



UNIVERSIDAD DE GRANADA

COMISION DE DOCTORADO

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
SECRETARIA GENERAL  
18 MAYO 1995  
SALIDA N.º 7009

Fecha: quince de Mayo de 1995  
Su Refª.  
Nuestra Refª.  
Fecha de Salida:  
Unidad de Origen: COMISIÓN DE DOCTORADO

Destinatario:

Ilmo. Sr. Decano  
FACULTAD DE CIENCIAS  
GRANADA

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha ... 22.05.95 ...  
ENTRADA NUM. ... 1044 ...

En cumplimiento del artículo 32 de las Normas Regulatoras de los estudios de Tercer Ciclo de esta Universidad, adjunto se remite un ejemplar de la Tesis Doctoral presentada por el Doctorando D.JUAN L. ORTEGA VINUESA titulada ESTABILIDAD COLOIDAL DE INTERFASES ESTRUCTURADAS: APLICACION A INMUNOSENSORES y dirigida por el Profeso/es Dr/es MARIA J. GALVEZ RUIZ Y ROQUE HIDALGO ALVAREZ con objeto de mantenerla depositada desde el día doce de Mayo de 1995 hasta el día diecisiete de Junio de 1995 para que pueda ser examinada por cualquier Doctor que así lo desee.

Granada a quince de Mayo de 1995.

EL PRESIDENTE DE LA COMISION  
DE DOCTORADO,



JUAN CAMPOS FERNANDEZ  
Vicerrector de Enseñanzas Propias  
y Postgrado

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Física Aplicada

T  
13  
105

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha <u>22-05-95</u>
ENTRADA NUM. <u>1144</u>

ESTABILIDAD COLOIDAL DE  
INTERFASES ESTRUCTURADAS:  
APLICACIÓN A INMUNOSENSORES

Juan Luis Ortega Vinuesa

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA
12 MAYO 1995
COMISION DE DOCTORADO

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento <u>619655058</u>
Nº Copia <u>121201080</u>



ESTABILIDAD COLOIDAL DE INTERFASES ESTRUCTURADAS:

APLICACIÓN A INMUNOSENSORES.

JUAN LUIS ORTEGA VINUESA

Directores de la Tesis

Dr. Roque Hidalgo Álvarez

Catedrático Dpto. Física Aplicada



Dra. María José Gálvez Ruiz

Prof. Titular Dpto Física Aplicada



Trabajo presentado para aspirar al

GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS FÍSICAS



Juan Luis Ortega Vinuesa

Granada, Mayo de 1995

*A Victoria y a mis padres,  
por todo lo que me han dado.*

*Sería injusto no detenerse un momento en agradecer abiertamente todo el apoyo que he recibido durante estos cuatro años de formación de postgrado. Especialmente a aquellas personas que, dejando a un lado el terreno profesional, han sabido enseñarme cosas más valiosas que la propia Ciencia.*

*Por ello, deseo darle las gracias sinceramente a mis directores de Tesis, Roque Hidalgo y María José Gálvez, por toda la ayuda y por los consejos que tan sabiamente siempre me han dado.*

*A quien más le debo es a Delfi Bastos, pero por desgracia no hay calificativos que reflejen mi agradecimiento sin caer en la cursilería; creo que ya nos conocemos como para que me perdones el que te dedique tan pocas palabras (que no tiempo).*

*A José Manuel Peula, con el que he pasado muy buenos momentos en los últimos nueve años; que sean muchos más.*

*A Antonio Martín, de quien he aprendido multitud de cosas tanto en el Laboratorio como fuera de él; eres un ejemplo a seguir (pero no hasta Utah).*

*A Kurro Galisteo, porque ha demostrado que hay gente que nace con estrella y gente que nace "estrellá".*

*A Miguel Cabrerizo, no sólo por su ayuda desinteresada en las tareas de investigación, sino por su lado humano que tantas veces nos ha hecho reír.*

*A Pepe Sánchez y a Paco Martínez por dedicar tanto tiempo a volvernos locos con los ordenadores, aunque al final todos hemos salido ganando.*

*A José Alberto Moleón, por permitirme hacer uso de ciertos programas de cálculo y por introducirme en los deportes alternativos.*

*A Pepe Callejas, por haberse dedicado a resolver los problemas técnicos de equipos de medida siempre que hiciera falta.*

*A Paqui, Omar, Pepetonio, Manolo y a todos los demás becarios que compartimos el barracón 13; ya nos llegarán tiempos mejores, pero seguro que menos divertidos.*

*A Ángel Delgado y toda la gente de su grupo, por las largas horas de laboratorio que hemos compartido.*

*A los no nombrados tampoco los olvido; y qué bien quedo.*

*Asímismo, quiero dar las gracias a la empresa Biokit S.A. por la obtención y purificación de las proteínas empleadas en este trabajo; y muy especialmente a Josep Puig, que siempre ha abierto nuevas e interesantes perspectivas de investigación.*

*Por último, también quiero hacer extensivo mi agradecimiento al resto de los miembros del Departamento de Física Aplicada, por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este trabajo de investigación.*

*Sin todos ellos hubiera sido imposible la realización de esta Tesis. Muchísimas gracias.*

## I. INTRODUCCIÓN.

- I.1. Introducción.
- I.2. Bibliografía.

## II. CARACTERIZACIÓN Y ESTABILIDAD COLOIDAL DE SISTEMAS POLIMÉRICOS MODELO.

- II.1. Introducción.
- II.2. Tamaño y polidispersidad.
- II.3. Análisis elemental y espectroscópico.
- II.4. Densidad superficial de carga.
- II.5. Carácter hidrófobo de los látex.
- II.6. Caracterización electrocinética.
- II.7. Estabilidad coloidal.
- II.8. Bibliografía.

## III. ADSORCIÓN DE LA INMUNOPROTEÍNA F(ab')<sub>2</sub> SOBRE LOS LÁTEX.

- III.1. Introducción.
- III.2. Termodinámica de los procesos de adsorción de macromoléculas sobre interfaces.
- III.3. Adsorción y desorción de F(ab')<sub>2</sub>. Covalencia.
- III.4. Caracterización electrocinética de los complejos.
- III.5. Estabilidad de los complejos.
- III.6. Bibliografía.

## IV. ESTRATEGIAS PARA AUMENTAR LA ESTABILIDAD DEL COMPLEJO LÁTEX-F(ab')<sub>2</sub>.

- IV.1. Introducción.
- IV.2. Coadsorción secuencial de F(ab')<sub>2</sub> y BSA.
- IV.3. Adsorción del lípido DSDMA.
- IV.4. Bibliografía.

## V. ANÁLISIS DE LA LUZ DISPERSADA POR SISTEMAS COLOIDALES.

- V.1. Introducción.
- V.2. Fundamentos teóricos de la dispersión de luz.
- V.3. Aplicaciones a fluidos coloidales.
- V.4. Alternativas para el seguimiento óptico de la aglutinación.
- V.5. Bibliografía.

## VI. SEGUIMIENTO ÓPTICO DE LA AGLUTINACIÓN DE SISTEMAS LÁTEX-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR.

- VI.1. Introducción.
- VI.2. Cinética de reacción. Métodos de cuantificación.
- VI.3. Estudio de las variables fisicoquímicas que afectan a la inmunoreacción.
- VI.4. Bibliografía.

## VII. CONCLUSIONES.

### APÉNDICE I. SÍNTESIS DE COLOIDES POLIMÉRICOS.

- A.I.1. Introducción.
- A.I.2. Reacciones implicadas en la polimerización en emulsión.
- A.I.3. Mecanismos de polimerización.
- A.I.4. Condiciones de síntesis.
- A.I.5. Limpieza de los látex.
- A.I.6. Bibliografía.

### APÉNDICE II. ESPECTROSCOPÍA DE FOTOCORRELACIÓN.

- A.II.1. Dispositivo experimental.
- A.II.2. Teoría de la dispersión dinámica de luz.
- A.II.3. El correlador.
- A.II.4. Bibliografía.

### APÉNDICE III. MODELOS DE DOBLE CAPA ELÉCTRICA.

- A.III.1. Introducción.
- A.III.2. Doble capa eléctrica alrededor de una partícula coloidal.
- A.III.3. Relación entre movilidad electroforética y potencial  $\zeta$ .
- A.III.4. Bibliografía.

## I. INTRODUCCIÓN

## I.1. INTRODUCCIÓN.

Sería difícil encuadrar el trabajo de investigación que se presenta en esta Tesis Doctoral dentro una única rama de la Ciencia. Quizás, de forma genérica, estaría incluido dentro de la Física de Fluidos Coloidales, pero queremos hacer hincapié en que para desarrollar este trabajo ha hecho falta recurrir a conocimientos de líneas científicas tan variadas como pueden ser la dispersión de luz, la química de la polimerización, la inmunología o a ciertas nociones de quimica física biológica. Por tanto, para poder estudiar nuestros resultados experimentales ha sido necesario adoptar una mentalidad interdisciplinaria, y de esta forma se ha conseguido obtener una formación investigadora suficientemente amplia y completa. Esta idea no entra en contradicción con el objetivo de profundizar al máximo en el análisis de cada uno de los resultados que se presentan en cada capítulo.

Los sistemas objeto de nuestro estudio son dispersiones de partículas que presentan un tamaño mesoscópico comprendido entre unos pocos nanómetros hasta escasa micras. Estos sistemas dispersos se conocen como coloides, y su principal característica es que las partículas son lo suficientemente pequeñas como para que sedimenten bajo la acción del campo gravitatorio terrestre. Dentro de la multitud de sistemas coloidales que existen, nuestro trabajo se ha centrado en dispersiones líquidas en donde las partículas utilizadas son de matriz polimérica (llamadas comúnmente látex) y como disolvente se ha empleado el agua. Las disoluciones de látex tienen extensas aplicaciones tecnológicas, pues en función de la naturaleza de los monómeros que lo componen se pueden constituir diferentes tipos de polímeros útiles para la fabricación de: pinturas plásticas, elásticos o gomas sintéticas, adhesivos, materiales resistentes al impacto, materiales para construcción, lubricantes, etc [1]. No obstante, uno de los campos con mayor aplicación de estas partículas poliméricas es la Biomedicina, especialmente la dirigida hacia la creación de tests de diagnóstico, inmunoensayos, marcaje de células biológicas, separación e identificación de proteínas, como sistemas portadores de drogas o fármacos, o en el desarrollo de nuevos materiales empleados en implantes quirúrgicos [2].

La principal característica que presentan las disoluciones de látex es la elevada proporción área/volumen que existe en ellas. Por lo tanto, son sistemas ideales para desarrollar estudios de superficie y caracterizaciones interfaciales. El presente trabajo se ha centrado en el análisis de las adsorciones de ciertas proteínas plasmáticas (la albúmina y un fragmento de la inmunoglobulina G), así como la adsorción de un lípido sintético. Con ello se ha intentado profundizar en las interacciones que gobiernan las uniones de macromoléculas

biológicas sobre interfases sólido/agua, para posteriormente enfocar el trabajo hacia los test de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con inmunoproteína. En particular, sobre el estudio de las variables ópticas y físicoquímicas que afectan tanto a la detección de la reacción antígeno-anticuerpo como a la cinética de la misma. La importancia de este trabajo reside principalmente en que es muy probable que para la detección o cuantificación de cualquier antígeno o anticuerpo, se puede encontrar un método adecuado basado en la tecnología *látex*. Así, si hacemos un recuento de los diferentes reactivos comerciales que utilizan en su composición partículas poliméricas resulta ser superior a 200, de los que más de 75 están diseñados para detectar la presencia de agentes infecciosos en diferentes líquidos y secreciones corporales, y el resto se reparte entre varias disciplinas como son alergias, marcadores tumorales o hepáticos, pruebas tiroideas, SIDA y cuantificación de diversas hormonas [3].

La estructura de la presente memoria consta de 5 bloques bien diferenciados, pero no independientes:

a) En primer lugar ha sido necesario sintetizar y caracterizar nuestras propias partículas de látex. Gracias al impulso que ha tenido en los últimos años la rama de la Físicoquímica que estudia las reacciones polimerización, se pueden conseguir dispersiones altamente homogéneas de microesferas poliméricas, en las que se puede variar independientemente el tamaño, grupos polares superficiales, grado de hidrofobicidad, etc [4]. En concreto, en nuestro trabajo se han sintetizado 7 látex que se diferencian entre ellos en algunas de las principales características de todo sistema coloidal: tamaño, naturaleza de grupos polares superficiales, densidad superficial de carga, hidrofobicidad y estabilidad coloidal. Una vez obtenidas las partículas, el segundo objetivo que se llevó a cabo fue caracterizar superficialmente las mismas, bloque que constituye el **Capítulo II**. Para tal fin, se han hecho uso incluso de técnicas analíticas no específicas de los polímeros, como son la resonancia magnética nuclear, la espectroscopía infrarroja o el análisis químico elemental. Dentro de la caracterización de los sistemas coloidales se ha prestado un especial interés en el estudio de las interacciones entre las partículas, pues éstas son las responsables de muchas propiedades macroscópicas que presentan los fluidos coloidales. Fundamentalmente, estas interacciones están relacionadas con la estabilidad coloidal y con el comportamiento electrocinético del sistema [5].

b) El segundo bloque de la investigación ha estado enfocado hacia el estudio de las interacciones polímero-proteína. Es un hecho bien conocido que las proteínas tienden a adsorberse sobre diferentes interfases debido a la naturaleza anfotérica de aquellas (es decir,



a que presentan regiones más polares y zonas más hidrófobas) [6]. El interés de este estudio se comprende cuando se revisan las múltiples aplicaciones y problemas tecnológicos que presentan los procesos de adsorción proteica sobre sustratos sólidos: formación de trombos en materiales artificiales usados en cirugía cardiovascular, formación de la placa bacteriana dental, contaminación de lentes de contacto, deposición proteica en planta potabilizadoras o en cascos de embarcaciones, o bien, como apuntamos anteriormente, en el desarrollo de tests de diagnóstico. En nuestro caso, el estudio se ha centrado en analizar las interacciones que se ponen en juego en la adsorción de una inmunoproteína, así como en el estudio de la caracterización de los complejos formados. Quizás la máxima atención deba prestarse a la estabilidad de tales complejos (así como en lo referente a su movilidad electroforética), pues de ella depende la viabilidad de los mismos en el desarrollo de inmunosistemas analíticos.

c) Tan importante es la estabilización coloidal que hemos dedicado un capítulo, el IV, para intentar aumentar la estabilidad de los complejos coadsorbiendo junto a nuestra inmunoproteína tanto albúmina de suero bovino (BSA) como un lípido catiónico. De los resultados experimentales se ha podido dar un avance importante, a nivel de investigación básica, en el estudio de las interacciones polímero-lípido.

d) En el siguiente capítulo nos hemos centrado en la detección óptica de la aglutinación de partículas de látex. La efectividad de un reactivo látex, en relación a su capacidad para poder cuantificar un antígeno o un anticuerpo determinado, no sólo es función de la naturaleza o composición del propio reactivo, sino que depende fuertemente del método de análisis que se emplee [7]. Las teorías de dispersión de luz nos ayudan a diseñar métodos de análisis fiables, reproducibles y sensibles con los que realizar el seguimiento de la agregación de partículas coloidales.

e) Por último, nos hemos detenido en hacer un estudio sobre todas las variables experimentales que pueden afectar al resultado final de un inmunoensayo de látex; principalmente en aquellas relacionadas con las condiciones físicoquímicas del medio de reacción, así como las que tienen su origen en las propias características de los complejos látex-inmunoproteína.

## 1.2. BIBLIOGRAFÍA.

1. M.S. El-Aasser. "An Introduction to Polymer Colloids". Editores F. Candau y R.H. Ottewill. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 1990.
2. K, Ishihara, N.P. Ziats, B.P. Tierney, N. Nakbayashi y J.M. Anderson. *J. Biomedical*

- Materials Research*. **25** : 1397 (1991).
3. L. Borque. *Boletín Bibliográfico Behring*. **6** : 13 (1992).
  4. M.S. El-Aasser. "Future Directions in Polymer Colloids". NATO ASI Series, Series E: Applied Sciences. Editores M.S. El-Aasser y R.M. Fitch. Volumen 138. 1987.
  5. R. Hidalgo Álvarez. *Adv. Colloid Interface Sci.* **34** : 217 (1991).
  6. W. Norde y J. Lyklema. *J. Biomater Sci Polymer Edn.* **2** : 183 (1991).
  7. G.K. von Schulthess, M. Giglio, D.S. Cannel y G.B. Benedek. *Molecular Immunology*. **17** : 81 (1980).

**II. CARACTERIZACIÓN Y ESTABILIDAD COLOIDAL DE  
SISTEMAS COLOIDALES MODELO**

**II.1. INTRODUCCIÓN.**

Cualquier sistema coloidal posee un conjunto de propiedades determinadas que permiten distinguirlo de cualquier otro. Por tanto, dichas características son las responsables de que todos los látex puedan diferenciarse entre sí. Como ya sabemos, el rasgo principal que caracteriza a una disolución coloidal es el alto valor de área superficial que hay presente en un pequeño volumen de muestra. Por lo tanto, la caracterización de un látex consiste principalmente en conocer y calcular las propiedades superficiales de las partículas, es decir, aquellas que están relacionadas con la estructura de la interfase agua/polímero. Algunas de ellas son la densidad superficial de carga, el carácter hidrófobo de la superficie, comportamiento electrocinético, estabilidad coloidal, etc. Otro parámetro de interés que debemos conocer, y que no depende de las características interfaciales del sistema, es el tamaño de las partículas y la distribución estadística de los diámetros de estas microesferas.

En el **Apéndice I** de esta memoria se explica cómo se sintetizaron y limpiaron los látex que se han usado en este trabajo. No obstante, en la **Tabla II.1** presentamos el grupo polar superficial que cada uno de ellos posee, pues como en dicho anexo apuntamos, de éste dependerán algunas de las principales propiedades del coloide.

Látex	Grupo superficial
JL1	Sulfonato
JL2	Sulfonato
JL3	Carboxilo
JL4	Carboxilo
JL7	Carboxilo
JL8	Amina e imina
JL10	Hidroxilo

**Tabla II.1.** Grupos superficiales de los látex empleados en esta Tesis

A continuación describimos algunas de las técnicas y métodos experimentales que se han usado en la caracterización de los sistemas coloidales, comentando paralelamente los resultados obtenidos.

## II.2. TAMAÑO Y POLIDISPERSIDAD.

La importancia de conocer el tamaño medio de las partículas reside en que a partir de este valor podremos calcular el área de superficie polimérica que tendremos en un volumen determinado de muestra. Por ello, se ha estimado el diámetro de las mismas a través de dos métodos alternativos, obteniendo valores muy concordantes. El primero ha sido la microscopía electrónica de transmisión (T.E.M.). Para usar esta técnica la dispersión coloidal tenía que ser desecada, ya que se trabaja a alto vacío, y por tanto el tamaño de partícula que se obtiene se determina a partir de microesferas que encuentran fuera de su entorno acuoso. Quizás sea ésta la principal diferencia con respecto a la otra técnica que hemos empleado: la espectroscopía de fotocorrelación (PCS), que detallaremos más adelante.

Para calcular el tamaño a través de la T.E.M. era necesario tomar fotografías de los látex; tanto el revelado y positivado de éstas como la preparación y fijación de las muestras, fueron llevados a cabo en los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. A continuación mostramos algunas de las fotografías tomadas con el microscopio electrónico (Figuras II.1-7). En ellas se observa claramente la geometría esférica de las partículas de poliestireno.

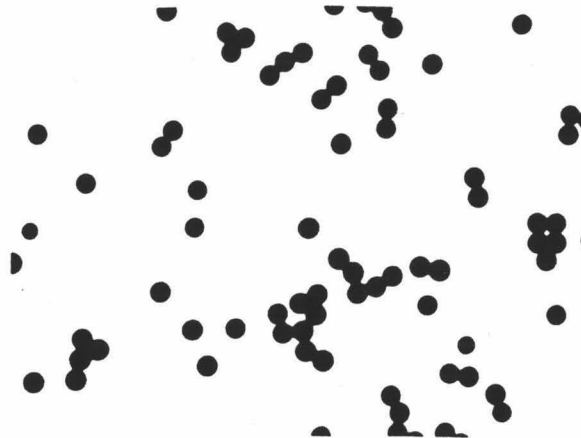


Fig. II.1. Fotografía obtenida con T.E.M. del látex JL1.

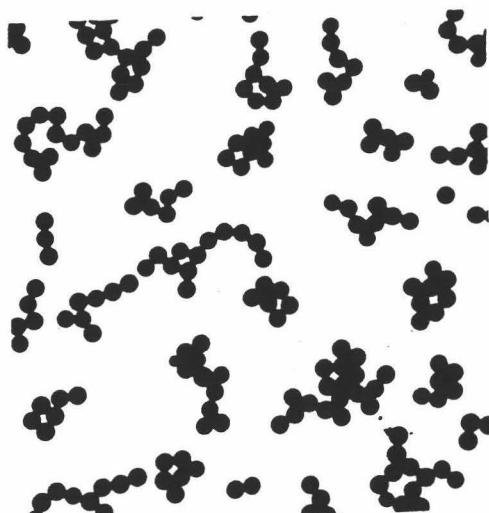


Fig. II.2. Fotografía obtenida con T.E.M. del látex JL2.

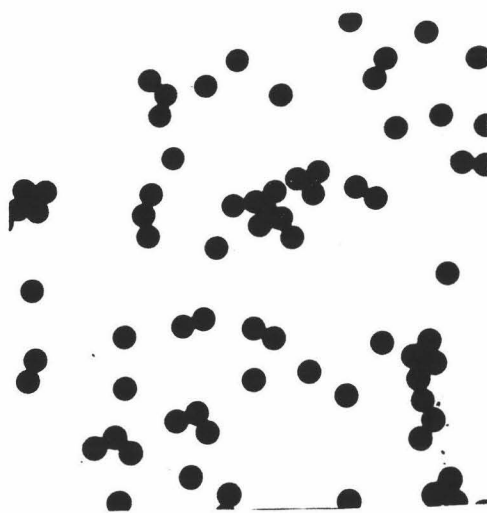


Fig. II.3. Fotografía obtenida con T.E.M. del látex JL3.

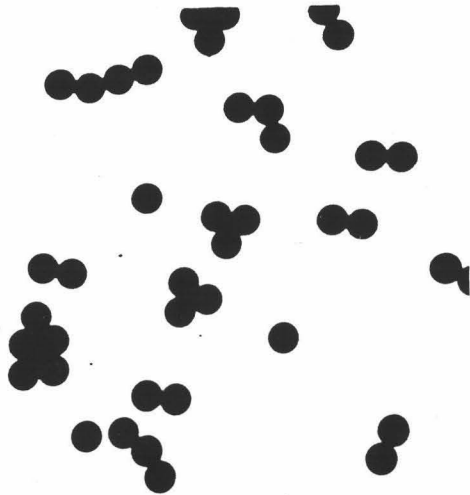


Fig. II.4. Fotografía obtenida con T.E.M. del látex JL4.

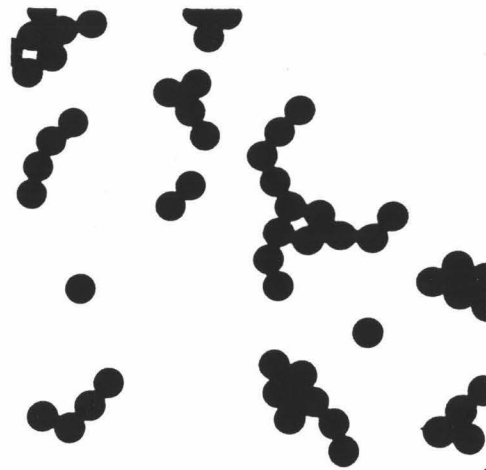


Fig. II.5. Fotografía obtenida con T.E.M. del látex JL7.

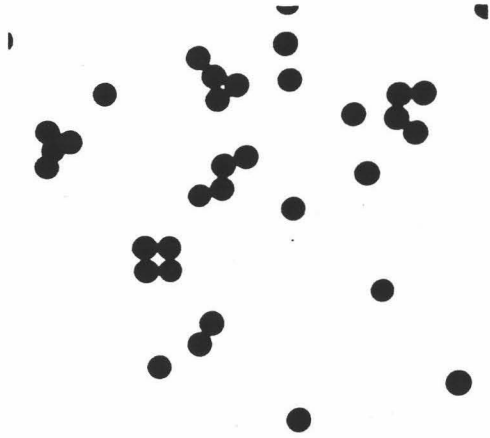


Fig. II.6. Fotografía obtenida con T.E.M. del látex JLB.

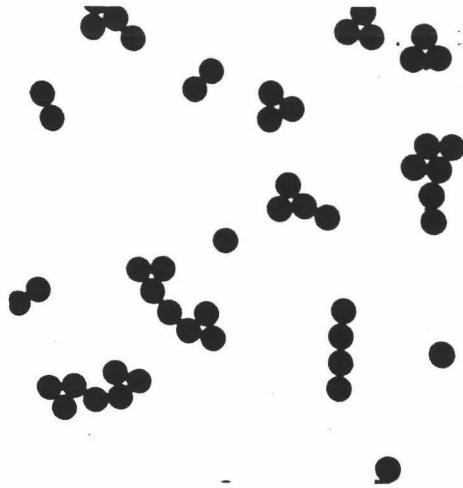


Fig. II.7. Fotografía obtenida con T.E.M. del látex JL10.



En las anteriores fotografías no pueden distinguirse detalles superficiales. Sin embargo, si observáramos el sistema a un gran aumento, tal y como se muestra en la Figura II.8, se puede ver que las partículas del látex JL10 tienen una superficie rugosa, hecho que no se detectó en ninguna de las otras muestras. Esto se debe a una floculación de partículas pequeñas, sintetizadas en la segunda etapa de la polimerización, que se adhieren sobre las partículas ya existentes.

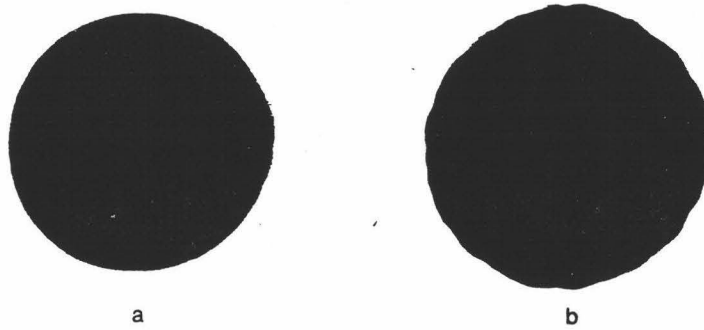


Fig. II.8. Detalles de los látex (a) JL7 y (b) JL10.

A partir de las fotografías se podía obtener el diámetro de las partículas empleando una tableta digitalizadora provista de un puntero, con el que se marcaban tres puntos del perfil de cada partícula; todo esto estaba conectado a un ordenador personal en el que se almacenaban los datos para su posterior análisis. Con esta técnica se puede calcular distintos diámetros promedio [1], como son:

- i) El diámetro promedio en *número* ( $d_n$ )

$$d_n = \frac{\sum n_i d_i}{\sum n_i} \quad (II.1)$$

donde  $n_i$  es el número de partículas que tienen un diámetro determinado  $d_i$ .

- ii) El diámetro promedio en *peso* ( $d_w$ ), que se define como

$$d_w = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (II.2)$$

iii) El diámetro promedio en *volumen* ( $d_v$ ), que se expresa como

$$d_v = \left( \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i} \right)^{1/3} \quad (II.3)$$

A partir de los dos primeros se puede calcular el índice de polidispersidad (P.D.I.) que viene dado por la relación

$$P.D.I. = \frac{d_w}{d_n} \quad (II.4)$$

Si su valor fuese 1, significaría que todas las partículas son exactamente iguales y el sistema sería totalmente monodisperso. A medida que el P.D.I. se aleja de la unidad, la distribución de tamaños será cada vez más ancha. Se considera que una disolución coloidal es monodispersa si su índice de polidispersidad es menor de 1.05 [2]. Los resultados obtenidos por esta técnica se muestran en la Tabla II.2, y las distribuciones de tamaño de todos los látex aparecen en las Figuras II.9-15.

Látex	Número de part.	$d_n$ (nm)	$d_w$ (nm)	$d_v$ (nm)	P.D.I.	desv. st. (nm)
JL1	691	185.1	187.7	185.8	1.014	9.5
JL2	852	197.3	200.7	198.2	1.013	11.2
JL3	474	263.6	264.3	263.8	1.003	7.5
JL4	242	331.0	331.7	331.3	1.002	8.8
JL7	273	332.7	333.3	333.0	1.002	7.5
JL8	257	183.3	183.7	183.5	1.002	5.1
JL10	344	636.2	637.2	636.5	1.002	13.6

Tabla II.2. Parámetros estadísticos relacionados con la distribución de tamaños. ( $\sigma_{st}$  = desviación standar).

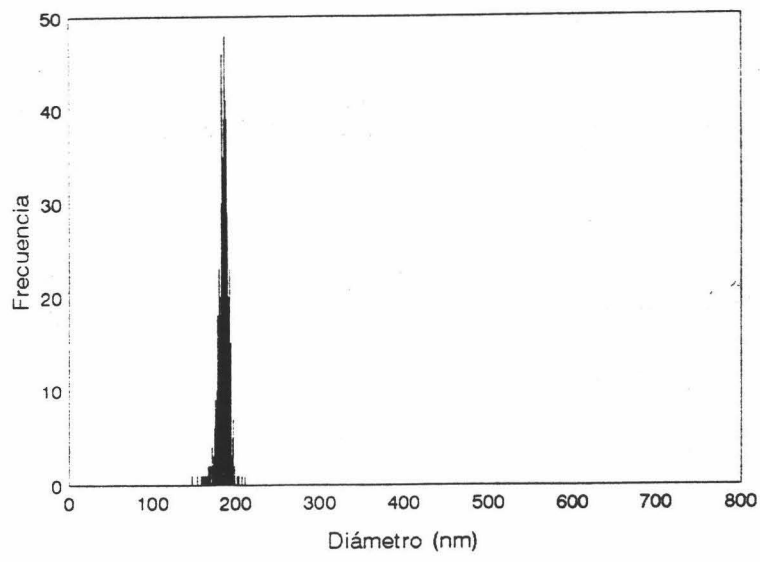


Fig. II.9. Distribución de tamaños del látex JL1.

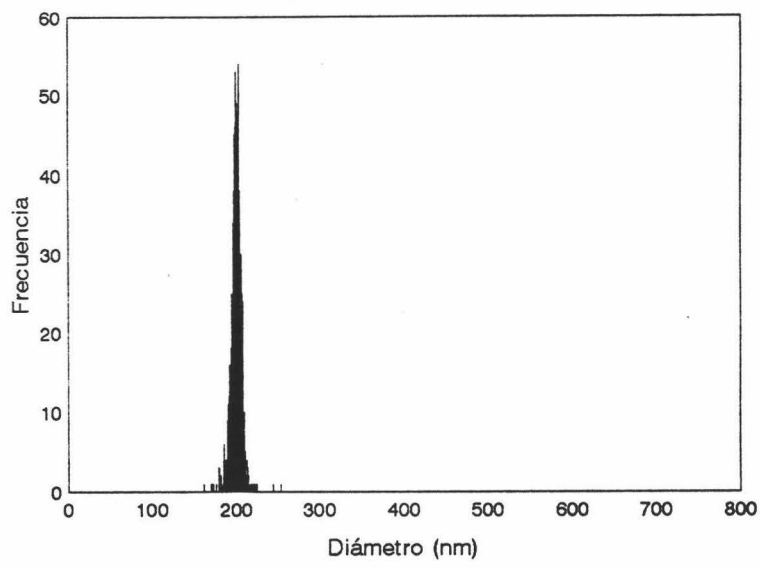


Fig. II.10. Distribución de tamaños del látex JL2.

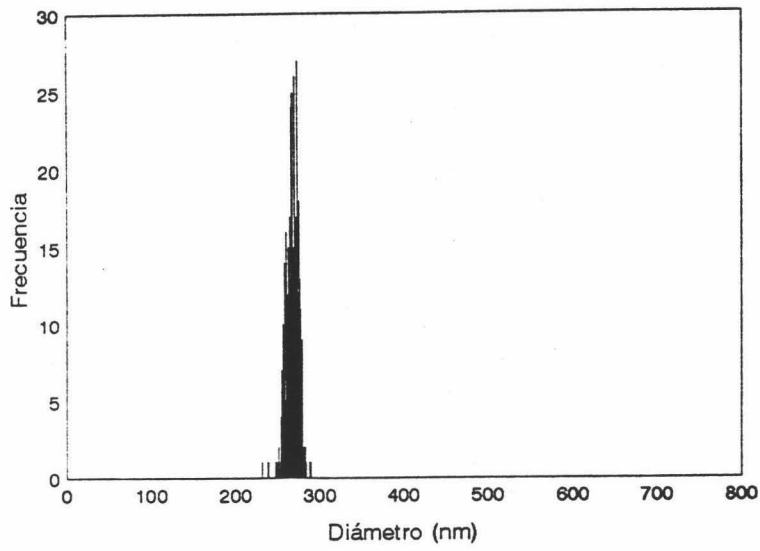


Fig. II.11. Distribución de tamaños del látex JL3.

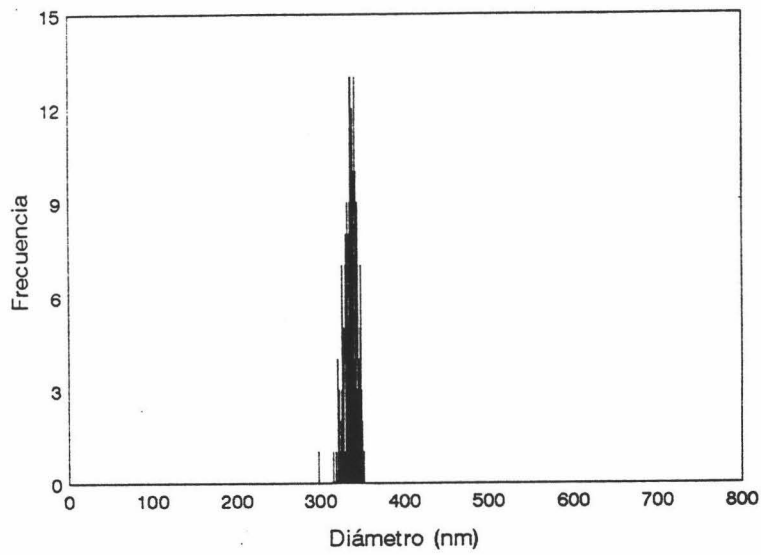


Fig. II.12. Distribución de tamaños del látex JL4.

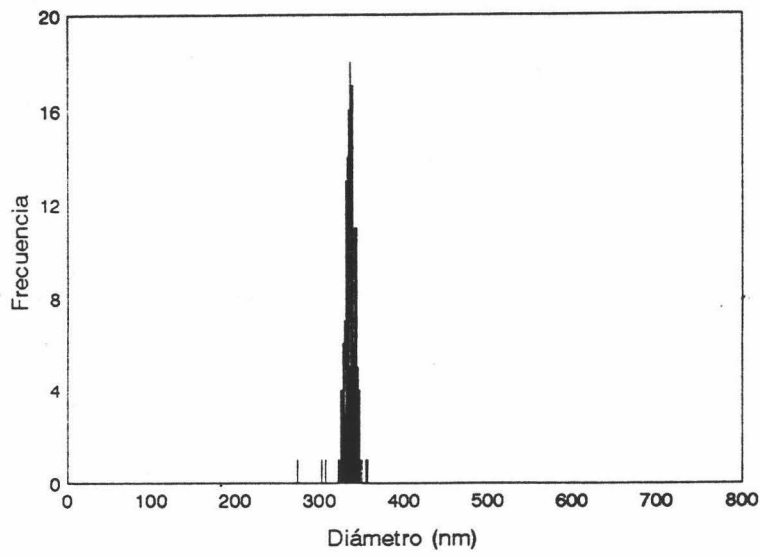


Fig. II.13. Distribución de tamaños del látex JL7.

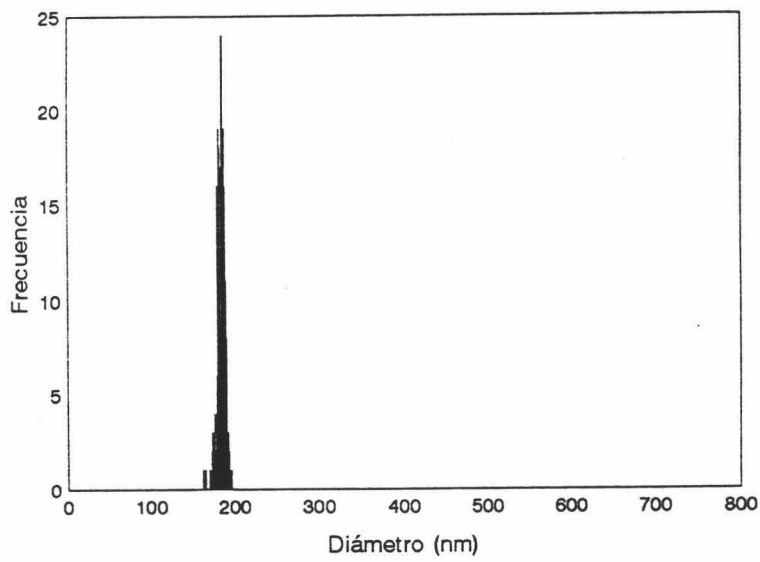


Fig. II.14. Distribución de tamaños del látex JL8.

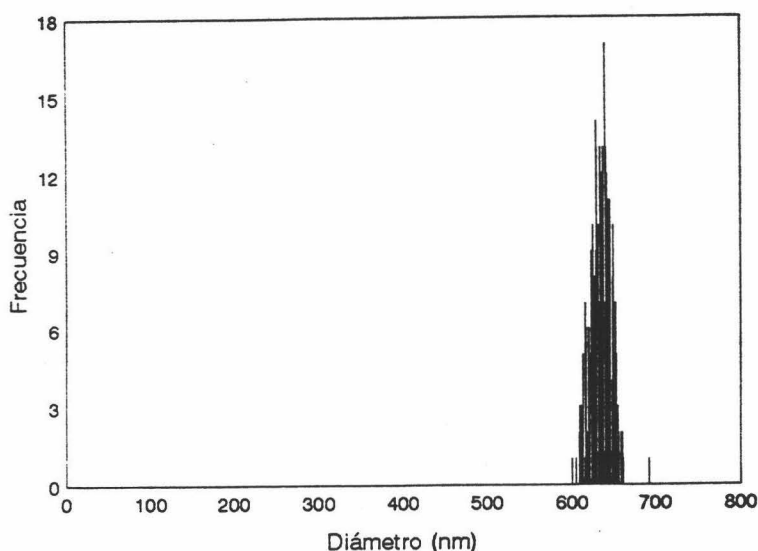


Fig. II.15. Distribución de tamaños del látex JL10.

La otra técnica que hemos empleado en la determinación de los tamaños ha sido la **dispersión cuasielástica de luz**. Tanto el fundamento teórico como la descripción del dispositivo experimental se detallan en el **Apéndice II**. Una dispersión muy diluida de partículas de látex era iluminada por un haz de luz láser. A partir del análisis de las fluctuaciones en la luz dispersada por las microesferas puede obtenerse el coeficiente de difusión de las mismas, y de éste el diámetro de las partículas. Los resultados, que aparecen en la Tabla II.3, se obtuvieron como media de 15 medidas para cada uno de los látex.

Si comparamos los valores de los tamaños calculados por las dos técnicas, podremos comprobar que son ligeramente superiores los datos suministrados por PCS que aquellos obtenidos por TEM, (salvo para el JL10). Esta diferencia puede deberse a que por microscopía se obtiene la información a partir de una muestra seca de látex, mientras que por dispersión cuasielástica de luz se obtiene el tamaño hidrodinámico de las partículas, que es el correspondiente al diámetro efectivo más la capa de agua de hidratación que solvata la superficie de las microesferas. No obstante, si nos fijamos en los valores de los errores del diámetro de todas las muestras de látex obtenidas por ambas técnicas ópticas comprobaremos que estas diferencias no son significativas.

Látex	D ( $10^8 \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ )	Diámetro (nm)	$\sigma_{st}$ (nm)
JL1	2.62	187	4
JL2	2.40	204	5
JL3	1.79	273	5
JL4	1.43	342	7
JL7	1.43	342	5
JL8	2.48	198	5
JL10	0.77	636	16

Tabla II.3. Tamaños y coeficientes de difusión de los látex obtenidos por PCS.

### II.3. ANÁLISIS ELEMENTAL Y ESPECTROSCÓPICO.

Tanto la espectroscopía infrarroja como la resonancia magnética nuclear permiten la detección e identificación de ciertos grupos funcionales orgánicos que estén presentes en un sistema. El análisis elemental de una muestra también nos dará las proporciones relativas que existen entre los átomos que forman sus moléculas. Por tanto, éstas constituyen un conjunto de técnicas que nos permiten determinar las estructuras moleculares de las sustancias investigadas.

Su aplicación en la ciencia de polímeros tiene algunas limitaciones pues los espectros que se obtienen pueden representar sólo al monómero mayoritario. En el caso de copolímeros o terpolímeros aparecen espectros más o menos complejos, donde la identificación de las señales o picos espectrales puede ser extremadamente difícil debido a posibles enmascaramientos. Sin embargo, estas técnicas nos confirmarán la presencia o ausencia de determinados grupos funcionales característicos [2,3].

En nuestro caso la información espectroscópica que se ha obtenido ha sido especialmente útil para el látex JL10. Veamos a continuación los resultados.



**Análisis elemental.**

Mediante el análisis elemental de una muestra podemos conocer las proporciones de C, H y N que hay en sus moléculas. En el copolímero JL10 podremos calcular la proporción de hidroxietil metacrilato y de estireno que han polimerizado, a partir de la razón entre las cantidades de carbono e hidrógeno obtenidos mediante este análisis. Las medidas fueron realizadas por los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada, a partir de muestras sólidas de látex que eran introducidas en un desecador con pentóxido de fósforo durante 24 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla II.4.

Átomo	% en peso	Prop. a C
C	89.22	1.00
H	7.78	1.05
N	0.01	0.00

Tabla II.4. Análisis elemental del látex JL10. En la última columna se expresa el número de átomos de una determinada naturaleza, en relación a los átomos de carbono de la misma.

Si todo el látex fuese de poliestireno ( $C_8H_8$ ) la razón C/H sería 1, y al contrario, si sólo tuviésemos poliHEMA ( $C_6H_{10}$ ) la anterior proporción valdría 0.6. A partir de estas premisas se ha calculado el porcentaje final de estireno y HEMA que hay en las partículas del látex JL10, encontrando un valor del 90.6 % en peso para el primero de los monómeros y un 9.4 % para el segundo. Si comparamos con la carga inicial de monómeros que se añadieron en la reacción de síntesis, 91.8 % de estireno y 8.2 % de HEMA, comprobamos que sólo existe una pequeña diferencia que podría explicarse en base a que no todo el estireno reaccionó en la polimerización o bien a que parte de él se ha perdido en los agregados que fueron filtrados por la lana de vidrio.

**Espectroscopía infrarroja (IR).**

Todas las moléculas son capaces de absorber radiación a determinadas longitudes de onda. La espectroscopía es la técnica que se encarga de cuantificar esa energía absorbida. El fundamento de la espectroscopía IR se basa en la vibración molecular. Los átomos de una molécula no mantienen posiciones fijas, sino que realmente vibran hacia atrás y hacia delante



sobre un valor que se aproxima al promedio de la distancia interatómica. Este movimiento de vibración está cuantizado. A temperatura ambiente la mayoría de las moléculas de una muestra se encuentran energéticamente en el estado de vibración más bajo. Cuando iluminamos el compuesto con luz infrarroja, la cual posee un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 2500 nm y 25000 nm, la absorción de radiación se traduce en que la molécula pasa a otro nivel de vibración energéticamente superior [4]. Por lo general en vez de representar la absorción de radiación frente a la longitud de onda, se hace frente al número de onda ( $\nu$ ) que es la inversa de la anterior. Uno de los grupos funcionales que más fácilmente se detecta en espectroscopía IR es el grupo carbonilo (C=O) que da lugar a un pico intenso y agudo a  $\nu = 1690 - 1750 \text{ cm}^{-1}$ .

Se realizaron espectros infrarrojos a todas las muestras de látex con el fin de confirmar la presencia de ciertos grupos, principalmente superficiales; así por ejemplo, se buscaron señales debidas a grupos sulfonato (-SO<sub>3</sub>H) en el JL1 y JL2, carbonilo (C=O) y nitrilo (C≡N) en el JL3, JL4 y JL7, amina (-NH-) en el JL8, y carbonilo (C=O) e hidroxilo (-OH) en el JL10. Sin embargo, la mayoría de ellos provienen de la molécula del iniciador utilizado, y debido a su pequeña proporción con respecto al estireno, sus posibles señales espectroscópicas aparecen totalmente enmascaradas por la del estireno. Por ello, los espectros IR de las muestras JL1, JL2, JL3, JL4, JL7 y JL8 fueron exactamente iguales. Las Figuras II.16-17 muestran los de los látex JL7 y JL8. Sin embargo, en el espectro del látex JL10 (Figura II.18) sí aparecen diferencias con respecto a los anteriores, hecho que confirma la presencia de HEMA en las partículas.

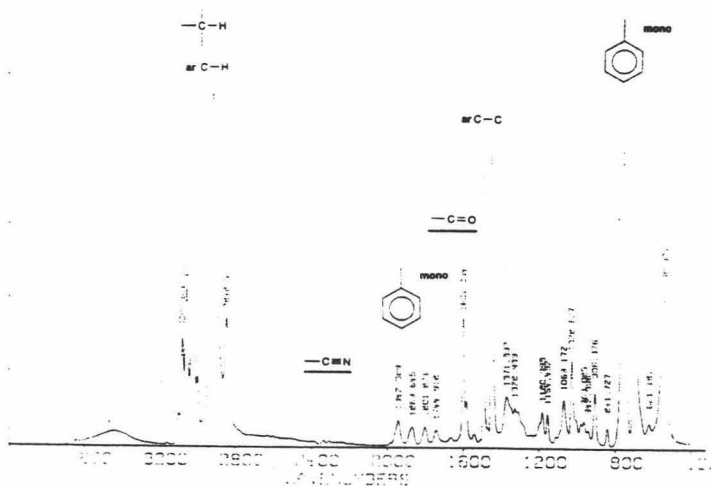


Fig. II.16. Espectro infrarrojo del látex JL7.

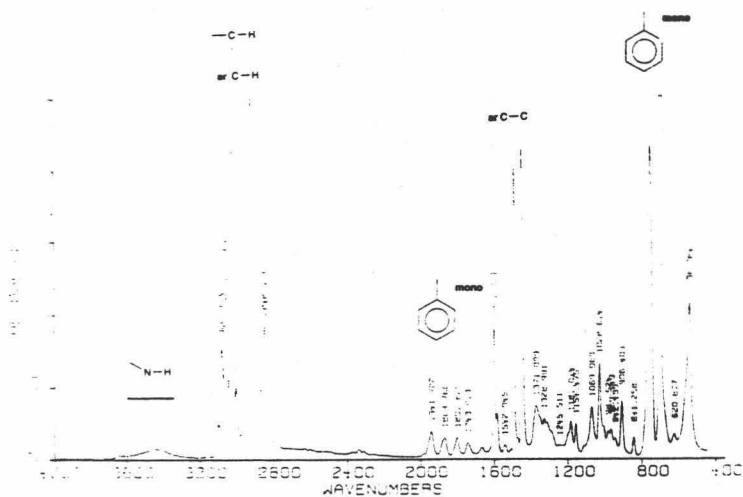


Fig. II.17. Espectro infrarrojo del látex JL8.

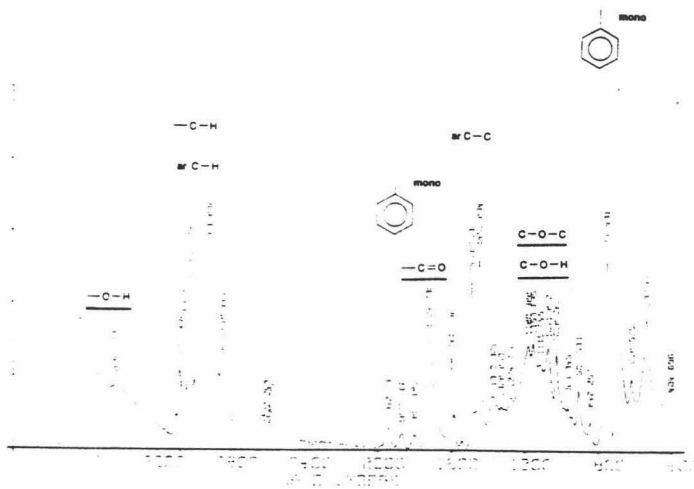


Fig. II.18. Espectro infrarrojo del látex JL10.

Los espectros fueron realizados por los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada, y la interpretación de los principales picos, cuyos grupos funcionales aparecen en las anteriores Figuras, se llevaron a cabo haciendo uso de las tablas de Pretsch y col [5].

### Resonancia magnética nuclear (RMN).

Esta es una técnica ampliamente empleada en química orgánica para la resolución de estructuras moleculares de compuestos. Aun sin detallar su fundamento teórico presentaremos una breve introducción. A diferencia de otras espectroscopías, las moléculas a examinar deben colocarse en presencia de un potente campo magnético para crear una diferencia de energía entre dos estados cuánticos; ésta se detecta por la absorción de una radiación energética adecuada. En ausencia del campo magnético estos estados diferentes tienen casi la misma energía.

La espectroscopía RMN se fundamenta en el espín nuclear. Los núcleos de ciertos átomos, al igual que los electrones, poseen un espín, ya que éstos se comportan como si giraran en torno a un eje. Por estar cargados (positivamente) y encontrarse en rotación, dichos núcleos tienen asociados un momento magnético. Para algunos núcleos importantes, como el  $^1\text{H}$ , el  $^{19}\text{F}$  y el isótopo  $^{13}\text{C}$ , el espín nuclear sólo puede tener uno de los dos valores asociados con los números cuánticos  $s_\alpha = +\frac{1}{2}$  y  $s_\beta = -\frac{1}{2}$ . Cuando estos núcleos se colocan en un campo magnético, sus momentos magnéticos tienden o bien a alinearse con el campo (espín  $+\frac{1}{2}$ ) o en contra de él (espín  $-\frac{1}{2}$ , estado energéticamente superior). La separación de energía entre esos dos estados depende de la magnitud del campo magnético externo aplicado. En esta situación habrá una radiación de una determinada longitud de onda que causará la inversión de los spines, de  $+\frac{1}{2}$  a  $-\frac{1}{2}$ .

El procedimiento seguido para obtener el espectro, consiste en colocar una disolución de la muestra entre los polos de un potente imán e ir variando la intensidad del campo magnético, manteniendo constante la frecuencia de la radiación. De esta forma, cierto valor de la intensidad de campo permite la inversión del espín nuclear mediante la absorción de energía. Estas absorciones quedan reflejadas como una señal en el espectro.

La situación real no es tan simple como hemos descrito anteriormente, pues los núcleos de una molécula no absorben a igual intensidad, puesto que se encuentran influenciados por la posición del resto de los átomos de la molécula; por ejemplo, en RMN de protones, el desdoblamiento de una señal espectroscópica en varios picos indica que en el entorno de un protón hay otros protones cercanos. Gracias a esta propiedad se puede obtener gran información a partir de esta técnica.

Nuestras muestras se han analizado mediante RMN de protones ( $^1\text{H}$ -RMN). Al igual que ocurrió con la espectroscopía IR, el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN coincide en todos nuestros látex, siendo igual al del espectro del poliestireno. En las Figuras II.19-20 aparecen los resultados de los látex JL7 y JL10. Aunque no se encuentran diferencias entre las posiciones de los picos, existe una propiedad en RMN que nos podría proporcionar información adicional: el área de los picos; ésta es proporcional al número de protones de la molécula que resuenan en esa posición del espectro. Así, si sólo hay poliestireno, la razón entre las áreas de los picos correspondientes a los protones del anillo bencénico (ver Figuras) y los que se encuentran fuera de él (-CH- y -CH<sub>2</sub>-) debería ser de 5/3 (1.67). Si aumenta el número de los protones no bencénicos, por ejemplo por la presencia de HEMA en el polímero, cambiará la razón entre estas áreas, disminuyendo este valor. Basándonos en este hecho [6], hemos intentado calcular el porcentaje en peso de los dos componentes mayoritarios del látex JL10. Sin embargo no pudimos obtener un resultado preciso ya que la razón de áreas para varias muestras de poliestireno (JL7, JL8 y A0 [6]) variaba apreciablemente (1.76, 1.58 y 1.81, respectivamente). Por tanto, aunque la técnica RMN es altamente reproducible en la posición de los picos, el valor que proporciona sobre el área de los picos no es lo suficientemente sensible como para obtener información acerca de la cantidad relativa de monómeros presentes en un copolímero, en donde uno de ellos sea bastante minoritario.

También se realizaron espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN, aunque no se obtuvieron resultados destacables.

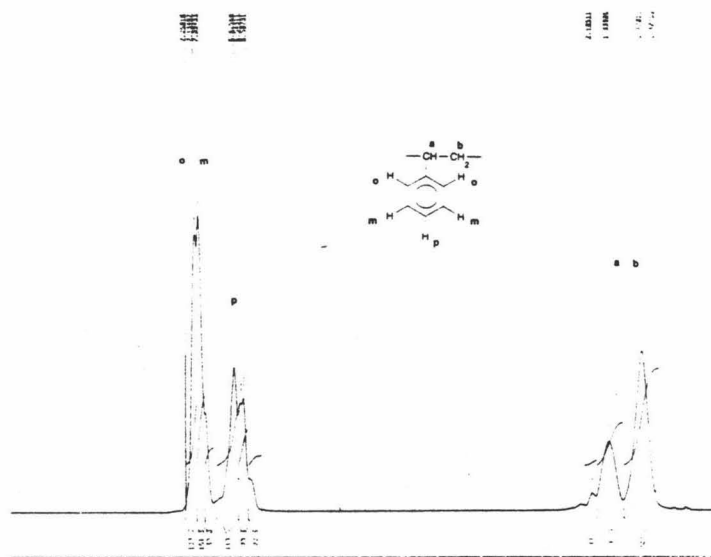


Fig. II.19. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del látex JL7.

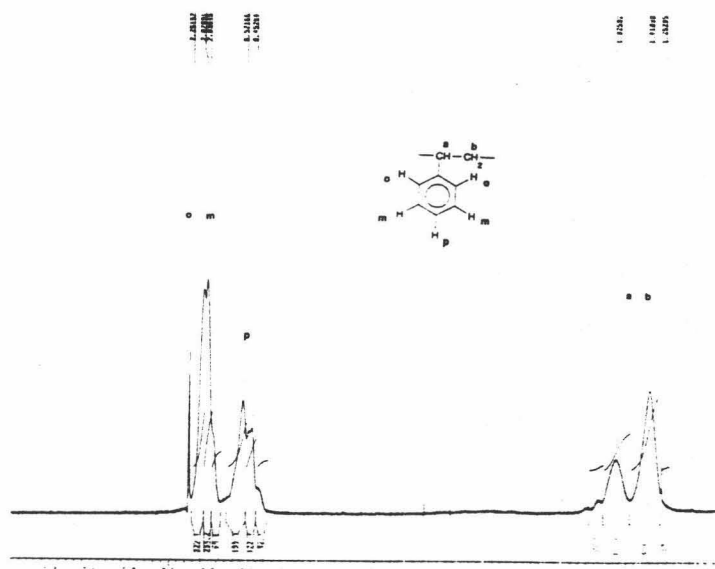


Fig. II.20. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del látex JL10.

Como conclusión general de este apartado podemos decir que estas técnicas confirman la presencia de hidroxietil metacrilato en las partículas del látex JL10. Sin embargo, no son lo suficientemente sensibles como para detectar los grupos funcionales derivados del iniciador empleado en la síntesis, por lo que su aplicación en la ciencia de polímeros podría estar limitada a aquellos constituidos por más de un tipo de monómero.

#### II.4. DENSIDAD SUPERFICIAL DE CARGA.

Muchas de las propiedades de los coloides que se encuentran en suspensiones acuosas vienen determinadas por la presencia de grupos químicos cargados situados en su superficie. La carga superficial de las partículas poliméricas que le confiere estos grupos cargados, hace que su comportamiento electrocinético y su estabilidad sean peculiares y responsables de la mayor parte de las propiedades de los sistemas coloidales. Por tanto, el conocimiento de la densidad superficial de carga ( $\sigma_0$ ) es importante para poder entender y explicar muchos de los resultados obtenidos durante el estudio de los látex; por ejemplo, la repulsión electrostática que existe entre las partículas determina su estabilidad frente a la coagulación.

Esta carga eléctrica tiene su origen en procesos de tipo químico, tales como la adsorción específica de ciertos iones o la disociación de grupos superficiales ionizables. En nuestro caso, como trabajamos con coloides de composición orgánica y en disoluciones donde no hay iones que puedan adsorberse de forma específica, el origen de la carga superficial lo tenemos en los grupos iónicos que provienen del iniciador utilizado en la polimerización.

Los grupos polares de los látex "JL" son de naturaleza ácido-base. Por consiguiente, una forma de cuantificar el valor de  $\sigma_0$  es a través de valoraciones conductimétricas y potenciométricas. En las primeras, observamos la variación de la conductividad de la disolución a medida que añadimos agente valorante; mediante las potenciométricas observamos la evolución del pH del sistema. Esta técnica clásica, desde el punto de vista del análisis químico, es utilizada ampliamente para determinar características superficiales de los polímeros [7,8,9].

El valor de la conductividad se corresponde con la sumatoria de los productos de la concentración de todos los iones presentes por sus conductancias equivalentes. Si representamos la conductividad y el pH frente a la cantidad de agente valorante añadido, las variaciones de pendiente en la curva de la conductividad y los puntos de inflexión de la curva de pH nos indican el punto final de la valoración.

En la valoración de un ácido fuerte (p. ej., HCl) disuelto en agua realizada con una base fuerte (p. ej. NaOH), observaremos claramente dos pendientes diferentes en las medidas de conductividad: en el primer tramo de la curva la pendiente es negativa, debido a la sustitución de protones por iones sodio, de menor movilidad; una vez alcanzado el punto final, el exceso de NaOH se traduce en un aumento pronunciado de la conductividad.

Sin embargo, cuando valoramos un látex podemos encontrar algunas diferencias con respecto a la valoración de ácidos o bases libres en el seno de la disolución, tales como la aparición de desviaciones de la linealidad en las gráficas conductividad, y que el cambio de pendiente que indica el punto final de la valoración no aparece como un cambio brusco, es decir, parece como si el proceso de valoración del polímero tuviera cierta inercia. Estos hechos son los responsables de que exista cierta subjetividad por parte del experimentador a la hora de calcular el volumen de agente valorante que se necesita para conocer  $\sigma_0$ . No obstante podemos explicar estos hechos basándonos en que las partículas poliméricas están rodeadas de una capa iónica que no tiene la misma movilidad que los iones de la disolución.

La instrumentación que hemos utilizado en las valoraciones de los látex consta de 4

dispositivos que permiten llevar a cabo las experiencias de una forma automática y reproducible:

- Un pHímetro (Crison Instruments, modelo 2002).
- Un conductímetro (Crison Instruments, modelo 525).
- Un dosificador (Metrohm, modelo 665 Dosimat) encargado de añadir el agente valorante con una precisión de 1  $\mu$ l.
- Un ordenador personal que controla todo el proceso y almacena los datos.

El procedimiento que hemos seguido en la valoración ha sido el siguiente; se tomaba una cantidad conocida de látex (entre 15 y 20 ml); como se conoce el tamaño de partícula y el contenido en sólido, podemos calcular la superficie total de polímero que iba a ser valorada (unos 12 m<sup>2</sup> aproximadamente); sobre este volumen se añadía un electrolito inerte (NaCl) con el fin de comprimir la capa de contraiones que rodea las partículas y así liberar protones hacia el medio, con el fin de que se encuentren más accesibles para reaccionar con el agente valorante [10].

### Valoración de los látex JL1 y JL2.

Debido a que su grupo polar es un ácido fuerte, (el ión sulfonato,  $-\text{SO}_3^-$ ), debemos asegurarnos de que todos los cationes que contrarrestan estas cargas negativas sean protones para así poder valorarlos con una base, (el NaOH). Por ello, estos látex se incubaron con resinas de cambio iónico durante una hora, manteniendo una agitación suave [11,12]. Las resinas empleadas (Amberlite) fueron suministradas por la empresa Biokit S.A. (Barcelona). Antes de mezclarlas con el látex se lavaron 3 veces con agua caliente y repetidas veces con fría. Las Figuras II.21 y 22 muestran las valoraciones de nuestros látex sulfonados con una disolución de NaOH de concentración conocida.

Como vemos, el cambio de pendiente en la curva de conductividad no es muy pronunciado. Este resultado también lo obtienen otros autores [7,13,14] con látex de la misma naturaleza que los nuestros, y han buscado dos posibles explicaciones que no son excluyentes: i) Por un lado, existen protones que estarán situados cerca de la superficie de la partícula; para valorarlos, el agente valorante ( $\text{OH}^-$ ) debe difundir hasta ellos, por lo que su neutralización no es instantánea y esto crea una dependencia con el tiempo. ii) La otra explicación se basa en la existencia de ciertos grupos ácido débil en el polímero. Éstos provendrían de la reacción de Kolthoff [15] del persulfato empleado en la síntesis, reacción que comentaremos

posteriormente con el látex JL10. Sin embargo, el uso del par redox persulfato/bisulfito como iniciador reduce enormemente la posibilidad de que se dé esta reacción.

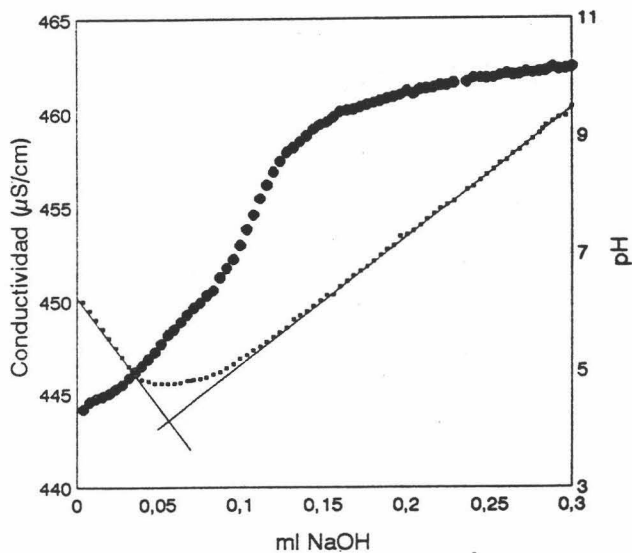


Fig. II.21. Valoración del látex JL1.

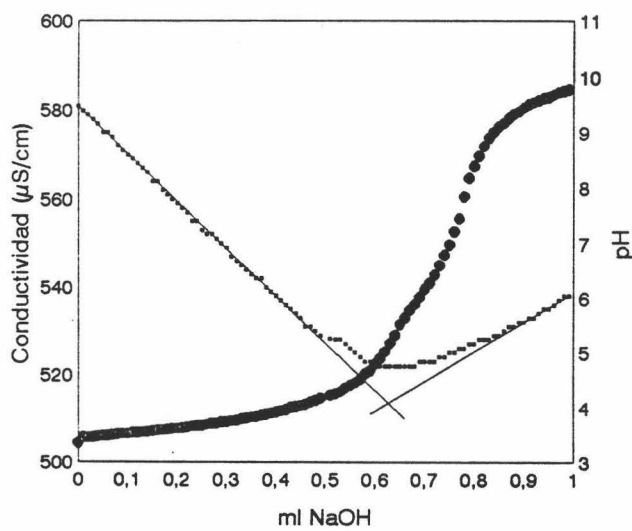


Fig. II.22. Valoración del látex JL2.



En ambas curvas potenciométricas se observan dos puntos de inflexión, uno a pH=5.5 y otro a pH=7.5, que podrían indicar la existencia de dos grupos químicos diferentes, hecho que apoyaría la segunda hipótesis. Sin embargo, la retrovaloración con HCl de estos látex (Figuras II.23 y 24) muestra que de haber grupos ácido débil en superficie, éstos se encuentran en una cantidad despreciable en comparación con la densidad de grupos sulfonato que hay en los polímeros. Esta afirmación se verá reforzada en el siguiente apartado.

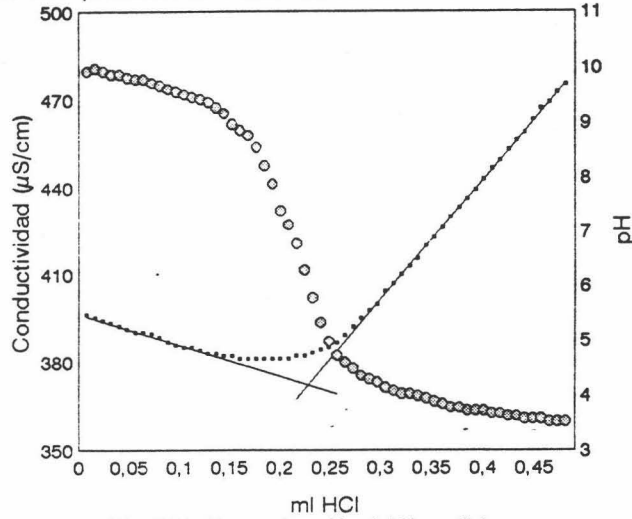


Fig. II.23. Retrovaloración del látex JL1.

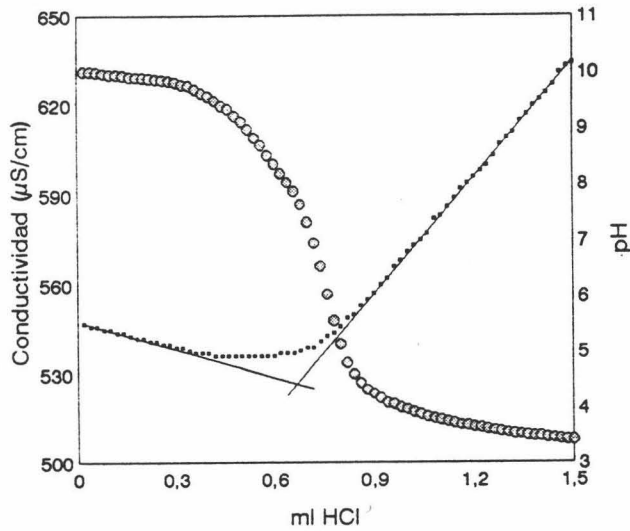


Fig. II.24. Retrovaloración del látex JL2.

Valoración de los látex JL3, JL4 y JL7.

En estas muestras el único grupo iónico que puede estar presente en la superficie de las partículas es el carboxilo. Para poder hacer una valoración directa (con NaOH), todos estos grupos funcionales tendrían que estar protonados (COOH), lo cual ocurriría a un pH próximo a 3. Sin embargo, en esta situación se eliminaría la carga eléctrica de las microesferas y se produciría la coagulación del sistema. Por ello, la única forma de poder calcular la  $\sigma_0$  en polímeros que sólo poseen ácido débil en superficie es poner el medio en pH básico (>10) por adición de NaOH. Así, todos los carboxilos estarán en su forma iónica y podremos valorarlos con un ácido fuerte, por ejemplo con HCl. En esta retrovaloración se distinguen tres procesos. El primero se corresponde con una disminución inicial de la conductividad al neutralizarse el exceso de iones hidroxilo que hay en el medio; es decir, tiene lugar una sustitución de grupos  $\text{OH}^-$  por iones  $\text{Cl}^-$ , de menor movilidad, hecho que se traduce en un descenso tanto de la conductividad como del pH. A continuación, los grupos carboxilos se van protonando progresivamente, por lo que el tramo de la curva correspondiente a este estadio presenta una pendiente diferente de la anterior. La razón por la que el valor de dicha pendiente es positiva la encontramos en el aumento de iones cloruro que hay en el medio. Finalmente, una vez valorados todos los carboxilos, la conductividad del medio aumenta rápidamente como consecuencia del exceso de clorhídrico. En las Figuras II.25-27 aparecen la retrovaloraciones de los látex JL3, JL4 y JL7.

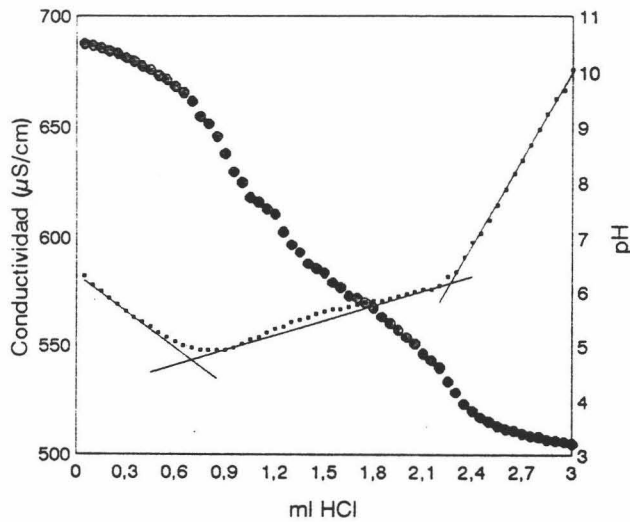


Fig. II.25. Retrovaloración del látex JL3.

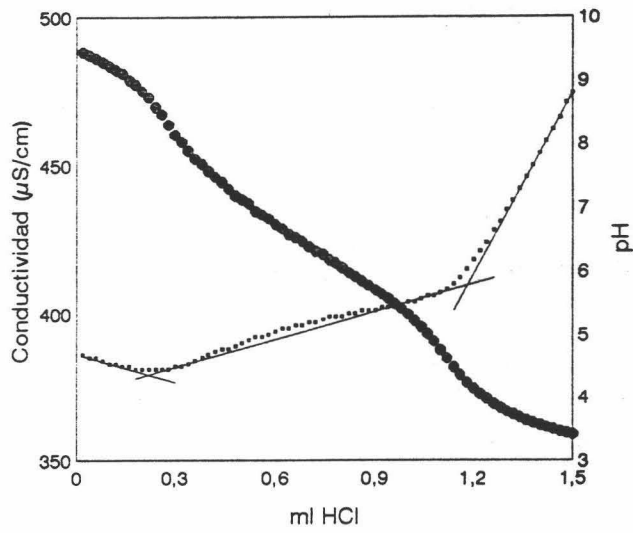


Fig. II.26. Retrovaloración del látex JL4.

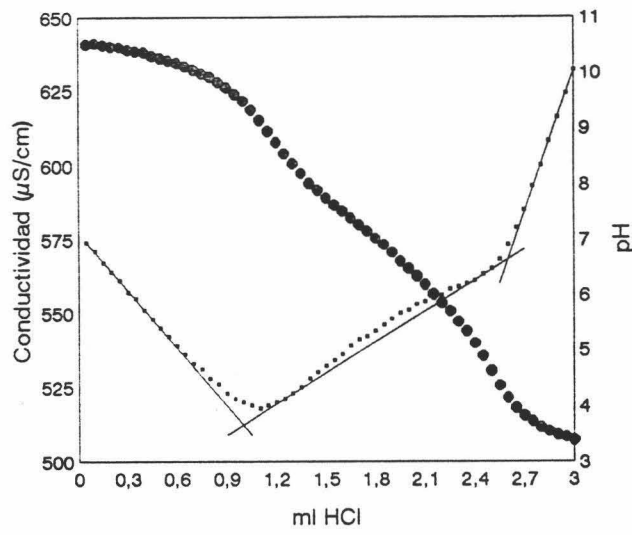


Fig. II.27. Retrovaloración del látex JL7.

Si observamos de nuevo las Figuras II.23 y 24 comprobamos en las curvas de conductividad, que la zona de transición que existe entre las dos pendientes extremas no llega a ser positiva, como sí ocurre en las retrovaloraciones de los látex con ácido carboxilo, por lo que se confirma que en los látex JL1 y JL2 la existencia de grupos ácido débil en superficie es despreciable.

**Valoración del látex JL8.**

Los únicos grupos polares que tiene este polímero en su superficie son los que provienen del iniciador ADMBA, es decir, grupos amina e imina. Por ser bases débiles, su cuantificación se realizó de forma análoga que para los ácidos débiles, es decir, añadiendo una cantidad de NaOH hasta alcanzar un pH  $\geq 10$  y retrovalorando con HCl, tal y como mostramos en la Figura II.28.

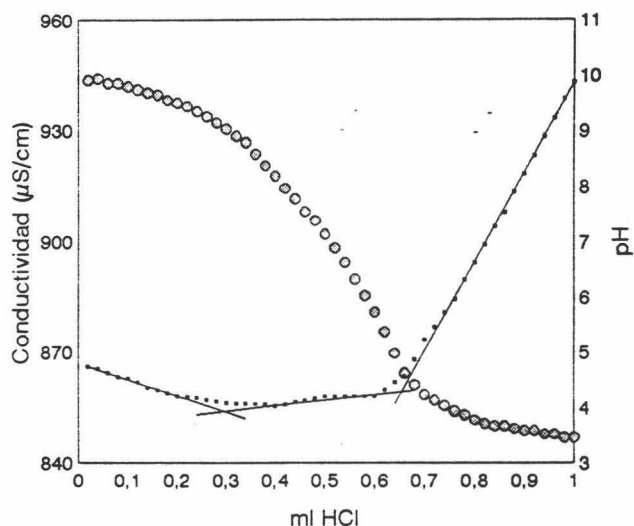


Fig. II.28. Retrovaloración del látex JL8.

**Valoración del látex JL10.**

Este látex se caracteriza por poseer grupos hidroxilo superficiales. Dichos grupos no aportan carga a las partículas y al no ser valorables, no hemos llevado a cabo su determinación. Sin embargo, debe poseer grupos ácido fuerte en superficie, derivados del iniciador empleado en

la síntesis. Por ello, incubamos el sistema con resinas y a continuación llevamos a cabo la valoración de este sistema. La gráfica correspondiente se muestra en la Figura II.29.

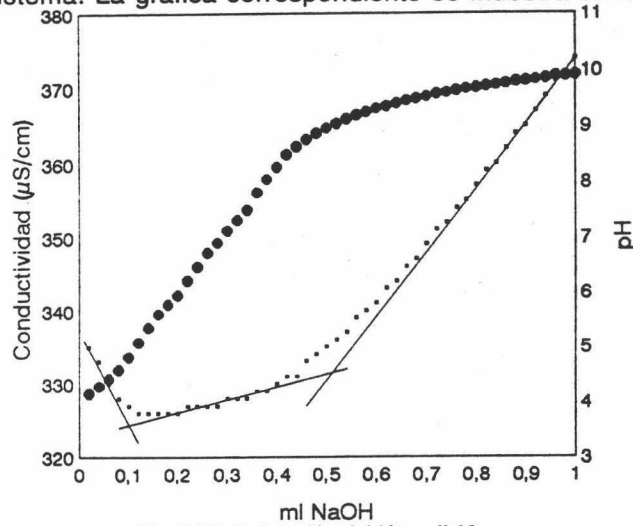


Fig. II.29. Valoración del látex JL10.

En este caso, sí se observan tres pendientes diferentes en la curva de la conductividad. La inicial aparece al ser valorados los grupos ácido fuerte; la final se corresponde con el exceso de agente valorante; la pendiente intermedia parece indicar la existencia de grupos ácido débil en el JL10. Este hecho se confirmó en la retrovaloración del polímero (Figura II.30).

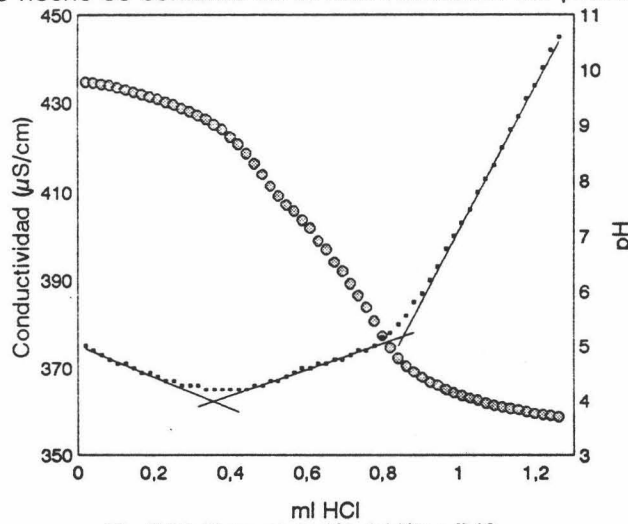


Fig. II.30. Retrovaloración del látex JL10.

Debemos preguntarnos cual es el origen de esta carga débil, ya que no aparece en ninguno de los componentes que se emplearon en la síntesis del polímero. La explicación la encontramos en la transformación de los grupos hidroxilo a carboxilo en presencia de un potente agente oxidante, tal y como es el persulfato [4]. Estos grupos -OH tienen dos orígenes posibles: mayoritariamente provienen del monómero HEMA, pero una minoría aparece como resultado de la reacción de Kolthoff. Si recordamos, en la segunda etapa de la polimerización del látex JL10 sólo se añadió persulfato como iniciador, el cual daría lugar, por ruptura, a iones radicales sulfato. Sin embargo, a pH neutro parte de las moléculas pueden reaccionar con el agua originando radicales hidroxilo que comenzarán la polimerización, originando cadenas orgánicas con grupos -OH terminales.



Una vez conocidos el volumen y concentración del agente valorante que se ha empleado y el área total de látex que se ha utilizado en las valoraciones, se puede calcular la densidad superficial de carga de los polímeros. En nuestros látex, todos los experimentos se realizaron por duplicado. Los valores de  $\sigma_0$  aparecen a continuación, en la Tabla II.5.

Látex	$\sigma_0$ fuerte ( $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ )	$\sigma_0$ débil ( $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ )	$\sigma_0$ total ( $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ )
JL1	- 4.0 ± 0.3	---	- 4.0 ± 0.3
JL2	- 10.5 ± 0.7	---	- 10.5 ± 0.7
JL3	---	- 16.2 ± 0.3	- 16.2 ± 0.3
JL4	---	- 12.1 ± 0.2	- 12.1 ± 0.2
JL7	---	- 19.0 ± 0.4	- 19.0 ± 0.4
JL8	---	+ 5.3 ± 0.2	+ 5.3 ± 0.2
JL10	- 2.1 ± 0.1	- 8.2 ± 0.3	- 10.3 ± 0.4

Tabla II.5. Valores de la densidad superficial de carga para todos látex.

Como comprobaremos el valor de la densidad de carga está relacionado con la cantidad de iniciador y/o comonomero iónico empleado en la síntesis. Así, entre el JL1 y el JL2 es el segundo el que tenía mayor cantidad de estirensulfonato de sodio, y por tanto se ve es el que más carga presenta; en el caso de los látex carboxilatados, las cantidades de ACPA utilizadas disminuyeron en el mismo orden en que decrecen los valores de  $\sigma_0$ .

