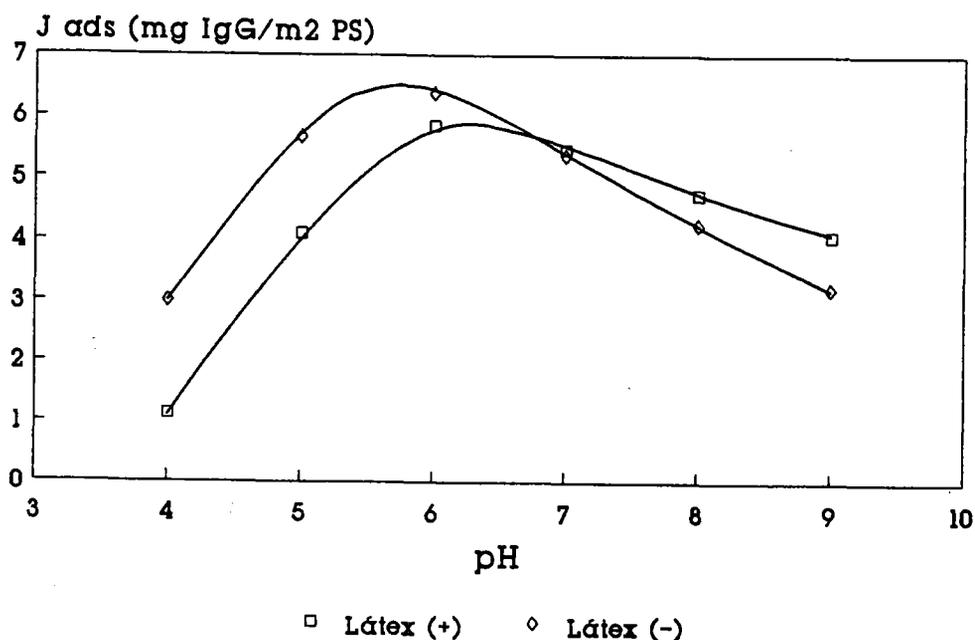


Fig. 4.9 *Máxima adsorción de IgG policlonal en función del pH para látex aniónico y catiónico.*

Existen numerosas evidencias que demuestran que la composición de un polímero influye sustancialmente sobre el modo y la cantidad en que una proteína puede adsorberse sobre él (20-22), y hay también algunos resultados experimentales que demuestran que nuestro látex catiónico tiene diferente polaridad polimérica y grado de hidrofobicidad que el aniónico (19,23) además de los hasta ahora expuestos. Sin embargo, donde se hacen más evidentes las diferencias entre los dos tipos de látexes es cuando se representa la cantidad máxima adsorbida por un látex (valor del plateau de adsorción Γ_{pl}) en función del pH. En la Figura 4.9 pueden verse las gráficas correspondientes a ambos tipos de látex, y donde la primera característica notable es la presencia de un máximo en las dos curvas Γ_{pl} - pH.

La existencia de este máximo puede deberse a varias razones. De acuerdo con algunos investigadores (24,25), el factor más importante a tener en cuenta es la disminución en la estabilidad conformacional de la proteína conforme aumenta la carga neta de las moléculas de IgG. Esto implicaría una mayor tendencia a sufrir variaciones estructurales en el proceso de adsorción, y daría como resultado una mayor área superficial ocupada por molécula. La consecuencia sería por tanto una menor cantidad de proteína adsorbida.

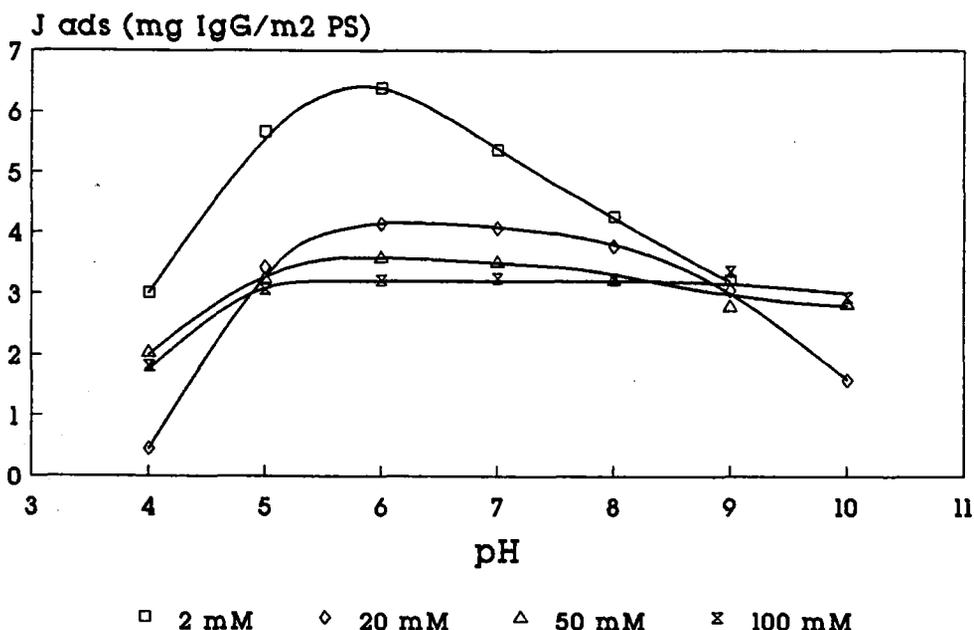


Fig. 4.10 *Máxima adsorción de IgG policlonal en función del pH para látex aniónico a diferente f. iónica.*

Según otros autores (6), este fenómeno podría deberse a un aumento en la repulsión electrostática lateral entre moléculas adsorbidas, lo que daría lugar a una menor cantidad de proteína adsorbida conforme nos alejamos de su punto isoeléctrico.

Una característica muy notable de la Figura 4.9 es el hecho de que las partículas de látex negativo muestran una mayor adsorción de IgG a pHs menores de 7, mientras que por encima de ese valor la tendencia se invierte y son las partículas de látex positivo las que presentan una mayor adsorción. Este resultado experimental demuestra que las fuerzas electrostáticas también intervienen de forma notable en el proceso de adsorción cuando éste tiene lugar a baja fuerza iónica. Es evidente que cuando la proteína presenta una carga global neta de signo contrario a la que tiene la superficie adsorbente, el proceso está electrostáticamente favorecido, mientras que cuando tienen la misma carga la interacción es desfavorable. Estos resultados confirman la idea de que las interacciones electrostáticas no son decisivas en el proceso de adsorción de proteínas sobre sustratos poliméricos, pero que sin embargo tienen cierta influencia cuando el proceso se realiza a fuerza iónica baja (ya que conforme aumentamos la fuerza iónica del medio las fuerzas electrostáticas van disminuyendo su alcance) (24).

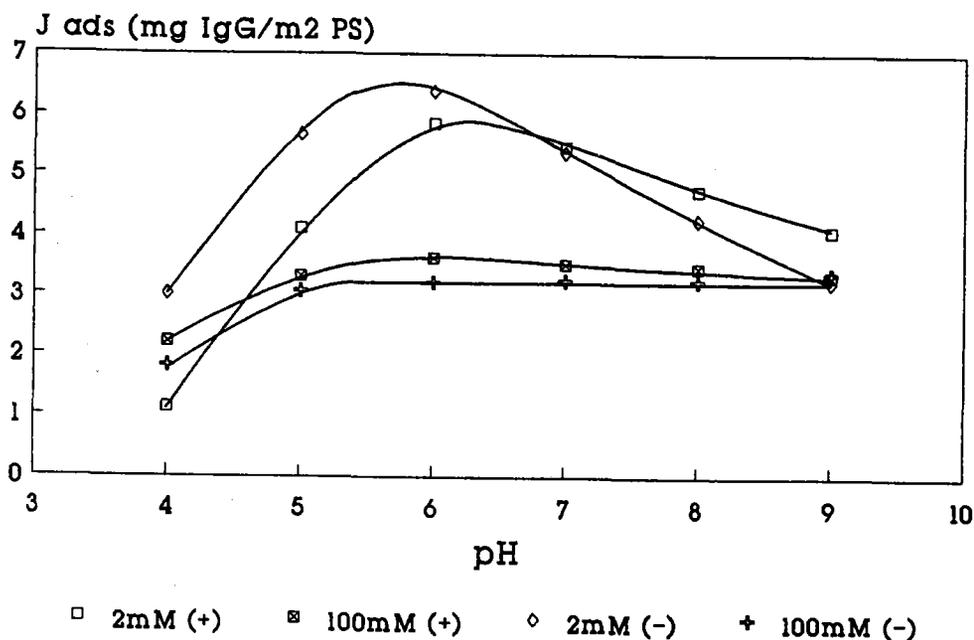


Fig. 4.11 *Máxima adsorción de IgG policlonal en función del pH para látex aniónico y catiónico.*

Para comprobar la influencia que tiene la fuerza iónica sobre el proceso de adsorción, y por tanto la influencia de la interacción electrostática, hemos realizado los experimentos de adsorción de IgG policlonal en función del pH variando la concentración de electrólito indiferente del medio. Como ejemplo se muestra en la Figura 4.10 los máximos de adsorción de la IgG policlonal sobre látex aniónico a diferentes pHs, y donde se observa que la forma de la curva va haciéndose más plana conforme aumentamos la fuerza iónica. Este es el resultado que cabría esperar si suponemos una disminución en la interacción electrostática entre la proteína y la superficie adsorbente, ya que la interacción hidrofóbica es independiente del pH. Como podemos ver en esa Figura, una fuerza iónica de 100 mM es suficiente para eliminar la interacción electrostática, y podemos suponer que el nivel de adsorción que se alcanza es el correspondiente a la unión hidrofóbica entre látex y proteína.

En la Figura 4.11 hemos representado la máxima adsorción de IgG policlonal en función del pH para fuerza iónica baja y alta en los dos tipos de látex. Podemos ver en esta Figura que las diferencias existentes entre ambos látexes cuando la fuerza iónica era baja desaparecen al aumentar ésta a 100 mM, lo que corrobora la idea de que son las fuerzas electrostáticas las responsables de la forma de esta curva a baja fuerza iónica. También hemos de hacer notar que

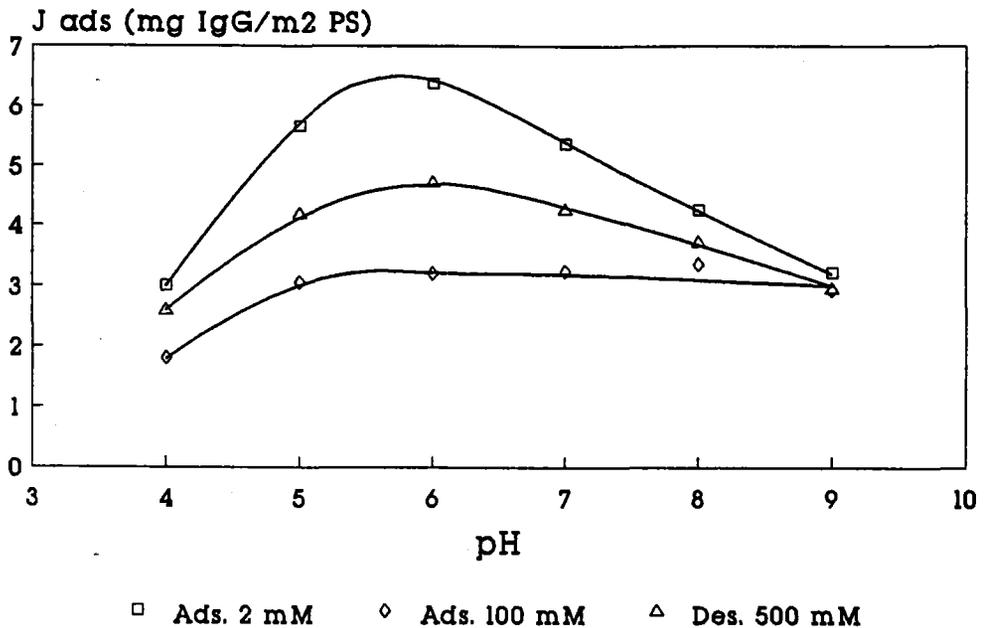


Fig. 4.12 *Adsorción y desorción de IgG policlonal en función del pH para látex aniónico.*

a fuerza iónica alta es el látex catiónico el que adsorbe una cantidad ligeramente mayor de proteína que el aniónico, a pesar de tener una carga eléctrica superior y por tanto menor superficie hidrofóbica libre.

Si efectivamente suponemos que en un proceso de adsorción de proteína a baja fuerza iónica hay una parte que se adsorbe de modo hidrofóbico y otra por interacción electrostática, es de esperar también que una vez realizada la adsorción, la parte de proteína unida por esta interacción electrostática sea desorbida de la superficie de las partículas si el complejo es resuspendido en un medio de fuerza iónica alta. En las Figuras 4.12 y 4.13 podemos ver el resultado de esta experiencia para los látexes aniónico y catiónico, respectivamente. En el caso del látex aniónico, Figura 4.12, podemos ver que la cantidad de IgG policlonal que queda sobre la superficie del látex después de resuspender el complejo en una suspensión de 500 mM de fuerza iónica es bastante superior a la que se adsorbe originalmente cuando el proceso se realiza a 100 mM de fuerza iónica. Esto parece indicar que aunque parte de la proteína se adsorba en una primera fase mediante interacción electrostática, posteriormente va desarrollando una unión de tipo hidrofóbico que hace irreversible el proceso. Hemos de pensar por tanto en el proceso de adsorción de una proteína sobre un sustrato polimérico como un proceso dinámico, en el que

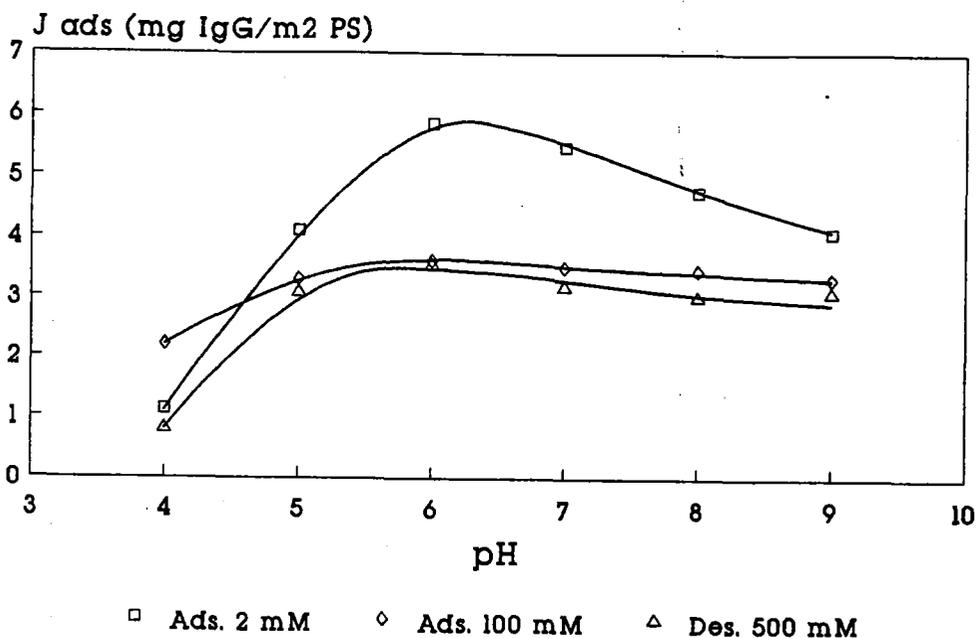


Fig. 4.13 *Adsorción y desorción de IgG policlonal en función del pH para látex catiónico.*

la unión entre ambos componentes puede variar con el tiempo, al menos en los estadíos iniciales. En el caso del látex catiónico, sin embargo, hay muy poca diferencia entre estos dos tipos de experiencias como puede verse en la Figura 4.13. Este resultado puede ser una consecuencia de la mayor afinidad antes mencionada de las moléculas de IgG policlonal por el látex positivo, ya que ésta implicaría también una mayor rapidez en los procesos de unión entre proteína y sustrato, y por tanto menos modificaciones posteriores.

Para comparar la adsorción de la IgG policlonal sobre estos dos tipos de soportes poliméricos de naturaleza fundamentalmente hidrofóbica con un látex cuya superficie sea de tipo hidrofílico, hemos realizado también los experimentos de adsorción a diferentes pHs sobre el látex copolimérico CC-2 (superficie de poliestireno-ácido acrílico, PS/PAA). En la Figura 4.14 hemos representado los datos de adsorción a baja fuerza iónica sobre este látex y sobre el látex aniónico comercial de Rhône-Poulenc, así como las cantidades de proteína que quedan en la superficie del complejo después de resuspender el precipitado inicial en una disolución 500 mM de fuerza iónica, centrifugar y analizar de nuevo el sobrenadante.

La característica que más llama la atención en esta Figura es sin lugar a dudas la superadsorción que ocurre a pHs ácidos y neutros sobre el látex carboxílico, que supera los cálculos

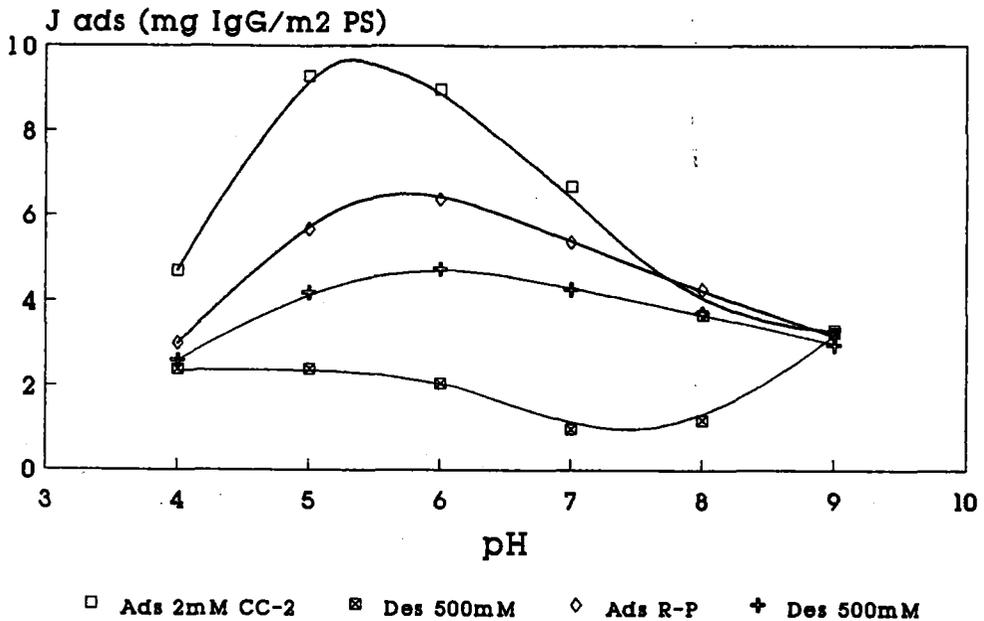


Fig. 4.14 *Adsorción y desorción de IgG policlonal en función del pH para látexes aniónicos.*

incluso de una monocapa compacta de IgG en la superficie. La explicación más aceptable para este fenómeno es suponer, como hacen varios autores (26,27), que las cadenas policarboxílicas de la superficie de estos látexes están desplegadas hacia el interior de la disolución. Esto sería consecuencia de la repulsión electrostática entre grupos carboxilo cuando se encuentran cargados, es decir, a pHs neutros y ácidos. Las moléculas de IgG se unirían mediante interacción electrostática a estos grupos, ya que precisamente a pHs menores de 7 la carga neta de la proteína sería positiva, y daría lugar a esta super-adsorción.

La mayor prueba que existe en favor de esta hipótesis es el hecho de que cuando se resuspenden los complejos en una disolución de fuerza iónica alta que disminuye el alcance de las fuerzas electrostáticas, la cantidad de IgG policlonal que queda adsorbida en la superficie de estas partículas es muy inferior a la que queda sobre el látex más hidrofóbico, como puede verse en la Figura 4.14.

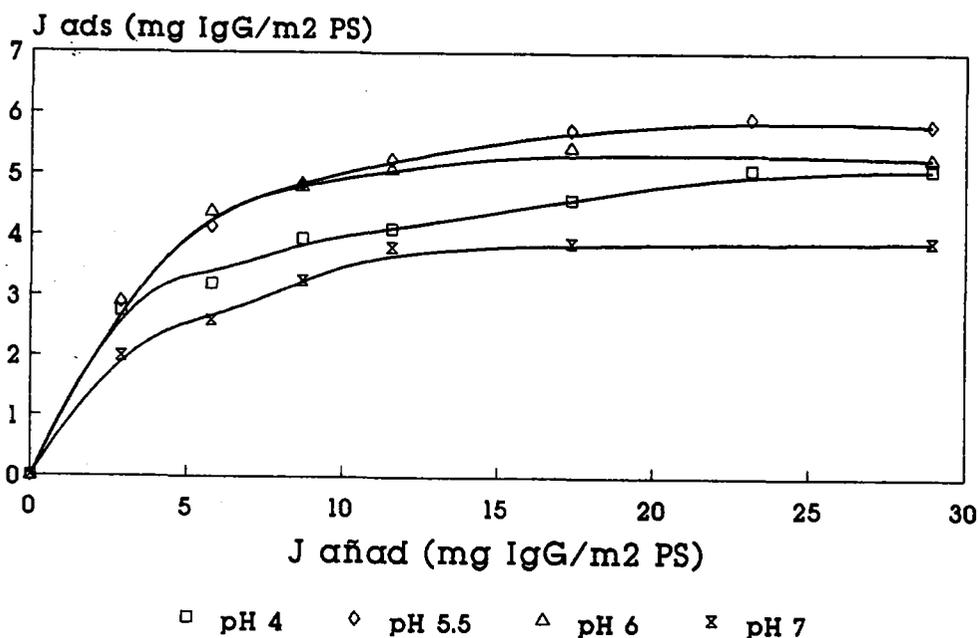


Fig. 4.15 *Isotermas de adsorción de IgG m-1 sobre látex aniónico a diferentes pHs.*

4.7 ADSORCION DE IgG MONOCLONAL

Las muestras de IgG monoclonal sí pueden considerarse como homogéneas en cuanto a su composición y propiedades físicas, contrariamente a lo que ocurría con la IgG policlonal preimmune. Esto quiere decir que los resultados obtenidos con ellas son más generalizables para este tipo de proteína, aunque hay que tener en cuenta que cada IgG monoclonal, a pesar de ser una muestra homogénea, es diferente de cualquier otra IgG.

En la Sección de este Capítulo dedicada a los Materiales y Métodos se han descrito ya las características de las dos muestras de IgG monoclonal utilizadas en este trabajo, ambas cedidas generosamente por Biokit S.A. Una de ellas es ligeramente ácida, la IgG m-1, con un punto isoelectrico (pI) entre 5.5 y 5.8, y la otra es ligeramente básica, la IgG m-2, con un punto isoelectrico entre 7.6 y 7.8

Al igual que en el caso de la IgG policlonal, el primer factor que hay que tener en cuenta a la hora de realizar los experimentos de adsorción en diferentes condiciones de pH es la estabilidad de la proteína en disolución, no en su aspecto conformacional, sino el referente a la solubilidad de la IgG monoclonal. Para estas dos muestras, el mínimo de solubilidad se acentúa

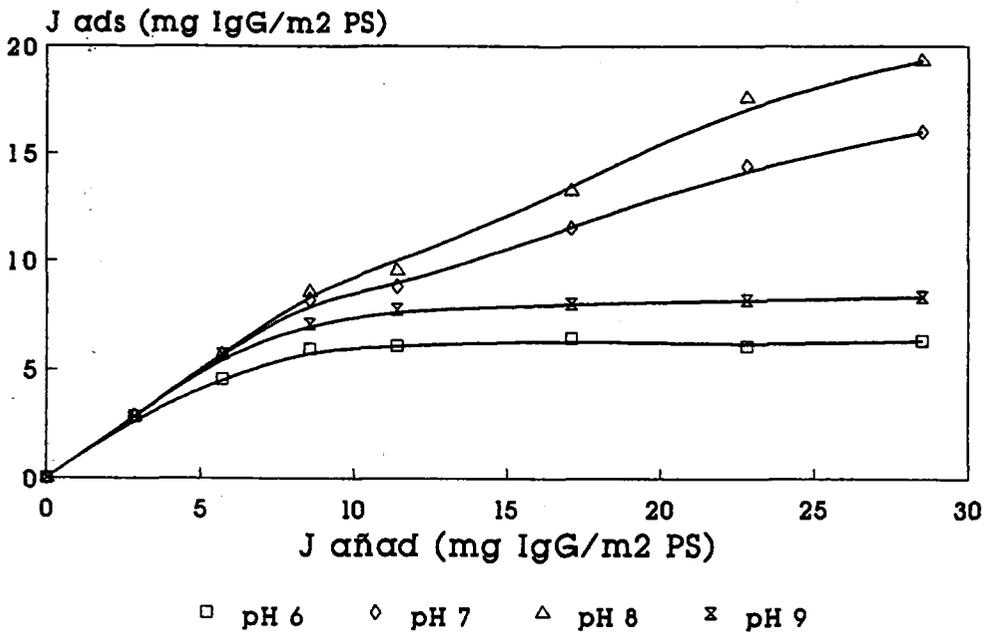


Fig. 4.16 *Isotermas de adsorción de IgG m-2 sobre látex aniónico a diferentes pHs.*

enormemente en las cercanías del pI, de modo que la IgG m-1 no podía utilizarse a pH 5, donde la absorbancia óptica a 320 nm alcanzaba valores de hasta 200 en solamente una hora, y la IgG m-2 no podía usarse a pHs 7 y 8, donde también se detectaba una rápida subida de la absorbancia tanto a 320 como a 280 nm. Esta inestabilidad en disolución ha hecho muy difícil trabajar con estas muestras, y nos hace sospechar que en el caso de la IgG policlonal también haya ocurrido precipitación de las fracciones con pI próximo al pH de cada experiencia. Los resultados de los isoelectroenfoces realizados a los sobrenadantes de los experimentos de adsorción, Figuras 4.7 y 4.8, demuestran sin embargo que si esto ha sucedido ha sido en pequeña escala, y en todo caso propiciado más por el látex aniónico a pH 7 y 9.

En la Figura 4.15 y 4.16 podemos ver algunas isotermas de adsorción realizadas con la IgG m-1 y la IgG m-2, respectivamente, sobre látex aniónico. En el caso del monoclonal ácido, IgG m-1, la precipitación a pH 5 era tan rápida que no podían medirse ni las concentraciones iniciales. A pHs 4, 5.5, 6 y 7, sin embargo, era posible realizar los experimentos de adsorción, como puede verse en la Figura 4.15. Estos resultados parecen indicar que el punto isoeléctrico de este anticuerpo monoclonal se encuentra en realidad más cercano a 5 que a 5.5, ya que es al pH más ácido de 5 en el que se produce la floculación y precipitación rápida de la proteína.

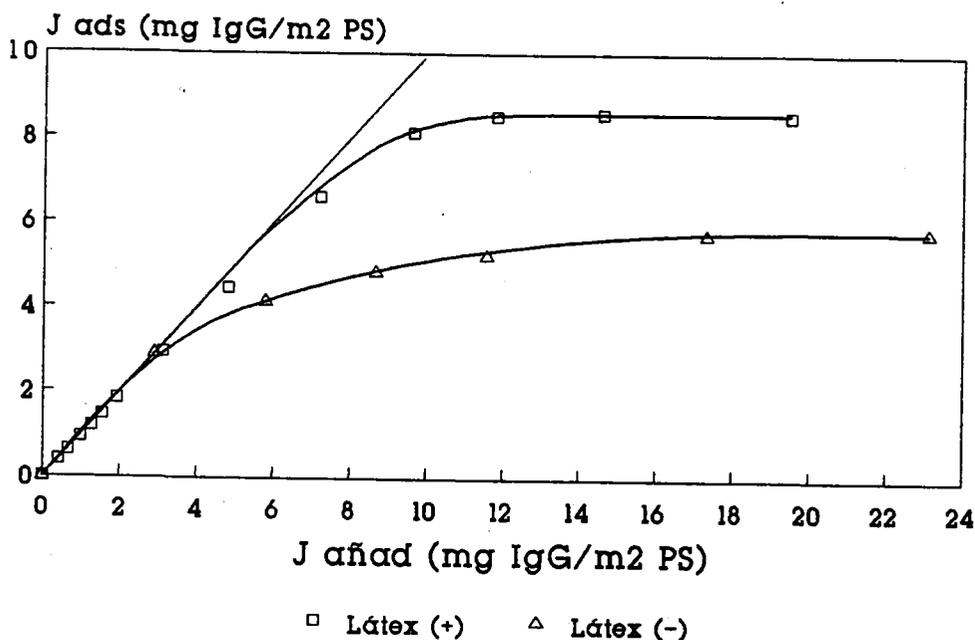


Fig. 4.17 *Isotermas de adsorción de IgG m-1 sobre látex aniónico y catiónico (pH 5.5, 2 mM).*

Las isotermas obtenidas tienen las características generales definidas para el caso de la IgG policlonal, y presentan el plateau más alto en pH 5.5. Al igual que entonces, la afinidad de la IgG es muy alta para concentraciones bajas de la proteína a todos los pHs, disminuyendo notablemente cuando esta concentración supera la mitad de la máxima cantidad de IgG que adsorbe en el plateau.

En el caso del anticuerpo monoclonal básico, el IgG m-2, el rango de pH en el que la proteína es sumamente inestable es mayor, ya que ni a pH 7 ni a 8 pueden realizarse los experimentos de adsorción. En la Figura 4.16 hemos representado como ejemplo las isotermas de adsorción a pHs 6, 7, 8 y 9 para este monoclonal, y donde puede verse el crecimiento monótono en la cantidad teóricamente adsorbida para pHs 7 y 8. Es evidente que lo que estamos midiendo en este caso no es adsorción, sino floculación y precipitación de la proteína como consecuencia de encontrarnos en un pH muy próximo al pI del monoclonal. A pHs 6 y 9, por el contrario, el comportamiento que presenta la IgG m-2 es normal, con bastante afinidad en el caso de pH 9 y alcanzando en ambos casos un plateau de adsorción con valores lógicos.

Esta restricción en las condiciones experimentales en las que se puede realizar el estudio de adsorción de estas proteínas sobre la superficie de las partículas es algo que dificulta

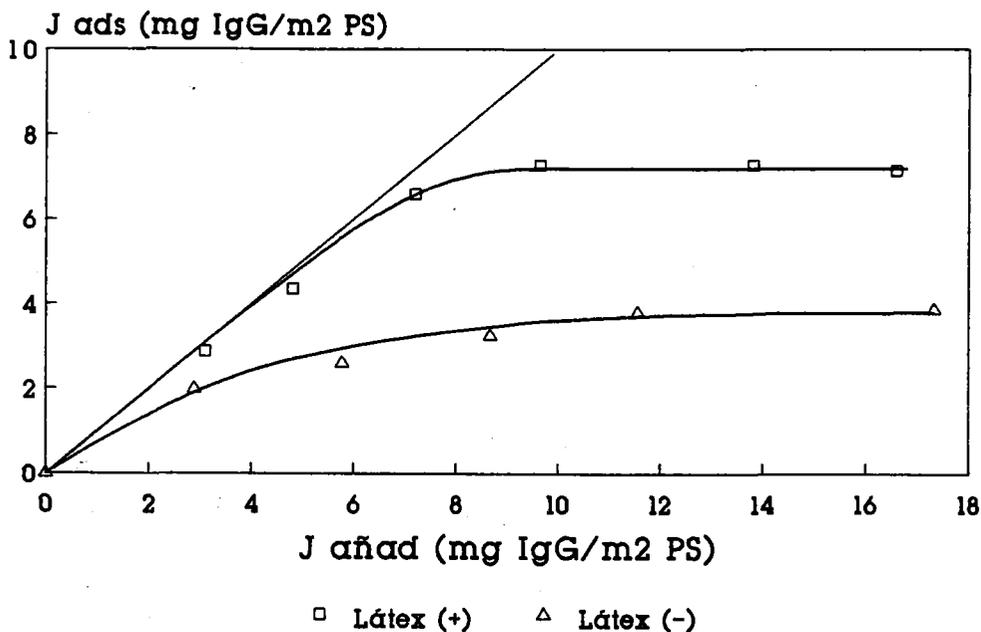


Fig. 4.18 *Isotermas de adsorción de IgG m-1 sobre látex aniónico y catiónico (pH 7, 2 mM).*

enormemente el trabajo, pero del que intentaremos obtener en cualquier caso la mayor cantidad posible de información acerca del sistema anticuerpo monoclonal - látex.

Para el caso del monoclonal ácido, IgG m-1, que es el único con el que podemos hacer experiencias de adsorción a un pH cercano al punto isoeléctrico, hemos hecho la isoterma de adsorción a pH 5.5 para el látex aniónico y el catiónico. En la Figura 4.17 está el resultado de esta experiencia, y podemos ver que una vez más el látex catiónico presenta una mayor afinidad por la proteína en las cercanías de su punto isoeléctrico, así como una mayor cantidad de anticuerpo monoclonal depositada en su superficie.

Si se realiza esta misma experiencia para ambos látexes a pH 7, donde el anticuerpo monoclonal tiene una carga neta negativa, podemos ver la diferencia que hay en la afinidad entre la proteína y la superficie cuando la interacción electrostática influye en el proceso de adsorción. En la Figura 4.18 está representado este experimento para los dos tipos de partículas, positivas y negativas, y donde podemos comparar con la Figura anterior en la que el proceso se había realizado a pH 5.5 y por tanto supuestamente sin influencia de la interacción electrostática.

Para el caso del látex catiónico, en el que a pH 7 la carga de la proteína y de la superficie tienen signos opuestos, es de destacar el hecho de que a pesar de que la interacción

electrostática debe favorecer el proceso de adsorción, sin embargo, se adsorbe una mayor cantidad de proteína en el caso de que el anticuerpo monoclonal se encuentre en las proximidades de su punto isoeléctrico, donde no existe interacción electrostática (8.6 mg IgG m⁻² frente a 7.2 mg IgG m⁻²). Este resultado contrasta con el obtenido para la IgG policlonal, ya que en ese caso se adsorbía la misma cantidad de proteína sobre ambos tipos de látex cuando nos encontrábamos en las proximidades de su punto isoeléctrico promedio, a pH 7 (Fig. 4.6). La diferencia en estos resultados puede deberse a la no-homogeneidad de la muestra de IgG policlonal, de la que no podemos asegurar gran cosa sobre el estado eléctrico de sus moléculas a este pH.

En cualquier caso, la explicación al sorprendente hecho de que se adsorba más proteína sobre una superficie polimérica cuando no existe interacción electrostática que cuando hay atracción debida a las cargas eléctricas de signo contrario debe proceder de la propia interacción inter- o intramolecular de la proteína, o a una combinación de ambas. En la Sección anterior ya comentábamos la explicación dada a este fenómeno por diversos autores. Según Elgersma y col. (24,25), sería la variación de las propias fuerzas intramoleculares las que provocarían una disminución en la estabilidad conformacional de la proteína conforme aumenta la carga neta en las moléculas como consecuencia de que el pH del medio se aleja de su punto isoeléctrico. Esta disminución de estabilidad interna implicaría una mayor tendencia de la molécula a sufrir variaciones estructurales en el proceso de adsorción, y daría como resultado una mayor área superficial ocupada por molécula. El resultado sería por tanto una menor cantidad de proteína adsorbida.

Según Bagchi y Birnbaum (6), serían las interacciones intermoleculares junto con las intramoleculares las causantes de este fenómeno. Además de un aumento de tamaño de la molécula de anticuerpo como consecuencia de la repulsión electrostática entre grupos cargados de la propia estructura de la proteína, lo que implicaría un aumento en la sección eficaz ocupada por molécula y por tanto la posibilidad de acomodar menos moléculas en una misma superficie, existiría también un aumento en la repulsión electrostática lateral entre moléculas adsorbidas, lo que provocaría igualmente una disminución en la cantidad de proteína que pudiera adsorberse sobre la superficie.

Para el caso del látex aniónico, en el que las cargas eléctricas son del mismo signo en la superficie de la partícula y en el anticuerpo monoclonal cuando el proceso de adsorción se realiza a pH 7, podemos ver que, de modo lógico esta vez, la cantidad de proteína que se puede

acomodar en la superficie es menor que cuando la molécula de IgG m-1 se encuentra sin carga eléctrica neta. Esta diferencia en cantidad adsorbida es difícil explicarla en función de la repulsión electrostática entre proteína y superficie adsorbente a la vista del resultado obtenido con el látex catiónico, donde no existía esta repulsión y cuyas diferencias en cantidad adsorbida son del mismo orden. Donde sí se observa una clara diferencia con los casos anteriores es en la afinidad de la proteína por la superficie adsorbente, ya que en el caso de que ambas tengan el mismo signo de carga eléctrica (adsorción de la IgG m-1 a pH 7 sobre látex aniónico, Figura 4.18) se observa perfectamente que incluso con cantidades muy bajas iniciales de proteína en el medio no todas las moléculas se adsorben, contrariamente a lo que ocurriría en los demás casos, en los que inicialmente los puntos coinciden con la línea de máxima adsorción. En las Figuras 4.15 y 4.16, correspondientes a la adsorción de las dos muestras de anticuerpo monoclonal sobre látex aniónico se puede observar este mismo fenómeno cuando el pH se aleja del punto isoeléctrico de la proteína. En el caso de la IgG m-2, de punto isoeléctrico básico, se observa también una disminución en la afinidad incluso cuando la carga eléctrica neta de la proteína tiene signo contrario al de la superficie del látex, a pH 6. En el látex catiónico, sin embargo, hemos visto en la Figura 4.18 que esta afinidad no disminuía si el signo de la proteína y la superficie era el mismo, lo que parece apoyar una vez más la conclusión varias veces comentada ya de que el látex catiónico tiene una mayor afinidad hacia las moléculas de proteína como consecuencia también de la mayor hidrofobicidad de su superficie.

Con objeto de verificar la irreversibilidad del proceso de adsorción de estos anticuerpos con respecto a la dilución, hemos representado como ejemplo en la Figura 4.19 el resultado de la isoterma de adsorción del anticuerpo monoclonal ácido, IgG m-1, sobre látex catiónico a pH 7, y la cantidad de proteína que permanece sobre la superficie después de resuspender el complejo en el mismo tampón utilizado en la adsorción y volver a centrifugar después de 4 horas. Como puede verse en esta Figura, no existe prácticamente desorción alguna por dilución, ya que las diferencias se encuentran en el intervalo del error experimental.

Para poder comparar las cantidades máximas adsorbidas en función del pH para ambos monoclonales y la IgG policlonal sobre una misma superficie, hemos representado en la Figura 4.20 estos datos para el caso del látex aniónico. Como se puede ver en esta Figura, es difícil establecer conclusiones claras con respecto al anticuerpo monoclonal básico, IgG m-2, debido a la imprecisión de los resultados a pH 7 y 8.

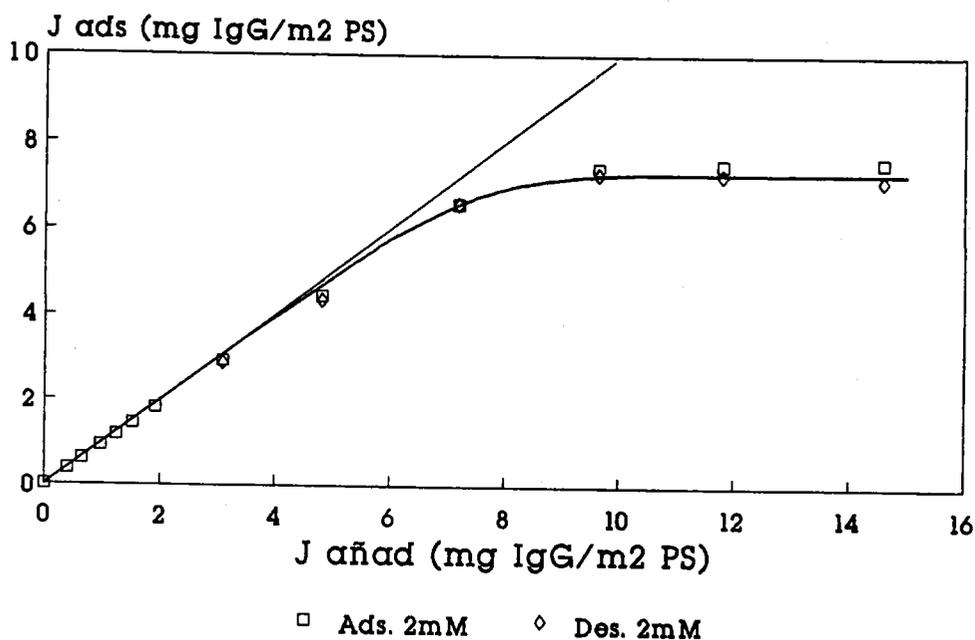


Fig. 4.19 *Desorción por dilución en el látex catiónico.*

En cualquier caso, las tendencias siguen un orden normal, con el máximo situado alrededor del punto isoelectrico, aunque esto es difícil de precisar en los anticuerpos monoclonales por su falta de solubilidad a estos pHs. La cantidad máxima adsorbida se ve afectada en cada caso por la interacción electrostática de diferente modo, ya que a pH 4, por ejemplo, podemos observar que la proteína con la mayor carga positiva, la IgG m-2, que tiene por tanto la mayor atracción electrostática hacia la superficie con carga negativa del látex aniónico es, sin embargo, la que menos se adsorbe de las tres muestras. El anticuerpo monoclonal ácido, por el contrario, que a pH 4 sería la proteína menos cargada positivamente, es la que más se adsorbe.

En el otro extremo, a pH 10, se observa sin embargo que es la proteína con menor repulsión electrostática la que se adsorbe en mayor cantidad. De estos resultados podemos extraer una conclusión clara con respecto al proceso de adsorción de proteínas: cuando el pH del medio se aleja del punto isoelectrico de la proteína, la aparición de una carga eléctrica neta sobre la superficie de las moléculas de esta proteína provoca una disminución en la cantidad máxima que puede adsorberse sobre la superficie de una partícula de látex, independientemente del signo de la carga tanto del látex como de la proteína.

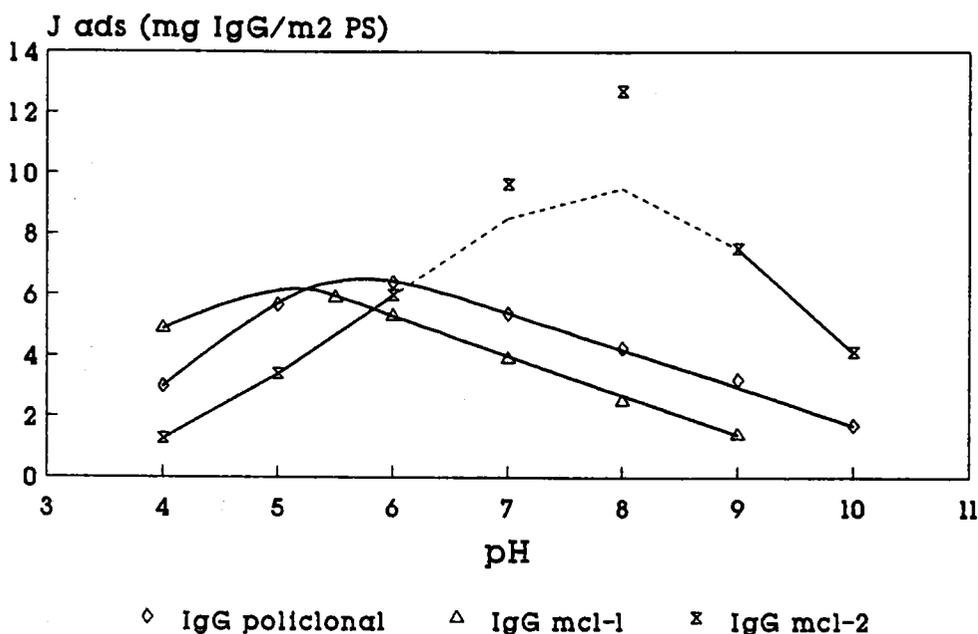


Fig. 4.20 *Máxima adsorción de IgG poli- y monoclonal en función del pH para látex aniónico.*

Es evidente una vez más que la interacción hidrofóbica es la que predomina en el proceso de adsorción de proteínas sobre sustratos poliméricos, llegando incluso a provocar fenómenos que contradicen a lo esperado por la influencia de las interacciones electrostáticas.