#### Dependencia de $\sigma_0$ con el pH.

La densidad superficial de carga es una magnitud susceptible de variar con el pH del medio, ya que su valor depende del estado eléctrico de los grupos iónicos de la superficie de las partículas; como hemos visto, algunos de estos grupos son ácidos o bases débiles y, por tanto pH dependientes, por lo que también lo será  $\sigma_0$ .

Para calcular la densidad superficial de carga en función del pH es necesario realizar una valoración potenciométrica [16], comparando el resultado obtenido en el sistema polimérico con el de una disolución que se encuentra en las mismas condiciones experimentales pero sin partículas de látex. En todos nuestros látex (salvo para el JL8) el agente valorante empleado fue HCl, por lo que al blanco se le añadió un determinado volumen de una disolución de NaOH de concentración conocida para poder realizar una valoración. Este mismo volumen de NaOH era añadido al sistema coloidal antes de su valoración. Dependiendo de la naturaleza del ácido (o de la base) observaremos diferentes comportamientos cuando comparamos la valoración del látex con la del blanco. En las Figuras II.31-37 aparecen las valoraciones potenciométricas de todos los látex. Para el látex catiónico JL8 el agente valorante fue el NaOH y el blanco fue una disolución diluida de HCl.

A partir de la diferencia entre ambas curvas obtendremos la variación de la carga eléctrica de la superficie de las partículas para cada valor de pH. Por ejemplo, para los látex sulfonatados JL1 y JL2 la forma de las curvas nos indica que los grupos funcionales de superficie son ácido fuerte [9,17] y por tanto el valor de la  $\sigma_0$  es independiente del pH, tal y como aparece en la Figura II.38. Esta experiencia demuestra de nuevo que en estos látex la presencia de grupos ácido débil es nula o despreciable.

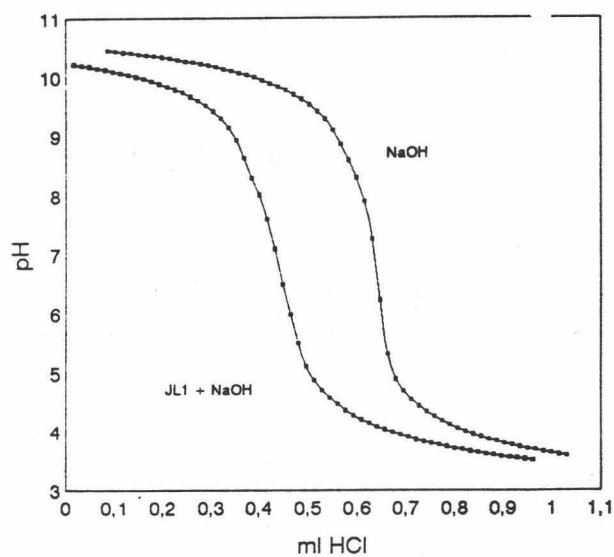


Fig. II.31. Valoración potenciométrica del látex JL1 con un blanco de NaOH.

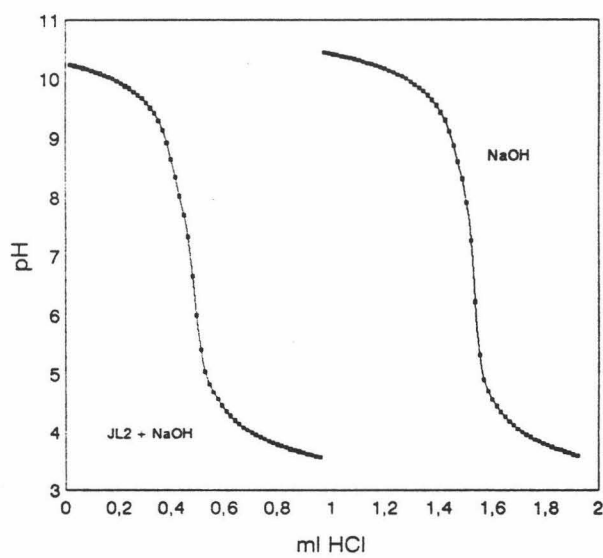


Fig. II.32. Valoración potenciométrica del látex JL2 con un blanco de NaOH.



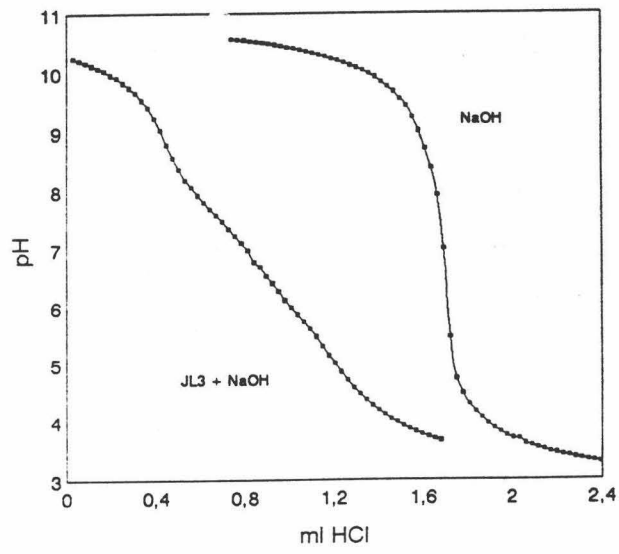


Fig. II.33. Valoración potenciométrica del látex JL3 con un blanco de NaOH.

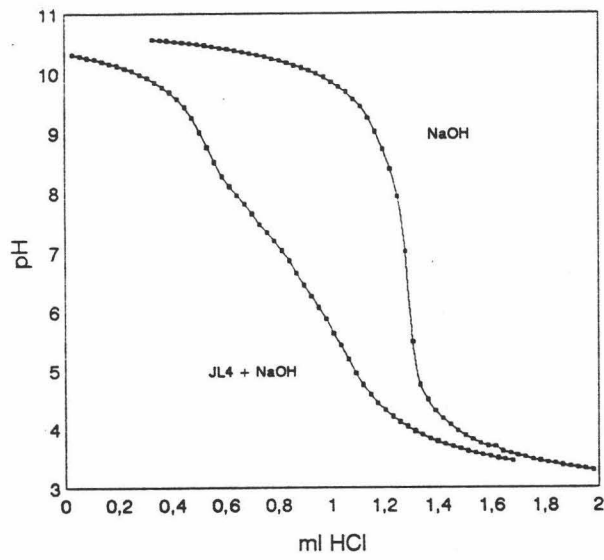


Fig. II.34. Valoración potenciométrica del látex JL4 con un blanco de NaOH.

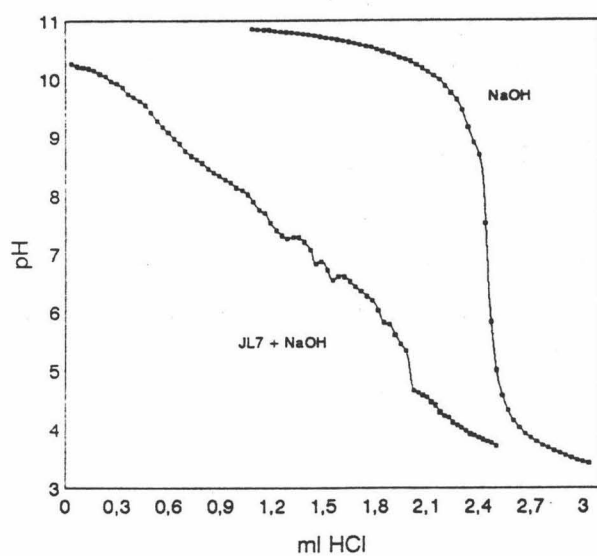


Fig. II.35. Valoración potenciométrica del látex JL7 con un blanco de NaOH.

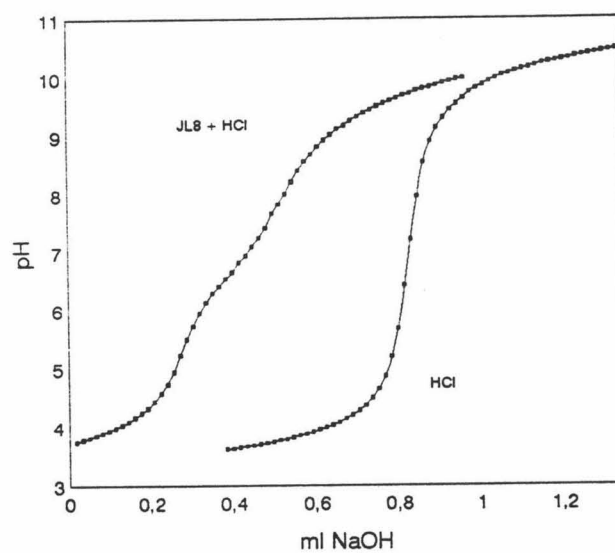


Fig. II.36. Valoración potenciométrica del látex JLB con un blanco de HCl.

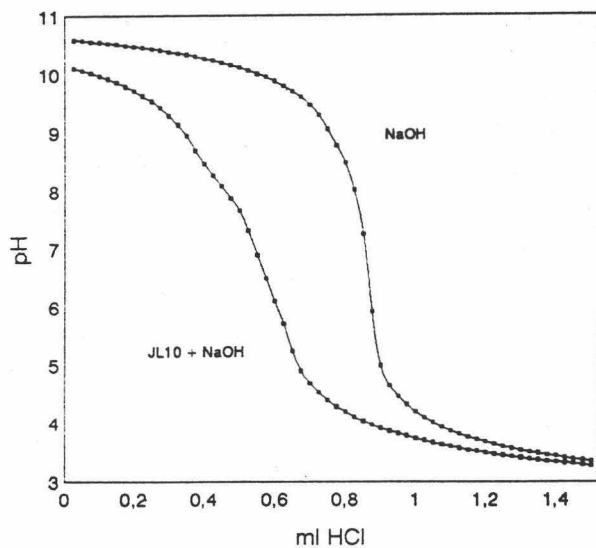


Fig. II.37. Valoración potenciométrica del látex JL10 con un blanco de NaOH.

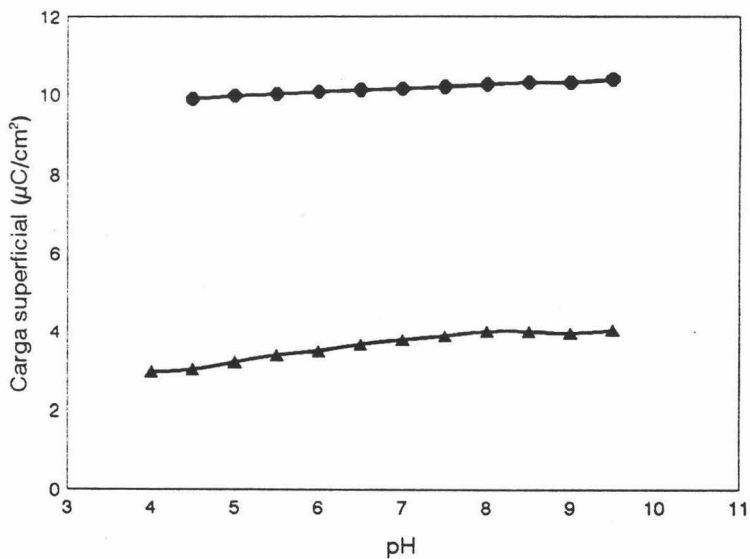


Fig. II.38. Dependencia de la densidad superficial de carga con el pH para los látex JL1(▲) y JL2(●).

Para los látex carboxilados sí que existen diferencias en la forma de las curvas de la valoración del blanco y la del látex, indicando que para diferentes valores de pH la densidad superficial de carga varía. La dependencia de  $\sigma_0$  de las muestras JL3 y JL4 queda reflejada en la Figura II.39. Este tipo de determinaciones están sujetas a ciertos errores debidos a las pequeñas desviaciones que puede presentar el pH en las valoraciones potenciométricas. No obstante, las tendencias de variación de  $\sigma_0$  con el pH se pueden establecer de un modo fiable.

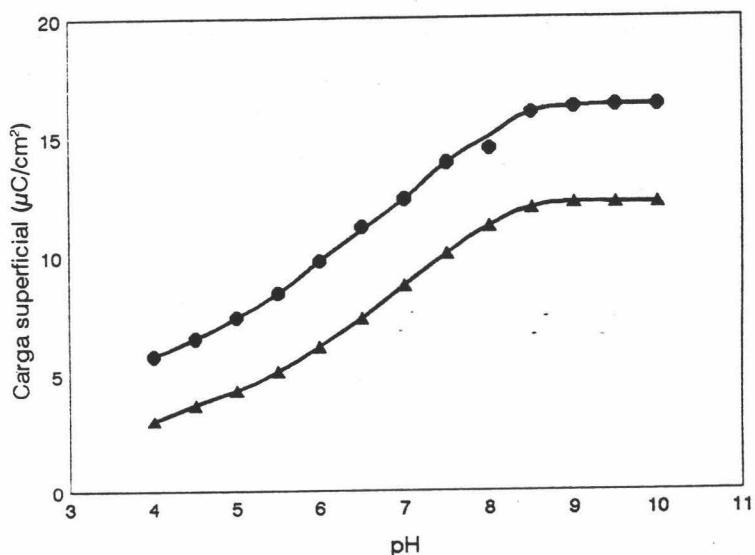


Fig. II.39. Dependencia de la densidad superficial de carga con el pH para los látex JL3(●) y JL4(▲).

La densidad superficial de carga de los látex JL8 y JL10 también es pH dependiente, tal y como se muestra en las Figuras II.40-41. Se confirma la presencia de grupos ácido débil en las partículas del látex JL10, si bien la disminución de  $\sigma_0$  conforme decrece el pH no es tan acusada como en los látex con grupos carboxilo como únicos grupos funcionales situados en su superficie, debido a que en el primero (JL10) coexisten tanto grupos ácido fuerte como débil en la superficie del polímero. Los grupos sulfato y sulfonato que provienen del iniciador redox que se empleó son los responsables de que, aún a pHs ácidos, estas partículas posean una carga neta que evita su coagulación.

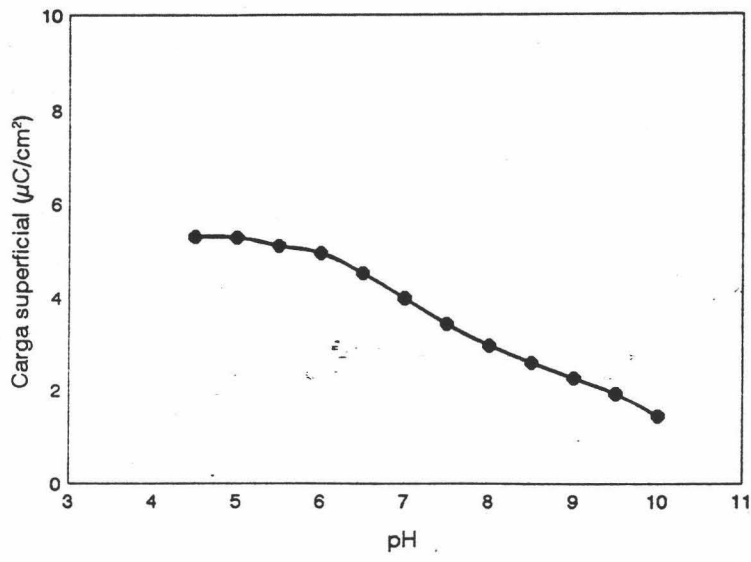


Fig. II.40. Dependencia de la densidad superficial de carga con el pH para el látex JLB.

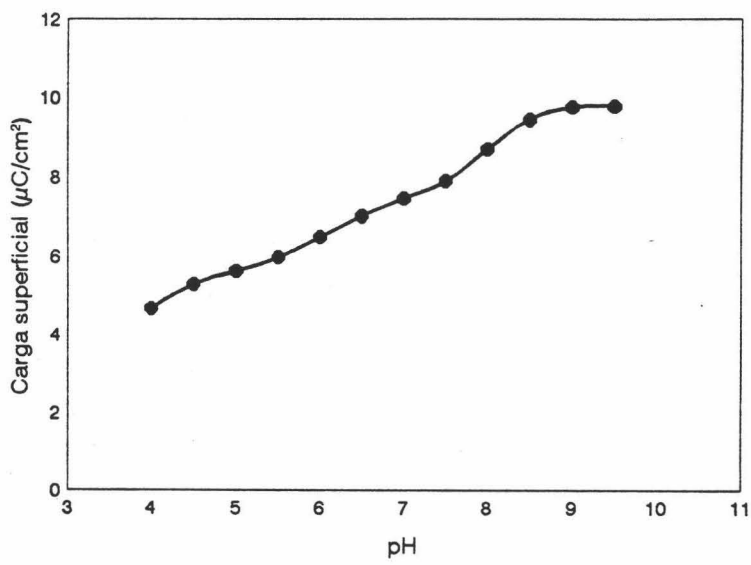


Fig. II.41. Dependencia de la densidad superficial de carga con el pH para los látex JL10.

En los látex que únicamente poseen grupos funcionales superficiales de naturaleza débil (JL3 JL4, JL7 y JL8), podremos calcular el  $pK_a$  del ácido a partir del equilibrio químico



donde  $AH$  se corresponde con los grupos  $-COOH$  y  $-NH_2^+$ , y  $A^-$  con  $-COO^-$  y  $-NH^-$ . Aplicando la ley de acción de masas se obtiene que

$$pK_a = pH + \log \frac{[AH]}{[A^-]} \quad (II.5)$$

por lo que el  $pK_a$  de nuestros látex se corresponderá con el pH en el que  $[AH] = [A^-]$ , es decir, el pH en el que la densidad superficial de carga se haya reducido a la mitad de su valor máximo. Los valores de  $pK_a$  obtenidos para los látex JL3, JL4 y JL8 se muestran en la Tabla II.6.

Látex	$\sigma_0$ ( $\mu C/cm^2$ )	$\sigma_{0/2}$ ( $\mu C/cm^2$ )	$pK_a$
JL3	16.2	8.1	5.4
JL4	12.1	6.05	5.9
JL8	5.3	2.65	8.5

Tabla II.6. Valores de  $pK_a$  para varios látex.

Comparando los resultados de  $pK_a$  que se han obtenido en los látex carboxilatados con los  $pK_a$  de otros grupos carboxilos de diferentes ácidos orgánicos libres en disolución, comprobamos que aquellos que se encuentran en la superficie del polímero tienen una constante de acidez inferior en un orden de magnitud al de otros ácidos carboxílicos en disolución que, por lo general, tienen valores de  $pK_a$  comprendidos entre 3.75 y 4.75. Este hecho se puede explicar si tenemos en cuenta que la localización espacial de estos grupos en la partícula está situada en una interfase polar (agua) / apolar (polímero), donde la constante dieléctrica de esa zona será algo menor que la del agua pura, por lo que los grupos  $-COOH$  tenderán a disociarse en menor medida que si se encontraran libres en disolución.

En un reciente trabajo, Schuiz y col [18] afirman que el grado medio de ionización de un grupo químico situado en la superficie de un polímero vendrá dado por la distribución de 'as diferentes constantes de disociación; esta distribución está causada por la interacción de ciertos grupos con sus vecinos o con otros potenciales eléctricos locales. De esta distribución de valores obtendremos un valor medio de  $pK_a$  que hace disminuir la pendiente de la curva de valoración del látex si la comparamos con la curva de valoración de una muestra que posea un único valor de  $pK_a$ . Este resultado aparece en nuestros látex carboxilados, hecho que queda reflejado en la Figura II.42.

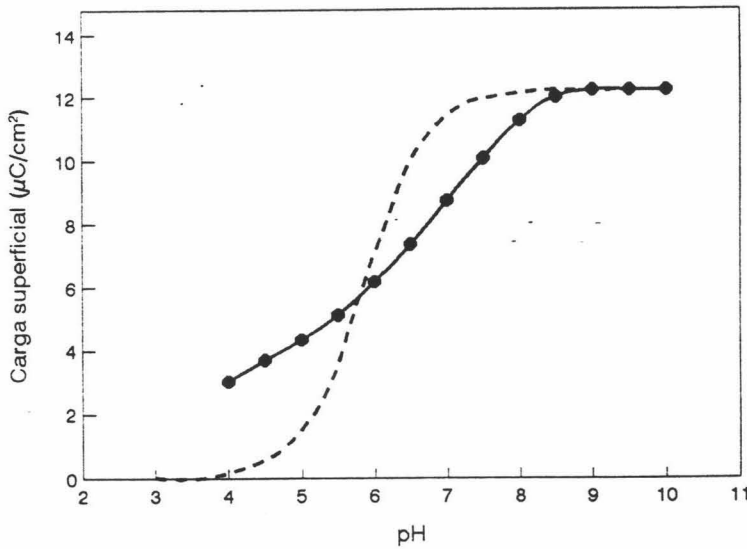


Fig. II.42. Gráfica comparativa entre la variación de la  $\sigma_0$  con el pH para el látex JL4 (línea continua) y la variación teórica (Ec. II.5) que tendría en un ácido con un  $pK_a$  fijo en 5.9 (línea discontinua).

Los valores de la constante de acidez de nuestros látex también se han calculado por otro método alternativo que veremos en el apartado dedicado al estudio electrocinético de las partículas en este mismo capítulo y comprobaremos que los resultados obtenidos por ambos lados es muy concordante con los aquí representados.

## II.5. CARÁCTER HIDRÓFOTO DE LOS LÁTEX.

Una de las principales propiedades que debemos conocer para llevar a cabo una buena caracterización en un látex es el grado de hidrofobicidad de su superficie polimérica, pues de ella dependen extraordinariamente los procesos de adsorción de un gran número de macromoléculas, tales como lípidos, surfactantes y proteínas. Una de las técnicas más utilizadas para determinar la hidrofobicidad de ciertas superficies es el ángulo de contacto [19]. El método más directo de conocer la hidrofobicidad de una interfase es mediante ángulo de contacto. En el caso de microesferas poliméricas, la formación de una superficie homogénea y lisa requiere disolverlas en un medio orgánico. Así, el ángulo de contacto medido en estas condiciones no informa de la hidrofobicidad de la interfase polímero-disolución, sino más bien de la fase interna del polímero. La formación, por compactación de una superficie con las microesferas de látex, tiene el serio inconveniente de su inherente rugosidad, característica que afecta apreciablemente al valor del ángulo de contacto medido. Estas son las razones que nos han llevado a determinar el carácter hidrófobo de la interfase polímero/disolución por otros métodos alternativos.

### Adsorción de un surfactante no iónico.

Otro método que se emplea para conocer la hidrofobicidad relativa de los polímeros es mediante la adsorción de un surfactante. El principio fundamental en el que se basa este procedimiento es que las superficies hidrofóbicas poseen una elevada tendencia a adsorber moléculas de surfactante, mientras que las hidrofílicas sólo adsorben pequeñas cantidades [20,21]. Para evitar la participación de fuerzas electrostáticas en el proceso de adsorción, hemos obtenido las isothermas de adsorción de un surfactante no iónico: el Tritón X-100 (Merck); su parte polar es una cadena de polióxido de etileno y su parte apolar consta de un anillo bencénico y una cadena alquílica (Figura II.43).

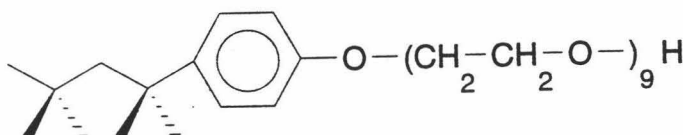


Fig. II.43. Molécula de Tritón X-100.



De esta forma la cantidad de Tritón X-100 adsorbido dependerá únicamente de las interacciones hidrofóbicas entre sus moléculas y la superficie polimérica.

Tanto las condiciones experimentales de la adsorción como el método de detección empleado fueron obtenidas a partir de los trabajos de A. Martín [6]. Por poseer en su molécula el anillo bencénico, el Tritón X-100 tiene un máximo de absorción de luz UV a  $\lambda_0 = 275$  nm. Se realizó un calibrado con medidas de la absorbancia a dicha longitud de onda frente a diferentes concentraciones de este surfactante. La adsorción se realizó por duplicado, añadiendo una cantidad conocida de Tritón X-100 sobre disoluciones de látex que contenían un área total de polímero de  $0.2 \text{ m}^2$ . La incubación se llevó a cabo a  $25^\circ\text{C}$ , durante 15 horas, en un medio neutro (pH 7) y a baja fuerza iónica (0.002). Transcurrido este tiempo, se retiraron las partículas de látex por centrifugación y se calculó la cantidad de surfactante adsorbida a partir de la diferencia entre la cantidad inicial añadida y la concentración que quedaba libre en el sobrenadante. Los resultados así obtenidos se muestran en la Tabla II.7.

Látex	Cantidad adsorbida ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ )	Área ocupada ( $\text{Å}^2/\text{molécula}$ )
JL1	$1.04 \pm 0.19$	$160 \pm 30$
JL2	$1.06 \pm 0.22$	$157 \pm 32$
JL3	$1.51 \pm 0.18$	$110 \pm 13$
JL4	$1.13 \pm 0.23$	$147 \pm 30$
JL7	$1.52 \pm 0.12$	$109 \pm 9$
JL8	$2.32 \pm 0.07$	$72 \pm 2$
JL10	$0.56 \pm 0.16$	$296 \pm 85$

Tabla II.7. Máximas cantidades de Tritón X-100 adsorbidas en los diferentes látex.

De estos resultados destacan principalmente los valores obtenidos con los látex JL8 y JL10. En función de la cantidad adsorbida podemos decir que el JL10 es el polímero más hidrófilo; su bajo grado de hidrofobicidad se debe a la presencia del comonomero HEMA en la

superficie de las partículas. Habrá gran cantidad de grupos hidroxilo, además de los carboxilos derivados de ellos por oxidación, capaces de interactuar con las moléculas de agua por puentes de hidrógeno. Todos los demás látex aniónicos son homopolímeros de estireno, por lo que deberían tener el mismo carácter hidrófobo. Sin embargo se diferencian en que en sus superficies hay diferentes grupos iónicos. En los látex aniónicos estos grupos son  $-\text{SO}_3^-$  o bien  $-\text{COO}^-$ . Teóricamente las partículas de mayor densidad superficial de carga, deberían ser algo más hidrófilas pues estos grupos aniónicos tienden a hidratarse. Sin embargo, basándonos en los resultados no podemos hacer una clasificación de estos látex en función de su grado de hidrofobicidad. El látex catiónico JL8 es, de acuerdo con el área ocupada por cada molécula de Tritón X-100, el de mayor carácter hidrófobo. La explicación de este hecho la encontramos en que a pesar de ser un látex de poliestireno como los anteriores, su grupo iónico superficial, (ver el iniciador ADMBA en el **Apéndice I**), se encuentra formando parte de un anillo orgánico y, por tanto, en un entorno más apolar que en el caso de los grupos sulfonato o carboxilo.

**Medidas de viscosidad.**

Otra técnica alternativa, aparte de la adsorción de proteínas, (fenómeno que está principalmente dirigido por interacciones de tipo hidrofóbico), nos lo proporciona las medidas de viscosidad de las muestras, pues con ellas se puede calcular el espesor de la capa de hidratación de las partículas, ya que esta propiedad está directamente relacionada con la hidrofiliidad de la superficie de las mismas.

Esta técnica es empleada por Suzawa y col [3,22] para poder conocer el espesor de la capa de poliHEMA que está extendida o solubilizada en la fase acuosa, y que esquematizamos en la Figura II.44.

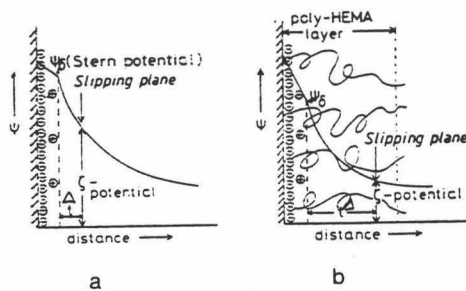


Fig. II.44. Representación esquemática de la doble capa eléctrica para superficies de (a) poliestireno y (b) de poli(estireno/HEMA).

La base teórica de estas experiencias se encuentra en la siguiente relación [23]

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = kv + k'v^2 C \quad (II.6)$$

donde  $\eta_{sp}$  es la viscosidad específica, que posteriormente definiremos,  $C$  es la concentración de soluto en g/ml,  $k$  es un factor numérico cuyo valor para partículas esféricas es 5/2 y  $v$  es el volumen específico del soluto en ml/g, que es igual a

$$v = \bar{v} + \delta \bar{v}_o \quad (II.7)$$

siendo  $v$  el volumen específico del soluto anhidro,  $v_o$  el del agua y  $\delta$  se corresponde con los gramos de agua que acompañan o mojan a cada gramo de soluto anhidro.

Si en vez de trabajar con la concentración en peso de soluto, trabajamos con la fracción de volumen ( $\phi$ ) ocupada por las partículas de látex en disolución, tendremos [3]

$$\frac{\eta_{sp}}{\phi} = kf + k''(kf)^2 \phi \quad (II.8)$$

donde  $f$  es un factor relacionado con la capa de hidratación de las partículas. El espesor de esta capa de hidratación ( $\Delta$ ) en una esfera será

$$\Delta = r \left[ \left( \delta \frac{\rho_s}{\rho_o} + 1 \right)^{1/3} - 1 \right] = r [f^{1/3} - 1] \quad (II.9)$$

donde  $r$  es el radio de la partícula,  $\rho_s$  es la densidad del sustrato (poliestireno  $\rho_s = 1.054$  g/ml) y  $\rho_o$  es la del disolvente (agua  $\rho_o = 0.997$  g/ml a 20°C).

El método de trabajo consiste en calcular la viscosidad específica en disoluciones de látex

a diferentes concentraciones ( $\phi$ ). Representando  $\eta_{sp}/\phi$  frente a  $\phi$ , obtendremos una línea recta cuya ordenada en el origen será "kf", y a partir de su valor podremos conocer el espesor  $\Delta$ .

El dispositivo empleado para obtener  $\eta_{sp}$  fue un viscosímetro automático AVS 310 (Schott Geräte) cuya célula de medida era un capilar Ubbelohde 0c. El parámetro que se mide en este dispositivo es el tiempo de paso de un fluido a lo largo del capilar. La viscosidad absoluta ( $\eta$ ) de un sistema es directamente proporcional al tiempo de medida y a la densidad de la disolución. Por ello, para calcular la viscosidad específica, que vale

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 = \frac{\eta_{dl}}{\eta_o} - 1 = \frac{t_{dl}\rho_{dl}}{t_o\rho_o} - 1 \quad (II.10)$$

(donde el subíndice *dl* se refiere a la disolución de látex y *o* al disolvente), lo que tendremos que medir será el tiempo de paso por el capilar del viscosímetro y las densidades de cada disolución; estas últimas medidas se realizaron con un densímetro DMA 58 (AD PAAR) cuya precisión es de  $10^{-5}$  g/ml.

Los resultados obtenidos con nuestros látex aparecen en las Figuras II.45-46.

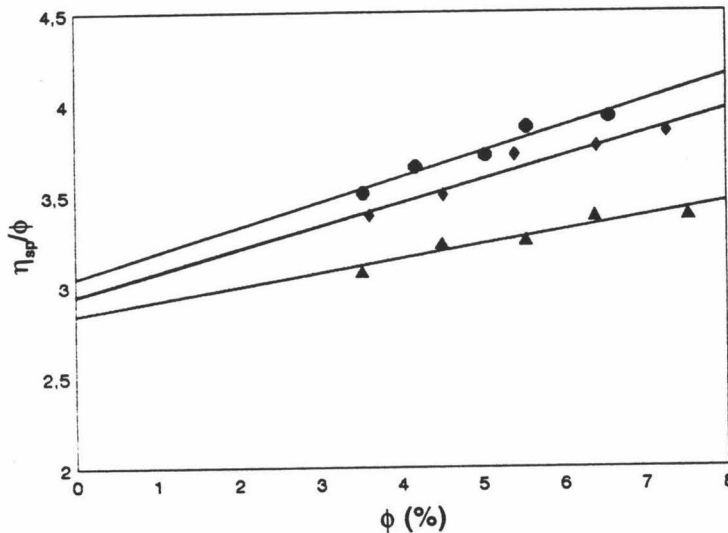


Fig. II.45. Relación entre  $\eta_{sp}/\phi$  y  $\phi$  para los látex JL1 (●), JL2 (◆) y JL10 (▲).

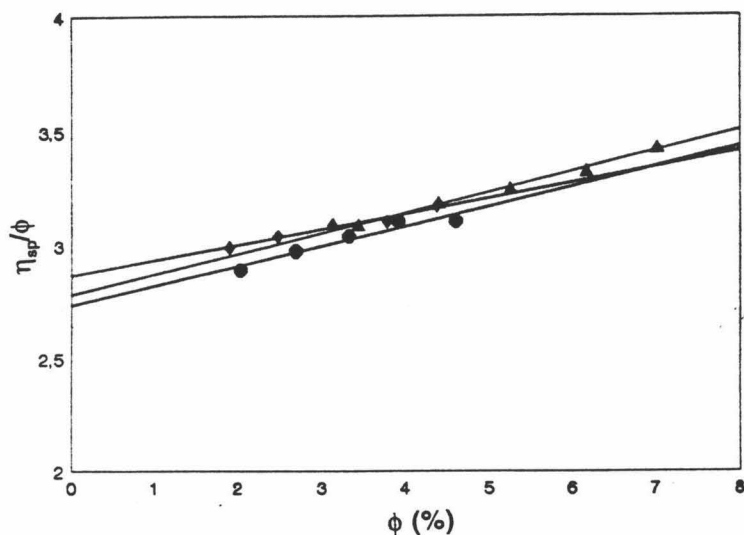


Fig. II.46. Relación entre  $\eta_{sp}/\phi$  y  $\phi$  para los látex JL3 (●), JL4 (◆) y JL7 (▲).

Debido a que el dato que nos interesa se obtiene de la ordenada en el origen, y por consiguiente el error que podemos cometer es considerable, decidimos duplicar las medidas, obteniendo los valores que aparecen en la Tabla II.8.

Látex	Orden. origen (kf)	$\Delta$ (nm)
JL1	$2.98 \pm 0.08$	$5.5 \pm 0.8$
JL2	$2.99 \pm 0.04$	$6.1 \pm 0.5$
JL3	$2.79 \pm 0.06$	$5.1 \pm 0.9$
JL4	$2.85 \pm 0.15$	$7.5 \pm 3.0$
JL7	$2.69 \pm 0.13$	$4.1 \pm 2.5$
JL10	$2.86 \pm 0.02$	$14.5 \pm 0.8$

Tabla II.8. Datos relativos a la capa de hidratación de las partículas ( $\Delta$ ) obtenidos por medidas de viscosidad.

Cuantitativamente, el valor obtenido no tiene demasiada lógica, pues si consideramos que el tamaño medio de una molécula de agua es del orden de 0.2 nm, el espesor de la capa de hidratación es superior, en todos los casos, a 20 monocapas moleculares de agua. Sin embargo, cualitativamente podemos ver que el mayor  $\Delta$  lo presenta el látex JL10 y cuyo valor sí es significativamente superior al resto de los látex, (que poseen  $\Delta$  bastante similares); este resultado vuelve a poner de manifiesto que el látex que presenta un menor grado de hidrofobicidad es el JL10, confirmando los resultados obtenidos mediante la adsorción del surfactante.

Para el látex catiónico JL8 fue imposible medir la viscosidad, pues sus partículas se adherían a las paredes del capilar de vidrio, atraídas posiblemente por la carga negativa de las paredes. Por ello, para el almacenamiento de este látex se utilizaron botellas de plástico para evitar la contaminación de su superficie con silicatos.

Para terminar presentamos a continuación una clasificación de los látex en función de su carácter hidrófobo.

mayor hidrofobicidad JL8 > JL1, JL2, JL3, JL4 y JL7 > JL10 menor hidrofobicidad

Sin embargo, sería imposible, según los resultados obtenidos, establecer un criterio para ordenar los látex sulfonatos y carboxílicos con respecto a su grado de hidrofobicidad.

## **II.6. CARACTERIZACIÓN ELECTROKINÉTICA.**

Cuando dos fases se ponen en contacto la región interfacial adquiere por lo general una carga eléctrica. Si nos centramos en nuestro caso, una de las fase es un sólido (polímero) y la otra es un líquido polar (agua). Cuando hay un exceso de iones o electrones en una o en las dos fases, debido, por ejemplo, a la presencia de grupos ionogénicos o disociables, hay una tendencia por parte de las cargas eléctricas a distribuirse de una forma no uniforme en la región proxima a la interfase. La distribución de iones libres en la fase líquida está gobernada por un balance entre las fuerzas eléctricas y la agitación térmica. La disposición de cargas en una fase (la sólida) y la distribución de las cargas en la otra fase (líquida) da lugar a lo que se conoce como la *doble capa eléctrica* (d.c.e.) en una interfase. Los fenómenos electrocinéticos aparecen cuando una de las fases es forzada a realizar un movimiento tangencial con respecto a la otra. En una clasificación clásica de éstos procesos electrocinéticos encontramos cuatro tipos principales, aunque existen otros fenómenos que

también pueden ser agrupados bajo el término "electrocinético" [24].

- a) Potencial de sedimentación: Está relacionado con el campo eléctrico que se produce cuando partículas cargadas se mueven en relación con un líquido estacionario.
- b) Potencial de flujo: Relacionado con el campo eléctrico generado cuando se hace pasar un líquido a través de una superficie estacionaria cargada.
- c) Electroforesis: Es el movimiento de una superficie cargada (generalmente partículas coloidales o macromoléculas) con respecto a un líquido estacionario cuando se aplica un campo eléctrico.
- d) Electroósmosis: Es el movimiento de un líquido con respecto a una superficie cargada estacionaria, bajo la acción de un campo eléctrico.

En el **Apéndice III** se describe de forma más detallada varios modelos que tratan sobre la estructura de la doble capa, así como las teorías que relacionan el potencial  $\zeta$  y la movilidad electroforética.

No obstante, definiremos también aquí el *potencial*  $\zeta$ , pues de él dependen los resultados obtenidos por cualquier medida electrocinética. Como dijimos anteriormente, en todo fenómeno electrocinético tiene lugar un movimiento tangencial de una fase con respecto a la otra. La experiencia demuestra que no todas las moléculas de líquido se comportan de la misma forma en el proceso; hay una transición entre la fluidez del disolvente que está situado lejos de la interfase y la fluidez (casi nula) de las moléculas que se encuentran en las proximidades de la misma. El plano imaginario situado en esta zona de transición se denomina plano de cizalladura o de deslizamiento, y potencial  $\zeta$  al potencial eléctrico en ese plano. Además de depender los fenómenos electrocinéticos del valor de este potencial, con él también están relacionados la estabilidad del sistema, su reología y otras propiedades de las dispersiones sólido-líquido.

Por ello es fundamental hacer un estudio electrocinético de nuestros sistemas. La técnica que hemos elegido para tal fin ha sido la electroforesis. Una partícula cargada se desplaza en el seno de un fluido con una velocidad  $v_e$  cuando en el medio se aplica un campo eléctrico de intensidad  $E$ . Se define la movilidad electroforética,  $\mu_e$ , como el coeficiente de proporcionalidad entre la primera y la segunda magnitud.

$$\mu_e = \frac{V_e}{E} \quad (II.11)$$

que, como se especifica en el **Apéndice III**, está estrechamente relacionada con el potencial  $\zeta$ .

El dispositivo experimental utilizado en la determinación de la movilidad electroforética ha sido el Zeta Sizer IV (Malvern Instruments). No creemos necesario explicar en esta memoria su funcionamiento, aunque sí diremos que para calcular la velocidad de las partículas, el dispositivo experimental se basa en 3 aspectos fundamentales: en la tecnología láser, en el efecto Doppler y en cálculos computacionales (para calcular funciones de autocorrelación similares a las que describimos en el **Apéndice II**, cuando hablamos de la dispersión elástica de luz).

Antes de llevar a cabo las medidas de movilidad electroforética hay que comprobar que éstas son reproducibles. Para ello hay que colocar la muestra en una concentración determinada y esperar un tiempo adecuado. Resultados previos [25,26] indican que es necesario utilizar concentraciones que tengan una cantidad aproximada de masa de polímero de  $5 \cdot 10^{-2}$  mg por ml de disolución, y esperar unos 20 minutos antes de realizar la medida. También hay que verificar que el dispositivo esté midiendo en las mismas condiciones, para ello se calibra con un látex estándar de movilidad conocida. Cada dato de movilidad es el resultado de cinco medidas experimentales. En todos los casos, el error de estos valores no es significativo en la representación gráfica de los mismos.

#### Efecto del pH.

Lo primero que se hizo fue estudiar la dependencia de la movilidad electroforética de los látex en función del pH, manteniendo en el medio una fuerza iónica baja y constante ( $I = 0.002$ ). La variación del pH provocará (o no) un cambio en el estado iónico de la superficie del látex, y puesto que sus grupos polares son de naturaleza ácido-base, su comportamiento electrocinético debe variar, (o bien permanecerá inalterado). Para mantener el pH se recurrió al uso de disoluciones tamponadoras o "buffers", en donde se incubaban las partículas de látex antes de proceder a la medida de su movilidad. Estos buffers fueron de acetato para los pHs 4 y 5, fosfato para pH 6 y 7, y borato para los pHs 8, 9 y 10. Sin embargo, el uso de iones fosfato y borato hace variar las características superficiales del látex catiónico, debido a la adsorción de estos iones sobre la superficie polimérica positiva [25]. Por esta razón, se recurrió al uso de otro tipo de sustancias tamponadoras para controlar el pH de las disoluciones donde se incuban partículas del látex JL8. Estos nuevos tampones fueron de



BIS-TRIS (bis (2 - hidroxietil) imino - tris (hidroximetil) metano) para el pH 6 y 7, TRIS (tris (hidroximetil) amino metano) para los pHs 8 y 9, y AMP (2 amino - 2 metil - 1 propanol) para el pH 10; todos ellos suministrados por la casa comercial Sigma. Los resultados de la movilidad electroforética de los látex en función del pH del medio, aparecen en las Figuras II.47-50.

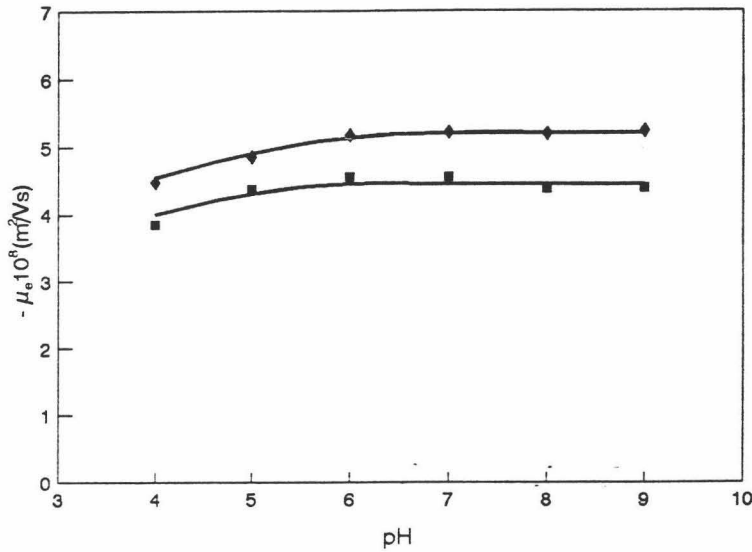


Fig. II.47. Movilidad electroforética de los látex JL1 (◆) y JL2 (■) frente al pH.

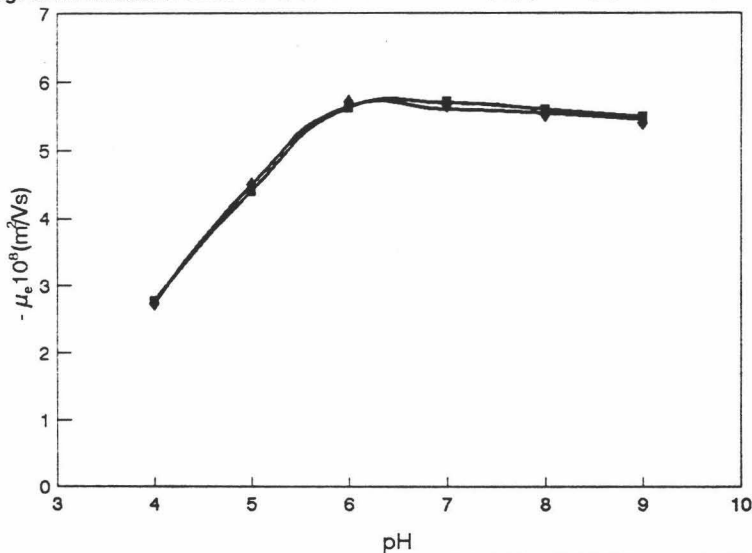


Fig. II.48. Movilidad electroforética de los látex JL3 (◆) y JL4 (■) frente al pH.

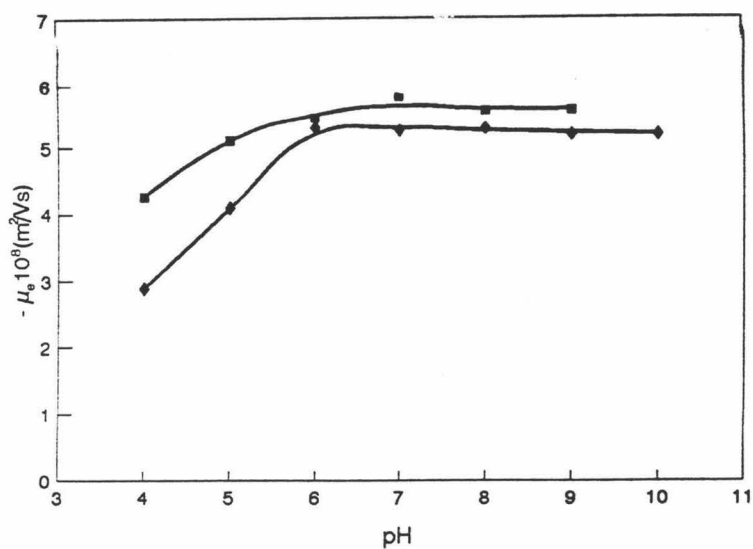


Fig. II.49. Movilidad electroforética de los látex JL7 (◆) y JL10 (■) frente al pH.

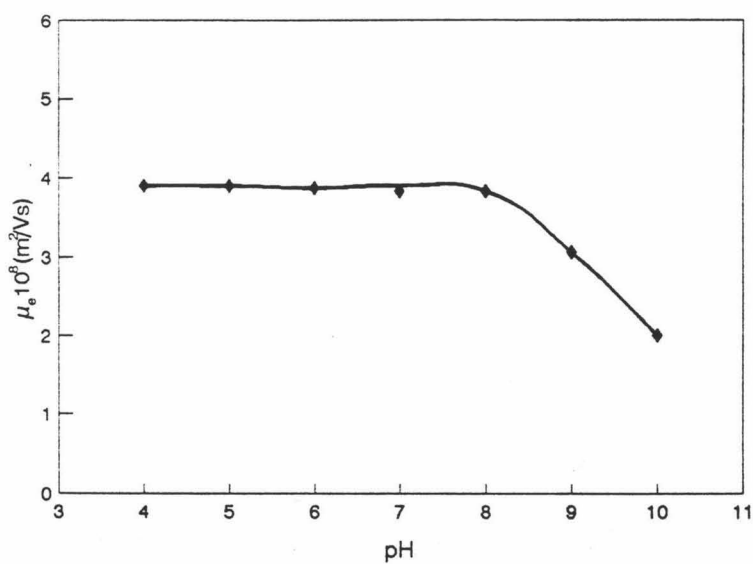


Fig. II.50. Movilidad electroforética del látex JL8 frente al pH.

En estas gráficas observamos que el valor de  $\mu_e$  varía en función del grado de protonación de la superficie del látex. Así, la movilidad electroforética es pH dependiente sólo en los látex con grupos ácido o base débiles. Sin embargo, debemos destacar que, en base a los valores absolutos de la movilidad, ésta es bastante insensible a la magnitud de las densidades superficiales de carga de los polímeros; por ejemplo, si comparamos entre sí los látex sulfonato (JL1 y JL2) o entre los carboxílicos (JL3, JL4 y JL7), a pesar de tener diferencias apreciables en  $\sigma_0$ , su movilidad es prácticamente la misma. Este hecho demuestra que la magnitud de la movilidad no depende del potencial superficial ( $\Psi_0$ ) derivado de  $\sigma_0$ , sino de la carga que existe en el plano de cizalladura, también llamada carga electrocinéticamente transportada ( $\sigma_{ek}$ ) relacionada con el potencial  $\zeta$ . En la Figura II.51 mostramos, para el látex JL4, cómo la densidad superficial de carga debe disminuir hasta (aproximadamente) la mitad de su valor máximo para que tenga lugar una disminución de  $\mu_e$  o de potencial  $\zeta$  [27].

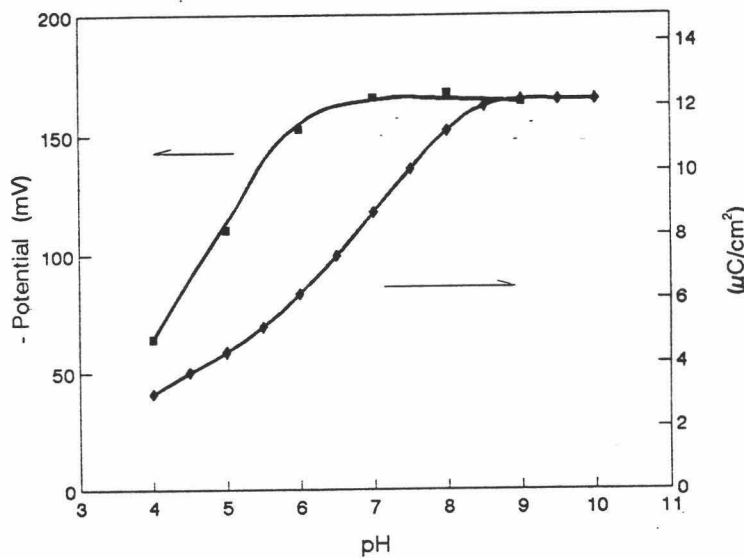


Fig. II.51. Variación del potencial  $\zeta$  (■) y de  $\sigma_0$  (◆) en función del pH para el látex JL4.

Sin embargo, a partir de la variación de la movilidad electroforética con el pH se puede obtener el valor del  $pK_a$  de los grupos ácido-base superficiales. Jacobasch [28] relaciona la concentración de protones cerca de la superficie del polímero con la concentración libre en disolución según:

$$[H^+] = [H^+]_d e^{-\left(\frac{e_0 \zeta}{KT}\right)} \quad (II.12)$$

y finalmente obtiene la relación

$$pK_a = pH_{\zeta/2} + \frac{e_0 \zeta_{\zeta/2}}{2.303 KT} \quad (II.13)$$

Por tanto, podemos calcular el valor de la constante de acidez de un ácido débil conociendo el pH al cual el potencial  $\zeta$  se reduce a la mitad de su valor máximo ( $pH_{\zeta/2}$ ), el valor de este potencial en ese punto ( $\zeta_{\zeta/2}$ ) y la temperatura de la disolución. Estos valores pueden obtenerse a partir de la gráfica que aparece en la Figura II.52, y los  $pK_a$  de nuestros látex calculados a partir de la ecuación II.13 aparecen en la Tabla II.9. La transformación de las medidas de movilidad en potencial  $\zeta$  (tanto en la Figura II.51 como en la II.52) se ha realizado usando la ecuación de Dukhin-Semenikhin (Ec A.III.29).

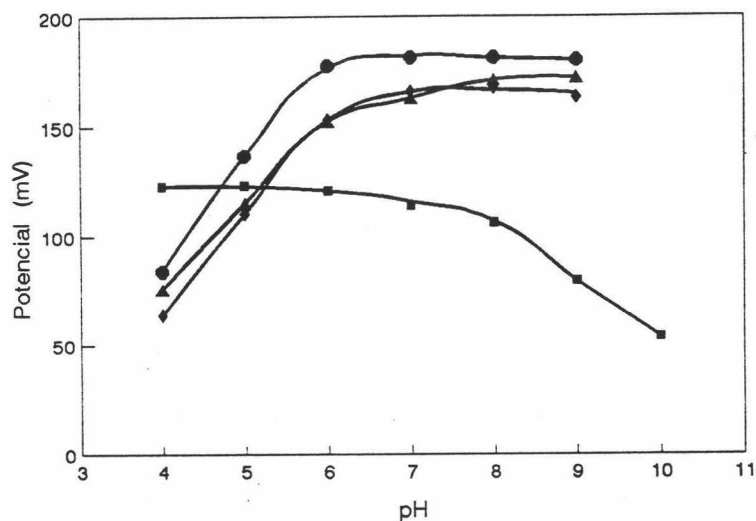


Fig. II.52. Dependencia del potencial  $\zeta$  con el pH para los látex JL3 (●), JL4 (◆), JL7 (▲) y JL8 (■).

Látex	pK <sub>a</sub>
JL3	5.6
JL4	5.7
JL7	5.7
JL8	8.7

Tabla II.9. Valores de pK<sub>a</sub> obtenidos a partir de los datos de la movilidad electroforética.

Si comparamos estos valores de pK<sub>a</sub> con aquellos que se obtuvieron de las valoraciones potenciométricas comprobaremos que los resultados son altamente concordantes.

### Efecto de la fuerza iónica.

La dependencia de la movilidad electroforética de los sistemas coloidales con la fuerza iónica origina, aún hoy en día, un punto de controversia entre los científicos de la física del estado coloidal, pues todavía no se ha encontrado una explicación satisfactoria que justifique de una forma clara los numerosos resultados experimentales obtenidos por diferentes autores. Teóricamente el potencial  $\zeta$  debería disminuir al aumentar la fuerza iónica del medio, debido a la compresión de la doble capa eléctrica, lo cual se traduciría en un descenso continuo de la movilidad. Sin embargo, las medidas de  $\mu_e$  de dispersiones de látex a diferentes concentraciones de una sal inerte, como puede ser el KBr, presentan siempre un máximo en el valor absoluto de esta movilidad. Los resultados obtenidos con nuestras muestras se representan en las Figuras II.53-56.

La posición del máximo depende principalmente del tipo de látex. Si comparamos entre nuestras partículas, es en los látex sulfonatados donde éste aparece a concentraciones mayores de KBr, ( $10^{-2}$  M para el JL1 y  $2 \cdot 10^{-2}$  M para el JL2). Centrándonos en estas dos muestras, el látex más cargado presenta el máximo más desplazado hacia posiciones mayores de electrolito; este hecho es característico en látex de esta naturaleza [9,13,14].

Sin embargo, para los látex carboxilos, el máximo se encuentra más atenuado y localizado a una concentración de KBr menor ( $2 \cdot 10^{-3}$  M) que en el caso de los látex sulfonatados, pese

a que los primeros (JL3, JL4 y JL7) tienen más carga que los segundos; otra característica que los diferencia es que la posición de este máximo no varía con  $\sigma_0$  en los carboxilados.

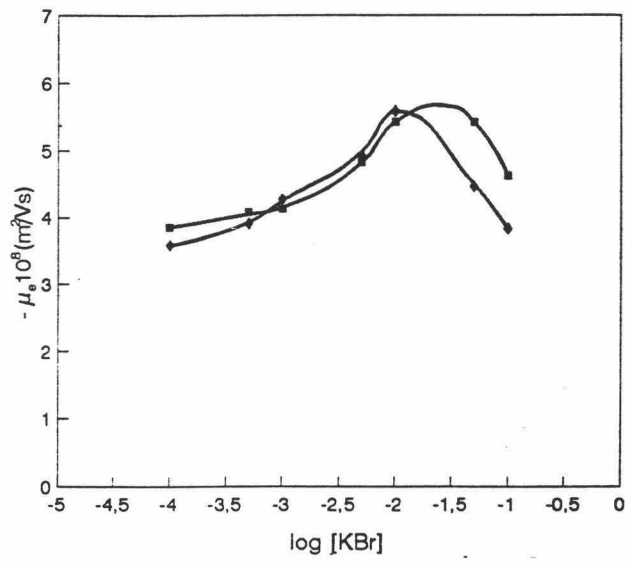


Fig. II.53. Movilidad electroforética de los látex JL1 (◆) y JL2 (■) frente a la fuerza iónica.

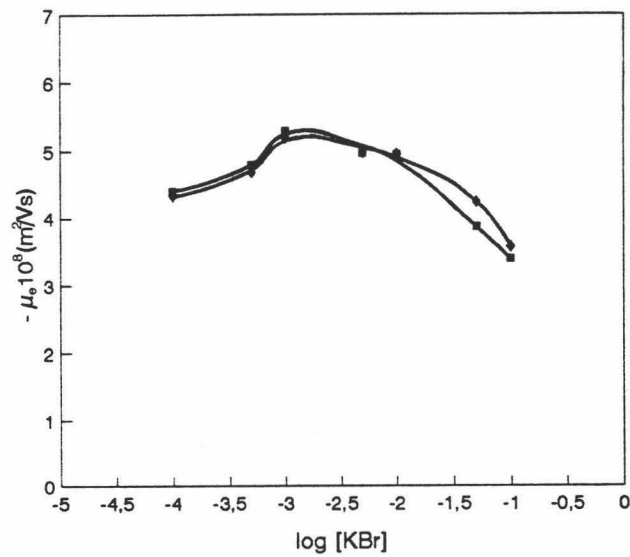


Fig. II.54. Movilidad electroforética de los látex JL3 (◆) y JL4 (■) frente a la fuerza iónica.

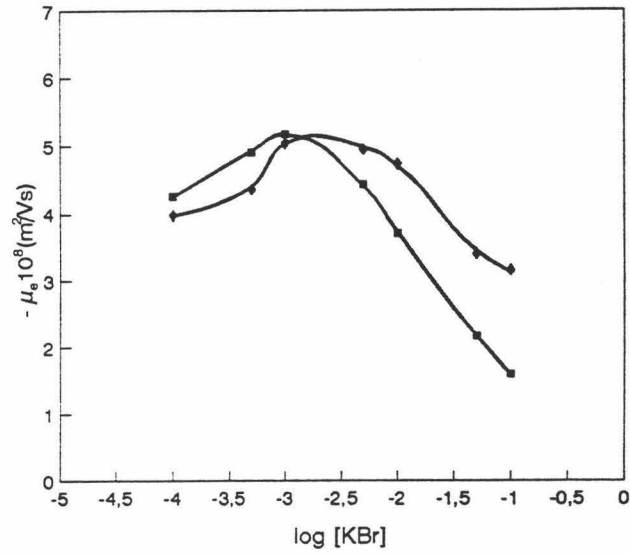


Fig. II.55. Movilidad electroforética de los látex JL7 (◆) y JL10 (■) frente a la fuerza iónica.

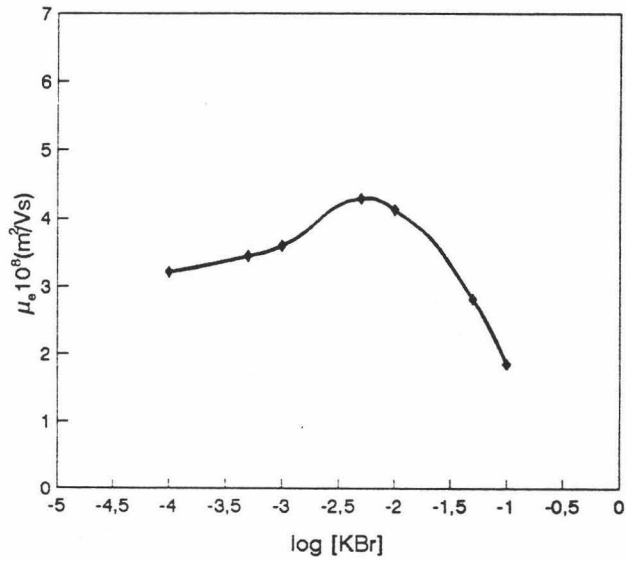


Fig. II.56. Movilidad electroforética del látex JL8.

El máximo del látex JL10, cuyas partículas tienen grupos sulfato, carboxilo e hidroxilo en superficie, está situado a una concentración más baja de electrolito ( $10^{-3}$  M), hecho que también se presenta en otros trabajos [6,22].

Por último, el látex catiónico JL8 presenta una dependencia similar a la de los látex carboxilados, pero con el máximo situado en  $5 \cdot 10^{-3}$  de KBr.

Todo este conjunto de resultados resulta difícil de explicar. Aunque nuestro trabajo no está centrado en el estudio de la movilidad de suspensiones de poliestireno, sí hemos realizado un esfuerzo por reunir en esta memoria las principales hipótesis que intentan explicar de una forma cualitativa este comportamiento anómalo de la movilidad de las disoluciones de partículas de poliestireno. Antes de comenzar, debemos decir que la aplicación de los diversos fenómenos electrocinéticos y las medidas de la conductividad y la constante dieléctrica de una misma suspensión de poliestireno conduce a la obtención de distintos valores de potencial  $\zeta$  [29]. Por ello, el uso de este tipo de partículas, enfocado a verificar la teoría electrocinética, ha fallado en numerosas ocasiones, por lo que los látex de poliestireno han dejado de ser considerados como sistemas electrocinéticos ideales o modelo [30,31]. Existen varias interpretaciones sobre la aparición del máximo de la movilidad que a continuación resumimos.

#### Adsorción preferencial de coiones.

Esta hipótesis está apoyada por ciertos autores, como Elimelech y O'Melia [17], Kamel y col. [32] o Zukoski y Saville [33,34], pero también existen varios trabajos que hacen cuestionar su veracidad [24,31]. El mecanismo que se propone para la explicación cualitativa del máximo en la movilidad consta de tres procesos competitivos:

- i) Neutralización de parte de la carga superficial por la adsorción de contraiones, que causa un descenso en el potencial electrocinético.
- ii) A medida que aumenta la fuerza iónica hay una aproximación de coiones hacia la superficie hidrofóbica, causando un aumento del potencial electrocinético.
- iii) Para altas concentraciones de electrolito se comprime la capa difusa de la d.c.e., haciendo disminuir el potencial electrocinético.

Estos procesos se esquematizan en la Figura II.57.

Un reciente trabajo de Dunstan [29] justifica sus resultados de las medidas de movilidad, de conductividad y de constante dieléctrica del medio, basándose en que una superficie hidrofoba actúa perturbando la estructura del agua causando una solvatación preferencial de un tipo de iones en la región interfacial, a la vez que produce una total exclusión del resto de



los iones en esa región. Esta interacción hidrofóbica puede tener un alcance de hasta 100 nm en la capa acuosa, aunque esto varía con la concentración de electrolito del medio.

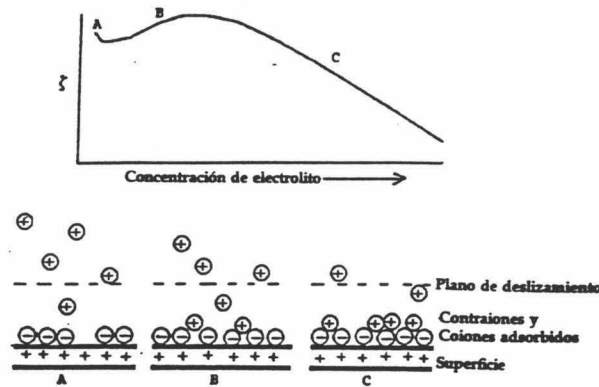


Fig. II.57. Mecanismo de adsorción preferencial de coiones.

Capa de polielectrolitos extendida hacia la fase acuosa: "hairy layer".

El mecanismo en que se basa esta hipótesis es que la superficie del polímero no es completamente lisa. Es lógico pensar que ciertas cadenas de polímero con grupos cargados (polielectrolitos) se encuentran en contacto con la fase polar. A baja fuerza iónica, estas cadenas tienden a repelerse entre ellas por tener igual carga, extendiéndose hacia la fase acuosa, desplazando así el plano de cizalladura y provocando que el potencial electrocinético sea menor. A medida que aumenta la fuerza iónica, se va apantallando esta repulsión entre las cadenas de polielectrolito, que se irán replegando sobre la superficie, con lo que el plano de cizalla se aproxima hacia la interfase aumentando el potencial. Finalmente, un mayor aumento de la fuerza iónica provocará la compresión de la doble capa y la movilidad electrocinética decrecerá, tal y como predice la teoría. Los procesos involucrados en este mecanismo se representan en la Figura II.58.

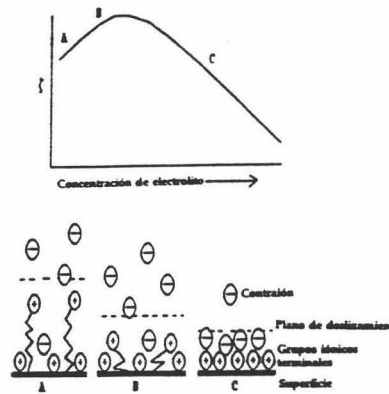


Fig. II.58. Mecanismo de "hairy layer".

Esta hipótesis, apoyada por ciertos autores [31,35,36,37], ha sido bastante cuestionada por otros estudios que parecen demostrar su invalidez [13,17,29,38]. De hecho, una reciente teoría que trata sobre la movilidad electroforética de partículas con cadenas de polielectrolito en su superficie, desarrollada por Ohshima y Kondo [39,40] y de la que hablaremos en el siguiente capítulo, predice un descenso continuo de la  $\mu_e$  con el aumento de la concentración de electrolito del medio.

Conducción superficial anómala.

Sobre este mecanismo se habla de manera más extensa en el **Apéndice III**. Haciendo un breve comentario, podemos decir que la aparición del máximo en la movilidad no se corresponde con un valor máximo en el potencial  $\zeta$ . En un proceso electroforético podemos distinguir dos mecanismos diferentes de conducción eléctrica de iones: i) una conducción superficial asociada con la transferencia tangencial de cargas a través de la porción más fluida de la d.c.e.; y ii) una conducción superficial anómala relacionada con el movimiento tangencial de cargas en la capa comprendida entre el plano de cizalladura y la superficie sólida.

Según este mecanismo, a bajas fuerzas iónicas mayor es la distancia entre la interfase sólido/líquido y el plano de desplazamiento, por lo que se dará esta conducción superficial anómala en mayor medida, provocando una disminución de la  $\mu_e$  de las partículas con

respecto a otra fuerza iónica ligeramente superior. Una vez alcanzado el máximo, el efecto de la compresión de la d.c.e. cobra cada vez más importancia y empezará a disminuir  $\mu_e$  al aumentar la concentración de electrolito del medio.

Sin embargo, en base a estos mecanismos expuestos, no podemos explicar de una forma intuitiva todos los resultados obtenidos con nuestros látex. Lo único que podemos decir es que la dependencia de  $\mu_e$  con la fuerza iónica está influenciada por la naturaleza de los grupos polares superficiales, pero es casi insensible a la cantidad de estos grupos que hay por partícula ( $\sigma_0$ ). Para llegar a conclusiones definitivas se debería complementar la electroforesis con otras técnicas electrocinéticas, realizando más estudios con otras especies iónicas (aparte del KBr) y planteando diversas estrategias de trabajo con las que no vamos a entrar en discusión.

La transformación de los datos de movilidad en potencial  $\zeta$  se realizaron en base a las teorías de Smoluchowski (Ec A.III.16), O'Brien y White, y Dukhin y Semenikhin (Ec A.III.29). Como veremos en las Figuras II.59-65, sólo el uso de esta última teoría, que considera la conducción superficial anómala, hace desaparecer el máximo en el valor del potencial  $\zeta$  para todos los látex, excluyendo los carboxilatados. En estas gráficas se representa en el eje "x" el radio electrocinético  $ka$ , (siendo  $a$  el radio de la partícula y  $\kappa$  la inversa de la longitud de la d.c.e.), que es un parámetro representativo de la fuerza iónica del medio, ya que  $\kappa$  crece con la raíz cuadrada de la concentración de electrolito (Ec. A.III.8).

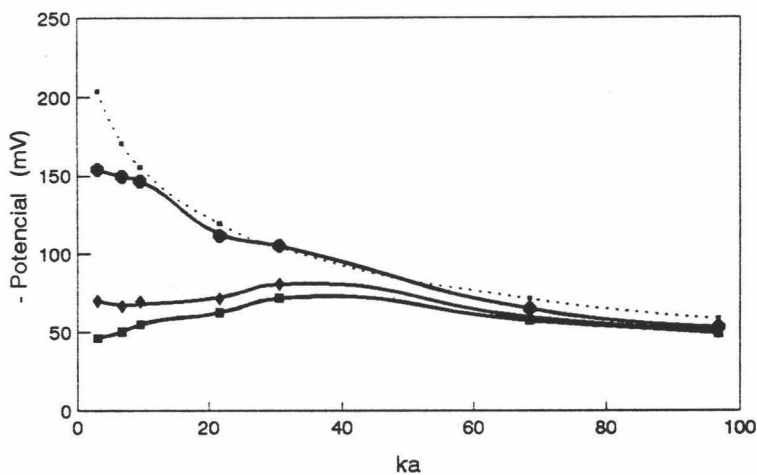


Fig.II.59. Potenciales  $\zeta$  y difuso (.) en función del radio electrocinético para el látex JL1 con KBr. Smoluchowski (■), O'Brien y White (◆) y Dukhin y Semenikhin (●).

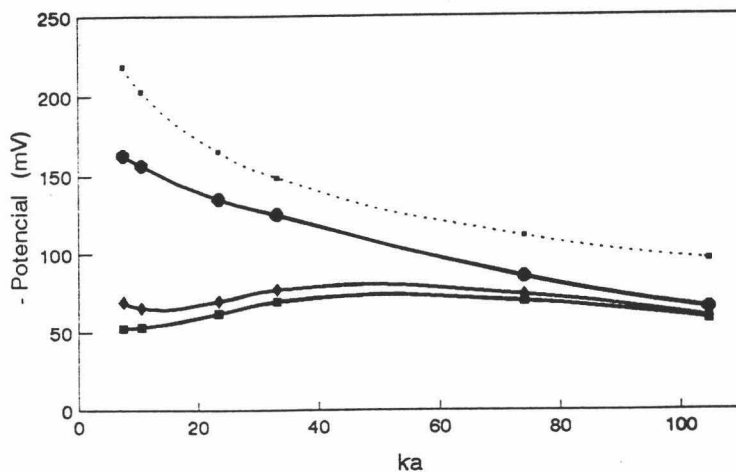


Fig.II.60. Potenciales  $\zeta$  y difuso (.) en función del radio electrocinético para el látex JL2 con KBr. Smoluchowski (■), O'Brien y White (◆) y Dukhin y Semenikhin (●).

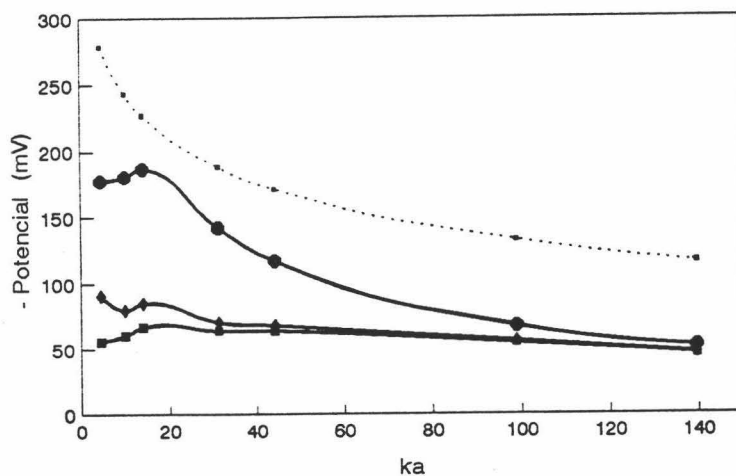


Fig.II.61. Potenciales  $\zeta$  y difuso (.) en función del radio electrocinético para el látex JL3 con KBr. Smoluchowski (■), O'Brien y White (◆) y Dukhin y Semenikhin (●).

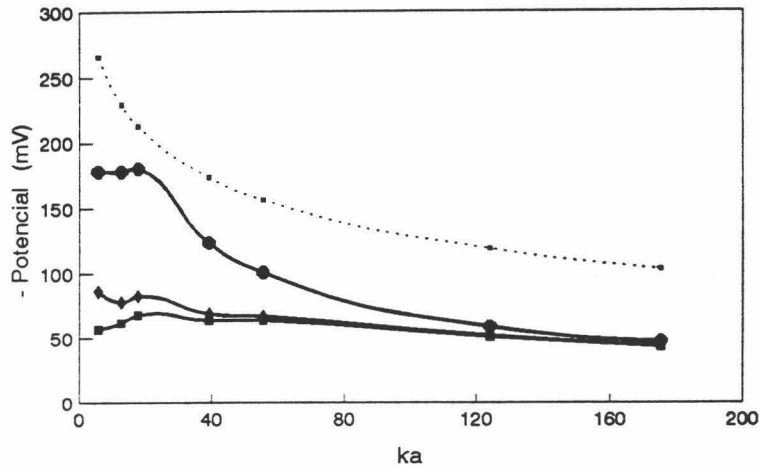


Fig.II.62. Potenciales  $\zeta$  y difuso (.) en función del radio electrocinético para el látex JL4 con KBr. Smoluchowski (■), O'Brien y White (◆) y Dukhin y Semenikhin (●).

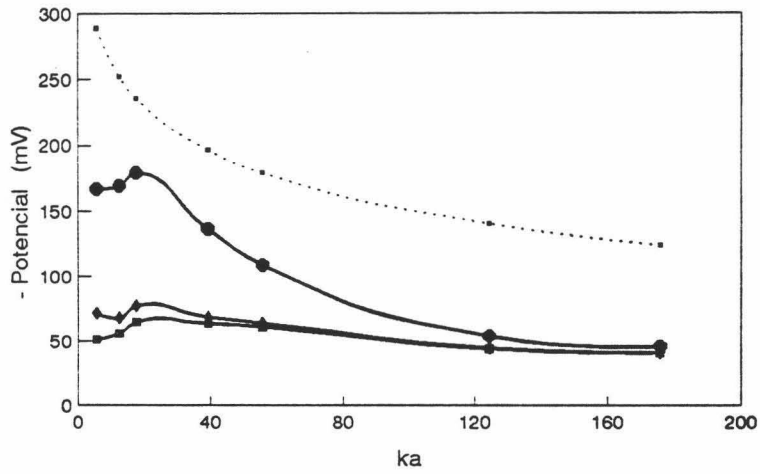


Fig.II.63. Potenciales  $\zeta$  y difuso (.) en función del radio electrocinético para el látex JL7 con KBr. Smoluchowski (■), O'Brien y White (◆) y Dukhin y Semenikhin (●).

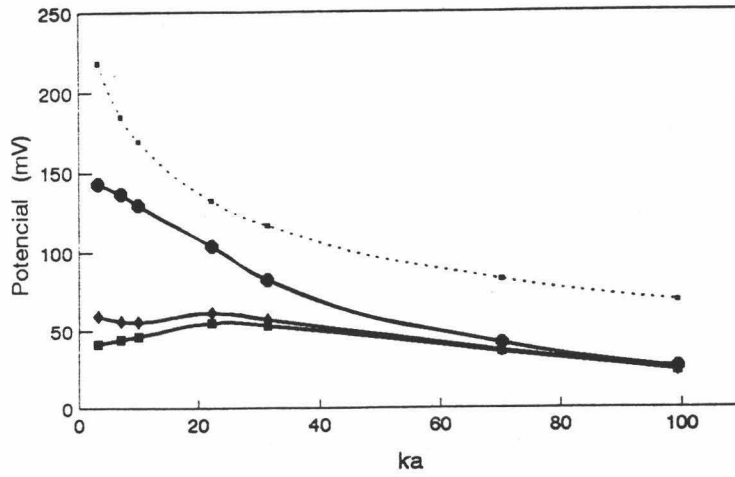


Fig.II.64. Potenciales  $\zeta$  y difuso (.) en función del radio electrocinético para el látex **JLB** con KBr. Smoluchowski (■), O'Brien y White (◆) y Dukhin y Semenikhin (●).

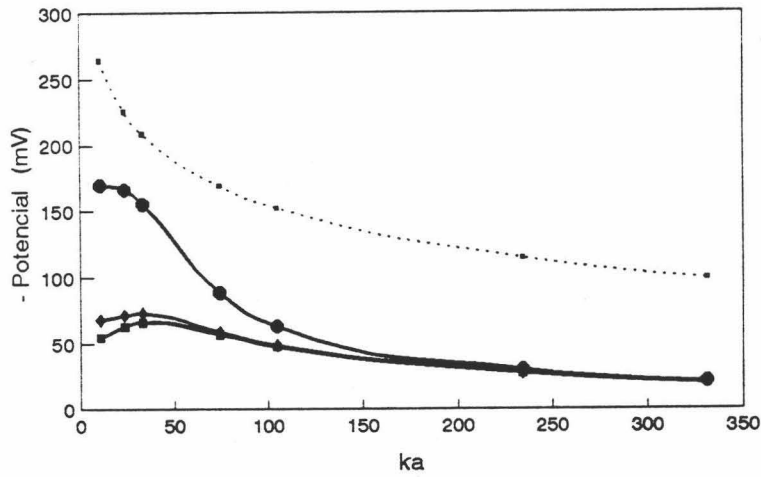


Fig.II.65. Potenciales  $\zeta$  y difuso (.) en función del radio electrocinético para el látex **JL10** con KBr. Smoluchowski (■), O'Brien y White (◆) y Dukhin y Semenikhin (●).

Como se puede ver, en todos los látex (menos en el JL1) siempre hay una diferencia entre el potencial difuso ( $\Psi_d$ ) y el potencial  $\zeta$ . Recordamos que  $\Psi_d$  es el potencial eléctrico asociado al plano exterior de Helmholtz, y el cálculo de su dependencia con  $\kappa$  se ha realizado en base a la ecuación A.III.14, previo conocimiento de la densidad superficial de carga de los látex, la cual se considera constante e independiente de la concentración de electrolito del medio; para realizar dicho cálculo se ha tenido que hacer la aproximación de que el potencial  $\Psi_0$  se corresponde con  $\Psi_d$  y es éste el que varía con  $\kappa$ . En los coloides modelo ambos potenciales deben tender a coincidir conforme aumenta la fuerza iónica. Sin embargo, existe en nuestros látex una diferencia casi constante. La explicación de este hecho se basa en la consideración de una capa de moléculas de agua, de espesor  $\Delta$  y con muy baja movilidad hidrodinámica, localizada en las proximidades de la superficie sólida. Las razones que justifican la existencia de esta capa de agua de baja fluidez están basadas en la rugosidad de la superficie polimérica [41] o en el efecto electroviscoso [42], según el cual hay un aumento en la viscosidad de un líquido polar al aplicar sobre él un campo eléctrico; el campo creado por la d.c.e. sería el responsable del incremento de  $\eta$  en las proximidades de la superficie. Sin embargo, la existencia de esta capa de agua estacionaria no está en contradicción con que los iones presentes en ella posean una alta movilidad, fenómeno responsable de la conducción superficial anómala [43].

El espesor de esta capa de hidratación puede calcularse a partir de la ecuación de Eversole y Boardman [44]:

$$\ln \tanh\left(\frac{ze\zeta}{4kT}\right) = \ln \tanh\left(\frac{ze\Psi_d}{4kT}\right) + \kappa \Delta \quad (\text{II.14})$$

Si representamos el primer término de la ecuación frente a  $\kappa$ , obtendremos una línea recta de pendiente  $\Delta$ . Esta representación se muestra en la Figura II.66 para todos nuestros nuestros látex.