Si comparamos la adsorción del anticuerpo monoclonal ácido, IgG m-1, sobre látex catiónico y aniónico en condiciones de saturación pero a diferente pH, Figura 4.21, podemos ver que, al contrario de lo que ocurría en el caso de la IgG policlonal, esta proteína más homogénea se adsorbe en mucha más cantidad sobre el látex catiónico a todos los pHs excepto en 4, donde la interacción electrostática favorece más su adsorción sobre látex aniónico. Para comprobar la influencia en ambos casos de esta interacción electrostática hemos resuspendido los complejos anticuerpo monoclonal-látex en una disolución tamponada de fuerza iónica 500 mM, al igual que hicimos con los complejos anticuerpo policlonal-látex. De esta forma se eliminan las posibles interacciones electrostáticas, y toda la proteína que no esté unida mediante interacción hidrofóbica se desorberá de la superficie. Transcurridas 4 horas, las muestras se centrifugan de nuevo y se mide la concentración de proteína en el sobrenadante. En la Figura 4.21 se ha representado el resultado de este experimento junto con las cantidades máximas adsorbidas inicialmente. Para ambos látexes se observa una máxima desorción en los pHs cercanos al punto

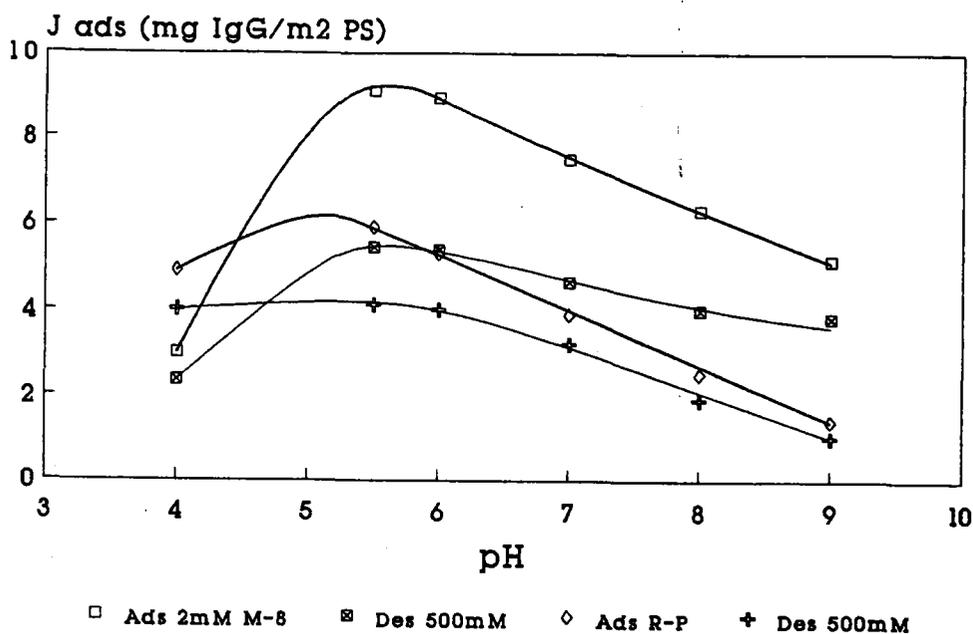


Fig. 4.21 *Adsorción y desorción de IgG m-1 en función del pH para látex aniónico y catiónico.*

isoelectrico de la proteína, es decir, donde se había producido también la máxima adsorción. En el látex catiónico la desorción es muy alta, indicando que había mucha proteína unida por interacción electrostática. Los niveles tan altos de adsorción inicial sugieren que esta interacción electrostática pudiera ocurrir en gran parte entre moléculas adsorbidas sobre la superficie y moléculas de la disolución más que entre éstas y la propia superficie de la partícula, ya que una monocapa compacta de moléculas de IgG sobre una superficie plana tiene un nivel de ocupación teórico de alrededor de 7 mg IgG m⁻². La rugosidad de la superficie de las partículas de estireno, sin embargo, puede ser otro factor a tener en cuenta a la hora de calcular esta cantidad máxima de proteína que una partícula de látex puede acomodar en su superficie. En cualquier caso, las diferencias entre la adsorción de esta proteína sobre látex aniónico y catiónico quedan bastante minimizadas tras la desorción con una solución de alta fuerza iónica, lo que implica que las diferencias iniciales proceden de la mayor interacción electrostática sobre el látex que está mucho más cargado, el catiónico. Una vez eliminadas estas interacciones, podemos valorar el alcance de la unión hidrofóbica entre látex y proteína, que como hemos venido observando hasta ahora siempre favorecen al látex catiónico.

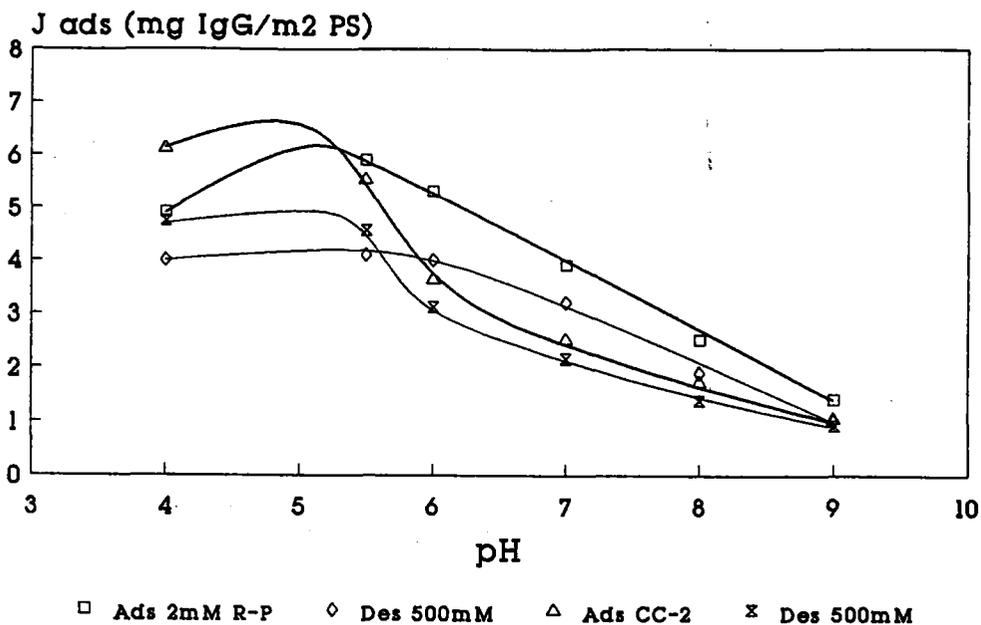


Fig. 4.22 *Adsorción y desorción de IgG m-1 en función del pH para látexes aniónicos.*

Al igual que hicimos con la IgG policlonal, también hemos realizado los experimentos de adsorción de la IgG monoclonal sobre látex copolimerizado de estireno y ácido acrílico. De esta forma se pueden comparar los resultados anteriores de adsorción de anticuerpos sobre superficies más hidrofóbicas con los obtenidos para superficies más hidrofílicas. En la Figura 4.22 se han representado los valores de máxima adsorción para el anticuerpo monoclonal IgG m-1 en función del pH para el látex carboxílico CC-2 y el látex aniónico de Rhône-Poulenc. Igualmente se han representado en la misma Figura los datos de proteína que queda sobre la superficie tras un proceso de desorción a alta fuerza iónica similar al expuesto en casos anteriores.

El comportamiento que demuestra el látex carboxílico en comparación con el otro látex más hidrofóbico es el que cabría esperar de un látex aniónico que simplemente está más cargado que el de Rhône-Poulenc, ya que podemos ver en la Figura 4.22 cómo a un pH ácido de 4, por ejemplo, en el que la carga neta de la proteína tiene signo contrario al del látex, ésta se adsorbe más sobre la superficie más cargada, la del látex carboxílico, mientras que a pHs neutros y básicos, en los que la carga neta de la proteína tiene el mismo signo que los grupos cargados de la superficie de las partículas ocurre lo contrario, es decir, se adsorbe menos proteína sobre el látex más cargado.

El fenómeno de super-adsorción que vimos que ocurría cuando el proceso se realizaba con IgG policlonal sobre este látex carboxílico no se observa en este caso, y de igual forma podemos ver que cuando los complejos látex-proteína son tratados con fuerza iónica alta el resultado en ambos casos es bastante diferente. Mientras que la IgG policlonal se desorbía casi completamente de la superficie del látex, en el caso de la IgG monoclonal sólo una pequeña parte es desorbida, quedando sobre la superficie de la partícula una considerable cantidad de proteína que supuestamente está unida de modo hidrofóbico (a pH ácido más incluso que sobre el látex aniónico menos cargado).

Todos estos resultados sugieren que existen grandes diferencias entre las muestras de IgG policlonal e IgG monoclonal, ya que su comportamiento difiere considerablemente bajo las mismas condiciones de experimentación. El hecho de que las moléculas de anticuerpo nunca sean idénticas las unas a las otras (excepto las monoclonales entre sí) en sus regiones variables e hipervariables, así como las diferencias en la secuencia aminoácida que puedan existir entre estas muestras por proceder de animales diferentes (conejo y ratón), pueden ser la razón del diferente comportamiento que presentan en las experiencias de adsorción. Esto implica que los resultados obtenidos para una clase de estas proteínas no puede generalizarse a las demás, y que con el objeto de profundizar en los fenómenos implicados en el proceso de adsorción de anticuerpos sobre superficies poliméricas hay que estudiar cada muestra dependiendo de su procedencia e incluso del método de purificación. A pesar de ello, existen ciertas características generales que sí pueden admitirse para el proceso de adsorción de una proteína sobre un sustrato polimérico:

- La cantidad máxima de proteína se adsorbe siempre a un pH próximo a su punto isoeléctrico. En el siguiente capítulo dedicado a la caracterización electrocinética de los complejos látex-proteína veremos que esta máxima adsorción ocurre precisamente en el punto isoeléctrico de dichos complejos.
- A un pH diferente del de máxima adsorción la interacción electrostática influye de forma negativamente en el proceso, independientemente del signo de la carga neta de la proteína y de los grupos cargados de la superficie del látex, observándose únicamente una mayor pendiente en el caso de repulsión electrostática.

- La interacción entre proteína y sustrato polimérico es, por tanto, predominantemente hidrofóbica, observándose una alta afinidad cuando las concentraciones de proteína son bajas.
- Los látexes catiónicos son más hidrofóbicos que los aniónicos, y en consecuencia adsorben más proteína y con más afinidad cuando ésta se encuentra a un pH próximo a su punto isoelectrico.

4.8 REFERENCIAS

- (1) Singer, J.M. y Plotz, C.M., *Am. J. Med.* 21, 888 (1956).
- (2) Grabar, P. y Williams, C.A., *Biochim. Biophys. Acta* 30, 193 (1953).
- (3) Heukeshoven, J. y Dernick, R., *Electrophoresis* 6, 103 (1985).
- (4) Ronner, J.A., Lensen, H.G.W., Olthuis, F.M.F.G., Smolders, C.A. y Feijen, J., *Biomaterials* 5, 241 (1984).
- (5) Wadsley, J.J. y Watt, R.M., *J. Immunol. Methods* 107, 1 (1987).
- (6) Bagchi, P. y Birnbaum, S.M., *J. Colloid Interface Sci.* 83 (2), 460 (1981).
- (7) Miller, S., Janin, J., Lesk, A.M. y Cothia, C., *J. Mol. Biol.* 196, 641 (1987).
- (8) Norde, W. y Lyklema, J., *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* 2 (3), 183 (1991).
- (9) Nakamura, M., Ohshima, H. y Kondo, T., *J. Colloid Interface Sci.* 149 (1), 241 (1992).
- (10) Van Dulm, P., Norde, W. y Lyklema, J., *J. Colloid Interface Sci.* 82 (1), 77 (1981).
- (11) Norde, W., *Croat. Chem. Acta* 56, 705 (1983).
- (12) Norde, W. y Lyklema, J., *J. Colloid Interface Sci.* 71 (2), 353 (1979).
- (13) Horsley, D., Herron, J., Hlady, V. y Andrade, J.D., *ACS Symp. Ser.* 343, 290 (1987).
- (14) Norde, W. y Lyklema, J., *J. Colloid Interface Sci.* 66 (2), 285 (1978).
- (15) Abraham, M.H., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 69, 1375 (1973).
- (16) Abraham, M.H., Ah-Sing, E., Danil de Namor, A.F., Hill, T., Nasehzadeh, A. y Schultz, R.A., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 74, 359 (1978).
- (17) Danil de Namor, A.F., Contreras, E. y Sigsted, E., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 79, 1001 (1983).
- (18) Van Dulm, P. y Norde, W., *J. Colloid Interface Sci.* 91 (2), 248 (1983).

- (19) Galisteo González, F., Cabrerizo Vílchez, M. e Hidalgo Alvarez, R., *Colloid Polym. Sci.* **269**, 406 (1991).
- (20) Bale, M.D., Danielson, S.J., Daiss, J.L., Gopper, K.E. y Sutton, R.C., *J. Colloid Interface Sci.* **132** (1), 176 (1989).
- (21) Kondo, A., Shinya, O. y Higashitani, K., *Biotech. Bioeng.* **37**, 537 (1991).
- (22) Suzawa, T. y Shirahama, H., *Adv. Colloid Interface Sci.* **35**, 139 (1991).
- (23) Rubio Hernández, F.J., de las Nieves López, F.J., Bijsterbosch, B.H. e Hidalgo Alvarez, R., *Polymer Latex III* **1**, 10 (1987).
- (24) Elgersma, A.V., Zsom, R.L.J., Norde, W. y Lyklema, J., *Colloids and Surfaces* **54**, 89 (1991).
- (25) Elgersma, A.V., Zsom, R.L.J., Norde, W. y Lyklema, J., *J. Colloid Interface Sci.* **138** (1), 145 (1990).
- (26) Suzawa, T., Shirahama, H. y Fujimoto, T., *J. Colloid Interface Sci.* **86** (1), 144 (1982).
- (27) Lee, S.H. y Ruckenstein, E., *J. Colloid Interface Sci.* **125** (2), 365 (1988).

CAPITULO 5

CARACTERIZACION ELECTROKINETICA Y ESTABILIDAD COLOIDAL DE LOS COMPLEJOS LATEX - PROTEINA

- 5.1 INTRODUCCION**
- 5.2 MATERIALES Y METODOS**
- 5.3 MODELOS TEORICOS**
- 5.4 COMPLEJOS IgG POLICLONAL - LATEX**
- 5.5 COMPLEJOS IgG MONOCLONAL - LATEX**
- 5.6 ESTABILIDAD COLOIDAL DE LOS COMPLEJOS**
- 5.9 REFERENCIAS**

CAPITULO 5

CARACTERIZACION ELECTROKINETICA Y ESTABILIDAD COLOIDAL DE LOS COMPLEJOS LATEX-PROTEINA

5.1 INTRODUCCION

La caracterización electrocinética de los diversos complejos látex - proteína formados en los procesos de adsorción tiene como objeto el estudio de las propiedades eléctricas de esta nueva partícula, caracterizada fundamentalmente por presentar en su superficie la estructura proteica adsorbida. Este hecho hace que la interfase polímero-disolución acuosa se convierta ahora en una interfase proteína adsorbida - disolución acuosa en el caso de un recubrimiento completo, o una interfase mixta entre polímero y proteína adsorbida - disolución acuosa en el caso de que el recubrimiento no sea completo. Puesto que prácticamente todas las propiedades de un coloide en suspensión están determinadas por las características de su superficie (ver Apéndice III), es evidente que el hecho de adsorber moléculas de proteína sobre una partícula de látex cambiará drásticamente su comportamiento coloidal.

De acuerdo con la teoría DLVO sobre coloides liofóbicos (1,2), es precisamente el estado eléctrico de la superficie el que determina la estabilidad coloidal del sistema, y puesto que éste último parámetro es de importancia básica en el establecimiento de las condiciones necesarias para el desarrollo de un test inmunológico de aglutinación, hemos de estudiar cómo afectan los diferentes modos de adsorción a la estabilidad coloidal de este complejo.

La electroforesis de partículas de látex tanto en estado puro como recubiertas con moléculas de proteína es un método muy adecuado para obtener información sobre la estructura de las superficies coloidales, especialmente con respecto a la distribución de grupos cargados. Por esta razón, son numerosos los estudios que se han llevado a cabo sobre el comportamiento electrocinético de estos látexes limpios y recubiertos de proteína (3-9). A pesar de toda esta información obtenida sobre la interfase látex-disolución acuosa y proteína adsorbida-disolución acuosa, nuestro actual conocimiento de la distribución de grupos cargados en la superficie de estas partículas es aún limitado, principalmente por el hecho de que los modelos usados para la interpretación de los datos de movilidad no son muy adecuados. En el caso de los látexes limpios, considerados como modelos coloidales, hemos expuesto con detalle en el Capítulo 3 los problemas asociados con las diferentes teorías que relacionan los datos de movilidad

electroforética con la estructura eléctrica de la doble capa que rodea estas partículas. Cuando además la superficie está recubierta de moléculas de proteína el problema se complica aún más, ya que la suposición de partida en cualquier teoría electrocinética de que las cargas eléctricas están situadas sobre la superficie de la partícula con un grosor cero, y que dicha superficie es impermeable a los iones de electrolito no es válida en este caso. Efectivamente, las cargas eléctricas de la superficie de una proteína adsorbida sobre una partícula no se encuentran necesariamente en el exterior de la misma, sino que pueden estar en regiones más internas, y dicha superficie es además permeable a los iones de bajo peso molecular presentes en la disolución.

5.2 MATERIALES Y METODOS

Todos los reactivos utilizados en las experiencias de electroforesis y estabilidad coloidal son de grado analítico y se han usado sin posterior purificación.

Las muestras de proteína y de látex son las mismas que ya se han descrito en Capítulos anteriores, y al igual que entonces se han utilizado siempre recipientes de plástico para el manejo de los látexes catiónicos y de vidrio Pyrex para los látexes aniónicos.

La caracterización electrocinética se ha realizado, al igual que en el caso de los látexes poliméricos limpios, mediante medidas de movilidad electroforética con el Zeta-Sizer IIc. La concentración de partículas era en todos los experimentos de aproximadamente 0.033 mg/ml, y el tiempo de acondicionamiento de las muestras de 15 min. El valor de movilidad electroforética se obtenía como la media de cuatro medidas realizadas en el nivel estacionario de una célula cilíndrica PC-4. Como ya hemos comentado en el Capítulo anterior, en ninguno de los casos se observó desorción de las moléculas de IgG de los látexes sensibilizados por dilución.

Las soluciones tamponadas que se han empleado para diluir las muestras y ajustar las condiciones de pH y fuerza iónica del medio han sido las mismas que ya hemos descrito en Capítulos anteriores, teniendo en cuenta igualmente el carácter aniónico o catiónico de los látexes utilizados.

Las curvas de valoración electroforética de las moléculas de IgG monoclonal se obtuvieron mediante isoelectroenfoque en dos dimensiones (2D-IEF) con el equipo Phast-System de Pharmacia, utilizando como medio para el corrimiento eléctrico de las proteínas el Phast Gel-1 de Pharmacia usado también en los isoelectroenfoques normales (Capítulo 4). Este gel cubre un

rango de pH entre 3 y 9, y una vez fijada la proteína son revelados con Coomassie Blue. Este método permite obtener información sobre el estado eléctrico de la proteína a diferentes pHs midiendo su desplazamiento electroforético.

5.3 MODELOS TEORICOS

Recientemente se han desarrollado algunos estudios teóricos sobre la electroforesis de partículas coloidales con superficies estructuradas de tipo biológico o poliméricas recubiertas de macromoléculas (10-18). Estos estudios revelan que en muchos casos el potencial- ζ pierde incluso su significado, ya que la movilidad electroforética llega a hacerse independiente de la posición exacta del plano de deslizamiento. Ohshima y Kondo (17), en particular, han estudiado la distribución de carga en la región superficial de los eritrocitos humanos, y han obtenido una fórmula aproximada para la movilidad electroforética de partículas con superficie estructurada. Esta fórmula depende de una media ponderada del potencial Donnan y del potencial en el límite entre la región de carga superficial y la disolución que la rodea (lo que podría compararse con el plano de deslizamiento hidrodinámico, aunque en este caso no tiene el mismo sentido).

Una modificación de esta ecuación ha sido publicada recientemente también por estos autores (9) para el caso de partículas coloidales recubiertas de proteína, en la que suponen una distribución uniforme de las cargas eléctricas en una región superficial de tamaño finito y la posibilidad de penetración de los iones en el interior de esta región. Igualmente tienen en cuenta la contribución de la densidad de carga superficial de las partículas de látex a la movilidad electroforética del complejo. La fórmula que obtienen para la movilidad electroforética es:

$$\mu = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \frac{\Psi_{DON} / \lambda + \Psi_{(0)} / \kappa_m}{1 / \lambda + 1 / \kappa_m} + \frac{zeN}{\eta \lambda^2} + \frac{8 \epsilon_r \epsilon_0 kT}{\eta \lambda v e} \tanh \frac{ve\zeta}{kT} \times \frac{e^{-\lambda d} / \lambda - e^{-\kappa_m d} / \kappa_m}{(1 / \lambda)^2 - (1 / \kappa_m)^2} \quad [5.1]$$

donde Ψ_{DON} y Ψ_0 son, respectivamente, el potencial Donnan y el potencial en la zona límite entre la región superficial y el medio, como se han definido antes; κ_m es el parámetro de Debye-Hückel de la región superficial; λ es un parámetro cuyo inverso tiene dimensiones de longitud, y su significado se relaciona con la distancia que puede penetrar el flujo hidrodinámico en el

interior de la región superficial; ν es la valencia del electrolito; z y N son la valencia y la densidad de grupos cargados en la región superficial, respectivamente; ζ es el potencial zeta de las partículas coloidales en las mismas condiciones pero en ausencia de macromoléculas adsorbidas en su superficie; d es el espesor de la capa de proteína adsorbida a partir de la superficie de la partícula; η es la viscosidad del medio; e es la carga elemental y ϵ_r y ϵ_0 son, respectivamente, la permitividad dieléctrica relativa del medio y la permitividad dieléctrica del vacío. El potencial Donnan, el potencial en la zona límite, el parámetro de Debye-Hückel de la región superficial, y la densidad de carga vienen dadas por:

$$\Psi_{DON} = \frac{kT}{e} \ln \left[\frac{zN}{2n} + \left\{ \left(\frac{zN}{2n} \right)^2 + 1 \right\}^{1/2} \right] \quad [5.2]$$

$$\Psi_{(0)} = \frac{kT}{e} \left(\ln \left[\frac{zN}{2n} + \left\{ \left(\frac{zN}{2n} \right)^2 + 1 \right\}^{1/2} \right] + \frac{2n}{zN} \left[1 - \left\{ \left(\frac{zN}{2n} \right)^2 + 1 \right\}^{1/2} \right] \right) + \frac{4kT}{ve} \tanh \frac{ve\zeta}{4kT} \cdot e^{-\kappa_m d} \quad [5.3]$$

$$\kappa_m = \kappa \left[1 + \left(\frac{zN}{2n} \right)^2 \right]^{1/4} \quad [5.4]$$

$$\sigma_0 = \sqrt{8n\epsilon_r\epsilon_0kT} \operatorname{senh} \left(\frac{e\zeta}{2kT} \right) \quad [5.5]$$

donde κ es el parámetro de Debye-Hückel del medio, n es la concentración de electrolito, y σ_0 es la densidad de carga en la superficie de la partícula. Para el cálculo del potencial ζ de las partículas de látex limpias, sin embargo, utilizan la ecuación clásica de Smoluchowski, a pesar de las limitaciones que ya hemos visto en el Capítulo 3 que tiene esta teoría clásica.

Mediante esta formulación, en la que por existir tres magnitudes indeterminadas (N , $1/\lambda$ y d) hay que hacer el ajuste de la curvas experimentales dando valores a esos parámetros, estos autores obtienen para el espesor de la capa de proteína adsorbida sobre la superficie de una partícula de látex los siguientes datos: para IgG de conejo a pH 6.5, 100 Å, y para HSA (seroalbúmina humana) a pH 8.5, 60 Å. Estos resultados concuerdan bastante bien con los tamaños moleculares determinados para estas proteínas adsorbidas sobre una superficie de látex por diversos métodos, como por ejemplo viscosimetría o dispersión dinámica de luz. Para el caso

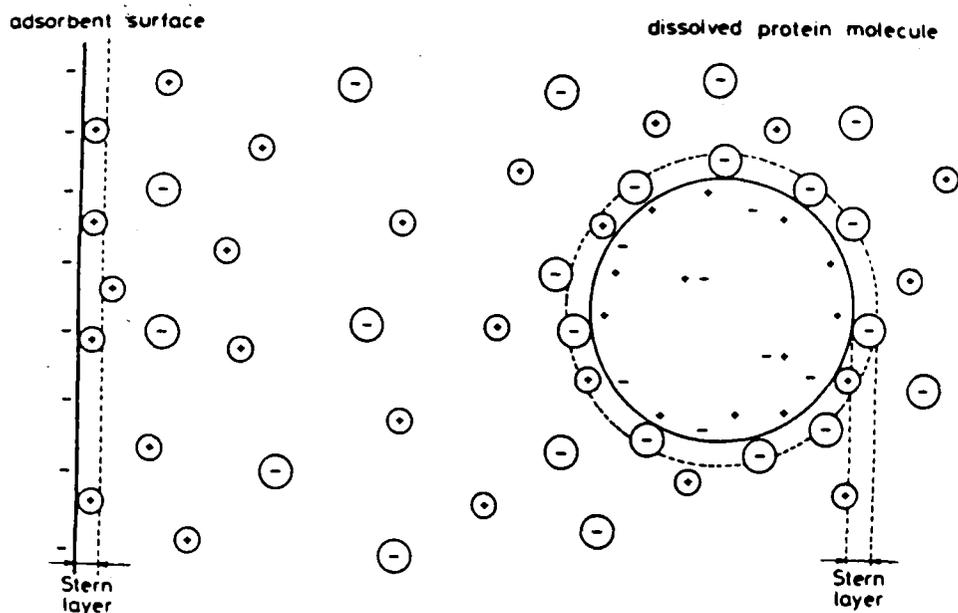


Fig. 5.1 *Esquema de la distribución de carga e iónica en la proteína y en la superficie adsorbente.*

de la IgG, Bagchi y Birnbaum (19) han determinado un tamaño que oscila entre 44 y 243 Å, en función del pH del medio.

La difusión de iones hacia el interior de la región superficial de las partículas de látex recubiertas de proteína también ha sido estudiado por Norde y Lyklema (20), los cuales han cuantificado incluso la influencia de estos iones en la densidad de carga eléctrica movilizada electrocinéticamente por los complejos látex-HSA y látex-ribonucleasa.

El modelo que estos autores proponen parte de la situación del sistema antes de la adsorción, tal y como describimos en el Capítulo anterior. En esta situación, tanto la carga eléctrica de los grupos en la superficie de las partículas como la carga neta en la molécula de proteína disuelta están neutralizados por contraiones. Una fracción de estos contraiones se encuentra en la capa de Stern que rodea a la partícula y a la molécula de proteína, y otra parte están difusamente distribuidos a su alrededor (modelo de doble capa). Esta distribución está resumida esquemáticamente en la Figura 5.1.

Como primera aproximación, podemos identificar el plano exterior de Helmholtz con el plano de deslizamiento o, lo que es lo mismo, identificar el potencial difuso Ψ_d con el potencial electrocinético ζ (21). Hay que tener en cuenta, no obstante, que la superficie de una molécula

de proteína globular en disolución no es completamente rígida; los contraiones de la disolución adheridos a esta superficie pueden penetrar en el interior de la molécula una distancia de incluso algunas décimas de nanometro (22,23). Esta situación no está reflejada en la Figura 5.1, aunque sí en la Figura 4.5 del Capítulo anterior.

Una vez que se ha producido la adsorción, las dobles capas eléctricas que rodean la superficie de la partícula y la molécula de proteína se superponen, obligando a una redistribución de carga en ambos sistemas y una transferencia de iones entre la superficie del látex, la molécula de proteína adsorbida y la disolución. Este último efecto es el que se puede evaluar, según estos autores, electroforéticamente. Para ello es necesario comparar las cargas movilizadas electrocinéticamente en el sistema antes y después de la adsorción, así como el cambio en la carga neta de la proteína que se produce como consecuencia del proceso de adsorción (24).

Como consecuencia de la condición de electroneutralidad, el cambio que se produce en la carga electrocinética por unidad de área superficial, $\Delta_{ads} \sigma_{ek}$, debida al proceso de transferencia una molécula de proteína desde la disolución hasta la superficie del látex, puede ser expresada como:

$$\Delta_{ads} \sigma_{ek} = \sigma_{ek}^{PS/prot} - \sigma_{ek}^{PS} - \sigma_{ek}^{prot} \quad [5.6]$$

donde los superíndices *PS/prot*, *PS* y *prot* se refieren, respectivamente, a los complejos látex de poliestireno-proteína, látex limpio y moléculas de proteína disueltas (en este caso, el término σ_{ek}^{prot} está expresado directamente en unidades de densidad de carga respecto a la superficie del látex, no como en la Ecuación [4.4]).

Para calcular el efecto de carga, $\Delta_{ads} \sigma'_{ek}$, causado por la transferencia desde o hacia la solución de iones de electrolito indiferente, hay que tener en cuenta el término $\Delta_{ads} Z_H$ (variación en la carga neta de protones de la molécula de proteína como consecuencia del proceso de adsorción). Este término puede evaluarse a partir de las curvas de valoración de la proteína en disolución (24), y para valores de pH distintos de aquellos en los que se han realizado los experimentos de adsorción puede determinarse por interpolación. De esa forma,

$$\Delta_{ads} \sigma'_{ek} = \Delta_{ads} \sigma_{ek} - F \cdot \Delta_{ads} Z_H \cdot \Gamma_p \quad [5.7]$$

donde *F* es la constante de Faraday, y Γ_p es la cantidad de proteína adsorbida en moles por unidad de área superficial de látex.

Los resultados obtenidos mediante la aplicación de estas ecuaciones llevan a los autores a la conclusión de que ocurre una adsorción simultánea de proteína e iones de la disolución, lo que explicaría las variaciones de carga producidas en el sistema látex-proteína como consecuencia de la adsorción. Esta adsorción simultánea disminuiría considerablemente la repulsión electrostática en el caso de que los grupos superficiales y la molécula de proteína tuvieran el mismo signo, y facilitaría por tanto la adsorción espontánea de la proteína en condiciones electrostáticamente desfavorables.

En nuestro trabajo no hemos podido hacer una estimación de estos parámetros de variación de carga movilizada electrocinéticamente, dada la imposibilidad de medir la movilidad electroforética (y por tanto calcular sus potenciales superficiales y difuso) de las moléculas de IgG en disolución. Para realizar estas medidas es necesario un aparato de electroforesis de frente móvil del que no disponemos, pero que intentaremos conseguir en un futuro próximo con objeto de profundizar en los fenómenos a nivel iónico que acontecen en los procesos de adsorción de proteínas sobre la superficie de partículas de látex. Además, en el caso de la IgG no existen datos bibliográficos a este respecto, que sin embargo sí existen para la HSA, la BSA y la ribonucleasa, por ejemplo.

5.4 COMPLEJOS IgG POLICLONAL - LATEX

En el Capítulo anterior dedicado a la adsorción de anticuerpos sobre la superficie de los látexes encontramos que la cantidad máxima se adsorbía a un pH próximo al punto isoeléctrico de cada proteína, tanto para el látex aniónico como para el catiónico. Resultados similares se encuentran en la literatura (19,25,26), aunque sólo para el caso de látex aniónico.

Según todos los indicios, en su punto isoeléctrico los anticuerpos se adsorben con una alta afinidad sobre la superficie de estas partículas mediante fuerzas hidrofóbicas. Ya vimos en el Capítulo anterior que la resuspensión de estos complejos en una disolución con fuerza iónica de 500 mM demuestra que también hay interacción electrostática entre la superficie de látex y las moléculas de proteína o entre las moléculas de proteína adsorbidas y las moléculas de proteína en disolución, ya que una parte de las IgGs son desorbidas con este método y hemos comprobado que por dilución no hay desorción apreciable de moléculas de proteína de la superficie (Figura 4.19). En esta adsorción irreversible de tipo hidrofóbico, los anticuerpos tienden a unirse a la superficie de las partículas de látex mediante el fragmento F_c , dejando la

parte inmunorreactiva de la molécula, los fragmentos F_{ab} , libres para reaccionar con el antígeno (27).

Puesto que el pH del medio tiene una influencia decisiva en el proceso de adsorción de los anticuerpos, determinando la cantidad máxima que puede adsorber la superficie de una partícula, es posible que un cambio en el pH del medio una vez realizado el proceso de adsorción implique un cambio también en la cantidad de proteína adsorbida final. Si el tampón de resuspensión tiene la misma fuerza iónica que el de adsorción y no contiene proteína disuelta, sólomente cuando pasemos de un pH de más adsorción a uno de menos podremos encontrar si se produce desorción como consecuencia del cambio de pH en el medio, mientras que en el caso contrario estaremos midiendo únicamente la posible desorción del anticuerpo por dilución.

En la Tabla 5.1 están resumidos los resultados del experimento realizado para determinar la desorción de IgG policlonal de látex aniónico y catiónico, adsorbiendo inicialmente distintas cantidades de anticuerpo sobre las partículas a pH 7 por triplicado, y resuspendiendo después cada una de las tres muestras iguales en un tampón de igual fuerza iónica (2 mM) pero diferente pH: 4, 7 y 10. En los resultados podemos ver que la desorción por dilución en ambos látexes (pH de adsorción igual al de desorción) no supera en ninguno de los casos el 5%, que es el margen de error aplicable a éste método indirecto de determinación de la cantidad de proteína adsorbida. A pHs extremos, sin embargo, sí se observa algo más de desorción, especialmente en el caso del látex aniónico donde se alcanza incluso un 10% de desorción a pH 4 cuando el recubrimiento de proteína sobre la partícula es máximo. Una vez más parece confirmarse que la adhesión de los anticuerpos a la superficie del látex catiónico es más fuerte que en el caso del látex aniónico.

Estos resultados, sin embargo, no están de acuerdo con los obtenidos por Bagchi y Birnbaum (19) para la adsorción de IgG policlonal sobre látexes aniónicos de PVT (poli-vinil-tolueno). Estos autores encontraron desorción de las moléculas de anticuerpo de la superficie del látex con valores superiores incluso al 20% al cambiar el pH del medio. No obstante, la comparación de estos resultados con los obtenidos por nosotros es bastante complicada, ya que tanto las características del látex como las de la IgG utilizadas eran considerablemente diferentes (estructura y densidad del polímero; pureza, procedencia y rango de puntosisoelectrónicos de las muestras de IgG; tampones de adsorción y resuspensión; tiempo de adsorción y desorción; etc.)

Tabla 5.1 Desorción de IgG policlonal por efecto del pH de redispersión

Látex aniónico

| J_{ads} (mg IgG/m ² PS) | pH desorción | J_{desor} (mg IgG/m ² PS) | % desorción |
|-----------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|----------------|
| 2.99 | 4 | 0.19 | 6.4 |
| | 7 | 0.14 | 4.7 |
| | 10 | 0.19 | 6.4 |
| 4.51 | 4 | 0.30 | 6.7 |
| | 7 | 0.17 | 3.8 |
| | 10 | 0.32 | 7.1 |
| 5.08 | 4 | 0.42 | 8.3 |
| | 7 | 0.21 | 4.1 |
| | 10 | 0.38 | 7.5 |
| 5.91 | 4 | 0.59 | 10.0 |
| | 7 | 0.26 | 4.4 |
| | 10 | 0.48 | 8.1 |

Látex catiónico

| J_{ads} (mg IgG/m ² PS) | pH desorción | J_{desor} (mg IgG/m ² PS) | % desorción |
|-----------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|----------------|
| 3.21 | 4 | 0.11 | 3.4 |
| | 7 | 0.06 | 1.9 |
| | 10 | 0.09 | 2.8 |
| 4.84 | 4 | 0.19 | 3.9 |
| | 7 | 0.08 | 1.7 |
| | 10 | 0.21 | 4.3 |
| 5.52 | 4 | 0.28 | 5.1 |
| | 7 | 0.12 | 2.2 |
| | 10 | 0.22 | 4.0 |
| 5.87 | 4 | 0.35 | 6.0 |
| | 7 | 0.15 | 2.6 |
| | 10 | 0.30 | 5.1 |

Nuestros resultados sugieren que si el tiempo de adsorción es suficiente para que tengan lugar los reajustes estructurales necesarios en la molécula de anticuerpo sobre la superficie del látex, la desorción de estas moléculas es bastante improbable cambiando sólo el pH del medio, especialmente en el caso del látex catiónico, donde la afinidad de la superficie hacia la molécula de anticuerpo parece mayor.

La razón de que exponamos en este Capítulo las experiencias sobre desorción en ambos látexes por efecto de la dilución y del cambio de pH del medio (en vez de hacerlo en el Capítulo anterior dedicado propiamente a la adsorción de estos anticuerpos sobre la superficie del látex) responde al hecho de que en la caracterización electrocinética y en el estudio de la estabilidad coloidal de los complejos látex-proteína es cuando realmente se van a resuspender estas partículas en diferentes medios para medir su movilidad electroforética o su concentración crítica de coagulación (c.c.c.). Es fundamental, por tanto conocer de antemano si en este proceso de redispersión se va a producir desorción de las moléculas de anticuerpo de la superficie del látex, ya que esto implicaría un cambio en la estructura superficial del complejo que alteraría los resultados obtenidos.

La movilidad electroforética de los complejos látex-anticuerpo se ha medido con el objeto de determinar el estado eléctrico de la interfase proteína adsorbida-disolución acuosa, y el primer paso en este estudio es la comprobación del estado eléctrico de dicha interfase para una misma clase de moléculas de anticuerpo unidas a la superficie bajo diferentes condiciones de adsorción. En la Tabla 5.2 hemos repetido los datos del experimento sobre la cinética de adsorción de IgG policlonal sobre látex aniónico a pH 7 mostrados en la Tabla 4.2 del Capítulo anterior, añadiendo en este caso los datos de movilidad electroforética determinados para cada uno de los complejos obtenidos en iguales condiciones pero con diferente tiempo de adsorción. Para evitar la posible influencia de los iones de un tampón en la estructura eléctrica de la superficie del complejo, éstos se resuspendieron en una disolución 1 mM de KBr con un pH aproximado de 6. En ninguno de los casos se observó una variación superior a ± 0.2 décimas de pH en esta experiencia.

Los resultados mostrados en la Tabla 5.2 indican claramente que el proceso de adsorción de IgG policlonal sobre superficie de poliestireno es muy rápido, ya que a los 3 min se había adsorbida prácticamente la misma cantidad de anticuerpo que si se permitía un mayor tiempo de residencia de la disolución de proteína en contacto con el látex. En el caso del látex catiónico, donde ya hemos visto que existe una mayor afinidad hacia las moléculas de IgG, los resultados son similares, por lo que es de suponer que la adsorción sea incluso más rápida que en el látex

aniónico, pero evidentemente no podemos detectar dicha diferencia. La última columna de esta Tabla, donde se encuentran los datos de movilidad electroforética de los complejos, nos demuestra además que electrocinéticamente no existen diferencias entre ellos, ya que todos los valores se encuentran comprendidos dentro del margen de error experimental. Esto quiere decir que en el caso de que con posterioridad al proceso inicial de adsorción se produzcan variaciones estructurales en la molécula de anticuerpo ya adsorbida en la superficie del látex, éstas no se reflejan en el estado eléctrico superficial del complejo, y por tanto no se pueden determinar electrocinéticamente.

Tabla 5.2 *Adsorción de IgG policlonal en función del tiempo*

| TIEMPO Minutos | A B S O R B A N C I A | | | J_{ads} mg IgG/m ² PS | Movilidad m ² s ⁻¹ V ⁻¹ ×10 ⁸ |
|-------------------|-----------------------|-----------|------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| | Blancos | Con látex | Diferencia | | |
| 3 | 0.492 | 0.368 | 0.124 | 4.7±0.2 | -1.41±0.10 |
| 15 | 0.486 | 0.351 | 0.135 | 5.1±0.3 | -1.45±0.10 |
| 30 | 0.503 | 0.360 | 0.143 | 5.4±0.3 | -1.58±0.11 |
| 45 | 0.494 | 0.364 | 0.130 | 4.9±0.3 | -1.45±0.10 |
| 60 | 0.492 | 0.362 | 0.130 | 4.9±0.3 | -1.40±0.10 |
| 120 | 0.494 | 0.358 | 0.136 | 5.1±0.3 | -1.37±0.09 |
| 210 | 0.494 | 0.358 | 0.136 | 5.1±0.3 | -1.42±0.10 |
| 300 | 0.489 | 0.356 | 0.133 | 5.0±0.3 | -1.27±0.08 |
| 24 H | 0.491 | 0.358 | 0.133 | 5.0±0.3 | -1.42±0.10 |

De forma similar a la experiencia anterior, hemos intentado comprobar también la influencia que tiene el pH de adsorción sobre el comportamiento electrocinético de los complejos látex-anticuerpo. Para hacer esta comparación en igualdad de condiciones excepto el pH al que se han adsorbido las moléculas de IgG, hemos representado en la Figura 5.2 la movilidad electroforética de los complejos de látex aniónico con el mismo grado de recubrimiento (3.3 mg IgG m² PS), pero obtenidos a diferente pH de adsorción (5 y 7 respectivamente). Podemos ver en esta Figura

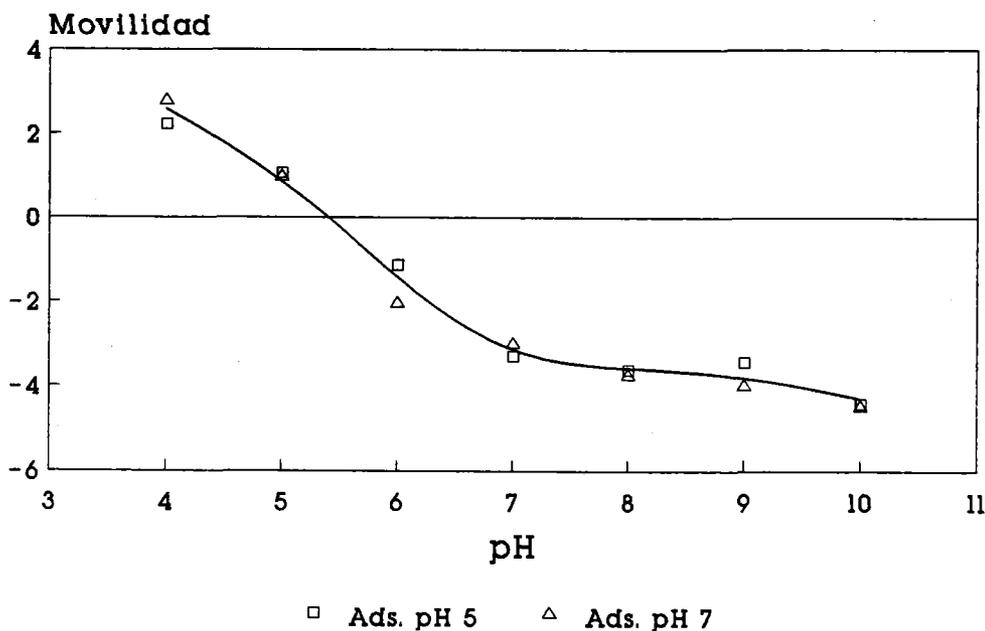


Fig. 5.2 *Movilidad electroforética de los complejos IgG policlona-látex aniónico en función del pH.*

que los resultados obtenidos en ambos casos son prácticamente iguales dentro del margen de error experimental, que para las medidas de movilidad electroforética está en torno al 7%.

Si en el proceso de adsorción de una molécula de IgG policlona sobre la superficie de un látex a diferente pH existen diferencias también en el modo en que esta molécula se sitúa sobre la superficie, explicando de este modo las diferentes cantidades máximas que pueden efectivamente acomodarse en uno u otro pH, entonces los resultados de medir la movilidad electroforética de estos complejos nos demuestra que cuando se resuspenden las partículas así obtenidas en disoluciones tamponadas a diferente pH, es este último pH el que controla la estructura final de la molécula de anticuerpo adsorbida, o sea, que provoca nuevas alteraciones en el estado eléctrico de la proteína que la lleva a una situación independiente del pH inicial de adsorción. Por otro lado, también hemos de tener en cuenta que aunque las moléculas de anticuerpo se encontraran adsorbidas en posiciones diferentes según el pH de adsorción, es posible que el estado eléctrico neto de estos complejos no variara lo suficiente a un mismo pH de redispersión como para detectarlo con medidas de movilidad electroforética, es decir, no podamos distinguir electrocinéticamente entre diferentes estructuras de una molécula de anticuerpo adsorbida sobre una misma superficie.

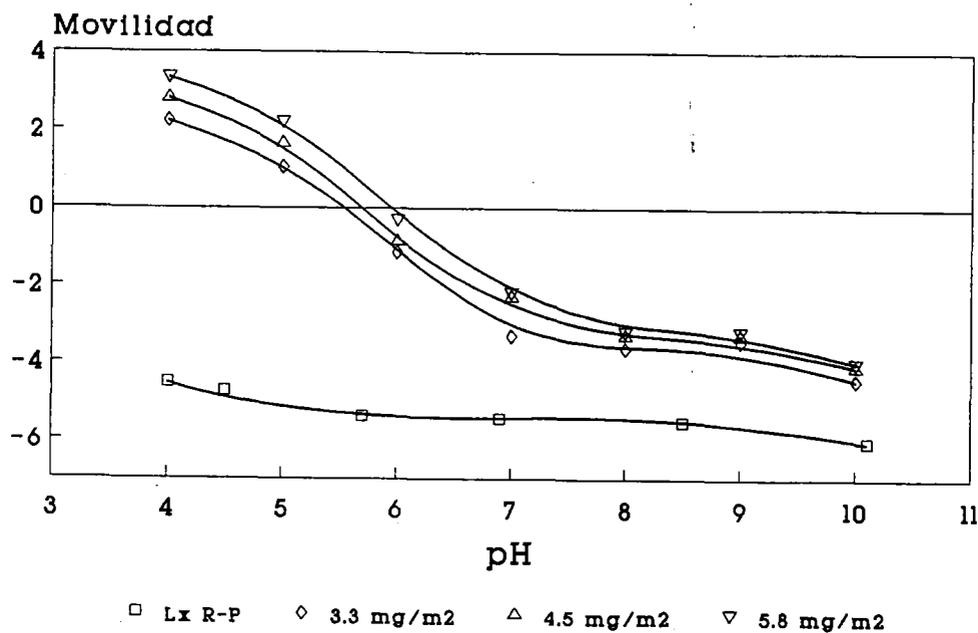


Fig. 5.3 *Movilidad de los complejos IgG policlonal-látex aniónico y del látex limpio en función del pH.*

En cualquier caso, lo que sí podemos afirmar es que a nivel macroscópico es el pH de adsorción el que controla la cantidad máxima de proteína que puede acomodarse en una superficie, mientras que es el pH de resuspensión el que controla las propiedades electrocinéticas del complejo. Siguiendo la teoría DLVO, si este pH es el que determina el estado eléctrico final de la partícula, será también el responsable de la estabilidad coloidal del sistema. En la Figura 5.2, por ejemplo, con un recubrimiento del 60% sobre la cantidad máxima de proteína capaz de acomodar el látex aniónico, sería entre pH 5 y 6 (punto isoeléctrico de este complejo látex-IgG policlonal) donde cabría esperar la menor estabilidad del sistema. Más adelante comprobaremos, sin embargo, que el estado eléctrico superficial del complejo no es el único responsable en la estabilidad coloidal de estas partículas, sino que deben existir otros fenómenos que hacen flocular también a los complejos incluso en condiciones electrostáticamente favorables para la estabilidad coloidal.

Para determinar la influencia que tiene en las propiedades electrocinéticas del complejo IgG policlonal-látex el grado de recubrimiento del anticuerpo sobre la superficie, hemos representado en las Figuras 5.3 y 5.4 la movilidad electroforética de las partículas con diferente cantidad de proteína adsorbida sobre su superficie en función del pH de redispersión para el caso del látex

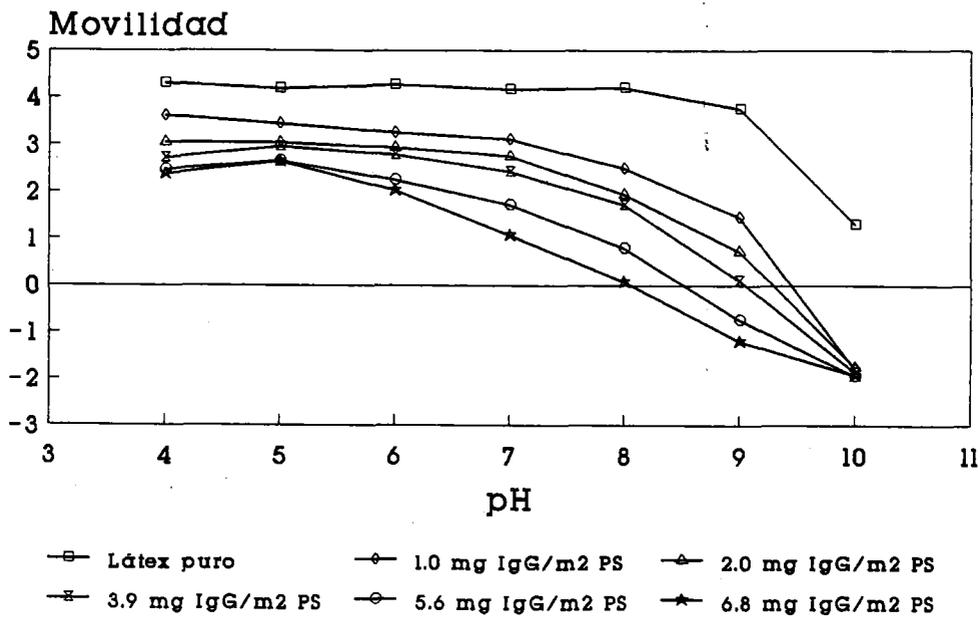


Fig. 5.4 *Movilidad de los complejos IgG policlonal-látex catiónico y del látex limpio en función del pH.*

aniónico y del látex catiónico, respectivamente. Podemos ver en estas Figuras como el grado de recubrimiento sí influye notoriamente en el estado eléctrico final de los complejos, variando su punto isoeléctrico en función de la cantidad de anticuerpo adsorbida. La forma de estas curvas nos demuestra que evidentemente es la proteína la que determina la estructura eléctrica superficial del complejo, ya que en todos los casos presenta una movilidad electroforética positiva a pH ácido y negativa a pH básico, lo cual es una característica propia de una macromolécula con numerosos grupos cargados con diferentes pK_a como es el caso de una proteína.

La muestra de IgG policlonal que se encuentra adsorbida sobre la superficie de ambos látexes es la misma, con un punto isoeléctrico promedio de alrededor de 7, por lo que tenemos que deducir de estas Figuras que las partículas poliméricas recubiertas completamente de anticuerpo no pueden ser consideradas como si estuviéramos determinando las propiedades electrocinéticas únicamente de la proteína que las cubre, ya que el resultado es diferente para ambos látexes.

En la Figura 5.5 hemos resumido esta situación representando la movilidad electroforética de los látexes limpios y completamente recubiertos de IgG policlonal en función del pH de redispersión, y donde podemos observar el diferente comportamiento electrocinético que presentan estos dos complejos. Este resultado está en franca contradicción con la suposición que

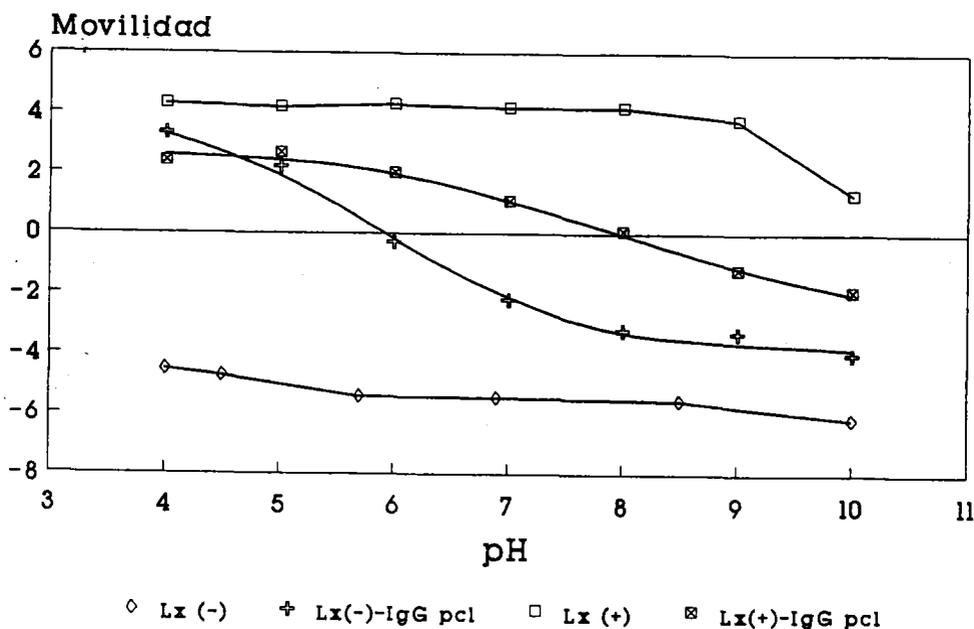
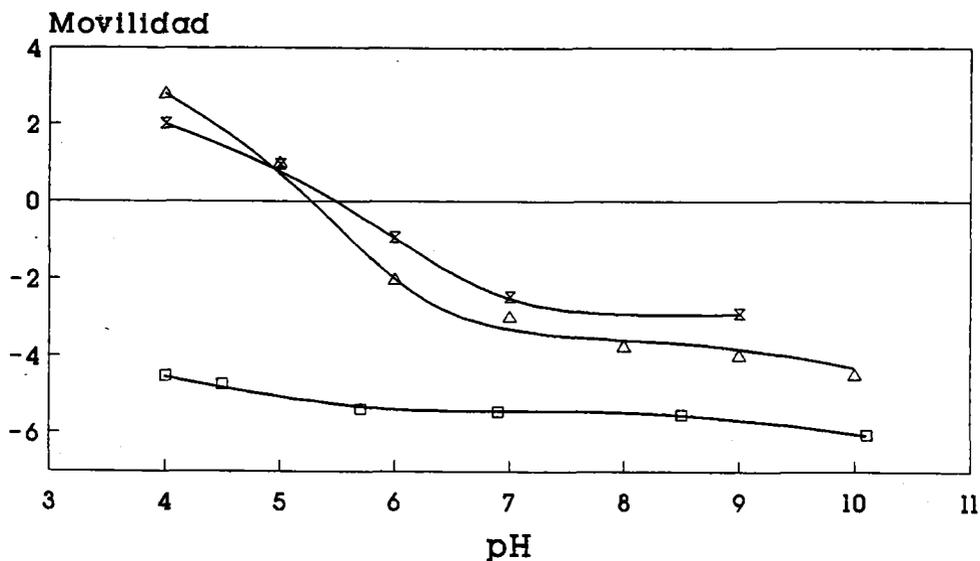


Fig. 5.5 Movilidad de los complejos IgG pol. con látex (+) y (-) y los látexes limpios en función del pH.

hacen Bagchi y Birnbaum (19) de que un coloide recubierto de proteína puede estudiarse electrocinéticamente y los resultados ser interpretados como los propios del estado eléctrico superficial de esa proteína en disolución. La Figura 5.5 demuestra que en un complejo látex-proteína, al menos en el caso de los anticuerpos (más adelante veremos que con la IgG monoclonal se obtienen resultados similares), la estructura superficial del coloide que hace de soporte también influye en las propiedades electrocinéticas de la partícula recubierta de proteína. Como era de esperar, el látex aniónico reduce el punto isoeléctrico del complejo con respecto al de la proteína en disolución, bajándolo hasta un pH de 6, mientras que el látex catiónico provoca el efecto contrario, aumentando el pI del complejo hasta un valor de 8.

Basándonos en este resultado hemos de suponer que parte de las cargas eléctricas de la proteína son neutralizadas por los grupos cargados de signo contrario de la superficie del látex, desplazando por tanto en este mismo sentido la carga eléctrica neta del anticuerpo adsorbido.

Otra característica importante a señalar en la Figura 5.5 es el hecho de que se observe una mayor movilidad electroforética en el complejo formado por la IgG policlonal y el látex aniónico a pH 4 que en el caso del complejo con látex catiónico. Este resultado es contradictorio con lo que cabría esperar, ya que en el látex catiónico a pH ácido tanto la molécula de anticuerpo como



□ Látex R-P △ Ads. 2 mM × Ads. 50 mM
Fig. 5.6 *Movilidad de los complejos IgG policlonal-látex aniónico y del látex limpio en función del pH.*

la superficie del látex tienen carga positiva, la cual debería sumarse y dar como resultado una movilidad electroforética mayor que en el caso del látex aniónico, donde la proteína debe tener una carga neta positiva de signo contrario a los grupos cargados de la superficie del látex, que son negativos incluso a pH 4. La explicación a este fenómeno debe proceder de los diferentes arreglos estructurales que la molécula de proteína sufre al adsorberse sobre una u otra superficie, y la implicación que estas variaciones pueden tener en la distribución de potencial y en la situación del plano de deslizamiento.

Ya hemos comentado en la Sección 5.3 sobre los modelos teóricos en superficies estructuradas que en algunos casos se ha encontrado que la movilidad electroforética de este tipo de partículas llega incluso a hacerse independiente de la posición del plano de deslizamiento (12,16), como consecuencia de que los grupos cargados se encuentran en una región superficial de cierto espesor (no en plano superficial rígido), y que esta zona de carga es además permeable a la entrada de iones de la disolución. Esta compleja situación puede provocar que el plano de deslizamiento hidrodinámico tal y como nosotros lo entendemos electrocinéticamente se encuentre incluso por debajo del límite exterior de la estructura látex-proteína adsorbida. Más adelante volveremos sobre este tema cuando tratemos la conversión de datos de movilidad

electroforética de los complejos en valores de potencial ζ , y entonces discutiremos las limitaciones de los tratamientos teóricos sobre la electroforesis en partículas recubiertas de proteína.

Siguiendo con el estudio de la influencia que tiene sobre el estado eléctrico final de los complejos anticuerpo-látex las diferentes condiciones en las que se puede producir la adsorción, hemos representado en la Figura 5.6 la movilidad electroforética en función del pH de redispersión para los complejos obtenidos en el proceso de adsorción de IgG policlonal sobre látex aniónico a fuerza iónica 2 mM y 50 mM, en ambos casos con el mismo grado de recubrimiento de proteína (3.3 mg IgG m⁻² PS para 2 mM y 3.4 mg IgG m⁻² PS para 50 mM). El pH del medio de adsorción fue en los dos casos de 7. Podemos ver en esta Figura que la fuerza iónica del medio en el que se produce la adsorción sí parece afectar la estructura final del complejo formado, y que la alteración que sobre la proteína adsorbida ha provocado el hecho de realizar el proceso a una fuerza iónica de 50 mM es irreversible aunque redispersemos el complejo de nuevo en una disolución tamponada de fuerza iónica 2 mM.

Para entender esta situación hay que tener en cuenta que la fuerza iónica en el proceso de adsorción influye decisivamente en las fuerzas que intervienen en dicho proceso, y esto tiene que redundar en la estructura final del complejo formado. Puesto que un aumento de la fuerza iónica implica un debilitamiento de las interacciones electrostáticas, hay que suponer que cuando el proceso se realiza a fuerza iónica baja, las orientaciones particulares que la molécula de anticuerpo puede adoptar como consecuencia de esta interacción desaparecen al aumentar la concentración de electrolito, en cuyo caso únicamente la interacción hidrofóbica sería la responsable de la orientación o de las alteraciones estructurales que la proteína sufre al adsorberse sobre la superficie. El hecho de que la movilidad electroforética del complejo anticuerpo-látex sea menor en valor absoluto que la del mismo complejo adsorbido a baja fuerza iónica tanto a pHs ácidos como básicos hace suponer una estructura más compacta de la región superficial y/o con mayor permeabilidad hacia los iones de la disolución, ya que esto implicaría una caída más rápida del potencial conforme nos alejamos de los centros de carga, y por tanto un menor potencial electrocinético en el plano de deslizamiento (independientemente del problema antes planteado de la verdadera situación de este plano). Puesto que el medio en el que se han redispersado las muestras es el mismo en los dos casos, mientras que en el proceso de adsorción las moléculas de anticuerpo se encontraban en medios de diferente fuerza iónica, podemos pensar que las moléculas de IgG que originalmente estaban en una disolución de fuerza

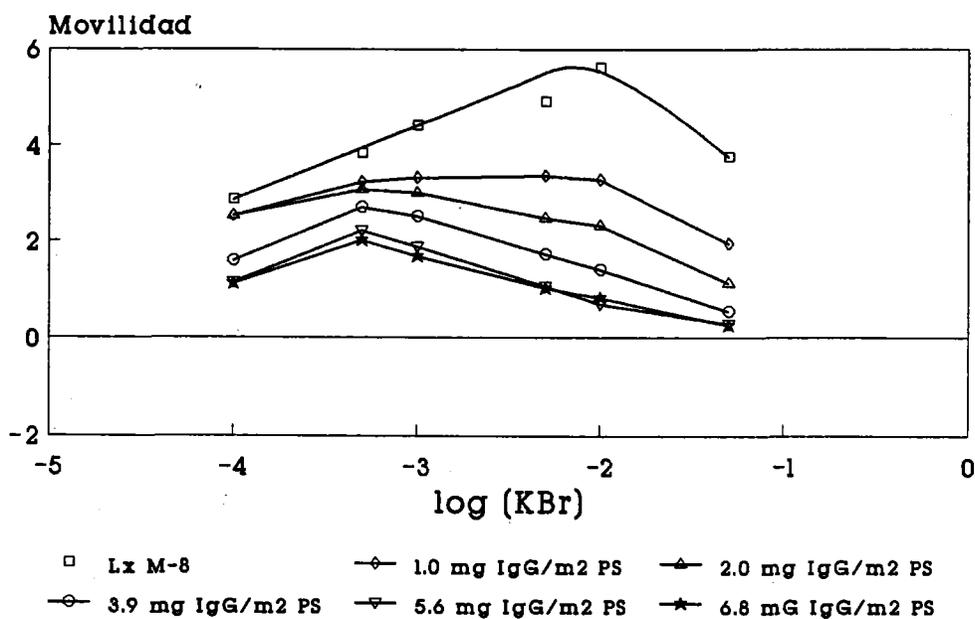


Fig. 5.7 *Movilidad de los complejos IgG policlonal-látex catiónico en función de la fuerza iónica.*

iónica alta (y que por tanto tendrían una estructura más compacta que las mismas moléculas en una disolución de fuerza iónica menor) se han unido a la superficie del látex manteniendo ese estado de compactación de modo irreversible, y provocando en consecuencia que el complejo presente una menor movilidad electroforética tanto a pH ácido como básico.

El caso contrario a éste, es decir, la resuspensión en medios de diferente fuerza iónica de muestras adsorbidas bajo las mismas condiciones de pH y concentración de electrolito se encuentra representado en la Figura 5.7. En esta experiencia se han adsorbido diferentes cantidades de IgG policlonal sobre látex catiónico a pH 7, y los complejos formados se han redispersado en disoluciones de KBr de concentración de electrolito creciente, en todos los casos a pH 6 (igual que en experiencias anteriores, el pH de estas disoluciones no varió más de ± 0.2 décimas de pH al añadir las partículas de látex recubiertas de proteína). Podemos ver en esta Figura como el recubrimiento de la superficie de la partícula de látex por parte de las moléculas de anticuerpo va provocando una disminución en la carga electrocinética efectiva de la partícula. Puesto que a pH 6 las moléculas de IgG policlonal prácticamente no tienen carga, ya que estamos en las proximidades del punto isoeléctrico (y en cualquier caso la carga neta de las moléculas sería ligeramente positiva, al estar a un pH más ácido que el pI promedio de esta

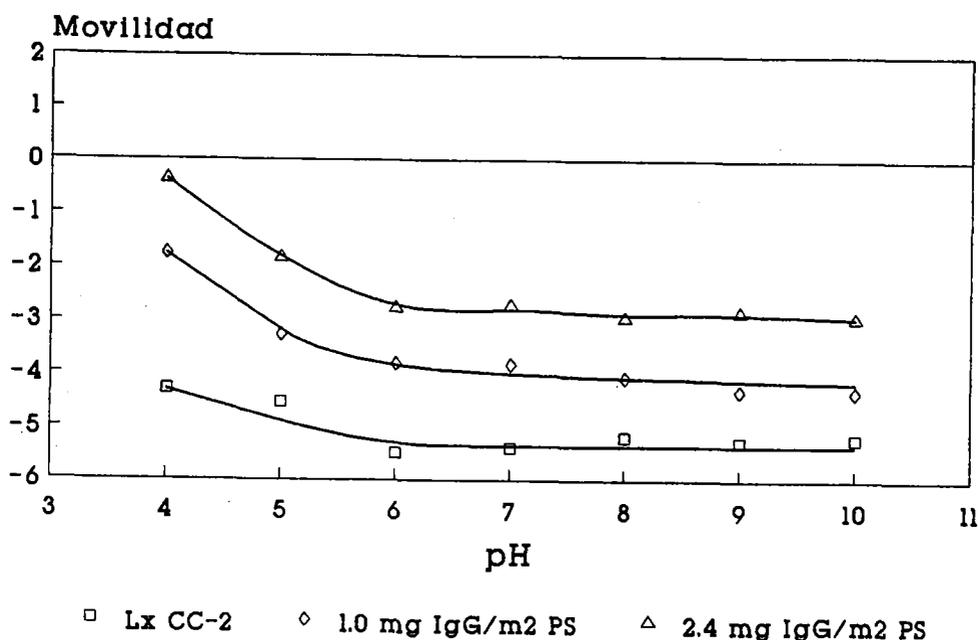


Fig. 5.8 *Movilidad de los complejos IgG policlonal-látex carboxílico y del látex limpio en función del pH.*

muestra de IgG policlonal), lo que estamos observando en esta Figura es el apantallamiento progresivo de las cargas eléctricas de la superficie del látex por parte de las moléculas de anticuerpo. La consecuencia lógica de esta disminución de carga efectiva es un descenso correlativo de la estabilidad coloidal del sistema, que como veremos en la Sección dedicada al estudio de dicha estabilidad coloidal se traduce efectivamente en una disminución de la concentración crítica de coagulación (c.c.c.) de las partículas a pH neutro (Tabla 5.3).

Para comprobar la influencia que tiene en el estado eléctrico final del complejo látex-proteína el tipo de superficie utilizada como soporte en el proceso de adsorción, además de las experiencias mostradas en las Figuras 5.3 y 5.4 donde se representaba la movilidad electroforética de los complejos obtenidos mediante la adsorción de IgG policlonal sobre látex aniónico y catiónico de poliestireno, respectivamente, en función del pH de redispersión, hemos realizado experimentos similares para el caso del látex copolimerizado con ácido acrílico. En la Figura 5.8 hemos representado estos resultados para dos grados de recubrimiento diferentes y para el látex carboxílico limpio.

Hay que tener en cuenta a la hora de examinar estos datos los resultados de las experiencias de adsorción de la IgG policlonal sobre este látex carboxílico, Figura 4.14, donde vemos que esta

proteína se adsorbía inicialmente en cantidades superiores a lo habitual a pHs neutros y ácidos, pero que posteriormente era desorbida en su mayor parte al redispersor los complejos en una disolución de fuerza iónica alta. Este comportamiento implica una gran cantidad de anticuerpo unida mediante interacción electrostática débil, por lo que las medidas de movilidad electroforética de los complejos se han realizado sobre las partículas que ya habían sido tratadas con la disolución de 500 mM de KBr, de modo que pudiéramos asegurar que las moléculas no serían desorbidas en el proceso de redispersión a diferentes pHs. Como consecuencia, el grado de recubrimiento no es muy alto ($2.4 \text{ mg IgG m}^{-2} \text{ PS/PAA}$), aunque sí es suficiente para comprobar que en este látex con una fuerte carga de grupos carboxílicos la proteína tiene menos capacidad de apantallamiento que en el caso de los látexes más hidrofóbicos y menos cargados.

En la Figura 5.8 podemos ver que, efectivamente el complejo látex-proteína no alcanza ni en el caso de mayor recubrimiento por parte del anticuerpo un punto isoeléctrico de 4, lo que quiere decir que la carga neta positiva de la proteína a este pH no es capaz de compensar la fuerte carga negativa del látex, a pesar incluso de que el propio hecho de la adsorción de la proteína en la superficie implica un desplazamiento hacia el exterior del plano de deslizamiento hidrodinámico, y por tanto una reducción en el potencial electrocinético.

En la Tabla 5.3 en la que se han resumido los datos de estabilidad coloidal de los tres látexes estudiados en el proceso de adsorción de IgG policlonal y monoclonal, veremos que en el caso del látex carboxílico con este recubrimiento intermedio de IgG policlonal los resultados no concuerdan con lo que cabría esperar a partir de los datos electrocinéticos. Efectivamente, la diferencia en estabilidad coloidal entre el mismo complejo redispersado a pH 7 y pH 9 es muy alta (50 mM y 200 mM, respectivamente), cuando sin embargo ambas presentan la misma movilidad electroforética. Este es uno de los múltiples ejemplos en los que no concuerdan los datos electrocinéticos con los de estabilidad coloidal, y que implican por tanto que además del estado eléctrico superficial de los complejos látex-anticuerpo también hay que tener en cuenta otros factores de tipo estérico y de puenteo entre moléculas de proteína y/o la superficie libre de las partículas para explicar el comportamiento coloidal de estos sistemas.

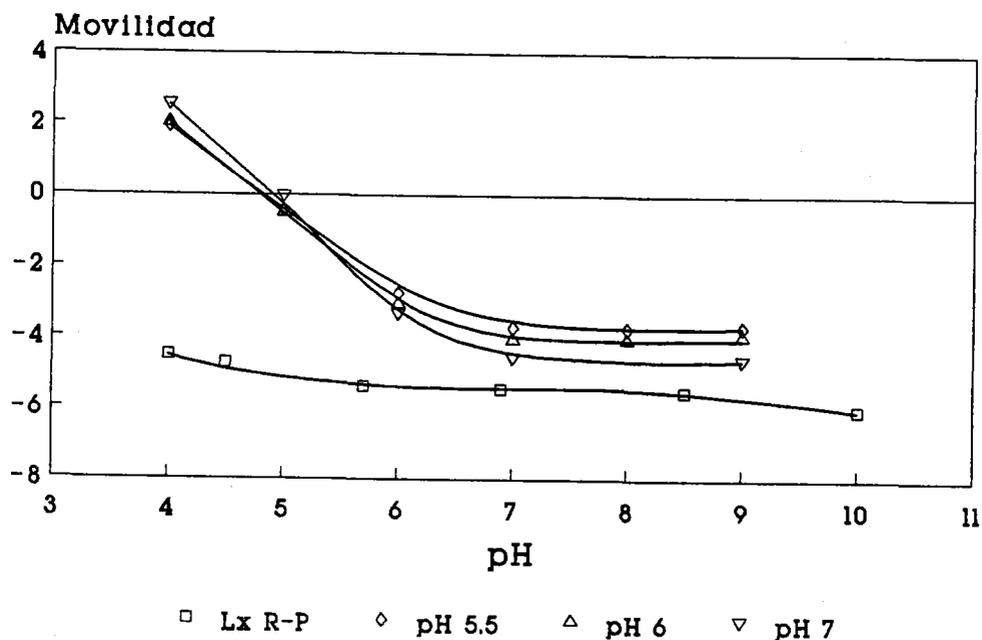


Fig. 5.9 *Movilidad de los complejos IgG m-1 (pI 5.5)-látex aniónico y del látex limpio en función del pH.*

5.5 COMPLEJOS IgG MONOCLONAL - LATEX

Al igual que en el caso de la IgG policlonal, los complejos formados por la adsorción de las dos muestras de IgG monoclonal sobre los distintos látexes también han sido estudiados electrocinéticamente para determinar el estado eléctrico de sus superficies, y poder relacionar este estado con la estabilidad coloidal.

Primeramente hemos determinado la movilidad electroforética de los complejos IgG monoclonal-látex en función del pH para diferentes grados de recubrimiento, y observar así el efecto producido por un aumento en el apantallamiento de los grupos superficiales del látex por parte de la proteína.

En la Figura 5.9 está representada la movilidad electroforética en función del pH de redispersión para los complejos formados por el anticuerpo monoclonal ácido, IgG m-1, con el látex aniónico de Rhône-Poulenc. Estos complejos son los obtenidos en condiciones de saturación a diferente pH, y por tanto tienen distinta cantidad de proteína en su superficie (Figura 4.15). En experiencias similares a la representada en la Figura 5.2 para el caso de la IgG policlonal sobre látex aniónico, hemos comprobado igualmente que el pH de adsorción no influye en las

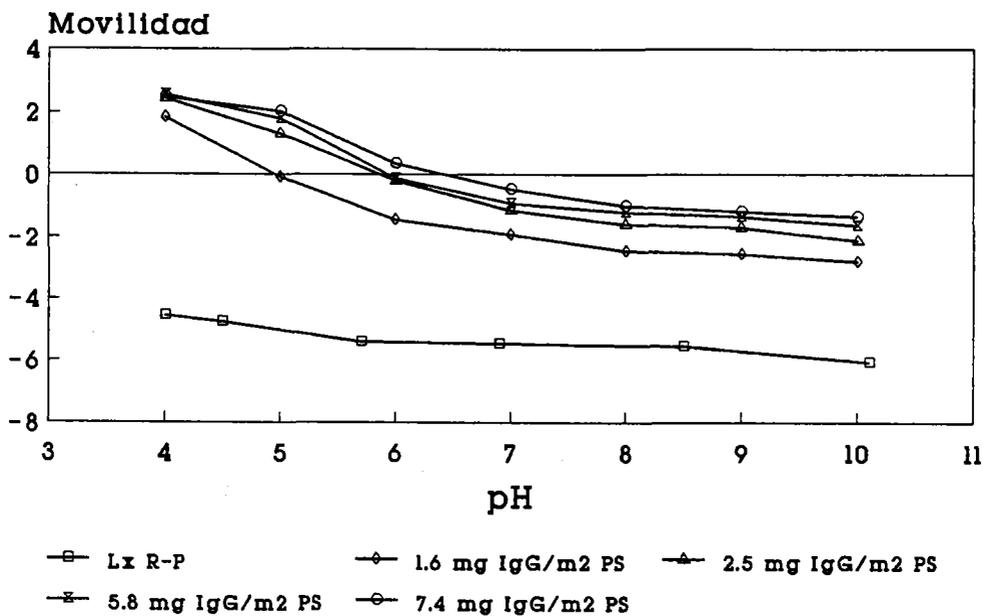


Fig. 5.10 *Movilidad de los complejos IgG m-2 (pI 7.8)-látex aniónico y del látex limpio en función del pH.*

propiedades electrocinéticas de los complejos formados con la IgG monoclonal, sino únicamente en la cantidad máxima adsorbida. Este comportamiento electrocinético está determinado, una vez más, por el pH de redispersión de las muestras.

Como se puede comprobar en la Figura 5.9, los resultados obtenidos con la IgG m-1 son similares a los de la IgG policlonal, salvo en un desplazamiento del punto isoeléctrico del complejo hacia valores más ácidos en una proporción semejante a la diferencia que también existe entre los pI de estas dos muestras en disolución. En el caso del anticuerpo monoclonal básico, sin embargo, los resultados son ligeramente diferentes.

En la Figura 5.10 están representados los datos de movilidad electroforética en función del pH para los complejos formados por el anticuerpo monoclonal básico, IgG m-2, y el látex aniónico Rhône-Poulenc para diferentes grados de recubrimiento. Aunque de la misma forma que en los casos anteriores el pI del complejo se encuentra situado en un valor de pH más bajo que el de la proteína en disolución, como consecuencia de la neutralización de grupos básicos de la molécula de proteína adsorbida por parte de los grupos ácido de la superficie de la partícula, hay que destacar que la pendiente de la variación de movilidad electroforética en función del pH de redispersión es mucho menor. Esto quiere decir que, a pesar de que la

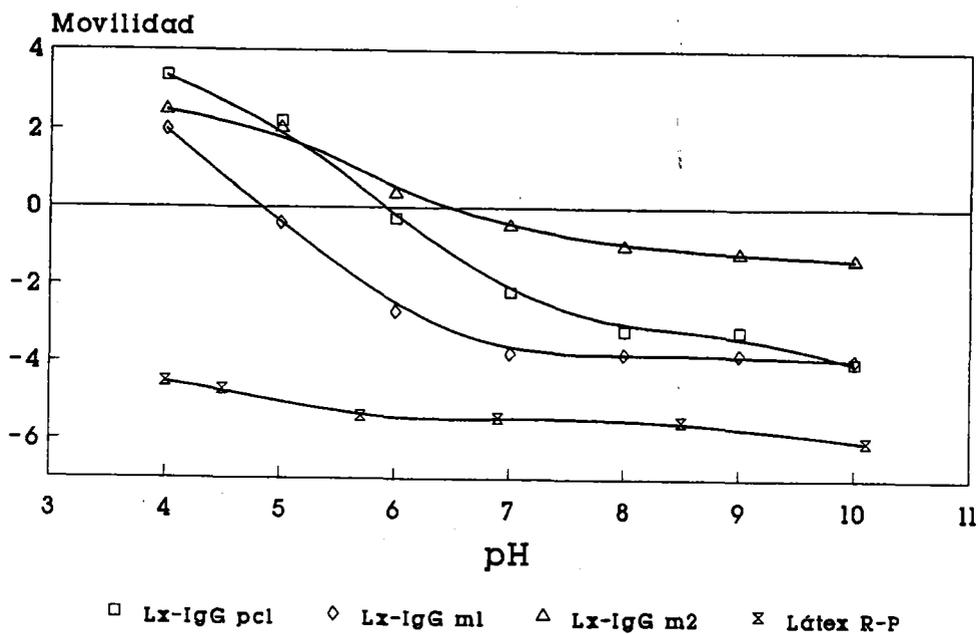


Fig. 5.11 Movilidad de los complejos de látex aniónico con IgG policlonal, IgG m-1, IgG m-2 y látex limpio.

cantidad de anticuerpo es mayor en el caso de este monoclonal ($7.4 \text{ mg IgG m}^{-2}$ PS frente a $5.9 \text{ mg IgG m}^{-2}$ PS para la IgG m-1), la carga eléctrica de esta proteína tiene una menor influencia en el comportamiento electrocinético neto del complejo.

Para poder comparar con más exactitud las propiedades electrocinéticas de los complejos formados por el látex aniónico con las tres muestras de anticuerpo, la IgG policlonal y las dos monoclonales, hemos representado en la Figura 5.11 los resultados para los tres sistemas en condiciones de máxima adsorción, donde suponemos que la partícula está completamente recubierta por una monocapa compacta de moléculas de anticuerpo a pesar de las ligeras diferencias en cantidad de proteína adsorbida (5.8 mg m^{-2} para la IgG policlonal, 5.9 mg m^{-2} para la IgG m-1, y 7.4 mg m^{-2} para la IgG m-2). En esta Figura podemos ver que efectivamente los resultados son muy similares para la IgG policlonal y el monoclonal ácido, IgG m-1, salvo en el desplazamiento del valor del pI del complejo y la movilidad electroforética a pH 10 de la partícula recubierta por IgG policlonal. No obstante, a este pH tan básico los resultados electrocinéticos son poco fiables, ya que se puede producir adsorción específica de los iones OH^- como ya comentamos en el Capítulo 3.

El complejo formado por el anticuerpo monoclonal básico y el látex aniónico, sin embargo, tiene un comportamiento diferente al de las otras muestras, presentando una menor pendiente de variación de la movilidad electroforética con el pH de redispersión, como hemos comentado antes. Puesto que el estado eléctrico superficial de una partícula de látex completamente recubierta de proteína está determinado fundamentalmente por esta última, y en este caso el soporte polimérico es el mismo, no cabe la menor duda de que estas diferencias de comportamiento electrocinético han de explicarse en base a la propia estructura de la proteína o a la orientación que estas moléculas adopten sobre la superficie. Como en estos tres casos representados en la Figura 5.11 la adsorción se realizó al pH de máxima adsorción, que evidentemente está en las cercanías del punto isoeléctrico de la propia proteína, hemos de suponer también que la carga eléctrica neta de la molécula de IgG en disolución era prácticamente nula, y que por lo tanto el mecanismo de adsorción debe ser hidrofóbico y similar para las tres muestras de anticuerpo. Esto implicaría una orientación del mismo tipo para las tres clases de moléculas, y dejaría como responsable del diferente comportamiento electrocinético del complejo látex-IgG m-2 a la propia estructura del anticuerpo adsorbido sobre la superficie. El hecho de que se adsorba también una cantidad mayor de anticuerpo monoclonal básico, cuando el proceso de adsorción se ha realizado en este caso a pH 9 (y por tanto la carga eléctrica neta de la molécula de proteína en disolución era ligeramente negativa, del mismo signo que la presente en la superficie de la partícula), quiere decir que esta molécula ocupa al adsorberse una menor área superficial que las otras dos muestras, es decir, se adsorbe en una forma más compacta.

Si recordamos la Figura 5.6, en la que representábamos la movilidad electroforética en función del pH de redispersión para los complejos formados por IgG policlonal y látex aniónico en las mismas condiciones de adsorción y grado de recubrimiento, salvo la fuerza iónica a la que se había realizado dicho proceso de adsorción, veremos que el resultado obtenido cuando el complejo se había formado en condiciones de fuerza iónica alta es similar al que obtenemos ahora para el caso del anticuerpo monoclonal básico. La explicación al diferente comportamiento electrocinético de los complejos formados con fuerza iónica alta se relacionó entonces con la estructura más compacta que tiene una proteína en disolución cuando la concentración de electrolito es mayor (debido fundamentalmente a la flexibilidad de una molécula de proteína globular, cuya estructura varía considerablemente en función del pH y la fuerza iónica del medio en que se encuentra (28), para más detalle, ver Apéndice II). Cuando esta molécula más

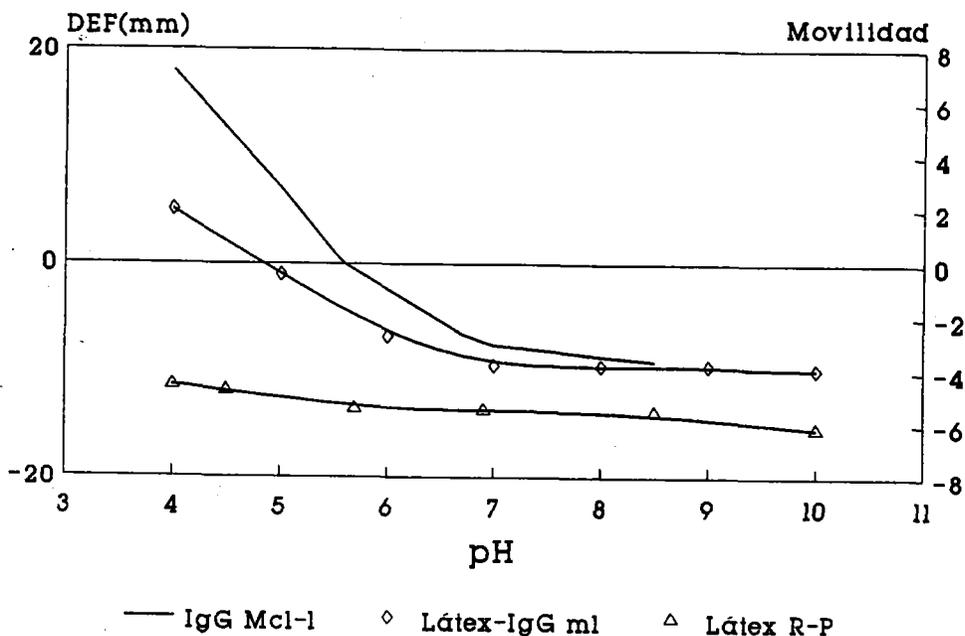


Fig. 5.12 *Desplazamiento electroforético de la IgG m-1 y movilidad del complejo con látex aniónico.*

compacta se adsorbe sobre la superficie de la partícula, se deben producir interacciones hidrofóbicas irreversibles que dejan a la proteína adsorbida con una estructura que permite menos arreglos conformacionales posteriores, aunque el complejo se redispersa de nuevo en una disolución de baja fuerza iónica. Este empaquetamiento molecular, dado el bajo grado de recubrimiento que se alcanza en condiciones de fuerza iónica alta debe provocar, sin embargo, que la molécula se adsorba en posición lateral, o que si lo hace en posición vertical presente una estructura muy aplastada longitudinalmente.

En el caso del anticuerpo monoclonal básico, por el contrario, la cantidad de proteína adsorbida es bastante alta, superior incluso a la calculada para una monocapa teórica de moléculas de IgG en posición vertical sobre una superficie de poliestireno, que varía según los autores entre 6 y 7 mg m⁻² PS (19,29,30). Esto quiere decir que si la explicación al diferente comportamiento electrocinético de los complejos formados con este anticuerpo se basa en una estructura más compacta de su molécula en disolución (como consecuencia de su composición en aminoácidos, de los que únicamente sabemos que predominan los de tipo básico sobre los de tipo ácido), este reajuste provoca que la molécula adsorbida ocupe una menor área superficial cuando se encuentra en posición vertical.

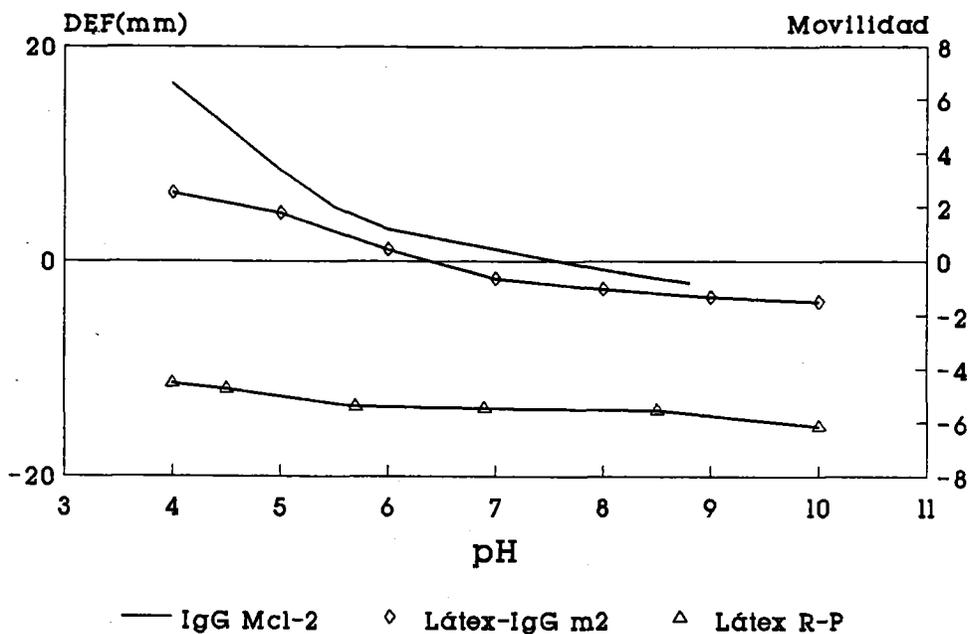


Fig. 5.13 *Desplazamiento electroforético de la IgG m-1 y movilidad del complejo con látex aniónico.*

Para comprobar el estado eléctrico que presenta la superficie exterior de una molécula de proteína es posible realizar un experimento de tipo electroforético en el que se determina de forma relativa el desplazamiento que sufre esta molécula hacia uno u otro de los electrodos en función del pH. Esta técnica, denominada isoelectroenfoque en dos dimensiones (2D-IEF), está basada en una modificación de la utilizada para el isoelectroenfoque normal, y consiste básicamente en girar 90° la placa con el gel de corrimiento de la proteína una vez que el gradiente de pH se ha establecido y ha quedado estabilizado. Se sitúa entonces en la línea central horizontal la muestra de proteína y se aplica el campo eléctrico, y en cada banda de pH las moléculas se desplazaron en un sentido o en otro dependiendo de la carga que la proteína tenga a ese pH, moviéndose más rápido evidentemente las más cargadas. De esta forma se obtiene un valor relativo del desplazamiento electroforético (DEF) en función del pH, y puede interpretarse como una descripción cualitativa del estado eléctrico superficial de la proteína en disolución (no sirve para una interpretación electrocinética cuantitativa, ya que no podemos medir realmente la velocidad instantánea de desplazamiento, ni factores como la viscosidad o la constante dieléctrica del medio, que en este caso es un gel de poliacrilamida).