Lo cierto es que el espesor de esta capa de agua con baja movilidad hidrodinámica varía con la fuerza iónica y quizás sería erróneo linealizar la anterior ecuación; por ello, si representamos el espesor  $\Delta$  frente a  $\kappa$  (Figura II.67) podremos sacar un valor medio de  $\Delta$  a partir de las disoluciones de mayor concentración de electrolito, donde este valor sí se

estabiliza.

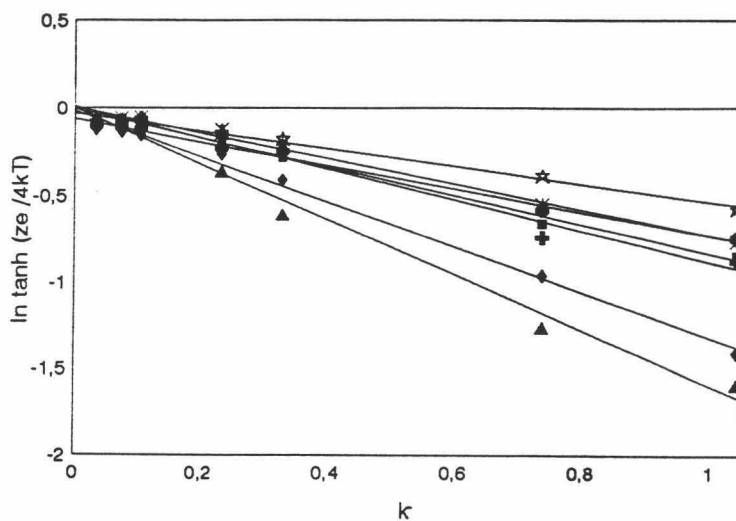


Fig. II.66. Presentación de la ecuación de Eversole y Boardman para los látex JL1 (●), JL2 (★), JL3 (\*), JL4 (■), JL7 (+), JL8 (◆) y JL10 (▲).

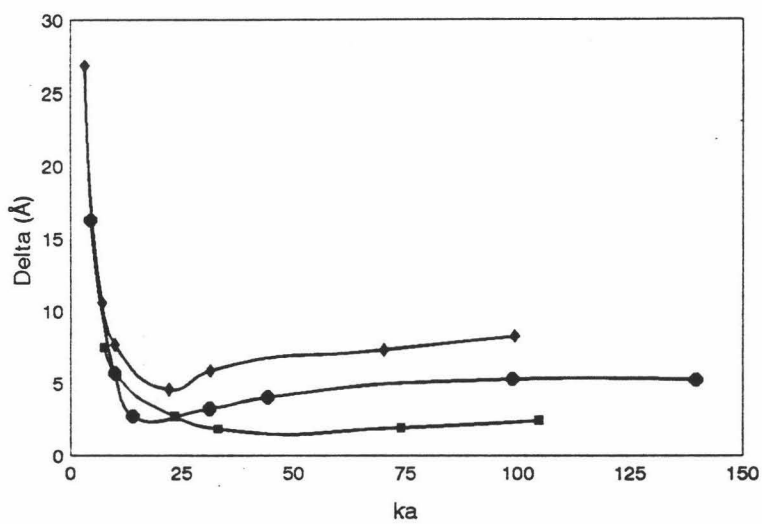


Fig. II.67. Variación de  $\Delta$  con el radio electrocinético para los látex JL2 (●), JL3 (■) y JL8 (◆).



Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla II.10.

Látex	$\Delta_{(\text{regresión lineal})}$ (Å)	$\Delta_{(\text{valor medio})}$ (Å)
JL1	6	1
JL2	5	2
JL3	7	4
JL4	8	5
JL7	9	5
JL8	13	7
JL10	16	14

Tabla II.10. Valor del espesor de la capa de agua de baja fluidez que rodea a las partículas.

Estos resultados son comparables con otros datos que, sobre este espesor, dan autores como Midmore y Hunter [31] ( $\Delta \approx 0.5$  nm en látex de poliestireno) o Israelachvili [45] ( $\Delta \approx 0.2$  nm en partículas de mica). Cualitativamente se puede comparar estos valores con los obtenidos por viscosidad, y como se puede comprobar, los resultados son bastante concordantes. Volvemos a obtener para el látex JL10 el mayor valor de la capa de hidratación. Con el látex JL8 sólo hemos conseguido información sobre  $\Delta$  por éste método; como se ve, posee un valor relativamente alto si consideramos que es el látex más hidrófobo. Se podría explicar este dato basándonos en que la fuerte interacción hidrofóbica estructure el agua alrededor de la partícula, de manera que su fluidez disminuya enormemente, quedando esta capa de agua adherida a la superficie; esta interacción hidrófoba difiere de las fuerzas de solvatación responsables de la capa de líquido estacionario que rodea a las superficies hidrófilas.

## II.7. ESTABILIDAD COLOIDAL

Las dispersiones coloidales podemos clasificarlas en dos grupos diferentes: a) el primero lo constituyen los coloides liofílicos (hidrofílicos en el caso de que el agua sea el disolvente) los cuales se forman espontáneamente, bien a partir de unidades menores, por ejemplo micelas de surfactantes creadas a partir de la agrupación de un determinado número de dichas moléculas, o bien pueden tener un origen biológico, como serían las disoluciones de proteínas globulares. Tales dispersiones son termodinámicamente (e indefinidamente) estables. b) El segundo grupo está constituido por los llamados coloides liofóbicos, los cuales no se forman espontáneamente sino que se crean usando diversas estrategias hasta que alcanzan un tamaño coloidal. Esto lo podemos conseguir, por ejemplo, subdividiendo ciertos sistemas macroscópicos o bien haciendo crecer partículas pequeñas por adición de moléculas de bajo peso molecular (como sería el caso de la polimerización); ejemplos de este tipo serían dispersiones de oro, de ioduro de plata, látex, tintes, etc. Todos ellos son termodinámicamente inestables como consecuencia del efecto Kelvin [46], también llamado efecto de maduración de Ostwald, que hace más solubles a las partículas pequeñas que a las grandes. Por tanto las partículas de estos coloides liofóbicos tienden a agregarse, ya sea por un proceso de coagulación o de floculación, a menos que haya un mecanismo de repulsión lo suficientemente fuerte como para mantener las partículas bien separadas unas de otras. El término **estabilidad coloidal** se aplica generalmente a los mecanismos que evitan este tipo de agregación.

La tendencia a la agregación está causada por atracciones de tipo London - van der Waals entre las partículas. Como comentaremos más adelante, son de largo alcance entre cuerpos macroscópicos. La repulsión que se necesita para contrarrestar esta atracción tiene su principal origen en la carga eléctrica de la superficie de las partículas, o mejor dicho (teniendo en cuenta la electroneutralidad de la disolución), en el efecto de una doble capa eléctrica de suficiente fuerza y extensión.

### Teorías de estabilidad coloidal

Hamaker [47] y de Boer [48] fueron los primeros autores que establecieron una teoría de estabilidad para los coloides hidrofóbicos teniendo en cuenta únicamente el balance de fuerzas que aparece entre las interacciones atractivas de van der Waals y la repulsión eléctrica de la doble capa. De los tres tipos de interacciones de van der Waals, es decir, *orientación* dipolo -dipolo (Keesom), interacción dipolo permanentemente - *dipolo inducido*

(Debye) e interacción de *dispersión* de London (dipolo fluctuante - dipolo inducido), sólo esta última tiene importancia en las interacciones entre cuerpos macroscópicos de sistemas condensados [49,50]. Hamaker, en el desarrollo de su teoría, demostró que el carácter aditivo de estas interacciones daba lugar a un efecto atractivo de mayor alcance; así por ejemplo, si entre dos átomos simples esta interacción decae con la distancia de la forma  $r^{-6}$ , entre cuerpos macroscópicos decae con  $r^{-2}$  (o con  $r^{-3}$  para distancias mayores) [49]. Estas teorías fueron posteriormente ampliadas por Derjaguin y Landau [51], e independientemente, por Verwey y Overbeek [52,53]. La teoría general de estabilidad coloidal creada por la combinación de los trabajos de estos cuatro autores es conocida como la **teoría DLVO**.

Los principios básicos en los que se basa son:

i) La energía libre de interacción ( $V$ ) entre dos partículas consta de un término atractivo ( $V_A$ ) y otro repulsivo ( $V_R$ ) de tal forma que

$$V = V_A + V_R \quad (II.15)$$

ii) La interacción atractiva decae con la distancia entre la superficie de las partículas ( $H$ ), a través de la inversa de una potencia de la misma, es decir, de la forma  $H^{-n}$ . La expresión más simple de la energía de interacción, por unidad de área, es

$$V_A = - \frac{A}{12 \pi H^2} \quad (II.16)$$

donde  $A$  es la constante de Hamaker; ( $A = \pi^2 N^2 B$ , [54], siendo  $B$  la constante de London y  $N$  la densidad de moléculas por unidad de material). Por lo tanto, esta constante sólo depende de la naturaleza del material.

iii) Considerando el modelo de d.c.e. de Gouy-Chapman, con un potencial superficial  $\Psi_0$ , la energía de repulsión, por unidad de área, viene dada por

$$V_R = 2 \pi \epsilon \epsilon_0 \left( \frac{4kT}{ze} \gamma_0 \right)^2 e^{-\kappa H} \quad (II.17)$$

siendo  $\kappa$  la inversa de la longitud de Debye de la d.c.e. (ecuación A.III.),  $\epsilon_0$  la permitividad del vacío,  $\epsilon$  la constante dieléctrica del medio y  $\gamma_0$  se define como

$$\gamma_0 = \tanh\left(\frac{ze\Psi_0}{4kT}\right) \quad (II.18)$$

Como vemos, la repulsión decae exponencialmente con  $-\kappa H$ , donde  $\kappa$  es proporcional a  $zc^{1/2}$  (siendo  $z$  la carga del electrolito y  $c$  la concentración del mismo). Por tanto, la energía libre de interacción  $V$  entre 2 partículas puede expresarse en función de la distancia entre las mismas, tal y como se muestra en la Figura II.68a. En este gráfico aparece un máximo de potencial a una determinada distancia; si por agitación térmica estas partículas tienen la energía suficiente como para superar esta barrera de energía ( $\Delta V_{max}$ ), podrán acercarse hasta distancias muy próximas, donde se sitúa el mínimo primario; en este mínimo primario las fuerzas atractivas de van der Waals son contrarrestadas por la repulsión de Born (de muy corto alcance, pues decae con  $H^{-12}$ )

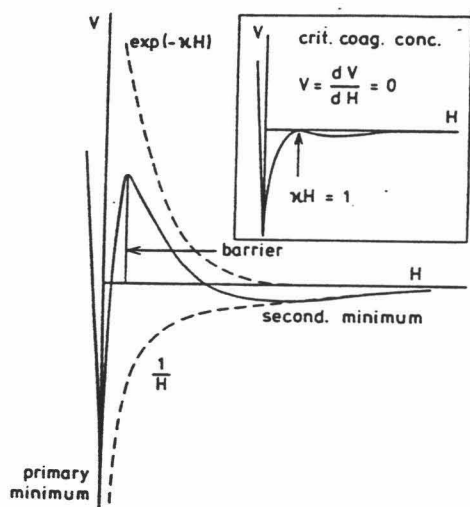


Fig. II.68. (a) Energía libre de interacción entre dos partículas. (b) Situación en la C.C.C.

Cuando las partículas quedan situadas en el primer mínimo se dice que el sistema ha sufrido una **coagulación**. Si las partículas poseen una energía térmica inferior a la profundidad del mínimo secundario ( $\Delta V_{min}$ ) el sistema se agregará y la distancia media entre las partículas

será  $H_{\min}$ ; este proceso de agregación se conoce como **floculación**. Es relativamente fácil redispersar las partículas de un sistema coloidal que se encuentra floculado; sin embargo, el proceso de coagulación es difícilmente invertible.

Conforme va aumentando la concentración de electrolito del medio se comprime la d.c.e. y, por tanto, la repulsión electrostática entre las partículas será menor, con lo que la barrera de energía disminuye. A la concentración de electrolito en la que  $V = 0$  y  $dV/dH = 0$  (Figura II.68b) se le conoce como concentración crítica de coagulación (C.C.C.). Para concentraciones de sal iguales o mayores a la C.C.C., todos los choques que se produzcan entre las partículas darán lugar a agregados. Esta situación, donde la velocidad del proceso de agregación está limitada por la difusión de las partículas, se conoce como **DLCA**, y difiere del proceso de agregación que pudiera darse a menores concentraciones de electrolito, donde no todas las aproximaciones entre las partículas originan agregados, mecanismo conocido como **RLCA** (agregación limitada por la velocidad de reacción).

Fuchs [55] introdujo un factor que considera la efectividad de los choques entre las partículas. Se conoce como *factor de estabilidad* ( $W$ ) y es igual a la inversa del factor de eficiencia de la colisión ( $\alpha$ ). Para la C.C.C.  $W$  valdrá 1 y para disoluciones de electrolito menores, el factor de estabilidad será mayor que la unidad.

Todo proceso de agregación posee una cinética determinada. Smoluchowski propuso que la velocidad de desaparición de las partículas individuales para dar dímeros viene dada por

$$-\frac{dN}{dt} = kN_0^2 \quad (\text{II.19})$$

donde  $N_0$  es la concentración inicial de partículas y  $k$  es la constante de velocidad. En ausencia de barrera de potencial, la velocidad de coagulación viene determinada por la difusión browniana y  $k$  vendrá dada por la ecuación de Smoluchowski [56]

$$k = k_R = 8\pi Da \quad (\text{II.20})$$

siendo  $a$  el radio de la partícula,  $D$  el coeficiente de difusión de la misma;  $k_R$  es la constante de velocidad en condiciones DLCA (o coagulación rápida). Para las condiciones RLCA

definiremos una constante de velocidad  $k_L$ , donde el subíndice  $L$  nos indica que la agregación se produce de una forma más lenta. En este momento estamos en condiciones de definir el factor de estabilidad de Fuchs como

$$W = \frac{1}{\alpha} = \frac{k_R}{k_L} \quad (II.21)$$

Verwey y Overbeek relacionaron  $W$  con la energía de interacción entre las partículas, a través de [52]

$$W = 2a \int_0^{\infty} \frac{e^{(V/KT)}}{(2a+H)^2} dH \quad (II.22)$$

donde todos los parámetros que aparecen ya han sido definidos previamente.

Aplicando las condiciones  $V = (dV/dH) = 0$  a las ecuaciones II.15, II.16 y II.17 se puede llegar fácilmente a la expresión que que nos liga la C.C.C. con la constante de Hamaker y el parámetro  $\gamma_0$

$$C.C.C. = \frac{3^2 2^{11} (4\pi\epsilon\epsilon_0)^3 (kT)^5 \exp(-4)}{\pi e^6} \frac{\gamma_0^4}{A^2 z^6} \quad (II.23)$$

En este momento deberíamos detenernos en explicar las estrategias experimentales empleadas para conocer estos datos característicos de la estabilidad de nuestros sistemas coloidales. Como vimos en la ecuación (II.21), podremos conocer  $W$  a partir de la razón entre las constantes de agregación rápida y lenta. Un método experimental ampliamente utilizado en el seguimiento de los procesos de aglutinación es el que estudia la variación de la turbidez ( $\tau$ ) o la absorbancia (Abs) del sistema con el tiempo [49]. Un ejemplo de estas experiencias lo tenemos en la Figura II.69.

$$W = \frac{k_R}{k_L} = \frac{(d\tau/dt)_{Rápida}}{(d\tau/dt)_{Lenta}} = \frac{(dAbs/dt)_{Rápida}}{(dAbs/dt)_{Lenta}} \quad (II.24)$$

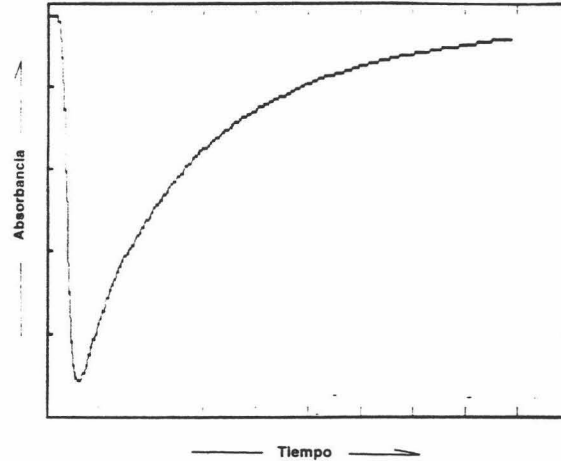


Fig. 69. Variación de la absorbancia de una disolución de látex con el tiempo en un proceso de coagulación.

Se parte de una disolución de látex a baja fuerza iónica ( $I = 0.002$ ) tamponada a un pH determinado. Sobre ella se añade un volumen de una disolución que contiene una cierta concentración de electrolito; en nuestro caso éste siempre ha sido el KBr. Debido al efecto de dilución, la absorbancia inicial del sistema disminuye rápidamente. A continuación la turbidez de la muestra empieza a aumentar de forma lineal, debido a la formación de dímeros. La pérdida de linealidad se debe a la formación de agregados con mayor número de monómeros. Como lo que nos interesa medir es la constante de formación de dobletes (ec. (II.19)), lo que se hace es medir la pendiente inicial de esta curva de agregación.

Si repetimos el experimento para varias concentraciones de electrolito, esta pendiente irá variando hasta que alcanza un valor máximo en la C.C.C. (Figura II.70a). El factor de estabilidad se podrá calcular para cada concentración de electrolito ( $C_e$ ) con tal de dividir la  $(dAbs/dt)$  encontrada para la C.C.C. por la obtenida para cada  $C_e$ . Reerink y Overbeek [57] demostraron, introduciendo varias aproximaciones, que existe una relación lineal entre el  $\log W$  y el  $\log C_e$  para valores iguales o inferiores a la C.C.C.

$$\log W = -k' \log C_e + \log k'' \quad (II.25)$$

donde  $k'$  y  $k''$  son constantes. Este hecho se muestra en la Figura II.70b, cuyos datos fueron obtenidos con un látex sulfato de la casa comercial Rhône Poulenc ( $d = 300 \text{ nm}$  y  $\sigma_0 = 6.9 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ ).

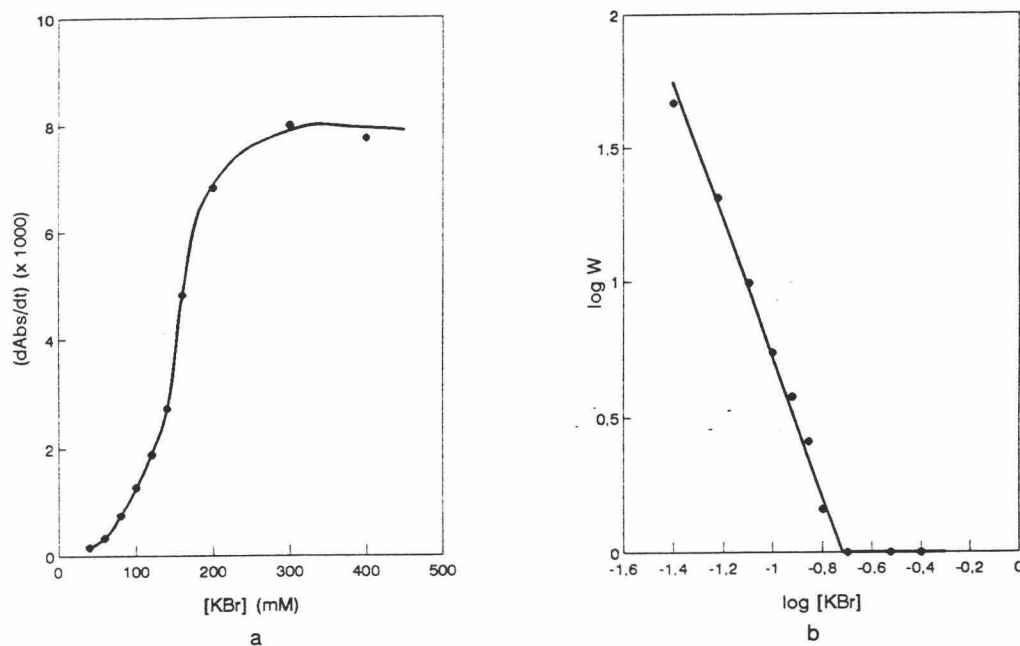


Fig. II.70. (a) Dependencia de  $(dAbs/dt)_{micel}$  con la concentración de KBr. (b) Dependencia lineal de  $\log W$  frente al  $\log [KBr]$  obtenida a partir de los datos de la gráfica (a).

Estos mismos autores relacionaron la pendiente  $-(d \log W / d \log C_e)$  con el parámetro  $\gamma_0$  a través de la expresión [57]

$$-\left(\frac{d \log W}{d \log C_e}\right) = 2.15 \cdot 10^9 \frac{a \gamma_0^2}{z^2} \quad (II.26)$$

en la que el radio  $a$  debe expresarse en metros.



Por tanto, a través de las experiencias de floculación podremos conocer tanto la C.C.C. como  $\gamma_0$  y, haciendo uso de la ecuación (II.23), podremos conocer la constante de Hamaker para nuestras partículas. Asimismo, a partir de  $\gamma_0$  podremos calcular el potencial superficial de las partículas a través de la ecuación (II.18).

Los resultados experimentales obtenidos con nuestros látex se muestran en las Figuras II.71-75. El seguimiento de la variación de la absorbancia de la disolución de hizo a través de un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 601. La longitud de onda empleada fue de 570 nm y la concentración inicial de partículas en la cubeta fue de  $2 \cdot 10^{10}$  part/ml. Un volumen de 1 ml de disolución de electrolito (con diferente concentración para cada experiencia) era añadido sobre 2ml de la muestra de coloidal con una jeringa. Se seguía el proceso de agregación durante unos 40 segundos, y los datos eran almacenados en un ordenador personal conectado con el espectrofotómetro.

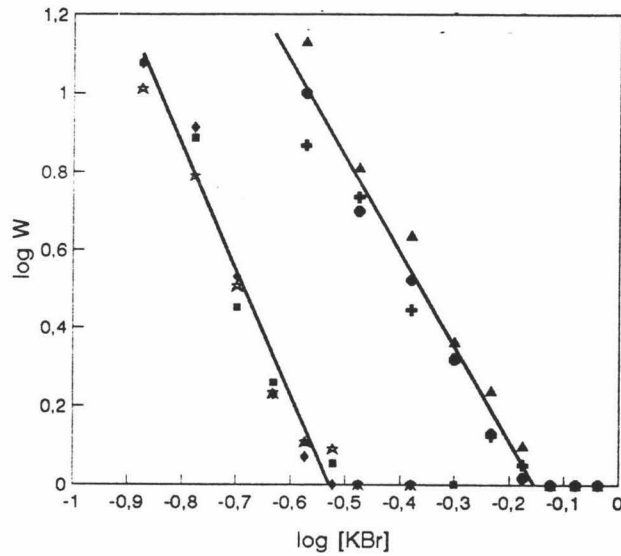


Fig. II.71. Dependencia de logW con logC<sub>e</sub> para los látex JL1 (pH 5 (◆) pH 7 (■) y pH 9 (★)) y JL2 (pH 5 (▲) y pH 7 (●) y pH 9 (+)).

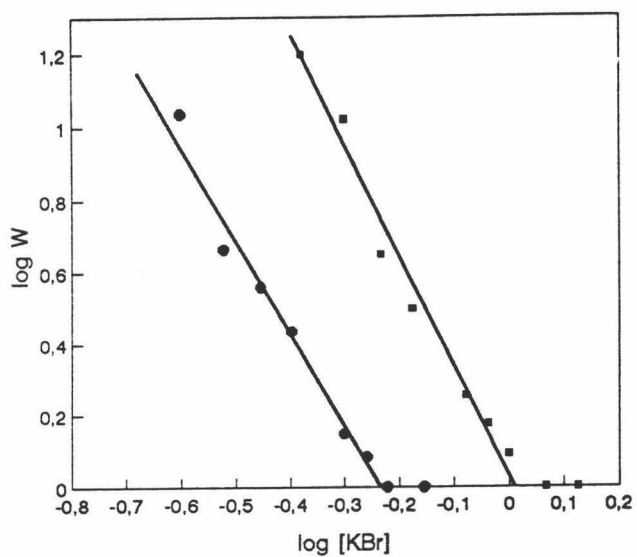


Fig. II.72. Dependencia de  $\log W$  con  $\log C_s$  para el látex JL3 (pH 5 (●) y pH 7 (■)).

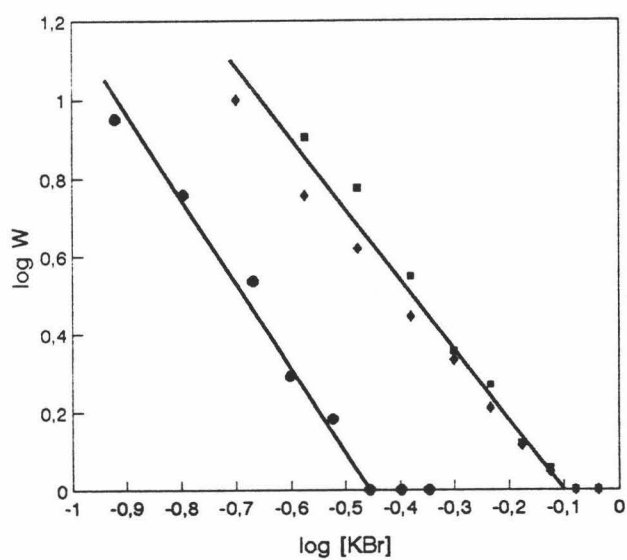


Fig. II.73. Dependencia de  $\log W$  con  $\log C_s$  para el látex JL4 (pH 5 (●) pH 7 (■) y pH 9 (◆)).

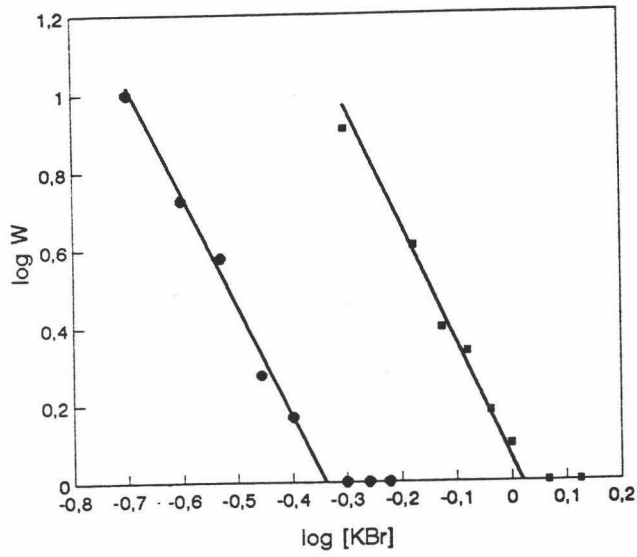


Fig. II.74. Dependencia de logW con logC<sub>0</sub> para el látex JL7 (pH 5 (●) y pH 7 (■)).

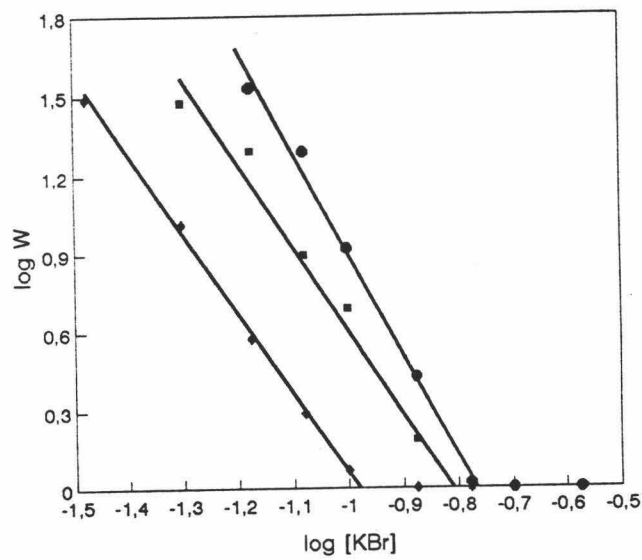


Fig. II.75. Dependencia de logW con logC<sub>0</sub> para el látex JLB (pH 5 (●), pH 7 (■) y pH 9 (◆)).

No pudimos seguir la aglutinación del látex JL10 con el espectrofotómetro, debido al gran tamaño de las partículas. Para calcular la C.C.C. del mismo lo hicimos de forma estática, es decir, dejando incubar partículas de látex en distintas disoluciones que contuvieran concentraciones crecientes de electrolito; al cabo de 4 horas se observaba la turbidez de las muestras y podía verse claramente a partir de qué concentración de KBr el sistema estaba agregado; dicha concentración se tomaba como la C.C.C. Con este método alternativo la C.C.C. que se encuentra en cualquier sistema es siempre menor que la obtenida espectrofotométricamente, ya que después de tan largo periodo de incubación, las muestras que aparecen coaguladas habrán seguido tanto procesos DLCA (para las  $C_e$  mayores) como RCLA. Hemos calculado los parámetros "A" y " $\Psi_0$ " de dos formas diferentes: Por un lado, haciendo uso de las ecuaciones II.18, 23 y 26; en este método de cálculo, para obtener el valor de  $\Psi_0$  a partir de las pendientes  $d\log W/d\log C_e$  debemos hacer uso de las aproximaciones propuestas por Reerink y Overbeek, los cuales consideran que el valor del factor de estabilidad W depende de la altura máxima de la barrera de potencial y no de la distribución completa de este potencial en función de la distancia. Las constantes de Hamaker y los potenciales superficiales calculados por esta vía a partir de todos nuestros experimentos se muestran en la Tabla II.11.

La otra forma por la que hemos calculado el potencial superficial y la constante de Hamaker ha sido empleando un método más exacto; éste consiste en calcular la dependencia del factor de estabilidad W (ecuación II.22) con la concentración de electrolito, utilizando como parámetros de ajuste a nuestras curvas experimentales las variables " $\Psi_0$ " y "A". De este modo los valores obtenidos son los que aparecen en la Tabla II.12.

Látex	pH del medio	C.C.C. (mM)	$\Psi_0$ (mV)	A ( $10^{21}$ J)
JL1	pH 5, 7 y 9	$290 \pm 20$	$13.1 \pm 0.5$	$2.7 \pm 0.3$
JL2	pH 5, 7 y 9	$700 \pm 40$	$10.8 \pm 0.4$	$1.2 \pm 0.2$
JL3	pH 5	$590 \pm 30$	$9.8 \pm 0.3$	$1.5 \pm 0.2$
	pH 7	$1000 \pm 100$	$10.5 \pm 0.3$	$0.9 \pm 0.1$
JL4	pH5	$360 \pm 20$	$7.8 \pm 0.5$	$0.8 \pm 0.1$
	pH7	$790 \pm 40$	$7.7 \pm 0.3$	$0.6 \pm 0.1$
JL7	pH5	$480 \pm 30$	$8.7 \pm 0.4$	$0.9 \pm 0.2$
	pH7	$1000 \pm 100$	$8.9 \pm 0.2$	$0.6 \pm 0.1$
JL8	pH5	$170 \pm 10$	$14.2 \pm 0.8$	$4.1 \pm 0.2$
	pH7	$160 \pm 10$	$12.6 \pm 0.5$	$3.4 \pm 0.1$
	pH9	$105 \pm 5$	$12.6 \pm 0.7$	$4.1 \pm 0.3$
JL10	pH5	$90 \pm 10$	---	---
	pH7	$130 \pm 10$	---	---
	pH9	$150 \pm 10$	---	---

Tabla II.11. Principales datos de la estabilidad de nuestros sistemas. El método de cálculo empleado se describe en el texto. La C.C.C. está expresada en mM de KBr.

Látex	pH del medio	C.C.C. (mM)	$\Psi_0$ (mV)	A ( $10^{21}$ J)
JL1	pH 5, 7 y 9	290 ± 20	17.1 ± 0.3	2.9 ± 0.3
JL2	pH 5, 7 y 9	700 ± 40	15.0 ± 0.4	1.2 ± 0.2
JL3	pH 5	590 ± 30	13.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2
	pH 7	1000 ± 100	15.0 ± 0.3	1.1 ± 0.1
JL4	pH5	360 ± 20	10.6 ± 0.2	0.7 ± 0.2
	pH7	790 ± 40	10.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2
JL7	pH5	480 ± 30	12.0 ± 0.3	0.9 ± 0.2
	pH7	1000 ± 100	13.0 ± 0.2	0.8 ± 0.1
JL8	pH5	170 ± 10	17.8 ± 0.1	4.4 ± 0.3
	pH7	160 ± 10	16.0 ± 0.2	3.4 ± 0.2
	pH9	105 ± 5	16.0 ± 0.2	4.3 ± 0.3

Tabla II.12. Principales datos de la estabilidad de nuestros sistemas. El método de cálculo empleado se describe en el texto. La C.C.C. está expresada en mM de KBr.

De todos estos resultados debemos destacar los siguientes puntos: i) Los valores de C.C.C. obtenidos se corresponden bastante bien con la magnitud de la densidad superficial de carga de cada látex, tal y como podemos esperar de la ecuación II.23. Encontramos una excepción entre los látex JL3 y JL7, que poseen valores similares de C.C.C. pese a estar uno de ellos algo más cargado que el otro. Para el látex JL10, los valores son más bajos de lo que cabría esperar debido al método experimental empleado para calcularlos. ii) En segundo lugar tenemos que recordar que la constante de Hamaker no debe ser pH dependiente, aunque  $\Psi_0$  sí lo sea en los látex con grupos superficiales ácido-base débiles. La variación de "A" con el pH que hemos encontrado no es sino el resultado de aplicar directamente la ecuación II.23 o bien del ajuste de las curvas experimentales. Asimismo, debería tener el mismo valor para partículas de igual composición superficial, pues "A" no depende de la densidad de grupos cargados, sino de la naturaleza química de la superficie del látex. Por todo ello sería más

correcto expresar los valores de la constante de Hamaker como:

$$\begin{aligned} A &= (2.0 \pm 0.8) 10^{-21} \text{ J, para los látex sulfonados,} \\ A &= (0.9 \pm 0.3) 10^{-21} \text{ J, para los látex carbonatados y} \\ A &= (3.9 \pm 0.4) 10^{-21} \text{ J, para el látex catiónico.} \end{aligned}$$

Si comparamos estos valores experimentales con el valor teórico de la constante de Hamaker para el poliestireno, veremos que los primeros siempre son inferiores. El valor teórico ha sido calculado haciendo uso de la teoría de Lifshitz por Gregory, en 1969 [54], y por Prieve y Russel, en 1988 [58], encontrando un valor de la constante A para el poliestireno de  $5.5 \cdot 10^{-21}$  J el primer autor y de  $13.7 \cdot 10^{-21}$  J los segundos. No obstante, Prieve y Russel muestran que "A" no es realmente una constante, pues su valor decae con la distancia entre las superficies de las partículas, siendo el valor de la misma de  $\approx 9 \cdot 10^{-21}$  J para distancias de 1 nm y. No deberíamos preocuparnos en exceso por nuestros resultados pues, como veremos a continuación, existe una gran dispersión entre los valores de A encontrados por diferentes autores (en  $10^{-20}$  J): 0.1-1.1 [59], 0.1-0.5 [60], 0.2-1.1 [61], 0.1-0.6 [62], 1.3 [63], 0.3-0.8 [64], 0.4 [65], 0.9 [66], 0.1-0.4 [67].

Overbeek justifica estos resultados debido a que han sido obtenidos teniendo sólo en cuenta la teoría de Gouy-Chapman. Si se considera el modelo de d.c.e. de Stern, el cual tiene en cuenta el tamaño finito de los iones, las ecuaciones vistas hasta ahora cambiarán. Si nos fijamos en la Figura II.76, y teniendo en cuenta la capa de Stern, las fuerzas atractivas de van der Waals actúan a una distancia H entre las partículas; sin embargo, la repulsión lo hace a una distancia  $H-2\Delta_3$ , siendo  $\Delta_3$  el espesor de esta capa de Stern, que coincide con el radio de un ion hidratado. Ahora el potencial difuso ( $\Psi_0$ ) el que actúa como el potencial superficial responsable de la repulsión eléctrica entre las partículas. Por lo tanto, la condición de coagulación rápida, ecuación II.23, debe modificarse introduciendo la distancia  $\Delta_3$  en ella y cambiando  $\Psi_0$  en las ecuaciones II.17 y II.18 por  $\Psi_0$ .

$$V_R = 2 \pi \epsilon \epsilon_0 (a + \Delta_3) \left( \frac{4kT}{ze} \right)^2 e^{-\kappa(H-2\Delta_3)} \quad (\text{II.27})$$

Si además consideramos la expresión no simplificada para el potencial atractivo,

$$V_A = -\frac{A}{6} \left( \frac{2a^2}{H(4a+H)} + \frac{2a^2}{(2a+H)^2} + \ln \frac{H(4a+H)}{(2a+H)^2} \right) \quad (II.28)$$

o incluso la aproximación

$$V_A = -\frac{A}{12} \left( \frac{(a + \frac{3}{4}H)}{H} + 2 \ln \frac{H}{(a + \frac{3}{4}H)} \right) \quad (II.29)$$

podremos obtener expresiones que reflejan de una forma más exacta el proceso de agregación.

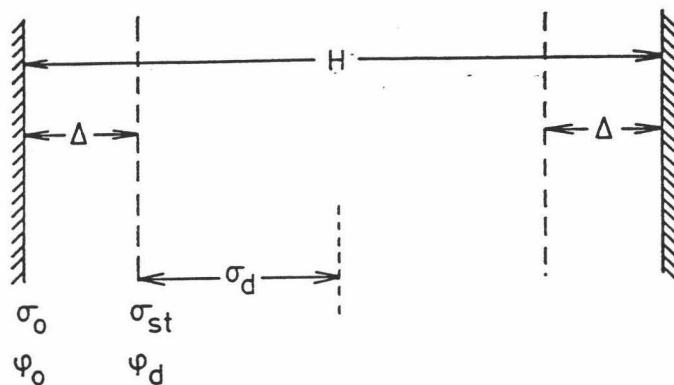


Fig. II.76. Parámetros que intervienen en la interacción entre dos partículas según el modelo de Stern.

Si consideramos la condición de coagulación rápida ( $V = (dV/dH) = 0$ ), resulta



$$C.C.C. = cte \frac{\gamma^4}{A^2 z^6} \left( 1 - \frac{3}{2\kappa a} + \frac{4}{\kappa a} \ln(\kappa a) \right) \left( 1 + \frac{2\Delta_3}{a} \right) e^{4\Delta_3 \kappa} \quad (\text{II.30})$$

donde la constante de la expresión anterior tiene la forma

$$cte = \frac{3^2 2^7 \exp(-2) (4\pi\epsilon\epsilon_0)^3 (kT)^5}{\pi e^6} \quad (\text{II.31})$$

La constante de Hamaker dependerá del espesor de la capa de iones situada sobre la superficie polimérica. Nosotros hemos utilizado un valor de  $\Delta_3$  de 3.6 Å pues éste se corresponde con el valor del radio de hidratación del ion  $K^+$  [69]. Podemos volver a calcular "A" para nuestros látex haciendo uso de la ecuación II.30, si bien el resultado dependerá del valor de  $\Psi_0$  que empleemos; si utilizamos los valores obtenidos de la pendiente  $d\log W/d\log C_0$  (ec. II.18 y 26) tendremos:

$$\begin{aligned} A &= (4.2 \pm 0.7) 10^{-21} \text{ J, para los látex sulfonados,} \\ A &= (2.4 \pm 0.6) 10^{-21} \text{ J, para los látex carbonatados y} \\ A &= (5.5 \pm 0.5) 10^{-21} \text{ J, para el látex catiónico.} \end{aligned}$$

pero si empleamos el valor del potencial difuso obtenido por el método más exacto, los valores de la constante de Hamaker son

$$\begin{aligned} A &= (7.5 \pm 0.8) 10^{-21} \text{ J, para los látex sulfonados,} \\ A &= (4.6 \pm 1.4) 10^{-21} \text{ J, para los látex carbonatados y} \\ A &= (8.7 \pm 0.7) 10^{-21} \text{ J, para el látex catiónico.} \end{aligned}$$

Como vemos, considerando el modelo de Stern nos encontramos con que los valores experimentales de la constante de Hamaker ya se aproximan bastante a los obtenidos a través de la teoría de Lifshitz. Hasta ahora sólo hemos considerado que las únicas fuerzas que participan en la estabilidad de un sistema coloidal han sido de van der Waals y de tipo electrostático. Sin embargo, existen otras interacciones diferentes a éstas que también influyen en la estabilidad de un coloide; un ejemplo lo podemos encontrar en la interacción

viscosa o en la estabilización estérica. Veamos los resultados que se obtienen al considerar estos nuevos mecanismos.

**Interacción viscosa o interacción hidrodinámica.**

Spielman, en 1970 [70], fue el primero que introdujo un coeficiente de estabilidad que tenía en cuenta la interacción viscosa entre dos partículas que se aproximan. Al año siguiente, Honig y col [71] también realizaron un profundo estudio, estableciendo soluciones analíticas aproximadas al efecto de la interacción hidrodinámica.

Cuando una partícula coloidal está en movimiento browniano, ésta posee un coeficiente de difusión que es constante siempre que no actúe otra fuerza sobre la partícula. Hasta ahora, el movimiento relativo entre dos partículas se podía describir como una superposición de los movimientos de las partículas individuales, sin considerar ningún efecto causado por la presencia de la otra. Por tanto el coeficiente de difusión relativo entre ellas se podía expresar como  $D_{12} = D_1 + D_2$ . Sin embargo, cuando dos partículas se mueven en un medio viscoso, el movimiento de una de ellas sí está influenciado por la presencia de la otra. La magnitud de esta interacción viscosa depende de la distancia existente entre ambas; si están muy separadas entre sí, no hay interacción viscosa y será válida la expresión:

$$D_{12}^{\infty} = D_1 + D_2 \tag{II.32}$$

No obstante, conforme se van aproximando, el valor relativo del coeficiente de difusión ( $D_{12}/D_{12}^{\infty}$ ) va disminuyendo. En la Figura II.77 aparece, en escala logarítmica, la variación de la anterior razón en función de la distancia entre las superficies (normalizada por el radio de la partícula) cuando se aproximan, o alejan, dos partículas de igual tamaño.

Como se puede observar, sólo a distancias mucho más grandes que el radio de la partícula ( $H/a \approx 100$ ) el movimiento de ambas partículas puede considerarse totalmente independiente. Spielman, para incluir el efecto viscoso en el estudio de la estabilidad coloidal de un sistema, introdujo un coeficiente correctivo en el factor de estabilidad de Fuchs.

$$W_{visc} = 2a \int_0^{\infty} \left( \frac{D_{12}^{\infty}}{D_{12}} \right) \frac{e^{(V/KT)}}{(2a+H)^2} dH \tag{II.33}$$

Dicho autor advierte que si se realiza el cálculo de la constante de Hamaker ignorando el efecto viscoso, (o lo que es lo mismo, sin considerar  $(D_{12}^{\infty}/D_{12})$ ), se puede llegar a obtener errores considerables.

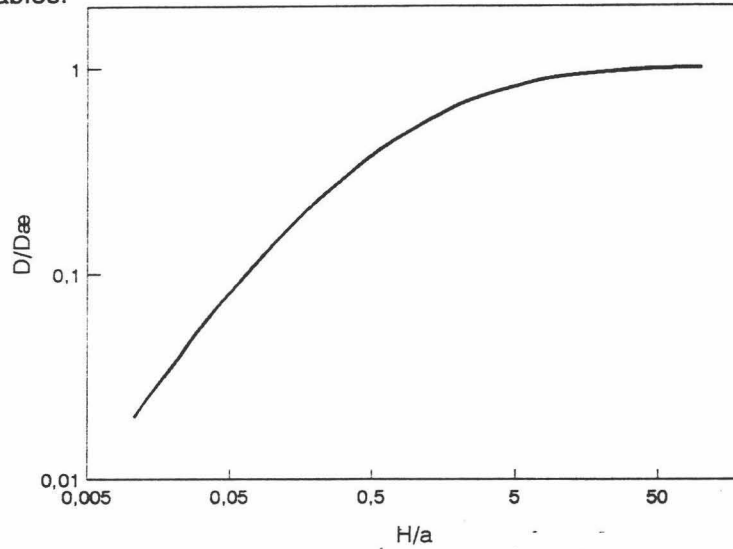


Fig. II.77. Variación de  $D_{12}/D_{12}^{\infty}$  con la distancia entre las partículas [70].

Como se puede observar, sólo a distancias muy superiores al radio de la partícula ( $H/a \approx 100$ ) el movimiento de ambas partículas puede considerarse totalmente independiente. Spielman, para incluir el efecto viscoso en el estudio de la estabilidad coloidal de un sistema, introdujo un nuevo coeficiente en el factor de estabilidad de Fuchs.

$$W_{visc} = 2a \int_0^{\infty} \left( \frac{D_{12}^{\infty}}{D_{12}} \right) \frac{e^{(V/KT)}}{(2a+H)^2} dH \quad (II.33)$$

Dicho autor advierte que si se realiza el cálculo de la constante de Hamaker ignorando el efecto viscoso, (o lo que es lo mismo, sin considerar  $(D_{12}^{\infty}/D_{12})$ ), se puede llegar a obtener errores considerables.

Para calcular  $\Psi_0$  y  $A$  de la anterior ecuación actuaremos de la siguiente forma: Teniendo en cuenta la dependencia de  $(D_{12}^{\infty}/D_{12})$  con la distancia, a partir del apéndice del trabajo de Spielman, y considerando el potencial  $V$  como suma de los potenciales  $V_R$  y  $V_A$  sin

aproximaciones (ec. II.27 y II.28), podemos hacer la integración numérica de la expresión II.33. Para diferentes valores de concentración de electrolito (ligeramente inferiores a la C.C.C.), podremos calcular diferentes  $W_{\text{visc}}$  y la compararemos con los valores experimentales obtenidos (ec. II.24) utilizando como parámetros de ajuste  $\Psi_0$  y A [72]. Los valores así obtenidos se muestran en la Tabla II.13.

Látex	pH del medio	C.C.C. (mM)	$\Psi_0$ (mV)	A ( $10^{21}$ J)
JL1	pH 5, 7 y 9	290 ± 20	17.2 ± 0.4	4.9 ± 0.2
JL2	pH 5, 7 y 9	700 ± 40	15.0 ± 0.3	2.4 ± 0.2
JL3	pH 5	590 ± 30	14.5 ± 0.3	2.6 ± 0.2
	pH 7	1000 ± 100	15.2 ± 0.3	2.0 ± 0.2
JL4	pH5	360 ± 20	11.0 ± 0.2	1.9 ± 0.1
	pH7	790 ± 40	10.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1
JL7	pH5	480 ± 30	13.1 ± 0.2	2.3 ± 0.2
	pH7	1000 ± 100	13.2 ± 0.3	1.5 ± 0.1
JL8	pH5	170 ± 10	16.9 ± 0.3	6.0 ± 0.2
	pH7	160 ± 10	16.0 ± 0.1	5.8 ± 0.3
	pH9	105 ± 5	16.0 ± 0.2	7.3 ± 0.3

Tabla II.13. Parámetros característicos de la estabilidad de nuestros sistemas. "A" calculada considerando el efecto viscoso ( $\Delta_3 = 0$ ).

Como podemos comprobar, el efecto viscoso no afecta al valor de los potenciales superficiales pero sí influye sobre los valores de "A", duplicando éstos si comparamos con los resultados de la Tabla II.12. Como previamente comentamos, es más correcto expresar los valores de la constantes de Hamaker agrupándolos en función de la naturaleza del látex considerado, siendo éstos de

$$A = (3.7 \pm 1.2) 10^{-21} \text{ J, para los látex sulfonatados,}$$



$A = (1.9 \pm 0.5) 10^{-21}$  J, para los látex carbonatados y

$A = (6.4 \pm 0.7) 10^{-21}$  J, para el látex catiónico.

Como vemos el considerar o no el efecto viscoso produce diferencias apreciables en los valores de "A", aproximándose éstos a los valores teóricos cuando sí se tiene en cuenta tal efecto hidrodinámico.

### Estabilización estérica.

Son numerosos los autores que hablan de un mecanismo adicional al de la repulsión electrostática que estabiliza ciertas disoluciones coloidales: la estabilización estérica. Ésta surge por la presencia de largas cadenas de polielectrolito hidrofílico situadas sobre la superficie de las partículas. Hasta hace poco tiempo, la consideración de este efecto estérico sólo podía hacerse de una forma cualitativa [73]. Esta estabilización puede estar causada por dos mecanismos diferentes:

- Cuando dos partículas se acercan, se produce un solapamiento entre las capas más externas de sus superficies. Este solapamiento provoca un incremento local de concentración de cadenas de polielectrolito (si sobre la superficie de las partículas interactuantes se encuentran dichas estructuras), lo que constituye, si el disolvente es un *buen disolvente*, un incremento de energía libre; por tanto, habrá una tendencia de las moléculas del disolvente a entrar en esa zona y separar a las partículas. Este efecto se conoce como efecto **osmótico**.

- Otro segundo efecto que puede ocurrir, está relacionado con el contacto entre las cadenas poliméricas de las superficies de ambas partículas. A distancias muy cercanas, su libertad conformacional queda reducida enormemente; esto se traduce en una disminución de la entropía conformacional de las cadenas que origina otro aumento en la energía libre del sistema, haciendo que este acercamiento sea energéticamente desfavorable. Este efecto se conoce como efecto del **volumen de restricción** o de exclusión.

Vincent y col [74] fueron los primeros que hicieron una consideración cuantitativa del problema. Según ellos, si sobre la superficie de la partícula existe una capa externa de cadenas poliméricas de espesor  $\delta$ , aparecerá el efecto osmótico cuando ambas partículas se encuentren a una distancia inferior a  $2\delta$ . En ese caso el potencial de repulsión osmótica ( $V_{osm}$ ) viene dado por

$$V_{osm} = \frac{4\pi a}{v_1} (\phi_2)^2 (1/2 - \chi) (\delta - H/2)^2 \quad (II.34)$$

siendo  $v_1$  el volumen molar del disolvente,  $\phi_2$  la fracción de volumen efectiva del polímero y  $\chi$  es el parámetro de solubilidad de Flory-Huggins para dichas cadenas de polímero.

Si ambas partículas se encontraran a una distancia inferior a  $\delta$ , aparece el efecto del volumen de restricción, que origina un nuevo potencial de repulsión ( $V_{vr}$ ). Además, a esta distancia, la expresión del potencial osmótico varía, siendo

$$V_{osm} = \frac{4\pi a}{v_1} (\phi_2)^2 (1/2 - \chi) \delta^2 \left[ \left( \frac{H}{2\delta} \right) - \frac{1}{4} - \ln\left( \frac{H}{\delta} \right) \right] \quad (II.35)$$

$$V_{vr} = \left( \frac{2\pi a}{Pm} \phi_2 \delta^2 \rho_2 \right) \left( \frac{H}{\delta} \ln \left[ \frac{h}{\delta} \left( \frac{3 - H/\delta}{2} \right)^2 \right] - 6 \ln \left[ \frac{3 - H/\delta}{2} \right] + 3 (1 + H/\delta) \right) \quad (II.36)$$

siendo  $\rho_2$  la densidad del polímero y  $Pm$  el peso molecular de la cadena extendida hacia el disolvente. El potencial total de interacción entre dos partículas será ahora:

$$V = V_R + V_A + V_{osm} + V_{vr} \quad (II.37)$$

La aplicación de este tratamiento cuantitativo sobre nuestros látex está bastante limitada, ya que además de  $\Psi_d$  y  $A$ , son parámetros ajustables el espesor  $\delta$  y los parámetros  $\phi_2$  y  $\chi$ . Estos últimos son parámetros accesibles en estudios de estabilidad de partículas coloidales con cadenas de polióxido de etileno o propileno adsorbidas en sus superficies [74,75,76], pero son desconocidos para cadenas de poliestireno y máxime si consideramos los distintos grupos iónicos que existen en sus extremos.

No obstante, hemos representado en la Figura II.78. la variación de cada uno de estos potenciales,  $V_R$ ,  $V_A$ ,  $V_{osm}$ ,  $V_{vr}$  y  $V_{Total}$  con la distancia para el látex JL2, ya que en este látex la probabilidad de que existan cadenas superficiales de poliestirensulfonato es muy elevada. De este modo, considerando una  $\Psi_d$  de 15 mV, un valor para la constante de Hamaker de  $5.5 \cdot 10^{-21}$  J, un espesor  $\delta = 7.5 \text{ \AA}$  (este valor corresponde a 3 unidades de monómero que

pudieran estar extendidas de forma lineal hacia la fase acuosa), un  $\phi_2$  de 0.10 y un  $\chi$  de 0.40, se obtiene en la condición de coagulación ( $V = dV/dH = 0$ ) una C.C.C. que coincide con la experimental (700 mM).

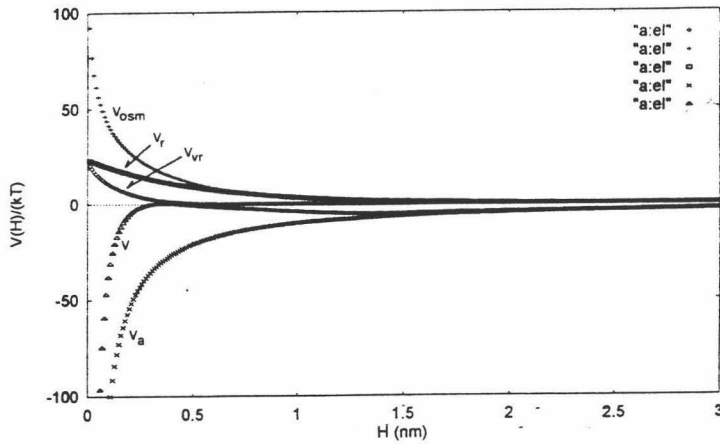


Fig. II.78. Dependencia de  $V$ ,  $V_r$ ,  $V_a$ ,  $V_{osm}$  y  $V_{vr}$  para el látex JL2 con la distancia.  $\Psi_d = 15$  mV,  $A = 5.5 \cdot 10^{-21}$  J,  $\delta = 7.5$  Å,  $\phi_2 = 0.10$  y  $\chi = 0.40$ .

Como hemos visto en el desarrollo de este apartado que trata sobre la estabilidad coloidal, la justificación de los resultados experimentales puede ser variada, debido al gran número de mecanismos que pueden afectar a la interacción de las partículas (atracción de van der Waals, repulsión electrostática, interacción viscosa o hidrodinámica, efecto osmótico y efecto del volumen excluido). Sin embargo, puede complicarse aún más si se considera que la interacción electrostática no es independiente de la estérica, lo cual daría lugar a un mecanismo de estabilización *electrostérica*, propuesto por Einarson y Berg [76]; o bien, si se consideran las interacciones *polares* o de electrón aceptor - electrón donador, propuesta por Van Oss y col [77], los cuales afirman que es una de las interacciones que más fuertemente se pone de manifiesto cuando dos partículas coloidales se encuentran suficientemente cerca.

## II.8. BIBLIOGRAFÍA.

1. A. Zamora Lucas. "Efecto de los parámetros de reacción sobre los fenómenos de nucleación y coagulación en copolimerización en emulsión". Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco. 1991.
2. S.L. Tsaur y R.M. Fitch. *J. Colloid Interface Sci.* **115** : 450 (1987).
3. T. Suzawa y H. Shirihama. *Adv. Colloid Interface Sci.* **35** : 139 (1991).
4. A. Streitwieser y C.H. Heathcock. "Química Orgánica". Interamericana-McGraw Hill. Madrid. 1987.
5. E. Pretsch, T. Clerc, J. Seilb y W. Simon. "Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos". Ed. Alhambra. Madrid. 1989.
6. A. Martín Rodríguez. "Síntesis, caracterización y aplicaciones de coloides poliméricos funcionalizados". Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1993.
7. P. Bagchi, B.V. Gray y S.M. Birnbaum. *J. Colloid Interface Sci.* **69** : 502 (1979).
8. W. Stone y J. Stone-Masui. "Science and Technology of Polymer Colloid". Martinus Nijhoff Publishers. Boston. 1983.
9. H. Tamai, K. Niino y T. Suzawa. *J. Colloid Interface Sci.* **131** : 1 (1989).
10. M.E. Labib y A.A. Robertson. *J. Colloid Interface Sci.* **77** : 151 (1980).
11. H.J. van der Hul y J.W. Vanderhoff. *J. Colloid Interface Sci.* **28** : 336 (1968).
12. J.W. Vanderhoff, M.J. van der Hul, R.J. Tansk y J.T.G. Overbeek. "Clean surfaces: Their preparation and characterization for interfacial studies". Marcel Dekker. New York. 1970.
13. D. Bastos González. "Caracterización de nuevos coloides poliméricos con diferente funcionalidad: Tratamiento térmico y aplicaciones". Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1993.
14. J.M. Peula García. "Adsorción de BSA sobre látex de funcionalidad sulfonato: Caracterización y estabilidad del complejo". Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada. 1992.
15. I.M. Kolthoff y I.K. Miller. *J. Am. Chem. Soc.* **73** : 3055 (1951).
16. D.H. Everett, M.E. Gultepe y M.C. Wilkinson. *J. Colloid Interface Sci.* **71** : 336 (1979).
17. M. Elimelech y Ch.R. O'Melia. *Colloids and Surfaces.* **44** : 165 (1990).
18. S.F. Schulz, T. Gisler, M. Borkovec y H. Sticher. *J. Colloid Interface Sci.* **164** : 88 (1994).
19. A.W. Neumann. *Adv. Colloid Interface Sci.* **4** : 105 (1974).
20. T.R. Patxon. *J. Colloid Interface Sci.* **31** : 19 (1969).
21. W.M. Brouwer y R.L.J. Zsom. *Colloids & Surfaces.* **24** : 195 (1987).



22. H. Tamei, M. Hasegawa y T. Suzawa. *J. Appl. Polym. Sci.* **38** : 403 (1989).
23. K.E. van Holde. "Bioquímica física". Ed. Alhambra. Madrid. 1983.
24. R. Hidalgo Álvarez. *Adv. Colloid Interface Sci.* **34** : 217 (1991).
25. F. Galisteo González. "Adsorción de proteínas sobre modelos coloidales". Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1992.
26. D. Bastos González. "Coloides modelo de poliestireno sulfonatados: preparación, propiedades electrocinéticas y estabilidad coloidal". Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada. 1992.
27. D. Bastos González, J.L. Ortega Vinuesa, F.J. de las Nieves y R. Hidalgo Álvarez. "Carboxylated latexes for covalent coupling antibodies". *J. Colloid Interface Sci.* Aceptado para su publicación. Febrero 1995.
28. H.J. Jacobasch. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie.* **128** :47 (1984).
29. D.E. Dunstan. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **89** : 521 (1993).
30. D.F. Myers y D.A. Saville. *J. Colloid Interface Sci.* **131** : 461 (1989).
31. B.R. Midmore y R.J. Hunter. *J. Colloid Interface Sci.* **122** : 521 (1988).
32. A.A. Kamel, C.M. Ma, M.S. El-Aasser, F.J. Micale y J.W. Vanderhoff. *J. Disp. Sci. Tech.* **2** : 315 (1981).
33. C.F. Zukoski y D.A. Saville. *J. Colloid Interface Sci.* **114** : 32 (1986).
34. C.F. Zukoski y D.A. Saville. *J. Colloid Interface Sci.* **114** : 45 (1986).
35. A.G. van der Put y B.H. Bijsterbosch. *J. Colloid Interface Sci.* **92** : 499 (1983).
36. Th.J.J. van der Hoven y B.H. Bijsterbosch. *Colloid & Surfaces.* **22** : 187 (1987).
37. F.J. de las Nieves, E.S. Daniels y M.S. El-Aasser. *Colloid & Surfaces.* **60** : 107 (1991).
38. L.A. Rosen y D.A. Saville. *J. Colloid Interface Sci.* **149** : 2 (1992).
39. H. Ohshima y T. Kondo. *J. Colloid Interfaces Sci.* **116** : 305 (1987).
40. H. Ohshima y T. Kondo. *Colloid & Polymer Sci.* **269** : 1080 (1986).
41. J.J. Bikerman. "Physical Surfaces". Academic Press. 1970.
42. J. Lyklema y J.Th.G. Overbeek. *J. Colloid Interface Sci.* **16** : 507 (1961).
43. J. Lyklema. *Colloid and Surfaces.* **92** : 41 (1994).
44. W.G. Eversole y W.W. Boardman. *J. Chem. Phys.* **9** : 798 (1941).
45. J.N. Israelachvili. *J. Colloid Interface Sci.* **110** : 263 (1986).
46. R.M. Fitch. "Polymer Colloids II". Plenum-Press. New York. 1978.
47. H.C. Hamaker. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* **55** : 1015 (1936).
48. J.H. de Boer. *Trans. Faraday Soc.* **32** : 21 (1936).
49. J.Th.G. Overbeek. "Colloid Science". Elsevier. Amsterdam. 1952.
50. F.M. Fowkes. "Physicochemical Aspects of Polymer Surfaces". Plenum-Press. New

- York. 1983.
51. B.V. Derjaguin y L.D. Landau. *Acta Physicochim. URSS.* **14** : 633 (1941).
  52. E.J.W. Verwey y J.Th.G. Overbeek. *Trans Faraday Soc.* **42B** : 117 (1946).
  53. E.J.W. Verwey y J.Th.G. Overbeek. "Theory of the Stability of Lyophobic Colloids". Elsevier. Amsterdam. 1948.
  54. J. Gregory. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2** : 397 (1969).
  55. N. Fuchs. *Z. Phys.* **89** : 736 (1934).
  56. M. von Smoluchowski. *Z. Phys.* **17** : 557 (1917).
  57. H. Reerink y J.Th.G. Overbeek. *Disc Faraday Soc.* **18** : 74 (1954).
  58. D.C. Prieve y W.B. Russel. *J Colloid Interface Sci.* **125** : 1 (1988).
  59. R.H. Ottewill y J.N. Shaw. *Disc. Faraday Soc.* **42** : 154 (1966).
  60. R.L. Schild, M.S. El-Aasser, G.W. Poehlein y J.W. Vanderhoff. "Emulsion Latexes and Dispersions". Dekker. Nueva York. 1978.
  61. A. Watillon y A.M. Joseph-Petit. "A.C.S. Symposium on Coagulation Coagulant Aids". 61. 1961.
  62. A.S.G. Curtisy y L. Hocking. *Trans. Faraday Soc.* **66** : 138 (1970).
  63. A. Kotera, K. Furusawa y K. Kudo. *Kolloid Z. Z. Polym.* **240** : 837 (1970).
  64. B. Goldstein y B.H. Zimm. *J. Chem. Phys.* **54** : 4408 (1971).
  65. H. Krapp y G. Walter. *J Colloid Interface Sci.* **39** : 421 (1972).
  66. B.H. Bijsterbosch. *Colloid Polym. Sci.* **256** : 343 (1978).
  67. S.L. Tsaur y R.M. Fitch. *J Colloid Interface Sci.* **115** : 463 (1987).
  68. J.Th.G. Overbeek. *Pure & Appl. Chem.* **52** : 1151 (1980).
  69. R.A. Robinson y R.H. Stokes. "Electrolyte Solutions". Butterworth. Londres. 1970.
  70. L.I.A. Spielman. *J Colloid Interface Sci.* **33** : 562 (1970).
  71. E.P. Honig, G.J. Roeberson y P.H. Wiersema. *J Colloid Interface Sci.* **36** : 97 (1971).
  72. A. Fernández Barbero, A. Martín Rodríguez, J. Callejas Fernández y R. Hidalgo Álvarez. *J Colloid Interface Sci.* **162** : 257 (1994).
  73. J.Th.G. Overbeek. *Adv. Colloid Interface Sci.* **16** :17 (1982).
  74. B. Vincent, J. Edwards, S. Emmett y A. Jones. *Colloids & Surfaces.* **18** : 261 (1986).
  75. K. Tajima, M. Koshinuma y A. Nakamura. *Colloid Polym. Sci.* **270** : 759 (1992).
  76. M.B. Einarson y J. Berg. *J Colloid Interface Sci.* **155** : 165 (1993).
  77. C.J. Van Oss, M.K. Chaudhury y R.J. Good. *Chem. Rev.* **88** : 927 (1988).

III. ADSORCIÓN DE LA INMUNOPROTEÍNA F(ab')<sub>2</sub>

SOBRE LOS LÁTEX

### III.1. INTRODUCCIÓN

Antes de pasar a ver los resultados de la adsorción de proteína sobre nuestros látex, merece la pena detenernos en hacer una breve presentación general de las proteínas, centrándonos posteriormente en la descripción del fragmento F(ab')<sub>2</sub>.

Al igual que los látex, las proteínas son polímeros pero en este caso las unidades monoméricas son los aminoácidos. Existen unos 22 aminoácidos diferentes que pueden formar parte de estos biopolímeros. La unión entre ellos tiene lugar a través de un enlace peptídico, el cual tiene su origen en la reacción que se produce entre un grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente (Figura III.1a). Una característica del enlace peptídico es que la rotación alrededor de él está impedida debido a que posee cierto carácter de doble enlace causado por un efecto mesomérico con el grupo carbonilo. Por tanto, la unidad peptídica es rígida y plana (Figura III.1b). Los grupos O y H están en posiciones "trans". No obstante, los otros dos enlaces situados a ambos lados de la unidad peptídica sí pueden, en principio, rotar libremente; (son los enlaces  $\psi$  y  $\phi$  que se representan en la Figura III.1c). Sin embargo, el volumen de los grupos laterales de los aminoácidos (R) impone restricciones estéricas a estas rotaciones, de modo que sólo estarán permitidas un limitado número de combinaciones de las rotaciones alrededor de  $\psi$  y  $\phi$ .

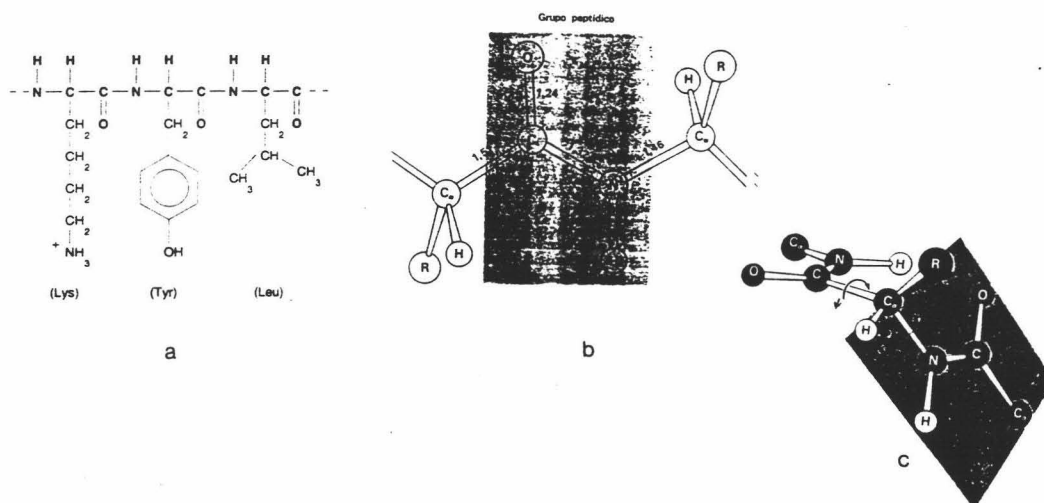


Fig. III.1. (a) Secuencia de 3 aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. (b) Esquema del enlace peptídico. (c) Posibles rotaciones alrededor de los enlaces  $\psi$  y  $\phi$ .

Pese a que parece existir un enorme grado de libertad rotacional en las cadenas polipeptídicas, todas las proteínas tienen una estructura tridimensional bien definida de la que depende su actividad biológica. Así, cualquier cadena de polipéptido extendida u ordenada al azar carece de actividad biológica. El factor que fundamentalmente determina la organización espacial de la molécula proteica es la secuencia de sus aminoácidos; a esta secuencia es lo que se llama o conoce como *estructura primaria* de una proteína. Dentro de la configuración tridimensional de la proteína hay fragmentos de la misma que adoptan estructuras regulares en forma helicoidal ( $\alpha$ -hélice) o de lámina plegada ( $\beta$ ), que pueden verse en la Figura III.2. La *estructura secundaria* de una cadena polipeptídica hace referencia a estas estructuras regulares cuando están presentes en una molécula de proteína.

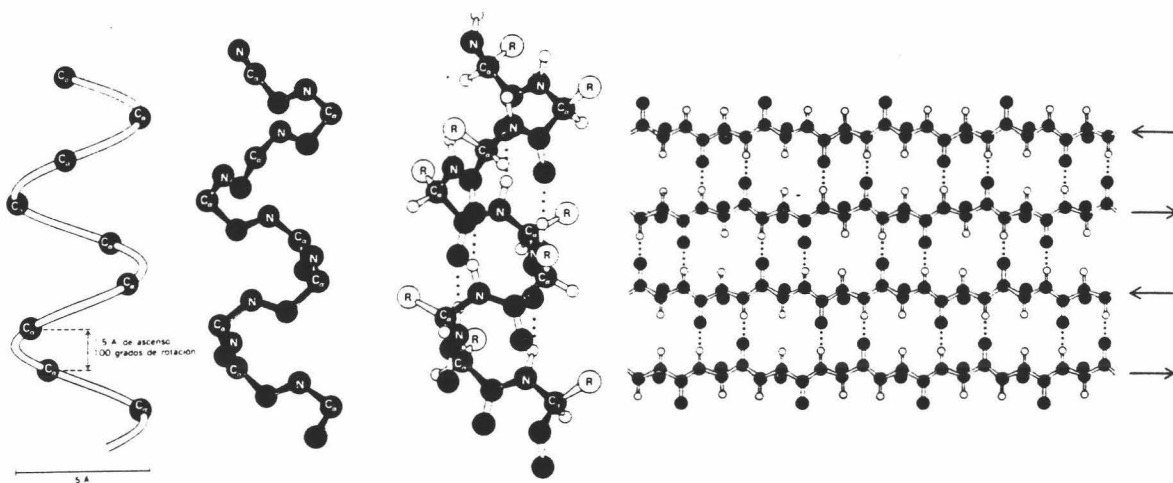


Fig. III.2. (a) Disposición en  $\alpha$ -hélice de una cadena de polipéptido. (b) Disposición en lámina plegada- $\beta$ .

Se conoce como *estructura terciaria* al orden espacial de toda la cadena polipeptídica. Esta tiene su origen en los diferentes tipos de interacciones que actúan entre los grupos laterales de los aminoácidos que la constituyen. En el siguiente apartado de este capítulo haremos un comentario más amplio de estas interacciones, donde hablaremos tanto de las intramoleculares como de las que tienen lugar entre la proteína y el medio que la rodea. Dependiendo de la estructura tridimensional, las proteínas pueden clasificarse en:

- i) proteínas altamente solvatadas y flexibles, que adoptan estructuras de cadenas expandidas o "random coils";
- ii) proteínas *fibrilares*, que tienen una conformación espacial lineal debido a que poseen, casi exclusivamente, estructuras secundarias a lo largo de su cadena;
- iii) proteínas *globulares*, cuya estructura está constituida por  $\alpha$ -hélices, láminas plegadas- $\beta$  y partes que poseen una estructura al azar pero plegadas de una forma compacta.

La mayoría de las proteínas de interés (enzimas, inmunoproteínas, proteínas con función transportadora, etc.) pertenecen a este último grupo.

La proteína que hemos elegido para nuestro trabajo es un fragmento de otra proteína cuya función biológica está relacionada con el sistema inmune; es la inmunoglobulina G (IgG) y está representada en las Figuras III.3.

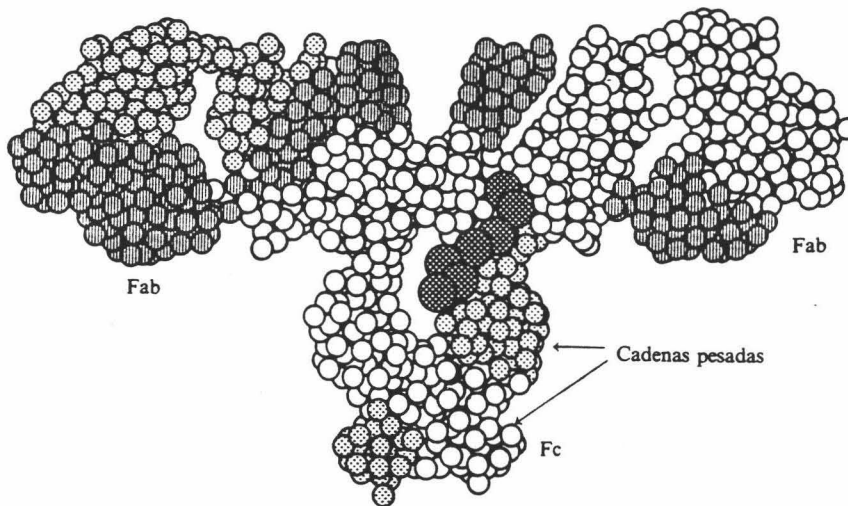


Fig. III.3. Diferentes esquemas de una molécula de IgG.

Su estructura consta de dos cadenas largas, o pesadas (H), y dos cortas, o ligeras (L), que se unen entre sí por enlaces disulfuro. Una molécula de IgG tiene una forma de "Y" en la que los tres brazos no son iguales; uno de ellos, el fragmento **Fc**, difiere de los otros dos fragmentos, llamados **Fab** (Figura III.3c). Sin embargo, la disposición espacial de estos tres fragmentos no es fija, sino que la estructura de "Y" es flexible gracias a unas "bisagras" que permiten una variación rápida de la posición relativa de los brazos *Fab* dentro de un amplio margen angular. Son los extremos de las cadenas *Fab* los que tienen un centro de unión o de combinación hacia un antígeno determinado.

Podemos someter una molécula de IgG a reaccionar con determinadas enzimas proteolíticas de acción muy específica y limitada. Por ejemplo, en presencia de *papaína*, la IgG se escinde en tres partes: los dos brazos *Fab* y el fragmento *Fc* quedan independientes; si la sometemos a la acción de la *pepsina*, esta enzima sólo tiene un punto de reconocimiento en toda la secuencia aminoacídica de la IgG, por lo que dicha molécula se escindirá en dos porciones: por un lado tendremos el fragmento *Fc* (pero algo más corto que el que se obtenía por la acción de la *papaína*), y por otro, tendremos los dos brazos *Fab* unidos por un puente disulfuro; a este fragmento se le conoce como **F(ab)<sub>2</sub>**, que sigue siendo inmunológicamente activo y que también posee las zonas "bisagra" de la IgG origen. Vease la Figura III.4.

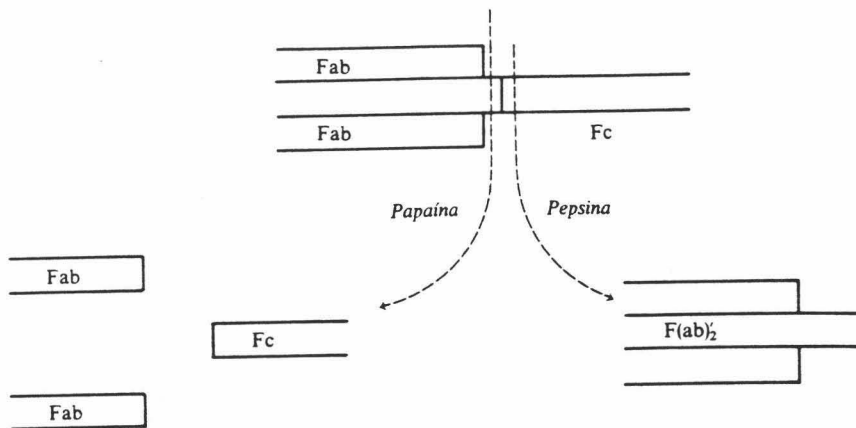


Fig. III.4. Efecto que produce la papaína y la pepsina sobre una molécula de IgG.

El fragmento F(ab')<sub>2</sub> con el que hemos realizado los estudios de adsorción ha sido obtenido y purificado por la empresa Biokit S.A. (Barcelona) a partir de IgG policlonal de conejo. Tras su digestión con pepsina, la muestra era sometida a dos procesos cromatográficos, uno de exclusión en gel y otro de afinidad, con el fin de eliminar los fragmentos Fc y retirar aquellas moléculas de IgG que hubiesen escapado a la acción proteolítica. El peso molecular del fragmento F(ab')<sub>2</sub> es de 102000 gr/mol. Su punto isoeléctrico (pI) fue determinado por isoelectroenfoque, encontrando valores de pI comprendidos entre pH 4.6 y 6.0 (debido al origen policlonal de la muestra). Recordamos que el punto isoeléctrico se define como el pH en el cual la proteína no presenta movilidad electroforética cuando se somete a la acción de un campo eléctrico. Por lo general el pI coincide con el punto de carga nula, o pH en el que la proteína tiene una carga neta igual a cero; a pHs superiores la proteína adquiere una carga global negativa y a pHs inferiores será positiva. El valor del pI de una proteína depende de los contenidos relativos en aminoácidos ácidos o básicos que posea y del entorno polar que rodee a estos grupos.

La presente introducción ha sido desarrollada en base a las referencias bibliográficas [1-3], si bien esta información puede encontrarse en cualquier libro de Bioquímica general.

### III.2. TERMODINÁMICA DE LOS PROCESOS DE ADSORCIÓN DE MACROMOLÉCULAS SOBRE INTERFASES .

La unión de una proteína a una interfase es uno de los hechos que más fácilmente se pueden llevar a cabo. A pesar de que el medio natural donde están inmersas la mayoría de las proteínas es el agua, si esta disolución entra en contacto con otra fase inmiscible con ella, las proteínas tienden a acumularse en la interfase. Esta tendencia puede tener un gran impacto en varios procesos naturales o de interés tecnológico, como ya comentamos en la introducción de esta memoria. Las razones que justifican la afinidad de las proteínas por las interfases debemos buscarlas en los diferentes tipos de interacciones que existen entre los componentes que hay en la muestra: la superficie del absorbente, las moléculas de proteína, el disolvente (agua) y otros solutos que puedan estar presentes (como iones de bajo peso molecular).

Cualquiera que sea el mecanismo y cinética por la que transcurra la adsorción de una proteína, el proceso (a presión y temperatura constante) sólo podrá ocurrir si la energía de Gibbs del sistema global decrece, es decir



$$\Delta_{ads}G = \Delta_{ads}H - T\Delta_{ads}S < 0 \quad (III.1)$$

siendo H, S y T, la entalpía, la entropía y la temperatura absoluta del sistema. A continuación veremos, brevemente, las diferentes interacciones que contribuyen al valor de  $\Delta_{ads}G$ .