En las Figuras 5.12 y 5.13 hemos representado, respectivamente, el desplazamiento electroforético de las muestras de IgG monoclonal ácido (IgG m-1) y básico (IgG m-2) en función del pH, así como los datos de movilidad electroforética del látex aniónico de Rhône-Poulenc limpio y del complejo formado por este látex y la muestra de anticuerpo correspondiente. En estas Figuras podemos ver que el comportamiento electrocinético de los complejos sigue una tendencia similar al de las proteínas en disolución, y efectivamente se observa como la curva de desplazamiento electroforético del anticuerpo monoclonal básico en función del pH tiene también menos pendiente que la correspondiente al anticuerpo monoclonal ácido, de la misma forma que ocurre con las curvas de movilidad electroforética de los complejos. Esto quiere decir que conforme nos alejamos del punto isoeléctrico, la IgG m-2 adquiere menos carga que la IgG m-1. Esta diferencia puede deberse a la existencia de un número menor de grupos cargados en su molécula, lo que efectivamente provocaría una situación similar a la que se produce cuando la fuerza iónica aumenta y las interacciones electrostáticas se debilitan. Al eliminarse las posibles repulsiones eléctricas entre grupos cargados del mismo signo, la interacción hidrofóbica que mantiene la estructura de la proteína en su forma globular se hace más fuerte y provoca una estructura más compacta de la molécula. Cuando esta proteína menos flexible se adsorbe sobre una superficie, tiene menos posibilidad de sufrir alteraciones estructurales, a la vez que aporta menos carga eléctrica al complejo. Como la capacidad de apantallamiento de la carga superficial del látex es, sin embargo, la misma que en los otros casos, el complejo presenta una carga eléctrica neta bastante baja, y como veremos en la Tabla 5.3 referente a la estabilidad coloidal de estos sistemas, los complejos formados con el anticuerpo monoclonal básico tienen muy poca estabilidad.

En la Figura 5.14 podemos ver el comportamiento electrocinético de los complejos formados en la adsorción de diferentes cantidades de anticuerpo monoclonal ácido, IgG m-1, sobre el látex catiónico M-8. Al igual que en el caso del látex aniónico, conforme aumenta la cantidad de proteína adsorbida sobre la superficie el comportamiento electrocinético se asemeja cada vez más al de la propia proteína en disolución, llegando a tener el complejo con el máximo recubrimiento un pI cercano al del anticuerpo en disolución. Este valor de punto isoeléctrico no se alcanza, lo que demuestra que efectivamente la carga eléctrica en la superficie de la partícula neutraliza algunos de los grupos cargados de signo contrario de la molécula de proteína.

Para comparar las propiedades electrocinéticas de los complejos formados por este anticuerpo monoclonal, el IgG m-1, sobre látex aniónico y catiónico, y relacionarlas a su vez con el

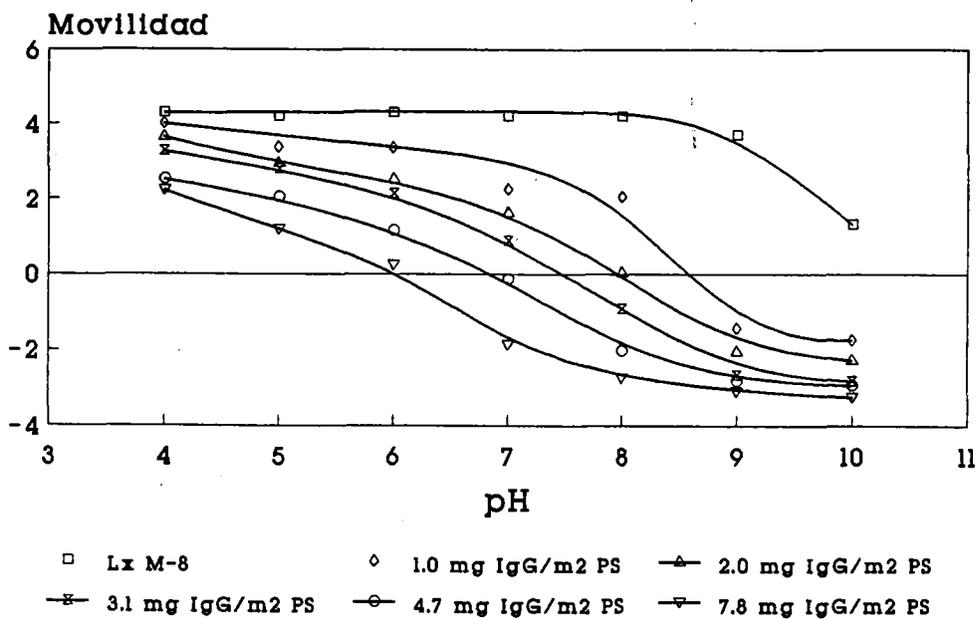


Fig. 5.14 *Movilidad de los complejos IgG m-1 (pI 5.5)-látex catiónico y del látex limpio en función del pH.*

comportamiento electroforético de la proteína en disolución, hemos representado todos estos datos en la Figura 5.15 junto con las movilidades electroforéticas de los látexes limpios en función del pH. Como se ve en esta Figura, los resultados obtenidos para ambos complejos son muy similares, aunque simétricos con respecto a los datos de la proteína aislada.

Lo más destacable de las propiedades electrocinéticas de los complejos es la menor movilidad electroforética en todos los casos de las partículas de látex catiónico, a pesar de que en principio tienen incluso una mayor cantidad de proteína adsorbida. Recordemos que en la representación similar a ésta que hicimos en la Figura 5.5 para el caso de la IgG policlonal ocurría lo mismo, es decir, los complejos formados con el látex catiónico presentaban menor movilidad electroforética que los similares formados con látex aniónico. Al igual que entonces, hemos de explicar estas diferencias en base a los diferentes arreglos estructurales que la molécula de proteína puede sufrir al adsorberse sobre una u otra superficie, y a la implicación que estas diferencias pueden tener en la distribución de potencial alrededor de la partícula y en la situación del teórico plano de deslizamiento hidrodinámico, ambos parámetros responsables de la movilidad electroforética que presentan estos complejos. También debe tenerse en cuenta que

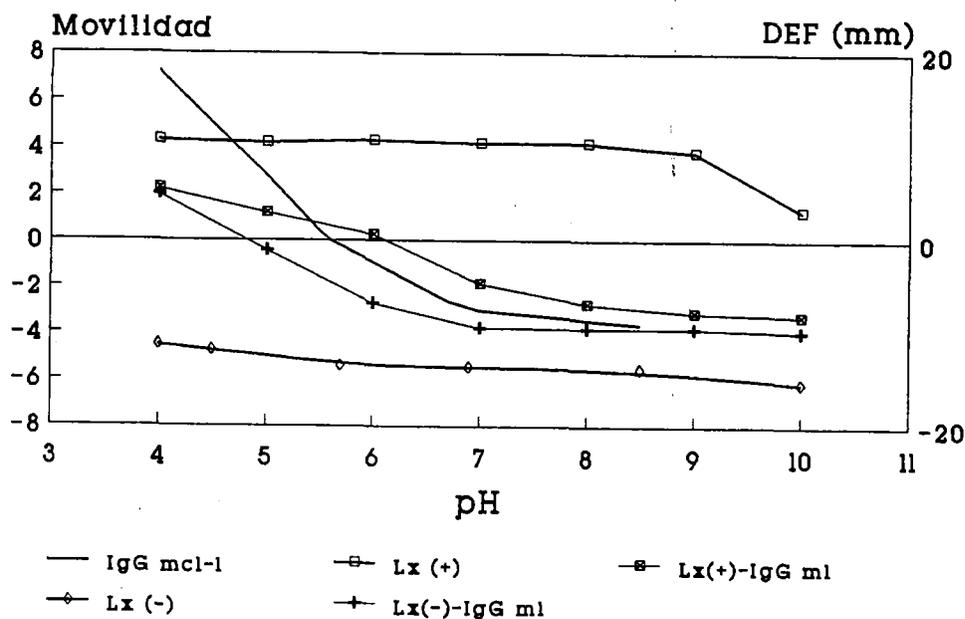


Fig. 5.15 *Desplazamiento electroforético de la IgG m-1 y movilidad de los complejos con látex (+) y (-).*

el látex catiónico tiene una densidad de carga eléctrica mayor, y por lo tanto, tiene una mayor efecto de neutralización de los grupos iónicos superficiales de las proteínas.

En cualquier caso, una menor movilidad electroforética representa en principio una menor carga superficial, y en consecuencia una menor estabilidad coloidal. En la próxima sección, dedicada precisamente al estudio de la estabilidad coloidal de estos complejos veremos que efectivamente los formados con látex catiónico son mucho menos estables que los similares con látex aniónico.

Del mismo modo que hicimos con la IgG policlonal, también para la IgG monoclonal hemos estudiado la influencia que tiene la fuerza iónica del medio de resuspensión en las propiedades electrocinéticas de los complejos. Para poder comparar con los resultados de la Figura 5.7, en la que se representaron estos datos para el caso de la IgG policlonal sobre látex catiónico con diferentes grados de recubrimiento, hemos representado en la Figura 5.16 los datos similares obtenidos con el anticuerpo monoclonal ácido, IgG m-1, también sobre látex catiónico con diferentes cantidades de proteína adsorbida. Si comparamos ambas Figuras, podremos ver que los resultados son prácticamente los mismos en ambos casos. En el caso de la IgG policlonal comentamos que estos datos podían interpretarse como una medida del efecto de

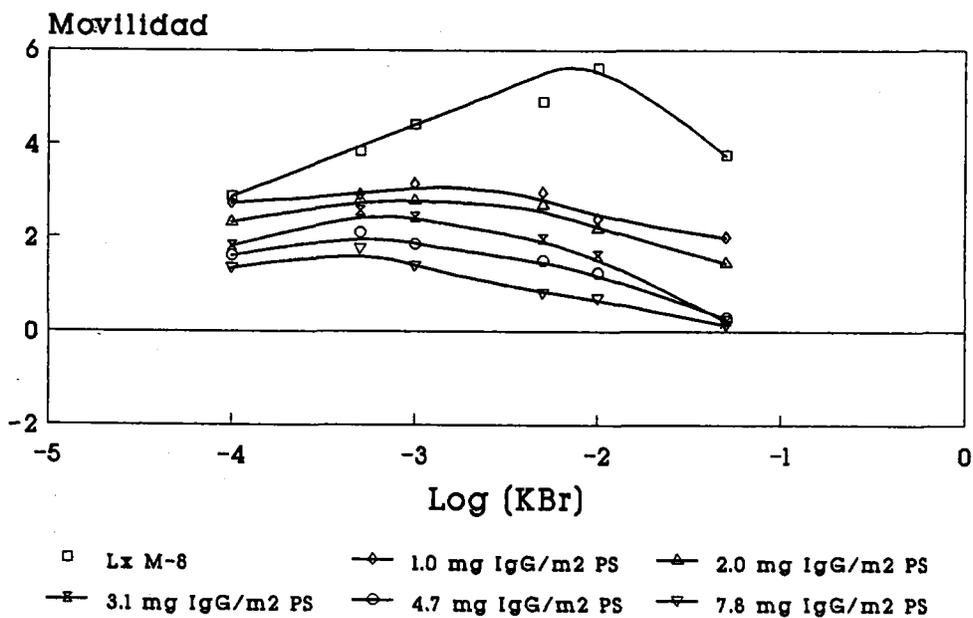


Fig. 5.16 *Movilidad de los complejos IgG m-1 (pI 5.5)-látex catiónico en función de la fuerza iónica.*

apantallamiento creciente de los grupos eléctricos de la superficie del látex por parte de las moléculas de anticuerpo, y a la vista de los resultados de ambas Figuras podemos decir que este efecto se produce de forma similar con ambas muestras (hay que tener en cuenta que en el caso de la IgG monoclonal las medidas se han realizado a pH 5, con objeto de mantener el sistema estable a la vez que asegurábamos que prácticamente no había carga neta en la molécula de proteína, y determinar de esa forma sólo el efecto de apantallamiento).

En el caso del látex carboxílico recubierto de IgG monoclonal, Figura 5.17, podemos ver que su comportamiento electrocinético es similar también al que tenía recubierto de IgG policlonal, excepto por la mayor cantidad de proteína en su superficie. Al igual que entonces ni siquiera la partícula con más anticuerpo adsorbido alcanza un pI de 4, lo que nos demuestra que la carga positiva neta de la molécula de IgG no es suficiente para que el complejo presente una movilidad electroforética positiva, y que por tanto son los grupos superficiales negativos de la partícula los que imponen la carga eléctrica total del complejo.

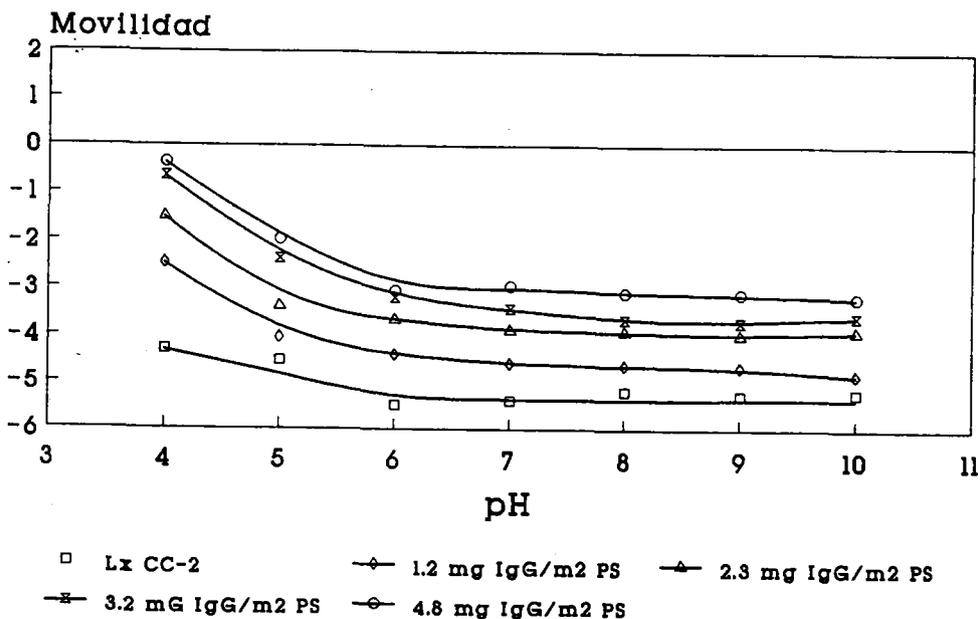


Fig. 5.17 Movilidad de los complejos IgG m-1 (pI 5.5)-látex carboxílico y del látex limpio en función del pH.

5.6 ESTABILIDAD COLOIDAL DE LOS COMPLEJOS

En la Tabla 5.3 se encuentran resumidos los datos de concentración crítica de coagulación (c.c.c.) obtenidos para los tres látexes estudiados en estos dos Capítulos, en una situación de máximo recubrimiento de cada una de las muestras de IgG adsorbidas en su superficie. En la primera fila de cada apartado hemos indicado, además, la c.c.c. de los látexes en ausencia de proteínas adsorbidas.

El estudio de la estabilidad coloidal de los complejos látex-anticuerpo se ha llevado a cabo a tres pHs diferentes, 5, 7 y 9, para cubrir todas las posibilidades en el estado eléctrico superficial de dichos complejos, y poder relacionar así las propiedades electrocinéticas de las partículas con su estabilidad frente a la concentración de electrólito en el medio.

En el caso de la IgG policlonal, por ejemplo, podemos ver que la estabilidad coloidal de sus complejos es bastante baja en general. Únicamente con el látex carboxílico a pH 9 es muy estable, aunque esto le ocurre a todas las muestras en esta situación. Es evidente que a este pH tan básico los grupos carboxílicos están todos cargados eléctricamente, y puesto que el nivel de ocupación por parte de las proteínas es bastante bajo, la repulsión electrostática provoca que las

cadena polimérica superficial estén muy extendidas hacia la disolución, impidiendo el acercamiento entre partículas a pesar de que a fuerzas iónicas altas la interacción electrostática prácticamente no exista.

Tabla 5.3 Estabilidad coloidal de los látexes limpios y recubiertos de IgG.

c.c.c. (mM)

| Látex | IgG | pH 5 | pH 7 | pH 9 |
|-------|--------------|-------|-------|-------|
| M-8 | --- | 150 | 150 | 120 |
| | Policlonal | 30 | < 10 | < 10 |
| | Monoclonal 1 | 20 | < 10 | 30 |
| | Monoclonal 2 | 20 | < 10 | < 10 |
| R-P | --- | 40 | 60 | 60 |
| | Policlonal | 80 | < 10 | 20 |
| | Monoclonal 1 | < 10 | > 200 | > 200 |
| | Monoclonal 2 | < 10 | < 10 | < 10 |
| CC-2 | --- | 180 | > 200 | > 200 |
| | Policlonal | 40 | 50 | > 200 |
| | Monoclonal 1 | > 200 | > 200 | > 200 |
| | Monoclonal 2 | < 10 | 50 | > 200 |

La IgG policlonal, con el látex de Rhône-Poulenc a pH 5, es capaz de mantenerse estable hasta una concentración de KBr de 80 mM, que excepto en el caso del látex carboxílico a pH 9 es la mayor c.c.c. que soporta. Es bastante contradictorio, sin embargo, que teniendo signo contrario la superficie de la partícula (negativa) y la carga eléctrica neta de la proteína (positiva), la c.c.c. de este complejo sea superior a la del caso similar con látex catiónico donde ambos componentes tienen carga eléctrica positiva. Al estudiar la movilidad electroforética de estos complejos ya vimos que las propiedades electrocinéticas de estas partículas también contradecían

lo esperado (Figura 5.5), y entonces se justificó este comportamiento en base a una diferente disposición de las moléculas sobre la superficie. En la Figura 5.5 podemos ver que la movilidad electroforética de estos dos complejos es muy parecida a pH 5, por lo que la diferencia en su estabilidad coloidal debe proceder de otros mecanismos no electrostáticos, posiblemente los mismos que también provocan el comportamiento electrocinético anormal. Para el caso del látex catiónico a pH 5 hemos de pensar en fenómenos de puenteo entre moléculas de proteína adsorbida o entre éstas y zonas libres de la superficie como posible explicación a la poca estabilidad coloidal de sus complejos con IgG policlonal (31,32).

En general, podemos ver que las partículas de látex catiónico recubiertas de anticuerpo no son muy estables con ninguna de las muestras, mientras que el látex limpio sí es muy estable coloidalmente. Parece ser que la mayor afinidad que este tipo de látex tiene hacia las moléculas de anticuerpo se traduce también en una mayor afinidad de los complejos entre sí, ya que incluso en situaciones en que la estabilidad coloidal debiera estar favorecida electrostáticamente se produce la floculación del sistema con concentraciones muy bajas de electrólito.

Por el contrario, el látex aniónico sí se comporta de modo general más acorde con lo que cabría esperar a partir de las consideraciones eléctricas superficiales de las partículas y de sus propiedades electrocinéticas en el caso del anticuerpo monoclonal ácido, IgG m-1, ya que a pH 7 y 9, donde presentaba una alta movilidad electroforética negativa es muy estable (Figura 5.11), mientras que a pH 5, donde prácticamente no presenta movilidad electroforética (proximidad del pI del complejo) no tiene estabilidad coloidal alguna. Lo más destacable en este caso es, además, el hecho de que la c.c.c. de estos complejos a pH 7 y 9 sea muy superior a la de las mismas partículas en ausencia de anticuerpo, cuando sin embargo estas últimas presentan una movilidad electroforética negativa mayor (Figura 5.11). Estos resultados nos demuestran que tanto en la estabilización como en la desestabilización de partículas de látex recubiertas de anticuerpo hay numerosos factores involucrados además de los puramente electrostáticos. En el caso antes mencionado, por ejemplo, deben existir impedimentos estéricos que impiden que los complejos se aproximen y se unan, aumentando de esa forma la estabilidad coloidal.

El anticuerpo monoclonal básico, IgG m-2, tiene en todos los casos una estabilidad coloidal muy baja (excepto en el látex carboxílico CC-2 a pH 9, donde todas las muestras son estables), lo que en principio está de acuerdo con la escasa movilidad electroforética que presentan sus complejos (Figura 5.11). A pesar de ello, las c.c.c. de estas partículas son extremadamente bajas, y hemos de suponer que existen fenómenos de adhesión entre moléculas de anticuerpo

adsorbidas de diferentes partículas que expliquen esta escasa estabilidad coloidal. En el caso de este anticuerpo hemos de recordar, además, la menor densidad de grupos cargados de su molécula y la tendencia a la autoagregación, factores que sin lugar a dudas deben favorecer también la floculación de los complejos formados con esta proteína.

En el caso del látex carboxílico CC-2, que presentaba prácticamente el mismo comportamiento electrocinético cuando estaba recubierto de IgG policlonal y de IgG m-1 (Figuras 5.8 y 5.17, respectivamente), podemos ver otro ejemplo de la influencia que tiene la propia molécula de proteína en la estabilidad coloidal del complejo. A pHs 5 y 7, en los que la partícula recubierta de IgG policlonal soporta una concentración de electrólito mucho menor que cuando están recubiertas del anticuerpo monoclonal ácido, ambas presentan movibilidades electroforéticas similares. Sin embargo, hemos de tener en cuenta que el grado de recubrimiento en estos dos casos era muy diferente (2.4 mg IgG policlonal m^{-2} frente a 4.8 mg IgG monoclonal m^{-2}). Esto quiere decir que en el caso de la IgG policlonal pueden existir zonas libres en la superficie de la partícula, y es posible que esto facilite un fenómeno de puenteo entre moléculas de proteína adsorbidas en una partícula y la superficie libre de otra que explique la baja estabilidad coloidal de estos complejos (31,32).

5.7 REFERENCIAS

- (1) Derjaguin, B.V. y Landau, L.D., *Acta Physicochim.* **14**, 633 (1941).
- (2) Verwey, E.J.W. y Overbeek, J.Th.G., en *Theory of Stability of Lyophobic Colloids*, Elsevier Publishing Co., Amsterdam (1948).
- (3) Norde, W. y Lyklema, J., *J. Colloid Interface Sci.* **66** (2), 277 (1978).
- (4) Dalgleish, D.G., Dickinson, E. y Whyman, R.H., *J. Colloid Interface Sci.* **108** (1), 174 (1985).
- (5) Shirahama, H., Takeda, K. y Suzawa, T., *J. Colloid Interface Sci.* **109** (2), 552 (1986).
- (6) Tamai, H., Fujii, A. y Suzawa, T., *J. Colloid Interface Sci.* **118** (1), 176 (1987).
- (7) Elgersma, A.V., Zsom, R.L.J., Norde, W. y Lyklema, J., *J. Colloid Interface Sci.* **138** (1), 145 (1990).
- (8) Suzawa, T. y Shirahama, H., *Adv. Colloid Interface Sci.* **35**, 139 (1991).
- (9) Nakamura, M., Ohshima, H. y Kondo, T., *J. Colloid Interface Sci.* **149** (1), 241 (1992).
- (10) Donath, E. y Pastushenko, V., *Bioelectrochem. Bioenerg.* **6**, 543 (1979).
- (11) Jones, I.S., *J. Colloid Interface Sci.* **68** (2), 385 (1982).

- (12) Wunderlich, R.W., *J. Colloid Interface Sci.* **88** (2), 385 (1982).
- (13) Levine, S., Levine, M., Sharp, K.A. y Brooks, D.E., *Biophys. J.* **47**, 563 (1985).
- (14) Sharp, K.A. y Brooks, D.E., *Biophys. J.* **42**, 127 (1985).
- (15) Ohshima, H. y Kondo, T., *J. Colloid Interface Sci.* **114** (2), 1081 (1986).
- (16) Ohshima, H. y Kondo, T., *J. Colloid Interface Sci.* **116** (2), 305 (1987).
- (17) Ohshima, H. y Kondo, T., *J. Colloid Interface Sci.* **130** (2), 281 (1989).
- (18) Kawahata, S., Ohshima, H., Muramatsu, N. y Kondo, T., *J. Colloid Interface Sci.* **138** (1), 182 (1990).
- (19) Bagchi, P. y Birnbaum, S.M., *J. Colloid Interface Sci.* **83** (2), 460 (1981).
- (20) Norde, W. y Lyklema, J., *J. Colloid Interface Sci.* **66** (2), 285 (1978).
- (21) Lyklema, J., *J. Colloid Interface Sci.* **58** (2), 242 (1977).
- (22) Ter-Minassian-Saraga, L. y Thomas, C., *J. Colloid Interface Sci.* **48** (1), 42 (1974).
- (23) Thomas, C. y Ter-Minassian-Saraga, L., *J. Colloid Interface Sci.* **56** (2), 412 (1976).
- (24) Norde, W. y Lyklema, J., *J. Colloid Interface Sci.* **66** (2), 266 (1978).
- (25) Okubo, M., Yamamoto, Y., Uno, M., Kamei, S. y Matsumoto, T., *Colloid and Polym. Sci.* **265**, 1061 (1987).
- (26) Van Dulm, P. y Norde, W., *J. Colloid Interface Sci.* **91** (2), 248 (1983).
- (27) Illum, L. y Jones, Ph.D.E., *Methods in Enzymology* **112**, 67 (1985).
- (28) Tanford, C., *Adv. Protein Chem.* **23**, 121 (1968).
- (29) Soderquist, M.E. y Walton, A.G., *J. Colloid Interface Sci.* **75** (2), 386 (1980).
- (30) Fair, B.D. y Jamieson, A.M., *J. Colloid Interface Sci.* **77** (2), 525 (1980).
- (31) Serra Domènech, J., Tesina de Licenciatura, Universitat Autnoma de Barcelona (1991).
- (32) Singer, J.M., Vekemans, F.C.A., Lichtenbelt, J.W.Th., Hesselink, F.Th. y Wiersema, P.H., *J. Colloid Interface Sci.* **45** (2), 608 (1973).

APENDICE I

POLIMERIZACION EN EMULSION

- I.1 INTRODUCCION**
- I.2 MECANISMO Y CINETICA DE LA REACCION**
- I.3 TEORIA CINETICA**
- I.4 TRANSFERENCIA DE CADENAS Y MODIFICACION DE LA POLIMERIZACION**
- I.5 GRADO DE CONVERSION Y TERMINACION**
- I.6 POLIMERIZACION EN EMULSION SIN EMULSIFICANTE**
- I.7 PREDICCION DEL TAMAÑO DE PARTICULA**
- I.8 REFERENCIAS**

APENDICE I

POLIMERIZACION EN EMULSION

I.1 INTRODUCCION

El estudio de la polimerización en emulsión probablemente tuvo su origen en las observaciones realizadas por algunos científicos de la Antigüedad sobre las propiedades de diversos látexes y resinas exudadas de forma natural por numerosas plantas. El más importante de estos es, sin lugar a dudas, el látex de caucho natural, que es una dispersión coloidal de partículas de poliisopreno en agua con aspecto lechoso, y que está protegida de la coagulación por proteínas y emulsificantes naturales. La primera referencia conocida sobre polimerización en emulsión está recogida en una patente alemana de 1.909 perteneciente a la compañía Bayer. En esta patente y en otras firmadas por Hofmann y col. en 1.912 se refiere el uso de gelatina, clara de huevo (proteínas), almidón, harina y suero sanguíneo como protectores coloidales en un intento de reproducir algo que se asemejara al látex de caucho natural. En aquellos entonces la iniciación de la reacción de polimerización ocurría fortuitamente, y el desarrollo de la reacción dependía del oxígeno atmosférico; el resultado era una polimerización muy lenta, y se necesitaban semanas para conseguir una cantidad apreciable de polímero. Una patente germana posterior de Klatte y Rollet en 1.914 es muy significativa a este respecto, ya que menciona el uso de compuestos liberadores de oxígeno para ser añadidos como activadores de la reacción. En 1.912 Kondakow describió el uso de una mezcla de dos monómeros diferentes, y de esta forma podemos decir que todos los elementos esenciales implicados en la reacción de polimerización en emulsión ya eran conocidos antes de la Primera Guerra Mundial.

El interés principal de este tipo de investigación se centraba básicamente en la búsqueda de un caucho sintético que pudiera sustituir al natural, y fue hacia el final de los años 20 cuando comenzó el desarrollo industrial de este tipo de procesos de polimerización. En 1.927 una patente de la I.G. Farben Company describía la polimerización del butadieno para producir un látex sintético utilizando jabón como emulsificante y peróxido de hidrógeno como iniciador, y en 1.933 ya se había establecido la polimerización en emulsión como el mejor método para preparar polímeros en la mayoría de los casos, especialmente en la manufactura de caucho sintético. Las ventajas que ofrecía esta técnica para controlar la iniciación, propagación y terminación de la síntesis de macromoléculas rápidamente se hicieron aparentes, a pesar de que se conocía muy

poco sobre el mecanismo envuelto en dicho proceso (el primer avance en este sentido vino de la mano de Fikentscher en 1.938 cuando demostró que, contrariamente a lo que todo el mundo pensaba, la polimerización ocurría en la fase acuosa y no en las gotas de monómero). Las principales ventajas de la polimerización en emulsión sobre otros métodos son las siguientes:

- 1.- Para muchas aplicaciones tales como pinturas, recubrimiento de superficies, adhesivos, tratamiento e impregnación del papel, cuero y materias textiles, etc., la forma ideal para el uso del polímero en cuestión es estabilizado en un medio dispersivo, o sea, en forma de látex.
- 2.- El control de la iniciación, propagación y terminación de la reacción es bastante fácil, y en la mayoría de los casos las temperaturas de polimerización necesitadas son relativamente bajas (0-80°C).
- 3.- Este tipo de reacción se presta fácilmente a un procesado continuo con interés industrial.
- 4.- Se pueden conseguir altas velocidades de polimerización a la vez que se obtienen altos grados de polimerización.
- 5.- Al contrario de lo que ocurre con las soluciones de polímeros, la viscosidad de un látex es independiente del peso molecular del polímero que contiene. Gracias a esta propiedad se pueden conseguir altas concentraciones de polímero en soluciones con baja viscosidad, facilitando de esta forma procesos tales como la agitación y la transferencia de calor, así como el transporte del material a través de bombas y tuberías.
- 6.- Puesto que el medio de dispersión utilizado para los látexes es siempre agua, se eliminan los problemas relacionados con el uso de solventes caros, que implicarían una posterior recuperación para hacer rentables los procesos. Otra ventaja consecuente con esta es la eliminación del riesgo de fuego e intoxicación debida a los solventes orgánicos.
- 7.- Cuando el producto final requerido es sólido, la transformación a partir del látex no presenta prácticamente ningún problema. Lo único que hay que hacer es coagular el látex de una forma adecuada y retirar el agua. El polímero así concentrado se lava con agua o con una disolución acuosa apropiada, se prensa y se seca. Si lo que se quiere conseguir es una mayor

dureza aumentando el tamaño de las macromoléculas, se calienta el material a una temperatura superior a la de transición vítrea del polímero que se esté tratando.

Por otro lado, sin embargo, hay que destacar que no es posible polimerizar mediante este método todos los monómeros activos e insaturados que se conocen. Así, por ejemplo, el propileno y el isobutileno no han sido aún satisfactoriamente homopolimerizados mediante sistemas de emulsión. Otro problema que presenta este método es que el producto obtenido está contaminado con restos de emulsificante y/o productos de descomposición de éste, aunque gracias a los descubrimientos realizados en este campo en los años 60 y 70 que permiten la polimerización en emulsión de numerosos monómeros en ausencia de agentes emulsificantes se ha solventado dicho problema. Estas técnicas, de fundamental importancia para un estudio básico de la superficie de un polímero atendiendo sólo a las características de la macromolécula que lo compone son las que nosotros hemos utilizado para la síntesis de los látexes estudiados en este trabajo. A nivel industrial, no obstante, el uso de agentes emulsificantes sigue siendo fundamental para un control adecuado del tamaño y la monodispersidad de las partículas de látex. Otra característica difícil de conseguir mediante la polimerización en emulsión es la estereoespecificidad en la reacción, por ejemplo para la fabricación de trans-polidienos, ya que sólo en algunos casos se ha conseguido realizar usando este sistema de polimerización.

1.2 MECANISMO Y CINÉTICA DE LA REACCIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, hubo un intervalo de muchos años entre el descubrimiento de que la polimerización podía realizarse en emulsión y el conocimiento de los mecanismos inherentes a dicho proceso. Incluso hoy, más de medio siglo después de la primera polimerización en emulsión, no todos los aspectos de este procedimiento están completamente resueltos. Una de las razones para que esto sea así es la enorme variedad de reactivos, aditivos y fenómenos diferentes que concurren normalmente incluso en los procesos de polimerización en emulsión más sencillos. Con el objeto de hacer progresos en la elucidación de los mecanismos implicados en la polimerización en emulsión, es de vital importancia el empezar por definir lo que debe ser considerado como el sistema "ideal", el cual contendría sólo los ingredientes mínimos y esenciales, esto es, agua, un monómero insoluble en agua, emulsificante (aunque ya

hemos citado anteriormente las nuevas técnicas de polimerización que prescindan de este elemento), y un iniciador formador de radicales libres. La primera representación cualitativa del mecanismo envuelto en una reacción de este tipo se atribuye a Harkins (1,2), que definió el sistema de la siguiente manera:

En una disolución acuosa diluida de emulsificante cuya concentración supera la denominada concentración micelar crítica (cmc), las moléculas de dicho emulsificante se encuentran en forma de agregados. Estos agregados, denominados micelas, contienen aproximadamente cien moléculas cada una, y tienden a adoptar una forma esférica con la porción hidrofóbica de sus moléculas orientadas hacia el centro de la micela, y las cabezas polares situadas en la superficie de la esfera. Una micela de emulsificante estándar tendría un diámetro de aproximadamente 50 \AA , y sería por tanto de dimensiones coloidales. Si uno añade entonces al sistema un monómero orgánico insoluble en agua como puede ser, por ejemplo, el estireno, y mantiene la mezcla bajo constante agitación, provocará que este último sea dispersado en forma de pequeñísimas gotas estabilizadas por el emulsificante. Las moléculas de éste se situarán en la superficie de las gotas con la cabeza polar orientada hacia la disolución acuosa y la porción hidrofóbica hacia el interior de la masa de monómero. Estas gotas tienen un tamaño bastante grande en comparación con las micelas de emulsificante, con un diámetro de alrededor de 10.000 \AA (1 \mu m). Una pequeña cantidad (aproximadamente un 1%) de monómero, no obstante, se encuentra también disuelta en el interior de las micelas, lo que convierte a éstas en esferas de un tamaño doble al que originalmente tenían, y también se encuentra algo disuelto en el propio agua, dependiendo esta cantidad del monómero que se esté utilizando; para monómeros muy hidrofóbicos como el estireno, esta cantidad no supera el 0.04%, por lo que su presencia puede despreciarse a la hora de describir los mecanismos de la reacción. De esta forma, el sistema antes de iniciarse la polimerización contiene los siguientes elementos: (a) fase acuosa externa (conteniendo en disolución únicamente algo de emulsificante y una pequeñísima cantidad de moléculas de monómero); (b) gotas de monómero dispersadas en esta fase acuosa gracias a la estabilización del emulsificante y a la agitación; y (c) micelas de emulsificante conteniendo una cierta cantidad de monómero solubilizado en su interior.

En nuestro sistema ideal vamos a asumir que los radicales libres iniciadores de la polimerización se generan en la fase acuosa. Puesto que un iniciador normal de tipo persulfato puede generar, a una temperatura de 50°C , aproximadamente 10^{13} radicales libres por mililitro y segundo, cabe suponer que dichos radicales libres alcanzarán rápidamente las micelas de

emulsificante "rellenas" de monómero, donde comenzará por tanto la polimerización (el hecho de que la reacción comience en las micelas y no en las gotas de monómero se comprende fácilmente comparando el área superficial de ambas: en una formulación normal y atendiendo al tamaño de cada una de éstas, el área que presentan las micelas es del orden de 60 veces superior al de las gotas de monómero). Tras esta iniciación, por tanto, tendremos una nueva fase presente en el sistema, esto es, (d) partículas de látex polimérico "rellenas" de monómero.

Etapas de nucleación: Una vez iniciada la reacción, la polimerización se propaga rápidamente en el interior de las micelas con el consiguiente crecimiento de la partícula desde el interior. Las moléculas de emulsificante quedan adsorbidas en la superficie de las partículas en formación actuando como protector coloidal, e impidiendo de esta forma que puedan coagular uniéndose unas con otras. Esta adsorción de emulsificante en la superficie de las partículas de látex "rellenas" de monómero que están creciendo rápida y continuamente disminuye la concentración de emulsificante disuelto en la fase acuosa, y por tanto desplaza el equilibrio entre dicho emulsificante disuelto y el que se encuentra en el interior de las micelas no activadas aún por el iniciador (aquellas donde no ha comenzado la polimerización). Estas últimas, por tanto, se irán desintegrando progresivamente para ir restaurando el equilibrio. Cuando se ha producido un cierto nivel de conversión del monómero a polímero (alrededor de un 10-20%) no queda prácticamente ninguna micela en la fase acuosa, ya que la concentración de emulsificante se ha reducido por debajo de la c.m.c. Como consecuencia, todo el emulsificante se encontrará adsorbido en la superficie de las partículas de látex en crecimiento. Es significativo el hecho de que a partir de este punto la tensión superficial de la fase acuosa se incrementa, ya que desaparecen también las moléculas de emulsificante situadas en la interfase aire-disolución acuosa. Cuando se alcanza esta situación no se pueden formar partículas nuevas, ya que la iniciación de la reacción de polimerización sólo puede tener lugar, como hemos dicho, en las micelas "rellenas" de monómero que llegado este punto están todas activadas. A partir de este momento el número de partículas de látex es fijo, y toda la reacción de polimerización posterior ocurre en el interior de las partículas ya formadas.

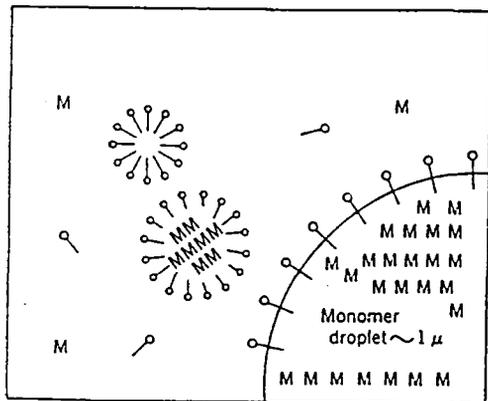
Etapas de crecimiento: Las partículas de látex en crecimiento tienen un suministro constante de monómero fresco gracias a la difusión a través de la fase acuosa de las moléculas encerradas en las gotas de monómero. Estas, como consecuencia, van disminuyendo gradualmente su tamaño conforme avanza la polimerización en el sistema, de manera que cuando se alcanza un grado de

conversión de monómero en polímero de alrededor del 60% ya han desaparecido completamente: todo el monómero libre ha difundido entonces hacia el interior de las partículas de látex.

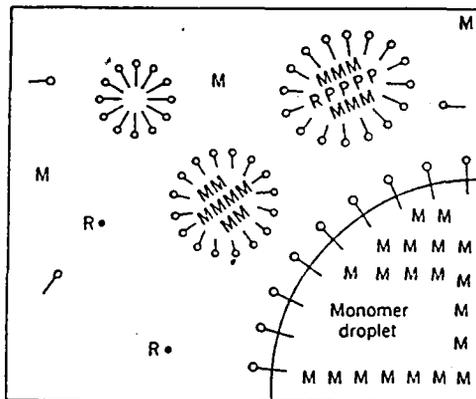
Etapas de terminación: A partir de este punto, el monómero situado en el interior de las partículas de látex es consumido gradualmente, y la velocidad de la reacción va disminuyendo. La polimerización cesará completamente cuando todo el monómero existente en el interior de la partícula haya reaccionado.

Una representación esquemática de la reacción de polimerización en emulsión tal y como la hemos descrito queda reflejada en la Figura I.1 y explicada en la Tabla I.1.

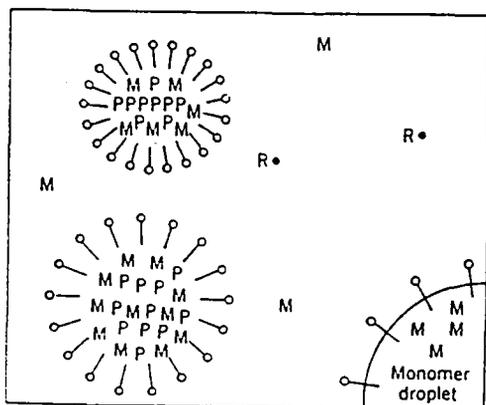
Esta representación cualitativa de un proceso de polimerización en emulsión "ideal" es bastante simple, y podríamos decir que está basada en una elección de elementos estándar para definir el mecanismo de dicha reacción. Con respecto a este sistema ideal existen en la realidad numerosas variaciones correspondientes a los diferentes procesos de polimerización que se llevan a cabo hoy en día, y cuyas desviaciones del sistema aquí expuesto serían básicamente: (a) la solubilidad del monómero; (b) la presencia en un mismo sistema de diferentes clases de monómeros; (c) el tipo de iniciador; (d) la solubilidad orgánica de dicho iniciador; (e) la presencia de inhibidores o retardadores de la reacción; (f) el tipo de emulsificante; (g) ingredientes secundarios, como pueden ser electrolitos, estabilizadores, etc.; (h) las proporciones entre las fases; (i) incrementos adicionales en la cantidad de iniciador, emulsificante o monómero; (j) control del tamaño de partícula; o (k) polimerización con siembra.