#### Interacciones que afectan a la estructura de la proteína.

Como apuntamos anteriormente, la libertad rotacional que pueda tener una cadena polipeptídica en una estructura desordenada al azar, debida al libre giro de los enlaces  $\psi$  y  $\phi$ , le permitiría adoptar numerosas conformaciones espaciales. No obstante, sólo se pueden alcanzar un número limitado de todas las posibles combinaciones de rotación. Estas combinaciones se recogen en el llamado diagrama de Ramachandran [4]; de él se puede estimar que el número posible de conformaciones diferentes que puede adoptar cada unidad peptídica es de cuatro [5]. Sin embargo, la mayoría de las proteínas tienen una estructura tridimensional definida. Ésta sólo se puede alcanzar si las interacciones que existan dentro de la propia molécula de proteína, o entre la proteína y el medio que la rodea, son lo suficientemente favorables como para compensar la pérdida de entropía conformacional. Norde y Lyklema [6] concluyen que esta pérdida de entropía puede hacer que el plegamiento de una proteína, de tamaño intermedio, a partir de una estructura de *random coil* origine valores de  $T\Delta S$  que causen un incremento en la energía de Gibbs de varios cientos de kJ/mol. Veamos qué interacciones favorecen, o impiden, el plegamiento de la proteína.

##### - Puentes de hidrógeno:

Estudios realizados con sustancias de bajo peso molecular [7] indican que la formación de puentes de hidrógeno entre un péptido y las moléculas de agua que lo rodean está ligeramente favorecida frente a los enlaces de hidrógeno entre péptido-péptido o agua-agua. Por tanto, este tipo de enlace, que siempre está presente en las estructuras secundarias proteicas, no puede ser el único responsable de la estabilidad de las  $\alpha$ -hélices y las láminas- $\beta$ .

##### - Interacciones de dispersión de London:

En una proteína compacta la densidad de átomos empaquetados unos cerca de otros favorece este tipo de interacción atractiva que tiende a mantener la estructura globular de las proteínas. También puede haber interacciones entre dipolos permanentes, pero se cree que tienen un efecto minoritario sobre el orden espacial de la macromolécula.

- Interacciones coulombianas:

Este tipo de interacción puede contribuir, o no, a la estabilización de una proteína compacta. Cerca del punto isoeléctrico la molécula poseerá cargas positivas y negativas; en esta situación hay una interacción electrostática intramolecular de tipo atractivo que favorece el empaquetamiento de la macromolécula. Sin embargo, lejos del pI, el exceso de carga positiva o negativa origina repulsiones intramoleculares que dan lugar a estructuras más expandidas.

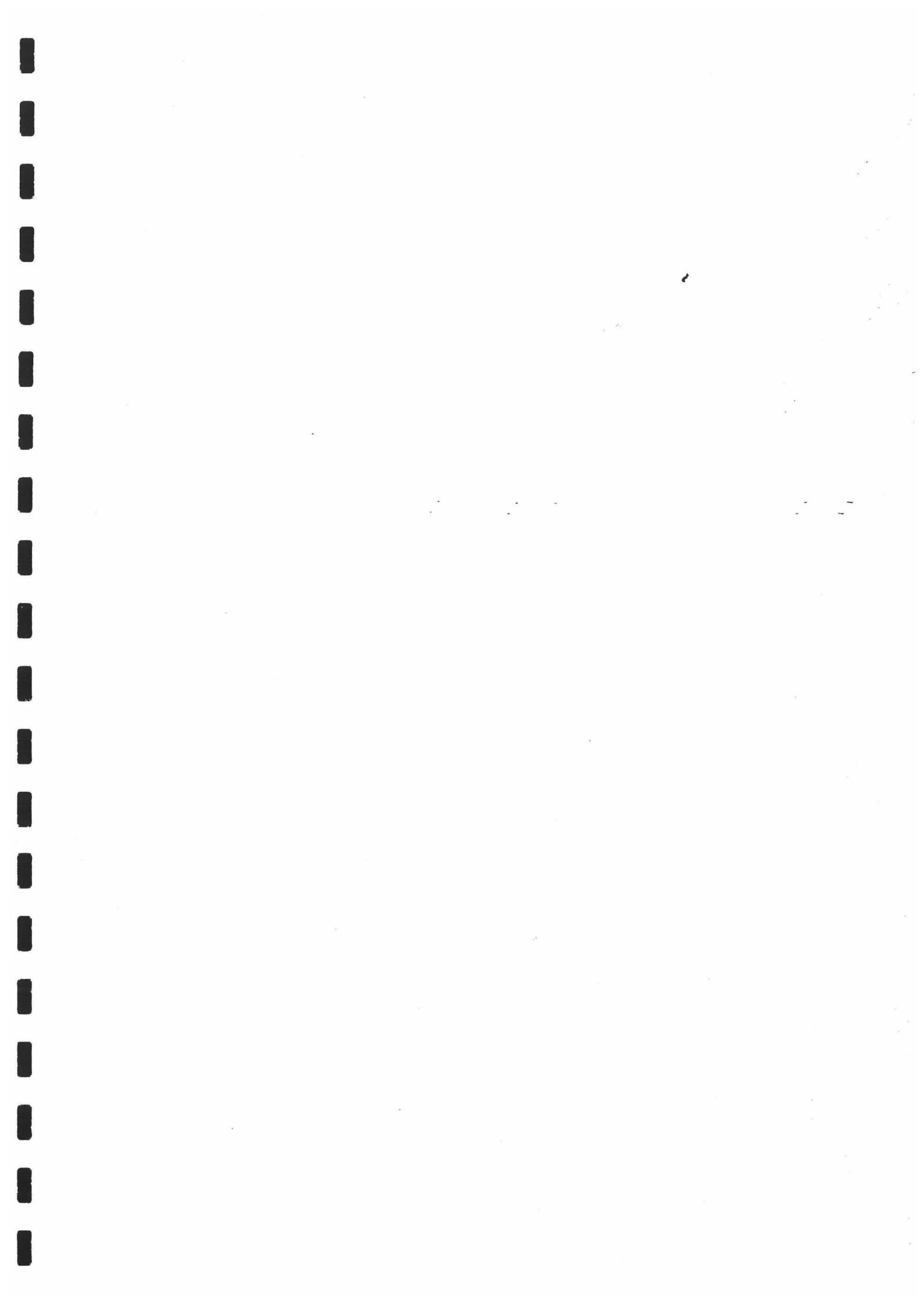
- Deshidratación de grupos hidrofóbicos de ciertos aminoácidos:

Este fenómeno es el principal responsable del plegamiento de una cadena peptídica y favorece enormemente la estructura compacta de la proteína [8]. Cuando las moléculas de agua están en contacto con una superficie hidrofóbica adoptan una estructura fija, formando "clusters" o estructuras similares a las que pudieran presentar en el hielo (con sus enlaces de hidrógeno fijos en determinadas orientaciones), ante la imposibilidad de establecer puentes de hidrógeno o otra interacción polar con dicha superficie. Por ello existe un incremento de entropía cuando esta capa de agua estructurada se libera de las partes hidrofóbicas de la proteína. La disminución de energía de Gibbs causada por esta deshidratación en una proteína que posea unos 100 aminoácidos puede ser de unos 500 kJ/mol [6].

- No obstante, esta tendencia a excluir los grupos apolares del contacto con el agua origina estructuras en las que puede haber distorsiones entre los ángulos y longitudes de algunos enlaces, hecho que causaría un incremento de la energía libre de Gibbs.

En la Tabla III.1 resumimos las diferentes interacciones que determinan la estructura tridimensional de las proteínas en un medio acuoso. Un valor negativo de  $\Delta G_{\text{extendida-compacta}}$  implica la estabilización de una estructura plegada, mientras que un valor positivo favorece la expansión de la cadena.

Como vemos, la deshidratación hidrofóbica y la libertad rotacional de ciertos enlaces de la cadena del polipéptido son los dos factores que contribuyen de una forma más acusada ( y además de manera opuesta) a la conformación espacial final de una proteína, causando su acción grandes cambios en la entropía del sistema. Esto hace que el estado nativo de una proteína en agua sea sólo *marginalmente* más estable que otros estados posibles. Por ello, cuando actuamos sobre el medio acuoso, adicionando diferentes sustancias (alcoholes, partículas de látex, sílice, etc), la proteína tenderá a adoptar conformaciones energéticamente más favorables en este nuevo sistema.



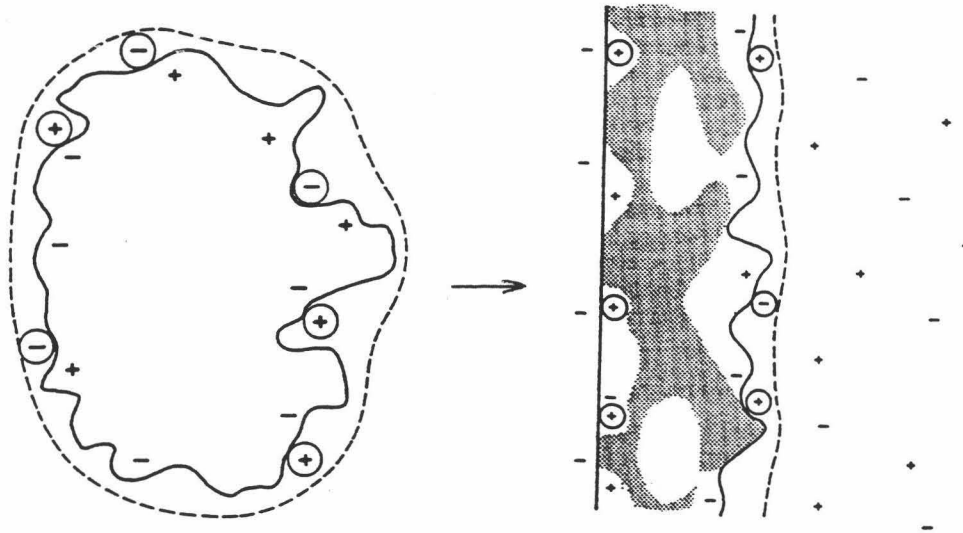


Fig. III.5. Adsorción de una proteína sobre una superficie sólida. Los iones aparecen como círculos con su carga; las zonas sombreadas representan partes hidrofóbicas de la proteína y en la línea discontinua situamos el plano de deslizamiento hidrodinámico.

Por tanto, los principales factores que hacen que la ecuación III.1 sea negativa son:

i) La deshidratación de las partes hidrofóbicas del adsorbente y de la proteína. Por lo general, cuanto mayor es el grado de hidrofobicidad de la superficie sólida, mayor afinidad tendrá la proteína por adsorberse. Aunque esta afirmación tiene sus excepciones para ciertas proteínas; por su naturaleza, estas macromoléculas son anfipolares y pueden mostrar una afinidad máxima en superficies de polaridad intermedia [9]. Se considera que cuanto mayor es el número y el tamaño de las zonas hidrofóbicas de la proteína que están expuestas al medio acuoso mayor será la tendencia de la macromolécula a adsorberse sobre un sustrato hidrofóbico.

ii) Cambios estructurales en la molécula proteica. Las partes hidrofóbicas de la proteína que, en su estado nativo, estaban en el interior de la molécula pueden quedar expuestas hacia la superficie sólida donde también están protegidas del contacto de las moléculas de agua. Esta reorganización estructural se producirá más fácilmente en proteínas donde la estructura compacta esté estabilizada por la interacción hidrofóbica intramolecular; como esta interacción

favorece la formación de estructuras secundarias, un pérdida de interacción hidrofóbica intramolecular originará una reducción en el contenido de hélices y láminas plegadas, dando lugar a un aumento de la libertad rotacional de ciertas partes de la cadena polipeptídica.

iii) La redistribución de grupos cargados de la proteína. Su efecto en la disminución, o en el aumento, de la energía de Gibbs durante el proceso de la adsorción depende de las condiciones eléctricas de la superficie adsorbente y de la proteína. No obstante, no tiene un efecto muy acusado sobre  $\Delta_{ads}G$ .

iv) La adsorción de pequeños iones en la interfase sustrato-proteína. Su importancia dependerá del tamaño y carga del ion considerado; por lo general, la incorporación de iones pequeños a esta interfase, más apolar, está químicamente desfavorecida [10,11], aunque la contribución electrostática sí favorece este aporte de iones.

Una cuestión que ha sido planteada por diferentes autores es la referente a la reversibilidad de la adsorción y a la aplicabilidad de la termodinámica clásica para obtener las variaciones de S, H y G del proceso. La confusión sobre la reversibilidad surge al considerar algunas de las características que se han observado en varios procesos de desorción proteica: a) la proteína adsorbida no se desorbe por dilución, o en el caso de que se produjese sólo afecta a una pequeña fracción; b) el cambio de las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, etc) puede producir una mayor desorción de proteína; c) existe un intercambio de moléculas entre proteínas adsorbidas con aquellas que están disueltas en el medio; y, d) se sabe con certeza que durante la adsorción se producen cambios conformacionales en la proteína [12,13]; sin embargo, tras la desorción las moléculas pueden no mantener su conformación original.

Este último punto ha sido verificado por diferentes autores: Norde y col [14,15], tras desorber albúmina de varios sustratos, han encontrado una reducción del 10 % en el contenido de  $\alpha$ -hélices en comparación con su estructura original; Chan y Brash [16] encontraron reducciones de hasta el 50 % trabajando con fibrinógeno; por último, Soderquist y Walton [17], comprobaron que las proteínas desorbidas mostraban una menor tendencia a readsorberse tras el cambio de configuración estructural.

Por tanto, el proceso general de adsorción proteica conduce a un cambio estructural irreversible en la molécula de proteína. No obstante, la extensión con que ésta se produce depende principalmente de la naturaleza de la proteína actuando la superficie del adsorbente como un catalizador de la transición estructural. Por ello, la aplicabilidad de las ecuaciones termodinámicas clásicas para procesos reversibles

$$\frac{\delta \Delta G}{\delta T} = -\Delta S \quad y \quad \frac{\delta (\Delta G/T)}{\delta T} = -\frac{\Delta H}{T^2} \quad (III.2)$$

no pueden ser aplicadas. Norde y Lyklema [18] han realizado un profundo estudio sobre este tema y desarrollan una complicada estrategia para poder conocer tales parámetros termodinámicos; sin embargo, ha sido materialmente imposible poder llevarla a cabo en nuestros laboratorios, ya que es necesario realizar medidas microcalorimétricas del proceso de adsorción.

### III.3. ADSORCIÓN Y DESORCIÓN DE F(ab')<sub>2</sub>. COVALENCIA.

Todas las isothermas de adsorción se realizaron siguiendo el procedimiento que se describe a continuación. Hubo cinco características experimentales que se mantuvieron constantes en todas las adsorciones: a) el área total de superficie polimérica añadida (0.3 m<sup>2</sup>); b) el volumen final de muestra (10 ml); c) la fuerza iónica del medio (0.002); d) la temperatura de incubación (25°C); y e) el tiempo de incubación (4 horas). Este último parámetro no es demasiado crítico una vez que se ha superado un límite inferior de tiempo. Varios estudios que se han realizado previamente en nuestro departamento sobre cinéticas de adsorción de proteínas (IgG y BSA) indican que el proceso ocurre muy rápidamente, observándose que no hay variación alguna en la cantidad de proteína que se adsorbe para tiempos de adsorción superiores a 3 minutos [19,20]. Con respecto a la temperatura de incubación sí se llegaron a realizar ciertas experiencias comparativas a 0°C y a 25°C pero no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de F(ab')<sub>2</sub> adsorbida.

Para cuantificar la proteína que quedaba adsorbida sobre las partículas se llevó a cabo un método analítico indirecto. Sobre una disolución tamponada se añadía un volumen determinado de una disolución patrón de F(ab')<sub>2</sub>, de tal forma que nos quedara un volumen final de 10-x ml (siendo x los ml de látex que posteriormente se añadirían). Luego se medía la Absorbancia de esta disolución a λ=280 nm; sabiendo que el coeficiente de extinción de nuestra proteína es Σ = 1.48 ml mg<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> podremos calcular la cantidad inicial de proteína añadida a través de la Ley de Lambert-Beer. Tras añadir los 0.3 m<sup>2</sup> de látex y una vez transcurrido el tiempo de incubación, se sometía al sistema a dos procesos consecutivos para retirar las partículas poliméricas del medio:

- Un proceso de *centrifugación* (30 min), en el que la fuerza centrífuga que se aplica variaba en función del tamaño de las partículas de látex, siendo de 32000 g para los

látex más pequeños y de 18000 g para el JL10. La centrifuga empleada fue de la casa Kontron Instruments (modelo Centrikon T-124). Tras la centrifugación se tomaba el sobrenadante y se sometía a

- un proceso de *filtración* para eliminar posibles partículas de poliestireno que aún pudieran quedar en disolución. El diámetro de poro de los filtros empleados (Millipore) fue de 0.1  $\mu\text{m}$  para los látex JL1, JL2 y JL8, y de 0.2  $\mu\text{m}$  para el resto. La principal característica del material que constituye la membrana (difluoruro de polivinilideno) es que presenta una bajísima afinidad frente a la adsorción de proteínas, condición necesaria para que este proceso de filtrado no interfiera negativamente en nuestros cálculos.

Finalmente se volvía a medir espectrofotométricamente la concentración de  $\text{F(ab')}_2$  disuelta en el sobrenadante y por diferencia con la cantidad inicial añadida se calcula la que queda adsorbida sobre la superficie del látex.

Se realizaron las adsorciones sobre todos los látex exceptuando el JL3; esta decisión se tomó considerando que para estudiar la influencia de la naturaleza de los grupos carboxilos, y la magnitud de su densidad superficial de carga de los látex carboxilatados, era suficiente realizar la experimentación con los látex JL4 y JL7.

#### **Influencia de la cantidad inicial añadida ( $J_n$ ).**

Las primeras experiencias se centraron en ver qué cantidad de  $\text{F(ab')}_2$  se adsorbe cuando se añaden distintas cantidades iniciales de proteína. De todas estas isothermas se pueden destacar dos características principales:

- La cantidad máxima de adsorción ( $J_{pl}$ ); por lo general, el proceso de adsorción de proteínas es de tipo Langmuir, alcanzándose un valor máximo y constante una vez que se ha saturado de moléculas la superficie polimérica ("plateau" de la adsorción).
- La afinidad de la adsorción. Un parámetro que nos va a ser útil para conocer de manera cualitativa la afinidad del proceso es la forma que tiene la curva de adsorción antes de llegar al "plateau". Si en una representación  $J_{ads}$  frente a  $J_n$  la pendiente del tramo inicial vale 1 hasta que se alcanza el máximo ( $J_{pl}$ ) la isoterma será de alta afinidad; a medida que el valor de esta pendiente se aleja de la unidad la afinidad de la proteína por la superficie disminuirá.

En las Figuras III.6-9 aparecen los resultados obtenidos con nuestros látex

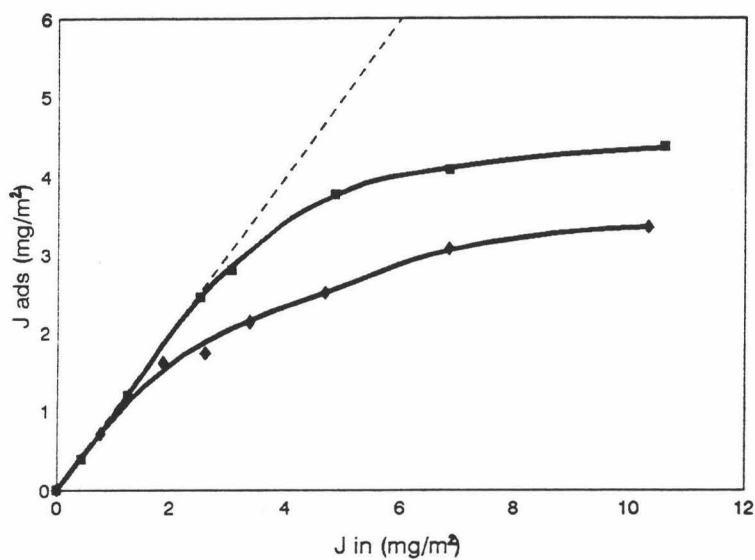


Fig. III.6. Isothermas de adsorción del látex JL1 a pH5 (■) y pH7 (◆).

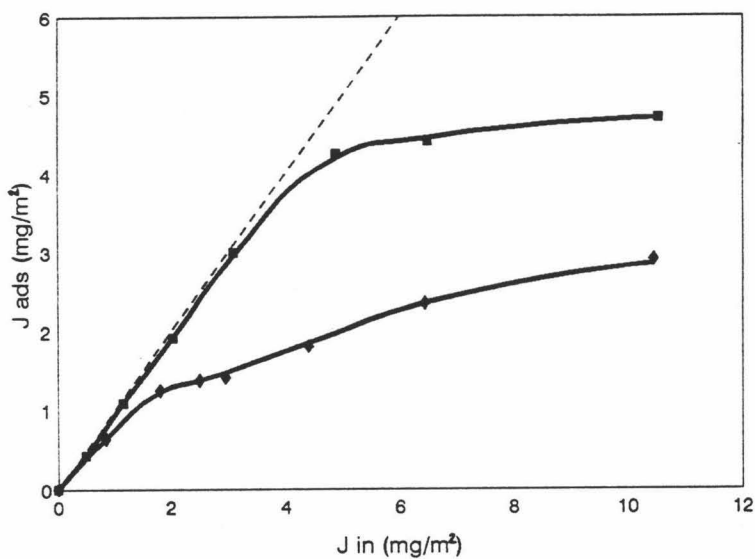


Fig. III.7. Isothermas de adsorción del látex JL2 a pH5 (■) y pH7 (◆).



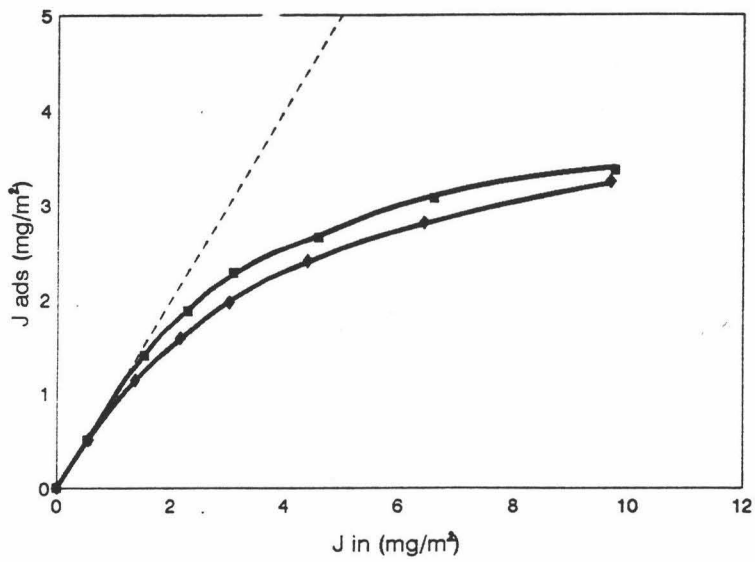


Fig. III.8. Isothermas de adsorción de los látex JL4 (■) y JL7 (◆) a pH7.

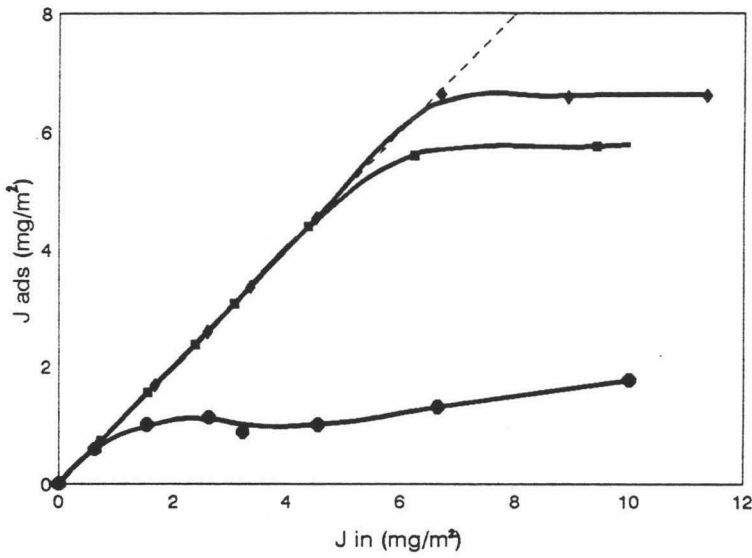


Fig. III.9. Isothermas de adsorción del látex JLB a pH5 (■) y pH7 (◆), y del látex JL10 a pH7 (●).

Si tenemos en cuenta que las dimensiones de la F(ab')<sub>2</sub> son 142 x 38 x 38 Å<sup>3</sup> [21], cuando el ángulo entre los brazos Fab es de 180°, podremos ver que el valor de una monocapa de moléculas dispuestas de esta forma es de 3.2 mg/m<sup>2</sup>. Por los resultados que hemos obtenido podemos decir que no se forman multicapas de proteína sobre las superficies poliméricas. El que existan valores de J<sub>pi</sub> superiores al teórico no nos debe llevar a concluir que existan bicapas proteicas, sino que puede ser que la F(ab')<sub>2</sub> se haya adsorbido de forma preferencial en otra orientación diferente a la esquematizada con anterioridad.

Si comparamos los resultados de los látex JL1 y JL2 podremos ver que en ambos casos existe una mayor adsorción a pH5 que a pH7. La justificación la encontramos en la interacción electrostática entre las partículas y las moléculas proteicas; a pH neutro ambas partes poseen carga negativa lo que conduce a una repulsión en condiciones de baja fuerza iónica (donde no hay efecto de apantallamiento de cargas). Pero debemos destacar que aún en estas condiciones desfavorables hay adsorción de F(ab')<sub>2</sub>, hecho que confirma que la interacción hidrofóbica es la predominante en la adsorción proteica sobre superficies de poliestireno. También cabe destacar que el látex más cargado (JL2) es el que menos cantidad de proteína adsorbe a pH7, resultado que refuerza la idea de la repulsión eléctrica. Además la afinidad de la adsorción a pH neutro es bastante baja en comparación con las adsorciones realizadas a pH5, (que si recordamos es un pH situado en el intervalo de pI del fragmento F(ab')<sub>2</sub>

Sobre los látex carboxilatados, las isotermas de adsorción se llevaron a cabo sólo a pH7. También podemos ver aquí que el látex con menor densidad de carga es el que más proteína adsorbe; además encontramos que la afinidad de la adsorción es algo menor en el látex más cargado (JL7).

Si seguimos analizando resultados podemos ver que el látex JL8 adsorbe una gran cantidad de F(ab')<sub>2</sub> a los 2 pHs estudiados; además estas isotermas son de muy alta afinidad. La explicación no debemos buscarla únicamente en la atracción eléctrica pues, aunque puede existir a pH7, a pH5 la mayoría de nuestras macromoléculas presentan carga neta nula. Si recordamos que en el capítulo de caracterización ya se demostró que el látex JL8 es el que tiene el mayor grado de hidrofobicidad, a partir de estos resultados de adsorción podemos afirmar que la principal interacción que dirige las adsorciones es de tipo hidrofóbico. Esta afirmación se consolida con los resultados obtenidos con el látex más hidrofílico (JL10) donde J<sub>pi</sub> = 1.0 mg/m<sup>2</sup>.

Ya que en las adsorciones hemos empleado sólo una proteína pero diferentes superficies poliméricas es obvio que la naturaleza de éstas influye de forma decisiva tanto en la cantidad

que se adsorbe como en la afinidad del proceso. Por tanto, podemos concluir que la deshidratación de las partes hidrofóbicas del látex es el mecanismo que causa un mayor descenso en el valor de  $\Delta_{ads}G$ . A su vez, la composición de la subfase también condiciona la extensión con que se producen reorganizaciones estructurales en la proteína adsorbida [22].

Como apuntábamos anteriormente, puede haber confusión sobre la reversibilidad o irreversibilidad de la adsorción proteica y aunque parece ser que la mayoría de autores están de acuerdo sobre la irreversibilidad del proceso, existen otros con diferente punto de vista. Por ejemplo, Chatteraj y col. [23,24] realizan un estudio termodinámico clásico para la adsorción de diferentes proteínas sobre superficies de distinta naturaleza. Ellos consideran que existe un equilibrio entre la proteína que se encuentra adsorbida en la interfase ( $J_{ads}$ ) y la que permanece en la disolución ( $C_p$ ). Haciendo uso de los trabajos de Bull [25,26] llegan a la siguiente expresión

$$\Delta G_B^\circ = \frac{RT}{J_{ads}} \left[ - \int_0^1 \frac{J_{ads}}{X_p} dX_p + J_{ads} \ln X_p \right] \quad (III.3)$$

donde  $\Delta G_B^\circ$  es la variación energía libre standard para la transferencia de un mol de proteína desde la disolución hasta la superficie cuando la fracción de soluto en la disolución ( $X_p$ ) cambia desde 0 hasta 1. El valor de  $\Delta G_B^\circ$ , que incluye todos los posibles efectos que intervienen en la adsorción (químicos, electrostáticos, etc), puede calcularse para cada uno de nuestros sistemas a partir de las isotermas; se mediría la cantidad de proteína adsorbida en la superficie ( $J_{ads}$ ) que está en equilibrio con la concentración de proteína que permanece libre en la disolución ( $C_p = X_p/55.55$ ) y posteriormente se realizaría la anterior integral de forma numérica. Los valores de  $\Delta G_B^\circ$  así obtenidos se muestran en la Tabla III.2. Como vemos, la variación de esta energía libre no depende del valor de la máxima cantidad de proteína adsorbida ( $J_{pi}$ ). Aunque  $J_{pi}$  varíe de forma apreciable según sea la naturaleza del soporte o el pH del medio,  $\Delta G_B^\circ$  es bastante insensible al cambio de los parámetros fisicoquímicos [23]. Sin embargo, sí está relacionado con la afinidad de la adsorción. A medida que ésta es mayor, la disminución del potencial de Gibbs se hace más acusada.

Si conocemos el número máximo de sitios superficiales accesibles a las moléculas de

proteína (a través de  $J_{pl}$ , en moles/m<sup>2</sup>), podremos calcular  $\Delta G^\circ$  como

$$\Delta G^\circ = J_{pl} \Delta G_B^\circ \quad (III.4)$$

Esta variación de energía se corresponde con la afinidad máxima que presenta una superficie para producir la saturación de ésta por la adsorción de F(ab')<sub>2</sub> cuando la fracción molar de la proteína en la disolución pasa, hipotéticamente, de 0 a 1. Los valores obtenidos para  $\Delta G^\circ$  también se muestran en la Tabla III.2.

Látex	$\Delta G_B^\circ$ (kJ/mol)	$J_{pl}$ (mg/m <sup>2</sup> )	$\Delta G^\circ$ (10 <sup>7</sup> kJ/m <sup>2</sup> )
<b>JL1</b> (pH 5)	- 53.9 ± 0.3	4.4 ± 0.1	- 23 ± 1
JL1 (pH 7)	- 50.4 ± 0.3	3.4 ± 0.2	- 17 ± 1
<b>JL2</b> (pH 5)	- 55.0 ± 0.4	4.7 ± 0.1	- 25 ± 1
JL2 (pH 7)	- 47.6 ± 0.8	3.0 ± 0.4	- 16 ± 2
<b>JL4</b> (pH 7)	- 52.5 ± 0.5	3.4 ± 0.2	- 17 ± 1
<b>JL7</b> (pH 7)	- 50.2 ± 0.5	3.2 ± 0.3	- 16 ± 2
<b>JL8</b> (pH 5)	- 69.0 ± 0.6	5.8 ± 0.2	- 40 ± 1
JL8 (pH 7)	- 80.8 ± 0.7	6.6 ± 0.1	- 52 ± 1
<b>JL10</b> (pH 7)	- 45.5 ± 0.8	1.5 ± 0.2	- 7 ± 1

Tabla III.2. Valores de la disminución de la energía de Gibbs en la adsorción de F(ab')<sub>2</sub> sobre nuestros látex.

Como se ve, la mayor variación (en valor absoluto) tanto de  $\Delta G_B^\circ$  como de  $\Delta G^\circ$  se produce en el látex más hidrofóbico (JL8) y es en el látex más hidrofílico (JL10) donde la espontaneidad de la adsorción es menor. Sin embargo, debemos recordar que todos estos datos se han obtenido considerando que el proceso transcurre por vía reversible, presunción que es bastante cuestionable.

Los autores citados anteriormente también realizaron isotermas de adsorción a distintas temperaturas y así obtienen los parámetros entálpicos y entrópicos de la adsorción proteica

haciendo uso de las ecuaciones III.2.

Siguiendo con la reversibilidad del proceso tenemos que decir que ésta depende principalmente de la estructura de la proteína empleada. Existen pequeñas proteínas globulares de estructura compacta ("hard" proteins), que se caracterizan por poseer una compresibilidad adiabática pequeña y una alta tendencia a mantener su configuración original o nativa bajo diferentes condiciones externas [27,28]. La adsorción de este tipo de proteínas (lisozima, quimotripsinógeno, ribonucleasa,  $\alpha$ -lactoalbúmina, etc) podría ser reversible. Por lo menos así lo consideran Roth y Lenhoff [29] en un reciente trabajo en el que proponen un modelo para calcular, por vía computacional, la constante de equilibrio entre la proteína adsorbida en la superficie y la que se encuentra libre en disolución ( $K_{eq} = C_s/C_p$ ). Este modelo hace uso de las contribuciones electrostáticas y de van der Waals, y sólo es aplicable en condiciones donde la superficie tiene un bajo recubrimiento proteico. A baja fuerza iónica, estos autores obtienen valores de  $K_{eq}$  muy elevados ( $\approx 10^6 - 10^8$ ) en situaciones de atracción eléctrica, lo cual se corresponde con valores de  $\Delta_{ads}G \approx -40$  kJ/mol. En ausencia de esta interacción atractiva obtienen valores de  $K_{eq} = 10 - 100$  ( $\Delta_{ads}G \approx -10$  kJ/mol).

No obstante, el fragmento  $F(ab')_2$  pertenece al grupo de proteínas blandas ("soft" proteins) como lo son la IgG, hemoglobina, albúmina de suero bovina (BSA), etc. En ellas sí hay cambios estructurales importantes durante la adsorción que pueden llegar a hacer irreversible el proceso. Por ello, los resultados que hemos obtenido a partir de la ecuación III.3 podrían cuestionarse, al menos desde un punto de vista cuantitativo. Sin embargo, sí proporcionan una información cualitativa o semicuantitativa. También hemos querido comparar nuestros valores con los resultados teóricos que obtienen Lu y col. [30]. Estos autores realizan un cálculo teórico sobre las energías de solvatación y de tipo van der Waals que se ponen en juego en la adsorción del fragmento Fab sobre diferentes sustratos. Cuando la superficie adsorbente es poliestireno, obtienen una energía de adsorción media de -411 kJ/mol; cuando la adsorción (teórica) se lleva a cabo sobre una superficie de poliHEMA obtienen un valor de -174 kJ/mol. Al menos, la tendencia de nuestros resultados es similar, ya que en ausencia de interacción electrostática los látex de poliestireno producen una variación de la energía de Gibbs de  $-63 \pm 12$  kJ/mol, mientras que en el látex de poliestireno y poliHEMA (JL10) su valor es de  $-45 \pm 1$  kJ/mol.

#### **Dependencia de la máxima cantidad adsorbida frente al pH.**

La siguiente paso que se dio fue estudiar la variación del valor de  $J_{pi}$  cuando se realizaban

las isothermas a diferentes pHs. En las Figuras III.10-12 aparecen los resultados experimentales obtenidos.

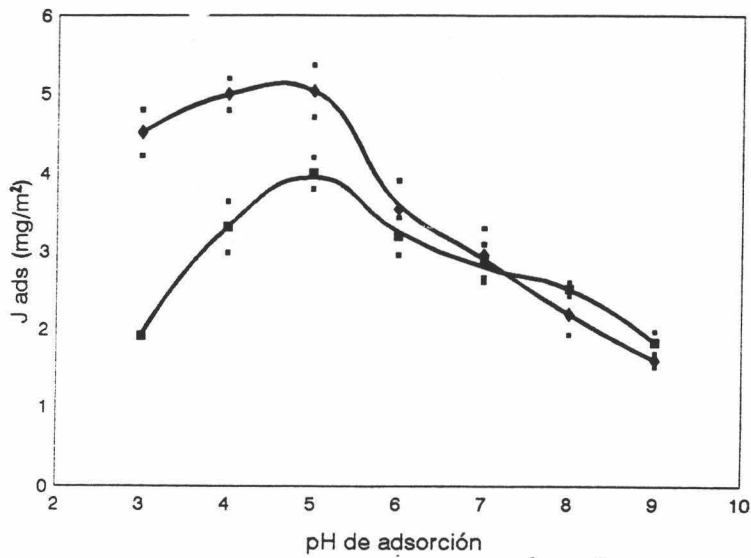


Fig. III.10. Dependencia de  $J_{pi}$  frente al pH de adsorción para los látex JL1 (■) y JL2 (◆).

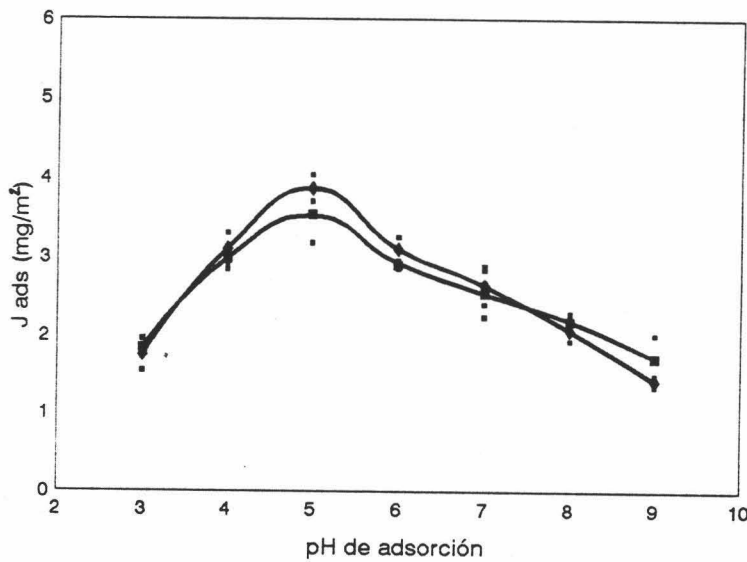


Fig. III.11. Dependencia de  $J_{pi}$  frente al pH de adsorción para los látex JL4 (■) y JL7 (◆).

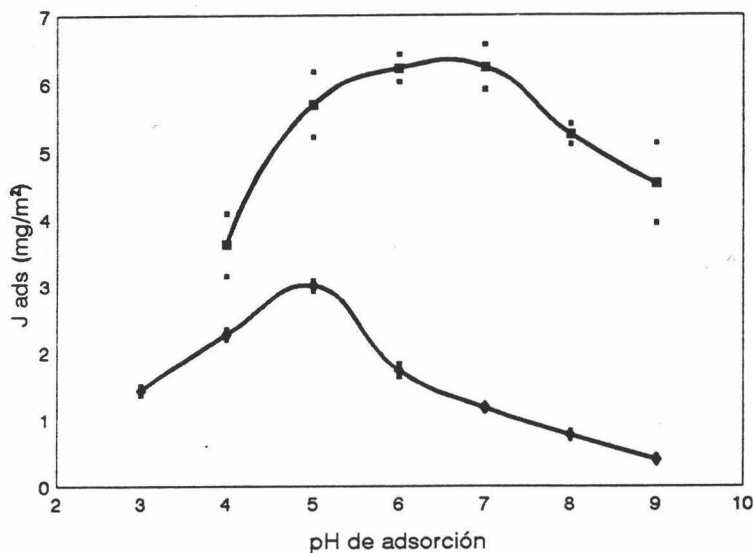


Fig. III.12. Dependencia de  $J_{pi}$  frente al pH de adsorción para los látex JL8 (■) y JL10 (◆).

De los resultados obtenidos merece la pena destacar las siguientes conclusiones:

- En los látex aniónicos se alcanza el máximo grado de recubrimiento proteico cuando el pH del medio es 5. En dicho pH la mayoría de las moléculas de proteína tienen carga nula; recordemos que el punto isoeléctrico de la  $F(ab')_2$  está comprendido entre 4.6 y 6.0. Por tanto la proteína posee una conformación más compacta, favoreciendo la adsorción de dos maneras: Por un lado, cada molécula ocupa menos área, luego podrá adsorberse más proteína por unidad de área que en otras condiciones en las que las moléculas estuviesen más extendidas. Por otro lado, la variación de entropía configuracional de la proteína (al pasar de este estado compacto al adsorbido) es mayor que si originalmente tuviese una estructura más expandida, como ocurriría a pHs fuera de su pl. Numerosos autores [31-34] han observado un máximo de adsorción en la región del punto isoeléctrico de diferentes proteínas.
- Para el látex catiónico, el máximo de adsorción (pH7) se encuentra ligeramente desplazado del pl de la  $F(ab')_2$ . Este resultado también lo obtiene Norde [15] trabajando con BSA y con un látex positivamente cargado. Este hecho nos indica que, además de la interacción entrópica, la interacción electrostática también influye en la extensión con que se

produce la adsorción. De hecho, en los látex aniónicos, especialmente el JL2 y el JL10, hay una mayor adsorción a pH4, (donde las macromoléculas ya poseen una carga global positiva), que a pH6 (límite del intervalo de pl).

- En situaciones de pH alejadas del pl, la proteína posee una carga neta que le hace estar en disolución de una forma más expandida. Por tanto, la variación de entropía configuracional entre este estado y el adsorbido no debe ser muy elevada. Además, en aquellos pHs donde también hay repulsiones de tipo electrostático entre proteína y superficie (pH > 6 en látex aniónicos y pH < 5 en el catiónico) sigue produciéndose la adsorción proteica de un modo espontáneo. La justificación de este hecho la encontramos en la deshidratación de las partes hidrofóbicas del látex. Fijémonos como en el látex más hidrofílico (JL10) los valores de  $J_{pl}$  a pHs > 6 son muy pequeños en comparación con los demás látex. Suzawa y Shirahama [35] obtienen resultados muy similares cuando adsorben IgG sobre látex de poliHEMA. Este mecanismo de deshidratación se confirma con los resultados de la alta cantidad de F(ab')<sub>2</sub> que se adsorbe sobre el látex más hidrofóbico a pH4.

- Otro mecanismo que también tiene lugar en la adsorción proteica, y que aún no hemos comentado, es la interacción lateral que existe entre las moléculas de proteína situadas en la superficie. Esta contribución es extremadamente importante como para ser despreciada tal y como lo demuestran Johnson y col. [36] en un reciente trabajo en el que desarrollan un modelo teórico para cuantificar la interacción lateral proteína-proteína. No obstante, Norde y col. [14,37,38] concluyen que la reducción de  $J_{pl}$  a ambos lados del pl de la proteína se debe más a la influencia de la reestructuración conformacional de las macromoléculas que se adsorben que a la repulsión lateral que existe entre ellas.

#### Desorción de F(ab')<sub>2</sub>.

Las experiencias de desorción se llevaron a cabo con el fin de estudiar qué cantidad de proteína se desorbe al resuspender el sistema en diferentes condiciones. Se sabe que la extensión con que se produce la desorción depende del tiempo de adsorción [39-41]. El proceso de adsorción, como cualquier otro, es un fenómeno cinético. El coeficiente de difusión de la proteína condiciona la velocidad de la reacción de contacto inicial entre la superficie sólida y la macromolécula. No obstante, una vez realizado el contacto, la proteína comienza a sufrir cambios estructurales que hacen que la molécula se expanda en cierta medida sobre la superficie polimérica, estableciéndose más contactos con la subfase a través de nuevos segmentos proteicos que quedan expuestos hacia ella. Por tanto, los lentos fenómenos cinéticos que ocurren después de la adsorción inicial van a tener una gran importancia. Véase Figura III.13.



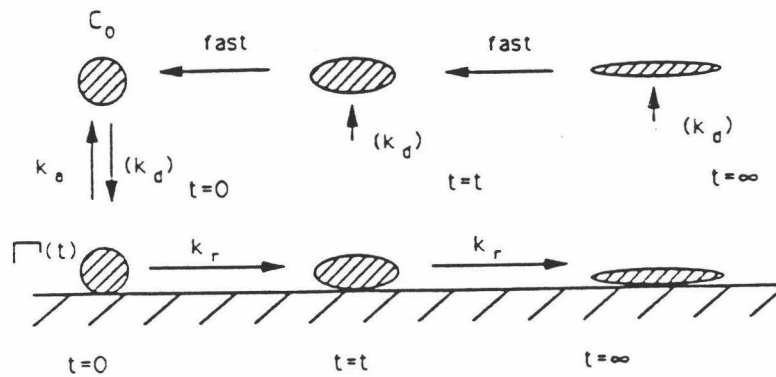


Fig. III.13. Esquema de un modelo cinético de adsorción - desorción [40].

Para unificar las condiciones experimentales realizamos las desorciones sobre las muestras una vez transcurridas las 4 horas de incubación del proceso de adsorción. Posteriormente se centrifugaron, se retiraron los sobrenadantes y las partículas se redispersaban en 5 ml del medio de desorción. Se dejaban incubar a 25°C durante 15 - 20 horas y transcurrido este tiempo se volvían a repetir los pasos de centrifugación y filtrado para así calcular la cantidad de proteína que se había desorbido.

Se idearon varias experiencias para sacar la máxima información posible del proceso de la desorción. Por ejemplo, las muestras de las isothermas de adsorción del látex JL8 (Figura III.9) sufrieron el proceso de desorción en condiciones de alta fuerza iónica ( $I = 0.50$ ) manteniendo el pH de la adsorción. De esta forma se elimina toda interacción de tipo electrostático. En la Figura III.14 podemos ver el efecto que produce este apantallamiento de carga en la desorción de  $F(ab')_2$ . Como puede verse, existe una gran cantidad de proteína que inicialmente está adsorbida a través de interacciones eléctricas con la superficie catiónica. Este efecto es más acusado en pH neutro donde proteína y látex tienen carga opuesta. Ambas series (la de pH5 y la de pH7) alcanzan el mismo valor de cantidad de proteína que permanece adsorbida sobre la superficie tras la desorción. Además este valor final de  $J_{pl}$  que

se obtiene está próximo al valor teórico de una monocapa de F(ab')<sub>2</sub> (3.2 mg/m<sup>2</sup>).

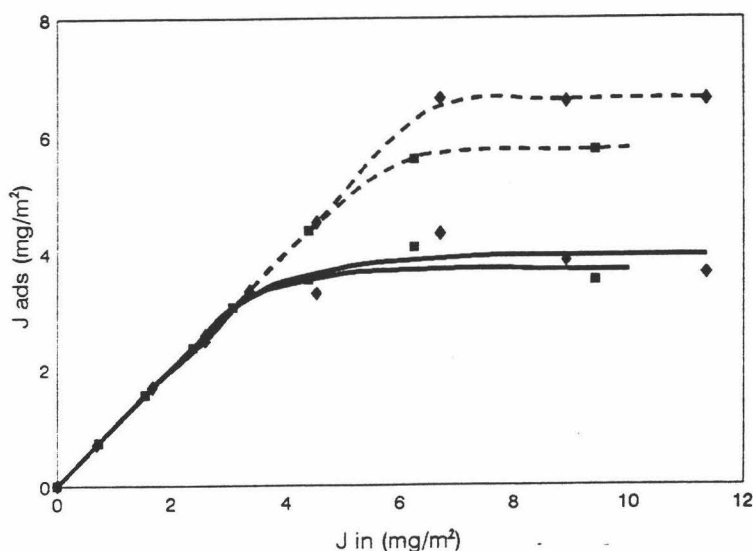


Fig. III.14. Complejos JLB-F(ab')<sub>2</sub>. Línea discontinua: adsorción inicial a pH5 (■) y pH7 (◆). Línea continua: tras desorción en 500 mM de KBr a pH5 (■) y pH7 (◆).

Cabe destacar que apenas se produce desorción en las muestras que no presentan un total recubrimiento de proteína. Este resultado es general para todos los demás látex. A bajo y medio recubrimiento las interacciones laterales proteína-proteína no existen o son muy débiles; como consecuencia, durante la adsorción pueden producirse una mayor deformación o expansión de la proteína sobre la superficie, estableciéndose así un mayor número de contactos entre segmentos proteicos y la subfase polimérica que favorecen la irreversibilidad del proceso. Por ello las experiencias que se realizaron posteriormente se llevaron a cabo con partículas de látex recubiertas con F(ab')<sub>2</sub> en condiciones de saturación superficial.

Otra variable que se estudió fue el efecto que causa la variación del pH cuando se mantiene constante la fuerza iónica del medio. En las Figuras III.15-19 aparecen las cantidades de F(ab')<sub>2</sub> que permanecen unidas a la superficie después de resuspender en pH8 muestras de látex que presentaban máximo recubrimiento proteico. Las muestras de las que partimos son

las que se mostraron anteriormente en las Figuras III.10-12. Como se ve, las cantidades iniciales de  $F(ab)_2$  de cada lote variaban en función del pH en que se realizó la adsorción. Estas experiencias se llevaron a cabo en los látex aniónicos.

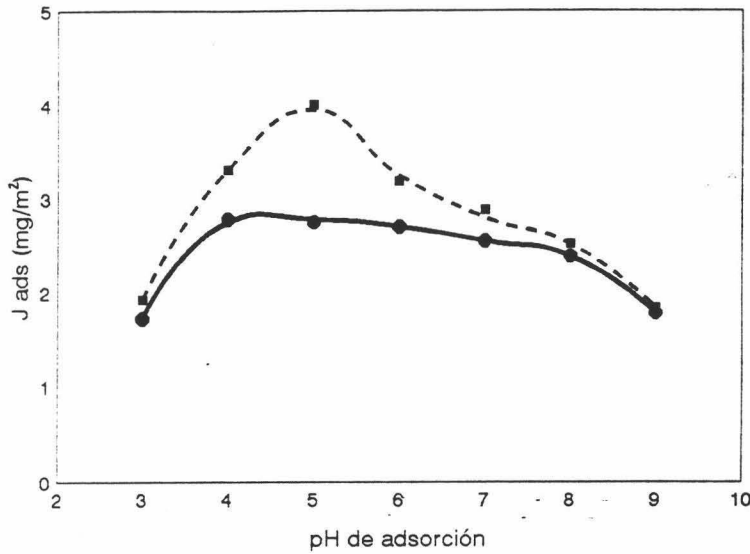


Fig. III.15. Línea discontinua: cantidad de  $F(ab)_2$  adsorbida a diferentes pHs en el látex JL1. Línea continua: cantidad que permanece adsorbida tras la resuspensión de las muestras anteriores en pH8 ( $I = 0.002$ ).

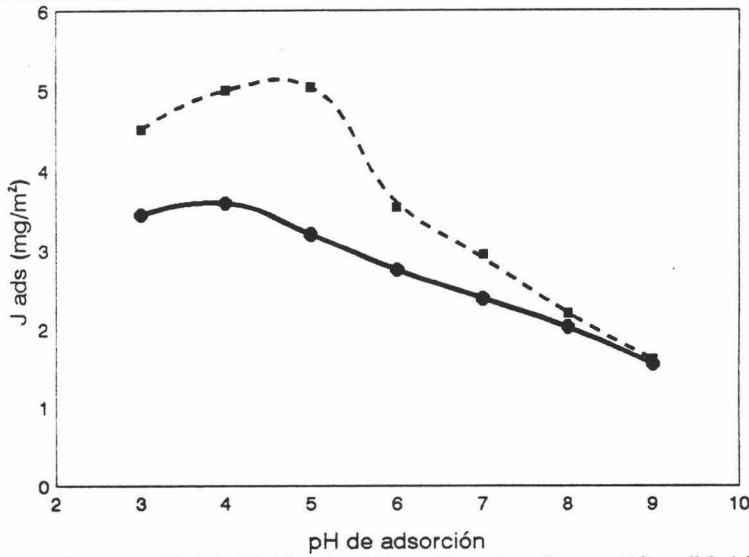


Fig. III.16. Línea discontinua: cantidad de  $F(ab)_2$  adsorbida a diferentes pHs en el látex JL2. Línea continua: cantidad que permanece adsorbida tras la resuspensión de las muestras anteriores en pH8 ( $I = 0.002$ ).

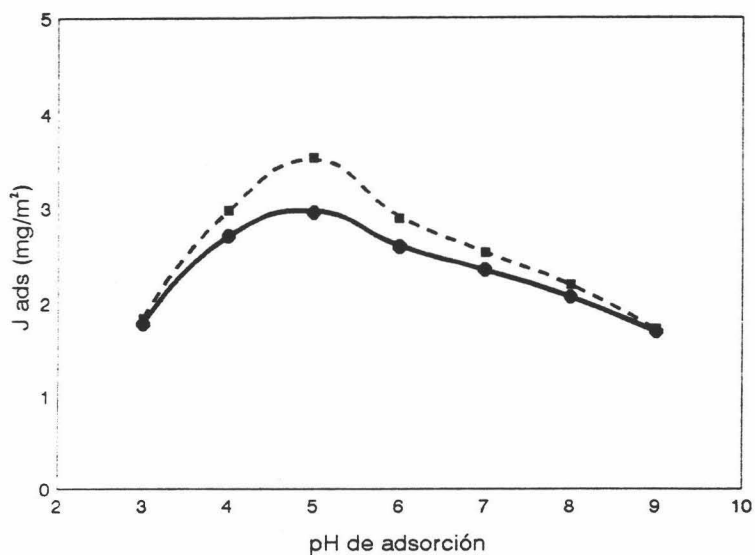


Fig. III.17. Línea discontinua: cantidad de F(ab')<sub>2</sub> adsorbida a diferentes pHs en el látex JL4. Línea continua: cantidad que permanece adsorbida tras la resuspensión de las muestras anteriores en pH8 (I = 0.002).

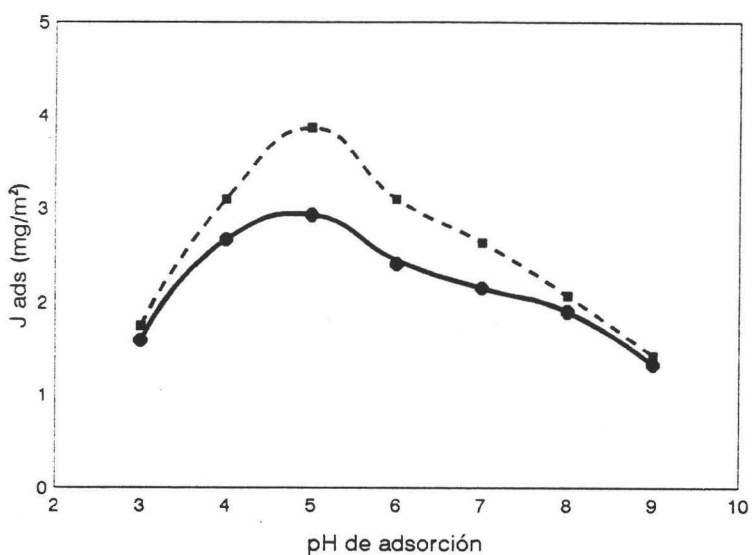


Fig. III.18. Línea discontinua: cantidad de F(ab')<sub>2</sub> adsorbida a diferentes pHs en el látex JL7. Línea continua: cantidad que permanece adsorbida tras la resuspensión de las muestras anteriores en pH8 (I = 0.002).

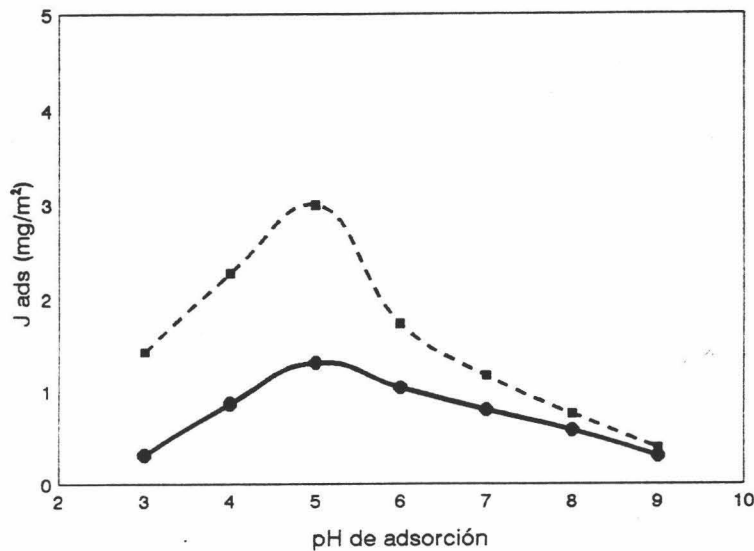


Fig. III.19. Línea discontinua: cantidad de  $F(ab')_2$  adsorbida a diferentes pHs en el látex JL10. Línea continua: cantidad que permanece adsorbida tras la resuspensión de las muestras anteriores en pH8 ( $I = 0.002$ ).

Cuando el fragmento  $F(ab')_2$  está en un medio a pH8 posee una carga neta negativa, pues esta molécula está alejada de su  $pI$  en algo más de 2 unidades de pH. Las repulsiones electrostáticas intramoleculares fuerzan a las macromoléculas a estar algo más expandidas. Además, en este medio el látex y la proteína tienen el mismo signo de carga. Los efectos causados por este mecanismo se reflejan en las anteriores figuras. La mayor desorción se produce en los tubos cuya adsorción inicial se llevó a cabo a pH5, donde las moléculas presentan la estructura más compacta y el recubrimiento es de las partículas es mayor. Al cambiar a pH8 aparecen repulsiones electrostáticas y estéricas proteína-proteína, y repulsiones proteína-polímero. Este último mecanismo de repulsión electrostática entre la superficie de látex y la  $F(ab')_2$  se pone de manifiesto de una manera muy clara en el látex más hidrofílico (JL10) y en menor medida en el JL2. Para pHs de adsorción superiores al  $pI$  la extensión con que se produce la desorción disminuye gradualmente. Así, en el paso de pH6 a pH8 se desorbe algo más que en el cambio de pH7 a pH8, y este último algo más que por resuspensión en el mismo pH y por el cambio de pH9 a pH8.

Finalmente se realizaron las siguientes experiencias: Se tomaron dos muestras de cada látex. Las partículas poliméricas se recubrieron con  $F(ab')_2$  realizando la adsorción a pH5 en

una de las muestras y a pH7 en la otra. Posteriormente se sometieron a desorción en 3 condiciones experimentales diferentes: a) resuspendiendo a pH5, b) resuspendiendo a pH8 y c) resuspendiendo a alta fuerza iónica (250 mM en KBr) en el mismo pH donde se realizó la adsorción. Los resultados se muestran en las Figuras III.20-25.

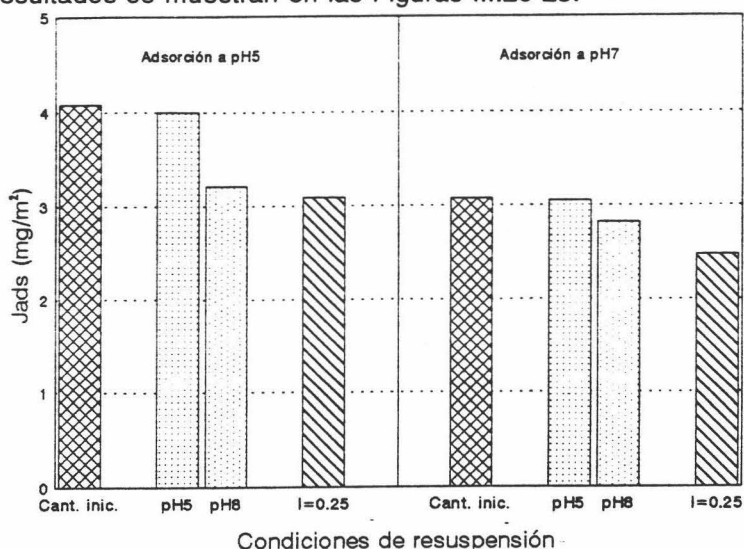


Fig. III.20. Cantidades de F(ab)<sub>2</sub> que permanecen adsorbidas en el látex JL1 tras sufrir desorción en 3 condiciones diferentes. (izquierda) La adsorción inicial se realizó a pH5; (derecha) la adsorción inicial se realizó a pH7.

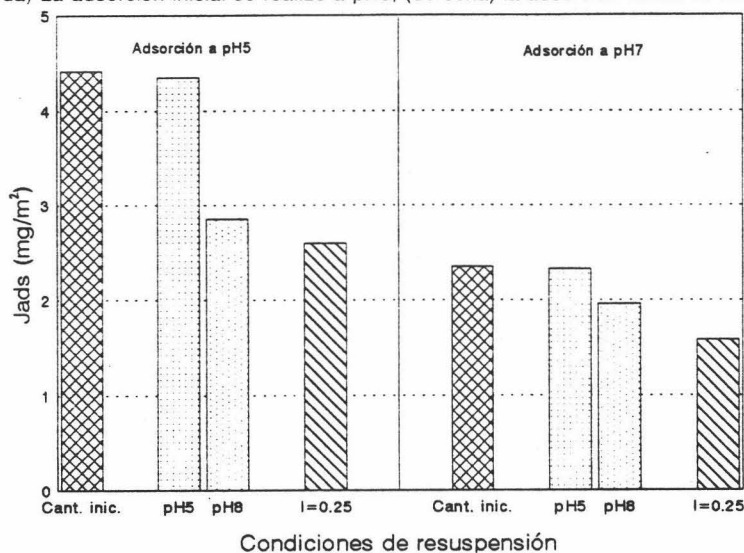


Fig. III.21. Cantidades de F(ab)<sub>2</sub> que permanecen adsorbidas en el látex JL2 tras sufrir desorción en 3 condiciones diferentes. (izquierda) La adsorción inicial se realizó a pH5; (derecha) la adsorción inicial se realizó a pH7.

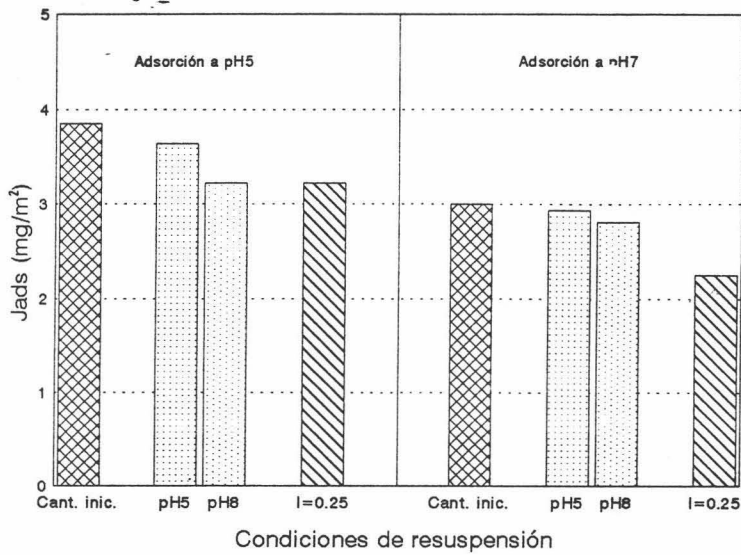


Fig. III.22. Cantidades de F(ab)<sub>2</sub> que permanecen adsorbidas en el látex JL4 tras sufrir desorción en 3 condiciones diferentes. (izquierda) La adsorción inicial se realizó a pH5; (derecha) la adsorción inicial se realizó a pH7.

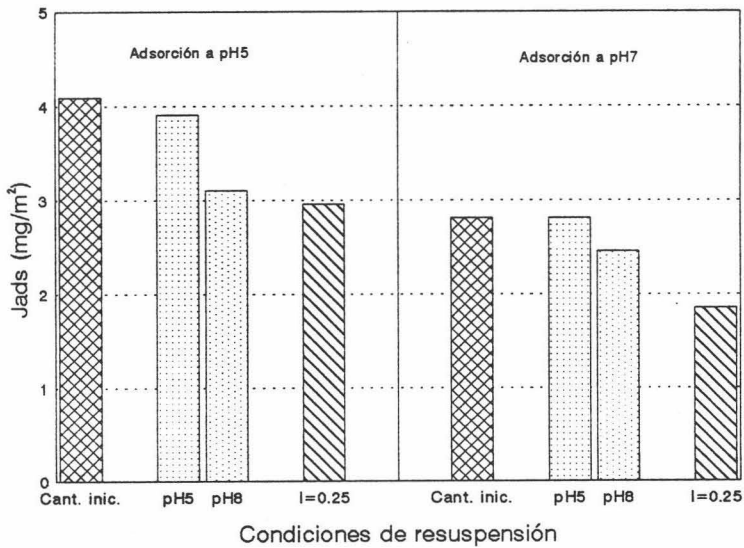


Fig. III.23. Cantidades de F(ab)<sub>2</sub> que permanecen adsorbidas en el látex JL7 tras sufrir desorción en 3 condiciones diferentes. (izquierda) La adsorción inicial se realizó a pH5; (derecha) la adsorción inicial se realizó a pH7.



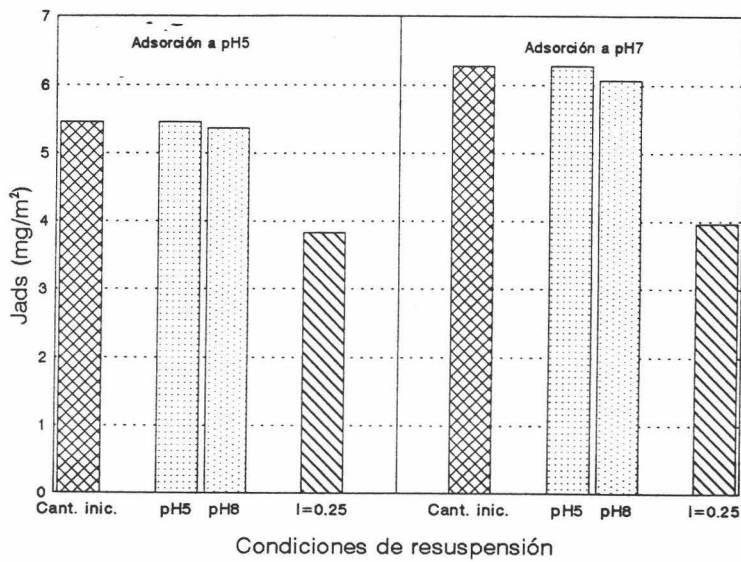


Fig. III.24. Cantidades de F(ab')<sub>2</sub> que permanecen adsorbidas en el látex JL8 tras sufrir desorción en 3 condiciones diferentes. (izquierda) La adsorción inicial se realizó a pH5; (derecha) la adsorción inicial se realizó a pH7.

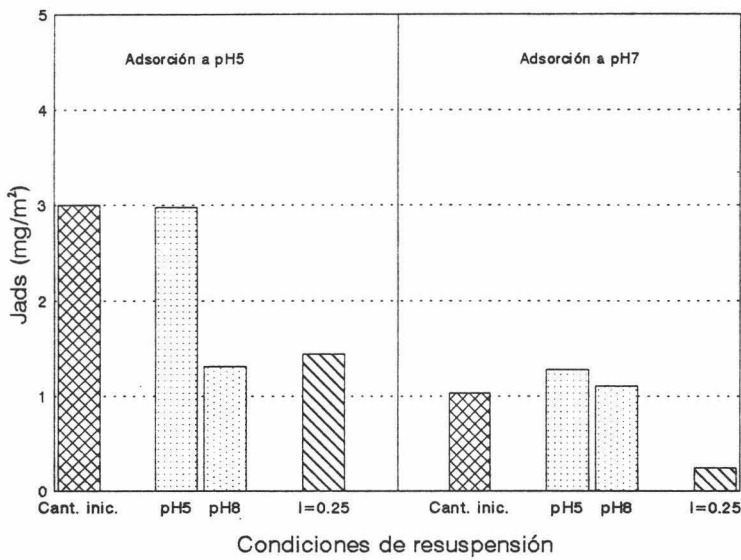


Fig. III.25. Cantidades de F(ab')<sub>2</sub> que permanecen adsorbidas en el látex JL10 tras sufrir desorción en 3 condiciones diferentes. (izquierda) La adsorción inicial se realizó a pH5; (derecha) la adsorción inicial se realizó a pH7.



A partir de todos los resultados de las distintas experiencias de desorción podemos formular las siguientes conclusiones.

- Cuando las adsorciones se realizan a baja fuerza iónica existen importantes interacciones atractivas entre proteína y polímero, pues al resuspender en alta fuerza iónica siempre se produce desorción. En el látex catiónico es donde más claramente se pone de manifiesto este efecto. En los látex aniónicos se desorbe una mayor cantidad de  $F(ab')_2$  cuando el pH del medio coincide con el pI de la proteína que a pH7 (donde las atracciones electrostáticas están desfavorecidas frente a las repulsiones). Parece ser, en vista de los resultados, que en el látex más hidrofílico la interacción de origen eléctrico tiene más importancia que las interacciones de tipo hidrofóbico.

- Si el pH en el que se lleva a cabo la desorción está más cercano al pI de la proteína que el pH de la adsorción inicial, no hay apenas desorción de  $F(ab')_2$ . Sin embargo, si el pH de desorción está más alejado del pI que el pH de la adsorción, sí hay una cantidad de proteína que se desorbe debido a los efectos de repulsión entre proteína-proteína y proteína-superficie.

- Cuanto menor es el grado de recubrimiento inicial, menor es la cantidad de proteína que se puede desorber bajo diferentes condiciones.

- No existe desorción por dilución en el mismo medio donde se realizó la adsorción.

#### **Covalencia de $F(ab')_2$ sobre los látex carboxilados.**

Una de las principales propiedades que poseen los látex carboxilados es que pueden enlazar covalentemente proteínas con su superficie. Esta unión covalente tiene un gran interés en el desarrollo de tests de inmunoensayo basados en la aglutinación de partículas de látex. Entre las ventajas que potencialmente tiene esta unión química frente a la adsorción física están las siguientes:

- La unión covalente de la proteína a la superficie previene la desorción de la misma, aumentando por tanto la vida media del complejo látex-anticuerpo. De esta forma los reactivos pueden ser almacenados durante largos períodos de tiempo.

- Se pueden usar surfactantes para estabilizar las partículas, ya que al no existir adsorción física no puede haber desplazamiento de proteína por las moléculas de tensioactivo que se unen a la superficie.

- Por la misma razón se podrían emplear estos reactivos para detectar ciertos antígenos en disoluciones que tengan surfactantes. Un ejemplo lo tenemos en la determinación de proteínas de membrana, donde es necesario usar surfactantes para

desintegrar la estructura de la membrana y liberar estas proteínas.

- Por último, el enlace covalente podría mejorar la actividad de las proteínas unidas, siempre que se usen "espaciadores" poliméricos entre la superficie de la partícula y la proteína. En este caso, las moléculas proteicas no se adsorben sobre la interfase, por lo que no habría una deformación de su estructura tridimensional y mantendrían su actividad biológica nativa.

La estrategia empleada para unir covalentemente antígenos o anticuerpos a partículas de látex fue inicialmente descrita por Grange y col. [42]. Hoy en día existen diversas técnicas creadas para tal fin. Si los grupos funcionales de la superficie del látex son grupos aldehído o grupos cloroactivados, las reacciones químicas necesarias para establecer la unión covalente entre la proteína y la partícula se simplifican bastante. Por ello, el empleo de partículas con estos grupos orgánicos en superficie va siendo cada vez más generalizado [43-46]. Sin embargo, la formación de enlaces covalentes entre partículas de látex y grupos carboxilo superficiales no se produce a través de una reacción química tan directa como en los casos anteriores. Es necesario activar estos grupos para que puedan reaccionar con los grupos amino presentes en las moléculas de proteína. Las carbodiimidas catalizan la formación de enlaces amida entre grupos carboxilo y grupos amino a través de un intermedio que es un o-acilurea compuesto [47,48]. En nuestro trabajo hemos empleado 1 etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimida (ECDI) para enlazar el fragmento F(ab')<sub>2</sub> a los látex JL3, JL4 y JL7. La química de la reacción se describe con detalle en la Figura III.26.

En teoría, los grupos activados por la ECDI se hidrolizan relativamente rápido y el rendimiento de la unión proteica puede no ser muy elevado. Para aumentar este rendimiento, Staros y col. [49] han descrito un método para formar un intermedio activo más resistente a la hidrólisis. Para lograr tal fin, dichos autores hacen reaccionar N-hidroxisulfosuccinimida con el o-acilurea compuesto. No obstante, en nuestras experiencias no hemos empleado este paso intermedio.

El procedimiento general de sensibilización covalente utilizado fue una modificación del descrito por la casa comercial Seradyn y consta de 4 etapas:

- Lavado del látex: Se toma una muestra limpia del látex (0.3 m<sup>2</sup> de superficie total), se centrifuga y se resuspende en un mililitro del tampón de activación.
- Activación: Se adiciona sobre el látex una disolución de ECDI recientemente preparada para obtener una concentración final de 10 mg de ECDI por m<sup>2</sup> de látex. Se incuba a temperatura ambiente durante 40 minutos; se centrifuga y se redispersa en el mismo volumen

de tampón de sensibilización. -

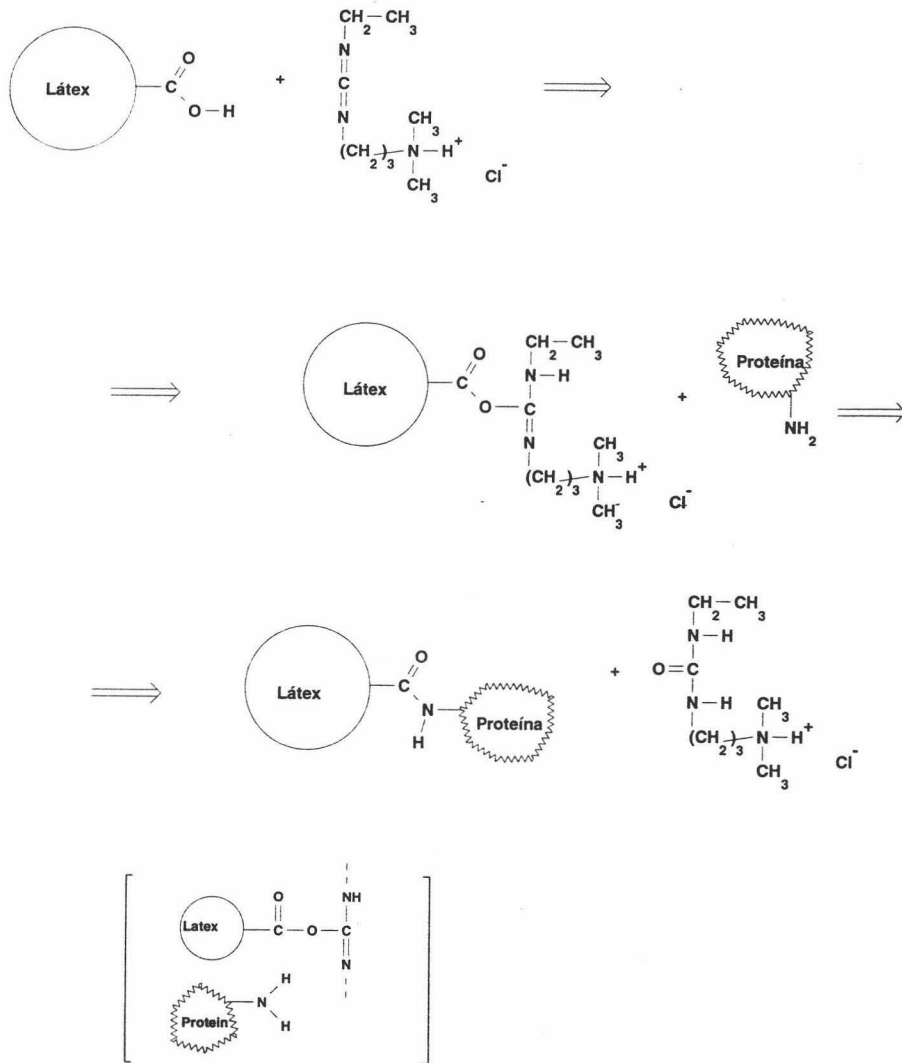


Fig. III.26. Esquema de la activación de un látex carboxilatado con ECDI y posterior reacción con una molécula de proteína.

- Sensibilización: Se adiciona el látex activado sobre una disolución de F(ab')<sub>2</sub> diluida en el tampón de reacción (volumen final: 10ml). Se incuba durante 4 horas y se añade tampón glicina 0.1 M (pH 9.2) y 0.17 M NaCl (GBS) con el fin de bloquear el exceso de grupos activados. Transcurridos 10 minutos se centrifuga y se mide la proteína no unida en los sobrenadantes filtrados. Se lava el precipitado con el tampón de sensibilización, se centrifuga y se resuspende en el tampón GBS pero conteniendo ahora 1% de surfactante Tween 20 (Merck) con el objeto de arrancar de la superficie aquellas moléculas proteicas que no estén químicamente unidas. Se deja incubar durante unas 15 horas. Se centrifuga y se analizan tanto los sobrenadantes como el precipitado para calcular el rendimiento de la covalencia.

- Resuspensión final: Se resuspende el látex en un tampón final cuya naturaleza dependerá del fin que se busque para las muestras.

La casa comercial Seradyn recomienda que se realice la activación de las muestras a pH5. Sin embargo, debido a que la ECDI reacciona con los grupos carboxilos, no pueden utilizarse tampones acetato/acético. Por esta razón se preparó la disolución tamponadora a partir del ácido morfolino etanosulfónico (MES), si bien (y debido a su pK<sub>a</sub>) el pH final fue de 5.6.

Si se realiza la activación a pH 5.6 las muestras coloidales se inestabilizan por completo. Por estar el sistema coagulado, al adicionar la proteína no podemos asegurar que la superficie que pueda estar al alcance de la F(ab')<sub>2</sub> sea la que inicialmente se añadió. Para evitar ambigüedades a la hora de calcular la cantidad de proteína unida covalentemente a la superficie se procedió a determinar este valor a través de dos métodos diferentes. Además de calcularlo a través del método indirecto que ya describimos anteriormente (midiendo la absorbancia a  $\lambda=280$  nm), se hizo por un método directo. Éste consiste en hacer reaccionar la proteína adsorbida sobre la superficie del látex con una disolución que contiene una sal cúprica y la sal soluble del ácido bicinconínico (BCA) (método patentado por la casa PIERCE). El esquema de la reacción que tiene lugar se describe con detalle en la Figura III.27.

Este método analítico está basado en una reacción bien conocida en la que los enlaces peptídicos de las proteínas y los aminoácidos cisteína, triptófano y tirosina son capaces de reducir el ion Cu<sup>2+</sup> a ion cuproso en un medio alcalino [50]. Este ion Cu<sup>+</sup> forma un complejo de color violáceo con el ácido bicinconínico que tiene un máximo de absorbancia a  $\lambda=562$  nm. Para poder determinar la proteína adsorbida sobre las partículas es necesario realizar un calibrado previo con el reactivo BCA a partir de disoluciones patrón de F(ab')<sub>2</sub> donde exista la misma cantidad de área de látex que está presente en las muestras problema.