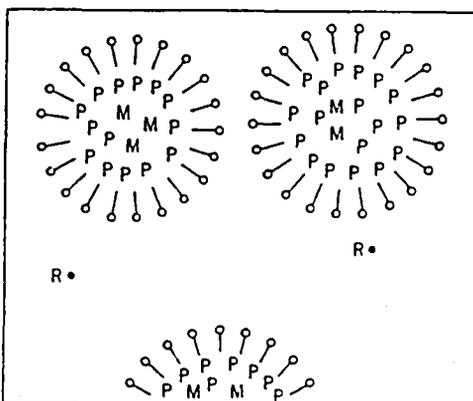
(a)



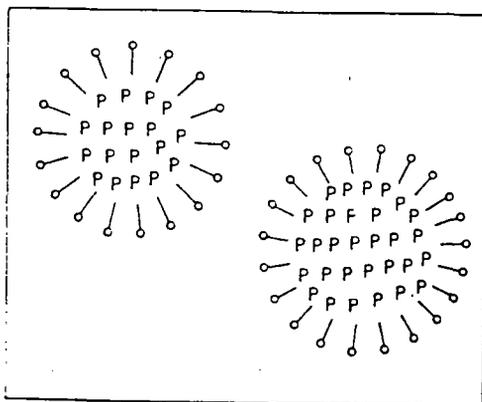
(b)



(c)



(d)



(e)

Fig. I.1 *Etapas de una polimerización en emulsión ideal. a) Antes de la iniciación; b) Iniciación; c) Propagación; d) Terminación; -○ representa una molécula de emulsificante; M, una molécula de monómero; y R•, un radical libre.*

Tabla I.1. Etapas de una Polimerización en Emulsión Ideal

| Contenido del matraz de reacción | Características y observaciones |
|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (a) Anterior a la iniciación (Fig. I.1a) | |
| 1. fase acuosa externa | - tensión superficial baja debido a que la concentración de emulsificante excede la cmc. |
| 2. baja concentración de moléculas de monómero molecularmente disuelto | - las gotas de monómero (fase orgánica) tiende a separarse si no se agita. |
| 3. emulsificante molecularmente disuelto | - tamaño de las gotas = 10,000 Å |
| 4. micelas de emulsificante | - tamaño de las micelas = 40-50 Å |
| 5. gotas de monómero dispersadas | - tamaño de las micelas "hinchadas" = 60-100 Å |
| 6. micelas de emulsificante conteniendo monómero solubilizado | |
| (b) Etapa 1ª de la polimerización: Nucleación (Fig. I.1b) | |
| 1-6. igual que en (a) | - formación de las partículas de látex |
| 7. partículas de látex conteniendo polímero y monómero | - dura hasta aproximadamente 10-20% de conversión |
| 8. radicales libres del iniciador | |
| (c) Etapa 2ª de la polimerización: Crecimiento (Fig. I.1c) | |
| 1. fase acuosa externa | - periodo de difusión |
| 2. baja concentración de monómero molecularmente disuelto | - dura hasta aproximadamente el 60% de conversión |
| 3. no queda emulsificante disuelto | - incremento de la tensión superficial |
| 4. no quedan micelas de emulsificante | - etapa principal de la polimerización |
| 5. gotas de monómero más pequeñas | - número de partículas de látex fijo |
| 6. no quedan micelas "hinchadas" de monómero | - el monómero se suministra a las partículas de látex en crecimiento gracias a la difusión desde las gotas |
| 7. partículas de látex en crecimiento | |
| 8. radicales libres del iniciador | |
| (d) Etapa 3ª de la polimerización: Terminación (Fig. I.1d) | |
| 1. fase acuosa externa | - periodo de agotamiento del monómero |
| 2. no queda monómero disuelto | - comienza aproximadamente con el 60-70% de conversión |
| 3. no queda emulsificante disuelto | |
| 4. no quedan micelas de emulsificante | - descenso gradual de la velocidad de polimerización |
| 5. no quedan gotas de monómero | |
| 6. no quedan micelas "hinchadas" de monómero | |
| 7. partículas de látex con muy poca concentración de monómero | |
| 8. radicales libres del iniciador | |

Tabla I.1 (Cont.). Etapas de una Polimerización en Emulsión Ideal

| Contenido del matraz de reacción | Características y observaciones |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (e) Fin de la polimerización (Fig. I.1e) | |
| contiene solamente partículas de polímero estabilizadas por el emulsificante y dispersadas en la fase acuosa (látex) | - 100% de conversión - radicales libres del iniciador y de cadenas poliméricas activas totalmente consumidas. |

I.3 TEORIA CINETICA

El mecanismo cualitativo anteriormente explicado para la reacción de polimerización en emulsión fue ampliamente desarrollado y dotado de una base más cuantitativa por los trabajos de Smith y Ewart (3), Smith (4) y Haward (5) a finales de los años 40. La polimerización en emulsión sigue las mismas leyes cinéticas que habían sido establecidas de modo general para la polimerización homogénea, sea ésta en masa (el sistema de polimerización contiene únicamente el monómero y el iniciador) o en solución (el monómero se encuentra disuelto en un solvente orgánico adecuado). Sin embargo, como puede apreciarse en la Figura I.1, la polimerización en emulsión está sujeta a una serie de condiciones particulares en la reacción que la distinguen claramente de las otras formas de polimerización. La más importante de éstas es que cada lugar donde se produce polimerización está aislado de los demás, de modo que cada pequeña partícula de látex (o al principio, cada micela hinchada de monómero) es un sistema de polimerización homogénea donde el proceso ocurre de forma independiente. Además, están aisladas de la fuente de monómero, que en este caso serían las gotas suspendidas en la fase acuosa. Estos dos factores implican que para los tres procesos que ocurren en toda reacción de polimerización, a saber, iniciación, propagación y terminación, hay que puntualizar los siguientes aspectos en nuestro caso:

- 1.- La velocidad de la reacción de terminación por medio de la interacción radical-radical será menor que la encontrada en una polimerización normal en masa o en solución al estar limitado el número de radicales libres que pueden existir en el pequeño volumen de una partícula de látex (la alta viscosidad en el interior de la partícula de látex puede dificultar aún más

este proceso al impedir la difusión de dichos radicales libres). Una consecuencia de este hecho es que el grado de polimerización que se puede alcanzar en el interior de una partícula de látex (peso molecular del polímero) es mayor que el que se puede lograr en una reacción homogénea normal.

- 2.- Durante la mayor parte de la polimerización la concentración de monómero útil en el interior de las partículas de látex se mantiene constante gracias a la difusión en la fase acuosa, y por tanto la velocidad de propagación de la reacción será también constante durante este periodo (o sea, hasta que las gotas de monómero son consumidas). La velocidad total de polimerización del sistema (es decir, la cantidad de polímero formado por unidad de tiempo) dependerá entonces del número de partículas de látex que se formen originalmente y en las que la reacción de polimerización se esté realizando.

Van der Hoff (6) ha dado una estupenda interpretación de la cinética de la reacción de polimerización en emulsión para un caso ideal basado en la teoría de Smith-Ewart y, en trabajos más recientes, ha extendido este tratamiento para acomodarlo a sistemas más complejos.

A partir de las reacciones básicas de una polimerización normal homogénea con radicales libres (Ecs. [I.1]-[I.3]) se pueden derivar expresiones para la velocidad y el grado de polimerización.

Iniciación



Propagación



Terminación



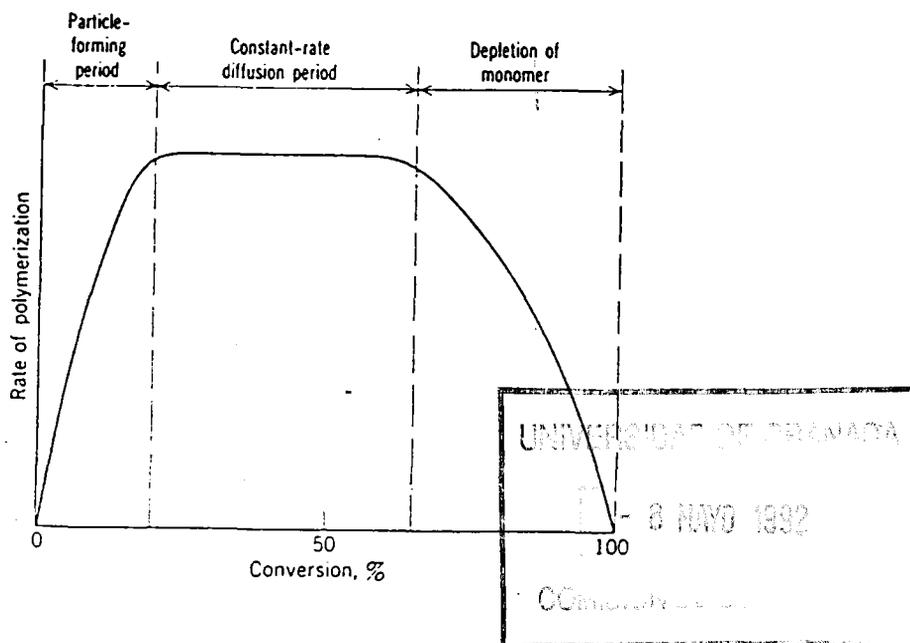


Fig. I.2 *Velocidad de polimerización en función del grado de conversión en una reacción ideal (ref. 6).*

En la Figura I.2 se encuentra gráficamente representada la variación en la velocidad de polimerización de un monómero insoluble en agua conforme avanza el grado de conversión de este en la reacción.

Bajo aquellas condiciones en las que se cumpla que la concentración de radicales libres, $R\cdot$, es constante (hecho que ocurre normalmente en el caso de la polimerización en emulsión), la velocidad de la reacción de iniciación será igual a la de terminación ($R_i = R_t$). Esta velocidad de terminación vendrá dada por la Ecuación [I.4].

$$R_t = \frac{-d[R\cdot]}{dt} = 2k_t[R\cdot]^2 \quad [I.4]$$

$$[R\cdot] = (R_i/2k_t)^{1/2} \quad [I.5]$$

El factor 2 se introduce en la Ecuación puesto que dos radicales poliméricos están envueltos en una misma reacción de terminación. Como consecuencia, la velocidad de propagación o polimerización, R_p , vendrá dada por la Ecuación [I.6].

$$R_p = k_p [M] [R\cdot] = \left(\frac{R_i k_p^2}{2k_t} \right)^{1/2} [M] \quad [I.6]$$

El grado de polimerización, GP (número medio de unidades monoméricas por molécula de polímero), vendrá dado por la razón entre la velocidad de crecimiento de las cadenas y la mitad de la velocidad de terminación de éstas (Ecuación [I.7]).

$$GP = \frac{2R_p}{R_t} = \left(\frac{2k_p^2}{R_i k_t} \right)^{1/2} [M] \quad [I.7]$$

Las Ecuaciones [I.4]-[I.7] están de acuerdo con los datos experimentales obtenidos para la polimerización en solución y en masa. Para la polimerización en emulsión, sin embargo, hay que tener en cuenta los factores anteriormente mencionados, es decir, el pequeño volumen de las partículas que corresponderían con los verdaderos sitios donde se está produciendo la reacción y el limitado número de radicales que pueden ser acomodados en cada partícula en crecimiento. De esta forma, la velocidad de la reacción de terminación será menor que aquella definida por la Ecuación [I.4].

Si llamamos n al número de radicales libres en un volumen de reacción V , y N_A es el número de Avogadro, entonces la concentración de radicales libres en moles en dicho volumen, $[R\cdot]$, vendrá dado por $(n/N_A)/V$.

Sustituyendo este valor en la Ecuación [I.4] quedará

$$R_t = 2k_t \frac{(n/N_A)}{V} \times \frac{(n/N_A)}{V} \quad [I.8]$$

En el caso de que el número de radicales libres en el volumen V sea suficientemente grande, la relación dada por la Ecuación [I.8] se puede considerar como una buena aproximación, ya que en la reacción de terminación de dos radicales combinándose mutuamente el hecho de que un radical no pueda reaccionar consigo mismo puede ser ignorado sin causar un apreciable error. Sin embargo, si n es pequeño, la relación exacta que debe aplicarse viene dada por la Ecuación [I.9].

$$R_t = 2k_t \frac{(n/N_A)}{V} \times \frac{[(n-1)/N_A]}{V} \quad [9]$$

A la vista de estas Ecuaciones es evidente que la velocidad de terminación (y por tanto la cinética total de la reacción) depende de la distribución de radicales libres entre las partículas.

Smith y Ewart demostraron que en una polimerización en emulsión normal, cada partícula de látex puede contener un sólo radical libre como máximo. Si un nuevo radical entra al interior de una partícula de látex donde ya existe uno en crecimiento, y como consecuencia del pequeño volumen en el que se está produciendo la reacción, se produciría instantáneamente la combinación de ambos para cerrar una cadena de polímero. Por consiguiente el número medio, n , de radicales libres por partícula de látex sera igual a $1/2$, y si N es el número de partículas totales por litro, entonces

$$[R\cdot] = N/2N_A \quad [I.10]$$

$$R_p = Nk_p[M] / 2N_A \quad [I.11]$$

La Ecuación [I.11] nos indica que la velocidad de polimerización para un número fijo de partículas es, en el caso ideal, independiente de la concentración de iniciador.

Dicha concentración de iniciador puede, no obstante, afectar el grado de polimerización, ya que una reducción en la concentración de radicales libres implicaría que el intervalo de tiempo transcurrido entre las sucesivas entradas de radicales primarios al interior de las partículas aumentaría, y puesto que la terminación ocurriría con menor frecuencia, las cadenas de polímero crecerían hasta alcanzar un mayor grado de polimerización antes de quedar inactivadas.

Como ya se justificó anteriormente, durante la mayor parte del proceso de polimerización la concentración de monómero en el interior de las partículas se mantiene constante y, por tanto, a una temperatura dada, la velocidad de polimerización depende única y exclusivamente del número de partículas presentes. Este número de partículas, N , viene dado por la Ecuación [I.12]:

$$N = F (\rho/\mu)^{2/5} \times (A_s[E])^{3/5} \quad [I.12]$$

donde

ρ = velocidad de producción de radicales libres

μ = velocidad de aumento de volumen de una partícula

A_s = area ocupada por una molécula de emulsificante

[E] = concentración de emulsificante

F = factor de proporcionalidad

El factor F toma valores comprendidos entre 0.37 y 0.53. Este último valor está basado en la suposición de que sólo las micelas de emulsificante capturan radicales libres de la fase acuosa, y no las partículas de látex. El valor más bajo, por el contrario, se basa en la suposición de que las partículas de látex son las que capturan los radicales libres, y de que el número de radicales que entran en cada partícula por unidad de área superficial y por unidad de tiempo es independiente del radio de dicha partícula. Sabemos, sin embargo, que la difusión de radicales hacia el interior de una esfera es inversamente proporcional a su radio. El valor verdadero que toma este factor se encontrará, por tanto, situado entre ambos extremos.

A partir de las Ecuaciones [I.11] e [I.12] se puede ver que la expresión más simple que podemos encontrar para cuantificar la velocidad de polimerización de un proceso de polimerización en emulsión ideal a una temperatura dada viene expresada por la Ecuación [I.13]:

$$R_p = K_1 [I]^{2/5} [E]^{3/5} [M] \quad [I.13]$$

siendo

[I] = concentración de iniciador

K_1 = constante de proporcionalidad

Para monómeros insolubles en agua, como es el caso del estireno, y para iniciadores que generan radicales libres en la fase acuosa, como es el caso del persulfato potásico, esta expresión concuerda bastante bien con los resultados experimentales obtenidos por numerosos autores.

Efecto de la Temperatura. Toda la interpretación cinética anteriormente expuesta sobre la reacción de polimerización en emulsión se ha deducido asumiendo una temperatura constante para el proceso. Una determinada temperatura de polimerización es elegida normalmente en función del iniciador empleado en la reacción, de forma que se busca la temperatura a la que éste ofrece su eficacia más óptima. Puesto que dicha eficacia puede moverse en ciertos márgenes de temperatura, también se tienen en cuenta otros efectos como pueden ser velocidad de difusión, solubilidad de los componentes, etc. Desde un punto de vista estrictamente cinético se puede apreciar rápidamente que una variación en la temperatura afectará de modo inmediato todos los términos de la Ecuación [I.13]. Podemos concluir entonces que un aumento de la temperatura provocará las siguientes variaciones en el sistema:

- 1.- La concentración de radicales libres iniciadores de la reacción aumentará, ya que lo hará la velocidad de producción de estos a partir del iniciador.
- 2.- El número de micelas formadas por un emulsificante generalmente aumenta con la temperatura, lo que en nuestro caso implicará un mayor número de partículas primarias. Como consecuencia de ésto, para una cantidad concreta de monómero el tamaño de las partículas resultará más pequeño al dividirse dicha cantidad entre un número mayor de partículas de látex.
- 3.- La velocidad de difusión del monómero desde las gotas que lo contienen hacia el interior de las partículas en formación aumentará con la temperatura, e igualmente aumentará la cantidad de monómero inicialmente encerrada en el interior de las micelas de emulsificante.
- 4.- De la misma forma, aumentará también el flujo de radicales libres hacia las partículas. Como la velocidad de difusión de estos radicales se afecta en mayor grado que la de difusión de moléculas de monómero, la proporción iniciador/monómero aumentará en el interior de las micelas, provocando la formación de cadenas poliméricas más pequeñas o, lo que es lo mismo, de un mayor número de cadenas para una misma cantidad inicial de monómero.

Como consecuencia de todos estos efectos, el resultado global que provocará sobre una polimerización en emulsión ideal un aumento de la temperatura será aumentar la velocidad de la reacción, reducir el grado de polimerización (o sea, el peso molecular promedio del polímero formado) y reducir el tamaño final de las partículas de látex.

Aparte de estos efectos que podríamos considerar generales para la polimerización en emulsión existen otra serie de efectos laterales que pueden producirse en un sistema particular como consecuencia de una variación en la temperatura de reacción. Estos efectos laterales suelen afectar de modo particular al sistema iniciador empleado o al monómero o mezcla de monómeros que quieren ser polimerizados. Desde un punto de vista práctico, estos deben tratarse de modo particular para cada caso, y antes de aplicar un cambio sobre la temperatura de reacción uno debe de tener en cuenta los siguientes efectos que podrían ocurrir y malograr el desarrollo de la polimerización: (a) desestabilización de la emulsión, provocando una prefloculación, coagulación o un cambio en la viscosidad; (b) producción de un polímero gelificado, ramificado

o entrecruzado; (c) cambios en la estructura del polímero o en la distribución de pesos moleculares, etc.

Agitación. Otra característica del sistema que hemos asumido durante todo el desarrollo del mecanismo de la polimerización en emulsión es la existencia de una agitación constante. Normalmente, la agitación requerida es sólo la suficiente para mantener las gotas de monómero y los demás componentes debidamente dispersados en la fase acuosa. Puesto que esta agitación no es excesiva, la polimerización en emulsión se puede realizar también en el interior de un frasco sin ningún problema. Si aumentamos la velocidad de agitación, el efecto provocado sobre el producto obtenido sería el que cabría esperar por un aumento en la velocidad de difusión de los diversos componentes de la mezcla de reacción, es decir, un aumento en la velocidad de reacción, disminución en el grado de polimerización, y disminución en el tamaño de las partículas. Estos efectos son, por tanto, los mismos que anteriormente deducimos que provocaría un aumento en la temperatura del sistema.

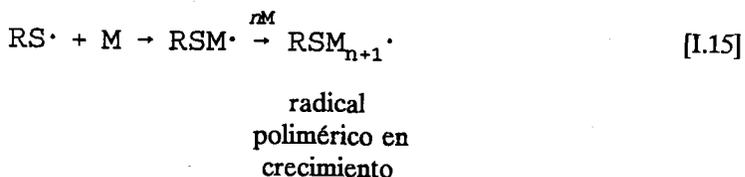
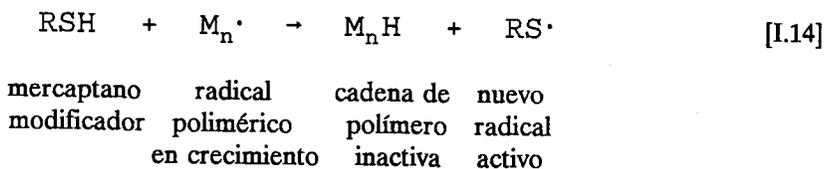
I.4 TRANSFERENCIA DE CADENAS Y MODIFICACION DE LA POLIMERIZACION

Como hemos visto hasta ahora en el desarrollo del mecanismo de una polimerización en emulsión ideal, el grado de polimerización que se alcanza en una reacción concreta puede verse afectado por numerosos factores, entre los que cabe destacar:

- 1.- La velocidad de difusión de radicales libres primarios hacia el interior de las partículas; ésta puede variar dependiendo básicamente de la concentración de iniciador, la concentración de emulsificante, o el tamaño de las partículas en formación.
- 2.- La concentración de monómero en el interior de las partículas; ésta dependerá en último extremo de la temperatura de polimerización, la tensión interfacial y la velocidad de agitación.
- 3.- El grado de conversión.

El control que sobre el grado de polimerización podemos conseguir manejando todos o algunos de estos factores está, sin embargo, extremadamente limitado en la práctica. Empíricamente se ha demostrado que si se desea obtener un control preciso sobre la longitud de las cadenas poliméricas sin interferir sobre la velocidad de polimerización es bastante más útil el emplear agentes de los denominados transferentes de cadena o modificadores de la reacción de polimerización que variar los parámetros antes mencionados. Numerosos compuestos orgánicos conteniendo azufre o elementos halógenos funcionan como agentes transferentes de cadena en las polimerizaciones por radicales. En el caso de la polimerización del estireno, los agentes transferentes de cadena que se comportan de la forma más próxima a un caso ideal son los mercaptanos de larga cadena tales como el *n*-dodecil mercaptano. Con respecto a este tipo de agentes y su influencia en la reacción de polimerización se han realizado numerosos trabajos, en particular con el objeto de controlar la longitud de las cadenas de polímero en el caso de los cauchos sintéticos preparados mediante la técnica de polimerización en emulsión.

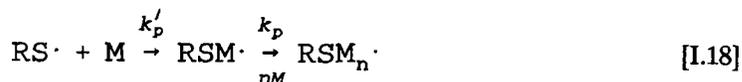
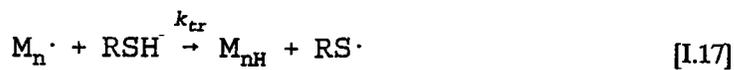
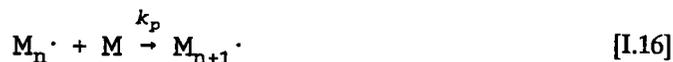
Flory (7) definió el efecto provocado por los agentes transferentes de cadena como un proceso en el que el centro radical activo de una molécula de polímero en crecimiento es transferido a otra molécula inactiva, quedando entonces la primera inactivada o "muerta" y activándose la segunda para poder incorporar unidades de monómero. Dicho de otra forma, un agente transferente de cadenas es una sustancia capaz de detener el crecimiento de una molécula de polímero convirtiéndose ella misma en una nueva especie iniciadora de la reacción de polimerización.



Por tanto, cuanto mayor sea la concentración del agente transferente de cadenas mayor será la cantidad de cadenas poliméricas en crecimiento que serán inactivadas de esta forma, y menor será el peso molecular promedio del polímero formado. Sin embargo, puesto que por cada radical polimérico en crecimiento inactivado se genera un radical nuevo capaz de continuar el proceso de polimerización, no se produce ninguna variación en la velocidad de la reacción.

Con el objeto de calcular el nuevo peso molecular promedio de las cadenas de polímero formadas en presencia de un agente transferente de cadenas vamos a suponer la condición de que dicho proceso de transferencia es provocado de forma significativa únicamente por esta sustancia, y que los procesos similares que pueden ser producidos por otros elementos presentes en el medio tales como moléculas de monómero, solvente, iniciador o por combinación mutua de cadenas activas son de pequeña magnitud y pueden ser ignorados.

Las ecuaciones necesarias son entonces:



$$\begin{aligned} - \frac{d[M]}{dt} &= k_p [M] [M_n \cdot] + k_p [M] [RS \cdot] \\ &= k_p [M] ([M_n \cdot] + [RS \cdot]) \end{aligned} \quad [I.19]$$

Con objeto de simplificar las expresiones se ha supuesto que $k'_p \approx k_p$.

Los resultados experimentales demuestran que numéricamente $[RS \cdot]$ presenta valores que pueden ser despreciados frente a $[M_n \cdot]$, de tal modo que podemos considerar como una buena aproximación la Ecuación [I.20].

$$- \frac{d[M]}{dt} = k_p [M] [M_n \cdot] \quad [I.20]$$

y también

$$- \frac{d[\text{RSH}]}{dt} = k_{tr} [\text{RSH}] [M_n \cdot] \quad [I.21]$$

La combinación de estas dos últimas Ecuaciones y la integración de la Ecuación diferencial resultante nos lleva a la Ecuación [I.22], donde definimos un nuevo término, C, como el cociente k_{tr}/k_p , y que denominaremos como constante de transferencia de cadenas;

$$[\text{RSH}] / [\text{RSH}]_0 = ([M] / [M]_0)^C \quad [I.22]$$

siendo

$[\text{RSH}]_0$ = concentración inicial de mercaptano en el lugar de la polimerización.

$[M]_0$ = concentración inicial de monómero en el lugar de la polimerización.

Cuando el parámetro C vale 1, la proporción $[\text{RSH}]/[M]$ es constante, y el peso molecular del polímero formado durante todo el proceso de polimerización es también constante. Si C es mayor de 1, la proporción entre mercaptano y monómero disminuye, aumentando progresivamente la conversión y trayendo como consecuencia la formación de cadenas poliméricas con un peso molecular en continuo crecimiento conforme va procediendo la polimerización.

En una reacción de polimerización en emulsión la concentración de mercaptano en el lugar de la polimerización, es decir, en el interior de la micela o de la partícula de látex, está sujeta a las condiciones de la reacción, y la transferencia de moléculas de mercaptano desde la disolución acuosa hacia la fase orgánica está influenciada por el grado de agitación y por la temperatura. La Ecuación [I.22] se ha obtenido basándonos en un proceso ideal de polimerización homogénea; por consiguiente, el coeficiente de transferencia de cadenas, C, no tiene en cuenta los factores relacionados con la velocidad de difusión y penetración de las moléculas de mercaptano desde la fase acuosa al interior de las partículas en crecimiento. Para introducir estos factores que influyen notoriamente en el desarrollo de la polimerización, la constante C se sustituye por el denominado coeficiente de transferencia de cadenas "aparente", C', que varía de acuerdo con las condiciones físicas del sistema (principalmente temperatura y velocidad de agitación).

Para el caso de polimerizaciones con estireno, por ejemplo, y utilizando mercaptanos de bajo peso molecular (C_8), la transferencia de masa no es muy importante, y C' es menos sensible a las

condiciones de agitación que a la temperatura. Si el mercaptano tiene un peso molecular suficientemente bajo, de forma que difunda a una velocidad al menos tan rápida como la del monómero, el coeficiente de transferencia de cadenas "aparente" C' tendrá un valor similar al verdadero coeficiente C para un sistema homogéneo. Con los mercaptanos de alto peso molecular tales como el *n*- y el *terc*-dodecil mercaptano, los valores de C' muestran una mayor tendencia a aumentar conforme lo hace el nivel de agitación de la mezcla reaccionante, y el efecto se ve más resaltado a una temperatura de polimerización de 5°C que a 50°C (Tabla I.2). Con mercaptanos de peso molecular aún mayor, la diferencia entre las constantes de transferencia de cadenas para polimerización homogénea y en emulsión se ve cada vez más acentuada.

Algunos valores típicos del coeficiente de transferencia de cadenas "aparente" C' para el caso del estireno y el butadieno bajo diferentes condiciones de reacción se pueden observar en la Tabla I.2.

Tabla I.2. Valores típicos de C'

| Monómero | Mercaptano | Temperatura, °C | C' |
|-----------|--------------|-----------------|------|
| estireno | n-octil | 5 | 23 |
| | n-octil | 50 | 19 |
| | terc-octil | 5 | 5.5 |
| | terc-octil | 50 | 4.3 |
| | terc-dodecil | 30 | 3.71 |
| | terc-dodecil | 50 | 2.91 |
| | terc-dodecil | 70 | 1.80 |
| butadieno | n-octil | 5 | 22 |
| | n-octil | 50 | 18 |
| | terc-octil | 5 | 5.3 |
| | terc-octil | 50 | 3.7 |

El valor del coeficiente de transferencia de cadenas "aparente" de un modificador determinado puede calcularse experimentalmente para un sistema de polimerización dado y unas condiciones de reacción concretas. Esto puede hacerse midiendo la concentración de modificador en función del grado de conversión durante el proceso de polimerización y aplicando la Ecuación [I.23] (la cual se ha obtenido a partir de la [I.22]).

$$\log \frac{[\text{RSH}]}{[\text{RSH}]_0} = C' \log \frac{[\text{M}]}{[\text{M}]_0} \quad [\text{I.23}]$$

1.5 GRADO DE CONVERSION Y TERMINACION

En los desarrollos anteriores hemos visto la importancia que tiene el grado de conversión en procesos tales como la desaparición de las micelas y de las gotas de monómero; el cálculo de la cantidad de mercaptano consumida y del alcance de la transferencia de cadenas; o el efecto en el peso molecular del polímero en formación. En la mayoría de los casos, una reacción de polimerización en emulsión acaba con un grado de conversión del 100% o casi del 100%, de modo que la terminación de la reacción resulta de la total desaparición del monómero en el interior de las partículas. Para el caso de la polimerización del estireno, cloruro de vinilo, acetato de vinilo y acrilonitrilo, por ejemplo, se pueden conseguir grados de conversión próximos al 100% sin causar ningún detrimento en las características del producto final obtenido. Sin embargo en la polimerización de otros monómeros como el butadieno, o la copolimerización del estireno con el butadieno, cuando se superan grados de conversión del 80% aproximadamente pueden producirse profundos cambios en la estructura del polímero. En cualquier caso, en la mayoría de los casos se producen desviaciones de la polimerización en emulsión ideal cuando se alcanzan altos grados de conversión, y esto se puede traducir en fenómenos tales como inestabilidad del látex, gelificación del polímero, cambios en la composición en el caso de copolimerización, etc. La inestabilidad del látex a causa de un alto grado de conversión puede producirse como consecuencia de que la cantidad de emulsificante no es suficiente para cubrir y proteger completamente la superficie en constante crecimiento de la partícula de látex durante el proceso de polimerización. Este problema se caracteriza por la aparición de un fenómeno denominado prefloculación, que resulta cuando una partícula en crecimiento deficiente en emulsificante se le roba a otra: la primera mejorará momentáneamente su estabilidad, mientras que la segunda disminuirá la suya y tenderá a flocular junto con otras fuera de la emulsión. La gelificación o la ramificación de moléculas de polímero ocurre cuando una partícula crece hasta un tamaño tan grande que la suposición en el mecanismo de Smith-Ewart de que solamente puede existir un radical libre en crecimiento en el interior de una partícula deja de cumplirse. Esto ocurre cuando el tamaño de dichas partículas supera los 800-1000 nm, y trae como consecuencia la existencia de reacciones laterales o secundarias tales como el ataque de un radical libre a una cadena de polímero ya formada o la reacción entre dos de estas cadenas, dando lugar a bruscos aumentos en el peso molecular del polímero. En casos extremos, este tipo de reacciones laterales provocan la formación de una tupido entrecruzamiento tridimensional de cadenas poliméricas que rompe

el estado de dispersión coloidal del producto final. Esta desviación de la teoría de Smith-Ewart es la que se conoce con el nombre de efecto gel o de Trommsdorff.

Como es evidente, en la mayoría de los casos no es deseable que ocurra este fenómeno de gelificación del polímero. Para evitar este problema, sin embargo, no es suficiente con utilizar modificadores del tipo del mercaptano, sino que generalmente es necesario detener la reacción de polimerización antes de que se alcancen altos grados de conversión que posibiliten la aparición de este fenómeno. Un ejemplo típico se da en la producción de caucho sintético mediante la copolimerización de estireno y butadieno, en el que las propiedades físicas y de procesado del producto final se ven enormemente influenciadas si el material se gelifica o se ramifican sus moléculas. Los procedimientos descritos para la fabricación de este material recomiendan que la polimerización se detenga bruscamente al alcanzar un grado de conversión próximo al 65%. En las Figuras I.3, I.4 e I.5 puede verse, respectivamente, como evoluciona una reacción típica de copolimerización de estireno y butadieno con el tiempo, la variación en el peso molecular promedio del producto final con el grado de conversión, y la variación en la composición del copolímero con el grado de conversión.

La parada brusca de la reacción con objeto de que el proceso de polimerización se detenga en el punto exacto de conversión requerido debe realizarse en el momento apropiado, es decir, justo antes de alcanzar dicho grado de conversión. Para lograr este objetivo existen gran cantidad de sustancias capaces de inhibir o retardar la polimerización, pero no todas sirven para detener bruscamente la reacción: el efecto que debe producir dicha sustancia tiene que ser inmediato y definitivo. Además, no sólo debe prevenir que la reacción de polimerización continúe su curso en el momento de añadirlo, sino cualquier aumento posterior en el peso molecular del polímero como consecuencia de reacciones laterales durante el procesado o transporte del producto final. En otras palabras, debe inactivar completamente todos los reactivos presentes en la fase acuosa, así como acabar con los posibles radicales libres en crecimiento que se encuentren en el interior de las partículas de látex, es decir, en la fase orgánica.

Los compuestos más comunes que se utilizan con este fin son el polisulfuro sódico, el dimetilditiocarbamato sódico, la hidroquinona o sus derivados, y la fenilhidracina. El más adecuado en cada caso depende generalmente del sistema iniciador utilizado, así como del monómero a polimerizar o el emulsificante empleado. Otras consideraciones que hay que tener en cuenta a la hora de elegir uno de estos productos es la toxicidad o el color que puedan dar al producto final.

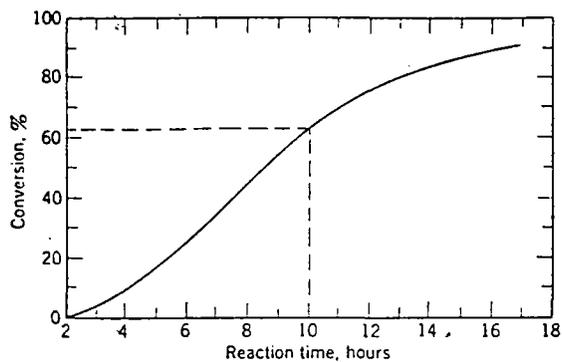


Fig. I.3 *Reacción de estireno y butadieno (ref. 6)*

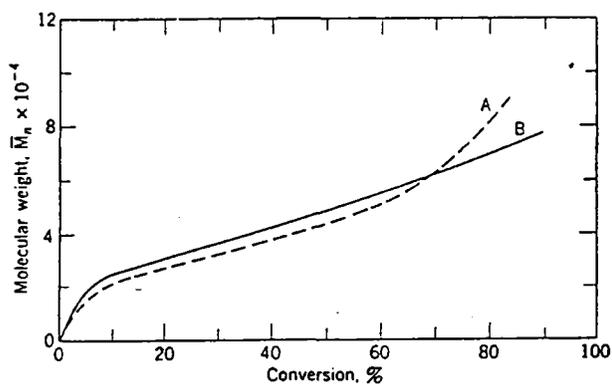


Fig. I.4 *Comparación entre los valores calculados y los experimentales de peso molecular promedio.*

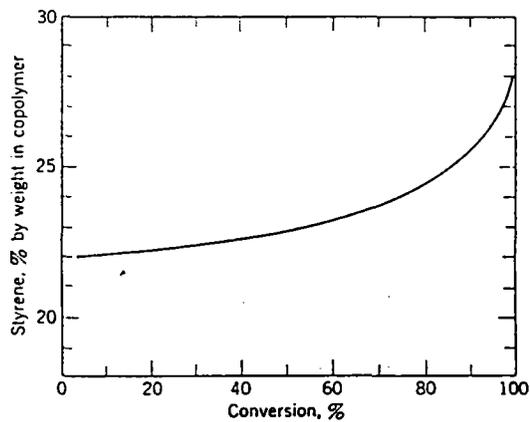


Fig. I.5 *Cambio en la composición del copolímero de estireno y butadieno con el grado de conversión.*

1.6 POLIMERIZACION EN EMULSION SIN EMULSIFICANTE

La polimerización en emulsión del estireno sin la presencia en el medio de reacción de ningún agente emulsificante que estabilizara las partículas de látex en formación fue descrita por primera vez por Hohenstein y Mark (8) en 1.946, aunque no se desarrolló esta técnica hasta 1.965 cuando Matsumoto y Ochi (9) usaron de modo sistemático este proceso para preparar látexes monodispersos. Estos autores produjeron partículas de látex estables y con una distribución de tamaños homogénea usando únicamente persulfato potásico como iniciador y estireno como monómero, y postularon que la estabilidad de las partículas así obtenidas se debía a la repulsión electrostática entre partículas generada por la presencia en la superficie de éstas de numerosos grupos sulfato covalentemente unidos a las cadenas de polímero. Desde entonces se han realizado numerosos estudios sobre la preparación de látexes monodispersos de poliestireno en ausencia de emulsificantes, entre los que cabe destacar los trabajos realizados por Kotera y col. en 1.970 (10), Furusawa y col. en 1.972 (11) y por Goodwin y col. en 1.974 (12). El mayor interés que suscitó la preparación de este tipo de partículas con "superficie limpia" fue la posibilidad de su uso como modelos coloidales, ya que se podían preparar con una distribución de tamaños de partícula muy estrecha, con forma esférica y con el diámetro adecuado para corroborar las teorías que sobre el estado coloidal se estaban desarrollando. En particular, la comprobación de la teoría de la estabilidad de coloides liofóbicos desarrollada por Derjaguin y Landau (13) y por Verwey y Overbeek (14) ya había sido estudiada por Ottewill y col. (15) y Force y col. (16) usando látexes de poliestireno sintetizados por el método de polimerización en emulsión, y usando un emulsificante como estabilizador de la dispersión. Posteriormente intentaron retirar todo el emulsificante posible mediante diálisis e intercambio iónico con resinas cambiadoras de iones.

El desarrollo de la síntesis de látexes de poliestireno monodispersos en ausencia de emulsificantes ha demostrado ser de gran utilidad para la comprobación de todo tipo de fenómenos relacionados con el estado coloidal, y sus enormes posibilidades en este campo han sido recogidas, por ejemplo, por Hearn y col. (17).

Puesto que la estabilidad de este tipo de dispersión coloidal procede de la repulsión electrostática generada por las cargas de igual signo situadas en la superficie de las partículas, rápidamente se desarrollaron técnicas para el estudio y la caracterización del estado eléctrico de la interfase polímero-disolución acuosa. La primera y más importante de estas técnicas, la

electroforesis, consistente en la aplicación de un campo eléctrico a la dispersión en agua de estas partículas demostró que eran efectivamente grupos con carga negativa los que estabilizaban el estado coloidal, y dio paso a la búsqueda de coloides poliméricos estabilizados mediante cargas positivas en su superficie. Los primeros en publicar un trabajo en el que se sintetizaban partículas de látex de poliestireno con carga positiva fueron Sakota y Okaya en 1976 (18) usando como iniciador un azocompuesto de tipo amidínico, el cloruro del 2,2'-azobis(2-amidinopropano), aunque ellos mismos hablan de que anteriormente ya se habían producido partículas de látex positivas mediante el uso de tensioactivos catiónicos o por copolimerización usando monómeros catiónicos. Posteriormente el trabajo de Goodwin y col. (19) sentó definitivamente las bases para la producción de látex catiónico monodisperso y estable coloidalmente usando como iniciador el dicloruro del azobis-isobutiramidín ($ABA \cdot 2HCl$), un azocompuesto que tiene el problema, al igual que el utilizado por Sakota y Okaya, de que el grupo que aporta la carga, el amidino, se hidroliza rápidamente con el tiempo y provoca una pérdida de carga en la superficie de las partículas. Además, al no ser una base muy fuerte, la densidad de carga eléctrica depende considerablemente del pH del medio y lo hace poco adecuado para su uso como modelo coloidal.

Estos problemas pueden solventarse utilizando como iniciador el cloruro del azo-N,N'-dimetilén-isobutiramidín ($ADMBA \cdot HCl$), compuesto similar a los anteriores pero que estabiliza los grupos amidino mediante dos metilenos que cierran la estructura en forma de anillo (Figura 2.2). Este compuesto ya fue descrito por Goodwin y col. (19), y su método posteriormente mejorado por Hidalgo Alvarez y col. (20). Aunque los látexes sintetizados con este nuevo iniciador eran muchísimo más estables frente a la hidrólisis que los anteriores, seguían presentando una dependencia de la carga con el pH. En este trabajo hemos conseguido solventar este problema mediante una variación del método de síntesis. Esta consiste básicamente en poner un medio ácido en el matraz de reacción, con lo que se consigue que los grupos cargados presenten una basicidad mayor, y por tanto una menor dependencia con el pH.

Supongamos un caso de polimerización en emulsión de estireno utilizando persulfato potásico como iniciador. Este sistema estará compuesto inicialmente por dos fases bien diferenciadas: una fase acuosa saturada con el monómero que pueda disolverse en ella junto con el iniciador también disuelto, y una fase orgánica formada por el resto de monómero. Si mantenemos la mezcla de reacción bajo constante agitación, esta última fase se encontrará dispersada en forma de gotas de monómero en la fase acuosa.

El inicio de la reacción vendrá determinado por el comienzo en la descomposición térmica del iniciador, de modo que se producirán radicales libres en la fase acuosa que rápidamente atacarán a las moléculas de monómero que se encuentran disueltas para formar pequeños oligómeros. Estos oligómeros crecerán progresivamente a costa de las moléculas de monómero disueltas hasta alcanzar un determinado tamaño en el que su insolubilidad los convertirá en agentes tensioactivos, y entonces se unirán entre ellas para formar micelas o partículas primarias mediante un mecanismo de nucleación homogénea. Estas partículas primarias pueden seguir creciendo mediante coalescencia con otras partículas o con más cadenas de oligómero, continuando este proceso hasta que se alcance un tamaño crítico en el que los grupos sulfato situados en la superficie aporten suficiente energía electrostática repulsiva entre partículas como para impedir el acercamiento entre ellas que podría dar lugar a una mayor coalescencia. Cuando se llega a este punto la fase de nucleación ha terminado, y todo el crecimiento posterior de las partículas de látex es ya un proceso controlado únicamente por la difusión del monómero desde la fase orgánica hacia el interior de estas partículas en crecimiento. Esta segunda etapa de la polimerización es similar a la del modelo de Harkins-Smith-Ewart anteriormente expuesta para el caso de un proceso con emulsificante, y favorece por tanto la monodispersidad en la distribución de tamaños de partícula.

Podemos por tanto obtener látexes monodispersos sin utilizar emulsificante si conseguimos que la etapa de nucleación sea relativamente corta, y que el tamaño de las partículas primarias formadas en esta etapa sea bastante pequeño en comparación con el tamaño final de las partículas de látex.

I.7 PREDICCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTICULA

El objetivo principal en el estudio de las condiciones de síntesis de los látexes monodispersos es conseguir un control independiente del tamaño de partícula y de la densidad de carga superficial, de modo que se puedan preparar muestras con las características necesitadas en un caso concreto de forma rápida y fácil. Para la polimerización en emulsión en ausencia de emulsificante, el diámetro y la densidad de carga superficial de las partículas de látex formadas dependen de la temperatura de síntesis, la velocidad de agitación, la fuerza iónica y el tipo de iones presentes en el medio, la concentración de iniciador y la concentración de monómero si asumimos que dichas partículas van a quedar estabilizadas coloidalmente por fuerzas de repulsión

electrostática. La influencia que estos parámetros ejercen sobre el tamaño de partícula y la densidad de carga superficial del látex pueden resumirse de la siguiente forma:

- 1.- Un aumento en la concentración de electrolitos disueltos en la fase acuosa implica un aumento en el diámetro de las partículas. Puesto que un aumento en la fuerza iónica del medio de dispersión trae consigo una contracción de la doble capa eléctrica que rodea la partícula, y por tanto una menor estabilidad debida a la repulsión electrostática, el núcleo primario no quedará estabilizado hasta alcanzar una densidad de carga superficial mayor, y puesto que esta densidad de carga depende del número de grupos cargados situados en la superficie, implicará también un aumento correlativo del diámetro de la partícula.
- 2.- Un aumento en la valencia del contra-ión presente en el medio de reacción provocará los mismos efectos que un aumento en la fuerza iónica, ya que de la misma manera tendrá que aumentar la carga eléctrica en la superficie de las partículas para contrarrestar el efecto que sobre la doble capa producen los iones de valencia superior. Aumentarán por tanto el diámetro y la densidad de carga superficial de la partícula.
- 3.- Un aumento en la concentración de radicales libres debida a un aumento en la concentración de iniciador o en la temperatura, a fuerza iónica constante, traerá como consecuencia un descenso en el peso molecular promedio del polímero formado, o lo que es lo mismo, una mayor proporción entre grupos cargados y volumen de polímero. Por tanto, se necesitará un tamaño menor para alcanzar una densidad de carga en la superficie que estabilice la partícula, y el resultado será un látex con menor diámetro. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que un aumento de la temperatura también disminuye la constante de estabilidad, ya que aumenta el número de colisiones brownianas que dan lugar a la coagulación.

Analizando el resultado de un gran número de síntesis en diferentes condiciones, algunos autores han deducido expresiones empíricas que relacionan el tamaño final de las partículas de

látex con los parámetros anteriormente mencionados, de forma que de antemano puedan buscarse las condiciones que permitan la obtención de un látex con el tamaño adecuado.