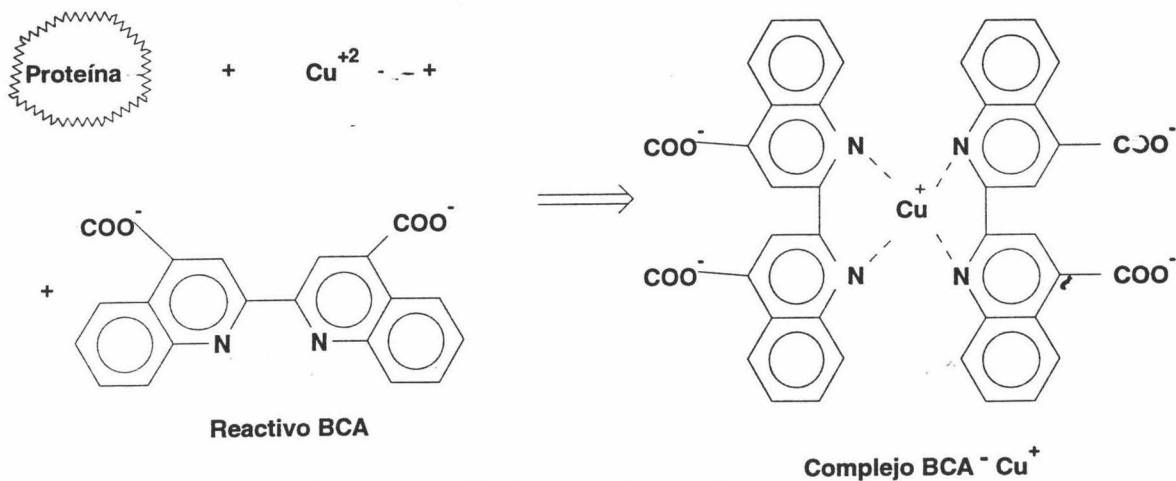


Fig. III.27. Reacción de una proteína con el reactivo BCA.

Se sensibilizaron 8 muestras de látex con  $F(ab')_2$  a máximo recubrimiento:

- Partículas del látex JL3 se activaron a pH 5.6 y a pH 8.2 para ver la influencia de este parámetro sobre el rendimiento de la covalencia.
- Se realizó la misma experiencia (a los dos pHs) pero con  $F(ab')_2$  inmunológicamente activa frente al antígeno "proteína C reactiva"; muestras que denominaremos JL3-PCR. Estas muestras se hicieron por duplicado para realizar posteriores estudios de inmunoreacción. A dos de estas muestras les llamaremos JL3-PCR-G porque al final de todo el proceso de sensibilización se añadiría en el medio una cierta cantidad del surfactante Gafac (Merck) con el fin de estudiar su influencia en la respuesta inmunológica del sistema.
- Por último se sensibilizaron partículas de los látex JL4 y JL7 a pH 8.2 con  $F(ab')_2$  no reactiva. El rendimiento de la covalencia se muestra en la Tabla III.3.

Como se ve el rendimiento de la unión covalente casi siempre es superior al 80 %. Las cantidades de proteína unidas a las partículas a pH 8.2 son menores que a pH 5.6 debido en gran parte a que también existe esta misma tendencia en la adsorción física de la  $F(ab')_2$ .

Por tanto, podemos concluir diciendo que: i) los látex carboxílicos sintetizados en nuestro Departamento son capaces de unir covalentemente proteína a través de la activación de sus grupos carboxilos con ECDI. ii) El reactivo BCA se muestra como una alternativa útil para determinar de una forma directa la cantidad de proteína que hay adsorbida sobre la superficie. iii) la activación y sensibilización de los látex a pH 8.2 consigue cubrir la superficie polimérica de  $F(ab')_2$  sin sufrir en ningún momento la desestabilización del sistema, proceso que sí tiene lugar cuando la activación del látex se lleva a cabo en pH 5.6.

Muestra	J <sub>ads</sub> total (mg/m <sup>2</sup> )	J <sub>cov</sub> (mg/m <sup>2</sup> ) λ = 280 nm	% cov. λ = 280 nm	J <sub>cov</sub> (mg/m <sup>2</sup> ) react. BCA	% cov. react. BCA
JL3 - 5.6	3.01	2.46	82	2.25	75
JL3 - 8.2	2.38	2.21	93	2.06	87
JL3PCR-5.6	2.56	2.35	92	1.97	77
JL3PCR-8.2	1.86	1.76	95	1.72	92
JL3PCRG-5.6	2.60	2.26	87	2.11	81
JL3PCRG-8.2	1.79	1.28	72	1.56	87
JL4 - 8.2	2.47	2.47	100	2.23	90
JL7 - 8.2	2.24	2.12	95	2.03	91

Tabla III.3. Rendimiento de la covalencia de F(ab')<sub>2</sub> sobre los látex carboxilados.

Recientemente en nuestro Departamento se ha realizado un estudio más riguroso sobre la unión covalente de moléculas de IgG sobre partículas de látex carboxiladas, así como estudios electrocinéticos de las partículas activadas con ECDI y partículas desactivadas posteriormente con etanolamina [50,51].

### III. CARACTERIZACIÓN ELECTROKINÉTICA DE LOS COMPLEJOS

Se realizaron medidas de movilidad electroforética de los complejos látex-F(ab')<sub>2</sub> con el fin de profundizar en el estudio del comportamiento electrocinético de estos nuevos sistemas coloidales. Estos datos pueden aportar una información muy valiosa a la hora de justificar los resultados que se obtengan en el estudio de la estabilidad de los complejos. Existen tres variables principales que afectan a la movilidad de las partículas recubiertas de proteína: cantidad de F(ab')<sub>2</sub> adsorbida, pH y fuerza iónica. Por esta razón se diseñaron diferentes experiencias para realizar la caracterización estudiando cada variable de forma independiente.

#### Influencia de la cantidad de F(ab')<sub>2</sub> adsorbida.

En este caso se mantuvieron fijos el pH y la fuerza iónica en los valores de pH 7 y de I =

0.002. Los resultados se muestran en las Figuras III.28 y 29.

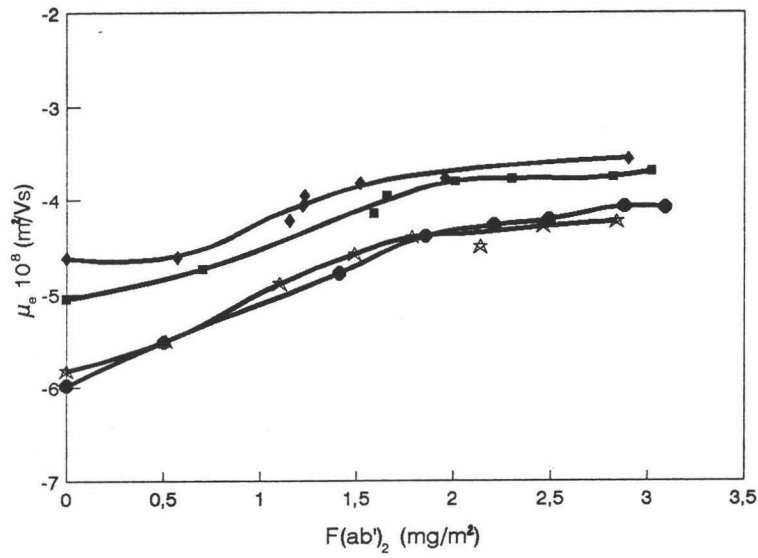


Fig. III.28. Movilidad de los látex JL1 (■), JL2 (◆), JL4 (●) y JL7 (★) en función de la cantidad de  $F(\text{ab}')_2$  adsorbida sobre sus superficies. Condiciones experimentales: pH 7,  $I = 0.002$ .

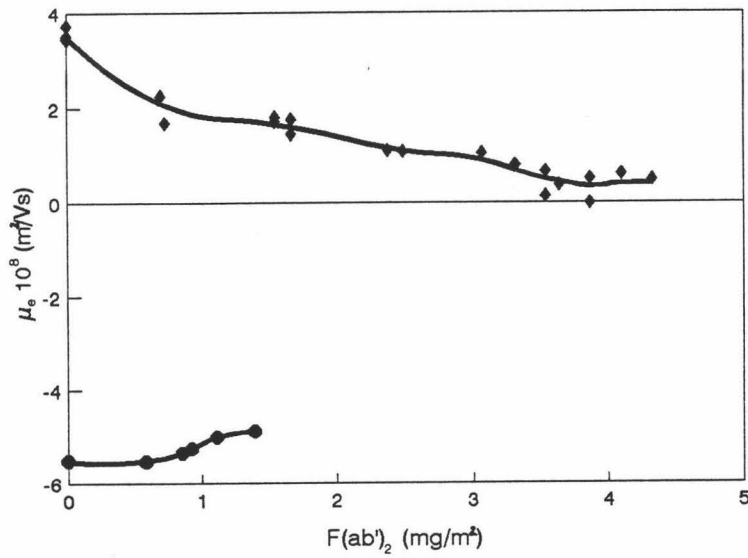


Fig. III.29. Movilidad de los látex JL8 (◆) y JL10 (●) en función de la cantidad de  $F(\text{ab}')_2$  adsorbida sobre sus superficies. Condiciones experimentales: pH 7,  $I = 0.002$ .

En el látex catiónico (JL8) se obtiene un descenso continuo en el valor de la movilidad a medida que va aumentando sobre las partículas el recubrimiento proteico. Esto puede entenderse fácilmente si recordamos que a pH neutro las moléculas de proteína tienen una carga neta negativa que tiende a compensar las cargas positivas de la superficie polimérica. Sin embargo, si nos fijamos en los resultados obtenidos con los látex aniónicos, a pesar de aumentar el contenido de cargas negativas en la partícula a medida que éstas se van recubriendo de proteína, hay un descenso (en valor absoluto) de la movilidad electroforética. La explicación de estos resultados se puede encontrar en 2 fenómenos físico-químicos que ocurren independientemente y que además no son excluyentes:

a) La participación de pequeños iones en la adsorción de la F(ab')<sub>2</sub>. El aporte de iones que se adsorben en la interfase polímero-proteína no sólo juega un papel considerable en el proceso de la adsorción proteica, como ya comentamos anteriormente, sino que además esta participación de iones de bajo peso molecular va a tener un importante reflejo en los valores de la movilidad electroforética de los complejos látex-proteína [53,54]. Elgersma y col [55] aplican la siguiente ecuación

$$\Delta_{ads} \sigma_{ek} = \sigma_{ek}^{(PS-proteína)} - \sigma_{ek}^{(PS)} - \sigma_{ek}^{(proteína)} J_{ads} A \quad (III.5)$$

para poder conocer la densidad superficial de iones que quedan adsorbidos entre la superficie del látex y la superficie de la proteína. Esta densidad de carga podrá calcularse a partir de la diferencia entre la carga electrocinética del complejo látex-proteína ( $\sigma_{ek}^{(PS-Proteína)}$ ) y la que tenían ambos componentes del sistema antes de la adsorción ( $\sigma_{ek}^{(PS)}$  y  $\sigma_{ek}^{(proteína)}$ ). La densidad de carga electrocinéticamente transportada se puede calcular a partir de medidas de movilidad y su posterior transformación en valores de potencial- $\zeta$ , según la ecuación

$$\sigma_{ek} = \frac{4 n_0 z e}{\kappa} \operatorname{senh}\left(\frac{z e \zeta}{2 k T}\right) \quad (III.6)$$

cuyo origen se describe en el **Apéndice III** de esta memoria. Los parámetros  $J_{ads}$  y  $A$  de la ecuación III.5 se corresponden respectivamente con la cantidad de proteína adsorbida por unidad de área de polímero y con la superficie de proteína por unidad de masa proteica. Elgersma y colaboradores logran aplicarla para la adsorción de BSA, pues para esta proteína



se conoce el valor de  $\sigma_{ek}^{(BSA)}$ . Sin embargo, estos autores no pudieron calcular la cantidad de iones adsorbidos en la interfase poliestireno-IgG monoclonal pues se desconoce el valor de dicho dato para estas proteínas [56]. En nuestro trabajo con la  $F(ab')_2$  llegamos al mismo problema y no hemos podido hacer una estimación cuantitativa del aporte de iones, si bien los resultados de las anteriores gráficas muestran evidencias cualitativas de este fenómeno.

b) Debemos de tener en cuenta que la movilidad electroforética no es un fiel reflejo de la carga superficial de los coloides, pues no depende del potencial superficial  $\Psi_0$  sino que sus valores son función del potencial en el plano de cizalladura de la partícula (potencial- $\zeta$ ). A medida que se va adsorbiendo proteína sobre la superficie polimérica, vamos pasando de una situación donde tenemos una superficie relativamente lisa hasta otra con una mayor rugosidad. Esta rugosidad tiene su origen tanto en la irregularidad de la superficie de las proteínas adsorbidas como en la disposición que adoptan en la interfase polimérica, que será relativamente desordenada y azarosa. Esto va a causar un desplazamiento del plano de deslizamiento, el cual tenderá a alejarse de la superficie, y por tanto la movilidad disminuirá. Sobre este efecto hablaremos con más profundidad en el apartado que dedicaremos al estudio de la movilidad de las partículas de los látex carboxilados que tienen  $F(ab')_2$  unida covalentemente.

#### **Influencia del pH del medio de resuspensión.**

Se realizaron estas experiencias para partículas de látex sin proteína, con un recubrimiento medio de  $F(ab')_2$  y con partículas que tenían una máxima cantidad de proteína en su superficie. La fuerza iónica se mantuvo constante a un valor bajo ( $I = 0.002$ ). Estos resultados se muestran en las Figuras 30-35.

En todos los casos, a medida que las partículas tienen más cantidad de proteína adsorbida, el punto isoeléctrico del complejo coloidal (que se corresponde con el valor de pH donde la movilidad electroforética es cero) se va aproximando al pI de la  $F(ab')_2$  pura. Sin embargo, este valor y la tendencia general de las curvas de movilidad no sólo es función de la naturaleza de la proteína adsorbida, sino que también dependen de los grupos funcionales superficiales de las partículas poliméricas que actúan de soporte.

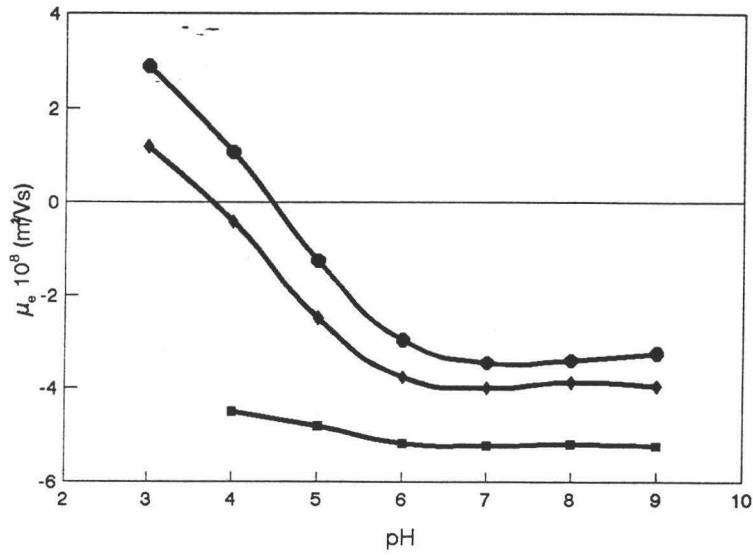


Fig. III.30. Movilidad frente al pH del: látex JL1 sin proteína (■), con 1.7 mg/m<sup>2</sup> de F(ab')<sub>2</sub> (◆) y con 3.0 mg/m<sup>2</sup> de F(ab')<sub>2</sub> (●). Fuerza iónica del medio I = 0.002.

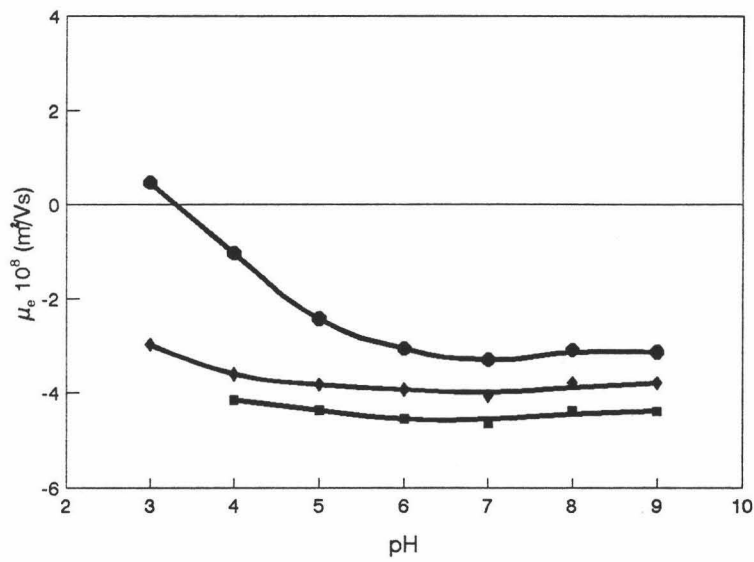


Fig. III.31. Movilidad frente al pH del: látex JL2 sin proteína (■), con 1.1 mg/m<sup>2</sup> de F(ab')<sub>2</sub> (◆) y con 2.9 mg/m<sup>2</sup> de F(ab')<sub>2</sub> (●). Fuerza iónica del medio I = 0.002.

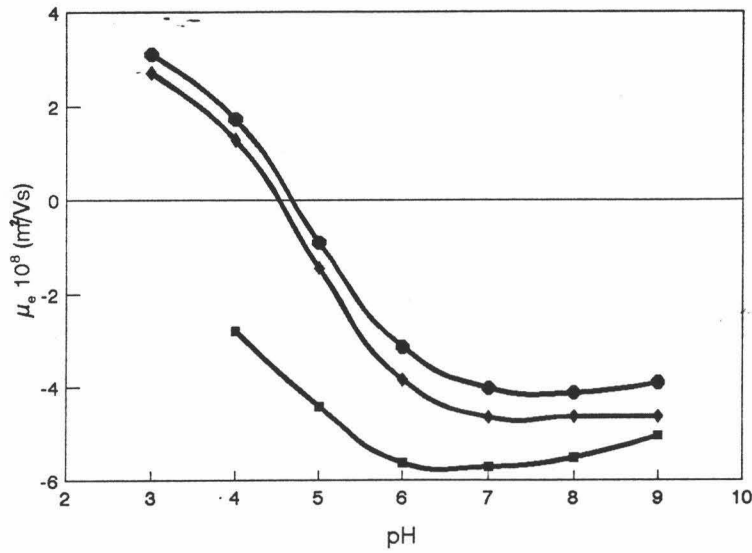


Fig. III.32. Movilidad frente al pH del látex **JL4** sin proteína (■), con 1.4 mg/m<sup>2</sup> de F(ab')<sub>2</sub> (◆) y con 3.1 mg/m<sup>2</sup> de F(ab')<sub>2</sub> (●). Fuerza iónica del medio I = 0.002.

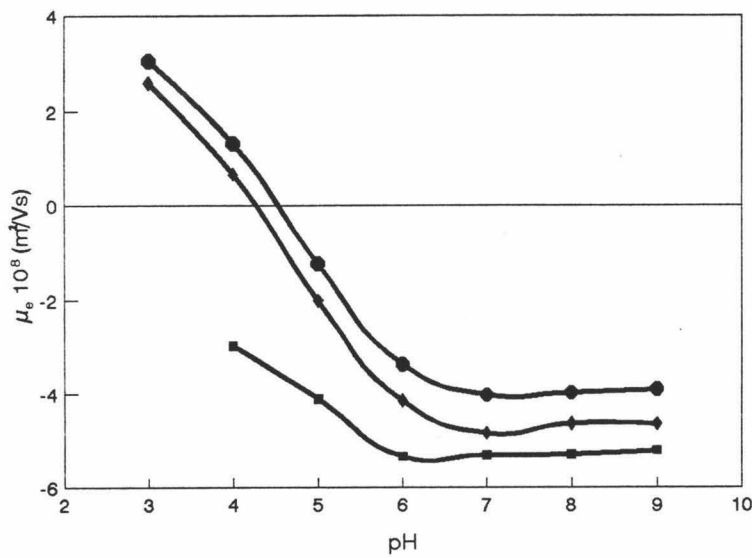


Fig. III.33. Movilidad frente al pH del látex **JL7** sin proteína (■), con 1.1 mg/m<sup>2</sup> de F(ab')<sub>2</sub> (◆) y con 2.8 mg/m<sup>2</sup> de F(ab')<sub>2</sub> (●). Fuerza iónica del medio I = 0.002.

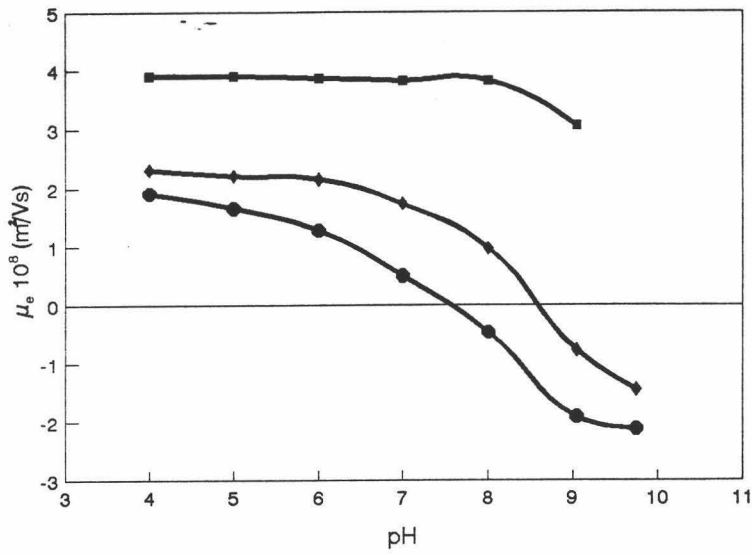


Fig. III.34. Movilidad frente al pH del látex **JLB** sin proteína (■), con 1.6 mg/m<sup>2</sup> de F(ab')<sub>2</sub> (◆) y con 3.8 mg/m<sup>2</sup> de F(ab')<sub>2</sub> (●). Fuerza iónica del medio I = 0.002.

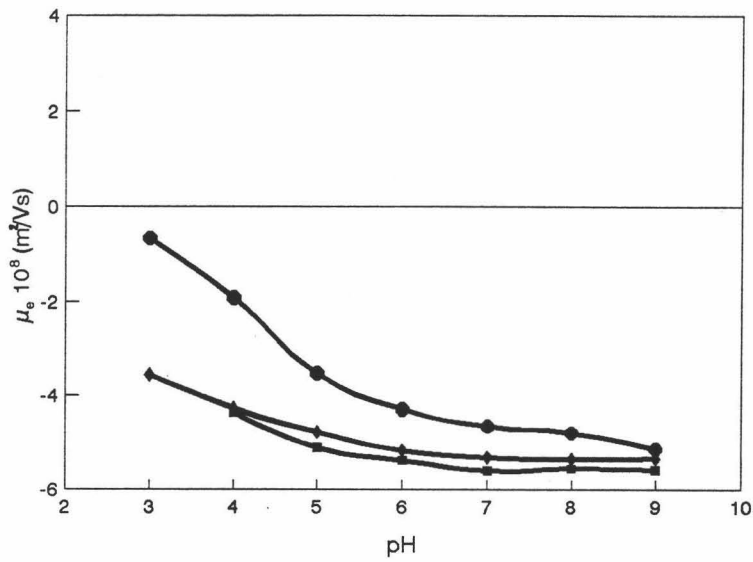


Fig. III.35. Movilidad frente al pH del látex **JL10** sin proteína (■), con 0.6 mg/m<sup>2</sup> de F(ab')<sub>2</sub> (◆) y con 1.4 mg/m<sup>2</sup> de F(ab')<sub>2</sub> (●). Fuerza iónica del medio I = 0.002.

Así, por ejemplo, en los látex-sulfonato la disminución de  $\mu_e$  (en valor absoluto) conforme el medio se va haciendo más ácido es menos acusada que en el caso de los látex carboxilatados. A su vez, los valores del  $pI$  del complejo también son menores: para el sulfonato más cargado (JL2) este valor es de  $\approx 3.5$ ; para el látex JL1, que presenta menor densidad superficial de grupos sulfonatos, su valor es de  $\approx 4.5$ . Este es el mismo valor que se alcanza con los látex carboxilatados, si bien los grupos de estas partículas no presentan carga a pHs ácidos, tal y como vimos en el capítulo de caracterización. Para el látex catiónico se obtiene un punto de movilidad nula a  $pH \approx 7.5$ . A ambos lados de estos puntos isoeléctricos la movilidad cambia de signo debido a la naturaleza anfotérica de la proteína. El látex JL10, debido a su naturaleza hidrofílica, tiene poca cantidad de proteína adsorbida, hecho que se refleja en estas medidas de movilidad. Todo lo que acabamos de comentar queda bien reflejado en la Figura III.36, donde hemos representado conjuntamente los resultados del látex JL1 y JL8 (los cuales poseen aproximadamente la misma magnitud de  $\sigma_0$  pero con signo opuesto) y se ha dibujado una tendencia aproximada de lo que podría ser la  $\mu_e$  de la molécula de  $F(ab)_2$  en disolución, con su  $pI$  en 5.3.

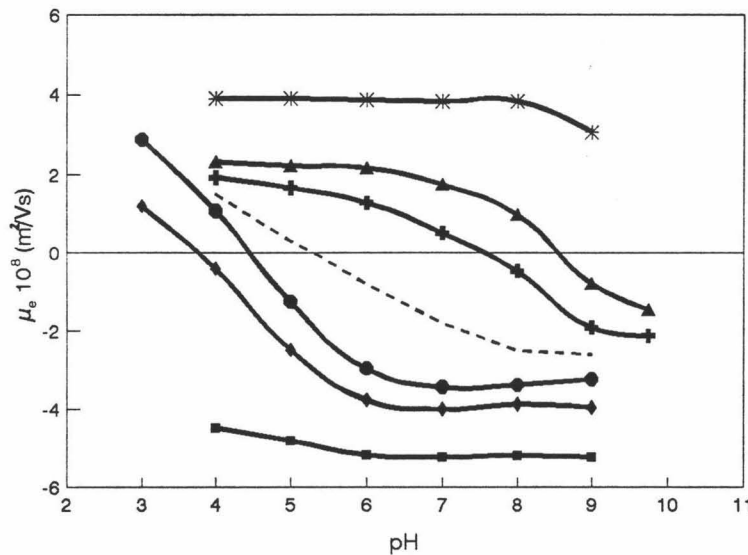


Fig. III.36. Dependencia de las  $\mu_e$  del látex JL1 (■), JL1-F(ab)<sub>2</sub> (1.7 mg/m<sup>2</sup>) (◆), JL1-F(ab)<sub>2</sub> (3.0 mg/m<sup>2</sup>) (●), curva hipotética para la F(ab)<sub>2</sub> (línea de puntos), JL8-F(ab)<sub>2</sub> (3.8 mg/m<sup>2</sup>) (+), JL8-F(ab)<sub>2</sub> (1.6 mg/m<sup>2</sup>) (▲) y látex JL8 (✱).

Si compaginamos todos estos resultados con los obtenidos en las isotermas de adsorción de F(ab')<sub>2</sub> frente al pH, podemos concluir que el máximo de adsorción proteica sobre cada látex se alcanza en las proximidades del pI del complejo látex-proteína más que en las del pI de la F(ab')<sub>2</sub>. Esto justificaría que el pH donde hay una máxima adsorción proteica sea de pH5 en el JL1, pH 3-5 en el JL2, pH5 para los carboxilatados y 7 en el látex catiónico. En estas situaciones, además de que la proteína presenta una estructura compacta por no estar muy alejada de su pI medio (pH 5.3), existe una atracción electrostática adicional que favorece la unión de la proteína a la superficie en condiciones de baja fuerza iónica. Numerosos autores [19,31,33,35,57] obtienen resultados similares en la posición del máximo de adsorción frente al pH cuando adsorben distintos tipos de proteínas sobre diferentes látex de carácter tanto aniónico como catiónico.

**Influencia de la fuerza iónica del medio.**

En esta serie de experiencias se mantuvo fijo el pH del medio en el valor dado por el agua empleada en las disoluciones de electrolito (pH ≈ 6). Para ir variando la fuerza iónica del medio se prepararon disoluciones a diferentes concentraciones de sal (KBr). Al igual que antes, se midieron las movilidades del látex sin proteína y del látex a medio y máximo recubrimiento de F(ab')<sub>2</sub>. Los resultados se muestran en las Figuras III.37-42.

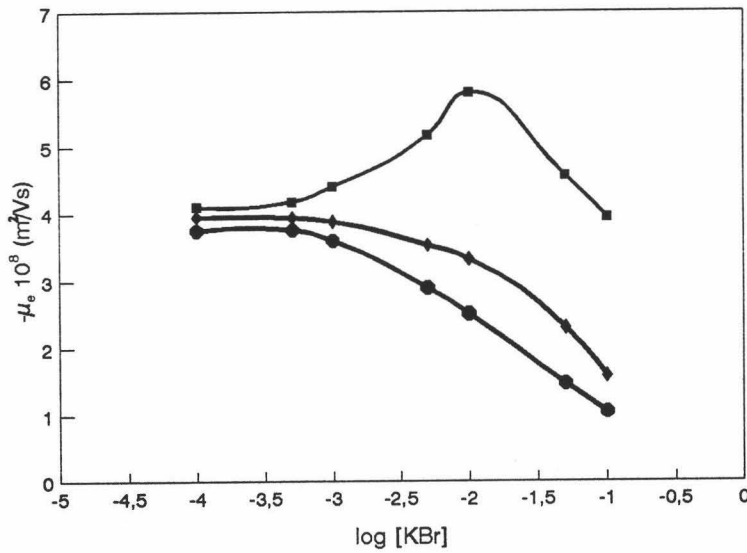


Fig. III.37. Movilidad frente a la fuerza iónica. Látex JL1 (■), JL1-F(ab')<sub>2</sub> (1.7 mg/m<sup>2</sup>) (◆) y JL1-F(ab')<sub>2</sub> (3.0 mg/m<sup>2</sup>) (●).

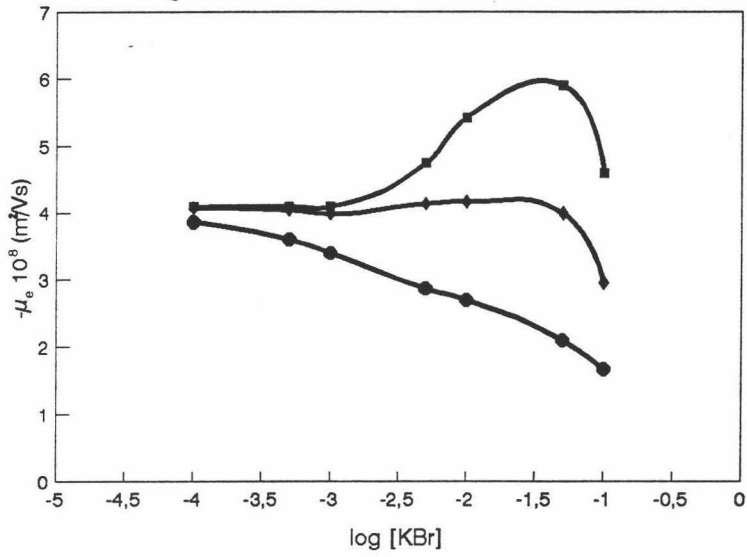


Fig. III.38. Movilidad frente a la fuerza iónica. Látex JL2 (■), JL2-F(ab')<sub>2</sub> (1.1 mg/m<sup>2</sup>) (◆) y JL2-F(ab')<sub>2</sub> (2.9 mg/m<sup>2</sup>) (●).

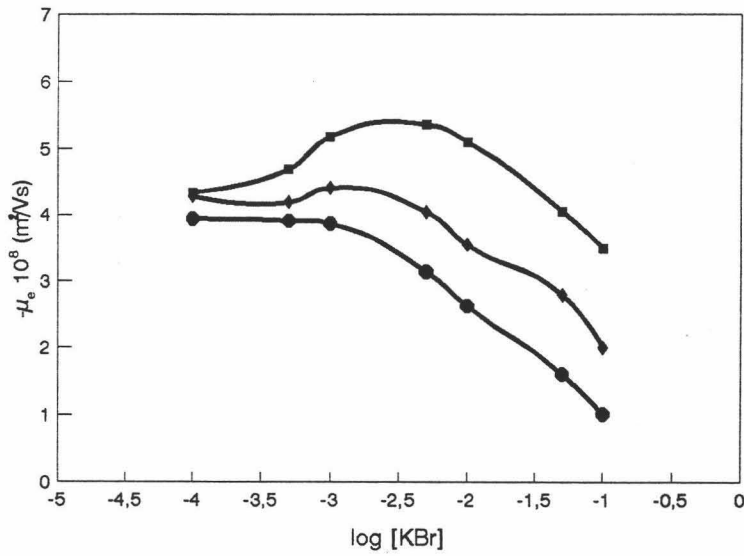


Fig. III.39. Movilidad frente a la fuerza iónica. Látex JL4 (■), JL4-F(ab')<sub>2</sub> (1.4 mg/m<sup>2</sup>) (◆) y JL4-F(ab')<sub>2</sub> (3.1 mg/m<sup>2</sup>) (●).

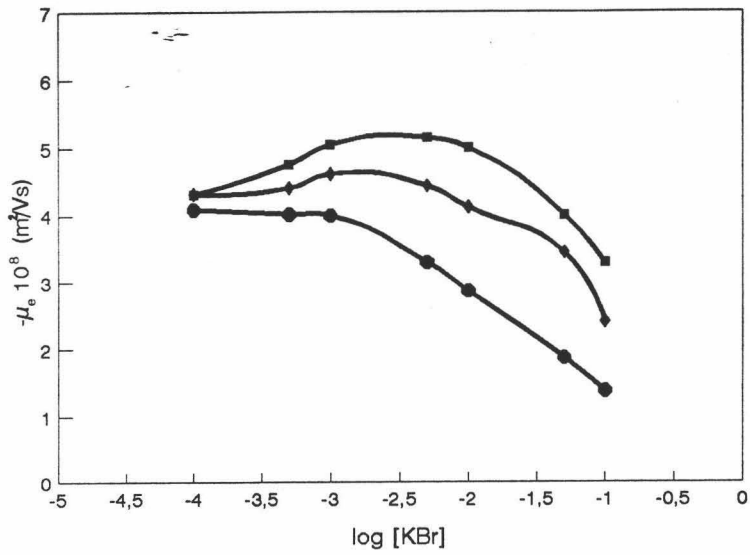


Fig. III.40. Movilidad frente a la fuerza iónica. Látex JL7 (■), JL7-F(ab')<sub>2</sub> (1.1 mg/m<sup>2</sup>) (◆) y JL7-F(ab')<sub>2</sub> (2.8 mg/m<sup>2</sup>) (●).

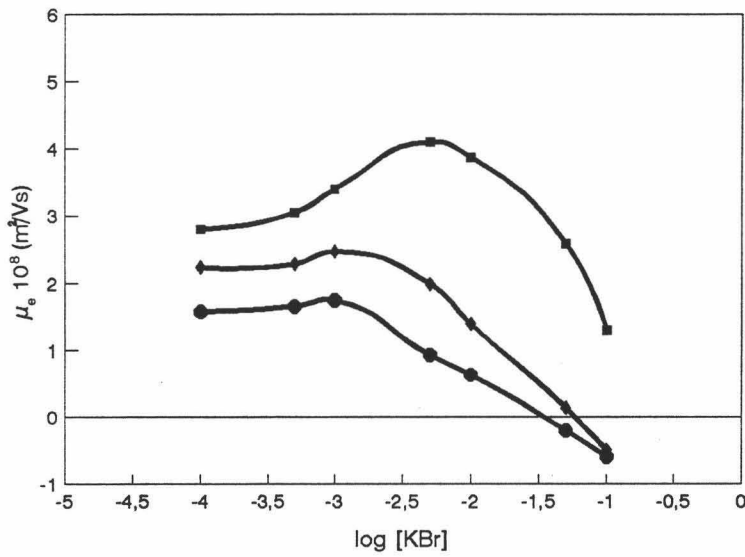


Fig. III.41. Movilidad frente a la fuerza iónica. Látex JL8 (■), JL8-F(ab')<sub>2</sub> (1.8 mg/m<sup>2</sup>) (◆) y JL8-F(ab')<sub>2</sub> (4.0 mg/m<sup>2</sup>) (●).



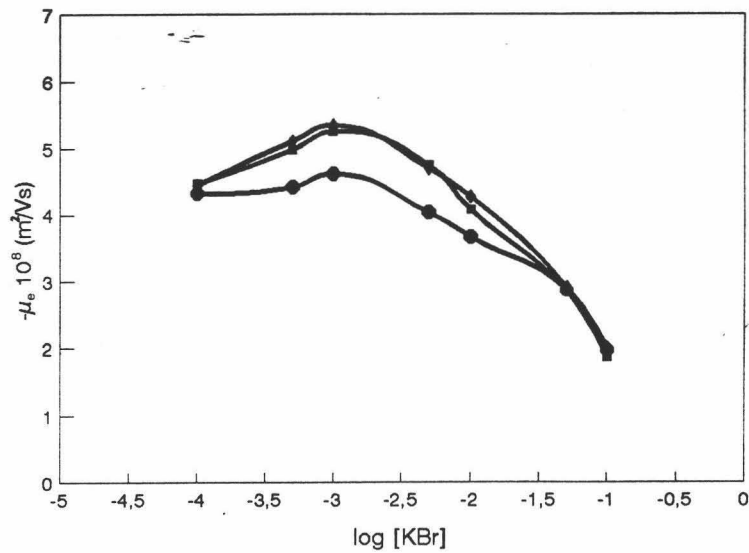


Fig. III.42. Movilidad frente a la fuerza iónica. Látex JL10 (■), JL10-F(ab')<sub>2</sub> (0.6 mg/m<sup>2</sup>) (◆) y JL10-F(ab')<sub>2</sub> (1.4 mg/m<sup>2</sup>) (●).

Podemos encontrar dos características principales en todas estas gráficas: Por un lado, a medida que aumenta la cantidad de proteína adsorbida disminuye la movilidad de las partículas (en valor absoluto). Este resultado ya lo habíamos encontrado en las experiencias de movilidad frente al pH y frente a la cantidad adsorbida, y ha sido justificado anteriormente. El segundo hecho característico que nos encontramos es que el máximo que aparecía en las medidas de  $\mu_e$  frente a la fuerza iónica para los látex sin recubrimiento se atenúa y en algunos casos llega a desaparecer conforme aumenta la cantidad de F(ab')<sub>2</sub> adsorbida sobre las partículas.

La respuesta a este comportamiento no la podemos encontrar en las teorías electrocinéticas que se describen en el **Apéndice III** de esta memoria, puesto que tales teorías asumen que la carga de la partícula está localizada únicamente en la superficie de la misma. Sin embargo, existen ciertas partículas coloidales, tales como células biológicas o microesferas de látex que poseen cadenas de polielectrolito en superficie o moléculas de proteína adsorbida, en las que sus grupos cargados no se encuentran en una superficie plana sino que están distribuidos en esta capa de polímero, de un determinado espesor, en la que los iones de la disolución podrán penetrar. Por tanto, la movilidad electroforética de estos sistemas coloidales no va a

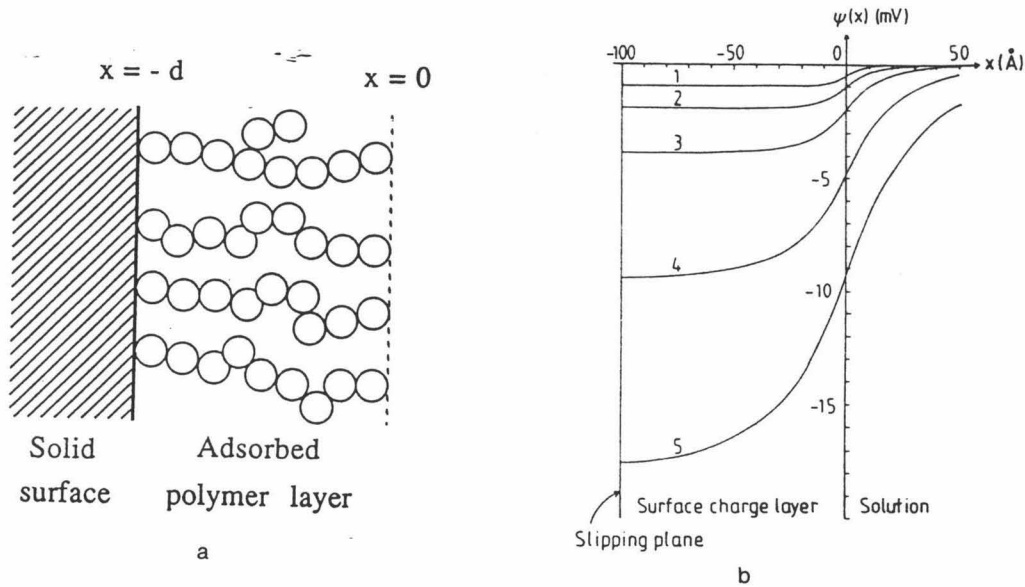


Fig. III.43. (a) Representación esquemática de una superficie sólida recubierta por una capa de polímero. (b) Representación de la distribución del potencial  $\Psi(x)$  en las proximidades de la partícula.

En la distribución del potencial de la figura anterior se ha considerado que sobre la superficie de la partícula (en  $x = -d$ ) no existe carga eléctrica y por ello  $(d\Psi/dx)_{-d} = 0$ . Además, si se considera que el plano de deslizamiento está localizado sobre la superficie de la partícula sólida ( $x = -d$ ), Ohshima y Kondo llegan a demostrar que la movilidad teórica de las partículas bajo estas condiciones viene dada por

$$\mu = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \frac{1}{\cosh \lambda d} \left[ \Psi(-d) + \lambda \int_{-d}^0 \Psi(x) \operatorname{senh} \lambda (x+d) dx \right] + \frac{\sigma}{\eta d} \frac{1}{\lambda^2} \left( 1 - \frac{1}{\cosh \lambda d} \right) \quad (\text{III.7})$$

donde  $\epsilon_0$  es la permitividad dieléctrica del vacío,  $\epsilon_r$  la constante dieléctrica del medio,  $\eta$  la viscosidad de la disolución,  $d$  el espesor de la capa de polielectrolito, y los parámetros  $\sigma$  y  $\lambda$  se definen a continuación:

-  $\sigma$  representa la cantidad de cargas fijas contenidas en la capa estructurada, y viene

ser un parámetro representativo de la magnitud del potencial- $\zeta$  de estas partículas, pues también influye de forma decisiva las características físico-químicas de la capa de polielectrolito (o proteína) situada en la superficie. Tal y como demuestran Ohshima y col [58], cuando el espesor de dicha capa tiene un valor superior a un cierto límite, la movilidad es insensible tanto a la posición del plano de deslizamiento como al espesor de la capa de polímero. Por tanto, en estos casos el potencial- $\zeta$  (que es el potencial asociado al plano de cizalladura, el cual estará situado en algún lugar dentro de la capa de polielectrolito) pierde su significado clásico. No obstante, si la carga superficial de un látex sin recubrimiento alguno, es muy alta en comparación a la densidad de cargas fijas de la capa de polielectrolito adsorbido, sí habrá que tener en cuenta la contribución de la  $\sigma_0$  del látex original sobre el valor de la movilidad.

En los últimos años, el objetivo de ciertos autores se ha centrado en obtener expresiones analíticas teóricas que predigan el comportamiento de la movilidad electroforética de todos estos sistemas. Donath y Pastushenko [59], Wunderlich [60], Levine y col [61] y Sharp y Brooks [62] propusieron un modelo en el que la capa superficial de las partículas coloidales está compuesta por cadenas de polímero cargadas. Estos estudios demuestran que la movilidad electroforética no sólo depende del potencial de la cara más externa de la capa polimérica, sino que es principalmente función de la total distribución del potencial a través de esta capa superficial. No obstante, han sido Ohshima y Kondo los autores que más han profundizado en el estudio de estos sistemas, tal y como lo demuestran en una serie de trabajos de bastante actualidad [58,63-67]. Intentaremos hacer un resumen de esta teoría antes de pasar a aplicarla sobre algunos de nuestros sistemas.

La condición inicial de la que parten consiste en proponer un modelo de tipo membrana en el que las cargas fijas de las cadenas de polielectrolito están distribuidas con una densidad uniforme en una capa superficial de espesor " $d$ ". Sobre este modelo unifican dos conceptos diferentes: el potencial de Gouy-Chapman para dobles capas eléctricas (**Apéndice III**) que se cumplirá para  $d \rightarrow 0$ , y el potencial de Donnan, que se corresponde con la distribución de potencial a lo largo de una capa superficial cargada de gran espesor. Por tanto, cuando  $d \rightarrow \infty$  el único potencial que habrá que tener en cuenta será el de Donnan. La teoría que desarrollan estos autores para interfases estructuradas está basada en el modelo molecular que se representa en la Figura III.43a; la distribución de potencial que se corresponde con esta gráfica se representa en la Figura III.43b.

expresada por unidad de área. Se relaciona con el espesor  $d$  y con la densidad de grupos cargados en dicha capa  $N$ , a través de

$$\sigma = z e N d \quad (III.8)$$

siendo  $e$  la carga del electrón y  $z$  hace referencia a la valencia de los grupos cargados de la capa superficial.

- El parámetro  $\lambda$  está relacionado con el coeficiente friccional de la capa de polielectrolito ( $\gamma$ ) a través de

$$\lambda = \left( \frac{\gamma}{\eta} \right)^{1/2} \quad (III.9)$$

y tiene unidades de la inversa de una longitud. De hecho,  $1/\lambda$  (que tiene unidades de longitud) actúa como una medida de la penetración del flujo de disolución a través de la superficie estructurada.

El problema principal que se plantea ahora es la dificultad que representa el resolver la integral de la ecuación III.7. Para evitar este escollo los anteriores autores han desarrollado diferentes fórmulas aproximadas. De todas ellas la que proporciona los mejores resultados es la ecuación que se presenta a continuación y que es aplicable a cualquier valor de potencial teniendo un error despreciable para valores de  $d$  mayores de 1 nm.

$$\mu = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \frac{\Psi_{DON}/\lambda + \Psi_{(0)}/\kappa_m}{1/\lambda + 1/\kappa_m} + \frac{z e N}{\eta \lambda^2} \quad (III.10)$$

En esta ecuación  $\Psi_{DON}$  es el potencial de Donnan en la posición  $x = -d$ , es decir, en la superficie de la partícula de látex y viene dado por

$$\Psi_{DON} = \lim_{d \rightarrow \infty} \Psi(-d) = \frac{kT}{ve} \ln \left[ \frac{zN}{2v\eta} + \left( \left( \frac{zN}{2v\eta} \right)^2 + 1 \right)^{1/2} \right] \quad (III.11)$$

$\Psi_{(0)}$  es el potencial de Donnan en la posición  $x = 0$ , es decir, en la superficie exterior de la capa de polielectrolito, y viene dado por

$$\Psi_{(0)} = \lim_{d \rightarrow \infty} \Psi(0) = \frac{kT}{ve} \ln \left[ \frac{zN}{2v\eta} + \left( \left( \frac{zN}{2v\eta} \right)^2 + 1 \right)^{1/2} \right] + \frac{2kT\eta}{zeN} \left[ 1 - \left( \left( \frac{zN}{2v\eta} \right)^2 + 1 \right)^{1/2} \right] = \Psi_{DON} - \frac{kT}{ve} \tanh \frac{ve\Psi_{DON}}{2kT} \quad (\text{III.12})$$

En las anteriores ecuaciones  $n$  representa la concentración de iones en la disolución de electrolito y  $v$  su valencia. Por último,  $\kappa_m$  se define como

$$\kappa_m = \kappa \left[ 1 + \left( \frac{zN}{2v\eta} \right)^2 \right]^{1/4} \quad (\text{III.13})$$

Recordemos que la ecuación III.10 es sólo aplicable a partículas coloidales que se mueven en un líquido en las siguientes condiciones:

- $d$  debe ser mayor de 1 nm.
- el plano de cizalladura se sitúa en la superficie de la partícula de látex ( $x = -d$ ).
- La superficie de látex no aporta carga alguna, sólo la capa de polielectrolito es la que posee grupos cargados ( $N \neq 0$ ,  $\sigma_0 = 0$ ).

Como vemos en este caso, la movilidad de las partículas coloidales viene expresada como suma de dos términos: el primero tiene que ver con la distribución de potencial en la capa superficial, y el segundo con las fuerzas eléctricas que actúan directamente sobre las cargas fijas contenidas en dicha capa y no está sujeta a los efectos de apantallamiento de los iones de la disolución. No obstante, esta teoría ha sido ampliada para casos a) en los que el plano de deslizamiento no coincide con la superficie del látex sino que está situado entre dicha posición ( $x = -d$ ) y la superficie exterior de la capa de polielectrolito ( $x = 0$ ) [65]. b) Casos en los que la interfase estructurada no presenta carga pero sí la presenta la superficie de la partícula sólida ( $N = 0$ ,  $\sigma \neq 0$ ). c) Casos en los que tanto la capa de polímero como la del látex presentan cargas ( $N \neq 0$ ,  $\sigma \neq 0$ ).

Es este último el que nos interesa, puesto que nuestra capa de polielectrolito se va a corresponder con la capa de proteína adsorbida sobre la superficie, la cual presenta una

densidad de carga que varía con el pH del medio. Además, la superficie de nuestros látex también presenta carga. En tales condiciones, la movilidad teórica que proporciona la teoría de Ohshima y Kondo viene dada por

$$\begin{aligned} \mu = & \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \frac{\Psi_{DON}/\lambda + \Psi_{(0)}/\kappa_m}{1/\lambda + 1/\kappa_m} + \frac{zeN}{\eta \lambda^2} + \\ & + \frac{8\epsilon_r \epsilon_0 kT}{\eta \lambda v e} \tanh \frac{ve\zeta}{4kT} \frac{e^{-\lambda d/\lambda} - e^{\kappa_m d/\kappa_m}}{1/\lambda^2 - 1/\kappa_m^2} \end{aligned} \quad (III.14)$$

siendo  $\zeta$  el potencial- $\zeta$  de la partícula sin recubrir por proteína. Como podemos ver su valor sí influye ahora en la movilidad de las partículas a través del tercer sumando de la anterior ecuación. Además, el potencial  $\Psi_{(0)}$  también es ahora función del potencial  $\zeta$  asociado a la superficie del látex. Por esta razón, a la ecuación III.12 se añade el término

$$\Psi_{(0)} = \Psi_{(0)} (ec. III.12) + \frac{4kT}{ve} \tanh \frac{ve\zeta}{4kT} e^{-\kappa_m d} \quad (III.15)$$

La expresión III.14 puede ser útil para determinar algunos parámetros característicos de la capa de proteína adsorbida, como son su espesor ( $d$ ), la densidad de carga que presenta ( $N$ ) y la distancia de penetración del flujo de disolución ( $1/\lambda$ ). Nuestro objetivo se ha centrado en hacer medidas de movilidad de los complejos látex-F(ab')<sub>2</sub> a diferentes concentraciones de electrolito (KBr) tanto a pH 4.0 como a pH 8.0. Para evitar posibles desorciones de proteína por aumento de la fuerza iónica del medio, se realizaron las experiencias con los látex carboxilados que tenían F(ab')<sub>2</sub> unida covalentemente a máximo recubrimiento posible. También se llevó a cabo un estudio paralelo con las mismas partículas de látex (JL3, JL4 y JL7) pero recubiertas de proteína adsorbida físicamente (por interacciones hidrofóbicas). Tanto la adsorción física como la unión covalente de proteína se realizaron a pH8, y las cantidades finales que quedaron adsorbidas en la superficie de los látex están expresadas en los pies de las Figuras III.44-46, donde se representan los resultados obtenidos.

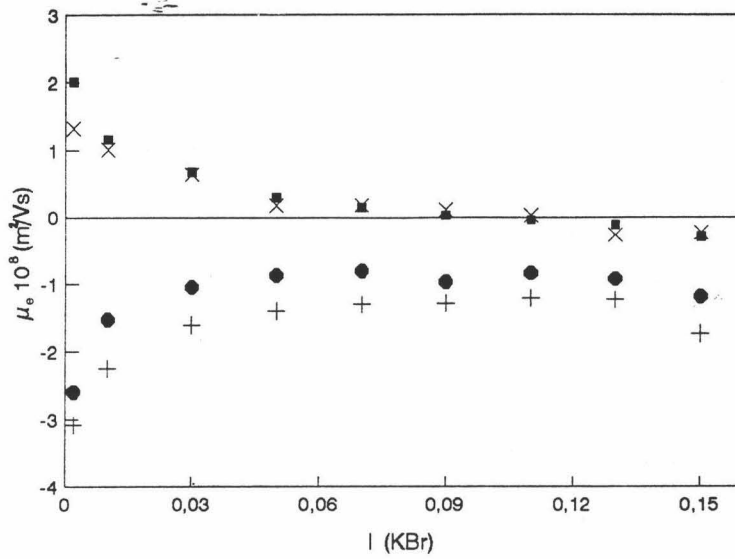


Fig. III.44. Movilidad de los complejos i) JL3-F(ab')<sub>2</sub> (2.6 mg/m<sup>2</sup>, unión física) a pH 4 (x) y a pH 8 (+); ii) JL3-F(ab')<sub>2</sub> (2.4 mg/m<sup>2</sup>, unión covalente) a pH 4 (■) y a pH 8 (●).

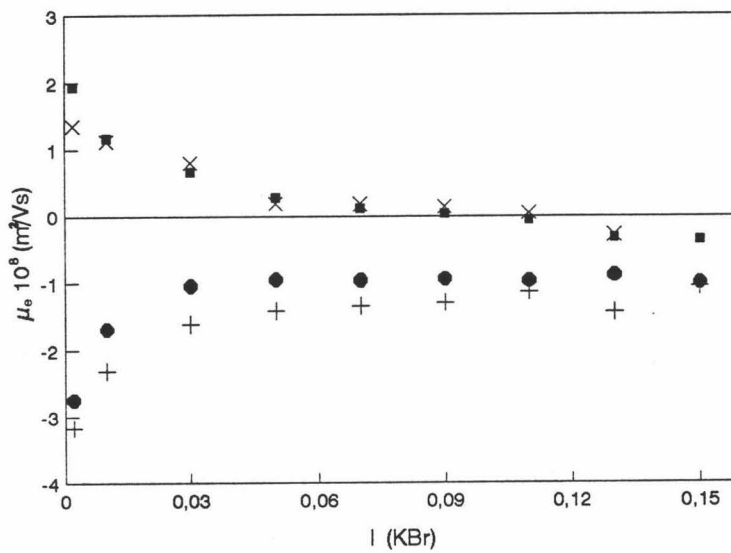


Fig. III.45. Movilidad de los complejos i) JL4-F(ab')<sub>2</sub> (2.3 mg/m<sup>2</sup>, unión física) a pH 4 (x) y a pH 8 (+); ii) JL4-F(ab')<sub>2</sub> (2.5 mg/m<sup>2</sup>, unión covalente) a pH 4 (■) y a pH 8 (●).

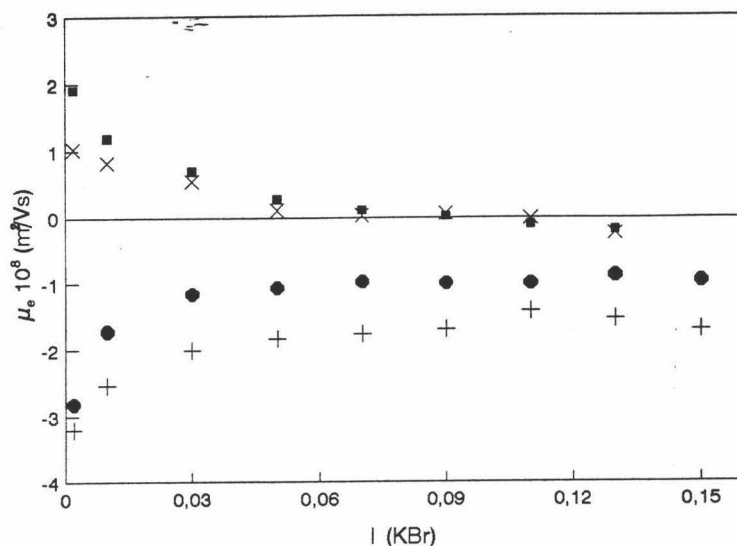


Fig. III.46. Movilidad de los complejos i) JL7-F(ab')<sub>2</sub> (2.0 mg/m<sup>2</sup>, unión física) a pH 4 (x) y a pH 8 (+); ii) JL7-F(ab')<sub>2</sub> (2.2 mg/m<sup>2</sup>, unión covalente) a pH 4 (■) y a pH 8 (●).

De estas gráficas cabe destacar los siguientes resultados más característicos:

- La respuesta de los complejos poliestireno-F(ab')<sub>2</sub> es independiente de la densidad superficial de carga del látex. Sólo el látex JL7 con proteína adsorbida físicamente parece tener una movilidad mayor (en valor absoluto) a pH8 y menor a pH4 que en el caso de los otros dos látex. Esto se debe a que el recubrimiento proteico de la superficie del primero es menor que en los segundos.

- A pH4 conforme aumenta la fuerza iónica del medio, el complejo alcanza una movilidad nula e incluso cambia de signo. La principal causa responsable de este resultado es el aporte de contraiones sobre la capa estructurada. De hecho, ya demostramos que el pI de estos complejos a baja fuerza iónica era de ≈4.5 (ver Figuras III.32 y33) y como se ve, a concentraciones de electrolito pequeñas, su movilidad (a pH4) no es nula. Recordemos que existe diferencia entre el punto de carga nula y el punto isoeléctrico; así por ejemplo, el valor de este último depende de la fuerza iónica del medio, hecho que se comprueba en las anteriores gráficas pues en ellas se puede ver que el pI de los complejos látex-F(ab')<sub>2</sub> se desplaza a pH4 para concentraciones de KBr de 100 mM.



- La respuesta de las partículas a pH8 se corresponde con la predicción de la teoría de Ohshima y Kondo, esto es, a medida que aumenta la concentración de electrolito la movilidad electroforética disminuye inicialmente y luego se mantiene constante. En la Figura III.47 se representan algunas curvas teóricas obtenidas con la ecuación III.14. El valor del potencial  $\zeta$  empleado fue el obtenido por la teoría de Dukhin-Semenikhin a partir de medidas de movilidad de los látex sin proteína (ver Capítulo II); a la hora de aplicar la anterior ecuación, se tuvo en cuenta que el valor de  $\zeta$  varía con la fuerza iónica.

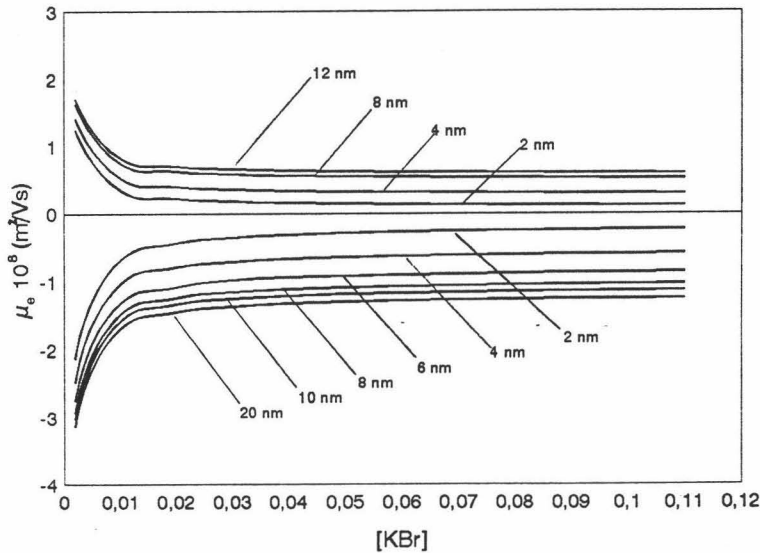


Fig. III.47. Dependencia de la movilidad teórica de superficies estructuradas con diferentes espesores "d". Movilidad negativa: N = 0.010 M y 1/λ = 3.3 nm. Movilidad positiva: N = 0.005 M y 1/λ = 3.3 nm.

- Podemos ver que existen diferencias entre los complejos con F(ab')<sub>2</sub> adsorbida físicamente y unida químicamente. En teoría no deberían existir pues la carga neta de todo el complejo superficial debe ser la misma en ambos casos. Si recordamos, en la unión covalente tras la activación de los grupos carboxilo con ECDI se desactivaban con glicina aquellos grupos que no hubiesen reaccionado con los grupos amino de la proteína, con lo que se regeneran de nuevo grupos carboxilo. Sin embargo, en un trabajo que se ha desarrollado recientemente en nuestro Departamento [51,52] se ha demostrado que la desactivación de los grupos carboxilo unidos a la ECDI no se produce por completo y siempre queda cierta cantidad de grupos -CO-ECDI con carga positiva en la superficie de las partículas. Este hecho hace que

su movilidad sea más alta a pH4 (como se puede ver a valores bajos de fuerza iónica) y más baja (en valor absoluto) a pH8.

- Por último, a partir de un estudio exhaustivo llevado a cabo para ver cómo la magnitud de las variables  $N$ ,  $\lambda$  y  $d$  afectan a la movilidad teórica, pudimos obtener los valores de la densidad de cargas ( $N$ ), el espesor ( $d$ ) y el parámetro  $\lambda$  que mejor ajustan la  $\mu_e$  teórica a nuestros resultados experimentales. En pH 8, éstos fueron de  $N = 10 \pm 2$  mM para los complejos con F(ab')<sub>2</sub> unida covalentemente y  $N = 15 \pm 2$  mM para los de adsorción física;  $1/\lambda = 3.0 \pm 0.5$  nm para todos los complejos; finalmente, los espesores de la capa proteica que mejor se ajustaban a nuestras medidas de movilidad electroforética están comprendidas en el intervalo  $d = 8 \pm 2$  nm, resultado que concuerda bien con las dimensiones de la F(ab')<sub>2</sub> (que recordemos que eran  $14 \times 4 \times 4$  nm<sup>3</sup>).

Si comparamos nuestros datos con los resultados obtenidos por Nakamura y col [68] en complejos látex-IgG y látex-albúmina de suero humana (HSA) podremos encontrar una buena concordancia, pues estos autores obtienen (a pH 8.5) valores de  $N = 18$  mM,  $1/\lambda = 2.0$  nm y  $d = 10$  nm para las partículas con IgG, y  $N = 25$  mM,  $1/\lambda = 2.0$  nm y  $d = 6$  nm para el sistema látex-HSA.

No obstante, no hemos podido obtener información a partir del comportamiento electrocinético de los complejos a pH 4, pues la teoría de Ohshima y Kondo no logra explicar los cambios de signo en la movilidad. Sin embargo, si comparamos nuestros resultados experimentales con los teóricos (Figura III.47), el valor de la densidad de grupos cargados en la capa de proteína (a pH 4) ha de ser  $N \leq 5$  mM, valor que puede reflejar la pequeña densidad de carga que tiene la molécula de F(ab')<sub>2</sub> en las proximidades de su pl (4.7 - 6.0).

### III.5. ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS LÁTEX-F(ab')<sub>2</sub>.

La estabilidad coloidal de los complejos látex-anticuerpo es posiblemente el principal punto de interés que se ha de tener en cuenta cuando se quiere caracterizar de forma rigurosa estos sistemas. No debemos olvidar que la aplicación tecnológica de las partículas de poliestireno recubiertas con proteínas relacionadas con el sistema inmune está enfocada hacia el desarrollo de tests de diagnóstico. En ellos se cuantifica la presencia de una determinada proteína en un medio (por ejemplo, un antígeno) en función de la extensión con que se produce la agregación del sistema. Si el sistema se aglutinara en ausencia de tal antígeno, imaginemos que por inestabilizarse en el medio donde se lleva a cabo la reacción, esta coagulación inespecífica conduciría a una diagnosis errónea. Antes de seguir más

adelante reflexionemos un poco sobre cuál debe ser el medio ideal donde llevar a cabo los inmunoensayos de partículas de látex.

Uno de los objetivos fundamentales que hacia donde están enfocados estos sistemas de diagnóstico se centra en la detección de diversos antígenos que estén presentes en suero sanguíneo o en orina. Por tanto, el medio de reacción básico debería estar constituido, al menos, por una disolución acuosa cuyo pH y fuerza iónica sea similar o próxima a la de estos fluidos biológicos, es decir,  $\text{pH} \approx 7.4$  y fuerza iónica  $\approx 0.15$ . Por ello, nuestro esfuerzo debe centrarse en obtener partículas de látex recubiertas de proteína capaces de ser coloidalmente estables en disoluciones acuosas de pH neutro y con concentraciones de electrolito (1:1) iguales o superiores a 150 mM. Es en este momento cuando podemos (y debemos) justificar el porqué se ha usado el fragmento  $\text{F(ab')}_2$  como la proteína que actúa de anticuerpo y no la molécula completa de IgG. La molécula de IgG presenta fundamentalmente dos problemas cuando se emplea en el desarrollo de tests de aglutinación de látex:

i) Por su naturaleza, las moléculas de inmunoglobulina G de la mayoría de los animales presentan una banda de puntos isoeléctricos comprendida entre 6.5 y 8.5. Por tanto, partículas de látex recubiertas con esta proteína coagulan con bastante facilidad a pHs próximos al fisiológico, ya que la capa proteica externa se haya descargada. Este resultado es bien conocido por los investigadores de este campo de la Ciencia, los cuales han empleado diversas estrategias (que ya comentaremos en el siguiente capítulo) para poder estabilizar los sistemas coloidales polímero-IgG. A modo de ejemplo diremos que Galisteo [19] ha obtenido valores de C.C.C. siempre menores a 50 mM en KBr para diferentes sistemas de poliestireno-IgG policlonal a pH7.

ii) Otro problema que puede aparecer cuando se usan moléculas de IgG en tests de aglutinación de partículas de látex es el siguiente. La mayoría de animales poseen anticuerpos que son específicos frente a determinadas células y tejidos propios del mismo individuo: son los llamados autoanticuerpos. Entre los autoanticuerpos más comunes en el hombre se encuentran los "factores reumatoides", grupo de anticuerpos que están dirigidos frente a las globulinas gamma [3]. Los factores reumatoides están presentes en pequeñas concentraciones en personas normales y en concentraciones mucho mayores en pacientes de diversas enfermedades. Estas proteínas se unen a la porción Fc de las moléculas de IgG [69]; por tanto, al intentar cuantificar un determinado antígeno con partículas recubiertas de IgG en un suero rico en factor reumatoide, se produciría un falso positivo en la diagnosis de

la enfermedad que se busca, pues el sistema precipitaría por la presencia de las anteriores proteínas.

Estas son las principales razones por las que algunos autores [70,71] presentan la adsorción del fragmento F(ab')<sub>2</sub> sobre soportes poliméricos como una posible solución a los problemas que se originan al usar la molécula de IgG. Por un lado, al poseer un intervalo de puntos isoeléctricos más ácido, estas moléculas presentarían una carga neta negativa a pH neutro que podría mejorar la estabilidad coloidal del sistema, ya que aparecerían repulsiones de tipo coulombiano. Por otra parte, al eliminarse el fragmento Fc de la molécula original de proteína desaparece el riesgo de la aglutinación inespecífica causado por sustancias que no actúan como antígeno, evitando diagnosis erróneas.

Se realizaron las mismas experiencias de estabilidad que se describieron en el capítulo anterior para determinar la concentración crítica de coagulación de los complejos. Como ejemplo, mostramos aquellos resultados que se obtuvieron con los látex JL2 y JL8 en las Figuras III.48 y 49.

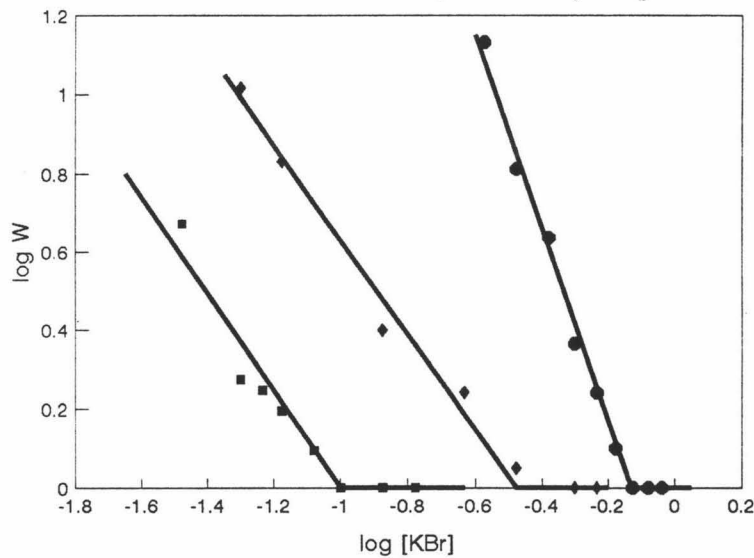


Fig. III.48. Variación del factor de estabilidad (W) con la concentración de electrolito del medio para el látex JL2 (●), JL2-F(ab')<sub>2</sub> (1.1 mg/m<sup>2</sup>) (◆) y JL2-F(ab')<sub>2</sub> (2.9 mg/m<sup>2</sup>) (■). Experiencias realizadas a pH 5.

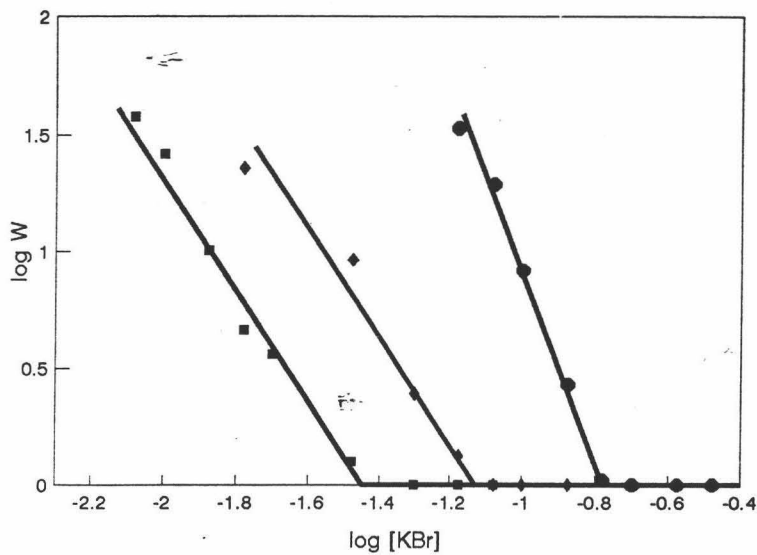


Fig. III.49. Variación del factor de estabilidad (W) con la concentración de electrolito del medio para el látex JL8 (●), JL8-F(ab')<sub>2</sub> (1.6 mg/m<sup>2</sup>) (◆) y JL8-F(ab')<sub>2</sub> (4.0 mg/m<sup>2</sup>) (■). Experiencias realizadas a pH 5.

Como se puede ver el valor de la C.C.C. depende del grado de recubrimiento de las partículas. También su valor es función del pH del medio, por lo que estos dos fueron los parámetros a estudiar en nuestros complejos látex-F(ab')<sub>2</sub>. Los resultados se muestran en las Figuras III.50-55.

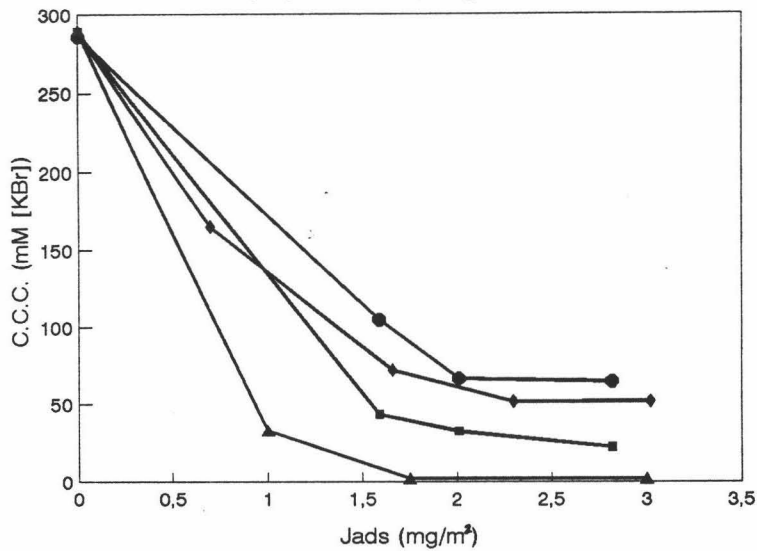


Fig. III.50. Dependencia de la concentración crítica de coagulación del sistema JL1-F(ab')<sub>2</sub> en función de la cantidad de proteína adsorbida en su superficie. pH4 (▲), pH5 (■), pH7 (◆) y pH9 (●).

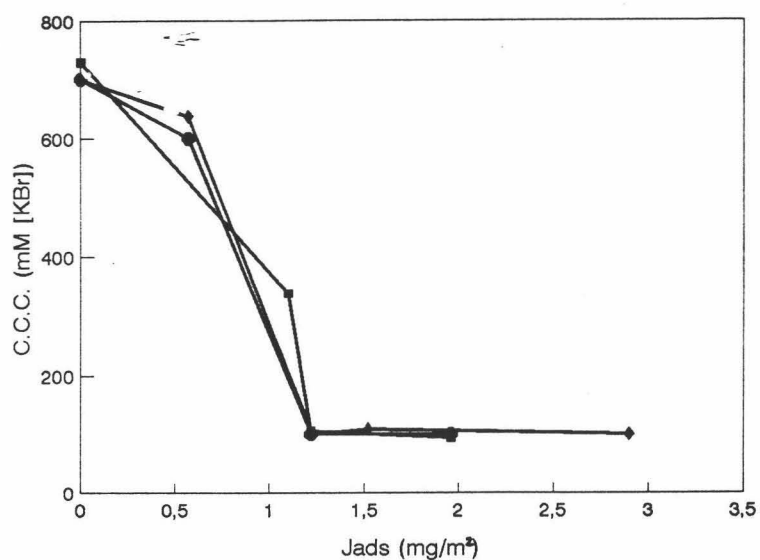


Fig. III.51. Dependencia de la concentración crítica de coagulación del sistema JL2-F(ab')<sub>2</sub> en función de la cantidad de proteína adsorbida en su superficie. pH5 (■), pH7 (◆) y pH9 (●).

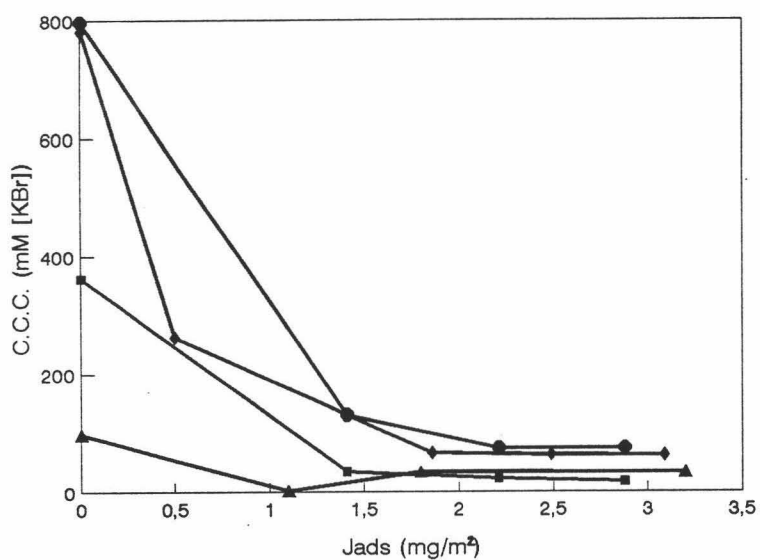


Fig. III.52. Dependencia de la concentración crítica de coagulación del sistema JL4-F(ab')<sub>2</sub> en función de la cantidad de proteína adsorbida en su superficie. pH4 (▲), pH5 (■), pH7 (◆) y pH9 (●).

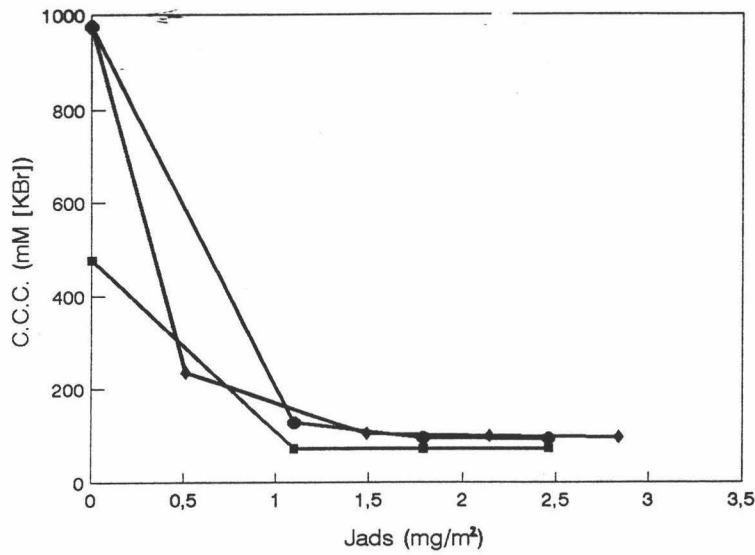


Fig. III.53. Dependencia de la concentración crítica de coagulación del sistema JL7-F(ab)<sub>2</sub> en función de la cantidad de proteína adsorbida en su superficie. pH5 (■), pH7 (◆) y pH9 (●).

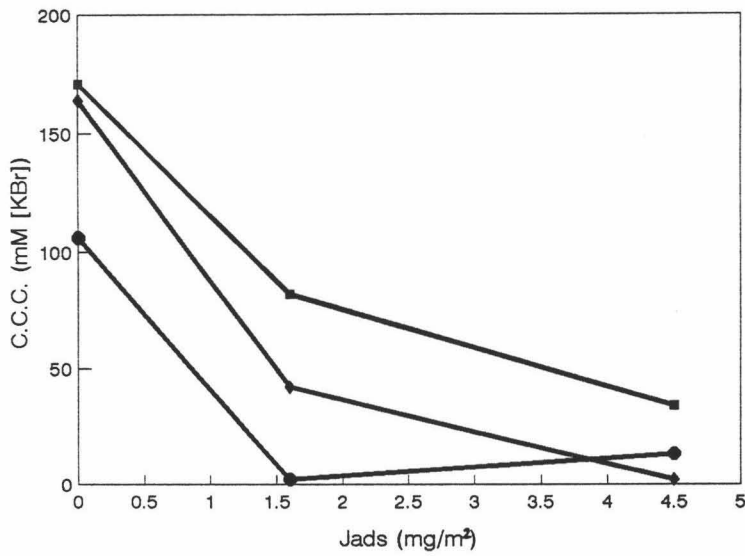


Fig. III.54. Dependencia de la concentración crítica de coagulación del sistema JL8-F(ab)<sub>2</sub> en función de la cantidad de proteína adsorbida en su superficie. pH5 (■), pH7 (◆) y pH9 (●).

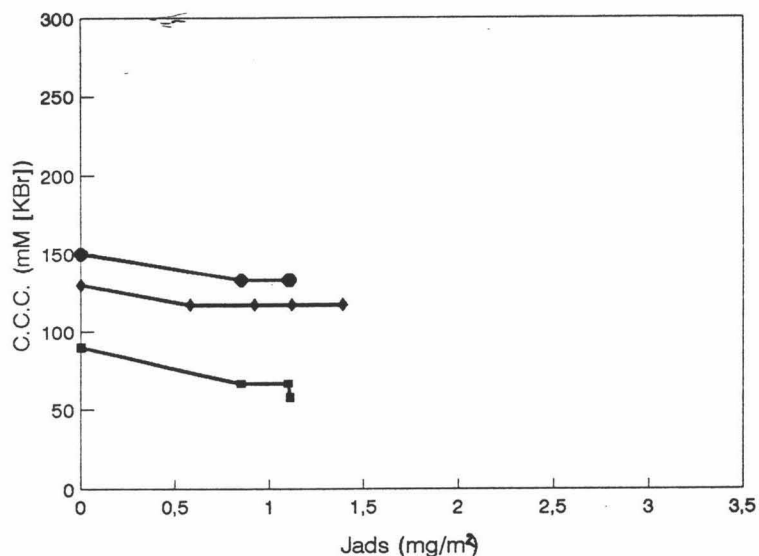


Fig. III.55. Dependencia de la concentración crítica de coagulación del sistema JL10-F(ab')<sub>2</sub> en función de la cantidad de proteína adsorbida en su superficie. pH5 (■), pH7 (◆) y pH9 (●).

A primera vista podemos comprobar que al recubrir las partículas de látex con F(ab')<sub>2</sub> su estabilidad coloidal disminuye en todos los casos. Esta inestabilidad se hace más acusada en condiciones bajo las cuales la proteína se haya descargada. Si analizamos los resultados podremos extraer las siguientes conclusiones:

- El escaso recubrimiento proteico de las partículas del látex más hidrofílico (JL10) hace que la concentración crítica de coagulación varíe de forma insignificante.

- En el resto de los látex aniónicos, la C.C.C. de los complejos disminuye rápidamente hasta que alcanza un valor constante cuando la cantidad de F(ab')<sub>2</sub> adsorbida es superior a cierto valor límite ( $\approx 1.5 \text{ mg/m}^2$ ). Los valores de C.C.C. en los látex sulfonatados y carboxilatados cuando se encuentran a máximo recubrimiento de proteína se muestran en la Tabla III.4.



Muestra	pH del medio	C.C.C. (mM en KBr)
JL1 - F(ab') <sub>2</sub> (... mg/m <sup>2</sup> )	pH 5	27 ± 4
	pH 7 y pH 9	55 ± 5
JL2 - F(ab') <sub>2</sub> (... mg/m <sup>2</sup> )	pH 5	100 ± 10
	pH 7 y pH 9	100 ± 10
JL4 - F(ab') <sub>2</sub> (... mg/m <sup>2</sup> )	pH 5	20 ± 3
	pH 7 y pH 9	60 ± 5
JL7 - F(ab') <sub>2</sub> (... mg/m <sup>2</sup> )	pH 5	70 ± 3
	pH 7 y pH 9	95 ± 5

Tabla III.4. Valores de la C.C.C. para algunas muestras.

El que los complejos sean más inestables a pH 5 queda confirmado con las medidas de movilidad electroforética, frente al pH, que se llevaron a cabo con estos complejos (Figuras III.30-33); éstas indican que la carga electrocinéticamente transportada es muy baja a pHs ligeramente ácidos. El látex JL2 es el que mostraba una mayor movilidad en esta zona de pH, hecho que concuerda con que el valor de la C.C.C. a pH 5 sea ligeramente superior que en los demás látex aniónicos. Se realizaron experiencias de estabilidad a pH4 con un látex sulfonatado (JL1) y con uno carboxilatado (JL4) y los resultados también pueden explicarse en base a las medidas de movilidad. Sin embargo, cuando nos encontramos a pH neutro, los valores de movilidad de dichas gráficas no justifican el descenso tan acusado de la concentración crítica de coagulación en los complejos polímero-proteína cuando se comparan estos resultados con los obtenidos en partículas de látex sin recubrimiento alguno. No nos debemos dejar engañar por estos datos, pues fueron obtenidos a baja fuerza iónica ( $I = 0.002$ ). Donde nos deberíamos fijar es en las gráficas que muestran la dependencia de la movilidad de las partículas coloidales frente a la concentración de electrolito (Figuras III.37-40). En ellas sí se ve que a valores de fuerza iónica de 0.1 existe una gran diferencia de movilidad entre el látex original y el que se haya totalmente recubierto con F(ab')<sub>2</sub>. Este resultado podría explicarse en base al aporte de contraiones hacia la interfase; de hecho, estos iones son capaces de difundir en la capa de proteína, cosa que no puede tener lugar

en superficies lisas como podrían ser la de los látex sin recubrimiento proteico.

- Para el látex catiónico sucede algo parecido a lo encontrado con los otros látex: a medida que recubrimos las partículas poliméricas con F(ab')<sub>2</sub> su estabilidad disminuye, alcanzando valores finales menores a 50 mM en KBr. Sin embargo, en este caso los complejos son más estables a pH 5 que a pH 7 o 9. Esto se debe a que, aunque la proteína esté descargada, el comportamiento general del sistema está influenciado también por la naturaleza del látex que actúa de soporte (hecho que ya fue comentado previamente y justificado con la Figura III.36). A pH5 el complejo JL8-F(ab')<sub>2</sub> tiene una movilidad positiva, la cual se anula a pH7 y posteriormente cambia de signo a pHs superiores; pues como se ve, la misma tendencia aparece en la estabilidad del complejo anteriormente mencionado.

A pH 9 tiene lugar un fenómeno de coagulación conocido como floculación o precipitación por puenteo ("bridging") [72]. En estas condiciones de pH tenemos las proteínas con una carga neta negativa y la superficie polimérica del látex es aún positiva y, como podremos ver, a bajo recubrimiento proteico el sistema se inestabiliza por completo. Esto se debe a que existen zonas libres en la superficie de las partículas que permiten que una molécula de proteína adsorbida sobre una partícula pueda adsorberse simultáneamente sobre otra haciendo de puente de unión entre las dos. A nivel macroscópico el sistema aparecería totalmente coagulado. Este fenómeno desaparece a medida que la superficie de las partículas se va recubriendo de proteína, resultado que encontramos en nuestras medidas experimentales. (Este mismo comportamiento también se encontró en los complejos JL4-F(ab')<sub>2</sub> cuando se llevaron a cabo las experiencias de estabilidad a pH 4).

Todo lo que hemos comentado hasta ahora para el látex catiónico concuerda con los valores obtenidos de la movilidad de estos complejos frente a la fuerza iónica (Figura III.41).

Otra posible causa que pudiera contribuir a que la estabilidad de estos sistemas sea pequeña puede ser que posean un valor de la constante de Hamaker elevada. Esto lo intentan demostrar Nakamura y col [73] en un trabajo reciente, pero obtienen que la constante de Hamaker para complejos de poliestireno-IgG es menor ( $1.2 \cdot 10^{-20}$  J) que para el látex sin carga proteica ( $1.7 \cdot 10^{-20}$  J). Estos autores concluyen que esta diferencia de valores es tan pequeña debido a que la contribución que tiene la fina capa de proteína sobre la atracción de Van der Waals entre las partículas también lo es, y que la baja estabilidad de los complejos látex-IgG se debe a que éstos poseen pequeños valores de potencial superficial.

Debemos indicar que sólo hemos encontrado la anterior cita bibliográfica donde unos autores aplican teorías de estabilidad a partículas con interfases estructuradas. Ya

comentamos en el capítulo anterior que Vincent y col [74] incluyen en la teoría DLVO dos nuevos términos que tienen en cuenta la contribución estérica. La aplicación de estas nuevas contribuciones está justificada cuando se trabaja con partículas coloidales que tienen cadenas altamente hidrófilas situadas en superficie. Por los resultados obtenidos en nuestros sistemas no parece haber estabilización estérica en las partículas de látex recubiertas con  $F(ab')_2$ , por lo que no hemos aplicado su teoría para analizar nuestros resultados. Sin embargo, sí podemos aplicar el anterior trabajo de Nakamura y col. para obtener información sobre la constante de Hamaker de nuestros complejos, teniendo en cuenta la teoría de Ohshima y Kondo para la distribución de potenciales a lo largo de la interfase estructurada. Si recordamos la teoría DLVO (**Capítulo II**) se llega a que en la C.C.C. la constante de Hamaker vale:

$$A = cte \frac{\gamma^2}{C.C.C.^{1/2} z^3} \quad (III.16)$$

siendo el parámetro  $\gamma$  igual a

$$\gamma = \tanh\left(\frac{ze\Psi_d}{4kT}\right) \quad (III.17)$$

y donde la constante vale de la ecuación III.16 vale  $2.867 \cdot 10^{-18} \text{ J mol}^{1/2} \text{ m}^{-3/2}$  expresando la concentración crítica de coagulación en mM.

Sin embargo, cuando sobre la superficie del látex tenemos una capa de proteína adsorbida, el potencial responsable de la energía de repulsión electrostática debe ser el potencial que existe en el límite exterior de la capa proteica,  $\Psi_{(0)}$  de la ecuación III.15, y no el potencial difuso del látex ( $\Psi_d$ ). Como recordemos,  $\Psi_{(0)}$  tiene en cuenta tanto la contribución de las cargas fijas de la capa de proteína como el potencial  $\zeta$  asociado a las partículas de látex sin proteína adsorbida.

$$\Psi_{(0)} = \lim_{d \rightarrow \infty} \Psi(0) = \frac{kT}{ve} \ln \left[ \frac{zN}{2v\eta} + \left( \left( \frac{zN}{2v\eta} \right)^2 + 1 \right)^{1/2} \right] +$$

$$+ \frac{2kTn}{zeN} \left[ 1 - \left( \frac{zN}{2vn} \right)^2 + 1 \right]^{1/2} + \frac{4kT}{ve} \tanh \frac{ve\zeta}{4kT} e^{-\kappa_m d} \quad (\text{III.18})$$

A partir de nuestros experimentos de movilidad electroforética realizados con los látex carboxilatados que tenían F(ab')<sub>2</sub> adsorbida en sus superficie, hemos obtenido los valores de los parámetros *N* y *d* necesarios para realizar este cálculo, siendo éstos de *N* = 15 mM y *d* = 8 nm. También es necesario conocer el valor del potencial ζ de los látex sin proteína en las condiciones de la C.C.C. de los complejos (esto es, a 60 mM para el JL4 y a 95 mM para el JL7). En el capítulo anterior se calcularon los valores del potencial ζ de los látex en función de la fuerza iónica, siendo éstos ζ<sub>JL4 a 60 mM</sub> ≈ 50 mV y ζ<sub>JL7 a 95 mM</sub> ≈ 55 mV. Los valores de la constante de Hamaker calculada tras aplicar las tres ecuaciones anteriores aparecen en la Tabla III.5.

Látex	Ψ <sub>d</sub> (mV)	A <sub>Sin prot.</sub> (10 <sup>21</sup> J)	Ψ <sub>(0)</sub> (mV)	A <sub>Con prot.</sub> (10 <sup>20</sup> J)
JL4	10.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2	47 ± 2	2.0 ± 0.2
JL7	13.0 ± 0.2	0.8 ± 0.1	51 ± 2	2.3 ± 0.2

Tabla III.5. Comparación de la constante de Hamaker entre las partículas carboxilatadas con y sin capa de proteína exterior.

Como se puede ver las constantes de Hamaker de las partículas con y sin proteína se diferencian en un orden de magnitud. El resultado tan elevado que encontramos en los complejos proteicos surge como resultado del gran valor que tiene el potencial teórico Ψ<sub>(0)</sub>; resultados que no se corresponden con la realidad puesto que la teoría de Ohshima y Kondo considera que sobre Ψ<sub>(0)</sub> sólo influye la densidad de carga de la capa de proteína y el potencial ζ asociado a la superficie del soporte sólido (el cual es bastante alto a fuerzas iónicas ≤ 0.1). Sin embargo, no tiene en cuenta la presencia de los contraiones que quedan adsorbidos en la interfase sólido-proteína, los cuales pueden hacer disminuir de forma crítica la densidad de carga negativa (para látex aniónicos) que hay en esa zona. Si esto se pudiera cuantificar obtendríamos un valores de potencial Ψ<sub>(0)</sub> menores, que conducirían a valores de la constante de Hamaker inferiores.

Tras este análisis de los resultados podemos decir que la baja estabilidad de los complejos látex-F(ab')<sub>2</sub> se debe: i) al efecto de una baja repulsión electrostática entre las partículas,

efecto causado principalmente por la presencia de contraiones situados en la interfase estructurada. También contribuye a esta inestabilidad ii) la baja densidad de carga que posee nuestra proteína (10-15 mM) en comparación con otras proteínas comunes, como la BSA o la HSA (25 mM [68]) y iii) un aumento (cuestionable) de la constante de Hamaker del sistema. Por último diremos que tampoco hay ningún resultado que indique la existencia de alguna estabilización adicional de origen estérico.

No obstante, y como conclusión final sí podemos decir que los látex aniónicos tienen una estabilidad mayor a pH neutro cuando tienen  $F(ab')_2$  adsorbida en vez de IgG, tal y como hemos demostrado en un trabajo previo [75], por lo que la utilización de este fragmento proteico ya presenta una doble ventaja frente al empleo de la molécula de IgG: la estabilidad del complejo final es mayor y se elimina el riesgo de coagulación de las partículas por acción de los "factores reumatoides". Sin embargo, los complejos poliestireno- $F(ab')_2$  no son suficientemente estables bajo condiciones fisiológicas (pH 7.4,  $I = 0.15$ ), por lo que su aplicación en el desarrollo de tests de diagnóstico no podría llevarse a cabo de una forma directa. Hay que buscar alternativas para poder aumentar la estabilidad de estos sistemas, objetivo al que le dedicamos el siguiente capítulo.

### III.6. BIBLIOGRAFÍA.

1. L. Stryer. "Bioquímica". Ed. Reverté. Barcelona. 1988.
2. E. Herrera. "Bioquímica". Interamericana-Emalsa. Madrid. 1986.
3. "Libros de Investigación y Ciencia: Inmunología". Ed. Lábor. Barcelona. 1983.
4. G.N. Ramachandran y V. Sasisekharan. *Adv. Protein Chem.* **23** : 283 (1968).
5. T.E. Creighton. "Proteins, Structures and Molecular Principles". W.H. Freeman. New York. 1983.
6. W. Norde y J. Lyklema. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* **2** : 183 (1991).
7. G.C. Kresheck y I.M. Klotz. *Biochemistry.* **8** : 8 (1969).
8. W. Krauzmann. *Adv. Protein Chem.* **14** : 1 (1959).
9. A. Baszkin y D.J. Lyman. *J. Biomed. Mater. Res.* **14** : 393 (1980).
10. M.H. Abraham. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **69** : 1375 (1973).
11. A.F. Danil de Namor, E. Contreras y E. Sigsted. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **69** : 1375 (1973).
12. F. MacRitchie. *Adv. Prot. Chem.* **32** : 283 (1978).

13. J.S. Tan y P.A. Martic. *J. Colloid Interface Sci.* **136** : 415 (1990).
14. W. Norde, F. MacRitchie, G. Nowicka y J. Lyklema. *J. Colloid Interface Sci.* **112** : 447 (1986).
15. W. Norde. *Adv. Colloid Interface Sci.* **25** : 267 (1986).
16. B.M.C. Chan y J.L. Brash. *J. Colloid Interface Sci.* **84** : 263 (1981).
17. M-E. Soderquist y A.G. Walton. *J. Colloid Interface Sci.* **74** : 386 (1980).
18. W. Norde y J. Lyklema. *J. Colloid Interface Sci.* **71** : 350 (1979).
19. F. Galisteo González. "Adsorción de proteínas sobre modelos coloidales". Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1992.
20. A. Martín Rodríguez. "Síntesis, caracterización y aplicaciones de coloides poliméricos funcionalizados". Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1993.
21. V.R. Sarma, E.W. Silverton, D.R. Davies y W.D. Terry. *J. Biol. Chem.* **216** : 3753 (1971).
22. M.D. Bale, S.J. Danielson, J.L. Daiss, K.E. Goppert y R.C. Sutton. *J. Colloid Interface Sci.* **132** : 176 (1989).
23. S. Hajra y D.K. Chattoraj. *Indian J. Biochem. Biophys.* **28** : 114 (1991).
24. D. Sarkar y D.K. Chattoraj. *J. Surface Sci. Technol.* **8** : 231 (1992).
25. H.B. Bull. *Biochem. Biophys. Acta.* **19** : 464 (1956).
26. H.B. Bull. *Arch. Biochem. Biophys.* **68** : 102 (1957).
27. K. Gekko y Y. Hasegawa. *Biochemistry.* **25** : 6563 (1986).
28. A. Kondo, S. Oku y K. Higashitani. *J. Colloid Interface Sci.* **143** : 214 (1991).
29. Ch. M. Roth y A.M. Lenhoff. *Langmuir.* **9** : 962 (1993).
30. D.R. Lu, S.J. Lee y K. Park. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* **3** : 127 (1991).
31. F. MacRitchie. *J. Colloid Interface Sci.* **38** : 484 (1972).
32. B.W. Morrisey y R.R. Stromberg. *J. Colloid Interface Sci.* **46** : 152 (1974).
33. P. Bagchi y S.M. Birnbaum. *J. Colloid Interface Sci.* **83** : 460 (1981).
34. P.G. Koutsokos, C.A. Numme-Young, W. Norde y J. Lyklema. *Colloids & Surfaces.* **5** : 93 (1982).
35. T. Suzawa y H. Shirahama. *Adv. Colloid Interface Sci.* **35** : 139 (1991).
36. C.A. Johnson, P. Wu y A.M. Lenhoff. *Langmuir.* **10** : 3705 (1994).
37. W. Norde y L. Lyklema. *J. Colloid Interface Sci.* **66** : 257 (1978).
38. W. Norde y L. Lyklema. *J. Colloid Interface Sci.* **66** : 266 (1978).
39. I. Lundström y H. Elwing. *J. Colloid Interface Sci.* **136** : 68 (1990).
40. J.D. Andrade y V. Hlady. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **516** : 158 (1987).
41. J.D. Andrade, V. Hlady, A.P. Wei, C.H. Ho, A.S. Lea, S.I. Jeon, Y.S. Lin y E. Stroup. *Clinical Materials.* **11** : 67 (1992).

42. J.Grange, A.M. Roch y G.A. Quash. *J. Immunol. Methods*. **18** : 365 (1977).
43. W. Kapmeyer. *Pure & Appl. Chem.* **63** : 1139 (1991).
44. P. Montagne, P. Varcin, M.L. Cuillière y J. Duheille. *Bioconjugate Chem.* **3** : 187 (1992).
45. H. Kitano, S. Iwai, T. Okubo y N. Ise. *J. Am. Chem. Soc.* **109** : 7608 (1987).
46. C.P. Price, A.K. Trull, D. Berry y E.G. German. *J. Immunol. Methods*. **99** : 205 (1987).
47. H.G. Khorana. *Chem. Rev.* **53** : 145 (1953).
48. D.F. De Tar y R. Silverstein. *J. Am. Chem. Soc.* **88** : 1013 (1966).
49. J.V. Staros, R.W. Wright y D.M. Swingle. *Analytical Biochem.* **156** : 220 (1986).
50. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. *J. Biol. Chem.* **193** : 265 (1951).
51. D. Bastos González, J.L. Ortega Vinuesa, F.J. de las Nieves López y R. Hidalgo Álvarez. *J. Colloid Interface Sci.* Aceptado para su publicación. 1995.
52. J.L. Ortega Vinuesa, D. Bastos González y R. Hidalgo Álvarez. *J. Colloid Interface Sci.* Aceptado para su publicación. 1995.
53. W. Norde y J. Lyklema. *J. Colloid Interface Sci.* **66** : 277 (1978).
54. H. Shirahama, K. Takeda y T. Suzawa. *J. Colloid Interface Sci.* **109** : 552 (1986).
55. A.V. Elgersma, R.L.J. Zsom, W. Norde y J. Lyklema. *J. Colloid Interface Sci.* **138** : 145 (1990).
56. A.V. Elgersma, R.L.J. Zsom, W. Norde y J. Lyklema. *Colloids & Surfaces.* **54** : 89 (1991).
57. A.V. Elgersma. "Competitive adsorption of albumin and monoclonal  $\gamma$ -globuline molecules on polystyrene surfaces". Tesis Doctoral. Universidad de Wageningen. Holanda. 1990.
58. H. Ohshima, M. Nakamura y T. Kondo. *Colloid Polym. Sci.* **270** : 873 (1992).
59. E. Donath y V. Pastushenko. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **6** : 543 (1979).
60. R.W. Wunderlich. *J. Colloid Interface Sci.* **88** : 385 (1982).
61. S. Levine, M. Levine, K.A. Sharp y D.E. Brooks. *Biophys. J.* **42** : 127 (1983).
62. K.A Sharp y D.E. Brooks. *Biophys. J.* **47** : 563 (1985).
63. H. Ohshima y S. Ohki. *Biophys. J.* **47** : 673 (1985).
64. H. Ohshima y T. Kondo. *J. Colloid Interface Sci.* **116** : 305 (1987).
65. H. Ohshima y T. Kondo. *Colloid Polym. Sci.* **264** : 1080 (1986).
66. H. Ohshima y T. Kondo. *J. Colloid Interface Sci.* **130** : 281 (1989).
67. H. Ohshima y T. Kondo. *Biophys. Chem.* **39** : 191 (1991).
68. M. Nakamura, H. Ohshima y T. Kondo. *J. Colloid Interface Sci.* **149** : 241 (1992).



69. A.B. Pereira, A.N. Theofilopoulos y F.J. Dixon. *J. Immunol.* **125** : 763 (1980).
70. M. Muratsugu, S. Kurošawa y N. Kamo. *J. Colloid Interface Sci.* **147** : 378 (1991).
71. H. Kawaguchi, K. Sakamoto, Y. Ohtsuka, T. Ohtake, H. Sekiguchi y H. Iri. *Biomaterials.* **10** : 225 (1989).
72. J.M. Singer, F.C.A. Vekemans, J.W.Th. Lichtenbelt, F.Th. Hesselink y P.H. Wiersema. *J. Colloid Interface Sci.* **45** : 608 (1973).
73. M. Nakamura, H. Ohshima y T. Kondo. *J. Colloid Interface Sci.* **154** : 393 (1992).
74. B. Vincent, J. Edwards, S. Emmett y A. Jones. *Colloid & Surfaces.* **18** : 261 (1986).
75. J.L. Ortega Vinuesa y R. Hidalgo Álvarez. *Colloid & Surfaces.* **1** : 365 (1993).



**IV. ESTRATEGIAS PARA AUMENTAR LA ESTABILIDAD**

**DEL COMPLEJO LÁTEX-F(ab')<sub>2</sub>**

#### IV.1. INTRODUCCIÓN

Como acabamos de ver en el Capítulo anterior, al recubrir las partículas poliméricas con  $F(ab')_2$  la estabilidad de los sistemas disminuye. Para evitar que las partículas colapsen en condiciones de baja y media fuerza iónica debemos recurrir al empleo de diferentes tipos de macromoléculas que mejoren la estabilidad de los complejos látex- $F(ab')_2$ .

Los surfactantes son los agentes estabilizadores de sistemas coloidales más importantes. Su utilización durante la síntesis de partículas poliméricas está muy generalizada y tienen como función cumplir un doble objetivo (como ya comentamos en el **Apéndice I** de esta memoria): por un lado especifican el mecanismo de nucleación de las partículas y por otro estabilizan el sistema coloidal en formación. Sin embargo, como ya apuntamos en dicho anexo, su uso también presenta ciertas desventajas; entre ellas destacamos las siguientes: i) pueden desnaturar las proteínas, hecho que sucede con surfactantes de bajo peso molecular como el SDS (dodecilsulfato de sodio), o bien ii) pueden desorber las proteínas que se hallan previamente adsorbidas. Este tipo de desorción ya lo pusimos en práctica empleando Tween-20 (un surfactante no iónico) durante el proceso de la unión covalente de  $F(ab')_2$  sobre los látex carboxilados, para eliminar las moléculas proteicas adsorbidas físicamente a la superficie de poliestireno. Lichtenbelt y col [1] demuestran que la desorción de proteína es más efectiva si se emplean surfactantes no iónicos en vez de usar tensioactivos cargados. Puesto que la unión del fragmento  $F(ab')_2$  a nuestras partículas de látex está, presumiblemente, entrópicamente dirigida y las fuerzas de unión son de carácter hidrofóbico y no de tipo químico, no podemos emplear moléculas de surfactante para intentar mejorar la estabilidad de los sistemas sin que corramos el peligro de que se desnature o se desorba la inmunoproteína. Por esta razón debemos buscar otros agentes estabilizadores.

Otros métodos alternativos que se han planteado para aumentar la estabilidad de partículas de látex sensibilizadas con inmunoproteínas son:

a) El empleo de IgGs monoclonales que presenten puntos isoeléctricos alejados del pH fisiológico al menos en una unidad [2]. Sobre este tema se ha realizado un trabajo coordinado entre nuestro grupo de investigación y el Departamento de Bioquímica Clínica del London Hospital Medical College (Inglaterra) en el que se ha comprobado que la estabilidad de las partículas del látex JL3 recubiertas parcialmente con IgGs policlonales ( $\approx 1.5 \text{ mg/m}^2$ ) es menor que la del látex sin carga proteica (C.C.C.  $< 0.6 \text{ M}$  de KBr en pH 8); pero cuando aquellas tienen adsorbida en su superficie IgG monoclonal ( $pI \approx 6.8$ ) en cantidades de  $1.5 \text{ mg/m}^2$ , su estabilidad es superior a la del látex sin proteína (C.C.C.  $\geq 1.2 \text{ M}$  de KBr en pH 8).

b) Otros autores emplean látex hidrofílicos de poliacrilamida o poliacrílico (en vez de los hidrofóbicos de poliestireno) para obtener inmunocomplejos látex-proteína estables en condiciones fisiológicas [3,4]; no obstante, la unión de las macromoléculas a las superficies poliméricas ha de hacerse a través de enlaces químicos, pues la adsorción espontánea de proteínas sobre estas partículas hidrofílicas no está favorecida energéticamente.

c) También existen ciertas proteínas que pueden actuar como agentes estabilizantes. Una de ellas es la albúmina que se encuentra en el suero sanguíneo de muchos mamíferos. De esta proteína podemos destacar dos características fundamentales que van a permitir su utilización en la estabilización de sistemas de una forma generalizada: por una parte, es una molécula que presenta una alta densidad superficial de carga fuera de su punto isoeléctrico; por otro lado, la obtención de grandes cantidades de albúmina a partir de sueros animales es relativamente poco costosa, ya que es una de las 3 proteínas sanguíneas que mayores concentraciones fisiológicas poseen: albúmina (40 mg/ml), inmunoglobulinas G (12 mg/ml) y fibrinógeno (3 mg/ml). En nuestro trabajo hemos empleado albúmina de suero bovino (BSA) para realizar su coadsorción junto con el fragmento  $F(ab')_2$ .

d) Otra estrategia que hemos puesto en práctica para intentar mejorar la estabilidad de nuestros complejos es adsorber un lípido sobre las partículas de látex. La estructura molecular de estas sustancias es similar a la de los surfactantes, pues constan de una parte apolar o hidrófoba y de una cabeza polar. Una hipotética ventaja que podemos encontrar en el uso de lípidos como agentes estabilizadores es la siguiente: son los principales componentes de las membranas biológicas, macroestructuras bien organizadas que presentan una elevada estabilidad coloidal, hecho que se constata con la gran cantidad de glóbulos rojos y otras células que permanecen estables en el torrente sanguíneo. Por ello podrían coadsorberse junto a proteínas sobre partículas poliméricas dando lugar a interfases estructuradas de forma parecida (pero mucho más simples) a las membranas celulares. Veamos los resultados que hemos obtenido tanto con la BSA como con el lípido.

#### IV. COADSORCIÓN SECUENCIAL DE $F(ab')_2$ Y BSA.

Se sabe que una proteína en disolución puede desplazar a otra que se halla situada en una interfase. Este hecho se pone de manifiesto cuando se adsorben proteínas plasmáticas sobre soportes sólidos. Fue a finales de los años 60, principio de los 70, cuando Vroman y col [5-7] confirmaron experimentalmente anteriores sospechas de que la adsorción de tales proteínas ocurre de manera jerárquica, produciéndose diversos procesos cinéticos de colisión, adsorción e intercambios superficiales de proteínas. La extensión con que se producen estos

procesos depende de la concentración relativa de las diferentes proteínas, de sus coeficientes de difusión y de su afinidad por la interfase. Para las proteínas plasmáticas se ha demostrado que la albúmina (que posee bajo peso molecular) es la primera proteína que se adsorbe sobre una superficie; posteriormente es desplazada por IgG, la cual es desplazada por fibrinógeno y fibronectina, las cuales a su vez son desplazadas por quinínogeno de alto peso molecular (HMWK) y por el factor de coagulación XII (FXII). A este orden "jerarquizado" de adsorción de proteínas plasmáticas se le conoce como secuencia Vroman o "efecto Vroman", y ha sido ampliamente estudiado y confirmado por numerosos autores [8-14].

Debemos diferenciar entre adsorción competitiva y adsorción secuencial. La primera hace referencia al proceso que tiene lugar cuando se realiza la adsorción en un medio donde existen simultáneamente diferentes proteínas. En la coadsorción secuencial, sin embargo, el proceso que tiene lugar es la adsorción inicial de una proteína en ausencia de cualquier otra; posteriormente se retiran las moléculas de proteína que no se hayan unido a la superficie y se añade una segunda proteína para ver en qué extensión se adsorbe desplazando a la primera. Peula y col [15-17] y Lutanie y col [18] han realizado estudios de coadsorción competitiva de albúmina e IgG y demuestran que los resultados que obtienen dependen fundamentalmente de la concentración en el medio de ambas proteínas, de sus coeficientes de difusión y de la naturaleza de la subfase. No obstante, no vamos a profundizar más en este tema pues en nuestro trabajo sólo hemos realizado estudios de adsorción secuencial.

Hay diferencias entre la desorción espontánea de una proteína y el intercambio de ésta por otra. Jenninsen [19,20] confirma que existe una mayor probabilidad de que suceda este segundo proceso que el primero. Esto es lógico si se piensa que cuando la adsorción de una proteína está energéticamente favorecida, la disminución de la energía de Gibbs durante este proceso será tanto mayor cuanto mayor sea el número de puntos de unión que se establezcan entre la superficie y la macromolécula; la desorción espontánea conlleva la ruptura de todos estos puntos de anclaje, lo cual será bastante improbable; sin embargo, el intercambio de la proteína adsorbida por otra libre en disolución puede tener lugar más fácilmente si se rompen gradualmente los segmentos de unión o sitios de interacción y se van sustituyendo sucesivamente por otros que se establecen entre la nueva molécula de proteína y la superficie.

Los resultados de la adsorción secuencial dependen del orden con que se añadan las proteínas tal y como lo demuestran Lutanie y col [18] y Arnebrant y Nylander [21], aunque en nuestro caso esta va a ser una variable que va a permanecer fijada de antemano pues siempre vamos a adsorber en primer lugar el fragmento  $F(ab')_2$ . Otro parámetro que ejerce un efecto muy importante en la adsorción secuencial es el tiempo de incubación de cada uno de los procesos de adsorción - desorción. Hay resultados experimentales de ciertos autores

[22,23] que así lo demuestran y, además, los recientes modelos teóricos propuestos por Lundström y Elwing [24] y por Lu y col [25] para cinéticas de adsorción e intercambio de proteínas son altamente dependientes de esta variable. En nuestro trabajo también hemos mantenido constante los tiempos de incubación tanto de la adsorción inicial como de la desorción.

Recordemos que nuestro objetivo se centra únicamente en conseguir complejos látex-F(ab')<sub>2</sub> que sean estables en las condiciones donde se van a llevar a cabo los inmunoensayos, las cuales se asemejan a las fisiológicas. Como veremos en el último capítulo, el medio de reacción que hemos empleado en estos inmunoensayos ha sido una disolución acuosa llamada BSA salina y que está compuesta por: 13 mM de borato (pH 8.0), con objeto de tener tanto la BSA como la F(ab')<sub>2</sub> bastante alejadas de sus puntos isoeléctricos sin separarnos demasiado del pH fisiológico; 150 mM de NaCl, para alcanzar la fuerza iónica de los fluidos biológicos; 1 mg/ml de azida sódica (NaN<sub>3</sub>), que evita contaminaciones bacterianas en la disolución; y por último, 1 mg/ml de BSA, la cual cumple un doble objetivo: por un lado estabilizar las partículas sensibilizadas con inmunoproteína y por otro suprimir interacciones no específicas de otras proteínas del medio de reacción que no actúen como antígeno, pues las moléculas de BSA cubrirán partes de la superficie del látex que no estén ocupadas por F(ab')<sub>2</sub>.

Antes de continuar, haremos una breve descripción sobre las principales características biológicas y fisicoquímicas de las moléculas de albúmina [26].

Es la más abundante de las proteínas plasmáticas, ya que la albúmina supone más de la mitad del total. Se ha estudiado ampliamente, pues su elevada concentración y estabilidad facilitan su obtención. Consta de una sola cadena polipeptídica de 580 aminoácidos y su peso molecular es de 66.000 g/mol; en su esqueleto peptídico posee 17 puentes disulfuro que pliegan la cadena originando múltiples lazos cortos y largos alternados. Estos se agrupan en tres regiones globulares principales. Experimenta cambios conformacionales en función del pH, si bien en un intervalo de pH comprendido desde 3 hasta 9 tiene su forma normal (o "N"), la cual es un ovoide o elipsoide. Posee tres funciones biológicas principales: i) nutritiva, como fuente de aminoácidos para los tejidos; ii) transportador sanguíneo de una gran variedad de sustancias (cationes divalentes, aniones, ácidos grasos, bilirrubina, medicamentos, algunas drogas y colorantes orgánicos); iii) función reguladora del volumen intravascular; la albúmina es responsable del 80 % de la presión osmótica total del plasma. Esta característica es la más interesante para alcanzar nuestro objetivo, pues la molécula de albúmina cuando está a pH 7.4 posee 17 cargas negativas, de modo que, por efecto Gibbs-Donnan, aumenta la concentración plasmática de cationes y ocasiona indirectamente un incremento de la presión

osmótica, que supera la de los líquidos extravasculares.

Cuando estas moléculas se adsorben sobre partículas de poliestireno son capaces de estabilizar los sistemas coloidales hasta valores superiores a 1 M en KBr a pH fisiológico [15,17]. La justificación de esta extraordinaria estabilidad la encontramos no sólo en la elevada carga de la proteína sino al efecto estérico que produce, el cual origina un aumento de la presión osmótica en las proximidades de las partículas cuando éstas se acercan; (este mecanismo de estabilización ya fue comentado en el **Capítulo II**).

La BSA empleada fue obtenida, purificada y suministrada por la empresa Biokit S.A. (Barcelona). Su punto isoeléctrico es de  $4.8 \pm 0.1$ . Por último comentaremos que, aunque la mayoría de las moléculas de albúmina se encuentran en el plasma en su forma monomérica, existe cierta proporción que está asociada formando dímeros y tetrámeros.

No hemos encontrado en bibliografía ningún trabajo que trate sobre la coadsorción secuencial de  $F(ab')_2$  y BSA. Por esta razón las condiciones experimentales empleadas en este estudio han sido extraídas de previos trabajos de coadsorción secuencial de IgG y BSA [16,22] llevados a cabo conjuntamente entre nuestro grupo de investigación y la empresa Biokit S.A. Las siguientes experiencias se llevaron a cabo con los látex JL1, JL2, JL4 y JL8. En los estudios del desplazamiento de  $F(ab')_2$  causado por la presencia de BSA hemos empleado esta segunda proteína en su forma monomérica. Para poder detectar la cantidad que finalmente queda adsorbida para cada una de las proteínas se siguió el siguiente procedimiento [22]:

Inicialmente adsorbemos sobre las partículas  $F(ab')_2$  inmunológicamente activa frente al antígeno "proteína C reactiva" ( $F(ab')_2$ -aPCR). El tiempo de incubación fue de 4 horas y se llevó a cabo a 3 pHs diferentes, pH 5, 7 y 9. Además, esto se realizó a 2 grados de recubrimiento proteico: en un caso las partículas tenían un 40% - 50% de su superficie ocupada por  $F(ab')_2$ -aPCR y en el otro fue de un 100%. La cantidad inicial adsorbida se detectó usando el método indirecto basado en la medida de la absorbancia del sobrenadante a  $\lambda = 280$  nm. A partir de este momento se tomaron varios alícuotas sobre los que se estudió qué cantidad de proteína se desorbe por la resuspensión de las partículas en pH 8, por resuspensión en pH 8 y 150 mM de NaCl, y la que se desorbe un medio de pH 8, 150 mM de NaCl y 1mg/ml de BSA. Ya comentamos en el capítulo anterior que los cambios de pH y el aumento de fuerza iónica casi siempre conducían a una desorción de proteína. En las Figuras IV.1 y 2 se muestran estos resultados para dos de los látex cuando tienen un máximo recubrimiento de inmunoproteína. Lo único que hay que destacar es que la mayor desorción se produce cuando se resuspenden los complejos en pH 8 y 150 mM de NaCl y no hace falta la presencia de la segunda proteína para que se dé esta ligera desorción de moléculas de

$F(ab')_2$ . Las razones que justifican estos resultados ya se discutieron en el capítulo anterior.

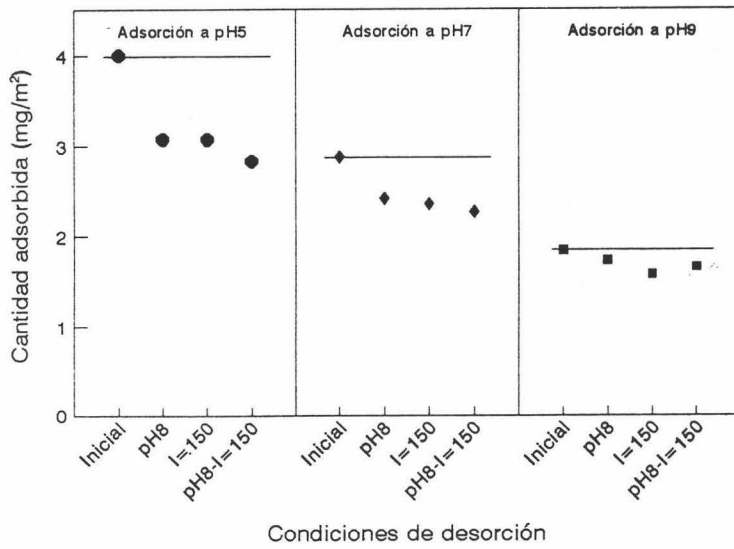


Fig. IV.1. Cantidades de  $F(ab')_2$  que permanecen adsorbidas en el látex JL1 tras la resuspensión de las muestras en: i) pH8, ii) 0.15 de fuerza iónica manteniendo el pH de la adsorción inicial y, iii) pH 8 y 0.15 de fuerza iónica.

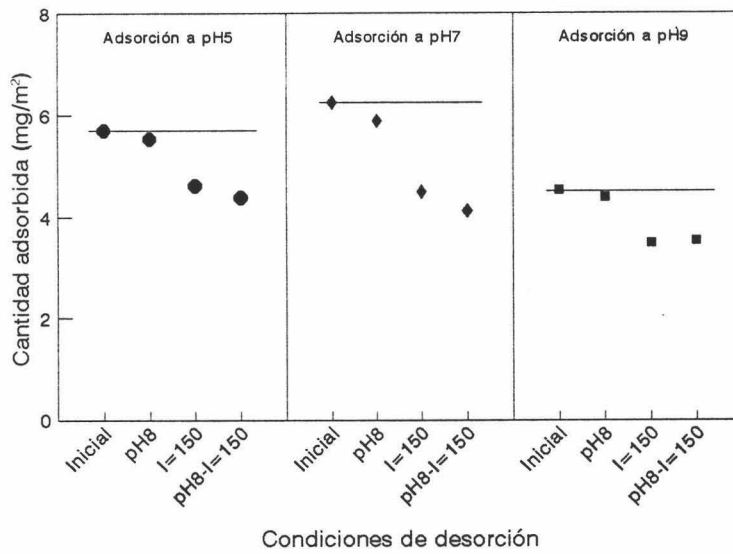


Fig. IV.2. Cantidades de  $F(ab')_2$  que permanecen adsorbidas en el látex JLB tras la resuspensión de las muestras en: i) pH8, ii) 0.15 de fuerza iónica manteniendo el pH de la adsorción inicial y, iii) pH 8 y 0.15 de fuerza iónica.



concentración de antígeno mayor será la extensión con que se produce la agregación de las partículas, lo cual se reflejará en un aumento de la absorbancia del sistema. Para detectar la  $F(ab')_2$ -aPCR que hay en el sobrenadante también se tiene que realizar un calibrado previo con disoluciones de  $F(ab')_2$ -PCR patrón. El modo de operar es el siguiente. El disolvente en todas estas experiencias fue BSA salina. En diferentes cubetas se añade un mismo volumen de disolución de  $F(ab')_2$ -aPCR a diferentes concentraciones conocidas. Posteriormente se añade en todas ellas un mismo volumen de una disolución que contiene PCR en una concentración en exceso. Se deja incubando durante 10 minutos, periodo en el que se producirán inmunoagregados de PCR- $F(ab')_2$ -aPCR. Transcurrido este tiempo se añade un volumen de reactivo Quantex CRP. Las partículas de este látex se agregarán a través de las moléculas de antígeno (PCR) que no estén complejadas con  $F(ab')_2$ -aPCR y la extensión con que se produce la agregación se realiza midiendo la absorbancia del sistema a  $\lambda = 570$  nm durante 10 minutos. Cuanto mayor sea la concentración inicial de  $F(ab')_2$ -aPCR en el medio, menor será la cantidad de PCR que quede libre en el medio dispuesta a reaccionar con los complejos látex-IgG-aPCR y, por tanto, la agregación de estas partículas se dará en menor medida. El calibrado de la  $F(ab')_2$  también se muestra en la Figura IV.3. La misma operación se realiza posteriormente con los sobrenadantes problema.

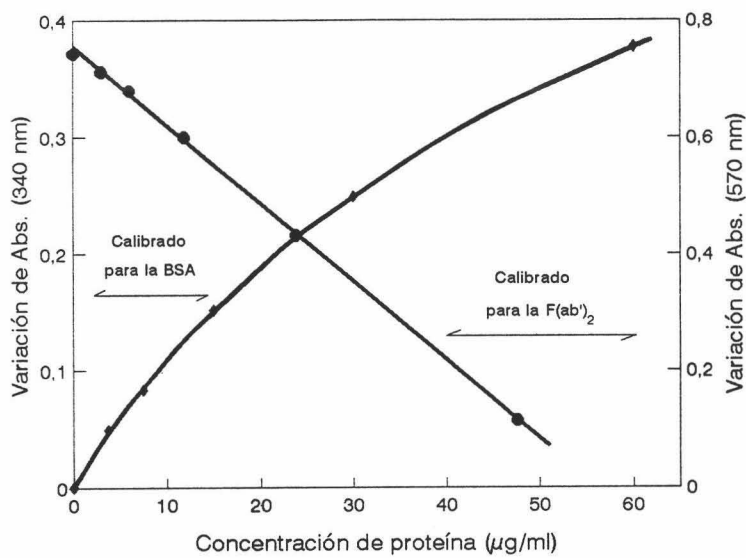


Fig. IV.3. Calibrados de BSA y  $F(ab')_2$  realizados con reacciones inmunológicas.



Debemos decir que este método permite detectar  $F(ab')_2$  con una fiabilidad de hasta  $1\mu\text{g/ml}$  en un medio rico en BSA. En las Figuras IV.4-11 se muestran los resultados obtenidos con los látex sulfonatados JL1 y JL2, el carboxilatado JL4 y el catiónico JL8. En las muestras que tenían un máximo recubrimiento de  $F(ab')_2$  mostramos las cantidades que van quedando en el complejo tras resuspender el sistema en pH 8, en pH 8 y 150 mM de NaCl, y en BSA salina, para poder ver independientemente el efecto de cada una de estas variables. Como comentamos en el capítulo anterior, la desorción de proteína de superficies poco recubiertas es bastante improbable y, tal como puede verse en estas gráficas, la cantidad de  $F(ab')_2$  que se libera es pequeña, si bien su salida está favorecida por la presencia de BSA, proteína que es capaz de desplazarla.

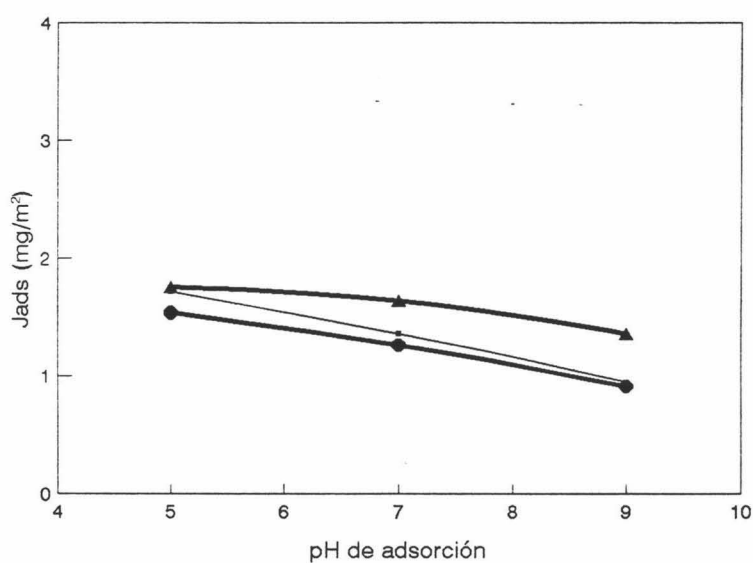


Fig. IV.4. Cantidad inicial de  $F(ab')_2$  adsorbida en el látex JL1 ( $\blacktriangle$ , línea estrecha); cantidad final que permanece tras resuspender en BSA salina ( $\bullet$ ); cantidad de BSA que se adsorbe ( $\blacktriangle$ ).

Pero es más interesante que pasemos a ver los resultados de la coadsorción de la albúmina bovina. Una vez centrifugados los complejos látex-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR iniciales, se retiraban los sobrenadantes, se resuspendían en BSA salina y se dejaban incubando las muestras durante 20 horas en continua agitación. Trascurrido este tiempo se centrifugaba de nuevo y se pasaba a analizar el contenido de los sobrenadantes. Puesto que ahora hay en el medio tanto BSA como F(ab')<sub>2</sub>-aPCR no podemos medir la absorbancia a  $\lambda = 280$  nm pues ambas proteínas absorben a dicha longitud de onda ( $\Sigma_{BSA} = 0.667 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Por consiguiente, la detección de las dos proteínas por separado requiere el uso de técnicas específicas. Estas técnicas están basadas en reacciones inmunológicas.

#### **Detección de la BSA adsorbida.**

La BSA del sobrenadante se detectó por aglutinación de esta proteína con IgG anti BSA (DAKO). Aunque el fundamento físico de estas reacciones se comenta con detalle en los siguientes capítulos, es necesario indicar que el sistema inicial (BSA + IgG-aBSA) se irá convirtiendo poco a poco en un sistema de agregados BSA-IgG-aBSA; esto va a producir un aumento en la turbidez del medio, o lo que es lo mismo, su absorbancia crecerá. De esta forma, cuanto mayor sea el tamaño de los agregados mayor será la variación de absorbancia que detectemos, parámetro que relacionaremos con la cantidad inicial de BSA.

La reacción se lleva a cabo en un medio a pH 7.2 (tamponado con fosfatos) y 150 mM de NaCl. En primer lugar se realiza un calibrado con disoluciones patrón de BSA a distintas concentraciones; se añade cierta cantidad de IgG-aBSA en condiciones en las que haya un exceso de esta proteína frente al antígeno; por último se sigue la variación de la absorbancia de la disolución a  $\lambda = 340$  nm durante 10 minutos. La curva de calibrado se muestra en la Figura IV.3. Posteriormente se repite la misma operación con nuestras muestras problema. A través del calibrado conoceremos la cantidad de BSA que existe en el sobrenadante, y por diferencia con la cantidad inicial que teníamos sabremos cuanta proteína habrá quedado adsorbida en la superficie de las partículas.

#### **Detección de la F(ab')<sub>2</sub>-aPCR desorbida.**

Su cuantificación se realizó con una prueba de inmunoprecipitación de un látex comercial sensibilizado con IgG anti PCR (Quantex CRP - Biokit S.A.). El proceso que tiene lugar es la aglutinación del sistema por la presencia del antígeno correspondiente. A este tipo de reacción se le dedican los dos siguientes capítulos, por lo que ahora no entraremos a describir el proceso con detalle. Sí debemos decir que a medida que aumenta la

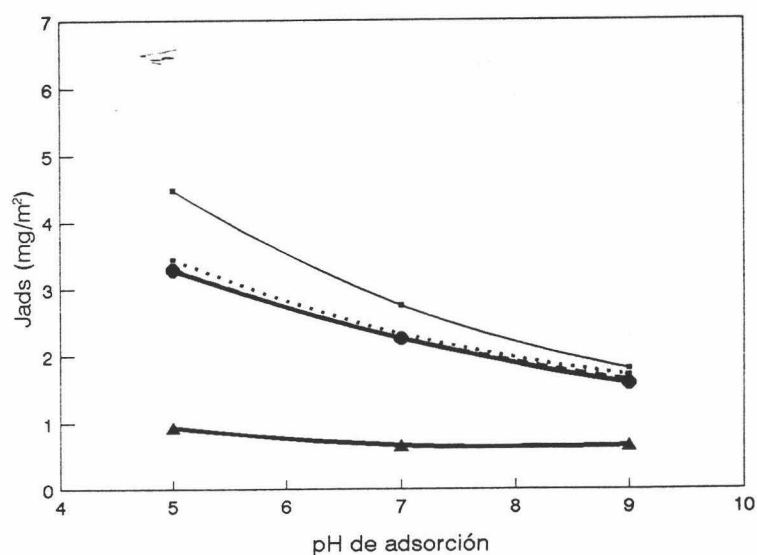


Fig. IV.5. Cantidad inicial de  $F(ab')_2$  adsorbida en el látex JL1 (■, línea estrecha); cantidad que permanece tras resuspender en pH 8 (◻, línea punteada); cantidad que permanece tras resuspender en pH 8 y 150 mM de NaCl (◻, línea discontinua); cantidad final que permanece tras resuspender en BSA salina (●); cantidad de BSA que se adsorbe (▲).

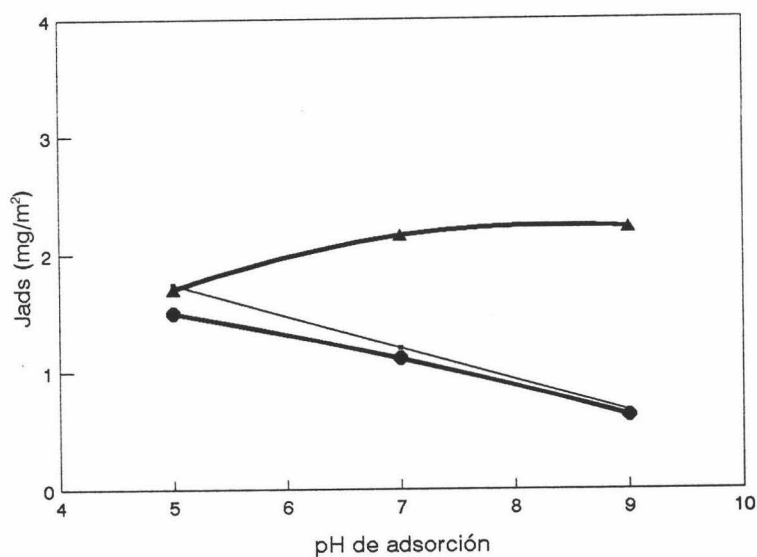


Fig. IV.6. Cantidad inicial de  $F(ab')_2$  adsorbida en el látex JL2 (■, línea estrecha); cantidad final que permanece tras resuspender en BSA salina (●); cantidad de BSA que se adsorbe (▲).

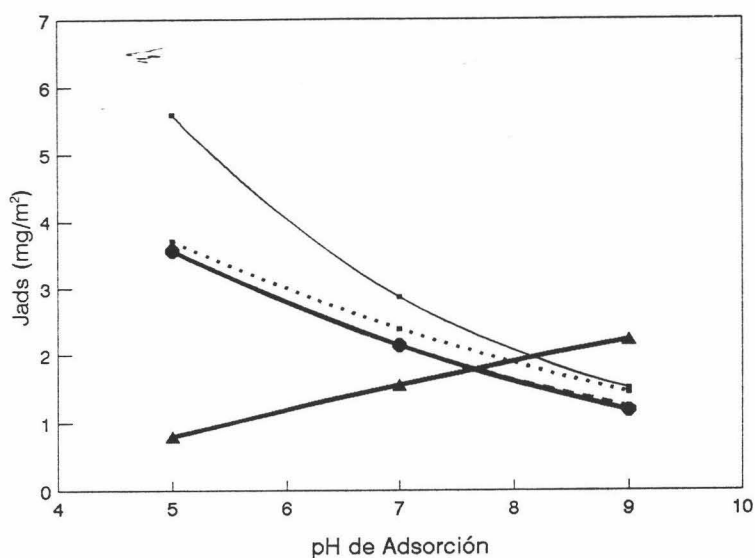


Fig. IV.7. Cantidad inicial de  $F(ab')_2$  adsorbida en el látex JL2 (■, línea estrecha); cantidad que permanece tras resuspender en pH 8 (■, línea punteada); cantidad que permanece tras resuspender en pH 8 y 150 mM de NaCl (■, línea discontinua); cantidad final que permanece tras resuspender en BSA salina (●); cantidad de BSA que se adsorbe (▲).

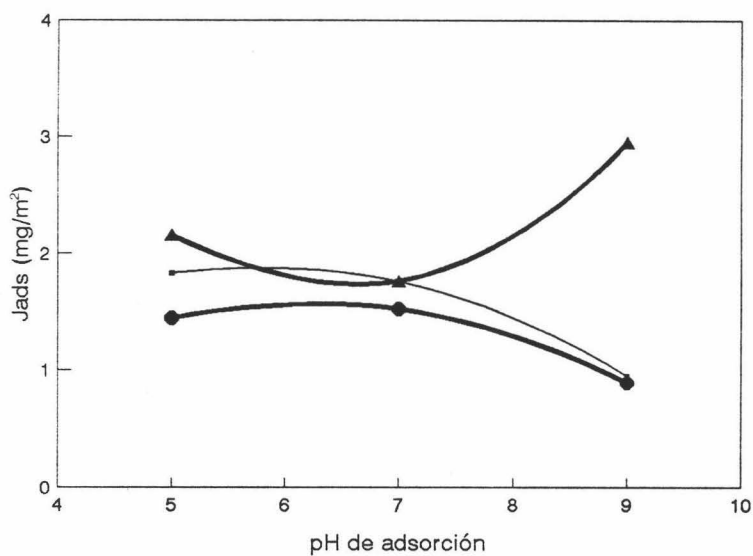


Fig. IV.8. Cantidad inicial de  $F(ab')_2$  adsorbida en el látex JL4 (■, línea estrecha); cantidad final que permanece tras resuspender en BSA salina (●); cantidad de BSA que se adsorbe (▲).

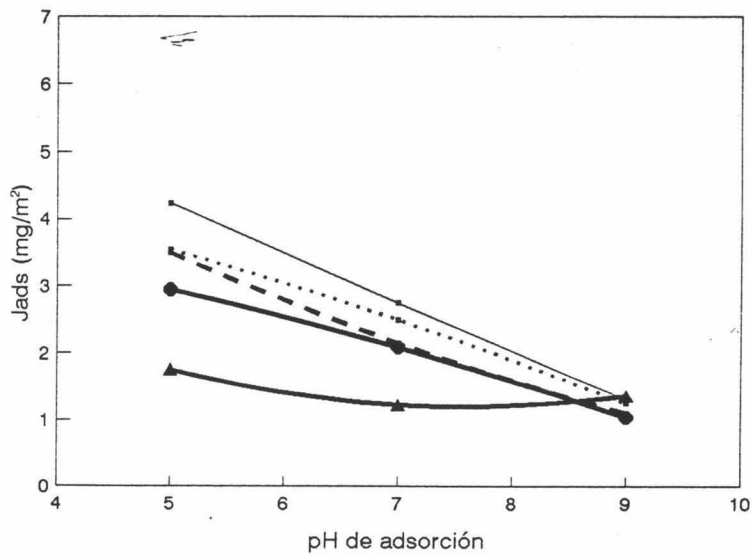


Fig. IV.9. Cantidad inicial de  $F(ab')_2$  adsorbida en el látex JL4 (■, línea estrecha); cantidad que permanece tras resuspender en pH 8 (●, línea punteada); cantidad que permanece tras resuspender en pH 8 y 150 mM de NaCl (■, línea discontinua); cantidad final que permanece tras resuspender en BSA salina (●); cantidad de BSA que se adsorbe (▲).

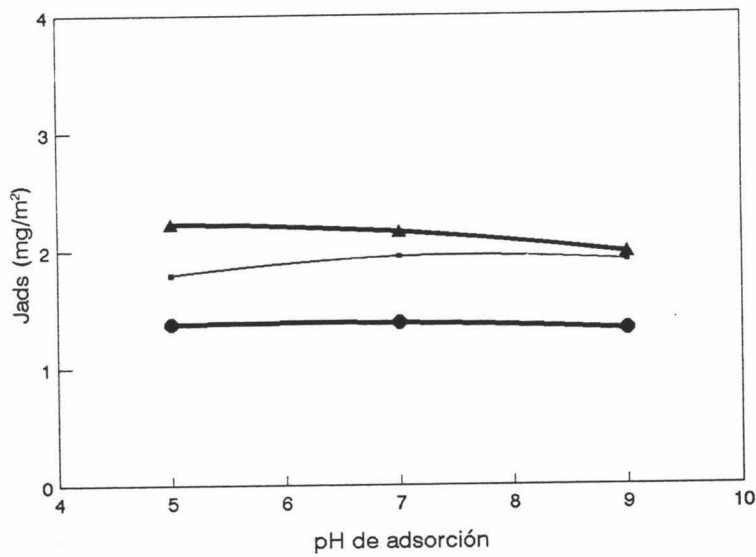
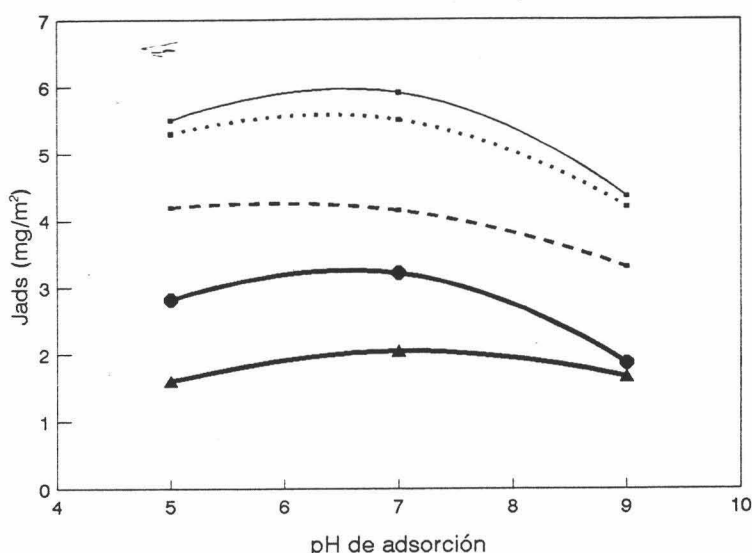


Fig. IV.10. Cantidad inicial de  $F(ab')_2$  adsorbida en el látex JL8 (■, línea estrecha); cantidad final que permanece tras resuspender en BSA salina (●); cantidad de BSA que se adsorbe (▲).



**Fig. IV.11.** Cantidad inicial de  $F(ab')_2$  adsorbida en el látex JL8 (■, línea estrecha); cantidad que permanece tras resuspender en pH 8 (■, línea punteada); cantidad que permanece tras resuspender en pH 8 y 150 mM de NaCl (■, línea discontinua); cantidad final que permanece tras resuspender en BSA salina (●); cantidad de BSA que se adsorbe (▲).

De todos estos resultados podemos destacar lo siguiente.

De las muestras que tenían poca cantidad de  $F(ab')_2$  adsorbida se producen desorciones proteicas casi despreciables; sin embargo, son las muestras donde más BSA se adsorbe. Este resultado es lógico, pues al haber un bajo recubrimiento existen muchos huecos donde puede colocarse la BSA. Este dato se puede comprobar especialmente cuando la adsorción inicial se realizó a pH 9.

En los látex aniónicos la desorción se produce principalmente por cambios en las condiciones fisicoquímicas del medio más que por la presencia de la BSA. Lo cierto es que el desplazamiento de inmunoproteínas causado por las moléculas de albúmina es contrario a la "secuencia Vroman", en la que las moléculas de IgG son las que desplazan a las de albúmina previamente adsorbida [18]. Por esta razón, no es de extrañar que la albúmina desplace tan poca cantidad de  $F(ab')_2$ .



No obstante, el resultado más llamativo lo encontramos en el látex catiónico. En él se desorbe una gran cantidad de  $F(ab')_2$ , siendo la adsorción de BSA más elevada que en los otros látex; además, la presencia de albúmina provoca el desplazamiento de cierta cantidad de moléculas proteicas previamente adsorbidas en la superficie polimérica. Este interesante resultado queda justificado en base a la alta hidrofobicidad del látex y a que la BSA y la superficie del polímero tienen carga opuesta (a pH 8), razones que justifican que la afinidad que poseen estas proteínas séricas por esta interfase sea muy superior a la que puedan presentar frente a la superficie de los látex aniónicos.

Para confirmar que las moléculas de BSA alcanzan la superficie de las partículas, se procedió a medir la movilidad electroforética de los complejos. Antes de realizar todos estos experimentos, comentaremos ciertos resultados de estabilidad que así nos lo indican. Como recordaremos la estabilidad de todos los complejos látex- $F(ab')_2$  era bastante baja, (sus C.C.C. eran iguales o menores que 100 mM en pHs  $\geq 7$ ). Sin embargo, a simple vista se pudo comprobar que todos los látex que tenían sus superficies a medio recubrir por  $F(ab')_2$  eran estables en BSA salina ( $I = 0.15$ ). En los complejos con máximo recubrimiento proteico nos encontramos que el JL1 es inestable en BSA salina; hecho que concuerda con la pequeña cantidad de albúmina que alcanza su superficie y con la baja  $\sigma_0$  que tiene el látex original. Para el JL4 existe cierta ambigüedad sobre su estabilidad o inestabilidad en BSA salina. Sin embargo, los complejos de los látex JL2 y JL8 son totalmente estables en dicho medio, salvo la muestra JL2- $F(ab')_2$  cuya adsorción inicial se hizo a pH 5 (Figura IV.7); por tanto estos resultados de estabilidad, aun siendo obtenidos de forma un tanto grosera, confirman los datos que aparecen en las anteriores gráficas.

En las Figuras IV.12 y 13 mostramos los resultados de la movilidad de las partículas de los látex JL1 y JL8 recubiertas con diferentes cantidades de  $F(ab')_2$  y de BSA. Los resultados obtenidos con los otros dos látex aniónicos (JL2 y JL4) no se muestran puesto que la dependencia de las movilidades de estos complejos con el pH es muy similar a la que puede verse con las muestras del látex JL1.

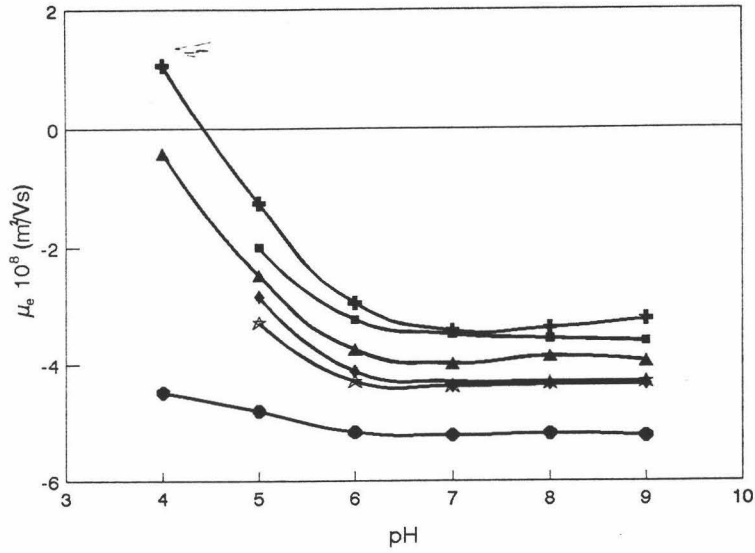


Fig. IV.12. Movilidad del látex JL1 (●), JL1-F(ab')<sub>2</sub> (1.8 mg/m<sup>2</sup>) (▲), JL1-F(ab')<sub>2</sub> (2.9 mg/m<sup>2</sup>) (+), JL1-F(ab')<sub>2</sub>-BSA (2.3 mg/m<sup>2</sup>, 0.8 mg/m<sup>2</sup>) (■), JL1-F(ab')<sub>2</sub>-BSA (1.4 mg/m<sup>2</sup>, 1.7 mg/m<sup>2</sup>) (◆) y JL1-BSA (2.0 mg/m<sup>2</sup>) (★).

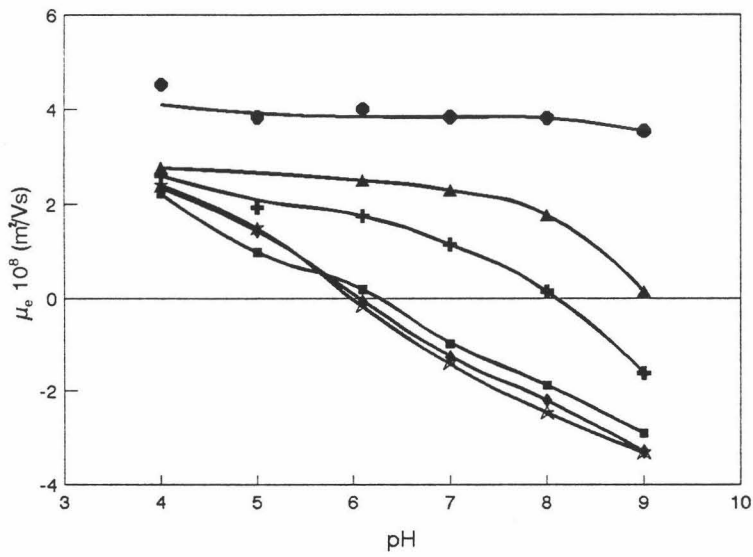


Fig. IV.13. Movilidad del látex JL8 (●), JL8-F(ab')<sub>2</sub> (1.9 mg/m<sup>2</sup>) (▲), JL8-F(ab')<sub>2</sub> (6.0 mg/m<sup>2</sup>) (+), JL8-F(ab')<sub>2</sub>-BSA (3.3 mg/m<sup>2</sup>, 2.0 mg/m<sup>2</sup>) (■), JL8-F(ab')<sub>2</sub>-BSA (1.3 mg/m<sup>2</sup>, 2.2 mg/m<sup>2</sup>) (◆) y JL8-BSA (2.9 mg/m<sup>2</sup>) (★).



Los resultados de los látex aniónicos parecen indicar que cuando las partículas de látex totalmente recubiertas con  $F(ab')_2$  se ponen en contacto con un medio rico en BSA, esta segunda proteína alcanza la superficie de las mismas. De hecho, las movilidades de los complejos látex- $F(ab')_2$ -BSA se sitúan entre las curvas de los complejos látex- $F(ab')_2$  y látex-BSA, tendiendo más hacia una o hacia otra dependiendo de la carga proteica relativa que tengan dichas partículas. Este resultado también se obtuvo con las muestras JL2 y JL4. Sin embargo, donde se ven los resultados de una forma más clara es en la gráfica que representa el comportamiento electroforético de los complejos formados con el látex JL8. En la Figura IV.13 se ve cómo las partículas que tenían previamente adsorbida  $F(ab')_2$  tienen una movilidad diferente antes y después de ser incubadas en BSA salina. De hecho, los complejos JL8- $F(ab')_2$ -BSA tienen un comportamiento muy similar al de las partículas de látex que poseen BSA como única proteína adsorbida. Teniendo en cuenta que los puntos isoeléctricos de ambas proteínas están muy próximos (4.8 y 5.3), la diferencia de comportamiento entre los complejos JL8- $F(ab')_2$  y JL8-BSA se debe principalmente a que la albúmina tiene una mayor densidad de carga, característica que permite que empleemos esta proteína como agente estabilizante en medios de pH neutro o superiores. Recientes estudios realizados por Peula y de las Nieves [27] demuestran que el uso de BSA tetramérica (también llamada "agregada") en vez de monomérica mejora la estabilidad de los sistemas coloidales gracias a impedimentos estéricos. Por esta razón se ha empleado BSA comercial (mezcla de monómeros, dímeros y tetrámeros) para realizar todas las experiencias que se muestran en los capítulos posteriores.

Por último podemos preguntarnos la siguiente cuestión: ¿alcanza la albúmina la superficie polimérica de las partículas recubiertas con  $F(ab')_2$  o se deposita sobre esta capa proteica previamente adsorbida?. Los experimentos anteriores no arrojan información alguna para responder esta pregunta. La única forma de poder contestarla es realizando inmunoensayos con partículas sensibilizadas con  $F(ab')_2$  inmune y viendo si estos complejos son reactivos o no en BSA salina. Si la albúmina cubriera la capa de  $F(ab')_2$  el sistema no podría reaccionar en presencia del correspondiente antígeno, pues éste no alcanzaría los sitios activos de las moléculas inmunoproteicas. Aunque sea adelantar acontecimientos, será ahora cuando respondamos a la pregunta: las moléculas de BSA se depositan sobre la superficie polimérica y no sobre la capa proteica puesto que los ensayos de inmunorreactividad son positivos en todos los casos. Por tanto el uso de albúmina sérica va a permitir aumentar la estabilidad de los complejos látex- $F(ab')_2$  haciendo posible la aplicación de estas partículas en tests de inmunodiagnos, ya que no se pierde la reactividad de nuestro fragmento inmunoproteico.

### IV.3. ADSORCIÓN DEL LÍPIDO DSDMA

Antes de pasar a ver los resultados experimentales nos parece necesario hacer un breve comentario sobre la escasa bibliografía que existe sobre la adsorción de lípidos en partículas de látex. Únicamente hemos encontrado dos artículos muy recientes en los que los autores encapsulan microesferas de látex en capas lipídicas. En uno de estos trabajos [28], la operación se realiza a través de la previa formación de vesículas gigantes de lípido con forma esférica (cuyo tamaño es de  $\sim 100 \mu\text{m}$ ); posteriormente las hacen interaccionar con las partículas de látex, quedando adsorbida sobre sus superficies una bicapa de fosfolípido. En el otro [29], preparan vesículas unilaminares de diferentes lípidos, (entre ellos se encuentra el dipalmitoilfosfatidil colina (DPPC), uno de los componentes mayoritarios de las membranas celulares). No obstante, la técnica de análisis que emplean es cuestionable, puesto que el diámetro de estas vesículas va desde los 60 nm hasta los 110 nm, el intervalo de las partículas de látex se encuentra entre 85 nm y 105 nm, y sin embargo cuantifican la adsorción lipídica tras centrifugación de las muestras incubadas para separar el polímero del lípido. Los resultados de estos autores muestran que la adsorción lipídica está favorecida más en látex catiónicos que en aniónicos. Los autores plantean el siguiente mecanismo de adsorción (común en todos los látex): Primero se adsorbe una bicapa lipídica sobre la superficie polimérica; a continuación, la estructura de la bicapa se destruye por las interacciones hidrofóbicas que surgen entre las colas apolares de los lípidos y la superficie de poliestireno, formándose así una monocapa lipídica alrededor de las partículas. En esta situación permanecen los látex aniónicos, pero sobre el catiónico (que en esta situación es coloidalmente inestable) continúa el proceso de adsorción y se van depositando sucesivamente bicapas lipídicas que vuelven a estabilizar el sistema.

No obstante, nuestras experiencias se han basado principalmente en los estudios realizados por Arai y col [30-32]. Estos autores adsorben sobre látex catiónicos una mezcla de fosfatidil colinas unidas a diferentes cadenas hidrocarbonadas de diferentes longitudes ( $C_{14}$  -  $C_{22}$ ), y sobre látex aniónicos realizan las adsorciones con un lípido sintético cargado positivamente: el diestearil dimetil amonio (DSDMA). Nuestro objetivo se centró en las adsorciones de este lípido catiónico y de otro lípido que tuviera la misma parte apolar (dos cadenas de ácido esteárico) pero diferente grupo polar para estudiar la influencia de éste sobre los resultados. La molécula escogida fue la diestearil fosfatidil colina (DSPC), ya que además es uno de los componentes mayoritarios de las membranas celulares [33]. Las estructuras químicas de ambas moléculas se representan en la Figura IV.14. Además, en la Figura IV.15 mostramos diferentes organizaciones estructurales de lípidos y un esquema representativo del objetivo

que queremos conseguir: partículas estabilizadas por bicapas lipídicas y sensibilizadas a su vez con  $F(ab')_2$ , obteniendo así interfases partícula/agua similares a (pero bastante más simples que) las membranas biológicas.

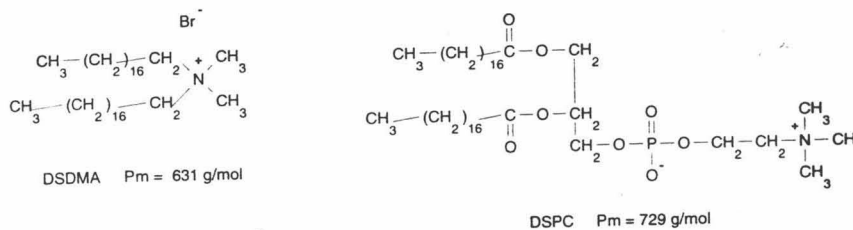


Fig. IV.14. Estructuras moleculares del diestearil dimetil amonio (DSDMA) y de la diestearil fosfatidil colina (DSPC).

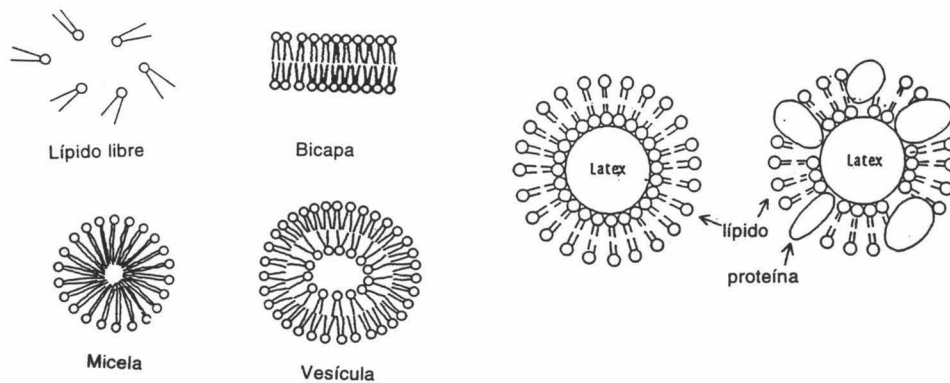


Fig. IV.15. Diferentes organizaciones estructurales de lípidos. Esquema representativo de los complejos látex-proteína-lípido.

Hemos encontrado dos grandes problemas a la hora de trabajar con estos lípidos. El primero de ellos es su baja solubilidad en agua y el segundo ha sido el conseguir un método de análisis adecuado para llevar a cabo la cuantificación de las cantidades adsorbidas. En cuanto al método analítico se utilizaron los siguientes: Para determinar el DSPC se preparó un reactivo de vainillina y se siguió el protocolo propuesto por Ahlgren y Merino [34]. Para el lípido DSDMA se recurrió al método del Cloroformo-Orange II [30], que describiremos posteriormente. De todas formas, el mayor problema lo tuvimos a la hora de disolver en agua ambos lípidos. Según los trabajos de Arai el DSDMA puede solubilizarse directamente en agua a concentraciones incluso mayores de  $10^{-4}$  M; sin embargo, según nuestras experiencias es imposible disolver dicho lípido ni siquiera a concentraciones de  $1.5 \cdot 10^{-6}$  M. En todos los casos se forman macroestructuras lipídicas (posiblemente vesículas multilaminares) de apreciable tamaño, pues dispersan la luz visible y se centrifugan con facilidad. Por consiguiente no podemos trabajar en estas condiciones, ya que debido a nuestro método de análisis indirecto es necesario separar las partículas de látex cubiertas de DSDMA de las moléculas de lípido que permanecen libres en disolución. No nos queda otra opción que añadir etanol a las muestras para favorecer su solubilidad. De hecho lo que se buscaba era realizar las adsorciones en disoluciones cuya concentración en lípido fuese menor que la de su C.M.C. (concentración micelar crítica) que se corresponde con la máxima concentración de lípido que origina la primera formación de micelas. Esta misma condición experimental de trabajar por debajo de la C.M.C. se lleva a cabo con las adsorciones de surfactantes [35]. En las gráficas de la Figura IV.16 aparecen los resultados de dos métodos analíticos diferentes que se pueden emplear para detectar la C.M.C. Por un lado se pueden realizar medidas de la conductividad de la disolución; la dependencia que esta propiedad tiene con la concentración de lípido será diferente para concentraciones mayores y menores de la C.M.C., con lo que habrá un punto de ruptura o un cambio brusco en la forma de la función "conductividad = f (concentración)" para dicho valor. El otro método que hemos empleado ha sido medir la absorbancia de las disoluciones con luz visible ( $\lambda = 450$  nm); la presencia de macroestructuras y de vesículas produce turbidez en el sistema

Como se puede ver, con mezclas de etanol/agua al 50 % en volumen/volumen podemos obtener disoluciones de DSDMA soluble a concentraciones iguales o mayores de  $10^{-4}$  M, condición necesaria para poder llevar a cabo nuestros estudios. Posteriormente a estos ensayos comprobamos que el lípido DSDMA puede ser disuelto en mezclas de etanol/agua al 1 % (v/v) a concentraciones no superiores a  $1.25 \cdot 10^{-4}$  M, siempre y cuando se disuelva primero el lípido en etanol puro y luego se añada el agua. La disolución que así se obtiene parece ser metaestable; al menos no se forman macroestructuras de lípido durante 24 horas,

se llega a producir una separación de fases, puesto que el etanol rompe la estructura interfacial que se forma entre el agua y el cloroformo. Se ideó el siguiente protocolo para poder realizar el análisis del DSDMA adsorbido: Tras mantener incubándose las partículas de látex y la disolución alcohólica de DSDMA durante 4 horas, se centrifugaban las muestras y se filtraban los sobrenadantes para poder analizarlos sin que las microesferas poliméricas produjeran ninguna interferencia. Posteriormente se tomaba 1 ml de este sobrenadante y se llevaba a sequedad para eliminar el etanol. A continuación se disolvían los residuos de lípido en 1 ml de cloroformo. Tras una incubación de 30 minutos se añadía otro mililitro de la disolución acuosa que contenía el colorante Orange II, se agitaban las muestras y se esperaba a que se separaran la fase clorofórmica de la acuosa (30 minutos). El ión complejo DSDMA-Orange II coloreaba el cloroformo y se medía la absorbancia de éste a  $\lambda = 485 \text{ nm}$ . En ausencia de lípido el colorante permanecía únicamente en la fase acuosa.