Goodwin y col. (12) estudiaron el efecto producido por un cambio en la fuerza iónica entre 0.88 y 50×10^{-3} M, en la concentración de monómero entre 2.2×10^{-3} M y 8.7×10^{-1} M, en la concentración de persulfato potásico como iniciador ([P]) entre 0.29 y 2.76×10^{-3} M, y en la temperatura entre 55 y 95°C, encontrando que el diámetro final de las partículas de látex obtenidas, en nm, seguía aproximadamente la siguiente expresión:

$$\log D = 0.238 \left(\log [I] [M]^{1.723} [P]^{-1} + \frac{4929}{T} \right) - 0.827 \quad [I.24]$$

Para el caso de partículas de látex catiónico utilizando como iniciador el dicloruro del azobisisobutiramidín (ABA•2HCl), Goodwin y col. (19) han encontrado la siguiente expresión:

$$\log D = 0.384 \left(\log [I] [M]^{1.099} [ABA]^{-1} + \frac{2563}{T} \right) - 0.195 \quad [I.25]$$

Goodall y col. (20) han encontrado también tendencias similares a estas utilizando como iniciador el sistema redox peroxidifosfato potásico/metabisulfito sódico; sin embargo, en este caso, la fuerza iónica no aumentaba el tamaño final de partícula.

En la síntesis de látex utilizando como comonomero del estireno el estirén-sulfonato de sodio, Juang y Krieger (21) han encontrado que, como era de esperar, el tamaño final de partícula disminuía con el contenido de comonomero cargado, y han deducido también la siguiente expresión empírica:

$$D = 166 [\text{NaSS}/I]^{-0.64} [P]^{0.2} [M]^{0.46} \quad [I.26]$$

1.8 REFERENCIAS

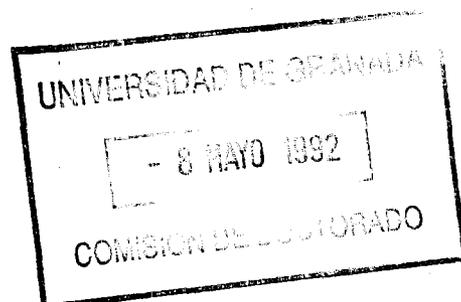
- (1) Harkins, W.D., *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 1428 (1947).
- (2) Harkins, W.D., *J. Polymer Sci.* **5**, 217 (1950).
- (3) Smith, W.V. y Ewart, R.H., *J. Chem. Phys.* **16**, 592 (1948).
- (4) Smith, W.V., *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 3695 (1948) y **71**, 4077 (1949).
- (5) Haward, R.N., *J. Polymer Sci.* **4**, 273 (1949).

- (6) Van der Hoff, B.M.E., "Polymerization and Polycondensation Processes", No. 34 en *Advances in Chemistry Series*, American Chemical Society, Washington, D.C., 1962, p.6.
- (7) Flory, P.J., *J. Am. Chem. Soc.* **59**, 241 (1937).
- (8) Hohenstein, W.P. y Mark, H., *J. Polymer. Sci.* **1**, 127 (1946).
- (9) Matsumoto, T. y Ochi, A., *Kobunshi-Kagaku* **22**, 481 (1965).
- (10) Kotera, A., Furusawa, K. y Takeda, Y., *Kolloid-Z. u. Z. Polymere* **239**, 677 (1970).
- (11) Furusawa, K., Norde, W. y Lyklema, J., *Kolloid-Z. u. Z. Polymere* **250**, 908 (1972).
- (12) Goodwin, J.W., Hearn, J., Ho C.C. y Ottewill, R.H., *Colloid and Polymer Sci.* **252**, 464 (1974).
- (13) Derjaguin, B. V. y Landau, L., *Acta Physicochim.* **14**, 633 (1941).
- (14) Verwey, E.J.W. y Overbeek, J.Th.G., "Theory of the Stability of Lyophobic Colloids", Elsevier, Amsterdam (1948).
- (15) Ottewill, R.H. y Shaw, J.N., *Disc. Faraday Soc.* **42**, 154 (1966).
- (16) Force, C.G. y Matijević, E., *Kolloid-Z. u. Z. Polymere* **224**, 51 (1968).
- (17) Hearn, J., Wilkinson, M.C. y Goodall, A.R., *Adv. Colloid Interface Sci.* **14**, 173 (1981).
- (18) Sakota, K. y Okaya, Y., *J. Applied Polym. Sci.* **20**, 1725 (1976).
- (19) Goodwin, J.W., Ottewill, R.H. y Pelton, R., *Colloid Polym. Sci.* **257**, 61 (1979).
- (20) Hidalgo-Alvarez, R., de las Nieves, F.J., Van der Linde, A.J. y Bijsterbosch, B.H., *Colloids and Surfaces*, **21**, 259 (1986).
- (21) Goodall, A.R., Hearn, J. y Wilkinson, M.C., *Br. Polym. J.* **10**, 141 (1978).
- (22) Juang, M.S. y Krieger, I.M., *J. Polym. Sci.* **14**, 2089 (1976).

APENDICE II

ESTRUCTURA DE LAS PROTEINAS

- II.1 INTRODUCCION
- II.2 RELACION ESTRUCTURA-FUNCION
- II.3 ESQUELETO POLIPEPTIDICO
- II.4 ENLACE DE HIDROGENO
- II.5 INTERACCION HIDROFOBICA
- II.6 INTERACCION IONICA
- II.7 PUENTES DE DISULFURO
- II.8 REFERENCIAS

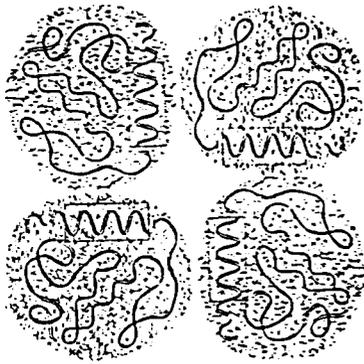


APENDICE II

ESTRUCTURA DE LAS PROTEINAS

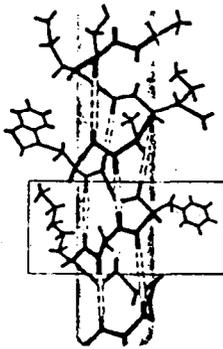
II.1 INTRODUCCION

Las moléculas de proteína son co-polímeros de unos 20 aminoácidos diferentes unidos entre sí por un enlace covalente para formar una cadena lineal denominada polipeptídica. La variedad de estructuras que pueden formarse mediante la polimerización de estos elementos es increíblemente grande, y de hecho se conocen millares de proteínas diferentes cuyo peso molecular varía desde unos 5.000 dalton hasta más de un millón. Como consecuencia de la complejidad estructural que pueden tener macromoléculas de semejante tamaño, hemos de establecer unos niveles de estructura que delimiten los diferentes órdenes de magnitud que pueden ser considerados en cada una de estas moléculas (Figura II.1). Así, por ejemplo, la secuencia lineal de aminoácidos es la llamada *estructura primaria* de las proteínas (Figura II.1d), y puesto que es la única información que existe codificada en los genes de los seres vivos, hay que suponer que es la responsable última de la estructura final tridimensional que adoptan estas macromoléculas. Al ordenamiento periódico y regular a lo largo de una dirección que adoptan en el espacio algunos trozos de esta cadena polipeptídica es a lo que se denomina *estructura secundaria* (Figura II.1c), agrupándose estas estructuras en tres grupos principales: *hélice- α* , en la que existe una ordenación en forma de escalera de caracol (Figura II.2a); *hoja- β* , con forma de zig-zag (Figura II.2b); y *random coil*, o distribución al azar en el espacio. La estructura secundaria es sobre todo evidente en las proteínas fibrosas, en las que las cadenas polipeptídicas poseen una conformación extendida (hoja- β) o arrollada longitudinalmente (hélice- α); lo mismo ocurre en segmentos de la cadena polipeptídica de las proteínas globulares. La forma en que el conjunto de estas estructuras secundarias se dispone en el espacio para constituir la macromolécula estrechamente plegada y compacta de las proteínas globulares es a lo que se denomina *estructura terciaria* (Figura II.1b). Cuando una proteína concreta está formada por más de una cadena polipeptídica, la *estructura cuaternaria* es la agrupación de estas cadenas para formar la estructura espacial completa y activa de esa proteína (Figura II.1a). El término más general de *conformación* se emplea para referirse a la combinación de la estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de una proteína.



II.1 a. Estructura cuaternaria

II.1 b. Estructura terciaria



Alpha
helix

II.1 c. Estructura secundaria

II.1 d. Estructura primaria

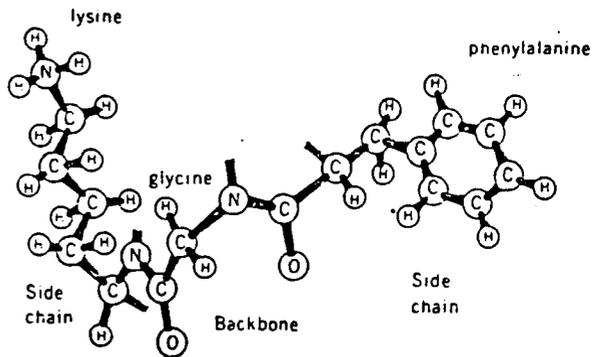


Fig. II.1 Niveles de estructura en las proteínas.

Atendiendo a esta conformación, las proteínas se dividen en dos grupos principales: *fibrosas*, que se hallan constituidas por cadenas polipeptídicas ordenadas de modo paralelo a lo largo de un eje formando fibras o láminas largas. Son materiales físicamente resistentes, insolubles en agua o en disoluciones salinas diluidas. Las proteínas fibrosas son los elementos básicos estructurales en el tejido conjuntivo de los animales superiores, tales como el colágeno de los tendones y la matriz de los huesos, la α -queratina del cabello, piel, uñas, plumas, cuernos, etc. y la elastina del tejido conjuntivo elástico; y *globulares*, constituidas por cadenas polipeptídicas plegadas estrechamente de modo que adoptan formas esféricas o globulares compactas. La mayor parte de ellas son solubles en medio acuoso, y generalmente desempeñan una función móvil o dinámica en la célula. Las proteínas que nosotros vamos a estudiar, tanto la seroalbúmina bovina como las gamma-inmunoglobulinas, corresponden a este último tipo de proteínas.

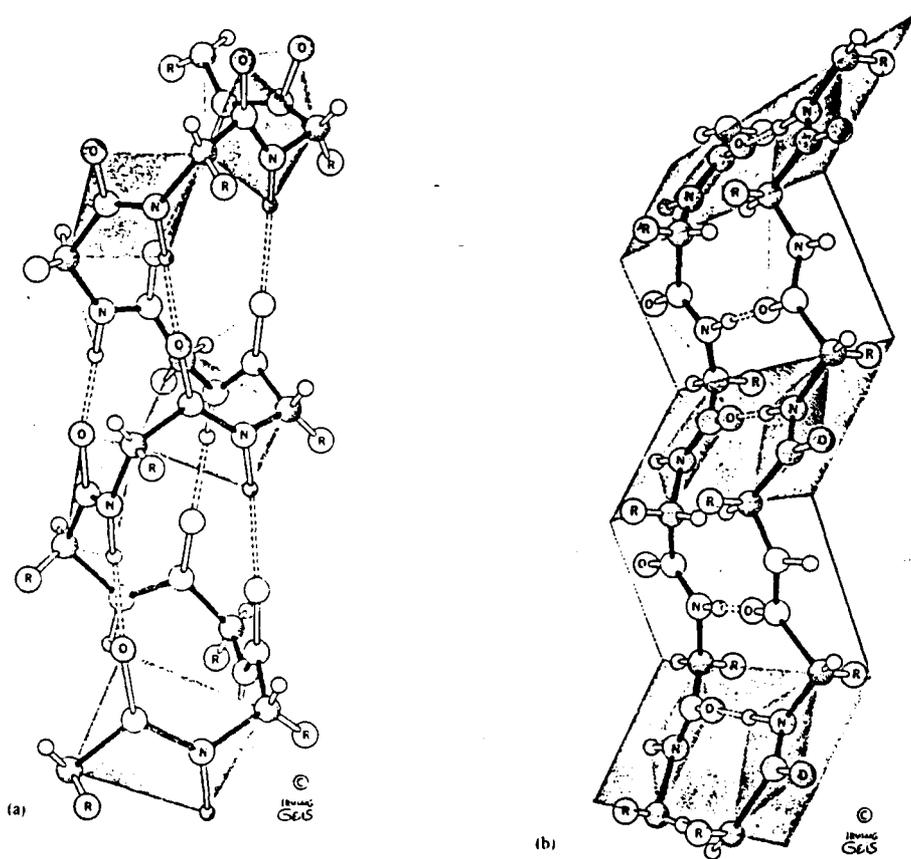


Fig. II.2 Estructura secundaria de las proteínas

II.2 RELACION ESTRUCTURA - FUNCION

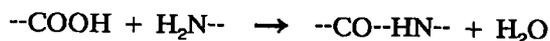
Como se comentó en la introducción de este trabajo, uno de los problemas más fascinantes de la investigación científica actual es el encontrar la base física sobre la que se asienta la estructura tan específica y bien organizada de las proteínas. Para nosotros esta cuestión es de fundamental importancia, ya que se ha demostrado en numerosas ocasiones que la actividad biológica de estas macromoléculas es muy sensible a pequeñas variaciones en su conformación tridimensional.

Como primer acercamiento a este problema de la relación tan estrecha entre estructura, función y actividad de las proteínas hay que tener en cuenta que este tipo de polímeros biológicos presentan en un gran número de casos la característica de que su estructura espacial puede ser desorganizada por medios físicos (calentamiento) o químicos (tratamiento con urea), y posteriormente reorganizada a su estado original de nuevo simplemente por interrupción del tratamiento (enfriamiento o retiro de la urea), lo que hace suponer que, en principio, la conformación que adoptan estos biopolímeros es la más favorecida termodinámicamente. La primera experiencia en este sentido fue obtenida por Anfinsen y col. (1) en 1.961, cuando demostraron que después de romper los cuatro enlaces disulfuro que mantienen la estructura compacta de la ribonucleasa y desnaturalizarla completamente con urea, la estructura original nativa se volvía a readoptar simplemente eliminando la urea del medio y reoxidando los enlaces disulfuro. Estos últimos, en vez de reagruparse al azar, lo hacían de nuevo según el esquema de la estructura nativa original.

Numerosas investigaciones en este campo han demostrado que si la información contenida en los genes solamente codifica la secuencia de aminoácidos que componen la estructura primaria de las proteínas, debe de ser el motor termodinámico, o sea, la tendencia hacia la menor energía libre, la que lleva a la formación de las estructuras ordenadas en el espacio de estas macromoléculas, y sin las cuales no podrían ejercer su función. Vamos a realizar por tanto un acercamiento termodinámico a los fenómenos que acontecen tanto en la formación y mantenimiento de la estructura interna de las proteínas como de los que ocurren cuando estas macromoléculas se encuentran en disolución o entran en contacto con una interfase.

II.3 ESQUELETO POLIPEPTIDICO

La primera característica de una proteína, que ya la hemos definido como estructura primaria, es la secuencia lineal de aminoácidos que componen su esqueleto polipeptídico. La unión entre estos, denominada de modo genérico como *enlace peptídico*, se realiza siempre de la misma forma: la eliminación de una molécula de agua entre el grupo ácido de uno de los aminoácidos y el grupo amino del siguiente, dando lugar a un enlace de tipo amida:



Este enlace covalente formado es bastante fuerte, y sólo puede romperse mediante hidrólisis química ácida o básica, o mediante el uso de enzimas específicos denominados proteasas (con los que los seres vivos pueden digerir las proteínas). En la Figura II.3 podemos observar la distribución espacial de átomos en una cadena polipeptídica modelo con todos los enlaces peptídicos en su forma *trans*. Nótese como se distinguen en la nomenclatura incluso los átomos de carbono similares de un mismo aminoácido, ya que al estar en situación diferente también presentan características diferentes. Lo mismo ocurre con los átomos de hidrógeno de cada resto aminoácido.

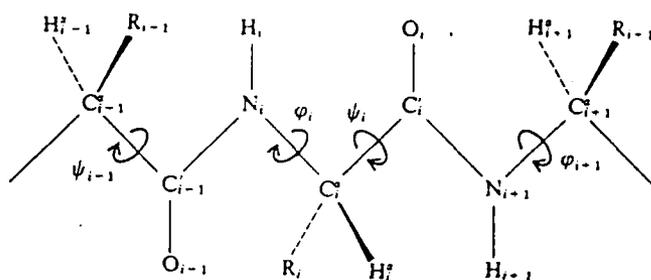


Fig. II.3 Esqueleto polipeptídico de una proteína.

Uno de los aspectos más importante de la estructura polipeptídica es que el enlace amida presenta siempre una conformación plana y en situación trans. La explicación a este fenómeno es la existencia de resonancia entre el enlace amida y el enlace carbonílico, lo que confiere un cierto carácter de doble enlace a la unión peptídica (Figura II.4).

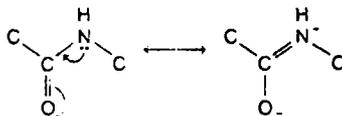


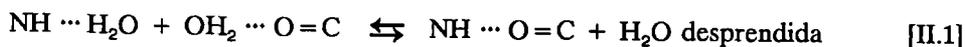
Fig. II.4 *Resonancia del enlace amida*

Este carácter parcial de doble enlace disminuye la distancia entre los átomos de carbono y nitrógeno del enlace amida en aproximadamente 0.1 \AA , e impide la rotación alrededor de este eje. Como consecuencia, la conformación de la cadena polipeptídica completa queda determinada únicamente por la rotación alrededor de los enlaces $N - C^\alpha$ y $C^\alpha - C'$. Esta rotación, sin embargo, estará siempre condicionada a los impedimentos estéricos de las cadenas laterales de los aminoácidos, así como a los diversos enlaces de tipo no covalente y a los enlaces disulfuro que se pueden establecer entre los átomos y grupos que componen la molécula, y que representarán ataduras que disminuyen la libertad de conformación del esqueleto covalente de la proteína. Estas uniones intramoleculares son, de modo general: (a) enlaces de hidrógeno; (b) interacción hidrofóbica; (c) interacción electrostática; y (d) enlace disulfuro.

II.4 ENLACE DE HIDROGENO

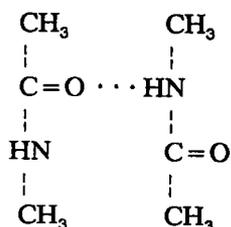
De los diversos tipos de enlace de hidrógeno que se pueden establecer en el interior de una proteína el más importante es, sin lugar a dudas, el que se establece entre los nitrógenos amídicos y los oxígenos carbonílicos del propio esqueleto covalente. Este enlace de hidrógeno desempeña un papel fundamental en la estabilización de varias de las conformaciones principales en la estructura protéica (como por ejemplo en las estructuras secundarias de hélice- α y hoja- β), por lo que ha sido considerada por muchos investigadores como la principal fuerza no covalente responsable de la estructura de las proteínas.

Puesto que el medio natural de todas las proteínas es el agua, hemos de suponer que su participación es fundamental en la formación de todo enlace de hidrógeno. La primera consideración energética en la formación de este enlace será por tanto el cambio de energía libre que se produce en el proceso



No es fácil calcular el cambio de energía libre involucrado en este proceso, ya que las moléculas de agua liberadas probablemente entren a formar parte de nuevos enlaces de hidrógeno con otras moléculas de agua en el momento de desprenderse.

Este problema fue cuidadosamente estudiado por Klotz y Franzen (2) utilizando como herramienta la espectroscopía infrarroja. Estos investigadores estudiaron la asociación intermolecular de la N-acetilamida (NAM) como un buen análogo del esqueleto peptídico. La molécula de NAM puede formar un enlace de hidrógeno de la siguiente forma



donde el grupo amida está en la conformación trans. Estos autores estudiaron el equilibrio entre las formas monoméricas (M) y diméricas (D) del compuesto, y los datos se analizaron en términos del denominado *grado de asociación*, que se define como la fracción de moléculas en estado dimérico frente al total de moléculas de NAM:

$$\alpha = \frac{2 [D]}{[M] + 2 [D]} \quad [\text{II.2}]$$

El parámetro α fue medido en tres disolventes diferentes (tetracloruro de carbono, dioxano y agua), de modo que podía evaluarse directamente el efecto que sobre la asociación de

moléculas producía el disolvente utilizado. En la Figura II.5 se puede ver el resultado de este experimento en una representación del parámetro α frente a la concentración de NAM. Se observa perfectamente como la asociación de moléculas varía de forma considerable en los tres disolventes utilizados. La asociación más fuerte se produce en el tetracloruro de carbono, el cual no puede formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de NAM; una asociación mucho más débil se produce con el agua, ya que esta compite con las moléculas de NAM para formar enlaces de hidrógeno. El dioxano, que tiene dos oxígenos que pueden aceptar un enlace de hidrógeno, aunque con mucha menor fuerza que el agua, presenta un comportamiento intermedio entre ambos disolventes.

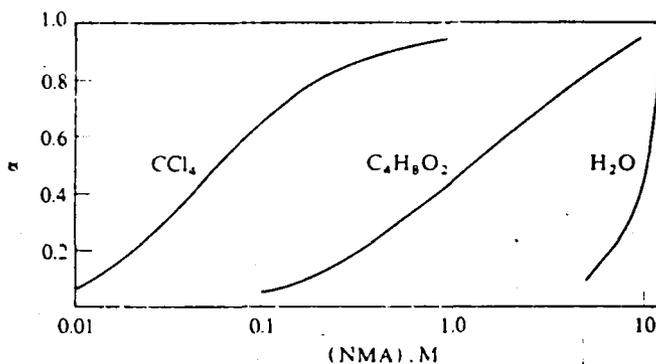


Fig. II.5 Asociación de la NAM en tetracloruro de carbono, dioxano y agua

La dependencia con la temperatura de la asociación molecular en estos tres disolventes fue también medida con objeto de determinar los parámetros termodinámicos implicados en esta unión (Tabla II.1). Se observa perfectamente como la asociación entre las moléculas de NAM está favorecida termodinámicamente en el caso del tetracloruro de carbono, pero no en el agua.

Estos resultados demuestran claramente la importancia que tiene el disolvente para determinar si el enlace de hidrógeno es factible de realizarse o no. En el caso que a nosotros nos ocupa, o sea, la fuerza de la interacción del enlace de hidrógeno en las proteínas, es fundamental por tanto el tener en cuenta que el interior de una proteína globular es predominantemente de naturaleza hidrocarbonada, y por tanto las medidas realizadas utilizando tetracloruro de carbono como disolvente serán más adecuadas para un proceso donde un enlace de hidrógeno se forma en el interior de una proteína. Por otro lado, si el enlace se forma cerca de la superficie polar o en contacto directo con el agua, serán entonces los resultados obtenidos con el agua los más útiles.

Tabla II.1 *Parámetros termodinámicos de la formación de un enlace de hidrógeno en la NAM a 25°C*

| Disolvente | ΔH° (kcal mol ⁻¹) | ΔS° (cal grad ⁻¹ mol ⁻¹) | ΔG° (kcal mol ⁻¹) |
|------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| CCl ₄ | -4.2 | -11 | -0.92 |
| Dioxano | -0.8 | - 4 | -0.39 |
| H ₂ O | 0.0 | -10 | 3.1 |

II.5 INTERACCION HIDROFOBICA

El primer acercamiento cuantitativo a la determinación de la energía puesta en juego cuando se produce una interacción hidrofóbica en el seno de una disolución acuosa vino de la mano de W. Kauzmann (3) en 1.959. Para ello aplicó la termodinámica al proceso de transferencia de un residuo apolar o hidrofóbico desde un disolvente también apolar hasta el agua. Así, por ejemplo, midió el cambio de energía libre que se produciría al transferir metano desde una fracción de volumen χ en benceno hasta la misma fracción de volumen χ en agua. Este tipo de aproximación nos determinará si los grupos apolares de los aminoácidos preferirán situarse en la superficie de la proteína (y por tanto en contacto con el agua) o si se introducirán todos juntos hacia el interior de la proteína (y formando de esa manera un ambiente hidrofóbico propio).

Antes de considerar los datos referentes a la energía libre de transferencia es importante tener en cuenta la diferencia existente entre las contribuciones *unitaria* y *crática* a dicha energía libre (3,4). Esta distinción es necesaria para que podamos estar seguros de que los datos que vamos a comparar tienen una misma base. Para ilustrar la dificultad que entraña esta cuestión, consideremos la reacción



con una constante de equilibrio definida como

$$K = \frac{[AB]}{[A][B]} \quad \text{[II.4]}$$

y una variación de energía libre estándar

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad [\text{II.5}]$$

Si las unidades que elegimos para la concentración son las de moles litro⁻¹, entonces ΔG^0 corresponderá al cambio de energía libre cuando A y B, cada uno de ellos en una concentración estándar de un mol litro⁻¹, se combinan para dar un mol litro⁻¹ de AB. Sin embargo, el valor numérico de la constante de equilibrio K (y en consecuencia el de ΔG^0) será diferente si se eligen unas unidades de concentración o una situación estándar diferente. Esta dependencia de la variación de energía libre con el estado estándar que se elija ocurre, desde luego, sólo cuando en la reacción el número de especies reactivas es diferente del número de productos resultantes.

La razón de que ocurra esta dependencia de la variación de energía libre con el estado elegido proviene únicamente de un problema estadístico procedente de la definición de entropía molar parcial; consideremos el caso del compuesto A, que tendrá una entropía molar parcial, S_A , igual a

$$S_A = S'_A - R \ln \chi_A \quad [\text{II.6}]$$

donde χ_A es la fracción molar de A. El término $-R \ln \chi_A$ es la contribución *crática* a la entropía, y es un término puramente estadístico que evalúa la mezcla de A con las moléculas de solvente. Como este parámetro depende únicamente de la concentración de A en el medio de reacción, esta contribución es independiente de la naturaleza química de A. El término S'_A es la contribución *unitaria*, y refleja las características propias del compuesto A y su interacción con las moléculas de solvente. La variación de entropía estándar para la reacción de la ecuación 3 será entonces:

$$\Delta S^0 = S'_{AB} - S'_A - S'_B + R \ln \chi_M = \Delta S' + R \ln \chi_M \quad [\text{II.7}]$$

siendo χ_M la fracción molar de cada molécula cuando su concentración es de un mol litro⁻¹. El cambio *unitario* de entropía, ΔS_u^0 , se calcularía entonces como

$$\Delta S_u^0 = \Delta S^0 - R \ln \chi_M \quad [\text{II.8}]$$

Si consideramos ahora los procesos de transferencia

Hidrocarburo en disolvente no-polar (fr. molar χ) - Hidrocarburo en agua (fr. molar χ) [II.9]

Hidrocarburo como líquido puro - Hidrocarburo en agua (fracción molar χ) [II.10]

Para el proceso definido en la Ecuación [II.9] es evidente que las contribuciones críticas a la energía libre de transferencia se van a anular mutuamente, mientras que no ocurrirá lo mismo para el caso de la Ecuación [II.10]. La contribución unitaria a la variación de entropía en este último proceso se obtendrá midiendo la variación de entropía estándar ΔS° y utilizando la Ecuación [II.8]. Una vez obtenido el valor de esta contribución unitaria a la variación de entropía podemos comparar directamente los resultados obtenidos para el proceso de la Ecuación [II.9] con el de la Ecuación [II.10].

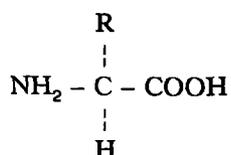
Tabla II.2 *Parámetros termodinámicos para transferir varios hidrocarburos desde disolventes no-polares hasta agua a 25°C*

| Reacción de transferencia | ΔH (kcal mol ⁻¹) | ΔS_u (cal grad ⁻¹ mol ⁻¹) | ΔG_u (kcal mol ⁻¹) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| CH ₄ en benceno → CH ₄ en H ₂ O | -2.8 | -18 | +2.6 |
| CH ₄ en éter → CH ₄ en H ₂ O | -2.4 | -19 | +3.3 |
| CH ₄ en CCl ₄ → CH ₄ en H ₂ O | -2.5 | -18 | +2.9 |
| C ₂ H ₆ en benceno → C ₂ H ₆ en H ₂ O | -2.2 | -20 | +3.8 |
| C ₂ H ₆ en CCl ₄ → C ₂ H ₆ en H ₂ O | -1.7 | -18 | +3.7 |
| Líquido C ₃ H ₈ → C ₃ H ₈ en H ₂ O | -1.8 | -23 | +5.05 |
| Líquido <i>n</i> -C ₄ H ₁₀ → <i>n</i> -C ₄ H ₁₀ en H ₂ O | -1.0 | -23 | +5.85 |
| Líquido C ₆ H ₆ → C ₆ H ₆ en H ₂ O | 0 | -14 | +4.07 |

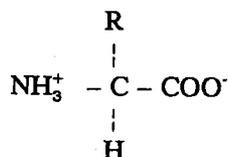
La Tabla II.2 muestra los valores de los parámetros termodinámicos medidos para el proceso de transferencia de varios hidrocarburos desde disolventes orgánicos hacia agua (Ec. [II.9]), así como desde su estado de líquido puro hacia agua (Ec. [II.10]). Tanto las variaciones de energía libre como las de entropía están expresadas como variaciones unitarias. Queda patente a la vista

de estos datos que, aunque energéticamente los hidrocarburos prefieren estar en el agua que en disolventes apolares ($\Delta H < 0$), la variación tan negativa de entropía provoca que la energía libre total del proceso sea positiva, lo que implica que la transferencia no es favorable termodinámicamente. La interpretación de estos resultados se basa en la suposición de que los hidrocarburos apolares inducen en las moléculas de agua la formación de estructuras ordenadas similares a las del hielo que encierran en su interior las moléculas de hidrocarburo de la misma forma que ocurre en los hidratos cristalinos. Esto es bastante razonable, especialmente por el hecho observado de que cuando se disuelven hidrocarburos en agua se produce una elevación en el punto de congelación del agua. Este proceso por lo tanto implica la formación de estructuras ordenadas y, por tanto, de enlaces de hidrógeno. Como la formación de estos enlaces de hidrógeno ocurre exotérmicamente, es decir, liberando energía, es por lo que se producen valores negativos de ΔH en los procesos de transferencia. Sin embargo, la ordenación de las moléculas de agua en estas nuevas estructuras más organizadas naturalmente trae consigo un descenso de entropía, que en último término es el responsable de que el proceso global de transferencia de un hidrocarburo desde un disolvente apolar hacia el agua no sea espontáneo.

Para el caso de los aminoácidos se han obtenido datos similares a los anteriormente expuestos para los hidrocarburos. En la Tabla II.3 se pueden observar los valores de la variación de energía libre para la transferencia de diferentes aminoácidos en estado puro desde una disolución en etanol hasta agua. En este proceso de transferencia, las moléculas cambian su estado eléctrico desde la forma neutra, apolar que tienen en el etanol



a la forma zwitteriónica que tienen en el agua



Esta transformación da como resultado una variación negativa de la energía libre en el proceso de transferencia, principalmente debido a la solvatación de la forma zwitteriónica por las moléculas de agua. Lo más importante en este proceso es, sin embargo, considerar la diferencia ΔG_i entre la variación de energía libre en el caso de un aminoácido particular y el mismo dato para el caso de la glicina. Esta diferencia nos da una medida directa de la contribución que tiene en el proceso la cadena lateral de cada aminoácido. Este dato es de fundamental importancia para la consideración del proceso en el caso de una proteína, ya que una vez establecidos los enlaces peptídicos entre los diferentes aminoácidos que lo componen, solamente la cadena lateral de cada uno de ellos es la que realmente influye en las transformaciones que sufra la estructura completa.

Tabla II.3 *Cambios de energía libre para transferir varios componentes de etanol a agua a 25°C*

| Componente | ΔG (kcal mol ⁻¹) | ΔG_i (kcal mol ⁻¹) |
|------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|
| Glicina | -4.63 | 0 |
| Alanina | -3.90 | +0.73 |
| Valina | -2.94 | +1.69 |
| Leucina | -2.21 | +2.42 |
| Isoleucina | -1.69 | +2.97 |
| Fenilalanina | -1.98 | +2.65 |
| Prolina | -2.06 | +2.60 |
| Contribución de un grupo CH ₂ | | |
| Etano | +3.02 | --- |
| Metano | +2.26 | --- |
| Etano-Metano | --- | +0.76 |
| Alanina-Glicina | --- | +0.73 |
| Leucina-Valina | --- | +0.73 |

En la Tabla II.3 podemos observar como los valores de ΔG_i aumentan conforme lo hace el tamaño de la cadena lateral; y lo que es más sorprendente, la contribución de cada grupo metileno (-CH₂-) al valor de ΔG_i es bastante similar para diferentes moléculas. Así, por ejemplo, se puede observar como la diferencia en la variación de energía libre entre el caso del etano y

el del metano es prácticamente la misma que entre la alanina y la glicina o que entre la leucina y la valina, todos ellos variando únicamente en la presencia de un grupo metileno más en su molécula. Estos resultados sugieren que cada grupo hidrocarburo individual actúa más o menos independientemente y de forma aditiva en el proceso de transferencia para el caso de estas pequeñas moléculas.

Los datos de las Tablas II.2 y II.3 nos demuestran que las cadenas laterales de los aminoácidos apolares, si pueden elegir, preferirán estar en un ambiente apolar alejados del agua. Por tanto, tenderán a juntarse entre ellas para formar una región de grupos apolares, y es esta tendencia lo que se denomina generalmente como interacción o enlace hidrofóbico. En el caso particular de las proteínas, numerosos estudios cristalográficos con rayos-X confirman el hecho de que las cadenas laterales de los aminoácidos apolares tienden a acumularse en el interior de la proteína, formando una región excluida del medio acuoso exterior.

Es fundamental tener en cuenta que la principal fuerza que provoca la interacción hidrofóbica es entrópica, y que la variación de entalpía de este proceso realmente actúa en sentido contrario a esta tendencia. Por tanto cuando dos o más grupos hidrofóbicos, inicialmente solvatados, se unen entre sí desplazando las moléculas de agua que los rodeaban, se produce una absorción de calor ($\Delta H > 0$). Esto significa que un aumento en la temperatura del sistema conllevará una tendencia a desplazar el equilibrio hacia la formación del enlace hidrofóbico más que hacia la disociación, siempre que supongamos que el rango de temperaturas que estamos considerando es lo bastante pequeño como para que ΔH permanezca positivo (cuantitativamente esta tendencia está expresada por la ecuación de van't Hoff $d(\ln K)/dT = \Delta H/RT^2$). A este respecto cabe citar aquí el estupendo tratamiento teórico de la interacción hidrofóbica publicado en 1977 por Pratt y Chandler (5).

Los resultados anteriormente expuestos demuestran claramente la importancia que la interacción hidrofóbica tiene en el plegamiento de una cadena polipeptídica para formar la estructura espacial compacta de una proteína en su estado nativo. Esta proteína, con sus cadenas laterales apolares orientadas hacia el interior, debe gran parte de su estabilidad estructural precisamente a esta interacción hidrofóbica. En consecuencia, parece razonable pensar que la conformación que una proteína presenta sea bastante sensible a cambios en la composición del medio, especialmente si estos cambios afectan a la capacidad de reparto de un hidrocarburo entre la fase orgánica del interior de la proteína y el medio acuoso externo. En esta línea se encuentra el caso de la urea, uno de los desnaturizantes de proteínas más conocido y utilizado

(definiremos primeramente la desnaturalización como el proceso por el que una cadena polipeptídica sufre un proceso de desplegamiento de su estructura nativa en la proteína, siendo la principal consecuencia la pérdida de la actividad de dicha proteína). Aunque antiguamente se pensaba que el efecto provocado por la urea era consecuencia de la competencia por los enlaces de hidrógeno peptídicos intramoleculares, y que por ello se distorsionaba la estructura original de la proteína, esta idea tuvo que desecharse porque entonces implicaría que la propia agua del medio sería un potente agente desnaturalizante, ya que su competencia por los enlaces de hidrógeno es aún superior a la de la molécula de urea.

Tabla II.4 *Cambios de energía libre para transferir varios aminoácidos de agua a urea 8 M a 25°C*

| Aminoácido | ΔG (kcal mol ⁻¹) | ΔG_i (kcal mol ⁻¹) |
|--------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|
| Glicina | +0.10 | 0 |
| Alanina | +0.03 | -0.07 |
| Leucina | -0.28 | -0.38 |
| Fenilalanina | -0.60 | -0.70 |
| Tirosina | -0.63 | -0.73 |

En la Tabla II.4 podemos observar los valores de la variación de energía libre que se han medido para la transferencia de diversos aminoácidos desde agua hasta una disolución de urea 8 M. Para poder evaluar la contribución de las cadenas laterales de estos aminoácidos, ΔG_i , una vez más se ha calculado la diferencia entre el valor de ΔG de cada uno de ellos con respecto a la glicina. En vista de los datos expuestos, está claro que las cadenas laterales de los aminoácidos apolares prefieren la disolución de urea 8 M que el agua, con un grado de preferencia que aumenta conforme lo hace el tamaño de dicha cadena lateral. Esto implica que, en presencia de una disolución de urea 8 M, la preferencia de una cadena lateral apolar por el interior hidrofóbico de una proteína frente al exterior acuoso disminuirá en varios cientos de calorías por mol. Puesto que los restos aminoácidos apolares representan entre el 30 y el 50% del total en la mayoría de las proteínas, es fácil deducir que incluso en el caso de una pequeña proteína de 150 aminoácidos el cambio total en la estabilidad causado por una disolución de urea 8 M es enorme.

II.6 INTERACCION IONICA

La existencia en las proteínas de aminoácidos que poseen cadenas laterales de tipo iónico, tanto positivos como negativos, hace pensar obviamente en la posibilidad de la formación de puentes salinos (también llamados pares iónicos) que actuarían como fuerzas no covalentes adicionales en el mantenimiento de la estabilidad de la estructura nativa de una proteína. Efectivamente los datos cristalográficos de rayos-X han verificado la existencia de pares iónicos en las proteínas. Cuando el pH del medio es neutro, las cargas negativas proceden de los grupos laterales carboxílicos del ácido glutámico y el ácido aspártico, así como de los residuos C-terminales. Las cargas positivas provienen de los grupos amino situados en el extremo N-terminal y en la cadena lateral de la lisina, de los grupos guanidino de la arginina, y del grupo imidazol de la cadena lateral de la histidina (el cual se ioniza en la zona de pH neutro).

Es bastante complicado cuantificar la magnitud de la contribución aportada por las interacciones iónicas a la estabilidad estructural global de una proteína en su estado nativo. Para poder hacerlo tendremos que considerar primeramente la variación de energía libre que tiene lugar cuando dos iones de carga contraria se aproximan hasta interaccionar (3). Vamos a calcular la diferencia de energía libre, ΔG , entre un estado final en el que las cargas se habrán aproximado hasta una distancia igual a la suma de sus radios iónicos (cuando entraran en contacto), y un estado inicial en el que ambas cargas están lo suficientemente alejadas la una de la otra como para poder suponer despreciable la interacción electrostática mutua. Esta variación de energía libre será, por tanto, la equivalente al trabajo necesario para juntar ambas cargas. Para cargas de signo contrario este trabajo es negativo, y vendrá dado por la expresión

$$\Delta G = -\int_{\infty}^a (z_1 z_2 e^2 / \epsilon r^2) dr = z_1 z_2 e^2 / \epsilon a \quad [\text{II.11}]$$

donde r es la distancia variable de separación, z_1 y z_2 son las valencias iónicas de los dos iones, e es la carga elemental del electrón, y ϵ la constante dieléctrica del medio. El parámetro a es la distancia de contacto entre ambos iones, y es igual a la suma de sus radios iónicos.

La Ecuación [II.11] es una expresión aproximada, claro está, ya que entre otras suposiciones admite que la constante dieléctrica del medio va a ser constante durante todo el proceso de aproximación de los iones; esto es bastante incierto, ya que el ambiente microscópico que va a existir entre ambas cargas seguramente irá variando conforme se acercan la una a la otra, lo que

implicaría una variación de ϵ con r . Además, tendríamos que tener en cuenta las variaciones energéticas que se pueden producir como consecuencia del desplazamiento de algunas de las moléculas de agua que originalmente se encuentran solvatando ambos iones, y que conforme se acercan el uno al otro tendrán que desplazarse de sus posiciones y variar su interacción con estas cargas.

Si asumimos que el valor de la carga de los iones es $z_1 = -z_2 = 1$, la suma de sus radios iónicos $a = 4 \text{ \AA}$, y que $\epsilon = 80$ (que es el valor de la constante dieléctrica del agua), entonces ΔG tendrá un valor de aproximadamente -1 kcal mol^{-1} . Conforme las cargas se aproximan la una a la otra cerca de la superficie de la proteína, sin embargo, tenemos que admitir que algunas líneas de fuerza de la interacción electrostática entre ambos iones pasarán a través de la propia proteína en vez de pasar a través del medio acuoso, y esto tenderá por tanto a reducir el valor de la constante dieléctrica efectiva existente entre las dos cargas. El efecto producido será entonces un aumento en la magnitud del cambio de energía libre del proceso. Por otro lado, también es muy posible que la separación inicial de las cargas que van a formar el par iónico en la estructura desplegada inicial de la proteína no sea tan grande como para poder desprestigiar las interacciones electrostáticas entre ambas. Partiendo de esta situación, el cambio de energía libre necesaria para poner en contacto ambas cargas sería menor del inicialmente calculado.

La variación de entalpía asociada a este proceso de acercamiento de dos iones de signo contrario puede calcularse a partir de la ecuación 11 si asumimos que la distancia a es independiente de la temperatura.

$$\begin{aligned} \Delta H &= -T^2 [d(\Delta G/T) / dT] = (z_1 z_2 e^2 / \epsilon a) + T(z_1 z_2 e^2 / \epsilon^2 a) (d\epsilon / dT) \\ &= (\Delta G / \epsilon) [d(\epsilon T) / dT] \end{aligned} \quad [\text{II.12}]$$

El cambio de entropía viene dado por

$$\begin{aligned} \Delta S &= -d\Delta G / dT = (z_1 z_2 e^2 / \epsilon^2 a) (d\epsilon / dT) \\ &= (\Delta G / \epsilon) (d\epsilon / dT) \end{aligned} \quad [\text{II.13}]$$

Las dos derivadas implicadas en las Ecuaciones [II.12] y [II.13] presentan valores negativos para medios acuosos, ya que la constante dieléctrica del agua o de las disoluciones acuosas disminuye conforme aumentamos la temperatura. Esto significa que el valor de ΔH para la formación de un par iónico tendrá un valor positivo en el caso de medios acuosos, es decir, el

cambio de entalpía se opone a la formación de este puente salino. En sentido contrario actuará sin embargo la variación de entropía, ΔS , que será positiva, y que nos indica que la interacción electrostática entre cargas de signo contrario en una proteína está por tanto entrópicamente dirigida. Algunas experiencias descritas en la literatura dan apoyo a las predicciones cualitativas desarrolladas con este modelo tan simple. Así, por ejemplo, en la reacción entre el ión Mg^{2+} y la molécula iónica ATP^{4-} para formar el complejo $MgATP^{2-}$ se ha medido una variación de entropía de $+29.4 \text{ cal mol}^{-1} \text{ grad}^{-1}$ a favor de la formación del complejo, mientras que se ha encontrado una variación de entalpía de $+3.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ que se opone al acercamiento de ambos iones. Puesto que el producto de ΔS por el valor de la temperatura es superior al de ΔH en magnitud, el proceso tendrá una variación de energía libre neta, ΔG , cuyo valor será negativo, y el proceso estará por tanto favorecido termodinámicamente.

Es bastante sorprendente el encontrar que la formación de pares iónicos es un proceso entrópicamente dirigido, puesto que la primera imagen que uno se hace de este proceso es que la formación de un complejo entre ambas cargas va a disminuir su libertad de movimientos con respecto al estado original (en el que los iones se encuentran separados), y esto se debería traducir en una disminución de la entropía. Sin embargo, el resultado obtenido puede explicarse en términos del mecanismo cualitativo que hemos desarrollado hasta ahora. Puesto que los iones tienden a estar enormemente solvatados como consecuencia de la electroneutralidad que tiene que existir en cada microambiente de una disolución acuosa, quiere esto decir que entre los iones y las moléculas de agua habrá una interacción electrostática muy fuerte. Existirá por tanto una estructura muy organizada de moléculas de agua inmovilizadas alrededor de cada ión que tendrán que ser liberadas para la formación de un puente salino, y el aumento en la libertad de movimientos de estas moléculas de agua conllevará un aumento correlativo en la entropía del medio acuoso que supera en valor a la pérdida de entropía sufrida por los dos iones al juntarse. La consecuencia global será un importante incremento de la entropía de todo el sistema tras la formación de un nuevo par iónico (6).