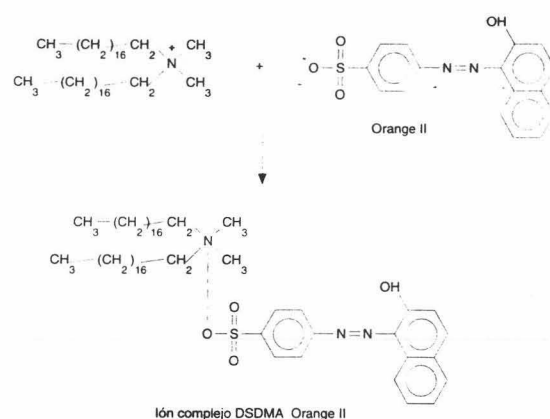


Fig. IV.17. Método del Cloroforo-Orange II para la detección del lípido DSDMA.

Todo este protocolo se realizaba de forma paralela sobre las muestras problema y sobre disoluciones patrón de DSDMA sin látex, con objeto de realizar curvas de calibrado. Para cada isoterma realizada se llevaba a cabo el correspondiente calibrado, obteniendo durante todas estas experiencias cerca de 10 curvas de calibrado muy reproducibles. En la Figura IV.18 se muestran algunas de ellas.

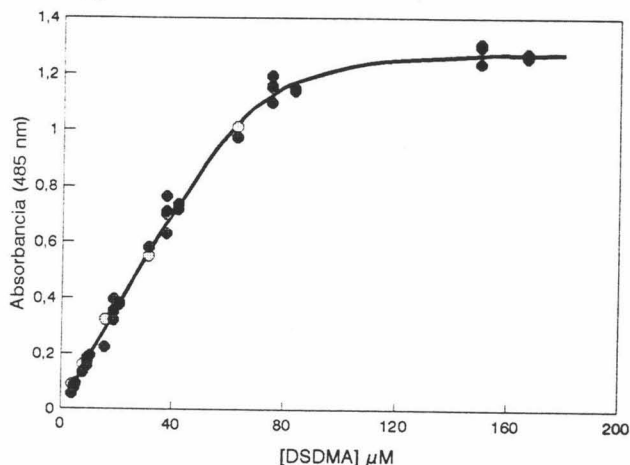


Fig. IV.18. Calibrado de disoluciones patrón de DSDMA con el método del Cloroformo-Orange II realizadas en días diferentes.

Tras obtener toda esta información, se ideó realizar las isothermas de adsorción de la DSDMA en mezclas etanol/agua al 50 % (v/v), en mezclas pobres en etanol (1 %) y en mezclas ricas en dicho alcohol (> 94 %) para estudiar la influencia de éste compuesto en la interacción lípido -poliestireno.

**Adsorciones de DSDMA en mezclas etanol/agua al 50 % (v/v).**

La sistemática de trabajo empleada fue similar a la utilizada en las isothermas de adsorción del fragmento proteico F(ab')<sub>2</sub>. El volumen final fue 10 ml, el área de superficie polimérica 0.3 m<sup>2</sup> y la temperatura de adsorción fue de 25°C. Lo primero que se realizó fue establecer la cinética de adsorción del DSDMA. Para ello se utilizó el látex JL2 y se llevaron a cabo las adsorciones del lípido con diferentes periodos de incubación que variaron desde 1 minuto hasta 24 horas. A estos tiempos hay que sumarle el tiempo que conlleva el proceso de centrifugación (30 minutos). En la gráfica de la Figura IV.19 aparecen los resultados de esta cinética de adsorción.

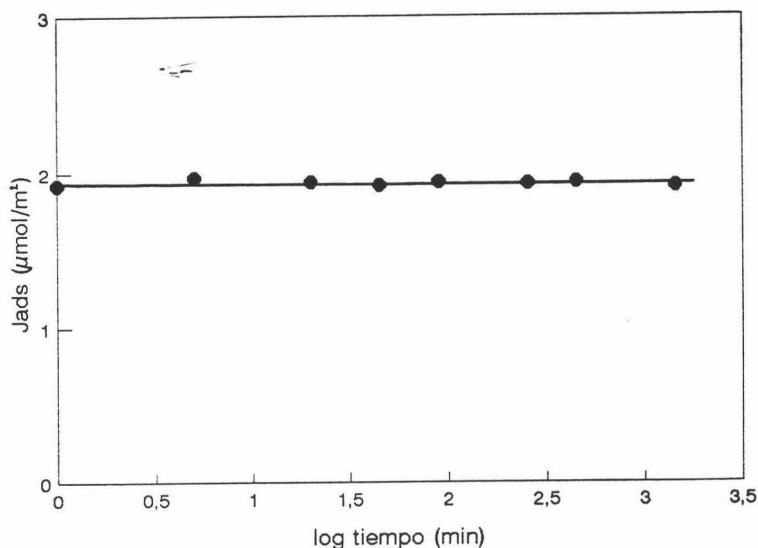


Fig. IV19. Cantidad de DSDMA adsorbida en el látex **JL2** en función del tiempo de incubación.

Como puede verse la velocidad del proceso es muy elevada, pues se adsorben las mismas cantidades de DSDMA en un minuto de incubación que en un día. Tras obtener estos resultados decidimos realizar las isoterma de adsorción incubando las muestras durante 4 horas, tiempo más que suficiente para que se alcance el equilibrio.

En segundo lugar se llevaron a cabo estudios de adsorción para ver qué cantidad de lípido se deposita sobre las partículas poliméricas en función de la cantidad de DSDMA añadida. Estas experiencias se realizaron sobre los látex JL2 (sulfonatado), JL4, JL7 (carboxilatados), JL8 (catiónico) y JL10 (hibrofílico) en una mezcla compuesta por etanol y por una disolución acuosa tamponada a pH7. Los resultados se muestran en las Figuras IV.20 y 21. La gráfica de los experimentos realizados con el látex JL8 no aparece puesto que la adsorción de DSDMA sobre estas partículas fue nula.

Hay varios indicios que nos llevan a sospechar que en este medio rico en alcohol la interacción predominante que existe entre las moléculas de DSDMA y el látex es una atracción de tipo electrostático y, por tanto, la orientación que inicialmente adopta el lípido en la interfase será con la cabeza polar dirigida hacia las cargas de la superficie polimérica. Una vez en esta situación podrían reorientarse las moléculas y contactar las colas apolares con la superficie de poliestireno afianzándose así la unión entre dichos compuestos. Este

mecanismo coincide con el que proponen Carmona-Ribeiro y Herrington [29].

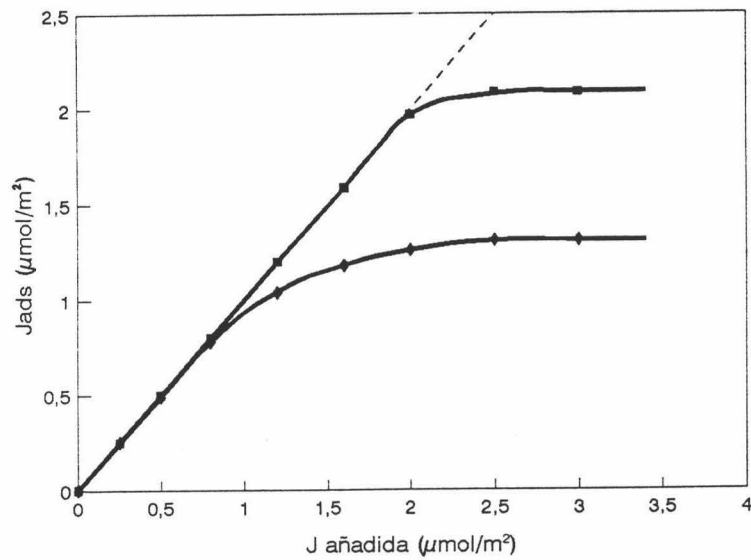


Fig. IV.20. Cantidades de DSDMA adsorbidas sobre los látex-JL2 (■) y JL10 (◆) en mezclas etanol/agua (pH7) al 50 % (v/v).

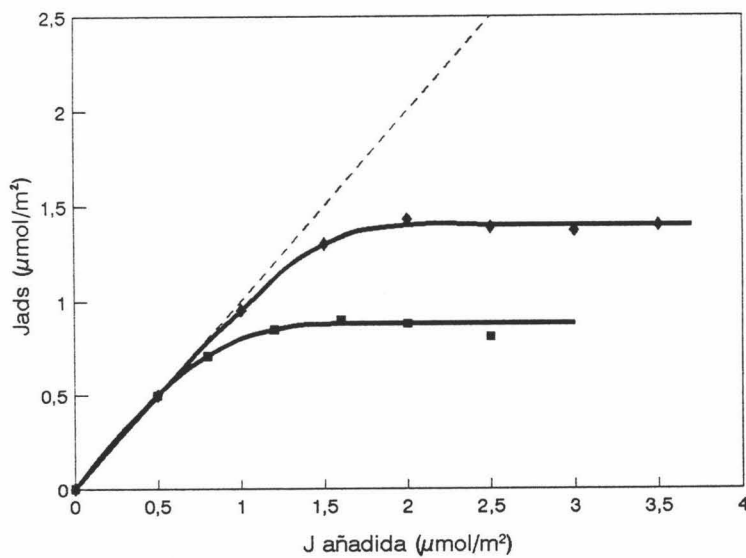


Fig. IV.21. Cantidades de DSDMA adsorbidas sobre los látex JL4 (■) y JL7 (◆) en mezclas etanol/agua (pH7) al 50 % (v/v).



Dos de las principales pruebas experimentales que apoyan la hipótesis de que la interacción lípido-látex está dirigida por fuerzas electrostáticas son las siguientes: i) sobre el látex catiónico no se adsorbe DSDMA (aun siendo el látex más hidrófobo) y ii) cuando se alcanza el "plateau" de máxima adsorción en todos los látex aniónicos estos sistemas se desestabilizan por completo. Según los trabajos de Arai, la pérdida de estabilización tiene lugar cuando la cantidad de DSDMA adsorbida ( $J_{ads}$ ) coincide con la cantidad de grupos cargados que tiene el látex en su superficie ( $\Gamma_e$ ). Teniendo en cuenta este hecho, hemos realizado los cálculos numéricos que aparecen en la Tabla IV.1 para el caso particular en el que las partículas poseen un máximo recubrimiento lipídico ( $J_{pl}$ )

Látex	$\sigma_0$ ( $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ )	$J_{pl}$ ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ )	$J_{pl}/\Gamma_e$ (moléculas/carga)
JL2	$-10.5 \pm 0.7$	$2.10 \pm 0.05$	$1.92 \pm 0.15$
JL10	$-10.3 \pm 0.4$	$1.30 \pm 0.05$	$1.22 \pm 0.10$
JL4	$-12.1 \pm 0.2$	$0.88 \pm 0.03$	$0.70 \pm 0.07$
JL7	$-19.0 \pm 0.4$	$1.40 \pm 0.04$	$0.71 \pm 0.07$
JL8	$5.3 \pm 0.2$	0.0	0.0

Tabla IV.1. Razón entre la máxima cantidad de lípido adsorbido y la cantidad de grupos cargados superficiales de los látex.

Según estos cálculos, en el látex sulfonatado (JL2) habría el doble de moléculas de lípido que de cargas negativas en la superficie de dichas partículas; por tanto, podríamos suponer que se habría formado una bicapa lipídica en la interfase polímero/disolución y, en esta situación, el sistema coloidal debería ser totalmente estable. Sin embargo, esta suposición es totalmente refutable por dos razones: en primer lugar, considerando que el área que ocupa una molécula de DSDMA dispuesta de forma vertical es de  $4.2 \cdot 10^{-19} \text{ m}^2$  [30], tendremos que una monocapa teórica de lípido equivaldría a  $3.9 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  y, sin embargo, nuestros valores siempre quedan bastante por debajo de dicha cifra. Por otro lado, el sistema es totalmente inestable. Otro resultado que parece confirmar que la principal interacción entre el lípido y la subfase es de origen electrostático es el siguiente: para los dos látex carboxilatados la razón

entre sus densidades superficiales de carga coincide exactamente con la razón entre las cantidades máximas de DSDMA adsorbidas ( $\sigma_{0, JL7}/\sigma_{0, JL4} = J_{pl, JL7}/J_{pl, JL4} = 1.6$ ).

Entonces, si la interacción es de tipo coulombiano en un medio al 50 % en etanol y agua, ¿cómo podemos justificar los datos de la Tabla IV.1?. Lo más llamativo es que en ningún caso  $J_{pl}/\Gamma_e = 1$  aunque las densidades superficiales de carga para el látex sulfonatado (JL2), el carboxilatado (JL4) y el más hidrofílico (JL10) sean prácticamente las mismas. La única respuesta posible que pueda explicar todos nuestros resultados experimentales es que hayamos cometido un error al calcular la densidad superficial de los grupos ácido fuerte en los látex, subestimando su valor real. Lo cierto es que es fácil obtener errores de subestimación al cuantificar grupos químicos de esta naturaleza. Si recordamos el capítulo de caracterización, la valoración de grupos ácido o base débiles no conlleva ningún problema, pues a partir de las retrovaloraciones se podía obtener el valor de  $\sigma_0$  de forma fiable. Sin embargo, en los casos de los látex sulfonados y en aquellos que tengan grupos sulfato superficiales hace falta que todos los contraiones de tales grupos funcionales sean protones (en realidad iones hidronio  $H_3O^+$ ). Por esta razón se incubaban las muestras con resinas de intercambio iónico. No obstante, tanto las resinas como los látex poseen grupos ácido fuerte y para conseguir el fin anteriormente expuesto es necesario que el número de protones aportado por las resinas sea muy superior al de iones  $Na^+$  que tiene el látex por contraiones. De esta forma, tras retirar las resinas casi todos los contraiones de los grupos sulfato y sulfonato serán iones hidronio y podrán ser valorados por reacciones ácido-base. Sin embargo, en nuestro caso sólo llevamos a cabo un lavado con resinas y por tanto es bastante probable que queden grupos ácido fuerte sin cuantificar (precisamente aquellos que, para mantener la electroneutralidad del sistema, tengan como contraiones iones diferentes al  $H_3O^+$ ). En el caso del JL2 esta subestimación es acusada puesto que sólo existen grupos sulfonato en superficie y, además, en gran número. Para el látex JL10 el valor de  $\sigma_0$  estará subestimado en menor medida pues la gran parte de sus grupos superficiales son carboxilos y una minoría son los que se corresponden con grupos sulfato. De ahí que los valores de  $J_{pl}/\Gamma_e$  para estos dos látex sean 1.92 y 1.22 respectivamente. Por último, la explicación que justifica el resultado de  $J_{pl}/\Gamma_e = 0.7$  para los látex carboxilatados es que en la mezcla etanol/agua no todos los grupos carboxilos están desprotonados (pues la constante dieléctrica del medio es menor que la del agua y el  $pK_a$  de dichos grupos será mayor).

La presencia de etanol, que rompe la estructura del agua pura, causa un doble efecto: por un lado hace que la interacción hidrofoba entre la superficie polimérica y el lípido no sea la

que dirige la unión de éstos. Si nos damos cuenta, debido a la estructura de las moléculas lipídicas, el aumento de entropía en el proceso de adsorción sólo puede estar causado por la deshidratación de las partes hidrofóbicas del látex y del lípido, ya que en este caso no hay variaciones configuracionales en las cadenas apolares del DSDMA que hagan aumentar la entropía de las mismas, sino que ocurre todo lo contrario, perderían movilidad y libertad de giro al quedar ancladas en la interfase polímero/disolución. Por tanto, al romper el etanol las estructuras organizadas que adoptan las moléculas de agua sobre las partes hidrofóbicas de ciertos materiales, la interacción hidrofoba de la que hablábamos en el capítulo de la adsorción proteica pierde su significado e importancia. Por otra parte, el etanol hace disminuir la constante dieléctrica del medio haciendo que sea las atracciones electrostáticas las responsables del resultado final de la adsorción. No obstante debemos decir que aunque las interacciones hidrofóbicas no son las que dirigen la adsorción, sí pueden ser una de las fuerzas que actúan "a posteriori" para mantener adsorbido el lípido a la partícula de poliestireno.

Para corroborar las anteriores afirmaciones llevamos a cabo la siguiente experiencia: calcular la máxima cantidad de DSDMA que se adsorbe a diferentes pHs. El medio de reacción se obtuvo mezclando disoluciones acuosas tamponadas a cada pH con el correspondiente volumen de etanol. Los resultados de estos ensayos se muestran en las Figuras IV.22 y 23.

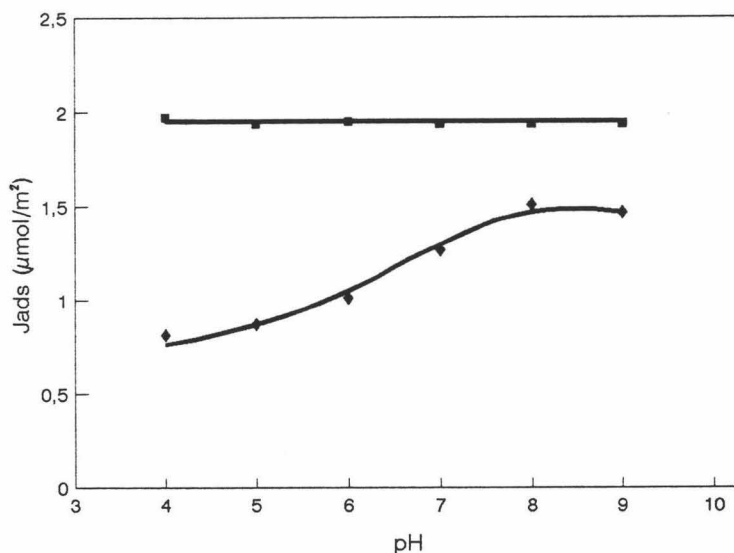


Fig. IV.22. Máxima cantidad de DSDMA que se adsorbe en mezclas etanol/agua al 50 % (v/v) en función del pH de la disolución acuosa original. Látex JL2 (■) y JL10 (◆).

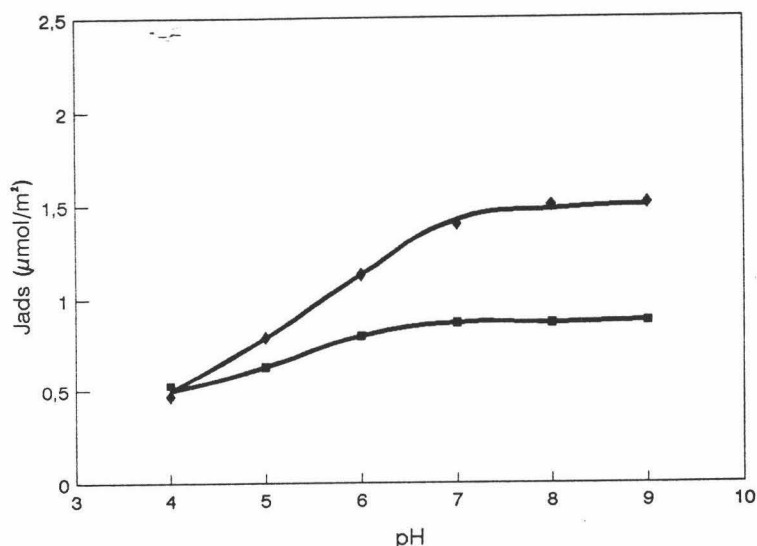


Fig. IV.23. Máxima cantidad de DSDMA que se adsorbe en mezclas etanol/agua al 50 % (v/v) en función del pH de la disolución acuosa original. Látex JL4 (■) y JL7 (◆).

Como se puede observar la cantidad de DSDMA adsorbida es función del pH, y esta dependencia varía tal y como lo hace la carga de los grupos superficiales cargados de los látex. Así, para el látex sulfonatado (JL2) la cantidad máxima de lípido que se adsorbe es la misma tanto a pHs ácidos como básicos. Sin embargo, el valor de  $J_{pi}$  en el caso de los látex carboxilatados (JL4 y JL7) y en el hidrofílico (donde la mayor parte de sus grupos cargados son carboxilos) es menor en pHs ácidos que en pHs básicos. También debemos decir que todas las muestras de estos ensayos de máxima adsorción estaban floculados tras el periodo de incubación. Por consiguiente, estos resultados refuerzan la anterior idea sobre la interacción eléctrica.

Debido a los resultados de todas las experiencias anteriores podemos decir que la adsorción del lípido DSDMA sobre látex que poseen grupos ácido fuerte superficiales podría constituir un nuevo método analítico enfocado a la cuantificación de la densidad superficial de tales grupos, (siempre y cuando la adsorción se lleve a cabo en mezclas etanol/agua al 50 %). Este método alternativo podría sustituir las valoraciones ácido-base de grupos sulfato y sulfonato por valoraciones lipídicas, pues como previamente comentamos el cálculo de  $\sigma_0$  en látex de esta naturaleza presenta dificultades experimentales; (o en vez de sustituirlas, puede

servir para apoyar o confirmar los resultados obtenidos por aquellas). Esta alternativa analítica no es completamente novedosa, pues Paulke y col [36] han propuesto recientemente el realizar adsorciones de un surfactante iónico (de carga opuesta a las partículas coloidales) para conocer la  $\sigma_0$  de látex con grupos ácido fuerte en superficie.

Por último, y al igual que hicimos con la adsorción del fragmento proteico F(ab')<sub>2</sub>, podemos aplicar las ecuaciones III.3 y III.4 dadas por Chatteraj y col [37,38] para calcular la variación de la energía de Gibbs del proceso de adsorción lipídica. De esta forma, haciendo uso de la siguiente ecuación

$$\Delta G_B^\circ = \frac{RT}{J_{ads}} \left[ - \int_0^\infty \frac{J_{ads}}{X_L} dX_L + J_{ads} \ln X_L \right] \quad (IV.1)$$

se calculó  $\Delta G_B^\circ$ , que si recordamos coincide con la variación de energía libre standard para la transferencia de un mol de lípido desde la disolución hasta la superficie polimérica cuando la fracción molar del DSDMA en la disolución ( $X_L$ ) cambia desde 0 hasta 1. A partir de dicho valor, y aplicando la ecuación III.4, se puede calcular  $\Delta G^\circ$ , que representa la variación de la energía de Gibbs standard de una superficie cuando ésta se satura por DSDMA cuando la fracción molar de dicho lípido pasa hipotéticamente de 0 a 1. Los resultados se muestran en la Tabla IV.2.

Látex	$\Delta G_B^\circ$ (kJ/mol)	$J_{pl}$ ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ )	$\Delta G^\circ \times 10^5$ (kJ/m <sup>2</sup> )
JL2	-52.7 ± 1.2	2.10 ± 0.05	-11.0 ± 0.3
JL4	-43.9 ± 0.8	1.30 ± 0.05	-6.0 ± 0.2
JL7	-42.6 ± 1.0	0.88 ± 0.03	-3.9 ± 0.2
JL10	-45.5 ± 0.5	1.40 ± 0.04	-5.9 ± 0.2

Tabla IV.2. Valores de la disminución de la energía de Gibbs en la adsorción de DSDMA sobre algunos de nuestros látex en mezclas etanol/agua al 50 %.

El valor de  $\Delta G_B^\circ$  es una medida de la afinidad de la adsorción. Esta afinidad es máxima en el látex JL2, cuyos grupos superficiales cargados son de carácter ácido fuerte, y disminuye la afinidad al ir cambiando la naturaleza de los grupos iónicos de la subfase polimérica.

**Adsorciones de DSDMA en mezclas etanol/agua al 1 % (v/v).**

En primer lugar se llevaron a cabo las isotermas de adsorción en función de la cantidad de lípido añadida, manteniendo constante el pH de la disolución en 7.0. Los resultados se muestran en las Figuras IV.24 y 25.

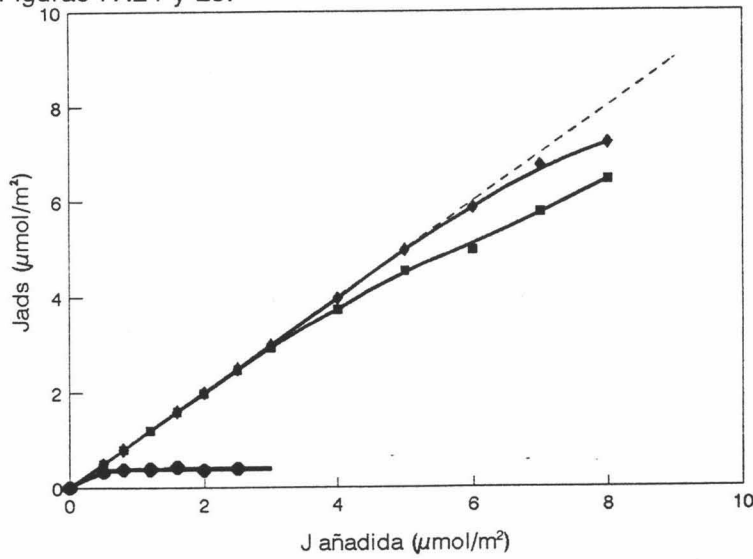


Fig. IV.24. Cantidades de DSDMA adsorbidas sobre los látex JL2 (■), JL10 (◆) y JL8 (●) en mezclas de etanol/agua al 1 % (v/v).

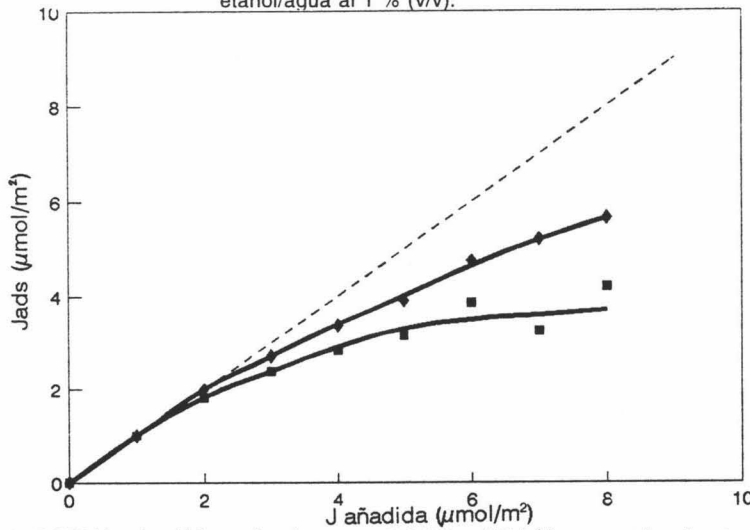


Fig. IV.25. Cantidades de DSDMA adsorbidas sobre los látex JL4 (■) y JL7 (◆) en mezclas de etanol/agua al 1 % (v/v).

Como se puede comprobar, existen diferencias entre estos resultados y los obtenidos con las mezclas de etanol/agua al 50 %. Por una lado, no se obtienen "plateaus" de máxima adsorción bien definidos. No pudimos continuar las curvas de adsorción porque nos lo impedía el límite de solubilidad del lípido. Además, un resultado llamativo que encontramos es que las muestras que tenían una cantidad de DSDMA similar al valor de  $J_{pl}$  para las adsorciones en etanol/agua al 50 % (es decir,  $2.1 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  para el látex JL2,  $1.3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  para el JL10,  $0.9 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  para el JL4 y  $1.4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  para el JL7), aparecían totalmente floculadas. Sin embargo, cuando las cantidades adsorbidas eran superiores a este valor la estabilidad del sistema parecía recuperarse, al menos visualmente. Este resultado nos lleva a pensar en la posibilidad de que las moléculas de DSDMA se dispongan sobre la superficie polimérica estructurándose en diferentes monocapas lipídicas. Otro resultado llamativo es que existe una ligera adsorción sobre el látex catiónico JL8 ( $\approx 0.4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ ). Parece ser que, aunque todavía sean las fuerzas de atracción eléctrica las que dirigen el proceso de adsorción, la interacción hidrofóbica también se pone de manifiesto, si bien su influencia es muy pequeña, (véase, por ejemplo, que sobre el látex más hidrofílico (JL10) se adsorben grandes cantidades de lípido).

A continuación se realizaron las experiencias de máxima adsorción de DSDMA en función del pH y en ellas encontramos unos sorprendentes resultados que son altamente reproducibles. Estos valores se muestran en las Figuras IV.26 y 27.

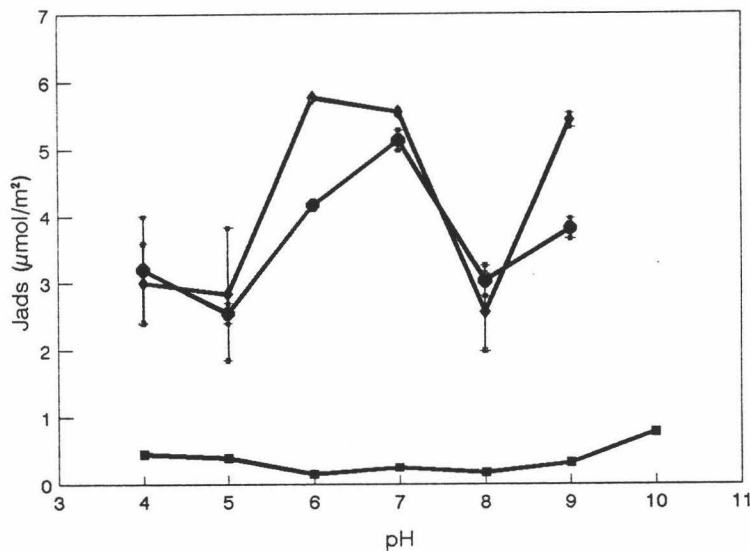


Fig. IV.26. Máxima cantidad de DSDMA adsorbida en función del pH sobre los látex JL2 (●), JL10 (◆) y JL8 (■).

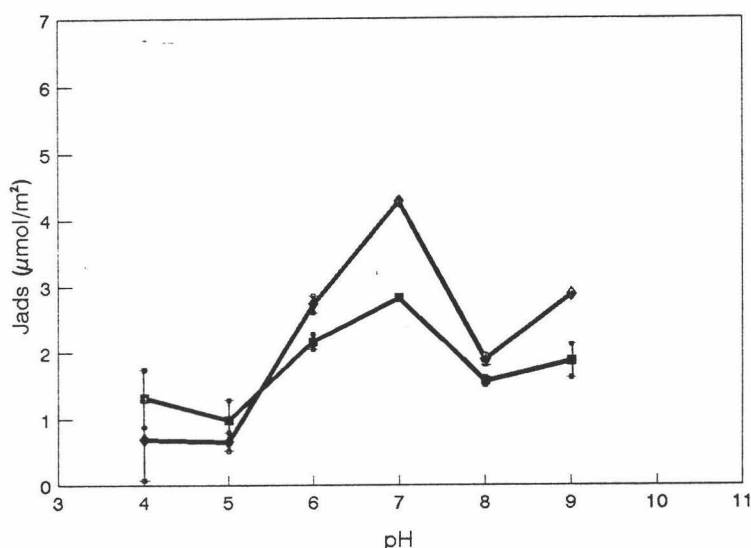


Fig. IV.27. Máxima cantidad de DSDMA adsorbida en función del pH sobre los látex JL4 (■) y JL7 (◆).

La forma de las curvas, que puede parecer caprichosa, no se corresponde para nada con lo que cabría esperar si se considera que la interacción electrostática es predominante en estos procesos de adsorción. Únicamente para el látex catiónico parece adsorberse más lípido en el pH donde las partículas poliméricas están menos cargadas (pH 10). Sin embargo, para el látex sulfonatado (JL2), cuya  $\sigma_0$  permanece constante en todo el intervalo de pH, los valores de  $J_{pl}$  sí dependen fuertemente del pH. Lo mismo ocurre para los látex carboxilados y para el JL10 (que posee grupos hidroxilo, carboxilo y sulfato en superficie), si bien la dependencia de sus  $\sigma_0$  con el pH difiere de la encontrada para la variación de  $J_{pl}$  con el mismo.

La única justificación posible que explica todos estos resultados la encontramos en el papel que juegan los iones del medio tamponador. Los iones fosfato (y principalmente el más cargado:  $\text{PO}_4\text{H}^-$ ) promueven la adsorción lipídica, al igual que lo hace el ion borato ( $\text{BO}_3\text{H}_2^-$ ). Esto explica que a pH 7 se adsorba más DSDMA que a pH 6 (salvo para el látex JL10) y que a pH 9 se adsorba más lípido que a pH 8. Para corroborar la idea de que los iones tamponadores son los responsables de estos curiosos resultados, se volvieron a realizar estas experiencias cambiando la naturaleza del par tamponador. En las Figuras IV.28 y 29 se muestran los resultados obtenidos en medios tamponados con BIS-TRIS para los pHs 6



y 7, y TRIS para los pHs 8 y 9. Dichos "buffers" son los que siempre se han usado en todas las experiencias que se han llevado a cabo con el látex catiónico JL8, tal y como ya comentamos en el **Capítulo II**.

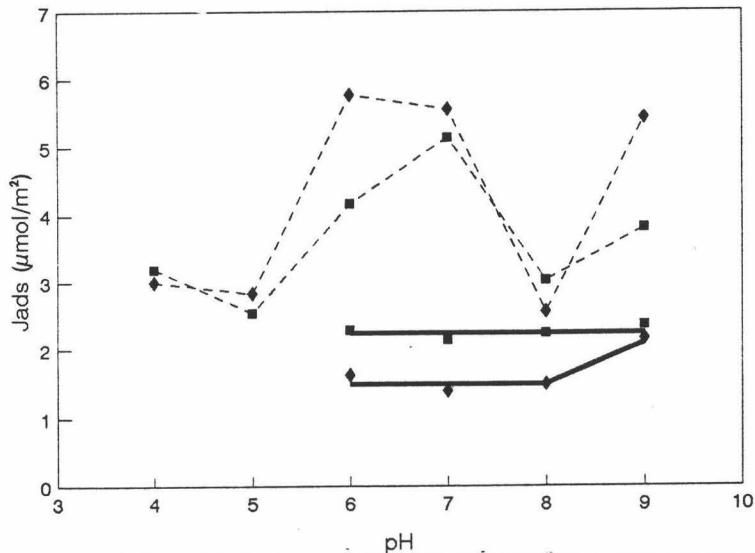


Fig. IV.28. La línea continua representa la cantidad máxima de DSDMA adsorbida en el látex JL2 (■) y en el JL10 (◆) en función del pH cuando el medio se tampona con BIS-TRIS o con TRIS. Con línea discontinua se representa los resultados de la Figura IV.26.

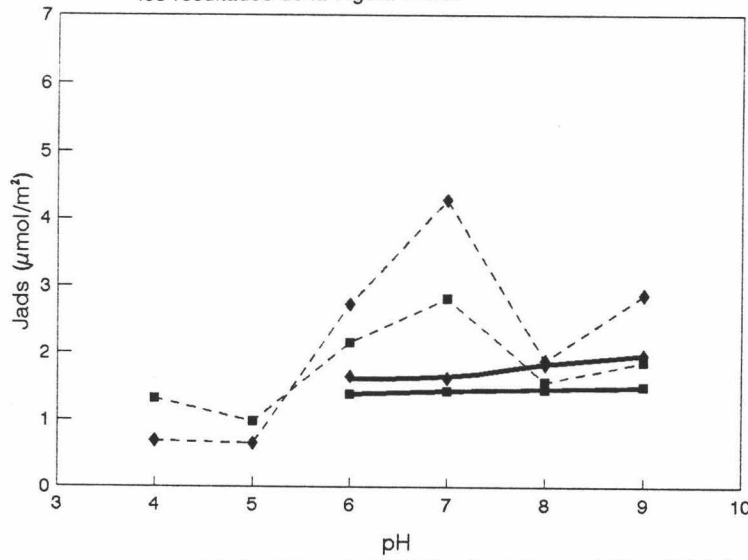


Fig. IV.29. La línea continua representa la cantidad máxima de DSDMA adsorbida en el látex JL4 (■) y en el JL7 (◆) en función del pH cuando el medio se tampona con BIS-TRIS o con TRIS. Con línea discontinua se representa los resultados de la Figura IV.27.

Como se puede ver, los iones fosfato y borato ejercen una potente influencia sobre los látex aniónicos. Lo curioso es que este hecho no se produce en mezclas de etanol/agua al 50 %, por lo que desconocemos su mecanismo de acción. También comprobamos que estos iones no afectan al método analítico del Cloroformo - Orange II y por tanto, todos los resultados de las Figuras IV.26 y 27 no son producto de errores en el análisis de las muestras.

También se realizaron desorciones del lípido catiónico por dilución en el mismo pH de la adsorción inicial y por cambio a pH 8, tanto en situaciones de máximo como de bajo recubrimiento. Los resultados indican que la desorción por dilución es siempre inferior al 3 %, por lo que la unión del lípido a la superficie polimérica es bastante fuerte. Al cambiar el pH del medio de adsorción desde su valor original hasta pH 8, la cantidad de DSDMA que permanece en superficie es del  $90 \pm 5$  % del valor inicial.

#### Adsorciones de DSDMA en medios ricos en etanol.

Estas experiencias se llevaron a cabo en disoluciones etanólicas que tenían una pequeña cantidad de agua, la cual provenía de la disolución original del látex. El porcentaje de agua en estas mezclas (en % en volumen) fue de 1.9 % para los ensayos con el látex JL2, 3.4 % (JL4), 2.5 % (JL7) y 5.8 % (JL10). Los resultados se muestran en las Figuras IV.30-33 y tal como se puede comprobar, la adsorción es muy pequeña.

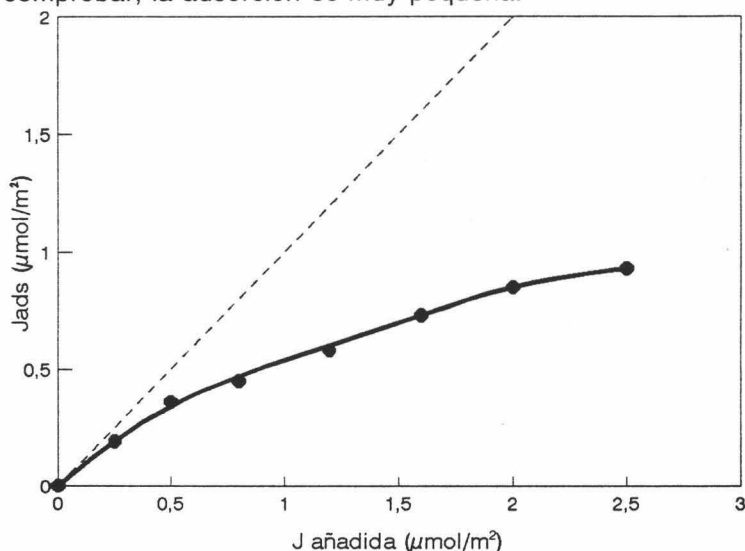


Fig. IV.30. Cantidades de DSDMA adsorbidas sobre el látex JL2 en mezclas etanol/agua al 98.1 % (v/v).

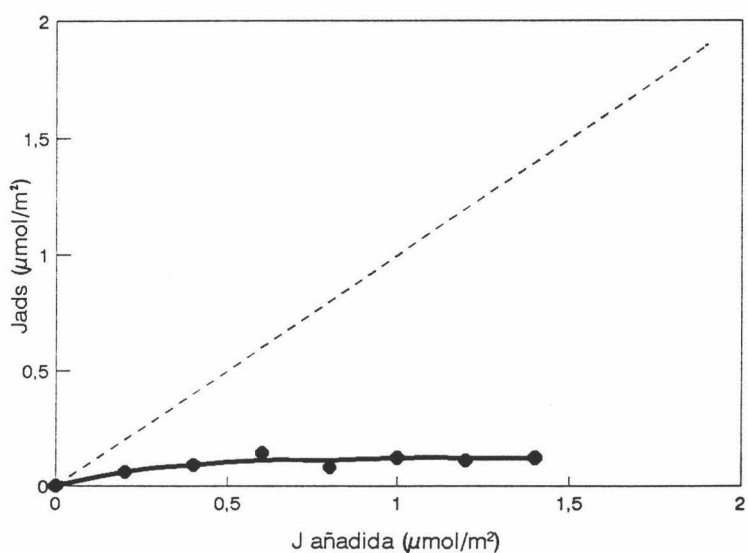


Fig. IV.31. Cantidades de DSDMA adsorbidas sobre el látex JL4 en mezclas etanol/agua al 96.6 % (v/v).

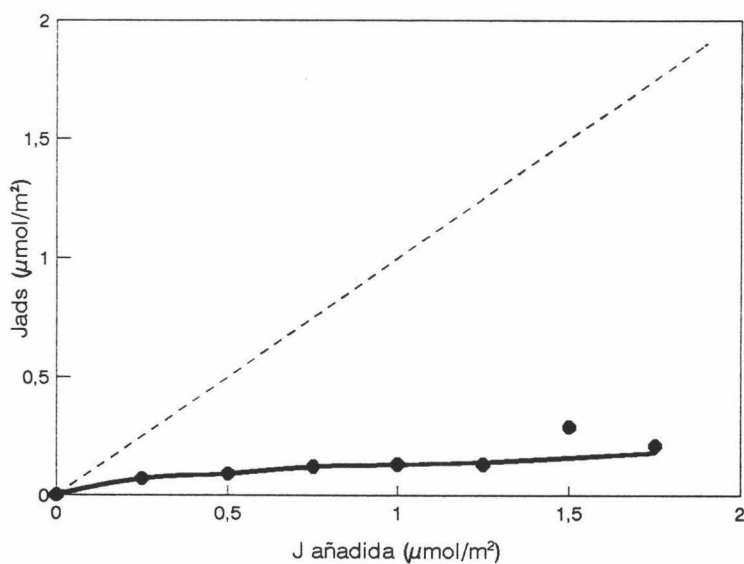


Fig. IV.32. Cantidades de DSDMA adsorbidas sobre el látex JL7 en mezclas etanol/agua al 97.5 % (v/v).

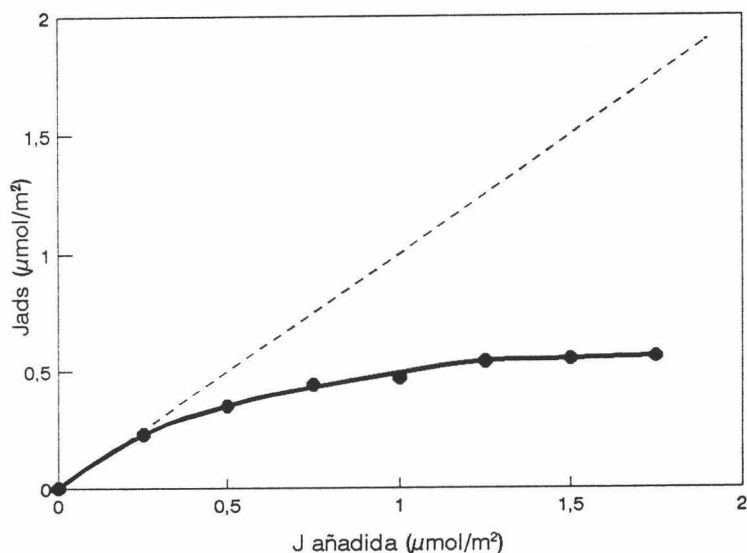


Fig. IV.33. Cantidades de DSDMA adsorbidas sobre el látex JL10 en mezclas etanol/agua al 94.2 % (v/v).

Estos resultados parecen indicar que la interacción hidrofóbica está prácticamente ausente en estas adsorciones. Por supuesto, la adsorción del lípido catiónico sobre el látex más hidrófobo (JL8) fue nula, ya que sus grupos cargados superficiales presentan carga positiva. Lo cierto es que la aproximación de las moléculas de DSDMA debe estar eléctricamente muy favorecida, pues la constante dieléctrica del medio es pequeña (recuérdese que para el etanol  $\epsilon = 24.3$ ) pero posiblemente no se originan posteriores interacciones (tipo hidrofóbico) que mantengan a las moléculas de lípido adsorbidas a las partículas poliméricas. Este resultado es más acusado en los látex carboxilados, donde la cantidad que se adsorbe es muy pequeña.

#### Movilidad de los complejos látex-DSDMA.

Siguiendo con la mecánica de trabajo que hemos llevado hasta ahora, a continuación de las experiencias de adsorción se realizaron medidas de movilidad electroforética, no sólo para hacer una caracterización completa de los sistemas, sino también para relacionar estos resultados con los de estabilidad coloidal.

En las gráficas de las Figuras IV.34-37 aparece la variación de la movilidad de los complejos

en función de la cantidad adsorbida. El medio de medida fue una disolución acuosa tamponada a pH 7 y con baja fuerza iónica (0.002)

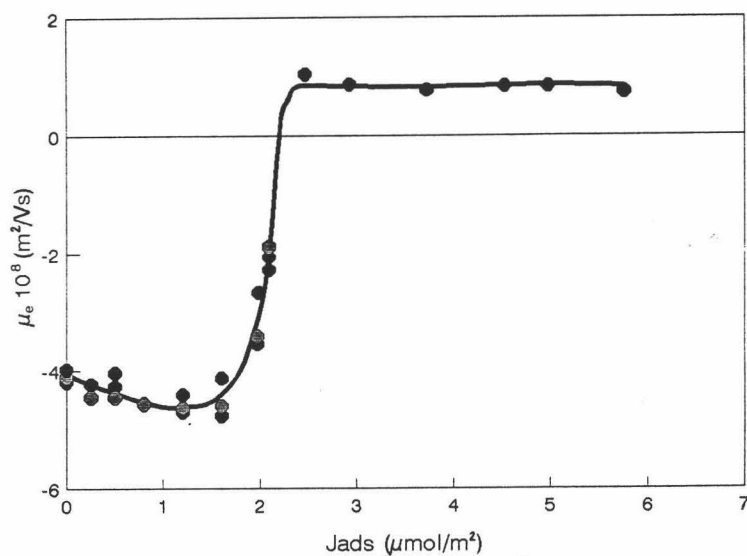


Fig. IV.34. Movilidad de los complejos JL2-DSDMA en función de la cantidad de lípido adsorbida. (pH 7 y I = 0.002).

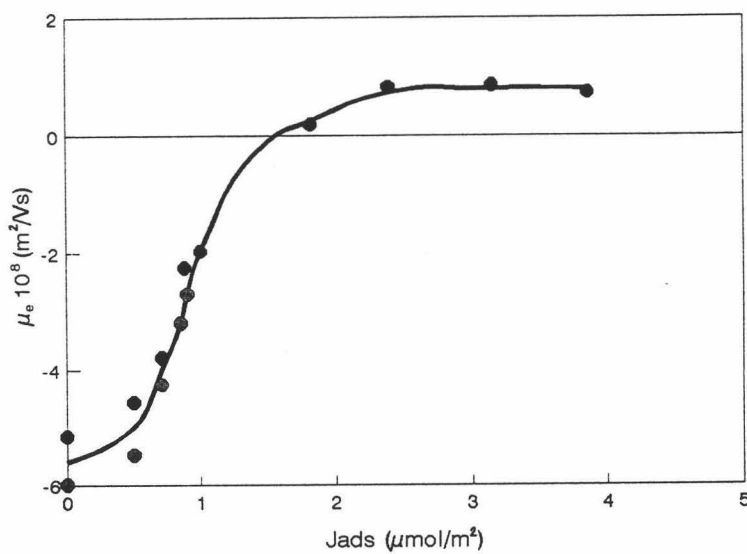


Fig. IV.35. Movilidad de los complejos JL4-DSDMA en función de la cantidad de lípido adsorbida. (pH 7 y I = 0.002).

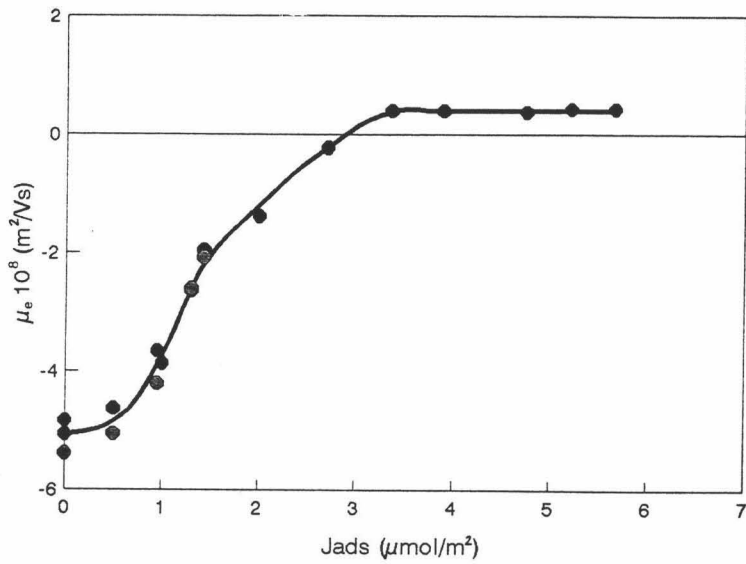


Fig. IV.36. Movilidad de los complejos JL7-DSDMA en función de la cantidad de lípido adsorbida. (pH 7 y I = 0.002).

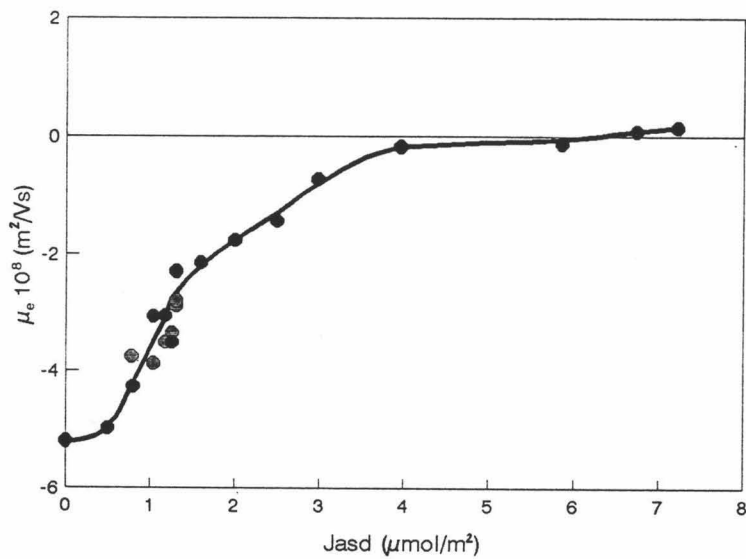


Fig. IV.37. Movilidad de los complejos JL10-DSDMA en función de la cantidad de lípido adsorbida. (pH 7 y I = 0.002).

De estas gráficas podemos destacar dos resultados. Por una parte, en todos los complejos existe un punto de movilidad nula próximo o coincidente con el valor de  $J_{pi}$  obtenido en los ensayos realizados con las mezclas de etanol/agua al 50 %. Este hecho se confirma con la inestabilidad que presentan dichas muestras, debido a la anulación de carga de las partículas causada por la adsorción del lípido catiónico. Por otro lado, tenemos que la movilidad electroforética, una vez que cambia de signo, permanece con un valor constante pese a que aumenta el aporte lipídico sobre la superficie de las partículas de látex. Este resultado está en concordancia con el hecho de que haya una coadsorción de iones fosfato ( $PO_4H_2^-$  y  $PO_4H^-$ ) sobre las capas de lípido que se van adsorbiendo. Éstos ejercen una acción de apantallamiento sobre las cargas positivas de las moléculas de DSDMA, permitiendo una mayor adsorción lipídica. A su vez, deben quedar adsorbidos cerca de la superficie o encerrados entre las moléculas de lípido adsorbidas, pues la carga electrocinéticamente transportada permanece constante, tal y como se refleja en las anteriores medidas de movilidad. El mecanismo de actuación se esquematiza en la Figura IV.38.

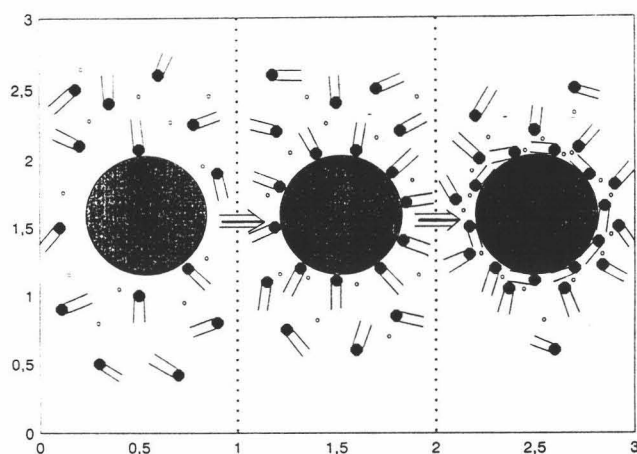


Fig. IV.38. Esquema propuesto para la coadsorción de DSDMA y de iones fosfato.

De hecho, cuando se midieron las movilidades (a pH 8) de las muestras cuyas adsorciones se llevaron a cabo en tal pH, se vio que una vez superado el  $pI$  del complejo la movilidad (positiva) de estas partículas era mayor que en muestras cuya adsorción se realizaba en pH 7. Véase las Figuras IV.39 y 40. Este resultado nos indica que aunque las muestras adsorbidas a pH 8 (medio más rico en  $BO_3H_3$  que en  $BO_3H_2^-$ ) tengan una menor cantidad de lípido adsorbido que las que se obtienen al incubar las partículas en pH 7, la carga electrocinéticamente transportada es mayor pues la coadsorción de las especies que forman el par tamponador es pequeña. Este hecho no ocurre a pH 9 (medio más rico en  $BO_3H_2^-$  que

en  $\text{BO}_3\text{H}_3$ ) puesto que el aporte de iones borato en estas disoluciones es mayor tal y como nos lo indican los resultados de adsorción.

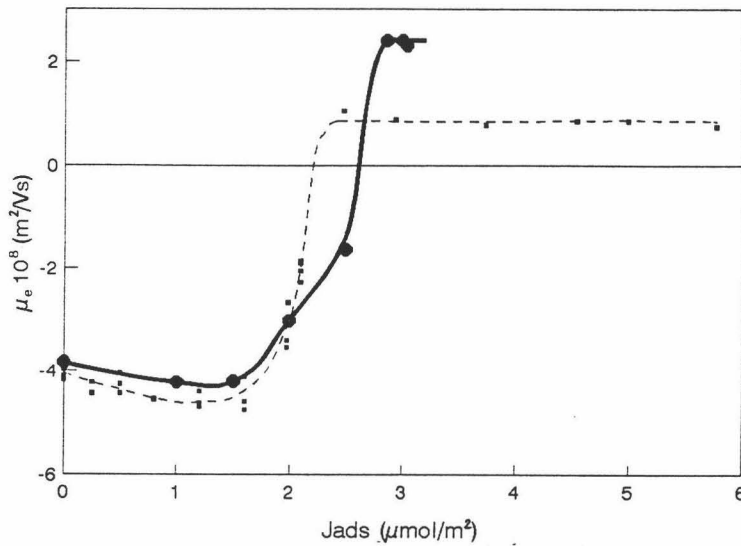


Fig. IV.39. Movilidad de los complejos **JL2-DSDMA** en función de la cantidad de lípido adsorbido en pH 8.  $I = 0.002$ . (Línea discontinua: datos de la Figura IV.34).

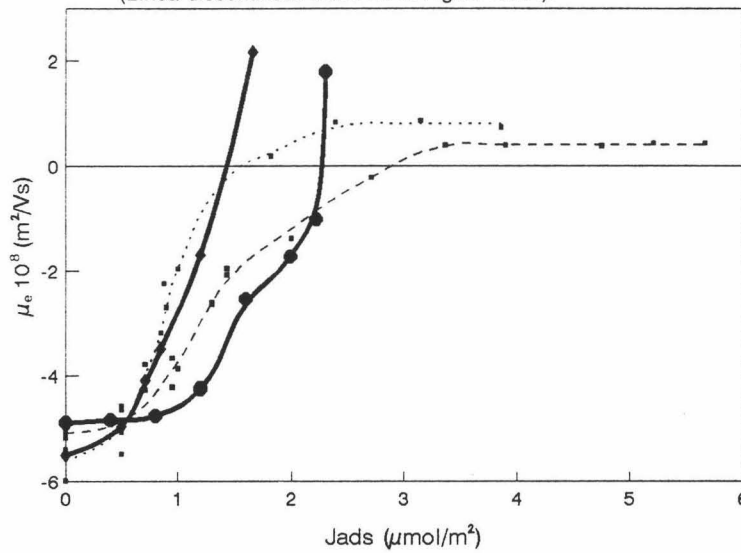


Fig. IV.40. Movilidad de los complejos **JL4-DSDMA** (♦) y **JL7-DSDMA** (●) en función de la cantidad de lípido adsorbida en pH 8.  $I = 0.002$ . (Línea punteada: datos de la Figura IV.35 (JL4); línea discontinua: datos de la Figura IV.36 (JL7)).



Por estas razones, posiblemente la estabilidad de los látex saturados con DSDMA a pH 8 (borato) sea mayor que la de las isotermas realizadas en pH 7 (fosfato) pese a que estas últimas tienen más cantidad de lípido adsorbido. Veamos esos resultados.

#### Estabilidad de los complejos látex-DSDMA.

Se realizaron las experiencias empleando la misma técnica utilizada en los capítulos anteriores. Los resultados de la concentración crítica de coagulación (a pH 7 y 8) en función de la cantidad de lípido adsorbida aparecen en las gráficas de la Figura IV.41.

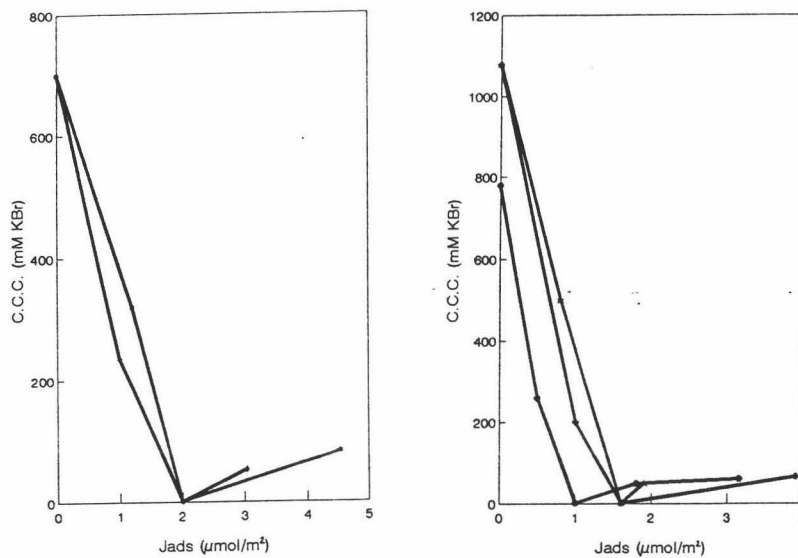


Fig. IV.41. C.C.C. de los complejos JL2-DSDMA en función de la carga lipídica de las partículas, a pH 7 (■) y a pH 8 (◆) (izquierda). C.C.C. para los complejos JL4-DSDMA a pH 7 (●) y JL7-DSDMA a pH 7 (+) y pH 8 (★) (derecha).

Como podemos comprobar, los resultados de estabilidad concuerdan con el comportamiento electrocinético de los látex recubiertos con el lípido. Al igual que la movilidad, la estabilidad coloidal decae continuamente hasta alcanzar el valor de recubrimiento de DSDMA que origina el punto de movilidad nula y luego, para mayores cantidades de lípido adsorbido, el sistema se reestabiliza ligeramente obteniéndose valores de C.C.C. de  $80 \pm 10$  mM (de KBr) para el látex sulfonatado (JL2),  $55 \pm 5$  mM para el JL4 y  $57 \pm 8$  mM para el látex JL7.

No obstante, la estabilidad de las muestras adsorbidas a pH 8 no mejora con respecto a las

obtenidas a pH7 alcanzando valores de C.C.C. muy similares, pese a que las primeras tienen una mayor movilidad (superior en una unidad) que las segundas.

Como ya comentamos en el capítulo de caracterización de los coloides poliméricos, el seguimiento de la floculación de las partículas del látex JL10 no pudo realizarse espectrofotométricamente y, por consiguiente, los valores de su C.C.C. no pudieron obtenerse. No obstante, a simple vista se podía comprobar que la estabilidad de los complejos JL10-DSDMA era extremadamente baja, pues todas aquellas partículas que tenían una cantidad de lípido  $> 1.2 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  estaban parcialmente coaguladas (tal y como cabría esperar después de ver el comportamiento electrocinético de las mismas).

La estabilidad coloidal sólo mejora para un látex: el catiónico (JL8). Como recordaremos, estas partículas adsorbían una pequeña cantidad de DSDMA ( $0.35 \pm 0.10 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) en las disoluciones pobres en etanol. Este aporte adicional de cargas positivas hace que la C.C.C. del látex original (160 mM a pH 7) aumente hasta 250 mM en dicho pH.

Para terminar este bloque, podemos decir que no se ha alcanzado el objetivo prefijado de obtener partículas estables cuya interfase presente una estructura similar a la bicapa lipídica de las membranas biológicas. Sin embargo, y pese a que estos resultados no parecen tener una utilidad experimental o técnica inmediata, sí son importantes desde el punto de vista de la experimentación básica, pues se ha realizado un profundo estudio donde se han intentado justificar todos los resultados obtenidos (aun siendo algunos de éstos un tanto sorprendentes). Además, en apoyo a este trabajo que hemos llevado a cabo debemos de recordar que han sido muy pocos los autores que han conseguido aportar alguna información sobre adsorciones lipídicas realizadas sobre soportes poliméricos.

### **Coadsorción secuencial de $F(ab')_2$ y DSDMA.**

Aunque "a priori" podemos pensar que con los látex aniónicos no vamos a conseguir complejos poliestireno- $F(ab')_2$ -DSDMA estables en condiciones fisiológicas, es posible que sí encontremos un aumento de estabilidad en aquellos complejos creados con el látex catiónico. La experimentación que se llevó a cabo se describe a continuación.

Se adsorbieron moléculas de  $F(ab')_2$  sobre los látex JL2 (sulfonatado), JL4, JL7 (carboxilatados) y JL8 (catiónico) obteniendo partículas con 3 grados de recubrimiento diferentes. Una vez realizadas dichas isotermas de adsorción se resuspendían los complejos en un medio acuoso tamponado a pH7, con 1 % de etanol y rico en DSDMA, y se dejaban incuban las muestras durante otras 4 horas. Transcurrido este tiempo se volvían a centrifugar todos los tubos y posteriormente se procedió a analizar los sobrenadantes para estudiar la

cantidad de proteína que se había desorbido y para ver la cantidad de lípido que se depositaba sobre las partículas. Los resultados de estas experiencias aparecen en las Figuras IV.42-45. Debemos decir que sólo hubo una ligera desorción (inferior al 8 % de la cantidad total de  $F(ab')_2$  inicialmente adsorbida) para las muestras que contenían partículas del látex catiónico JL8. En los látex aniónicos no hubo desorción proteica alguna.

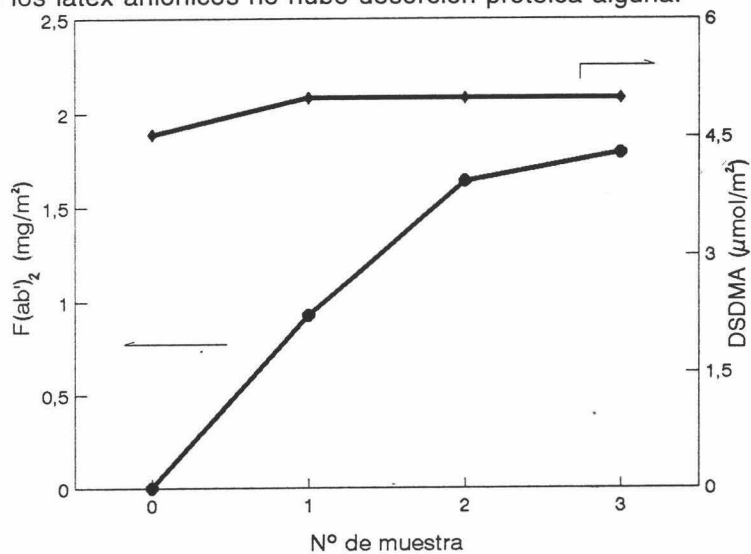


Fig. IV.42. Complejos JL2- $F(ab')_2$ -DSDMA en los que varía la cantidad de proteína adsorbida.

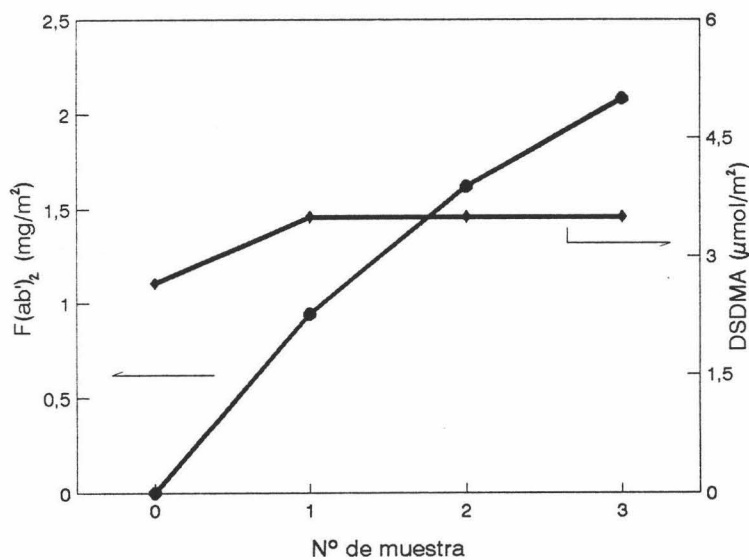


Fig. IV.43. Complejos JL4- $F(ab')_2$ -DSDMA en los que varía la cantidad de proteína adsorbida.

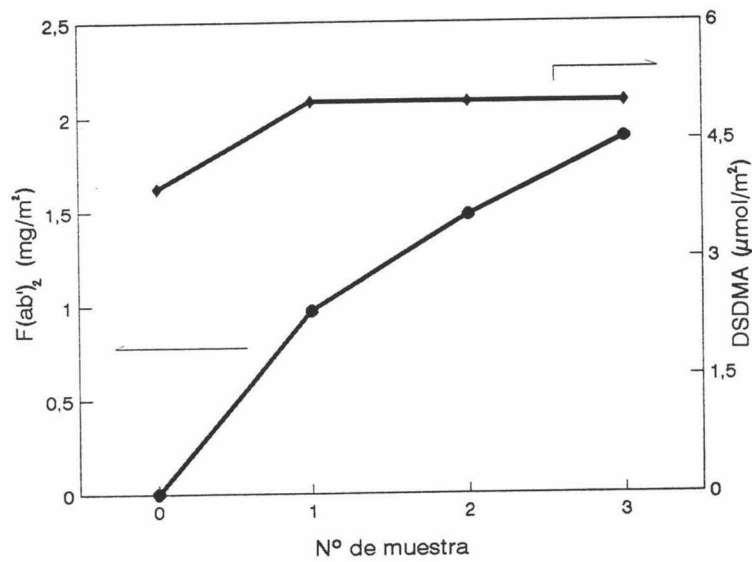


Fig. IV.44. Complejos JL7- $F(ab)_2$ -DSDMA en los que varía la cantidad de proteína adsorbida.

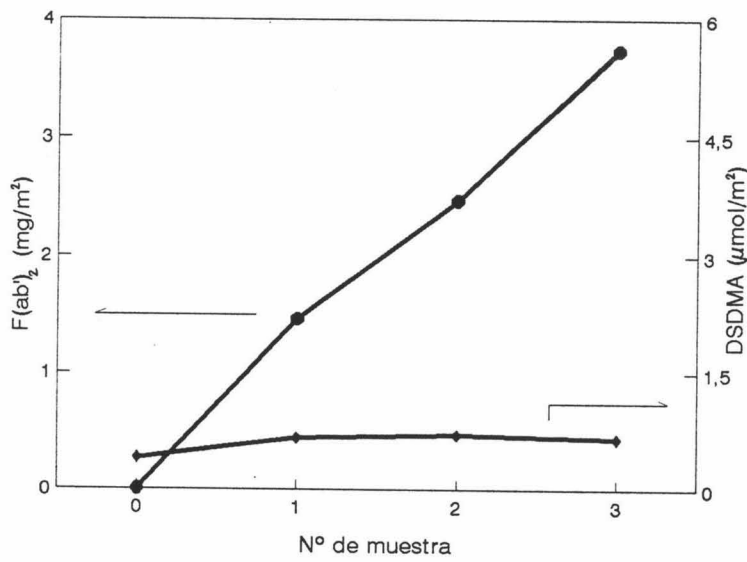


Fig. IV.45. Complejos JL8- $F(ab)_2$ -DSDMA en los que varía la cantidad de proteína adsorbida.

De estas gráficas cabe destacar un resultado llamativo, puesto que es contrario a lo que en un primer momento se podría pensar, y es el siguiente: a medida que aumenta el grado de recubrimiento proteico de las partículas, menor es la superficie de poliestireno que queda expuesta al ataque de las moléculas de DSDMA; por consiguiente, se podría esperar que cuanto mayor fuera la cantidad de  $F(ab')_2$  adsorbida menor sería la cantidad de lípido que se deposita sobre las partículas. Sin embargo, y como puede observarse en las anteriores gráficas, no sólo no disminuye la extensión con que se produce la adsorción lipídica cuando hay proteína previamente adsorbida, sino que aumenta con respecto a las muestras que no poseen  $F(ab')_2$ . Este hecho ocurre en todos los látex, independientemente de cual sea la naturaleza de sus grupos polares superficiales. Tales resultados parecen indicar que las moléculas de DSDMA se adsorben no sólo sobre la superficie polimérica sino que también lo hacen sobre la superficie de las moléculas de proteína situadas en la interfase látex/disolución.

Por último, en las Figuras IV.46-49 se muestran, simultáneamente, las movilidades electroforéticas y los valores de la C.C.C. (experiencias realizadas a pH 7) de todos estos complejos medidas en función de la cantidad de  $F(ab')_2$  que poseen. Paralelamente se llevó otro estudio con muestras cuya adsorción se realizó a pH 8, si bien la estabilidad de las mismas no varió con respecto a los anteriores complejos.

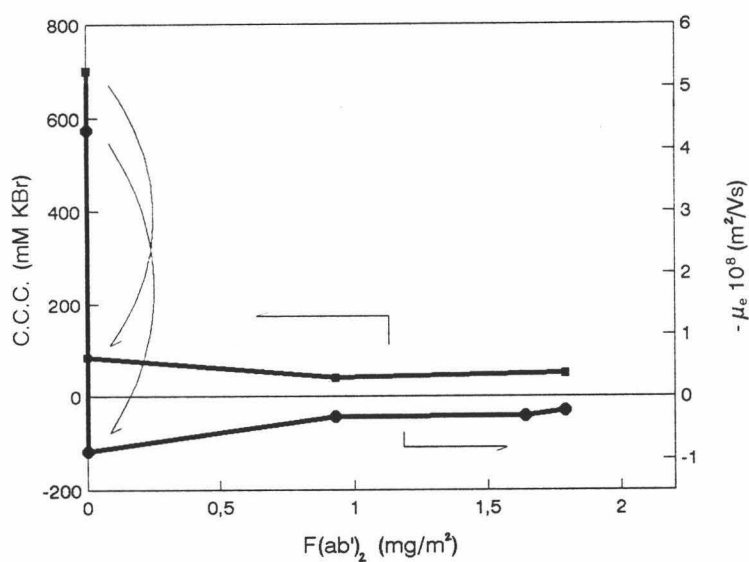


Fig. IV.46. Movilidad electroforética (●) y C.C.C. (■) de los complejos JL2- $F(ab')_2$ -DSDMA en función de la cantidad de proteína adsorbida. El pH del medio fue de 7.0 y la cantidad de lípido adsorbido fue de  $5.0 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ .

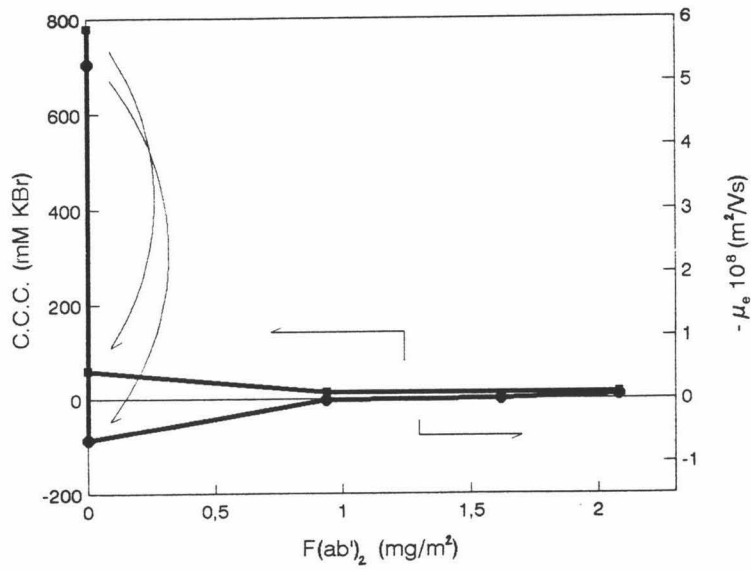


Fig. IV.47. Movilidad electroforética (●) y C.C.C. (■) de los complejos JL4-F(ab')<sub>2</sub>-DSDMA en función de la cantidad de proteína adsorbida. El pH del medio fue de 7.0 y la cantidad de lípido adsorbido fue de 3.5 μmol/m<sup>2</sup>.

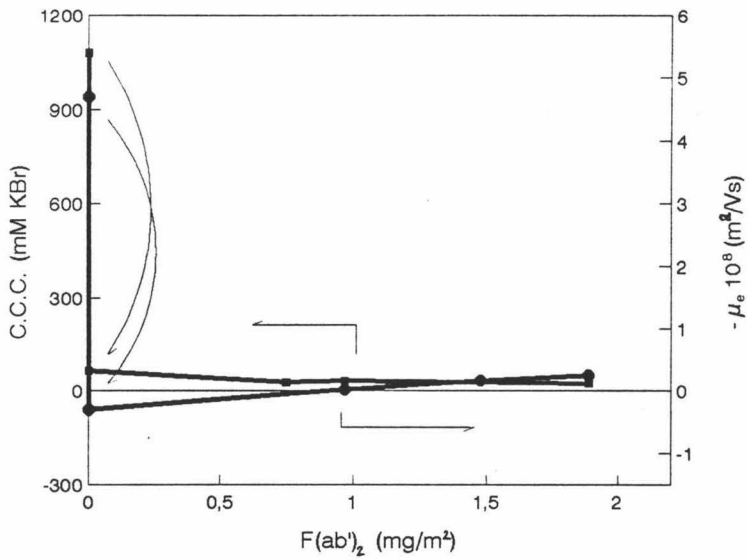


Fig. IV.48. Movilidad electroforética (●) y C.C.C. (■) de los complejos JL7-F(ab')<sub>2</sub>-DSDMA en función de la cantidad de proteína adsorbida. El pH del medio fue de 7.0 y la cantidad de lípido adsorbido fue de 5.0 μmol/m<sup>2</sup>.

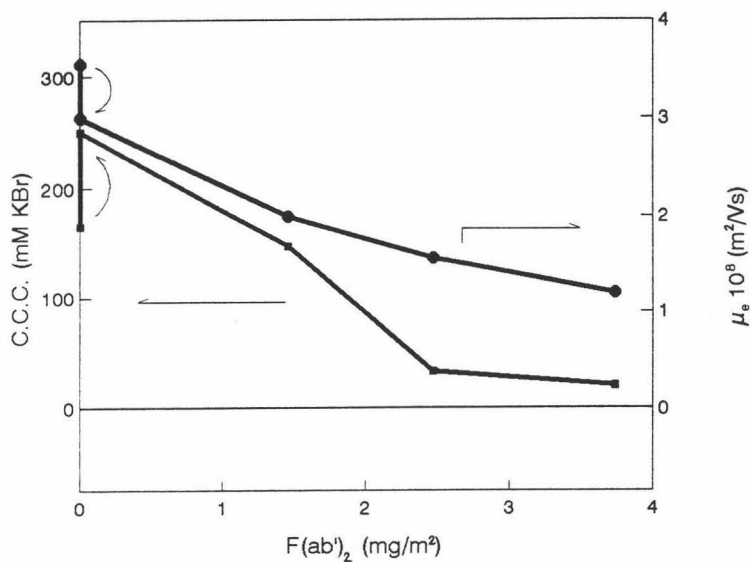


Fig. IV.49. Movilidad electroforética (●) y C.C.C. (■) de los complejos JL8-F(ab)<sub>2</sub>-DSDMA en función de la cantidad de proteína adsorbida. El pH del medio fue de 7.0 y la cantidad de lípido adsorbido fue de 0.7 μmol/m<sup>2</sup>.

La concordancia entre los valores de movilidad y estabilidad es total, y como se podía preveer, la estabilidad de los complejos en condiciones fisiológicas es nula. Sólo las muestras del látex catiónico (JL8) que poseen una carga proteica relativamente pequeña (< 1.5 mg/m<sup>2</sup>) tienen una estabilidad coloidal mayor que el resto. Sin embargo, aunque su estabilidad coloidal nos indica que son potencialmente útiles, la baja cantidad de inmunoproteína que tienen hace que estos complejos no sean muy reactivos, por lo que se desaconseja su aplicación práctica.

#### IV.6. BIBLIOGRAFÍA.

1. J.W.Th. Lichtenbelt, W.J.M. Heuvelsland, M.E. Oldenzeel y R.L.J. Zsom. *Colloid & Surfaces*. **1** : 75 (1993).
2. F. Galisteo González. "Adsorción de proteínas sobre modelos coloidales". Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1992.
3. P. Montagne, P. Varcin, M.L. Cuillère y J. Duheille. *Bioconjugate Chem.* **3** : 187 (1992).