La interrupción de las interacciones energéticamente muy favorables entre los iones y las moléculas de agua que los mantienen solvatados en su estado original en la proteína desplegada es también la responsable del cambio positivo de la entalpía asociado a la formación de un par iónico.

El hecho de que estos puentes salinos se encuentren en las proteínas cuando están en su estado nativo nos quiere decir que deben contribuir a la estabilidad de la estructura espacial

compacta. Como ya dijimos antes, sin embargo, es difícil evaluar su importancia relativa. Podemos hacer una estimación cualitativa partiendo de la base de que los puentes salinos aumentan la fuerza de su unión cuando la constante dieléctrica del medio disminuye (por ejemplo, añadiendo disolventes no polares como dioxano o alcohol etílico al medio acuoso). Cuando esto se realiza, sin embargo, las proteínas tienden a desnaturalizarse, lo que nos indica sin lugar a dudas que la disminución en la fuerza del enlace hidrofóbico que mantiene las cadenas laterales no polares en el interior de la proteína es superior al aumento que puede producirse en las interacciones electrostáticas. Por tanto, podemos concluir en el mantenimiento de la estabilidad de la estructura nativa de una proteína, las interacciones hidrofóbicas son más importantes que las electrostáticas.

II.7 PUENTES DISULFURO

Hasta ahora hemos considerado tres fuerzas de tipo no covalente que son fundamentales en la estabilización de la estructura nativa de las proteínas: el enlace de hidrógeno, la interacción hidrofóbica y la formación de pares iónicos. Junto a estas tres fuerzas existe además otra cuyo papel es también fundamental en el mantenimiento de la conformación original: el enlace covalente que se puede formar entre las cadenas laterales de dos restos de cisteína mediante la eliminación de sus dos átomos de hidrógeno, y que se denomina de forma general como enlace o puente disulfuro.



Este tipo de unión, al ser más fuerte y localizada que las anteriores, sirve para restringir el número de posibles conformaciones tridimensionales que la cadena polipeptídica puede adoptar en el espacio. De esta forma se reduce, por tanto, la diferencia en entropía configuracional entre los estados nativo y desnaturalizado de la proteína (con los enlaces disulfuro intactos). Sin esta restricción que suponen los puentes disulfuro, el estado desnaturalizado de la cadena polipeptídica tendría una libertad configuracional mucho mayor, y esto redundaría en una menor estabilidad del estado nativo al disminuir la diferencia en energía libre entre los dos estados.

Consideremos primero el número de posibles apareamientos diferentes que pueden existir entre las cadenas laterales de los restos de cisteína en una proteína desplegada y reducida (puesto que la formación del puente disulfuro implica la pérdida de hidrógenos por parte de los grupos sulfidrilo, y significa por tanto una oxidación de la molécula). Entre dos restos de cisteína existe una única posibilidad de apareamiento, mientras que entre cuatro ya hay tres posibilidades diferentes de enlace, entre seis hay 15, entre ocho hay 105, etc. Es evidente que en cuanto el número de restos de cisteína aumenta un poco, los posibles enlaces que se pueden formar se multiplican rápidamente.

Puesto que en la estructura nativa original de una proteína se encuentran los puentes disulfuro siempre en la misma posición, los investigadores en este campo se planteaban como podía alcanzarse esta estructura en la formación de una proteína si en la información genética sólo se encuentra codificada la secuencia de aminoácidos que componen el esqueleto polipeptídico de la proteína. Hay al menos tres posibles explicaciones para este fenómeno (7).

- 1.- Aunque existen muchas posibilidades hipotéticas de enlace, sólo una en particular es geométrica o estéricamente posible. La proteína estaría forzada, por tanto, a adoptar esta estructura.
- 2.- Muchos de los apareamientos espaciales son posibles, pero existen fenómenos específicos en la biosíntesis de la cadena polipeptídica que obligan a adoptar una única configuración (como puede ser mediante la acción de determinadas enzimas).
- 3.- La cadena de proteína desplegada y reducida se va plegando espontáneamente conforme se va sintetizando en su conformación más estable, y los puentes disulfuro están estratégicamente situados para reforzar esta estructura particular. Aunque otra situación de los puentes disulfuro sea posible, esta correspondería con un estado general de la proteína menos favorecido termodinámicamente.

Las diferentes explicaciones al problema de la situación tan específica de los puentes disulfuro fueron cuidadosamente estudiadas, como ya dijimos al principio de este apéndice, por Anfinsen y col. (1), quienes eligieron la ribonucleasa como proteína modelo para determinar cual era la verdadera razón de este plegamiento tan concreto. Esta proteína, con un peso molecular

aproximado de 14.000 daltons, tiene cuatro enlaces disulfuro y ningún grupo SH libre en su estructura espacial nativa y activa. Existen por lo tanto 105 formas diferentes de emparejamiento posibles entre estos ocho restos de cisteína.

El experimento realizado por estos autores fue el siguiente: primero redujeron la molécula nativa mediante tratamiento con β -mercaptoetanol ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$) en presencia de urea 8 M, lo que produce una cadena polipeptídica desplegada y con todos los enlaces disulfuro abiertos. Entonces se va retirando del medio tanto la urea como el β -mercaptoetanol mediante diálisis, y la solución es expuesta al oxígeno atmosférico a un pH alcalino medio para permitir la reoxidación de los grupos sulfidriilo. Los resultados obtenidos están resumidos gráficamente en la Figura II.6, donde se muestra la variación de varias propiedades enzimáticas en función del tiempo de reoxidación. Los círculos muestran el descenso en el número de grupos SH libres, mientras que los cuadrados muestran el cambio en la rotación óptica a 366 nm de la proteína. Cuando estos dos parámetros se normalizan a una misma escala, se observa como coinciden en una misma curva experimental. Este resultado sugiere que conforme van desapareciendo los grupos sulfidriilo, y por tanto se van formando puentes disulfuro, la cadena polipeptídica va adquiriendo una estructura más ordenada tal y como muestra el aumento correlativo en la rotación óptica (8).

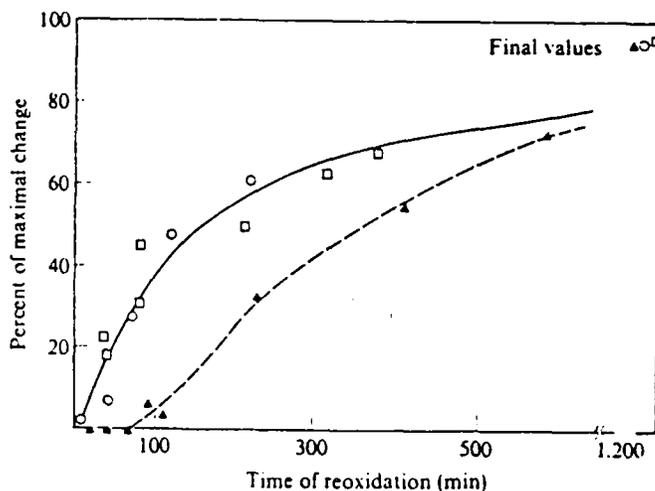


Fig. 6 Reoxidación de la ribonucleasa

En la misma Figura se muestra también como va apareciendo de nuevo la actividad enzimática conforme avanza el tiempo de reoxidación. Esta curva aparece con posterioridad en el tiempo detrás de las correspondientes a las propiedades físicas de la proteína, y va siempre por debajo de estas. Esto parece indicar, por lo tanto, que las moléculas completamente activas no se regeneran todas a un tiempo, sino que van reapareciendo una a una. El hecho de que exista este retraso de la curva de actividad con respecto a la de propiedades físicas implica que originalmente se van formando diferentes emparejamientos de los puentes disulfuro, tanto intermolecular como intramolecularmente, pero que estos van variando su posición hasta alcanzar el estado más estable termodinámicamente, o sea, la situación que tenían en el estado nativo de la proteína.

Las moléculas de ribonucleasa formadas tras la reoxidación de los grupos SH y el plegamiento de la cadena polipeptídica son idénticas a las originales antes del experimento. Podemos concluir por tanto que para el caso de la ribonucleasa, al menos, la segunda explicación de las anteriormente citadas no es válida, ya que los puentes disulfuro se han situado en su correcta posición *in vitro*. La primera de las explicaciones anteriores fue evaluada mediante un experimento que consistía en permitir la reoxidación de los grupos disulfuro de la ribonucleasa en presencia de urea 8 M, es decir, manteniendo la estructura de la proteína desplegada mientras se van formando de nuevo los puentes disulfuro. Después de regenerar todos estos enlaces, la urea es retirada del medio para permitir el replegamiento de la cadena polipeptídica, y se observó entonces que se había formado un producto con una actividad enzimática de sólo el 1%. Este valor tan bajo de actividad demuestra claramente que se han formado enlaces disulfuro en situaciones diferentes de las del estado nativo, como consecuencia de que durante su formación no se ha permitido que la cadena polipeptídica adopte su postura de mínima energía. Es muy curioso también que este nivel de actividad, el 1%, coincida con el que estadísticamente cabía esperar si suponemos que en este nuevo estado de la proteína los 105 posibles emparejamientos de los puentes disulfuro han ocurrido, y que sólo uno de ellos corresponde con un estado enzimáticamente activo de la proteína. Y lo que es más representativo todavía es el hecho de que si se añade a la solución un reactivo de tipo sulfidrílico, la estructura nativa original de la proteína se va regenerando de nuevo, lo que indica que si se le da la posibilidad de abrir los puentes disulfuros mal situados, estos van volviendo a oxidarse posteriormente en su situación original, que evidentemente corresponde con la de menor energía libre.

Estos experimentos demuestran que la tercera de las explicaciones anteriormente expuestas es la más acertada, e implica que la cadena o cadenas polipeptídicas que componen una proteína se pliegan tras su síntesis en la configuración más favorecida termodinámicamente, siendo este su estado nativo que además se ve reforzado por la formación de enlaces covalentes disulfuro.

II.8 REFERENCIAS

- (1) Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M. y White, F.J., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **47**, 1309 (1961).
- (2) Klotz, I.M. y Franzen, J.S., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 3461 (1962).
- (3) Kauzmann, W., *Adv. Protein Chem.* **14**, 1 (1959).
- (4) Gurney, R.W., en "*Ionic Processes in Solution*". McGraw-Hill, New York (1953).
- (5) Pratt, L.R. y Chandler, D., *J. Chem. Phys.* **67**, 3683 (1977).
- (6) Frank, H.S. y Wen, W.Y., *Disc. Faraday Soc.* **24**, 133 (1957).
- (7) Anfinsen, C.B. y Scheraga, H.A., *Adv. Protein Chem.* **29**, 205 (1975).
- (8) Doty, P., *Optical Rotation and the Structure of Polypeptides and Proteins* en "*Fourth International Congress of Biochemistry, Vol. VIII: Proteins*". Pergamon Press, New York (1960).

APENDICE III

TEORIA ELECTROKINETICA

- III.1 INTRODUCCION**
- III.2 TEORIA DE HELMHOLTZ-SMOLUCHOWSKI**
- III.3 TEORIA DE GOUY-CHAPMAN**
- III.4 TEORIA DE STERN**
- III.5 TEORIA DE HENRY**
- III.6 TEORIA DE LA DOBLE CAPA POLARIZADA**
- III.7 REFERENCIAS**

APENDICE III

TEORIA ELECTROKINETICA

III.1 INTRODUCCION

La electrocinética es el dominio de la Ciencia que trata aquellos fenómenos de transporte en los que una fase se encuentra en movimiento relativo respecto de otra. Generalmente, una fase es un fluido y la otra es sólida, y es imprescindible que la interfase de contacto esté cargada eléctricamente. El movimiento puede producirse por la aplicación de una fuerza eléctrica o mecánica. Un ejemplo del primer caso es la electroforesis, que se define como el movimiento de partículas cargadas a través de una disolución estacionaria debido a la presencia de un campo eléctrico; un ejemplo típico del segundo caso es el potencial de flujo que se genera cuando un fluido pasa a través de un medio poroso o un capilar cargado como consecuencia de la aplicación de una diferencia de presión externa.

Dentro del campo de la físico-química de los coloides, los procesos electrocinéticos se utilizan con frecuencia para conocer el estado eléctrico de las interfases sólido-líquido. El interés del estudio de estas interfases proviene del hecho de que en estos rangos de tamaño (1 micra o menos) los efectos superficiales son dominantes y gobiernan la conducta de estos materiales. Así, por ejemplo, un cubo de 1 cm³ tiene una razón superficie / volumen de 6 a 1, mientras que, en las mismas unidades, un cubo de 1 micra de arista tiene una razón superficie / volumen de 60.000 a 1.

En estas interfases existe, generalmente, una especial distribución de cargas denominada doble capa eléctrica (d.c.e.) consistente en una capa de especies cargadas situadas en la fase sólida y una capa formada por iones difusamente distribuidos en la disolución. La presencia de esta carga eléctrica en la superficie de las partículas es precisamente la causante, en la gran mayoría de los casos, de la propia existencia del estado coloidal. La repulsión eléctrica que se genera entre cargas del mismo signo impide que dichas partículas, formadas por un material inmisible o insoluble en disolución acuosa, puedan acercarse lo suficiente como para agregarse.

Conocer las principales características de esta doble capa eléctrica es de capital importancia para comprender el comportamiento de muchos modelos coloidales, así como de muchos sistemas prácticos reales. De este modo, por ejemplo, el signo de la carga presente en la

superficie de una partícula puede determinar si las especies cargadas disueltas en el medio se adsorberán sobre dicha superficie o no.

Esta carga eléctrica presente en la superficie sólida puede originarse de diferentes formas: exceso de iones o de electrones, en una o ambas fases, debido a diferencias en su afinidad electrónica; disociación de grupos iónicos presentes en la superficie de la partícula; adsorción de moléculas cargadas en dicha superficie. Cualquiera de estos procesos provoca un exceso de carga en una de las fases, e induce por tanto una redistribución en la fase adyacente que tiene por objeto mantener la neutralidad. Esta distribución de cargas es la que hemos denominado doble capa eléctrica.

Un concepto básico en el estudio de los fenómenos electrocinéticos es el de plano de deslizamiento, que se define como la superficie imaginaria que separa la parte de líquido firmemente adherido a la fase sólida del resto de líquido que se mueve libremente en el seno de la disolución. El elemento determinante de los procesos electrocinéticos es, precisamente, la densidad de carga o diferencia de potencial eléctrico presente en este plano de deslizamiento con respecto a un punto de la disolución lo suficientemente alejado como para poder considerarlo eléctricamente neutro. Este potencial se conoce con el nombre de "potencial zeta" (ζ). En general, la densidad de carga superficial y la movilizadora electrocinéticamente no coinciden, ya que el plano de deslizamiento no coincide con la superficie sólida de la partícula. De hecho, existe en la literatura una gran incertidumbre sobre la posición exacta del plano de deslizamiento y, en consecuencia, sobre la correcta interpretación del "potencial zeta" (1).

La técnica electrocinética que más se ha empleado en el estudio de las interfases sólido-líquido, y por tanto en la estimación del potencial zeta, ha sido la microelectroforesis, y este hecho se debe principalmente a la facilidad que supone la existencia de dispositivos comerciales adecuados. Estos van desde los sistemas clásicos de visualización directa (por efecto Tyndall) de las partículas hasta los más recientes y sofisticados sistemas que utilizan tecnología láser para detectar y cuantificar el movimiento de las partículas. La principal desventaja que presenta esta técnica se debe a que el material objeto de estudio debe presentarse en forma de dispersión coloidal suficientemente diluida y estable. En el caso de dispersiones concentradas, fibras o membranas, las técnicas electrocinéticas alternativas son el potencial o corriente de flujo, anteriormente definida, y la electro-osmosis.

En nuestro caso, donde el sistema coloidal a estudiar es látex de poliestireno tanto aniónico como catiónico, se pueden conseguir perfectamente las condiciones de dilución y estabilidad de

la muestra necesarias para realizar las medidas de movilidad electroforética. Se ha elegido por tanto este fenómeno electrocinético como el más adecuado para la caracterización interfacial de estas partículas, ya que presenta numerosas ventajas con respecto a las otras técnicas alternativas. Estas son, principalmente, la rapidez de ejecución y la práctica eliminación de efectos perturbadores (como conductancia superficial; solapamiento de dobles capas eléctricas, etc.) que, en cambio, si aparecen de forma habitual en los otros fenómenos electrocinéticos.

El primero que describió el fenómeno de la electroforesis fue Quincke en 1.861, quien lo definió como el efecto que provoca un campo eléctrico en una suspensión coloidal. Observó que las partículas se desplazaban hacia uno de los electrodos, y que la velocidad con que lo hacían era proporcional al campo eléctrico aplicado. Para el caso de una partícula esférica que se desplaza en el seno de un fluido con una velocidad v_e , bajo la influencia de un campo eléctrico de intensidad E , se define la movilidad electroforética μ_e como el coeficiente de proporcionalidad:

$$\mu_e = \frac{v_e}{E} \quad \text{[III.1]}$$

Como ya se comentó anteriormente, la carga eléctrica asociada al movimiento de una partícula en el seno de un fluido no es la que se presenta en la superficie de dicha partícula en forma de dipolos o grupos ionizables (carga superficial σ_0), sino la situada en el denominado "plano de deslizamiento", que es la superficie imaginaria que engloba a la partícula y a la capa de iones y solvente inmovilizados junto a ella. La diferencia de potencial eléctrico entre este plano y el seno de la disolución es la que realmente se refleja en los procesos electrocinéticos, y es precisamente el cuantificar esta variable microscópica lo que persiguen la mayoría de los desarrollos teóricos formulados en torno a estos fenómenos. Partiendo de los datos macroscópicos que se pueden obtener con alguna de las técnicas ya mencionadas, y usando los métodos matemáticos apropiados para su desarrollo, las teorías electrocinéticas estiman el potencial zeta, y predicen el comportamiento de los sistemas coloidales.

Puesto que en nuestro caso sólo hemos utilizado la electroforesis como fuente de datos para la estimación del potencial zeta, vamos a desarrollar brevemente la evolución histórica de las teorías que han descrito este fenómeno.

III.2 TEORIA DE HELMHOLTZ -SMOLUCHOWSKI

La primera interpretación teórica que se encuentra en la literatura referente a la movilidad electroforética y a su conversión en datos de potencial ζ se debe a Helmholtz (2) en 1.879, aunque fue Smoluchowski (3) el primero en cuantificar dicha interpretación en 1.903.

Helmholtz, en su intento de justificar teóricamente el fenómeno de la electroforesis, basó su interpretación en las siguientes hipótesis:

- a) Las dimensiones de la partícula son tales que el radio de curvatura, "a", en cualquier punto de la superficie es mucho mayor que la extensión de la doble capa eléctrica (d.c.e.) κ^{-1} . Por tanto, $\kappa a \gg 1$.
- b) Como consecuencia de esta primera hipótesis, la d.c.e. formada en la interfase sólido-líquido se puede considerar como un condensador plano-paralelo (Figura III.1), cuya capa interna estaría formada por las cargas del sólido, y la capa externa por las localizadas en el líquido. El grosor de este condensador (κ^{-1}) es del orden de varios radios moleculares.
- c) La partícula coloidal se considera como no conductora y el líquido que lo rodea como conductor.
- d) La partícula es indeformable y puede tener cualquier geometría. La capa de moléculas de líquido adheridas a la superficie sólida permanece estacionaria durante el movimiento, mientras que las capas siguientes son móviles. El flujo de líquido en la doble capa es laminar y se puede describir mediante las ecuaciones de la hidrodinámica.
- e) La superficie de la partícula tiene un potencial ζ con respecto al líquido que se encuentra lejos de ella. Si admitimos que existe una capa molecular adherida a la superficie, ζ representa la diferencia de potencial entre esta capa y el líquido móvil.
- f) El campo eléctrico externo está superpuesto al de la d.c.e. Esto significa que dicho campo no deforma la d.c.e., ni perturba su estructura de equilibrio.
- g) La constante dieléctrica ϵ y la viscosidad η tienen el mismo valor tanto en la d.c.e. como en el seno de la disolución adyacente.

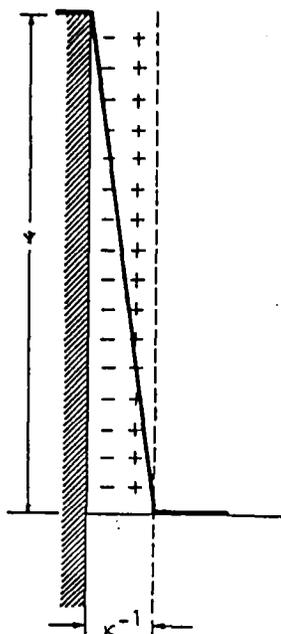


Fig. III.1 Modelo de d.c.e. de Helmholtz

A partir de estas consideraciones teóricas, sin embargo, no se obtuvo una interpretación cuantitativa satisfactoria del fenómeno hasta que Smoluchowski (3), en 1.903, propuso la siguiente ecuación para la movilidad electroforética de una partícula cargada sometida a un campo eléctrico:

$$\mu_e = \frac{V_e}{E} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta} \quad \text{[III.2]}$$

donde v_e representa la velocidad de la partícula coloidal y E la intensidad de campo resultante.

Posteriormente Debye y Hückel propusieron la introducción de un factor correctivo que tuviera en cuenta la forma geométrica de la partícula. Así, para el caso de una partícula esférica, este factor tendría un valor de 2/3.

Veamos ahora cual es el desarrollo matemático que acompaña y justifica esta teoría:

Sea n_i el número de iones de la especie i por cm^3 en una posición a distancia x , perpendicular a la superficie de la partícula donde existe un potencial ψ , y n_{i0} el número de iones de la especie i en una posición suficientemente alejada de la superficie como para que el potencial se anule.

En el equilibrio, el potencial electroquímico $\bar{\mu}_i$ de los iones debe ser constante en cualquier sitio, lo que implica que el grad $\bar{\mu}_i = 0$, luego la variación del potencial químico del ion i , $\Delta\mu_i = kT \ln n_i/n_{i0}$, debe ser compensada por la energía de interacción eléctrica, $z_i e \psi$, así pues:

$$-z_i e \psi = kT \ln \frac{n_i}{n_{i0}} \quad \text{[III.4]}$$

(el signo - se necesita para tener en cuenta contra y co-iones)

$$\ln \frac{n_i}{n_{i0}} = -\frac{z_i e \psi}{kT} \rightarrow \frac{n_i}{n_{i0}} = e^{-\frac{z_i e \psi}{kT}} \rightarrow n_i = n_{i0} e^{-\frac{z_i e \psi}{kT}} \quad \text{[III.5]}$$

que corresponde a la distribución de Boltzmann. Si realizamos un desarrollo en serie de esta expresión exponencial, despreciando los términos de escaso valor, llegamos a la distribución de iones anteriormente expuesta.

La densidad de carga en cualquier punto será la suma de las densidades de carga de cada especie iónica:

$$\rho(x) = \sum_i n_i z_i e = \sum_i n_{i0} z_i e^{-\frac{z_i e \psi(x)}{kT}} \left(\frac{\text{C}}{\text{cm}^3} \right) \quad \text{[III.6]}$$

Para un sistema cuyo potencial ψ sea función sólo de una coordenada, x , $\psi = \psi(x)$, la ecuación de Poisson es:

$$\frac{d^2 \psi}{dx^2} = -\frac{\rho(x)}{\epsilon \epsilon_0} \quad \text{[III.7]}$$

con lo que:

$$\frac{d^2 \psi(x)}{dx^2} = -\frac{e}{\epsilon \epsilon_0} \sum_i n_{i0} z_i e^{-\frac{z_i e \psi(x)}{kT}} \quad \text{[III.8]}$$

si introducimos la identidad

$$\frac{d^2\psi}{dx^2} = \frac{1}{2} \frac{d}{dx} \left(\frac{d\psi}{dx} \right)^2 \quad [\text{III.9}]$$

e integramos, desde un punto de la disolución donde $\psi = 0$ y $d\psi/dx = 0$ hasta otra posición x :

$$\left(\frac{d\psi}{dx} \right)^2 = 2 \frac{kT}{\epsilon \epsilon_0} \sum n_{i0} \left(e^{-\frac{z_i e \psi}{kT}} - 1 \right) \quad [\text{III.10}]$$

Utilizando la ley de Gauss:

$$\frac{d\psi}{dx} = \frac{\sigma_d}{\epsilon \epsilon_0} \quad [\text{III.11}]$$

siendo

$$\sigma_d = \int_x^\infty \rho(x) dx \quad [\text{III.12}]$$

la densidad superficial de carga difusa, es decir, la carga total de una columna de líquido de sección unidad, que se extiende desde el plano en cuestión (aquél en el que calculamos $d\psi/dx$) hasta el seno de la disolución, donde $\psi = 0$.

La Ecuación [III.12] es válida, siempre que admitamos que la constante dieléctrica es constante desde $x = \delta$ hasta $x = \infty$.

Combinando [III.11] y [III.12], obtenemos σ_d como función del potencial ψ :

$$\sigma_d = \pm \sqrt{2 \epsilon \epsilon_0 kT \sum_I n_{i0} \left[\exp \left(-\frac{z_i e \psi}{kT} \right) - 1 \right]} \quad [\text{III.13}]$$

El signo que se antepone a la raíz cuadrada indica que σ_d es positiva si ψ es negativa y viceversa. Si sustituimos ψ por ψ_0 , obtendremos la densidad de carga superficial total en toda la d.c. difusa.

Obtengamos ahora la distribución de potencial, $\psi = \psi(x)$: partiendo de la Ecuación [III.8]:

$$\frac{d^2\psi}{dx^2} = -\frac{e}{\epsilon \epsilon_0} \sum_I n_{i0} z_i e^{-\frac{z_i e \psi(x)}{kT}} \quad [\text{III.14}]$$

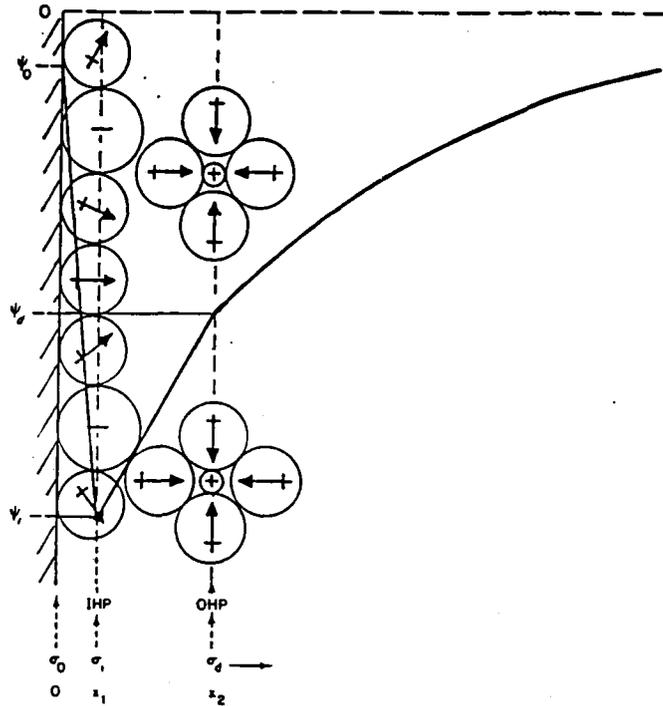


Fig. III.5 Doble capa eléctrica según el modelo de Stern en la que se observa el "plano interior de Helmholtz" (IHP) y "plano exterior de Helmholtz" (OHP).

En la región interna, los iones pueden estar o no hidratados, y pueden interaccionar con la superficie mediante enlaces covalentes o puentes de hidrógeno. El plano de los centros de los iones adsorbidos, tanto por fuerzas covalentes como por las de Van der Waals, recibe el nombre de "plano interior de Helmholtz" (IHP), mientras que el plano de los centros de los iones hidratados o solvatados en contacto con la superficie se denomina "plano exterior de Helmholtz" (OHP) (Figura III.5).

De acuerdo con Verwey y Overbeek (7) la densidad de carga superficial en la capa de Stern se puede deducir de la siguiente forma. Sean, respectivamente:

n_{ia} = nº de iones adsorbidos especie i por cm^2 .

N_1 = nº de lugares de adsorción en la pared por cm^2 .

n_i = nº de iones especie i por cm^3 en el seno de la disolución.

N = nº Avogadro.

M = masa molecular del disolvente.

El número de lugares disponibles en la pared será, $N_1 - n_{ia}$. En disolución, el número de lugares disponibles es una cantidad menos fácil de definir. Stern lo considera igual a N/M (por cm^2). La fracción de lugares ocupados en la pared es $n_{ia}/N_1 - N_{ia}$ y en la disolución $n_i/N/M$.

Cuando no exista adsorción, no habrá diferencia entre el potencial químico del ion en ambos lugares, pero cuando sí exista, tendremos:

$$\Delta\mu_i = kT \ln \left[\frac{\left(\frac{n_{ia}}{N_1 - N_{ia}} \right)}{\left(\frac{n_i}{N/M} \right)} \right] \quad \text{[III.20]}$$

y, para que esté en equilibrio, $\Delta\mu_i$ debe estar equilibrado por una energía w_i (electrostática), así pues:

$$kT \ln \left[\frac{\left(\frac{n_{ia}}{N_1 - N_{ia}} \right)}{\left(\frac{n_i}{N/M} \right)} \right] = -w_i \quad \text{[III.21]}$$

que conduce a:

$$\frac{n_{ia}}{N_1 - n_{ia}} = \frac{n_i}{N/M} e^{-\frac{w_i}{kT}} \quad \text{[III.22]}$$

La densidad superficial en la capa de Stern debida al ion i será:

$$\sigma_{st_i} = n_{ia} z_i e \quad \text{[III.23]}$$

a partir de [III.22] y [III.23], obtenemos:

$$\sigma_{st_i} = \frac{N_1 z_i e}{1 + \frac{N}{M n_i} e^{\frac{w_i}{kT}}} \quad \text{[III.24]}$$

Para todos los iones, tendremos:

$$\sigma_{st} = \sum_i \frac{N_i z_i e}{1 + \frac{N}{Mn_i} e^{\frac{w_i}{kT}}} \quad \text{[III.25]}$$

El trabajo w_i se suele dividir en dos términos: uno de trabajo electrostático, $z_i e \psi(x)$, y otro, químico, $z_i e \phi_i$.

$$w_i = z_i e (\psi - \phi_i) \quad \text{[III.26]}$$

En resumen, el término $z_i e \phi_i$ representa una energía específica de adsorción de la especie i en la capa de Stern, diferente de la energía de tipo electrostático. ϕ_i , a menudo, se utiliza como un parámetro de ajuste, debido a la dificultad en calcularlo, pero su existencia es importante, pues permite, al menos, cuantificar la adsorción de aniones y cationes.

Si consideramos el condensador molecular, de dimensiones atómicas ($\delta \approx \text{Å}$), que se forma entre la superficie cargada y la capa adsorbida,

$$\psi_0 - \psi_\delta = \frac{\sigma}{\epsilon'} \delta \quad \text{[III.27]}$$

siendo σ la densidad superficial de carga total, δ el espesor de la capa de Stern y ϵ' la constante dieléctrica de esta capa.

$$\sigma = \frac{\epsilon'}{\delta} (\psi_0 - \psi_\delta) \quad \text{[III.28]}$$

Se admite que ϵ es la misma que en el seno de la disolución. Si no existe adsorción específica, debería cumplirse:

$$\sigma + \sigma_d = 0 \quad \text{[III.29]}$$

A partir de las Ecuaciones [III.28] y [III.13] podemos calcular σ , σ_d , ψ_0 y ψ_δ si conocemos los datos de actividad de las especies iónicas y asignando un valor a ϵ'/δ .

Cuando exista adsorción específica, la Ecuación [III.29] se convierte en:

$$\sigma + \sigma_d + \sigma_{st} = 0 \quad \text{[III.30]}$$

Como antes, nuestras variables dependientes son σ , σ_{St} , σ_d , ψ_0 , ψ_s , que las podemos calcular a partir de las Ecuaciones [III.13, III.28, III.29], pero suponiendo valores para N_1 , ϵ' y δ .

A partir de esta teoría se puede suponer una nueva distribución iónica y de potenciales alrededor de una partícula cargada que nosotros hemos representado en la Figura III.6.

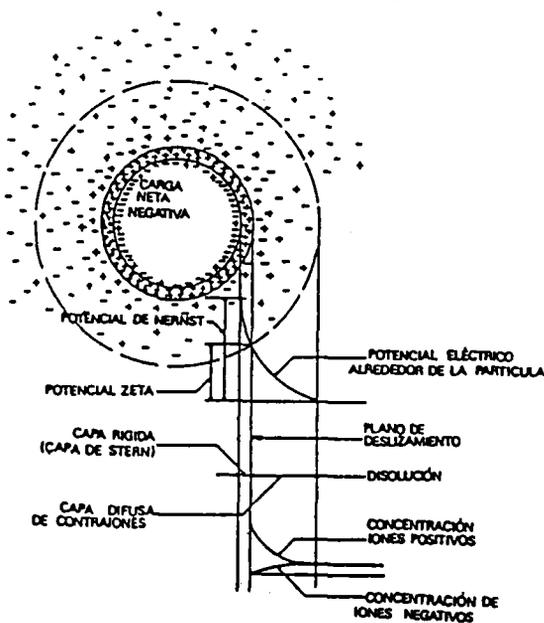


Fig. III.6 *Doble capa eléctrica alrededor de una partícula coloidal*

Aunque los fenómenos electrocinéticos están directamente relacionados con los procesos que tienen lugar en la capa difusa, lo cual parece indicar que sería necesaria únicamente la teoría de Gouy-Chapman; sin embargo, la teoría de Stern proporciona una interpretación muy exacta de la variación experimental del potencial ζ con la composición del medio líquido, dado que precisamente el valor de este potencial está determinado por los cambios en la capa de Stern.

La mayoría de los estudios realizados hasta la mitad de este siglo en relación con el comportamiento electrocinético de un gran número de sistemas se ha realizado haciendo uso de la ecuación más sencilla de Smoluchowski, identificando los potenciales ψ_s y ζ en el modelo de doble capa de Gouy-Stern con el fin de observar el efecto de la composición del líquido. En un intento de clasificación de todos los resultados experimentales conseguidos hasta 1.934, Abramson (8) clasifica a los sistemas en proteínas y superficies inertes. Con el término "proteínas" este autor

quería representar a todos los coloides que, al igual que las verdaderas proteínas, presentan en su superficie grupos ionogénicos, y que dependiendo del grado de ionización de estos grupos tendrán una carga u otra. Por otro lado, a las superficies que carecían de estos grupos ionogénicos Abramson las denominó inertes y, por lo tanto, su carga está determinada por la adsorción específica de iones o moléculas más o menos disociadas.

III.5 TEORIA DE HENRY

Henry (9) demostró que la discrepancia entre las ecuaciones de Smoluchowski y Hückel se debe a la diferente forma de tratar el campo eléctrico en las proximidades de la partícula. Hückel no consideró la deformación del campo externo aplicado por la presencia de la partícula (Figura III.7 a) y Smoluchowski admitió que el campo es uniforme y paralelo a la superficie (Figura III.7 b).

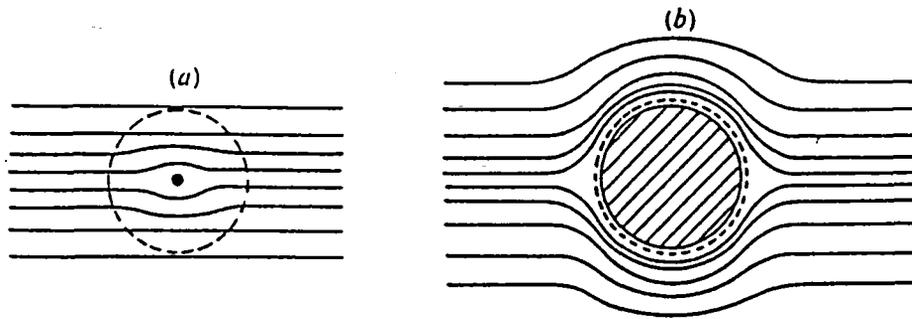


Fig. III.7 Líneas de campo eléctrico que rodean a una partícula coloidal según el tratamiento de Hückel (a) y el de Smoluchowski (b).

A partir de la Figura III.7 a) y b), es claro que $\kappa a \ll 1$ en el caso de Hückel y $\kappa a \gg 1$ en el de Smoluchowski.

Los cálculos de Henry se refieren a partículas esféricas o cilíndricas, con sus ejes paralelos o perpendiculares a la dirección del campo eléctrico. Considera la validez de la ecuación de Navier-Stokes y supone que la viscosidad es constante, el líquido es incompresible y que el plano en el que el potencial vale ζ no se mueve respecto a la partícula. El campo eléctrico resultante sobre la partícula es la suma del campo externo más el debido al de la d.c.e.

Para una partícula aislante esférica de radio a , obtiene:

$$\mu_e = \frac{2}{3} \frac{\epsilon \zeta}{\eta} f_1(\kappa a) \quad \text{[III.31]}$$

para $\kappa a < 1$

$$f_1(\kappa a) = 1 + \frac{(\kappa a)^2}{16} - \frac{5(\kappa a)^3}{48} - \frac{(\kappa a)^4}{96} + \frac{(\kappa a)^5}{96} - \left[\frac{(\kappa a)^4}{8} - \frac{(\kappa a)^6}{96} \right] e^{\kappa a} \int_{\infty}^{\kappa a} \frac{e^{-t}}{t} dt$$

[III.32]

para $\kappa a > 1$

$$f_1(\kappa a) = \frac{3}{2} - \frac{9}{2\kappa a} + \frac{75}{2(\kappa a)^2} - \frac{330}{(\kappa a)^3} \quad \text{[III.33]}$$

En la Tabla III.1, (8), se muestran valores de la función $f_1(\kappa a)$, y en la Figura III.7 se puede ver la forma que adopta esta función representada frente al $\log(\kappa a)$. En esta Figura se observa como en los casos extremos esta función tiende a los valores $3/2$ y 1 .

Tabla III.1

| κa | $f_1(\kappa a)$ | κa | $f_1(\kappa a)$ |
|------------|-----------------|------------|-----------------|
| 0 | 1.0 | 5 | 1.160 |
| 1 | 1.027 | 10 | 1.239 |
| 2 | 1.066 | 25 | 1.370 |
| 3 | 1.101 | 100 | 1.460 |
| 4 | 1.133 | ∞ | 1.5 |

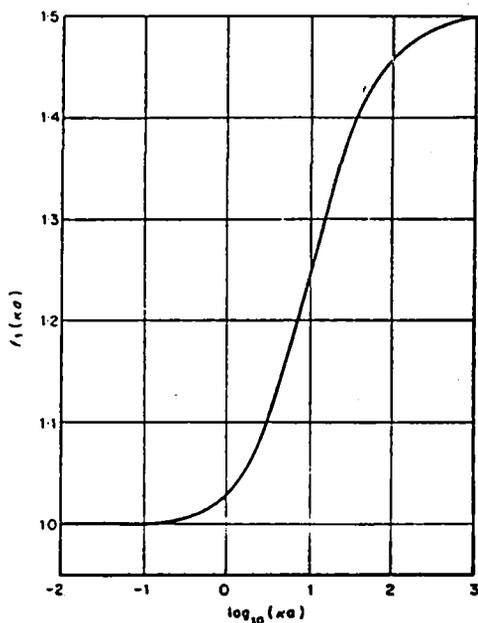


Fig. III.8 Función de Henry [$f_1(\kappa a)$].

En este mismo trabajo, Henry tuvo también en cuenta el efecto de que la partícula fuera o no conductora, obteniendo que:

$$\mu_e = \frac{2}{3} \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} F(\kappa a, \kappa') \quad \text{[III.34]}$$

siendo

$$F(\kappa a, \kappa') = 1 + 2\lambda [f_1(\kappa a) - 1] \quad \text{[III.35]}$$

$$\lambda = \frac{1 - \kappa'}{2 + \kappa'} \quad \kappa' = \frac{\lambda_p}{\lambda_o} \quad \text{[III.36]}$$

con λ_p = conductividad de la partícula ($\Omega^{-1} \text{ m}^{-1}$) y λ_o = conductividad del medio ($\Omega^{-1} \text{ m}^{-1}$). Para esferas no conductoras, $\kappa' = 0$ y $F(\kappa a, \kappa') = f_1(\kappa a)$.

Posteriormente, en 1948, consideró que el efecto de la conductividad superficial λ_s , se podía introducir modificando la conductividad λ , en la forma:

$$\lambda = \frac{1 - \kappa' - 2 \frac{\lambda_s'}{a}}{2 + \kappa' + 2 \frac{\lambda_s'}{a}} \quad \text{donde} \quad \lambda_s' = \frac{\lambda_s}{\lambda_0} \quad [\text{III.37}]$$

Estos cálculos son válidos para bajos potenciales ($\zeta \leq 25$ mV) y no se tienen en cuenta ni el efecto de relajación ni el de retardo electroforético.

III.6 TEORIA DE LA DOBLE CAPA POLARIZADA

La ecuación de Henry se basa en que el campo eléctrico externo se superpone con el campo local de la d.c.e., dado este por la forma linealizada de la ecuación de Poisson-Boltzmann. Por este motivo los resultados son válidos para potenciales pequeños solamente, y tampoco se considera la distorsión del campo inducida por el movimiento de la partícula. Estos fenómenos eléctricos son consecuencia de la atmósfera iónica que rodea la partícula. Como ésta y la parte difusa de la doble capa tienen signo contrario, al aplicar un campo eléctrico externo se van a mover en sentidos opuestos, con lo que la simetría original de la doble capa va a verse distorsionada. En el estado estacionario que alcanza, el centro de la atmósfera iónica difusa queda detrás del de la partícula, originando una fuerza eléctrica sobre ésta que se opone a la producida por el campo externo. A este fenómeno es al que se conoce con el nombre de "efecto de relajación".

Además, el campo externo aplicado actúa sobre los iones de la capa difusa mediante una fuerza que se transfiere a las moléculas de disolvente, provocando un flujo de éste en sentido opuesto al movimiento de las partículas, que quedan así frenadas; este es el llamado "retardo electroforético".

Otro efecto que se produce como consecuencia del movimiento electroforético de partículas es debido a que la conductividad eléctrica de un líquido se modifica al formarse una suspensión coloidal; este fenómeno es provocado tanto por la carga neta de la d.c.e. como por la diferencia en las concentraciones de los iones en la doble capa y en el seno de la disolución. A esa variación de conductividad es a la que se conoce con el nombre de "conductividad superficial".

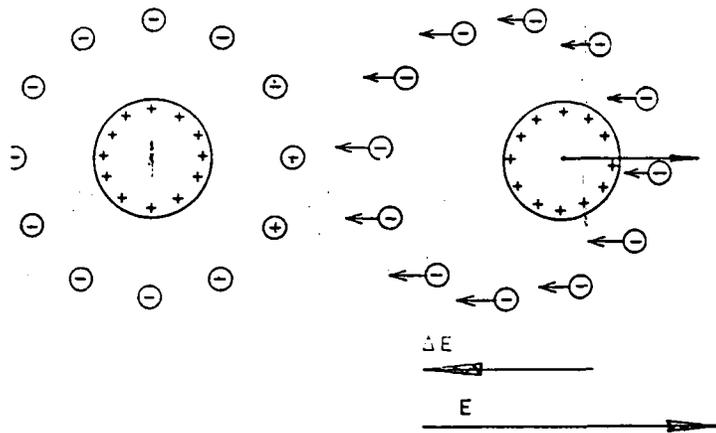


Fig. III.9 Ilustración esquemática del efecto de relajación (ΔE) debido a la aplicación de un campo eléctrico externo (E).

Verwey y Overbeek (7) fueron los primeros en desarrollar una teoría que tuviera en cuenta todos estos fenómenos eléctricos, e introdujeron algunas consideraciones para tener en cuenta estos problemas. Como principio fundamental, partieron de la hipótesis de que la movilidad electroforética debe obtenerse a partir de un balance de fuerzas eléctricas y viscosas. Las demás hipótesis de partida son:

- 1.- La partícula tiene un radio hidrodinámico (a), dentro del cual se comporta como un cuerpo rígido.
- 2.- Lejos de la partícula el electrolito tiene velocidad uniforme $-\mu E$.
- 3.- La distribución de carga superficial tiene simetría radial con densidad σ_0 , sin campo eléctrico aplicado.
- 4.- El potencial electrostático $\psi(r)$ fuera de la partícula cumple la Ecuación de Poisson.

$$\nabla^2 \psi(r) = -\frac{4\pi}{\epsilon} \rho(r) \quad [\text{III.38}]$$

donde

$$\rho(r) = \sum_{i=1}^N z_i e n_i(r) \quad [\text{III.39}]$$

siendo $n_i(r)$ la densidad numérica de iones tipo "i" a una distancia r .

Las condiciones límite de esta Ecuación son que el campo eléctrico no se perturba lejos de la partícula ($\nabla\psi(r)_{r=\infty} = -E$); y la otra condición para ψ ó para su gradiente en la superficie dependerá del modelo de d.c.e. usado.

5.- La fuerza neta sobre el líquido es nula:

$$\eta \nabla^2 u - \nabla p = \rho \nabla \psi \quad \nabla u = 0 \quad \text{[III.40]}$$

La primera es la ecuación de Stokes para un fluido newtoniano incompresible, siendo "p" la presión en el electrolito y "u" la velocidad del fluido.

Las condiciones límite serán:

$$\begin{aligned} u &= 0 & \text{en } r &= a \\ u &= -\mu E & \text{en } r &= \infty \end{aligned}$$

Las fuerzas que actúan sobre una partícula esférica con una determinada densidad de carga superficial, colocada dentro de una disolución y a la que se aplica un campo eléctrico, son:

$$f_1 = q E$$

fuerza eléctrica, siendo "q" la carga total de la esfera,

$$f_2 = -6 \pi \eta a v_e$$

la fuerza viscosa de Stokes.

Hay otras dos fuerzas actuando en el sistema debidas a la existencia de la atmósfera iónica alrededor de la partícula. La fuerza que el campo ejerce sobre los iones se transfiere a las moléculas de disolvente dando lugar a un flujo de líquido que se opone al movimiento, la llamada fuerza de retardo electroforético, f_3 . Una vez alcanzado el estado estacionario en el movimiento de las partículas, tras los efectos transitorios que aparecen después de la aplicación del campo, el centro de la atmósfera iónica se queda detrás del centro de la partícula como se ha comentado antes. Esta asimetría da lugar a la fuerza de retardo conocida como efecto de relajación, f_4 .

En el estado estacionario la partícula se mueve con velocidad uniforme, por lo que sobre ella la fuerza ejercida debe ser nula:

$$v_e = \frac{1}{6 \pi \eta a} (qE + f_3 + f_4) \quad \text{[III.41]}$$

El cálculo de estas fuerzas se hace por integración de las tensiones viscosa y eléctrica en la superficie de la partícula, llegándose a un sistema de ecuaciones diferenciales que no tiene solución analítica general.

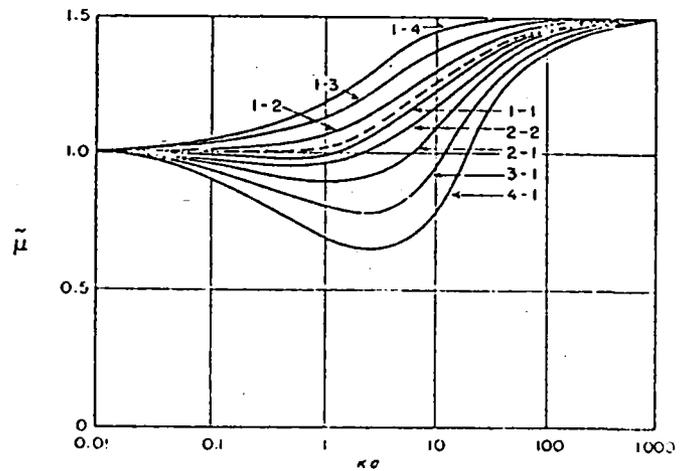
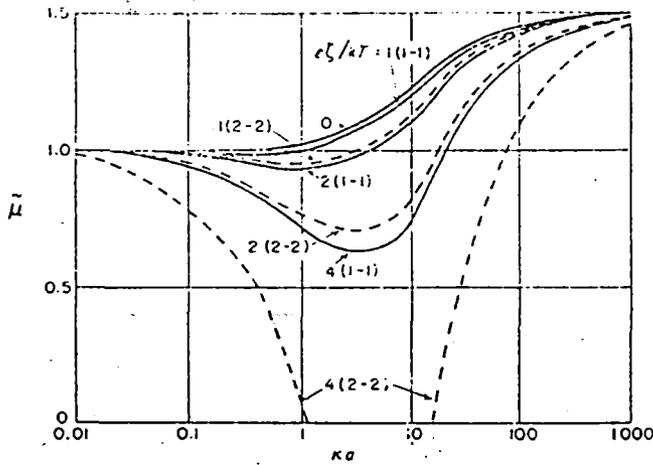


Fig. III.10 *Movilidad electroforética adimensional según la expresión de Overbeek.*
a) Electrolitos simétricos; b) Electrolitos asimétricos.

La primera resolución numérica aceptable de este sistema se debe a Overbeek (10) en 1950, usando para su resolución un método de aproximaciones sucesivas en el que v_e se va expresando en un desarrollo en serie de potencias de ζ . Para potencias superiores a 3 ó 4 la complicación matemática es tal que aconseja no continuar el desarrollo.

Los cálculos realizados ponen de manifiesto la importancia del efecto de relajación en la zona $\kappa a \approx 1$ (Figuras III.10 a) y b) realizadas por Overbeek) sobre todo para electrolitos de valencia superior a la unidad. En estas gráficas y en las siguientes se representan valores de la movilidad electroforética adimensional ($\bar{\mu}$) y el potencial zeta adimensional (ζ), definidos como:

$$\bar{\mu} = \frac{3}{2} \frac{\eta e \mu}{\epsilon k T} \quad \text{[III.42]}$$

$$\zeta = \frac{e \zeta}{k T} \quad \text{[III.43]}$$

Más tarde, Wiersema y col. (11) en 1966 obtuvieron una solución por ordenador para un mayor rango de potenciales ζ . En la Figura III.11 podemos ver comparados los resultados de estos autores.

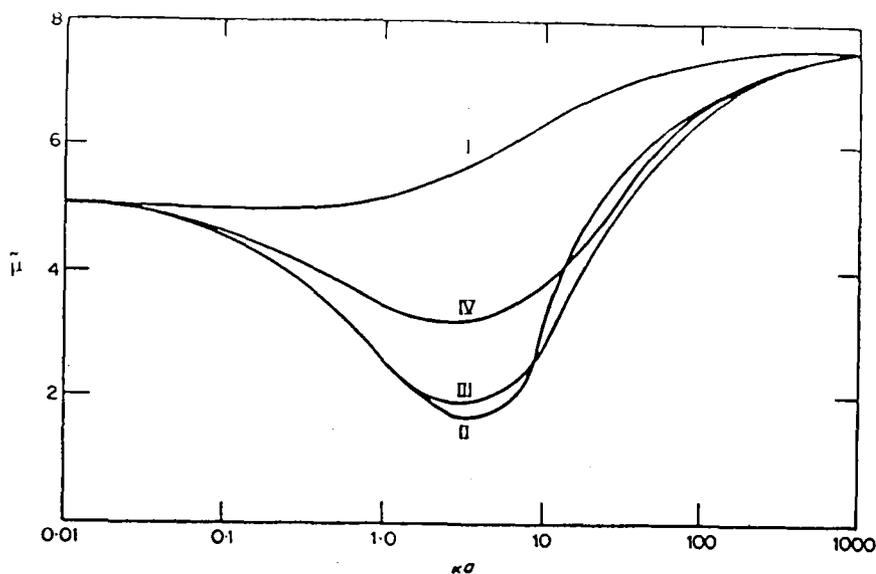


Fig. III.11 *Movilidad electroforética adimensional en función de κa de acuerdo con: I-Henry (1931); II-Overbeek (1943); III-Booth (1950); IV-Wiersema (1966).*

Se puede observar que las soluciones aproximadas son buenas, aunque sobreestiman el efecto de relajación para valores intermedios de κa . La corrección de la ecuación de Henry por relajación disminuye notablemente cuando el valor de $\tilde{\zeta}$ es pequeño (Figura III.12), y esta corrección depende del valor de la movilidad adimensional de los coiones y contraiones:

$$m_{\pm} = \frac{2}{3} \frac{\epsilon R T}{\eta \Lambda_{\pm}^0} z_{\pm}^2 \quad \text{[III.44]}$$

El método de Wiersema no es simple. Se necesitan gráficas de las funciones usadas para interpolar sus valores. Además el valor máximo de $\tilde{\zeta}$ que se puede usar está limitado, especialmente para $z_1 > 1$.

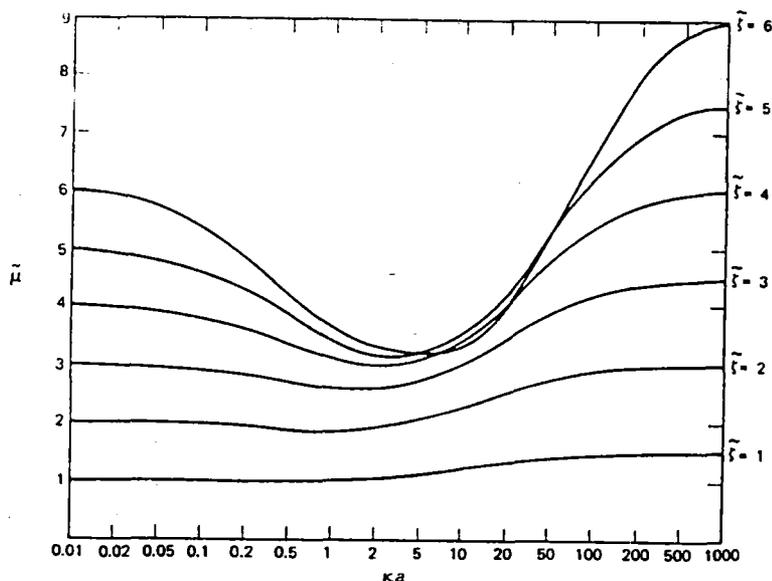


Fig. III.12 *Movilidad electroforética adimensional en función de κa según Wiersema.*

En la Figura III.12 se puede ver el comportamiento de la solución general. Podemos destacar que $\tilde{\mu}$ se aproxima a la ecuación de Hückel para valores pequeños de κa (como obtuvo Henry).

La mejor solución numérica para el problema de la electroforesis de partículas esféricas fue obtenida por O'Brien y White (12) en 1978. A partir de las condiciones y Ecuaciones contenidas en este apartado, su innovación se basa en obtener la solución descomponiendo el problema en dos casos más simples (suponiendo pequeños la velocidad y el campo eléctrico E para mantener la linealidad):

- a) Cálculo de la fuerza F_1 necesaria para mover la partícula a una velocidad v sin la aplicación de un campo eléctrico

$$F_1 = \alpha v$$

- b) Cálculo de la fuerza F_2 que deberíamos aplicar para mantener la partícula en reposo en presencia de un campo eléctrico E .

$$F_2 = \beta E$$

Los parámetros α y β son independientes de v y E . Como en el estado estacionario la fuerza neta ejercida sobre la partícula ha de ser nula, podemos establecer que:

$$\alpha v = -\beta E$$

de donde la movilidad electroforética será:

$$\mu = -\beta/\alpha$$

Para comentar los resultados de estos autores se representa la movilidad electroforética adimensional en función del potencial zeta adimensional para distintos valores de κa . A la vista de estas gráficas se podemos destacar varios aspectos:

- 1.- En la Figura III.13 se observa que la movilidad es función monótonamente creciente de ζ , cuando $\kappa a \leq 2.75$. Los resultados concuerdan con los de Wiersema en la zona en que coinciden ($\zeta \approx 5$).
- 2.- Para valores pequeños de ζ todas las curvas convergen asintóticamente a la forma de Hückel ($\tilde{\mu} = \zeta$).
- 3.- A valores de $\kappa a \approx 2.75$ la $\tilde{\mu}$ presenta una zona plana a un valor de ≈ 3.17 .
- 4.- En la Figura III.14 vemos la presencia de un máximo en la movilidad para todos los valores de $\kappa a > 3$.
- 5.- Este máximo aumenta con κa . Las curvas tienden a la ecuación de Smoluchowski al aumentar κa ($\tilde{\mu} = 3/2\zeta$).

Los autores, O'Brien y White, razonan la presencia de este máximo debido al hecho de que la fuerza de retardo electroforético sería proporcional al potencial ζ al cuadrado, mientras que la fuerza eléctrica sólo es proporcional a ζ . Por tanto, cuando el valor de ζ aumenta el retardo electroforético también lo hace de forma más rápida que la fuerza eléctrica. Cuando κa es pequeño (≤ 2.75) no aparece el máximo pues la distorsión de la doble capa decrece con κa .

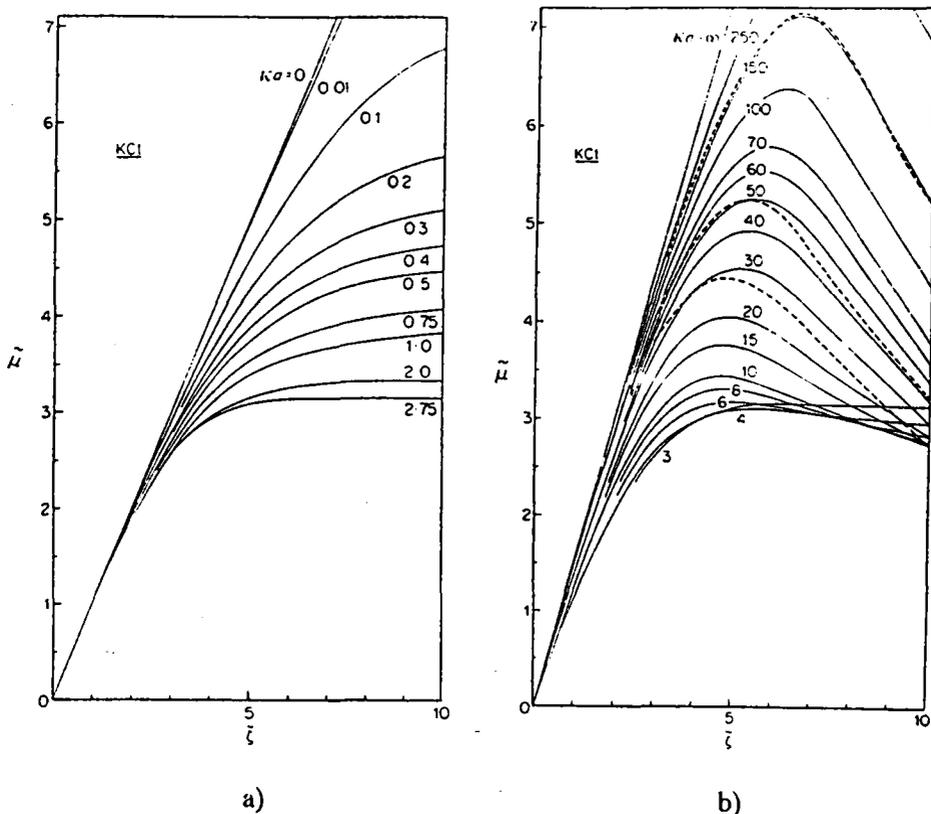


Fig. III.13 *Movilidad electroforética adimensional en función de ζ adimensional para diferentes valores de ka según la teoría de O'Brien and White.*
a) Valores de ka bajos ; b) Valores de ka altos.

Esta solución al problema de la electroforesis de partículas esféricas desarrollada por O'Brien y White, sin embargo, no tenía en cuenta otro de los fenómenos que acompañan al desplazamiento de una partícula cargada en el seno de una disolución: la diferente conductividad eléctrica que se presenta en las proximidades de dicha superficie cargada con respecto al resto de la disolución. Han sido Dukhin y col. (13-16) los que han desarrollado una solución analítica alternativa para resolver el problema creado por la existencia de este otro fenómeno superficial. Para ello han utilizado la afirmación, cuidadosamente justificada por Dukhin y Derjaguin (16), de que para grandes valores de ka , cuando el efecto de relajación aparece, los iones de la doble capa se mantienen en equilibrio local con el fluido adyacente (eléctricamente neutro).

De esta forma obtienen para la movilidad electroforética la siguiente expresión:

$$\bar{\mu}_e = \frac{3}{2} \zeta - \frac{6 \zeta \left(1 + \frac{3m}{z^2}\right) \operatorname{senh}^2\left(\frac{z\zeta}{4}\right) + \left[2z^{-1} \left(1 + \frac{3m}{z^2}\right) \operatorname{senh}\left(\frac{z\zeta}{2}\right) - 3m\zeta\right] \ln\left(\cosh\frac{z\zeta}{4}\right)}{\kappa a + 8 \left(1 + \frac{3m}{z^2}\right) \operatorname{senh}^2\left(\frac{z\zeta}{4}\right) - \left(\frac{24m}{z^2}\right) \ln\left(\cosh\frac{z\zeta}{4}\right)} \quad \text{[III.45]}$$

donde el segundo término representa el efecto causado por la polarización suponiendo que el coeficiente de arrastre viscoso m es igual para contra- y coiones ($m^+ = m^- = m$):

$$m = \frac{2}{3} \frac{\epsilon}{\eta D} \left(\frac{kT}{e}\right)^2 \quad \text{[III.46]}$$

Como consecuencia del movimiento de la partícula la distribución de carga en equilibrio se ve distorsionada, y esto ocasiona un efecto de polarización de la doble capa.

En los casos en los que el plano de cizalladura no coincida con la superficie de la partícula, y la capa estacionaria de la doble capa afecte la transferencia de iones por difusión y electromigración, la Ec. [III.45] se transforma en

$$\bar{\mu}_e = \frac{3}{2} \zeta - \frac{3}{2} \frac{\zeta \left[4(1+3m) \operatorname{senh}^2\left(\frac{\zeta}{4}\right) + 2g_1\right] + \left[2(1+3m) \operatorname{senh}\left(\frac{\zeta}{2}\right) - 3m\zeta + 2g_2\right] 4 \ln\left(\cosh\frac{\zeta}{4}\right)}{\kappa a + 8(1+3m) \operatorname{senh}^2\left(\frac{\zeta}{4}\right) - 24m \ln\left[\cosh\left(\frac{\zeta}{4}\right)\right] + 4g_1} \quad \text{[III.47]}$$

donde

$$g_1 = p \left[\cosh\left(\frac{\Psi_d}{2}\right) - \cosh\left(\frac{\zeta}{2}\right) \right] \quad \text{[III.48]}$$

$$g_2 = p \left[\operatorname{senh}\left(\frac{\Psi_d}{2}\right) - \operatorname{senh}\left(\frac{\zeta}{2}\right) \right] \quad \text{[III.49]}$$

siendo p la razón entre los coeficientes de difusión de los contraiones cerca de la pared y en el seno de la disolución.

En un principio, $\bar{\Psi}_d$, ζ y p se podrían calcular midiendo la μ_e de partículas esféricas de diferentes tamaños, siempre y cuando esos parámetros no dependieran de dicho tamaño.

Por otra parte, los efectos de conductancia superficial ejercen una marcada influencia sobre la electroforesis. A este respecto, podemos distinguir dos mecanismos diferentes de conducción: conductancia superficial debida a la transferencia tangencial de carga a través de la parte móvil de la d.c.e.; y conductancia superficial anómala, que se refiere a la transferencia tangencial de carga entre el plano de cizalladura y la superficie de la partícula. En el caso de la teoría debida a Dukhin y Semnikhin se considera sólo un caso particular de conducción anómala relacionada con la presencia de una capa iónica límite. Para valores elevados de $\tilde{\zeta}$ y $\tilde{\Psi}_o$, entonces

$$\tilde{\mu}_o = \frac{3}{2} \tilde{\zeta} \left(\frac{1 + R_{el}}{1 + 2R_{el}} \right) \quad \text{[III.50]}$$

$$R_{el} = \frac{\lambda_s}{\lambda_a} = \frac{\exp\left(\frac{\tilde{\Psi}_d}{2}\right) + 3m \exp\left(\frac{\tilde{\zeta}}{2}\right)}{\kappa a} \quad \text{[III.51]}$$

siendo R_{el} el término que cuantifica el efecto de la conductividad superficial anómala, y donde el potencial de polarización de corto alcance se supone que es despreciable. Si este se incluyera, entonces la expresión para la movilidad electroforética adimensional sería:

$$\tilde{\mu}_o = \frac{3}{2} \tilde{\zeta} \left[\frac{1 + (2\tilde{\zeta}^{-1} \ln 2) R_{el}}{1 + 2R_{el}} \right] \quad \text{[III.52]}$$

En consecuencia, cuando $R_{el} > 1$, una correcta interpretación de la electroforesis debe tener en cuenta no sólo los efectos debidos a los flujos difusivos, sino que también debe considerar el cambio en el potencial de polarización a través de la capa difusa delgada (17).

III.7 REFERENCIAS

- (1) Th.J.J. Van de Hoven, Tesis Doctoral: *Electrokinetic Properties and Conductance Relaxation of Polystyrene and Silver Iodide Plugs*, Wageningen, Países Bajos (1984).
- (2) H. von Helmholtz, *Ann. Phys. Chem.* 7, 337 (1879).
- (3) M. Smoluchowski, *Bull. Acad. Sci. Cracovie*, 182 (1903).

- (4) G. Gouy, *J. Phys. Radium* 9, 457 (1910).
- (5) D.L. Chapman, *Phylos. Mag.* 25 (6), 475 (1913).
- (6) O. Stern, *Z. Elektrochem.* 30, 508 (1924).
- (7) E.J.W. Verwey y J.Th.G. Overbeek en: *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*, Elsevier Publishing Co., Amsterdam (1948).
- (8) H.A. Abramson, L.S. Moyer y M.H. Gorin en: *Electrophoresis of Proteins*, Reinhold, New York (1942).
- (9) D.C. Henry, *Proc. Royal Soc. Phys. A* 133, 106 (1931).
- (10) J.Th.G. Overbeek, *Adv. Colloid Sci.* III, 97 (1950).
- (11) P.H. Wiersema, A. L. Loeb y J.Th.G. Overbeek, *J. Colloid Interface Sci.* 22, 78 (1966).
- (12) R.W. O'Brien y L.R. White, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* 74, 1607 (1978).
- (13) S.S. Dukhin y V.N. Shilov, *Colloid J.* 31, 564 (1969).
- (14) S.S. Dukhin, *Special Discussions Faraday Soc.* 1, 158 (1970).
- (15) S.S. Dukhin en: *Research in Surface Forces Vol. 3*, Consultants Bureau, New York (1971).
- (16) S.S. Dukhin y B.V. Derjaguin en: *Surface and Colloid Science Vol. 7*, John Wiley and Sons, New York (1974).
- (17) Hidalgo Alvarez, R., *Adv. Colloid Interface Sci.* 34, 217 (1991).



APENDICE IV

DISPERSION CUASIELASTICA DE LUZ LASER

- IV.1 INTRODUCCION**
- IV.2 FUNCION DE CORRELACION**
- IV.3 LUZ DISPERSADA POR UNA SOLUCION DE MACROMOLECULAS**
- IV.4 LUZ DISPERSADA BAJO LA INFLUENCIA DE UN CAMPO ELECTRICO**
- IV.5 REFERENCIAS**

APENDICE IV

DISPERSION CUASIELASTICA DE LUZ LASER

IV.1 INTRODUCCION

La dispersión cuasielástica de la luz emitida por un láser es una técnica muy utilizada para estudiar las propiedades hidrodinámicas de los coloides en suspensión y ha encontrado un amplio campo de aplicación en el desarrollo de dispositivos para la determinación de la movilidad electroforética de partículas coloidales. Básicamente, consiste en detectar y analizar el desplazamiento de frecuencia (efecto Doppler) de una luz láser dispersada por partículas en el seno de un campo eléctrico.

Para un tipo determinado de partículas, el desplazamiento de la frecuencia Doppler es proporcional a la velocidad del movimiento electroforético, mientras que la anchura de la banda de frecuencias desplazadas es una medida del efecto difusivo.

El método fue sugerido por Flygare, la teoría y algunos resultados experimentales por Ware y Flygare (1), los cuales, a continuación (2), presentaron medidas con BSA, en las que distinguían movilidades de tres componentes (BSA, dímeros de BSA y fibrinógeno).

A partir de esa fecha, se han desarrollado y comercializado algunos dispositivos experimentales para la medida tanto del tamaño como de la movilidad electroforética de macromoléculas. Uno de ellos es el Zeta-Sizer IIc, utilizado en esta investigación.

Haremos una somera descripción de los fundamentos teóricos de la dispersión cuasielástica de la luz, comenzando con el concepto de función de autocorrelación, para después obtener la correspondiente a la luz dispersada por un conjunto de macromoléculas en suspensión.

IV.2 FUNCION DE CORRELACION

Llamemos $E(t)$ a la intensidad de campo eléctrico existente en un determinado detector procedente de un punto cualquiera B en el instante t . En el transcurso de un intervalo de tiempo τ , la intensidad del campo será $E(t+\tau)$, y, puesto que lo que mide es la densidad de flujo óptico $S(\tau)$, la cual es proporcional a la media temporal del cuadrado de la intensidad total, la magnitud que estamos interesados en calcular es

$$\langle [E(t) + E(t+\tau)]^2 \rangle \quad \text{[IV.1]}$$

es decir, la media temporal de la magnitud

$$[E(t) + E(t+\tau)]^2$$

Tendremos, pues, que:

$$S(\tau) \propto \langle [E(t) + E(t+\tau)]^2 \rangle \quad \text{[IV.2]}$$

$$S(\tau) = \langle [E(t)]^2 \rangle + \langle [E(t+\tau)]^2 \rangle + 2 \langle E(t) E(t+\tau) \rangle \quad \text{[IV.3]}$$

La media temporal se define como:

$$\langle [E(t)]^2 \rangle = \frac{1}{T} \int_{t_0-T/2}^{t_0+T/2} [E(t)]^2 dt \quad \text{[IV.4]}$$

$$\langle E(t) E(t+\tau) \rangle = \frac{1}{T} \int_{t_0-T/2}^{t_0+T/2} E(t) E(t+\tau) dt \quad \text{[IV.5]}$$

donde se supone que T es suficientemente grande como para que las integrales sean independientes del tiempo t_0 , elegido para el cálculo.

Los términos $\langle [E(t)]^2 \rangle$ y $\langle [E(t+\tau)]^2 \rangle$ podemos igualarlos a $I_0/2$, siendo I_0 la densidad total de flujo detectada sin que haya interferencia.

El término $2 \langle E(t) E(t+\tau) \rangle$ contiene los efectos debidos a la interferencia. Se puede normalizar dividiendo por $\langle [E(t)]^2 \rangle$, con lo que:

$$\gamma(\tau) = \frac{\langle E(t) E(t+\tau) \rangle}{\langle [E(t)]^2 \rangle} \quad \text{[IV.6]}$$

y

$$S(\tau) = S_0 (1 + \gamma(\tau)) \quad \text{[IV.7]}$$

A $\gamma(\tau)$ se le denomina función de autocorrelación normalizada del campo $E(t)$. Representa la correlación media del campo \bar{E} consigo mismo y en un tiempo posterior.

Cuando, como es lo más común, el campo $E(t)$ venga expresado como la parte real de una señal compleja

$$E(t) = \text{Re} \{E_c(t)\}$$

tendremos entonces:

$$\gamma_c(\tau) = \frac{\langle E_c^*(t) E_c(t+\tau) \rangle}{\langle [E_c(t)]^2 \rangle} \quad \text{[IV.8]}$$

IV.3 LUZ DISPERSADA POR UNA SOLUCION DE MACROMOLECULAS

La función de autocorrelación puede interpretarse como una medida de la dependencia temporal de las fluctuaciones en la concentración de una solución de macromoléculas (3). Pretendemos evaluar la magnitud $C(\tau)$, definida como

$$C(\tau) = \langle E_d^*(t) E_d(t+\tau) \rangle \quad \text{[IV.9]}$$

El espectro de frecuencias de la luz dispersada, $I(\omega)$, se puede calcular a partir de la función de autocorrelación, $C(\tau)$, mediante la transformación de Fourier:

$$I(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} C(\tau) e^{i\omega\tau} d\tau \quad \text{[IV.10]}$$

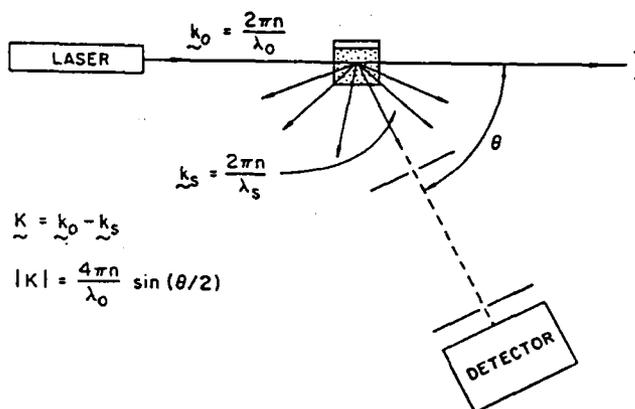


Fig. IV.1 Experimento de dispersión de luz láser en una solución de macromoléculas.

La luz incidente se caracteriza por un vector de onda \vec{k}_0 que tiene una magnitud $2\pi n/\lambda_0$, siendo n el índice de refracción de la solución y λ_0 la longitud de onda de la radiación incidente. Análogamente, la luz dispersada según un ángulo θ se caracteriza por un vector de onda \vec{k}_d , con una magnitud $2\pi n/\lambda_d$.

El campo incidente es una onda plana que se propaga en el medio con una magnitud del campo E_0 , una frecuencia w_0 y un vector de onda \vec{k}_0 :

$$E(x, t) = E_0 e^{i(\vec{k}_0 \cdot \vec{r} - w_0 t)} \quad [\text{IV.11}]$$

donde \vec{r} es el vector de posición respecto de algún origen fijo, pero arbitrario, en el que la fase $\phi = \vec{k}_0 \cdot \vec{r}$ es cero.

La magnitud del campo observado por el detector procedente del centro j de dispersión está dada por:

$$E_j = A_j e^{i(\phi_j - w_0 t)} \quad [\text{IV.12}]$$

donde la amplitud A_j puede depender de la orientación y movimiento interno del centro dispersor.

La fase ϕ_j que aparece en la expresión anterior es:

$$\phi_j = \vec{k}_0 \cdot \vec{r}_j - \vec{k}_d \cdot \vec{r}_j = (\vec{k}_0 - \vec{k}_d) \cdot \vec{r}_j = \vec{K} \cdot \vec{r}_j \quad [\text{IV.13}]$$

siendo \vec{K} el vector de dispersión. Como $|\vec{k}_0| = |\vec{k}_d|$, la magnitud de \vec{K} será:

$$K = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \text{sen} \left(\frac{\theta}{2} \right) \quad [\text{IV.14}]$$

luego:

$$E_j = A_j e^{i(\vec{K} \cdot \vec{r}_j - w_0 t)} \quad [\text{IV.15}]$$

El campo procedente de N centros de dispersión será:

$$E_d = \sum_{j=1}^N E_j = \sum_{j=1}^N A_j(t) e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r}_j - \omega_0 t)} \quad \text{[IV.16]}$$

y la función de autocorrelación:

$$C(\tau) = \left\langle \sum_{j=1}^N A_j^*(t) e^{-i(\vec{k} \cdot \vec{r}_j(t) - \omega_0 t)} \cdot \sum_{m=1}^N A_m(t+\tau) e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r}_m(t+\tau) - \omega_0(t+\tau))} \right\rangle \quad \text{[IV.17]}$$

Si suponemos que los centros de dispersión son estadísticamente independientes, todos los términos de cruce son cero ($j \neq m$). Si la orientación es independiente de la posición, las amplitudes podemos obtenerlas de la expresión que contiene las fases, y si, finalmente, los N centros de dispersión son idénticos y deben poseer idénticas funciones de autocorrelación, obtendremos que la función de autocorrelación será la suma de N veces una función simple de correlación. Es decir,

$$C(\tau) = N e^{-i\omega_0 \tau} \langle A^*(t) A(t+\tau) \rangle \left\langle e^{-i\vec{k} \cdot \vec{r}(t)} e^{i\vec{k} \cdot \vec{r}(t+\tau)} \right\rangle \quad \text{[IV.18]}$$

Como se pretenden considerar solamente los efectos de traslación sobre el espectro de la luz, podemos suponer que todos los centros dispersores son esféricos, por lo que

$$A(t) = A(t+\tau)$$

y

$$A^*(t) A(t+\tau) = A^2 \quad \text{[IV.19]}$$

con lo que:

$$C(\tau) = NA^2 e^{-i\omega_0 \tau} \left\langle e^{-i\vec{k} \cdot \vec{r}(t)} \cdot e^{i\vec{k} \cdot \vec{r}(t+\tau)} \right\rangle \quad \text{[IV.20]}$$

Más que intentar realizar la media temporal indicada en los paréntesis, elegimos hacer uso de la hipótesis que establece que la media temporal puede ser reemplazada por una media de posiciones.

La función de autocorrelación tendrá entonces la forma:

$$C(\tau) = NA^2 e^{-i\omega_0\tau} \left\langle \int W^c(r_0, t / r_0 + R, t + \tau) e^{-i\vec{k} \cdot \vec{r}_0} e^{-i\vec{k} \cdot (\vec{r}_0 + \vec{R})} d^3R \right\rangle \quad [\text{IV.21}]$$

donde $W^c(r_0, t / (r_0 + R), t + \tau)$ es la probabilidad condicional de que una partícula localizada en la posición \vec{r}_0 en el tiempo t , esté en un volumen unitario en posición $\vec{r}_0 + \vec{R}$ en el tiempo $t + \tau$.

Si el sistema es homogéneo, isotrópico y estacionario, W^c es independiente de \vec{r}_0 y t , dando:

$$C(\tau) = NA^2 e^{-i\omega_0\tau} \int G_s(R, \tau) e^{i\vec{k} \cdot \vec{R}} d^3R \quad [\text{IV.22}]$$

siendo $G_s(R, \tau)$ la probabilidad de que una partícula que se encontraba en el origen $t = 0$, esté en un volumen unidad en la posición \vec{R} , en el tiempo $t = \tau$.

Si admitimos que las fluctuaciones en la concentración de una suspensión de macromoléculas se comportan según la ecuación de difusión macroscópica, la evolución temporal de $G_s(R, \tau)$ vendrá dada por:

$$\frac{\partial G_s(R, \tau)}{\partial \tau} = D \nabla^2 G_s(R, \tau) \quad [\text{IV.23}]$$

que es la llamada ecuación de difusión o 2ª ley de Fick. D es el coeficiente de difusión traslacional.

La resolución de [IV.23] conduce a una función de distribución gaussiana, característica de los procesos de movimiento aleatorio

$$G_s(R, \tau) = \left(\frac{1}{4\pi} D\tau \right)^{3/2} e^{-R^2/D\tau} \quad [\text{IV.24}]$$

siendo $R^2 = x^2 + y^2 + z^2$.

Sustituyendo [IV.24] en [IV.22] y resolviendo, obtenemos la función de autocorrelación:

$$C(K, \tau) = NA^2 e^{-i\omega_0\tau} e^{-DK^2\tau} \quad [\text{IV.25}]$$

Vemos cómo la amplitud, $\exp(-DK^2\tau)$, actúa como un factor de modulación de las oscilaciones representadas por $\exp(-i\omega_0\tau)$, que son mucho más rápidas. En la figura IV.2.a vemos la forma de $C(K, \tau)$.

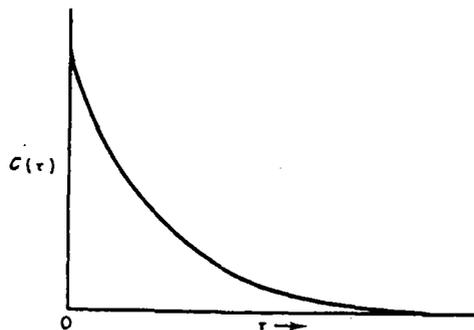


Fig. IV.2.a *Función de autocorrelación de la luz dispersada por una solución de macromoléculas.*

El espectro de la luz dispersada, ecuación [IV.26], lo obtenemos mediante la transformada de Fourier de la función de autocorrelación, y resulta:

$$I(\omega) = \frac{DK^2/\pi}{(\omega - \omega_0)^2 + (DK^2)^2} \quad \text{[IV.26]}$$

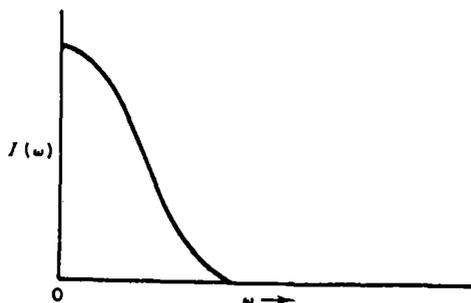


Fig. IV.2.b *Intensidad de luz dispersada por una solución de macromoléculas.*

Vemos cómo $I(\omega)$ presenta una distribución de frecuencias lorentziana, centrada en $\omega = \omega_0$, la frecuencia de la luz incidente, y con una semianchura de pico $DW_{1/2} = DK^2$.

Los valores típicos del desplazamiento en frecuencia son del orden de 10^9 Hz, mientras que la frecuencia incidente es del orden de 10^{14} Hz. El experimento requiere una técnica especial de detección de señales, conocida con el nombre de análisis de pulsos ópticos.

Esta técnica fue sugerida por Forrester y col. (4) y por Glauber (5). La aplicación a la dispersión cuasielástica de la luz ha sido discutida con detalle por varios autores (6,7). El principio básico es que, cuando dos frecuencias se mezclan en un elemento no lineal, se produce una señal que posee una frecuencia igual a la diferencia entre las dos anteriores. Esta diferencia de frecuencia se denomina un pulso. Esta idea se puede aplicar a la dispersión de luz, porque un fotomultiplicador responde al cuadrado del campo eléctrico.

Por tanto, si la luz dispersada por las partículas es mezclada con una luz monocromática en el fotocátodo, la fotocorriente producida tendrá un espectro idéntico al de la luz dispersada, excepto que su centro se habrá desplazado una frecuencia igual a la diferencia entre el centro original (ω_0) y la frecuencia de la luz monocromática de referencia. Normalmente, el rayo de referencia es el láser incidente ω_0 , por lo que la salida del fototubo tiene una distribución lorentziana centrada en la frecuencia 0, con una semianchura $DW_{1/2} = DK^2$. En este caso, se habla de detección heterodina.

También es posible observar la luz dispersada sin utilizar el rayo de referencia, sino mezclándola consigo misma: se habla entonces de detección homodina.

IV.4 LUZ DISPERSADA BAJO LA INFLUENCIA DE UN CAMPO ELECTRICO

Cuando un observador detecta luz dispersada procedente de estas partículas, se podría esperar que la frecuencia de la luz dispersada sufriera un desplazamiento Doppler en una cantidad proporcional al cambio de velocidad.

Una medida del desplazamiento Doppler sería suficiente para determinar la velocidad de las partículas, que, mediante la ecuación $v = \mu E$, nos permitiría calcular su movilidad microelectroforética.

Como antes, la función de autocorrelación será, según la ecuación [IV.22]:

$$C(\tau) = NA^2 e^{-i\omega_0\tau} \int G_s(R, \tau) e^{i\vec{k} \cdot \vec{R}} d^3R \quad [IV.27]$$

La evolución temporal de $G_s(R, \tau)$ de las macromoléculas que se mueven con una velocidad constante según el eje x , es:

$$\frac{\partial G_s(R, \tau)}{\partial t} = v_d \frac{\partial G_s(R, \tau)}{\partial x} \quad [\text{IV.28}]$$

y como también se debe considerar el término de difusión, resultará:

$$\frac{\partial G_s(R, \tau)}{\partial t} = D \nabla^2 G_s(R, \tau) \pm v_d \frac{\partial G_s(R, \tau)}{\partial x} \quad [\text{IV.29}]$$

donde el signo \pm depende del sentido de movimiento de las partículas.

Si se admite que el fenómeno de la difusión no se ve afectado por el campo eléctrico (lo cual es criticable), la solución de [IV.29] es:

$$G_s(R, \tau) = \left(\frac{1}{4\pi D\tau} \right)^{3/2} e^{-[(x \pm v_d \tau)^2 + y^2 + z^2] / 4D\tau} \quad [\text{IV.30}]$$

que nos permite obtener la función de autocorrelación de la luz dispersada procedente de una solución de partículas cargadas en el seno de un campo eléctrico (figura IV.3.a):

$$C(K, \tau) = NA^2 e^{-i\omega_0 \tau} e^{-i\vec{k} \cdot \vec{v}_d \tau} e^{-K^2 D \tau} \quad [\text{IV.31}]$$

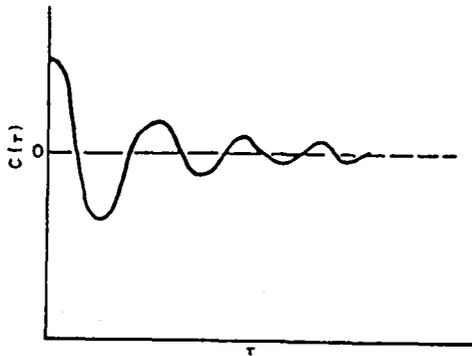


Fig. IV.3.a Función de autocorrelación de la luz dispersada por una solución de macromoléculas en el seno de un campo eléctrico.

El término adicional en la ecuación [IV.31], $e^{-i\vec{k}\cdot\vec{v}_d t}$, corresponde a una oscilación a baja frecuencia, cuya frecuencia es una medida de la velocidad, y por tanto, de la movilidad electroforética de las partículas.

El espectro de la luz es ahora:

$$I(\omega) = NA^2 \frac{DK^2/\pi}{\left(\omega - \omega_0 \pm \vec{K} \cdot \vec{v}_d\right)^2 + (DK^2)^2} \quad [\text{IV.32}]$$

Este espectro, figura IV.3.b, es similar a una distribución lorentziana con una semianchura de DK^2 , pero cuya frecuencia central se ha desplazado una cantidad $\vec{K} \cdot \vec{v}_d$. Claramente, la medida de este desplazamiento suministra un valor de v_d y, por tanto, de la movilidad electroforética μ_e .

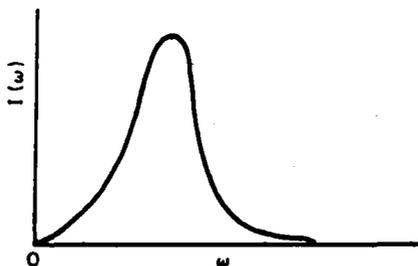


Fig. IV.3.b *Intensidad de luz dispersada por una solución de macromoléculas en el seno de un campo eléctrico.*

Se suele definir la resolución del aparato como el cociente entre el desplazamiento Doppler $\vec{K} \cdot \vec{v}_d$ y la semianchura del espectro DK^2 ,

$$R = \frac{\vec{K} \cdot \vec{v}_d}{DK^2} = \frac{Kv_d \cos \theta/2}{DK^2} = \frac{\mu E \cos \theta/2}{DK} \quad [\text{IV.33}]$$

R es mayor cuando \vec{K} es paralelo a \vec{v}_d y los ángulos de dispersión son bajos.

IV.5 REFERENCIAS

- (1) Ware, B.R. y Flygare, W.H., *Chem. Phys. Lett.* **12**, 81 (1971).
- (2) Ware, B.R. y Flygare, W.H., *J. Colloid Interface Sci.* **39** (2), 670 (1972).
- (3) Ware, B.R., *Adv. Colloid Interface Sci.* **4**, 1 (1974).
- (4) Forrester, A.T., Gudmundsen, R.A. y Johnson, P.O., *Phys. Rev.* **99**, 1691 (1963).
- (5) Glauber, R.J., *Phys. Rev.* **130**, 2569 (1963).
- (6) Chau, B., *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2**, 145 (1970).
- (7) Cummins, H.I. y Swinneg, H.L., *Prog. Opt.* **8**, 133 (1969).