4. H. Kitano, S. Iwai, T. Okubo y N. Ise. *J. Am. Chem. Soc.* **109** : 7608 (1987).
5. L. Vroman. "Blood". Natural History Press. New York. 1967.
6. L. Vroman, A.L. Adams y J.A. Klings. *Fed. Proc.* **3** : 1494 (1971).
7. L. Vroman y A.L. Adams. *J. Colloid Interface Sci.* **111** : 391 (1986).
8. R.G. Lee, C. Adamson y S.W. Kim. *Thromb. Research.* **4** : 485 (1974).
9. T.A. Horbett. *Thromb. Haemostas.* **51** : 174 (1984).
10. J.L. Brash y P. Ten Hove. *Throm. Haemostas.* **52** : 161 (1985).
11. H.G.W. Lensen, D. Bargeman, P. Bergveld, C.A. Smolders y J. Feijen. *J. Colloid Interface Sci.* **99** : 1 (1984).
12. M.D. Bale, D.F. Mosher, L. Wolfarht y R.C. Sutton. *J. Colloid Interface Sci.* **125** : 516 (1988).
13. J.D. Andrade y V. Hlady. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **2** : 161 (1991).
14. P. Warkentin, B. Wälivaara, I. Lundström y P. Tengvall. *Biomaterials.* **15** : 786 (1994).
15. J.M. Peula, J. Puig, J. Serra, F.J. de las Nieves y R. Hidalgo-Álvarez. *Colloids and Surfaces.* **92** : 127 (1994).
16. J.M. Peula, R. Hidalgo-Álvarez y F.J. de las Nieves. "Coadsorption of IgG and BSA onto sulfonated polystyrene latex : I". *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* En prensa (1995).
17. J.M. Peula, R. Hidalgo-Álvarez y F.J. de las Nieves. "Coadsorption of IgG and BSA onto sulfonated polystyrene latex : II". *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* En prensa (1995).
18. E. Lutanie, J.C. Voegel, P. Schaaf, M. Freund, J.P. Cazenave y A. Schmitt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89** : 9890 (1992).
19. H.P. Jenninsen. *J. Chromatog.* **159** : 71 (1978).
20. H.P. Jenninsen. *Adv. Enzyme. Reg.* **19** : 377 (1981).
21. T. Arnebrant y T. Nylander. *J. Colloid Interface Sci.* **111** : 529 (1986).
22. J. Puig, A. Fernández Barbero, D. Bastos González, J. Serra Domènech y R. Hidalgo Álvarez. "Surface Properties of Biomaterials". Editado por R. West y G. Batts. Butterworth-Heinemann Ltd. Oxford. 1994.
23. A.V. Elgersma. "Competitive adsorption of albumin and monoclonal  $\gamma$ -globuline molecules on polystyrene surfaces". Tesis Doctoral. Universidad de Wageningen. Holanda. 1990.
24. I. Lundström y H. Elwing. *J. Colloid Interface Sci.* **136** : 68 (1990).
25. Ch.F. Lu, Nadarajah y K.K. Chittur. *J. Colloid Interface Sci.* **168** : 152 (1994).
26. E. Herrera. "Bioquímica". Interamericana. Madrid 1986.



27. J.M. Peula y F.J. de las Nieves. *Colloids and Surfaces*. **90** : 55 (1994).
28. B. Pouligny, G. Martinot-Lagarde y M.I. Angelo. "Encapsulation of solid microspheres by bilayers". Comunicación en el VIII Congreso de la ECIS, Montpellier (Francia). Septiembre 1994.
29. A.M. Carmona-Ribeiro y T.M. Herrington. *J. Colloid Interface Sci.* **156** : 19 (1993).
30. T. Arai, N. Yasuda y H. Kitamura. "Construction of lipids layers onto the surface of polymer latices particles". Comunicación en el 7º Congreso de la ICSCS, Compiègne (Francia). Julio 1990.
31. T. Arai, R. Mishiro y H. Kitamura. "Adsorption of proteins onto the polymer latex particles covered with a lipid layer". Comunicación en el 7º Congreso de la ICSCS, Compiègne (Francia). Julio 1990.
32. T. Arai, R. Mishiro y H. Kitamura. "Possibility of orientation of the protein molecules adsorbed on the modified surfaces of látex particles". Comunicación en el 201<sup>er</sup> Encuentro Nacional de la ACS, Atlanta (USA). Abril 1991.
33. L Stryer. "Bioquímica". Ed. Reverté. Barcelona. 1988.
34. G. Ahlgren y L. Merino. *Arch. Hydrobiol.* **121** : 295 (1991).
35. A. Martín Rodríguez. "Síntesis, caracterización y aplicaciones de coloides poliméricos funcionalizados". Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1993.
36. B.R. Paulke, P.M. Möglich, E. Knippel, A. Budde, R. Nitzsche y R.H. Müller. *Langmuir*. En prensa (1995).
37. S. Hajra y D.K. Chattoraj. *Indian J. Biochem. Biophys.* **28** : 114 (1991).
38. D. Sarkar y D.K. Chattoraj. *J. Surface Sci. Technol.* **8** : 231 (1992).

**V. ANÁLISIS DE LA LUZ DISPERSADA  
POR SISTEMAS COLOIDALES**

### V.1. INTRODUCCIÓN.

Uno de los pilares fundamentales en el que se basa gran parte de este trabajo es el seguimiento óptico del proceso de aglutinación del sistema coloidal. Esta agregación puede darse por diferentes causas, como son:

- La pérdida de estabilidad del sistema debido al aumento de la fuerza iónica del medio, a la adsorción de determinadas macromoléculas o al aumento de la temperatura. En los dos primeros casos se disminuye la barrera de energía potencial que existe entre las partículas; en el tercero, esta barrera es fácilmente superada.
- El mecanismo de puenteo o "bridging" entre microesferas parcialmente recubiertas de proteína, causado por la adsorción de una misma molécula entre 2 partículas diferentes.
- La inmunoprecipitación del coloide. Aquí, el látex actúa como portador de inmunoproteínas en su superficie, ya sean anticuerpos o antígenos, y la coagulación se dará debido a la presencia en el medio de la proteína conjugada, antígeno o anticuerpo respectivamente, que actuará como punto de anclaje entre los diferentes complejos poliméricos.

Estos últimos fenómenos quedan reflejados en la Figura V.1.

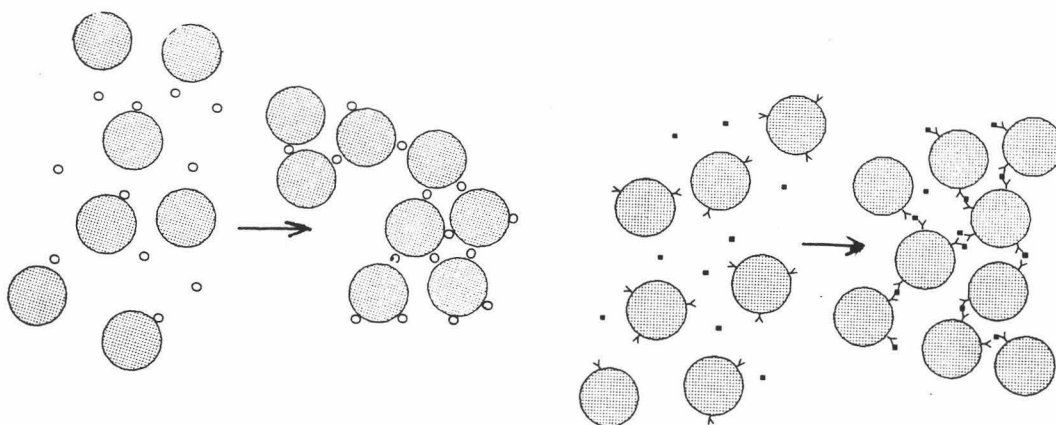


Fig. V.1. a) Agregación por puenteo. b) Inmuno aglutinación.

## **CAPÍTULO V**

---

Si nuestro objetivo se centra en desarrollar un test de inmunodiagnóstico, con el que cuantificar la presencia de un determinado antígeno, basado en la agregación del complejo látex-anticuerpo, es necesario buscar un método físico que permita detectar la extensión con que se ha producido la aglutinación. La indicación más clara o intuitiva de que un sistema coloidal ha perdido su estabilidad viene dada por la presencia de un precipitado observable a simple vista. Este método ha sido, y es aún, ampliamente utilizado en tests de aglutinación realizados en tubos de ensayo o en placas [1-3]. En tales experiencias, lo que se identifica es la dilución más alta de una muestra que contiene un determinado antígeno a una concentración desconocida, que aún es capaz de originar un precipitado visible. A través de un calibrado realizado con disoluciones de antígeno a concentraciones conocidas, uno puede determinar la concentración inicial de agente aglutinante (antígeno) de la muestra problema. Sin embargo, esta detección "a visu" tiene varias deficiencias: a) la observación visual de la reacción de aglutinación sólo es posible si se usan concentraciones elevadas de partículas y de agente aglutinante, de forma que puedan originar agregados de dimensión macroscópica; b) además, la presencia del precipitado está mal definida y su magnitud o extensión está influenciada por la subjetividad del experimentador. Esto reduce drásticamente la sensibilidad de los inmunoensayos realizados en placa o en tubo.

Para aumentar esta sensibilidad y disminuir el límite de detección en la determinación de un compuesto haciendo uso de la aglutinación de partículas, podemos recurrir al empleo de instrumentos ópticos, tales como los espectrofotómetros y los nefelómetros, que cuantifican la variación de la intensidad de luz dispersada por un sistema, inicialmente monodisperso, a medida que éste comienza a flocular.

Por ello merece la pena detenernos en comentar ciertos aspectos teóricos de la interacción de la luz con una partícula o con un conjunto de partículas.

### **V.2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA DISPERSIÓN DE LUZ.**

Desde hace tiempo siempre ha habido un especial interés en desarrollar una teoría que describa la interacción de la luz con pequeñas partículas. La idea de que el color azul del cielo se debía a una "reflexión" de la luz solar en las partículas contenidas en el aire, fue ya formulada por el científico árabe Alhazen de Basra durante los comienzos del siglo XI. Hasta finales del siglo XIX, han sido muchos los investigadores que han realizado distintas experiencias y descrito diferentes fenómenos cuando iluminaban vapor de agua, humo de tabaco o ciertos aerosoles. Entre ellos podemos destacar a Da Vinci (1500), Newton (1706), Arago (1811), Brücke (1853), Govi (1860) y Tyndall (1869). Todos sus trabajos despertaron

## INTERACCIÓN LUZ - PARTÍCULA

la curiosidad de Lord Rayleigh (1871), quien intentó explicar el color del cielo basándose, inicialmente, en el análisis dimensional. Ya que era lógico pensar que la intensidad de la luz dispersada por un conjunto de partículas debe ser proporcional a la intensidad de la radiación incidente, Rayleigh supuso que esta proporcionalidad vendría dada en función de ciertas variables como son: el volumen de la partícula dispersora ( $V$ ), la distancia al punto de observación ( $r$ ), la longitud de onda ( $\lambda$ ) y los índices de refracción de la partícula ( $n_1$ ) y del medio ( $n_2$ ). Luego  $I = f(V, r, \lambda, n_1, n_2) I_0$ , siendo la función desconocida  $f(V, r, \lambda, n_1, n_2)$ , obligatoriamente adimensional. Ya que la radiación es dispersada en todas las direcciones del espacio, la intensidad debe disminuir de la forma  $r^{-2}$ . También supuso que la radiación electromagnética interactuaba con la partícula convirtiéndola en un dipolo capaz de crear otro campo eléctrico. La intensidad de la radiación dispersada es proporcional al cuadrado de este campo, el cual depende del momento dipolar y éste, a su vez, del volumen de la partícula. Por tanto, la intensidad de la luz dispersada variará de la forma que lo hace  $V^2$ . Por último, ya que  $n_1$  y  $n_2$  son adimensionales, la dependencia de la intensidad con la longitud de onda vendrá dada por:

$$I = f'(n_1, n_2) \left( \frac{V^2}{r^2 \lambda^4} \right) I_0 \quad (\text{V.1})$$

Esta dependencia con la inversa de la cuarta potencia de la longitud de onda es la responsable del color característico del cielo, puesto que el extremo azul del espectro visible es el dispersado con más intensidad.

Estos simples argumentos fueron posteriormente objeto de un estudio más riguroso, que dio lugar a lo que hoy se conoce como la teoría de Rayleigh de dispersión de luz.

### Teoría de Rayleigh.

Supongamos que la partícula dispersora es una molécula esférica iluminada por un haz de luz cuya longitud de onda es muy distinta a la de cualquier banda de absorción de la partícula. Según la descripción clásica de la radiación, ésta se comporta como un campo electromagnético variable sinusoidalmente. Este campo producirá una oscilación sinusoidal de los electrones de la partícula con respecto a los núcleos, además de orientar parcialmente cualquier dipolo permanente que pudiera presentar la molécula. Estas cargas oscilantes hacen que la partícula se comporte como una pequeña antena, que dispersará parte de la

## CAPÍTULO V

energía en todas las direcciones posibles. La premisa básica de esta teoría más elemental es que la partícula debe ser pequeña comparada con la longitud de onda para que el campo eléctrico instantáneo al que está sometida sea uniforme sobre toda la molécula.

Imaginemos que la radiación incidente, de longitud de onda  $\lambda$ , está dirigida a lo largo del eje  $x$  y está polarizada con el vector eléctrico en la dirección del eje  $z$ , tal y como se representa en la Figura V.2.

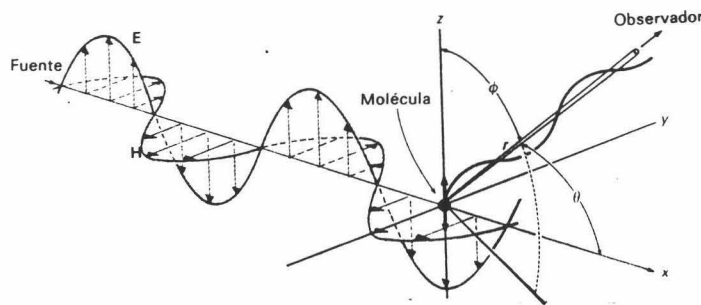


Fig V.2. Dispersión de radiación de una partícula en la dirección "r".

La radiación incidente puede describirse en términos de campo eléctrico (E) y el campo magnético perpendicular (H).

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu \left( t - \frac{x}{c} \right) \quad (\text{V.2})$$

$$H = H_0 \cos 2\pi\nu \left( t - \frac{x}{c} \right) \quad (\text{V.3})$$

Para esta discusión, sólo es importante el campo eléctrico. Si consideramos que la molécula está en el origen de ordenadas, el campo eléctrico que actúa sobre ella variará con el tiempo de la forma:

## INTERACCIÓN LUZ - PARTÍCULA

$$E = E_0 \cos 2\pi \nu t \quad (\text{V.4})$$

Como comentamos anteriormente, todas las moléculas son polarizables y, por tanto, este campo eléctrico producirá un momento dipolar oscilante (P) orientado de forma paralela a este campo, cuyo valor es

$$P = 4\pi\epsilon_0\alpha'E \quad (\text{V.5})$$

donde  $\alpha'$  es la polarizabilidad de la partícula, definida como  $\alpha' = a^3 [(\epsilon_1 - \epsilon_0) / (\epsilon_1 + 2\epsilon_0)]$ , siendo  $a$  el radio de la esfera;  $\epsilon_1$  y  $\epsilon_0$  son las permitividades eléctricas de la esfera y del medio externo respectivamente.

El dipolo oscilará armónicamente en la dirección del eje z, ya que está sincronizado con el campo externo, actuando como una fuente de radiación.

$$P = 4\pi\epsilon_0 a^3 \left( \frac{\epsilon_1 - \epsilon_0}{\epsilon_1 + 2\epsilon_0} \right) E_0 \cos 2\pi \nu t \quad (\text{V.6})$$

El campo eléctrico producido por un dipolo oscilante, a una distancia  $r$  del dipolo y a un ángulo  $\Psi$  con respecto a la dirección de polarización (el eje z), viene dado por la teoría electromagnética [4].

$$E_r = \left[ \frac{4\pi^2 a^3 E_0 \sin\Psi}{r \lambda^2} \left( \frac{\epsilon_1 - \epsilon_0}{\epsilon_1 + 2\epsilon_0} \right) \right] \cos 2\pi \nu \left( t - \frac{r}{c} \right) \quad (\text{V.7})$$

Sólo el término entre corchetes de la anterior ecuación es la parte que nos interesa, ya que representa la amplitud de la onda dispersada. La intensidad de la radiación, o lo que es lo mismo, el flujo de energía por centímetro cuadrado, depende del cuadrado de esta amplitud. Si comparamos la intensidad ( $I$ ) de la radiación dispersada, con la intensidad ( $I_0$ ) de la incidente, que será proporcional al cuadrado de su amplitud ( $E_0$ ), quedará:

## CAPÍTULO V

---

$$\frac{I}{I_0} = \frac{16\pi^4 a^6}{r^2 \lambda^4} \left( \frac{\epsilon_1 - \epsilon_0}{\epsilon_1 + 2\epsilon_0} \right)^2 \text{sen}^2 \Psi \quad (\text{V.8})$$

o bien

$$\frac{I}{I_0} = \frac{16\pi^4 a^6}{r^2 \lambda^4} \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \text{sen}^2 \Psi \quad (\text{V.9})$$

donde  $n$  es el índice de refracción de la partícula con relación al medio ( $n = n_1/n_0$ ) y  $\lambda$  es la longitud de onda en el medio ( $\lambda = \lambda_0/n_0$ ).

Hay dos casos especiales:

I) Si la dispersión se produce en el plano  $xy$ , donde  $\Psi = 90^\circ$ , entonces

$$\frac{I_I}{I_0} = \frac{16\pi^4 a^6}{r^2 \lambda^4} \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \quad (\text{V.10})$$

II) Si la dispersión se produce en el plano  $yz$ , paralelo a la polarización, entonces se puede demostrar, haciendo uso de la trigonometría, que

$$\frac{I_{II}}{I_0} = \frac{16\pi^4 a^6}{r^2 \lambda^4} \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \cos^2 \theta \quad (\text{V.11})$$

siendo  $\theta = \pi/2 - \Psi$ .

Estos dos casos extremos nos van a permitir calcular la distribución angular de la dispersión de la luz causada por una partícula cuando la radiación incidente no es polarizada. Una onda no polarizada puede descomponerse linealmente en dos polarizadas, una paralela y otra perpendicular al plano de dispersión. En este caso



## INTERACCIÓN LUZ - PARTÍCULA

$$\frac{I_{NP}}{I_0} = \frac{I_I + I_{II}}{2I_0} = \frac{8\pi^4 a^6}{r^2 \lambda^4} \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 (1 + \cos^2 \theta) \quad (\text{V.12})$$

Todos estos casos están representados en la Figura V.3.

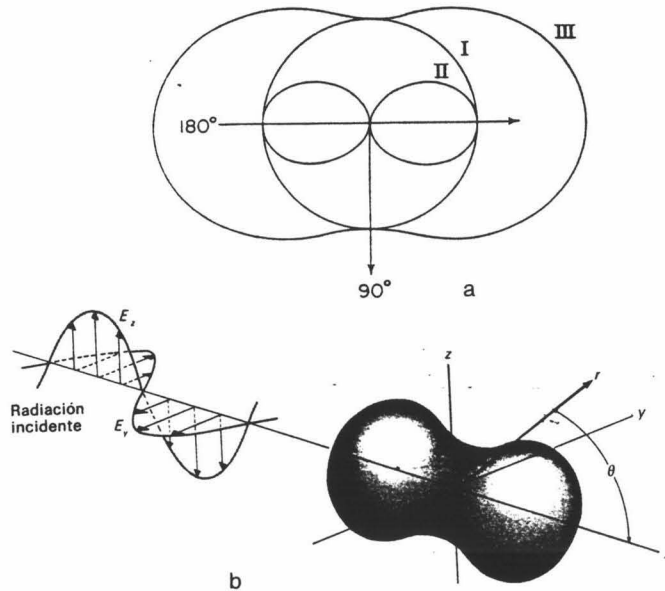


Fig. V.3. Distribución angular de la luz dispersada por un dispersor tipo Rayleigh. a) Luz incidente polarizada de modo perpendicular al plano de observación (I), y paralela al mismo (II); b) luz no polarizada.

Como todo nuestro trabajo experimental se ha realizado con luz polarizada y el plano de dispersión empleado ha sido perpendicular a la polarización, sólo haremos uso de la ecuación V.10, y ya que estamos considerando que el dispersor es esférico, con un volumen  $V = 4/3 \pi a^3$  tendremos

$$\frac{I}{I_0} = \frac{9\pi^2 V^2}{2r^2 \lambda^4} \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \quad (\text{V.13})$$

## CAPÍTULO V

Y si en vez de tener una única partícula dispersora tenemos  $N$  moléculas por centímetro cúbico distribuidas de forma aleatoria, tendremos que la intensidad dispersada por unidad de volumen del medio ( $i$ ) será la suma del efecto causado por cada partícula individual.

$$\frac{i}{I_0} = \frac{NI}{I_0} = \frac{9\pi^2 NV^2}{2r^2 \lambda^4} \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \quad (\text{V.14})$$

La medida de la intensidad dispersada por un sistema de partículas durante un proceso de agregación puede ser un método muy sensible para el seguimiento y estudio del mismo. Aunque la intensidad disminuye linealmente a medida que varía el número de dispersores ( $N$ ), el volumen de los mismos aumenta durante la aglutinación. Esto se traduce en un aumento lineal de la intensidad dispersada con el número de monómeros ( $m$ ) que forman el agregado. Si comparamos las intensidades antes ( $i_2$ ) y después ( $i_1$ ) de la aglutinación, se puede ver sin dificultad que  $i_2 = m i_1$ .

Encontraremos más aplicaciones prácticas de esta teoría si hacemos algunos cambios en la ecuación V.14. Así, sustituyendo el volumen por  $V = M/N_{Av}\rho$ , (siendo  $M$  el peso molecular,  $N_{Av}$  el número de Avogadro y  $\rho$  su densidad) y sabiendo que  $M/N_{Av} = C/N$ , donde  $C$  es la concentración en  $\text{gr/cm}^3$  y  $N$  es el número de partículas por  $\text{cm}^3$ , entonces tendremos

$$\frac{i}{I_0} = \frac{9\pi^2 NM^2}{2r^2 \lambda^4 N_{Av}^2 \rho^2} \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 = \frac{9\pi^2}{2r^2 \lambda^4 N_{Av} \rho^2} \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 CM \quad (\text{V.15})$$

ecuación que relaciona la intensidad dispersada con la concentración y el peso molecular de las partículas.

Para dispersores cuyo índice de refracción relativo ( $n$ ) es cercano a la unidad, podemos realizar una serie de aproximaciones [5,6] que conducen a que la anterior ecuación quede de la forma

$$\frac{i}{I_0} = \frac{2\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2}{r^2 \lambda_0^4 N_{Av}} CM \quad (\text{V.16})$$

## INTERACCIÓN LUZ - PARTÍCULA

La principal novedad que introduce esta teoría es que considera este efecto de interferencia a través de una función llamada  $P(\theta)$ , dependiente del ángulo de medida, que es igual a la razón entre la intensidad de luz dispersada con un ángulo  $\theta$  partido por la que se observaría si la partícula tuviera el mismo peso molecular pero dimensiones muy pequeñas comparadas con  $\lambda$ . O lo que es lo mismo

$$R_{\theta(\text{part. real})} = P(\theta) \times R_{\theta(\text{misma part. mostrando dispersión Rayleigh})} \quad (\text{V.22})$$

La función  $P(\theta)$  para cualquier agregado resulta ser [6]

$$P(\theta) = \frac{1}{N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{\text{sen } h R_{ij}}{h R_{ij}} \quad (\text{V.23})$$

donde  $N$  es el número de centros dispersantes dentro de la partícula,  $R_{ij}$  es la distancia entre cada par de centros  $i$  y  $j$ , y  $h$  viene dado por

$$h = \frac{4\pi}{\lambda} \text{sen} \frac{\theta}{2} \quad (\text{V.24})$$

En los casos límites se puede ver que para  $h \rightarrow 0$  o  $R_{ij} \rightarrow 0$  tenemos que  $P(\theta) \rightarrow 1$ . Por tanto, para ángulos muy pequeños, la partícula dispersora se comportará como un dispersor Rayleigh. A ángulos mayores que cero,  $P(\theta)$  será siempre menor que la unidad. La Figura 5 muestra la dependencia de dicha función con el ángulo.

Aunque parezca que este efecto del tamaño puede ser una complicación molesta, nos permite determinar las dimensiones de las partículas a partir de las medidas de la dispersión de luz. Para partículas no muy grandes, cuyo tamaño no sea superior a  $\lambda$ , podemos relacionar la función  $P(\theta)$  con el radio de giro ( $R_G$ ) del dispersor a través de la siguiente relación

$$P(\theta) = 1 - \frac{16 \pi^2 R_G^2}{3 \lambda^2} \text{sen}^2 \frac{\theta}{2} + \dots \quad (\text{V.25})$$

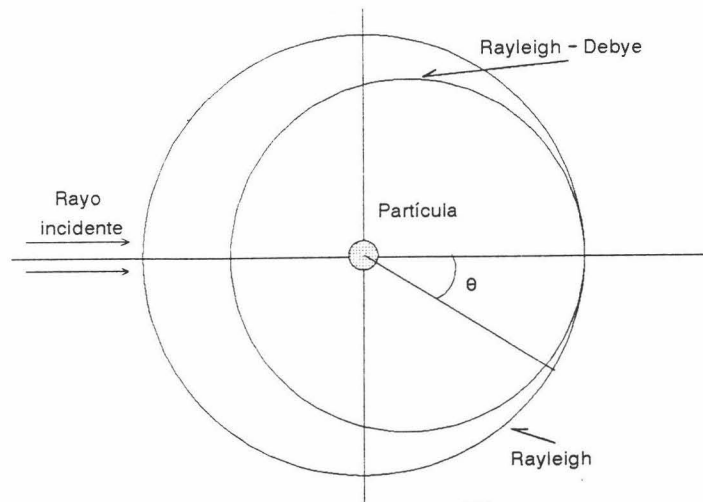


Fig. V.5. Distribución angular, en el plano perpendicular a la polarización de la luz, para un dispersor Rayleigh y uno Rayleigh-Debye.

Teniendo en cuenta las ecuaciones V.21 y V.22 nos quedará

$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{P(\theta)} \left[ \frac{1}{M} + 2BC \right] \approx \frac{1}{1 - \frac{16 \pi^2 R_G^2}{3 \lambda^2} \text{sen}^2 \frac{\theta}{2}} \left[ \frac{1}{M} + 2BC \right] \quad (\text{V.26})$$

que también puede escribirse como

$$\frac{KC}{R_\theta} \approx \left[ 1 + \frac{16 \pi^2 R_G^2}{3 \lambda^2} \text{sen}^2 \frac{\theta}{2} \right] \left[ \frac{1}{M} + 2BC \right] \quad (\text{V.27})$$

Como vemos, la dispersión producida por una disolución real de macromoléculas grandes depende al mismo tiempo de la concentración del soluto, de su peso molecular y del ángulo. Por ello si realizamos medidas de dispersión de una muestra problema a diferentes

## INTERACCIÓN LUZ - PARTÍCULA

concentraciones y ángulos, podemos obtener, a través de un método gráfico ideado por Zimm [8], datos tan importantes como son  $M$ ,  $R_G$  para las partículas y el coeficiente  $B$  para la disolución.

Sin embargo, esta teoría tiene sus limitaciones: sólo es aplicable a partículas con  $n$  próximo a 1 y de tamaño igual o inferior a la longitud de onda empleada.

### Teoría de Mie

La solución exacta del problema de la dispersión de luz producida por una esfera de tamaño arbitrario viene dada por la llamada teoría de Mie. A pesar de que esta teoría rigurosa se publicó en 1908, su aplicación práctica se retrasó debido, en gran parte, al trabajo necesario para encontrar soluciones numéricas a las ecuaciones de Mie y, en segundo lugar, a que en aquella época había un escaso número de coloides que satisficieran las restricciones de la teoría: forma esférica, homogeneidad de la partícula y uniformidad de tamaño.

Aunque Mie elaborase la teoría referenciando sólo a Thomson (1893), Rayleigh y Lorenz (1898), hubo otros investigadores que le dieron un gran avance al estudio de la dispersión de la luz. Entre ellos el más destacable fue Debye, que llegó a las mismas expresiones matemáticas en 1909, utilizando una función potencial (potencial de Debye) derivada de un vector de Hertz, mientras que Mie la desarrolló a partir de los componentes de los vectores del campo eléctrico y magnético de la luz.

Consideremos una partícula cuyo tamaño es lo suficientemente grande como para que podamos subdividirla en pequeñas regiones. En cada región el campo eléctrico incidente inducirá un momento dipolar, tal y como vimos en el apartado anterior. El campo total difundido en una dirección particular será la superposición de los campos procedentes de todos los dipolos. El campo, y por tanto la intensidad, en el punto de observación será función de las diferencias de fase entre los campos individuales. Si cambiamos la dirección del punto de observación ( $P$ ), estas diferencias de fase variarán, con lo que podremos esperar una distribución de máximos y mínimos de intensidad con la dirección de  $P$ . También es comprensible que la forma de la partícula altere esta distribución de la intensidad.

No creemos necesario plasmar aquí la larga demostración matemática de esta teoría [5,9] y sólo recurriremos a las fórmulas prácticas. En nuestro caso, la intensidad dispersada por una esfera de cualquier tamaño y cualquier  $n$  diferente de la unidad, en el plano perpendicular al plano de polarización de la luz incidente viene dada por

## CAPÍTULO V

$$I = \frac{\lambda^2}{4 \pi^2 r^2} |S_1| \text{sen}^2 \phi = \frac{\lambda^2}{4 \pi^2 r^2} i_1 \text{sen}^2 \phi \quad (\text{V.28})$$

donde  $i_1 = |S_1|$  es una función de la intensidad cuya expresión es

$$S_1 = \sum_{m=1}^{\infty} \frac{2m+1}{m(m+1)} [a_m \pi_m(\cos \theta) + b_m \tau_m(\cos \theta)] (-1)^{m+1} \quad (\text{V.29})$$

siendo las funciones angulares

$$\pi_m(\cos \theta) = \frac{P_m^{(1)}(\cos \theta)}{\text{sen} \theta} \quad (\text{V.30})$$

$$\tau_m(\cos \theta) = \frac{d}{d\theta} P_m^{(1)}(\cos \theta) \quad (\text{V.31})$$

donde  $P_m^{(1)}(\cos \theta)$  son los polinomios asociados de Legendre de 1ª clase. Los ángulos  $\phi$  y  $\theta$  vienen definidos por las coordenadas polares  $r, \theta$  y  $\phi$  que se representan en la Figura V.6

Las funciones  $a_m$  y  $b_m$  de la ecuación V.29 están definidas por las expresiones

$$a_m = \frac{\Psi_m(\alpha) \Psi_m'(\beta) - m \Psi_m(\beta) \Psi_m'(\alpha)}{\zeta_m(\alpha) \Psi_m'(\beta) - m \Psi_m(\beta) \zeta_m'(\alpha)} \quad (\text{V.32})$$

$$b_m = \frac{m \Psi_m(\alpha) \Psi_m'(\beta) - \Psi_m(\beta) \Psi_m'(\alpha)}{m \zeta_m(\alpha) \Psi_m'(\beta) - \Psi_m(\beta) \zeta_m'(\alpha)} \quad (\text{V.33})$$

donde  $\Psi_m$  es la función matemática de Ricatti-Bessel y  $\zeta_m$  son las llamadas funciones de Hankel, que imponen la condición de que la onda dispersada debe desaparecer o

## INTERACCIÓN LUZ - PARTÍCULA

desvanecerse a una distancia "r" infinita. Las funciones  $\Psi_m'$  y  $\zeta_m'$  son las derivadas de las anteriores. Todas estas funciones surgen al solucionar la ecuación de ondas en la que se basa esta teoría. Las variables adimensionales  $\alpha$  y  $\beta$  son  $\alpha = 2\pi a/\lambda$  y  $\beta = n\alpha$ .

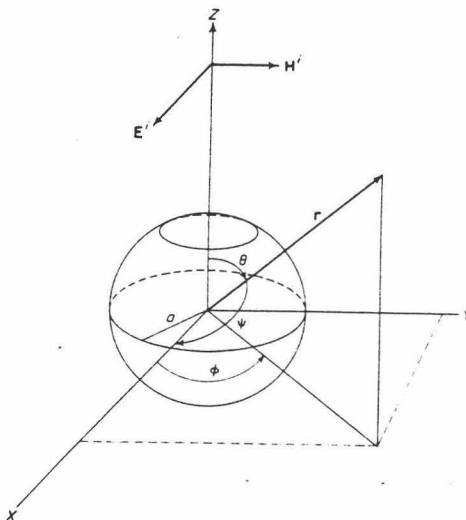


Fig. V.6. Representación polar de la dispersión de luz en la dirección  $r$ . El rayo incidente está dirigido en el sentido positivo del eje  $z$

De todas estas expresiones quizás lo más importante sea ver la representación gráfica de la ecuación V.28 para así tener una idea clara de la distribución de la intensidad dispersada con respecto al ángulo de medida. Esto lo podemos observar en las Figuras 7 y 8.

Las Figuras 7(a) y 7(b) muestran la fuerte dependencia del "scattering" de luz con el tamaño del dispersor, con el índice de refracción y con el ángulo, mientras que en la Figura 8 podemos observar cómo a medida que aumenta el tamaño, la intensidad de la luz dispersada hacia ángulos cercanos a cero se dispara a la vez que disminuye enormemente la difundida hacia atrás.

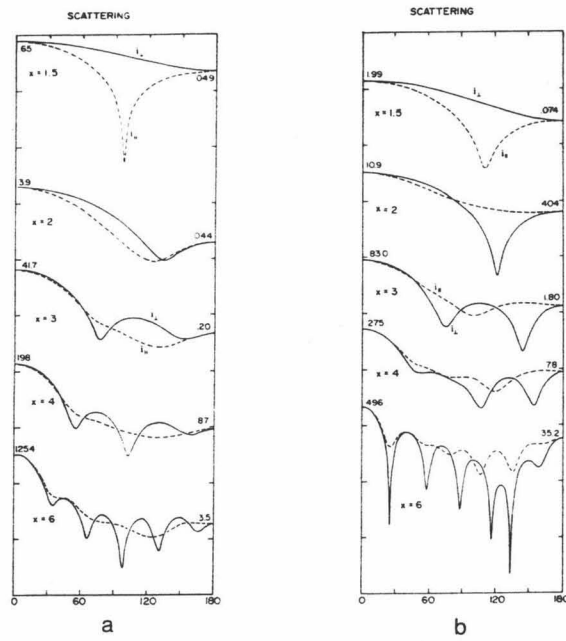


Fig. 7. Distribución angular de la intensidad dispersada por partículas de diferentes tamaños para (a)  $n = 1.33$  y (b)  $n = 1.55$ .

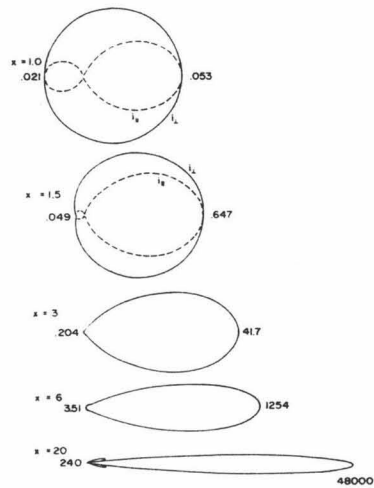


Fig. 8. Distribución, en representación polar, de la intensidad dispersada por partículas de diferente tamaño y  $n = 1.33$ .



## INTERACCIÓN LUZ - PARTÍCULA

Antes de pasar a ver las aplicaciones prácticas de la dispersión de luz, definiremos algunos parámetros de interés:

- El primero ya lo hemos nombrado anteriormente; es el parámetro adimensional de tamaño  $\alpha$ , que nos compara el perímetro externo de la partícula esférica con la longitud de onda.

$$\alpha = \frac{2 \pi a}{\lambda} \quad (\text{V.34})$$

- Otro parámetro es la sección transversal de scattering  $C_{sca}$  o energía total dispersada en todas las direcciones, que será igual a la integral de superficie de una esfera de radio  $r$ .

$$C_{sca} = \int_0^\pi \int_0^{2\pi} I r^2 \sin\theta \, d\theta \, d\phi \quad (\text{V.35})$$

Para un dispersor Rayleigh su expresión es

$$C_{sca} = \frac{24 \pi^3 V^2}{\lambda^4} \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \quad (\text{V.36})$$

y para un dispersor tipo Mie

$$C_{sca} = \left( \frac{\lambda^2}{2 \pi} \right) \sum_{m=1}^{\infty} (2m+1) [(a_m)^2 + (b_m)^2] \quad (\text{V.37})$$

- El factor de eficiencia  $Q_{sca}$ , que es igual a la razón entre la sección transversal de scattering y la sección transversal geométrica de la partícula. Para una esfera

$$Q_{sca} = \frac{C_{sca}}{\pi a^2} \quad (\text{V.38})$$

- Si tenemos un medio con  $N$  dispersores por centímetro cúbico, la atenuación del rayo incidente con la distancia, como consecuencia de la dispersión, será

$$-\frac{dI}{dx} = NC_{sca} I \quad (\text{V.39})$$

con lo que la transmitancia, definida como la razón entre la intensidad de la luz que abandona una dispersión de paso óptico  $l$  y la intensidad del haz incidente, será

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-NC_{sca}l} = e^{-\tau} \quad (\text{V.40})$$

donde  $\tau = N C_{sca}l$  es la turbidez de la disolución.

### V.3. APLICACIONES A FLUIDOS COLOIDALES.

De entre las numerosas aplicaciones que tiene la dispersión de luz de un conjunto de partículas, hemos intentado, con más o menos acierto, obtener cierta información de los sistemas con los que hemos trabajado. Con tal fin, se ha empleado el dispositivo comercial System 4700c (Malvern Instruments), el cual se describe con detalle en el Apéndice 2 de esta memoria. Este equipo permite obtener información a través de dos técnicas bien diferentes:

- haciendo uso de la *dispersión cuasielástica (o dinámica) de luz*, técnica que también se conoce como espectroscopía de fotocorrelación (PCS)
- o bien, a través de la *dispersión estática de luz*, cuyo fundamento teórico es el que se ha descrito en el apartado anterior.

De la primera se puede obtener, de forma muy fiable y precisa, el coeficiente de difusión (D) de las partículas. Si se consideran esféricas y conociendo la viscosidad ( $\eta$ ) del disolvente a la temperatura de medida, podremos determinar el tamaño de las mismas aplicando la relación de Stokes-Einstein:  $D = RT/(N_{Av}6\pi\eta a)$ .

Todas nuestras experiencias han sido realizadas usando como disolvente agua bifiltrada para evitar la presencia de cualquier partícula extraña que pudiera actuar como dispersor. Los por filtros empleados han sido de la casa Nucleopore, con un tamaño de poro de 100 nm.

La partícula más pequeña con la que se ha trabajado ha sido el fragmento proteico F(ab')<sub>2</sub>. Su tamaño, determinado por difracción de rayos X, es de 142Å x 38Å x 38Å [10]; por tanto, su volumen es el mismo que el de una esfera de 7.3 nm de diámetro. Por PCS se ha obtenido un valor de diámetro de 7.2 ± 1.7 nm, media calculada a partir de 50 medidas de

## INTERACCIÓN LUZ - PARTÍCULA

4 minutos cada una, a diferentes ángulos y concentraciones de proteína.

Por tanto, esta molécula debería actuar como un dispersor Rayleigh puro, ya que para la longitud de onda empleada ( $\lambda = \lambda_0/n_0 = 365 \text{ nm}$ ) se cumple que  $a \leq 0.05\lambda$ . De hecho, Sittampalam y col. [11,12] han realizado un estudio de inmunoprecipitación de moléculas de IgG de cabra anti IgG humana, usando estas últimas como antígeno. Estos autores siguen la cinética de la unión antígeno-anticuerpo midiendo el cambio de la intensidad de luz dispersada, a medida que los complejos iniciales se agregan para formar especies moleculares de mayor tamaño y peso molecular. En su trabajo, concluyen que los agregados menores a 50 moléculas de IgG ( $M = 8.0 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$ ) se comportan como dispersores Rayleigh puros. El intervalo que va desde 100 a 1000 IgGs por agregado es una región de transición que precede a la de Rayleigh-Debye, que va desde 2000 a 25000 unidades de IgG, y a la de Mie, a partir de 62000 IgGs. Por tanto la distribución angular de la intensidad dispersada por una disolución de  $F(ab')_2$ , en el plano perpendicular al de polarización de la luz, debería ser uniforme e independiente del ángulo (ecuación V.16). Nuestros resultados experimentales se muestran en la figura V.9

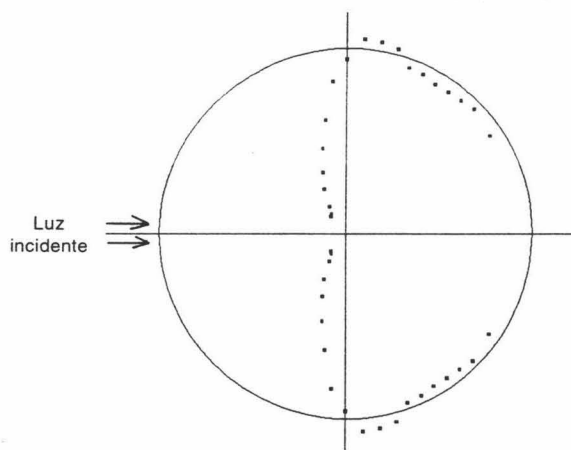


Fig. V.9. Distribución de la intensidad de luz dispersada por una disolución de  $F(ab')_2$ . Teoría: línea continua. Datos experimentales: puntos.

Teoría y experimentación coinciden para ángulos inferiores a  $90^\circ$  (forward scattering). Sin embargo, se obtiene una disminución muy acusada de la luz dispersada hacia ángulos

## CAPÍTULO V

mayores (back scattering). Esto puede deberse a una mala alineación del fotomultiplicador del equipo de medida, ya que, incluso para un blanco con agua, existen ángulos en los que se dispersa luz debido a reflejos internos del haz dentro del baño de termostatación.

Se realizaron medidas de la intensidad de luz dispersada a 4 ángulos distintos para 6 diferentes concentraciones de  $F(ab')_2$  y, aplicando la ecuación V.21, poder calcular el peso molecular  $M$  y el coeficiente del virial  $B$ , que nos dirá si la proteína se encuentra en un disolvente ideal ( $B = 0$ ), en un buen disolvente ( $B > 0$ ) donde predominan las interacciones soluto  $\leftrightarrow$  disolvente, o en un mal disolvente ( $B < 0$ ) donde predominarían las interacciones soluto  $\leftrightarrow$  soluto y disolvente  $\leftrightarrow$  disolvente [6]. Para cuantificar esas magnitudes se debería conocer la distancia de la célula al fotomultiplicador ( $r$ ) y el rendimiento del mismo para poder hallar  $i$  (ver ecuación V.17). Por desgracia, estos datos han estado fuera de nuestro alcance. Aun así se realizó el cálculo considerando  $r = 30$  cm y el rendimiento en la captación de fotones lo hemos situado en el 100%. El valor empleado para  $(dn/dc)$  fue 0.2079 ml/g, calculado por Flaming y col. [13];  $I_0$  y  $\lambda$  fueron datos suministrados por el propio dispositivo de medida; para el agua a 25°C  $n_0 = 1.337$ . La representación de  $KC/R_0$  frente a la concentración  $C$  se muestra en la Figura V.10.

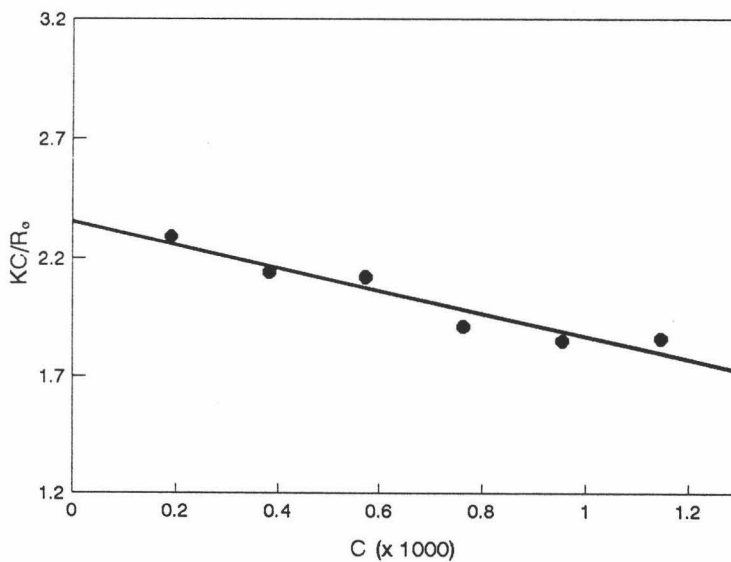


Fig. V.10. Dependencia de  $KC/R_0$  frente a la concentración de  $F(ab')_2$

En nuestro caso lo único que puede conocerse es que  $B < 0$ , resultado que también obtienen Sittampalam y Wilson [11].

## INTERACCIÓN LUZ - PARTÍCULA

También se calcularon las distribuciones angulares de las partículas de látex, que se hallan representadas en las Figuras V.11-15.

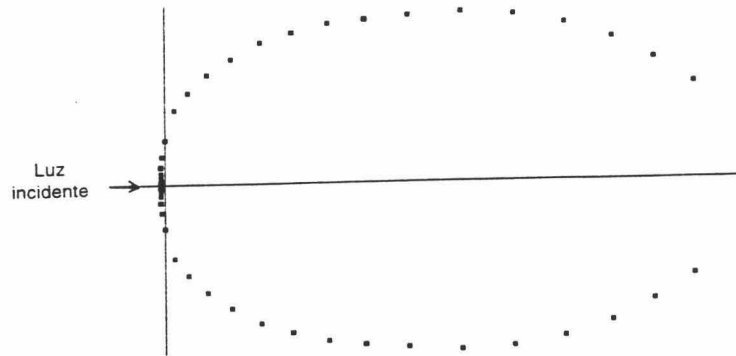


Fig. V.11. Distribución angular, en coordenadas polares, de la intensidad de luz dispersada por el látex JL1.  
Diámetro = 186 nm.  $\alpha = 1.6$ .

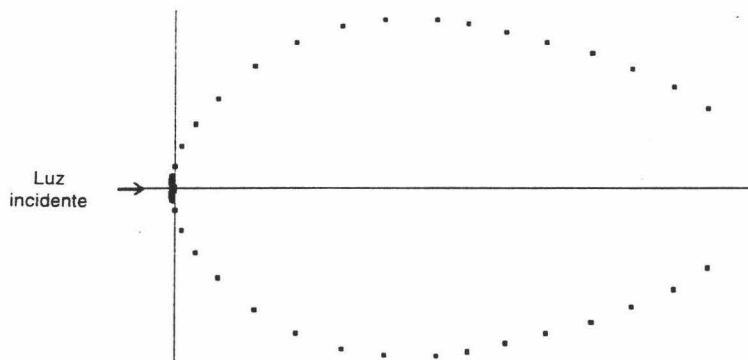


Fig. V.12. Distribución angular, en coordenadas polares, de la intensidad de luz dispersada por el complejo JL8-F(ab')<sub>2</sub>. Diámetro = 200 nm.  $\alpha = 1.7$ .

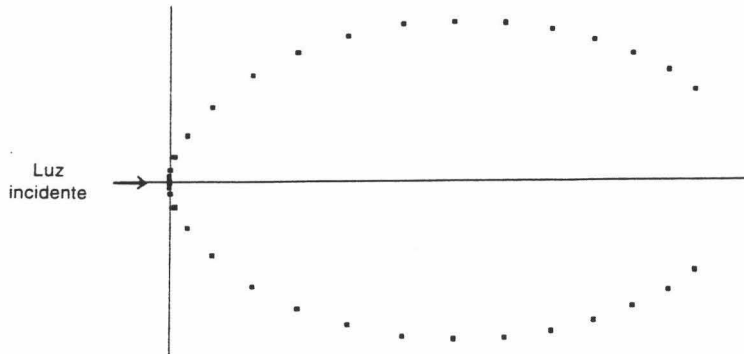


Fig. V.13. Distribución angular, en coordenadas polares, de la intensidad de luz dispersada por el látex JL3.  
Diámetro = 276 nm.  $\alpha = 2.4$ .

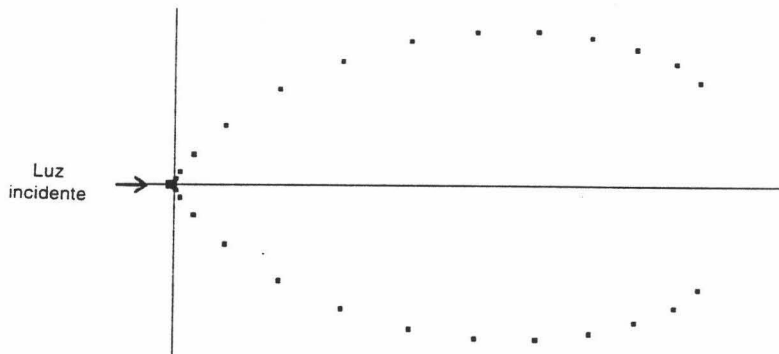


Fig. V.14. Distribución angular, en coordenadas polares, de la intensidad de luz dispersada por el látex JL7.  
Diámetro = 336 nm.  $\alpha = 2.9$ .

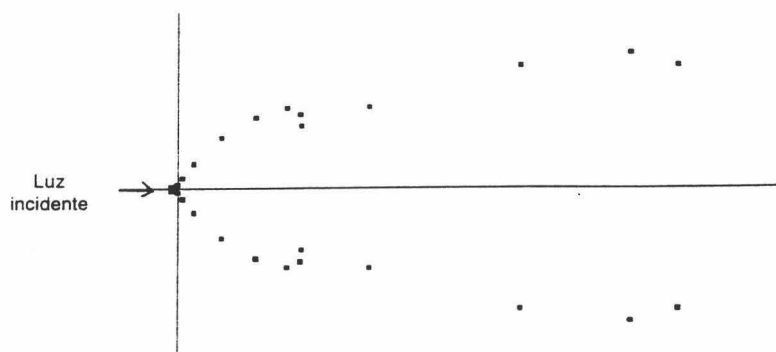


Fig. V.15. Distribución angular, en coo. Jenadas polares, de la intensidad de luz dispersada por el látex JL10.  
Diámetro = 636 nm.  $\alpha = 5.5$ .

Vemos como a medida que aumenta el tamaño de las partículas la distribución de la intensidad es cada vez más alargada, aumentando el forward scattering y disminuyendo el back scattering, tal y como predice la teoría de Mie.

Por lo general, la intensidad dispersada a un ángulo dado incrementa con el tamaño de la partícula hasta un valor de  $\alpha \approx 2$ , a partir del cual oscila de una forma complicada a medida que el tamaño del dispersor sigue aumentando. En la Figura V.16 representamos, en coordenadas cartesianas, la intensidad dispersada por los látex JL4, JL7 y JL10 frente al ángulo de medida.

En dicha figura podemos ver la aparición de un mínimo, para los dos primeros, y la existencia de dos mínimos y dos máximos para el JL10. La presencia de esos mínimos y máximos nos va a permitir calcular, por otra vía alternativa, el tamaño de nuestras microesferas, ya que su posición depende de  $n$  y de  $\alpha$ . Dandliker [14] fue el primero en demostrar que la posición angular del primer mínimo en la intensidad puede emplearse para obtener el tamaño de la partícula dispersora a través de la expresión

$$\frac{2a}{\lambda} \text{sen}\left(\frac{\theta_1}{2}\right) = k_1 \tag{V.41}$$

donde  $\theta_1$  es el ángulo donde aparece el primer mínimo y  $k_1$  es una función que depende de  $n$ . Posteriormente, Maron y col [15,16] generalizaron la anterior ecuación a

$$\frac{2a}{\lambda} \text{sen}\left(\frac{\theta_i}{2}\right) = k_i \quad \text{ó} \quad K_i \tag{V.42}$$

donde  $k_i$  es un parámetro cuyo valor depende de  $n$  y del  $i$ -ésimo mínimo de la intensidad y  $K_i$  es lo mismo para el máximo  $i$ -ésimo. De sus trabajos podemos ver que para dispersiones de poliestireno en agua, donde  $n = 1.19$ ,  $k_1 = 0.649$ ,  $K_1 = 0.827$  y  $k_2 = 1.103$ . Aplicando la anterior ecuación a nuestros sistemas, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla V.1.

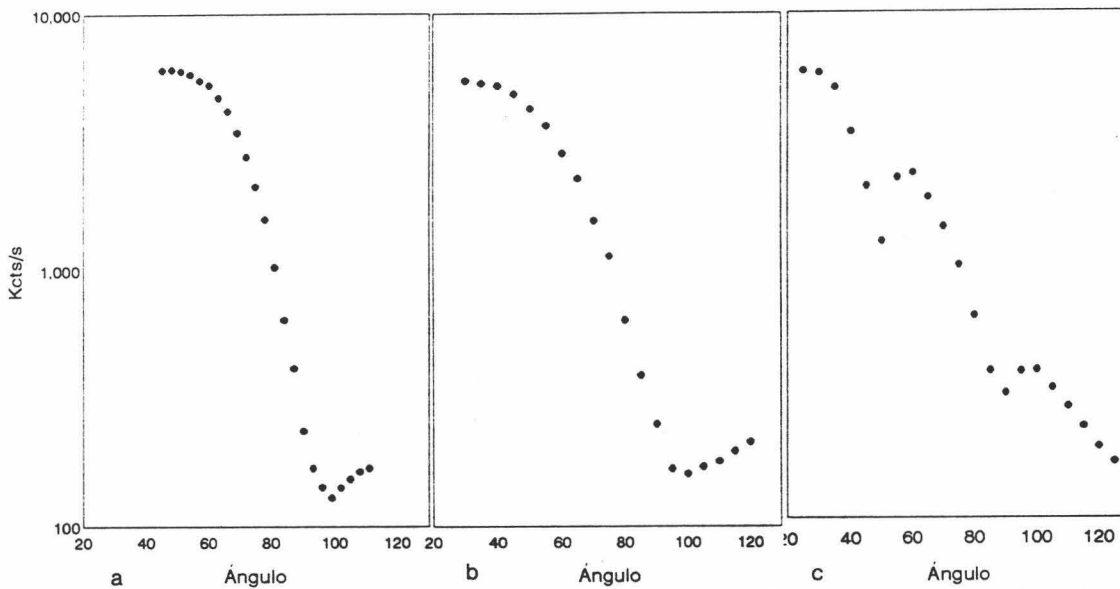


Fig. V.16. Distribución angular, en coordenadas cartesianas, de la intensidad de luz dispersada por los látex (a) JL4, (b) JL7 y (c) JL10.



## INTERACCIÓN LUZ - PARTÍCULA

Látex	PCS	TEM	1 <sup>er</sup> mínimo	1 <sup>er</sup> máximo	2 <sup>o</sup> mínimo
JL4	342	331	311 (99.0°)	--	--
JL7	342	332	309 (100.2°)	--	--
JL10	636	636	578 (48.4°)	623 (57.4°)	570 (90.0°)

Tabla V.1. Diámetro de las partículas, en nm, calculado por espectroscopía de fotocorrelación (PCS), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y aplicando la ecuación V.42. Entre paréntesis mostramos el ángulo al cual aparece el mínimo o máximo correspondiente.

A la hora de calcular estos diámetros se ha tenido en cuenta la ligera dependencia que existe entre la posición angular del mínimo (o máximo) y la concentración de partículas [15], realizándose las experiencias a varias concentraciones y extrapolando a  $C = 0$ .

Otro objetivo planteado en este trabajo fue calcular los tamaños de los látex más pequeños (JL1, JL2 y JL8) a través de un Zimm plot. Estas partículas podrían comportarse como dispersores Rayleigh-Debye, por lo que haciendo uso de la ecuación V.27 se hallaría su radio de giro. Sin embargo, y aunque se realizaron medidas usando tanto un láser de argón ( $\lambda_0 = 488$  nm) como uno de helio-neón ( $\lambda_0 = 632.8$  nm), los resultados no fueron destacables. No obstante, era necesario conocer  $n_1$  y  $(dn/dc)$  para el poliestireno, y aunque el primer dato aparece en diversas tablas, siendo su valor 1.59, no se encontró el valor de  $(dn/dc)$ . Para calcularlo se recurrió a la estrategia que a continuación se describe. En un reciente trabajo [17] se hace uso de la siguiente ecuación, obtenida por Debye y Cashin [18], para calcular el tamaño de inmunoagregados de IgG.

$$\tau = \frac{32 \pi^3 n_0^2 (dn/dc)^2 / (3 N_{Av})}{\lambda_0^4 + 4 A a^2 \lambda_0^2} CM \quad (V.43)$$

Esta ecuación es aplicable a dispersores cuyas dimensiones sean comparables o inferiores a la longitud de onda; en ella  $A$  es una constante de forma, que vale 6.056 para partículas esféricas, y  $D$  es el diámetro de las mismas. En dicho trabajo se verifica que la ecuación V.43 es válida para dispersiones de látex de diámetro igual o inferior a 210 nm si se trabaja con  $\lambda_0 \geq 350$  nm.

En nuestro caso se podría calcular  $(dn/dc)$  para los látex más pequeños, midiendo la

## CAPÍTULO V

absorbancia de la disolución frente a un barrido de longitudes de onda. Por otras técnicas, TEM o PCS, se conoce su tamaño y, haciendo uso de la densidad del poliestireno ( $1.054 \text{ g/cm}^3$ ), su peso molecular. En las Figuras V.17 - 19, aparece esta dependencia, tanto experimental como teórica, para las muestras JL1, JL2 y JL8. La relación entre la turbidez ( $\tau = \ln I_0/I$ ) y la absorbancia ( $\text{Abs} = \log I_0/I$ ) es simple:  $\tau = 2.303 \text{ Abs}$ .

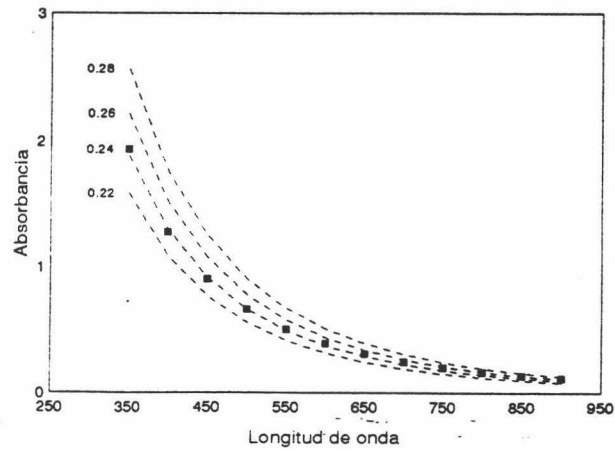


Fig. V.17. Variación de la absorbancia de una dispersión del látex JL1 frente a  $\lambda_0$ . Dependencia experimental (puntos) y teórica (líneas) para diferentes valores de  $(dn/dc)$ .

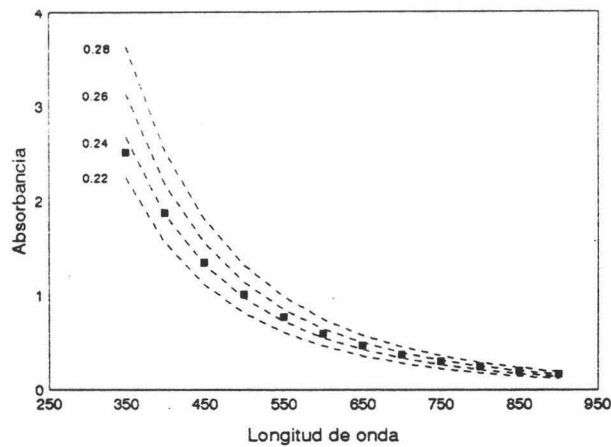


Fig. V.18. Variación de la absorbancia de una dispersión del látex JL2 frente a  $\lambda_0$ . Dependencia experimental (puntos) y teórica (líneas) para diferentes valores de  $(dn/dc)$ .

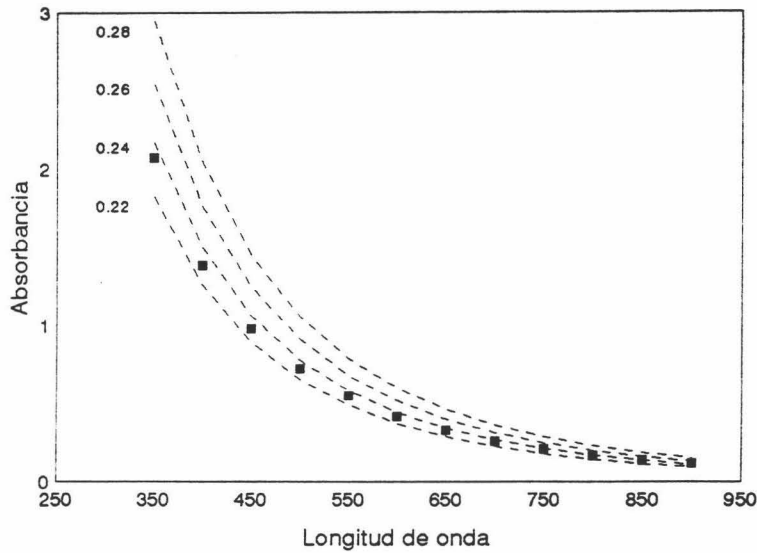


Fig. V.19. Variación de la absorbancia de una dispersión del látex JL8 frente a  $\lambda_0$ . Dependencia experimental (puntos) y teórica (líneas) para diferentes valores de  $(dn/dc)$ .

De aquí obtenemos que para disoluciones acuosas de poliestireno,  $(dn/dc)$  vale  $0.24 \text{ cm}^3/\text{g}$ .

Por último, se ideó un método para calcular el índice de refracción  $n$ , de partículas dispersoras tipo Mie ( $\alpha \gg 1$ ) cuyo índice de refracción relativo  $n$  fuera cercano a la unidad. En estos casos, el factor de eficiencia,  $Q_{sca}$ , vale [19]

$$Q_{sca} = 2 (n-1)^2 \alpha^2 \quad (\text{V.44})$$

Si se recuerdan las ecuaciones V.38, que liga  $Q_{sca}$  con la sección transversal de scattering ( $C_{sca}$ ), y V.40, que relaciona la turbidez con  $C_{sca}$ , quedará

$$\frac{\tau}{NI} = \frac{2.303 Abs}{NI} = \frac{8 \pi^3 a^4}{\lambda^2} (n-1)^2 \quad (\text{V.45})$$

Relacionando el número de partículas por  $\text{cm}^3$  con la concentración  $C$ , en gramos por  $\text{cm}^3$ ,

## CAPÍTULO V

a través de  $C = (4/3)\pi a^3 \cdot \rho \cdot N$ , la anterior ecuación quedará como

$$\frac{Abs}{C} = \frac{6 \pi^2 a l n_0^2}{\lambda_0^2 \cdot 2.303 \rho} \left[ \left( \frac{n_1}{n_0} \right) - 1 \right]^2 \quad (V.46)$$

con lo que se podrá calcular  $n_1$ , con las medidas de la absorbancia de una disolución coloidal en la que se conozcan, a priori, el radio  $a$  y la densidad  $\rho$  de las partículas. Para cumplir la condición inicial de trabajar con un dispersor Mie, se realizaron las experiencias con el látex JL7 trabajando a una longitud de onda de 400 nm ( $\alpha = 3.53$ ). Así, el valor medio del índice de refracción del poliestireno, calculado a partir de 15 medidas diferentes de  $Abs/C$ , ha sido  $n_1 = 1.586 \pm 0.003$ . En la Figura V.20 aparece esta dependencia lineal de la absorbancia con la concentración.

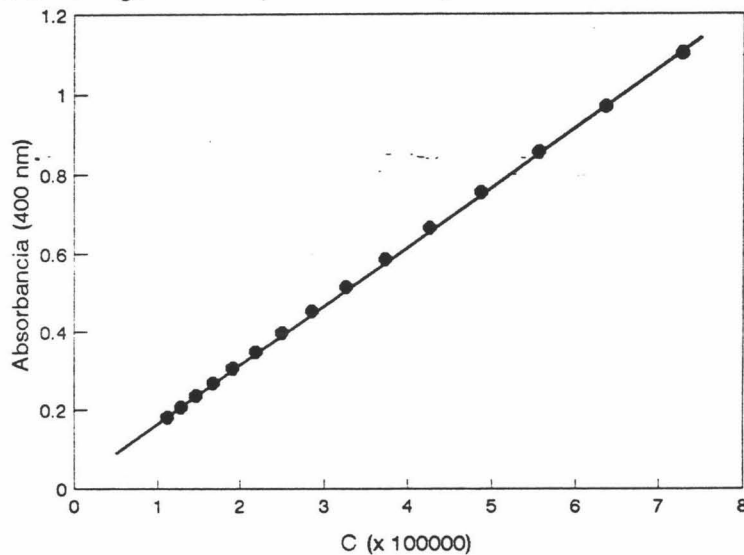


Fig. V.20 Variación de la absorbancia ( $\lambda_0 = 400$  nm) mostrada por el látex JL7 a distintas concentraciones de partículas

### V.4. ALTERNATIVAS PARA EL SEGUIMIENTO ÓPTICO DE LA AGLUTINACIÓN.

Hasta ahora hemos visto que la variación del tamaño de una partícula afecta enormemente al valor y distribución angular de la intensidad de luz dispersada por la misma. Sin embargo,

## INTERACCIÓN LUZ - PARTÍCULA

cabe preguntarnos porqué se usan partículas de látex en los inmunoensayos, ya que se puede seguir el proceso de la unión antígeno-anticuerpo sin el concurso de estos polímeros. Aunque hay autores [12,17,19,20] que aún siguen estudiando esta inmunoprecipitación directa, en la actualidad el inmunoensayo de látex (LIA) se ha consolidado como una técnica suficientemente fiable y potente, ya que la presencia de las microesferas poliméricas, que actúan como portadoras de antígenos o anticuerpos, amplifican la señal producida por la unión de estas proteínas, aumentando la sensibilidad de la medida en un orden de 100 a 1000 veces. Debemos tener presente que las partículas de látex dispersan mucha más luz a bajas concentraciones ( $\approx 20 \mu\text{g/ml}$ ) que muestras que contengan altas concentraciones de proteína, como pudiera ser el suero sanguíneo, que contiene aproximadamente 60 mg/ml de proteína. Entre las ventajas que ofrecen los inmunoensayos de látex podemos destacar su alta sensibilidad y bajo límite de detección, características que aparecen como consecuencia de la amplificación de la reacción antigénica; además, por esta misma razón, se requiere el empleo de menos reactivo en comparación con las técnicas de inmunoprecipitación clásicas.

Para poder rentabilizar al máximo las posibilidades que ofrece esta técnica, debemos optimizar el LIA en dos bloques bien diferenciados:

- En el primero, tienen que quedar bien caracterizadas todas las posibles variables que afectan al reactivo en sí, por ejemplo, propiedades de las partículas portadoras (tamaño, carga superficial, naturaleza y composición), cantidad de antígeno o anticuerpo adsorbida, naturaleza de dichas proteínas, estabilidad del reactivo, condiciones del inmunoensayo, etc.
- En el segundo bloque tendremos que encontrar los métodos ópticos más sensibles para detectar la aglutinación del látex.

Ciertos temas relacionados con el primer apartado se han tratado en capítulos anteriores y se hablará más en el siguiente. En relación al seguimiento óptico de la aglutinación, podemos hacer una clasificación sobre las distintas estrategias empleadas en la detección del LIA [21,22]:

a) **Detección manual.** En estos métodos es el ojo humano el que actúa como detector.

- *Tests en placas.* Sobre un ortobjeto de fondo oscuro se añaden una gota de muestra problema y otra de la dispersión de látex sensibilizado. Si tiene lugar la inmunoaglutinación, se podrá ver la formación de un material granular. Pero este sistema posee varios inconvenientes, de los que podemos destacar el siguiente: después de 3-5 minutos de reacción la suspensión se empieza a secar; este material seco se acumula en los bordes de la placa, donde puede confundirse con partículas

## CAPÍTULO V

---

agregadas, dando lugar a falsos positivos.

- *Tests en tubos*. Surgieron para superar los inconvenientes de los tests en placa. Se realizan en tubos de ensayo; en ellos el tiempo de espera para que la aglutinación tenga lugar puede ser mayor y, por tanto, mejoran la sensibilidad con respecto al método anterior.

No obstante, la detección que tiene lugar haciendo uso de estos tests es sólo cualitativa o semicuantitativa y, por lo tanto, imprecisos y altamente subjetivos en su interpretación. Estos hechos generaron, inicialmente, cierta desconfianza hacia la metodología LIA. Sin embargo, los importantes avances que últimamente se han dado en medidas de dispersión de luz y en la automatización de la instrumentación, permiten hacer análisis cuantitativos de la cantidad de agente aglutinante presente en una muestra problema, de una forma fiable y reproducible.

b) **Detección instrumental**. El ojo deja de ser el que cuantifica la extensión de la agregación, eliminando así la subjetividad en el inmunoensayo. Podemos diferenciar varias técnicas.

- *Espectrofotometría o turbidimetría*. En ella se miden lecturas de absorbancia o turbidez, estando el detector situado en la misma dirección que el haz de luz incidente. Dentro de esta técnica se distinguen dos variantes: i) La *turbidimetría infrarroja*, donde se mide la transmitancia de la luz a  $\lambda_0 = 940 \text{ nm}$ . Por esta vía se han conseguido límites de detección de 15-20 ng/ml [23] para ciertos sistemas. ii) Por otro lado tenemos la medida de la *absorbancia a 580 nm* de una dispersión diluida de látex; éste es un método estándar ampliamente utilizado [24,25,26], ya que es bastante sensible a la aglutinación de las partículas.

- *Nefelometría*. Se mide la luz dispersada a ángulos diferentes a  $0^\circ$ , aunque a veces es posible encontrar bibliografía donde aplican este término a la medida de la luz difundida a  $90^\circ$ .

- *Anisotropía angular*. Mide y relaciona la intensidad dispersada a dos ángulos diferentes. Por lo general se escoge un ángulo mayor que  $90^\circ$  y el otro menor.

- *Espectroscopía de fotocorrelación (PCS)*; también llamada dispersión dinámica (o elástica) de luz. Este método se basa en el efecto Doppler de la luz láser cuando ésta ilumina una partícula. El cambio en la frecuencia con la que la luz es dispersada hacia el detector, está relacionada con la velocidad del movimiento de la partícula. Una partícula se desplazará (o difundirá) más rápidamente que dos partículas unidas, con lo que esta técnica, que también se usa para medir el tamaño de microsferas, puede ser una herramienta sensible para detectar pequeñas cantidades de agente aglutinante.

- *Contador de partículas (PACIA)*. Cuantifica el número de partículas que hay en



disolución antes y después de la agregación.

Nuestro propósito se ha centrado en hacer un análisis comparativo entre algunas de estas técnicas, aplicadas a uno de nuestros sistemas. En concreto, se realizaron inmunoaglutinaciones de partículas de látex JL8 recubiertas con  $F(ab')_2$ -antiPCR, usando como antígeno la proteína C reactiva (PCR), detectando su agregación por turbidimetría, nefelometría, PCS y anisotropía angular.

**Turbidimetría**

La medida de la absorbancia es un buen método para seguir la coagulación de un sistema coloidal, puesto que la energía total irradiada en todas las direcciones ( $C_{sca}$ ), el factor de eficiencia ( $Q_{sca}$ ) y, por lo tanto, la turbidez ( $\tau$ ) aumentan de forma pronunciada a medida que aumenta el tamaño del agregado, o lo que es lo mismo, a medida que  $\alpha$  se hace más grande. W. Heller y col [27] representan la dependencia de estas tres funciones con  $\alpha$ , para distintos valores de índice de refracción, haciendo uso de la teoría exacta de Mie. Estos resultados se muestran en la Figura V.21.

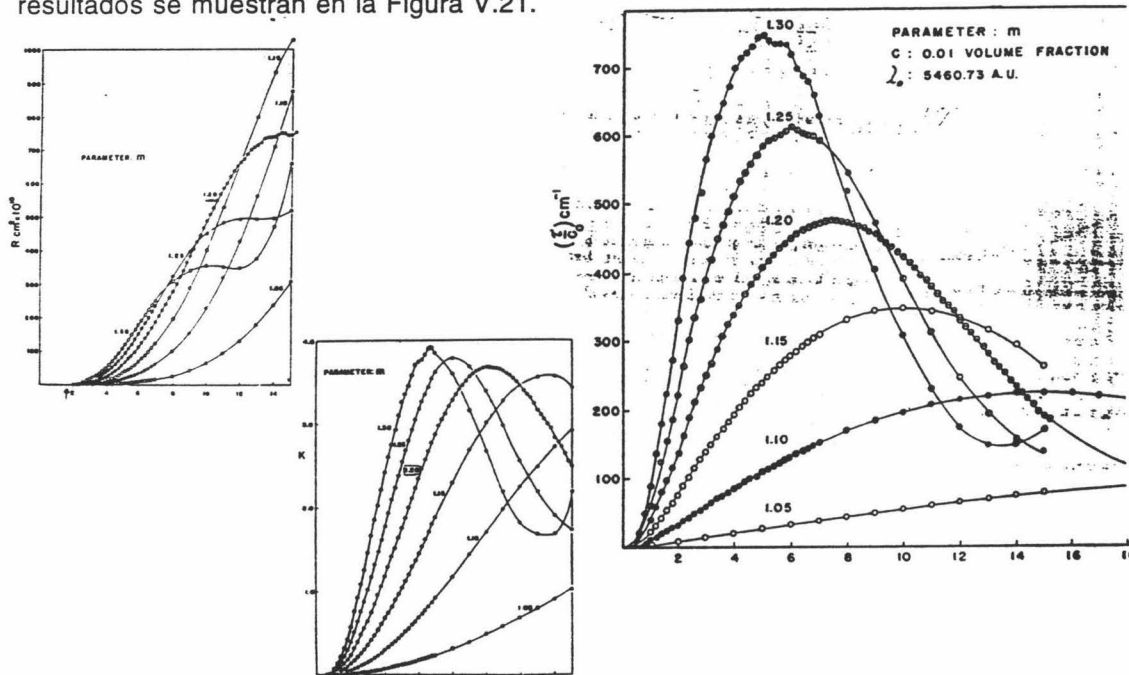


Fig. 21. (a) Energía total dispersada ( $C_{sca}$ ), (b) factor de eficiencia ( $Q_{sca}$ ) y (c) turbidez por unidad de concentración de materia dispersora ( $\tau/c$ ), calculadas para distintos  $n$  y  $\alpha$ . [Ref. 27].

## CAPÍTULO V

Teniendo en cuenta dichos resultados, podemos afirmar que se produce un mayor aumento de la turbidez a medida que una partícula pequeña ( $\alpha \leq 4$ ) aumenta su índice de refracción, o bien, esta variación en la turbidez se dará a medida que un sistema coloidal, que se encuentre inicialmente estable, comience la agregación. En este último caso, el incremento de la absorbancia será más pronunciado si partimos de partículas de alto  $n$  y  $\alpha \leq 1$ .

Como todos nuestros coloides poseen el mismo índice de refracción ( $n = 1.2$ ), recurrimos a los de menor tamaño para llevar a cabo las inmunorreacciones. En concreto, fue el látex JL8 el que escogimos, debido a su elevada estabilidad, en comparación con el JL1 y JL2, cuando todos ellos se encuentran recubiertos con  $F(ab')_2$  y BSA. Aunque la metodología empleada para realizar los inmunoensayos está descrita en profundidad en el capítulo siguiente, conviene exponer ahora las condiciones en las que se realizaron. El medio de reacción fue BSA salina (pH 8.0 borato (13mM), NaCl (150 mM), azida sódica (1 mg/ml) y BSA (1 mg/ml)); la concentración final de partículas fue  $4.5 \cdot 10^{10}$  part/ml; la adsorción de proteína sobre el coloide se realizó a pH7, siendo  $6.0 \text{ mg/m}^2$  la cantidad de  $F(ab')_2$ -antiPCR adsorbida. La longitud de onda de trabajo fue 570 nm y, por último, el tiempo de espera en la reacción inmunológica con PCR fue de 10 minutos. El espectrofotómetro empleado ha sido un Milton Roy Spectronic 601. Los resultados obtenidos están reflejados en las gráficas de la Figura V.22.

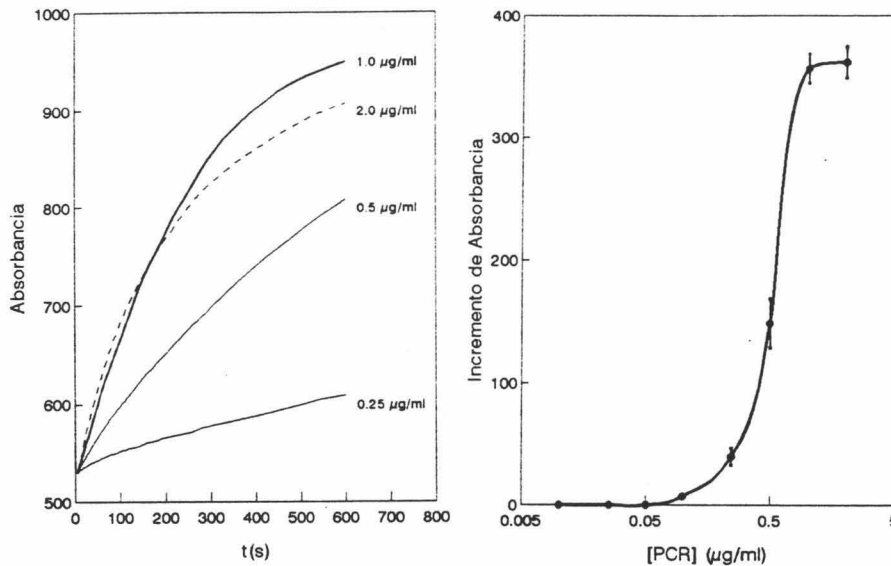


Fig V.22. (a) Incremento temporal en la absorbancia de la disolución con distintas concentraciones de PCR. (b) Variación de la absorbancia tras 10 minutos de incubación con diferentes cantidades de antígeno.



## INTERACCIÓN LUZ - PARTÍCULA

En la gráfica (a) se ve la variación temporal de la absorbancia de la dispersión coloidal cuando en el medio de ración hay diferentes cantidades de PCR. Al cabo de 10 minutos, la agregación casi se ha completado para las concentraciones más altas de antígeno. En la gráfica (b) se muestra la dependencia del incremento de absorbancia con la cantidad de PCR presente en el medio, después de 10 minutos de incubación. Esta curva, y las que posteriormente mostraremos en las otras técnicas, son media de tres experimentos realizados en tres semanas diferentes.

Entre las ventajas de la turbidimetría podemos destacar su simplicidad instrumental (un espectrofotómetro), lo que permite una gran aplicabilidad de los tests de látex en numerosos laboratorios clínicos, manteniendo una alta reproducibilidad y buena sensibilidad. Sin embargo, en comparación con las otras técnicas de seguimiento óptico, la turbidimetría requiere una mayor cantidad de reactivo (partículas). Además, debería ser menos sensible que los otros, al menos teóricamente [28,29], por encontrarse el fotomultiplicador trabajando siempre con una luz de fondo, ya que el detector y la lámpara se encuentran situados en la misma dirección. La calidad de los resultados depende del ruido óptico del instrumento y del intervalo de medida del mismo [30].

### Nefelometría

Es una técnica que gana cada vez más terreno en la detección de los LIA, desde que en 1971 Killingsworth y Savory [31] publicaran sus resultados, obtenidos haciendo uso de un nefelómetro comercial. Teóricamente, la sensibilidad de la nefelometría debe ser muy alta, ya que el detector mide directamente la intensidad de luz dispersada en un ángulo  $\theta$ , sin comparar con ninguna otra luz de fondo. Por lo tanto, dependerá del blanco, o dispersión basal de la muestra, que en ausencia de partículas debería ser cero. Los reflejos internos y la dispersión causada por ciertos componentes ópticos contribuyen a dar señal de fondo.

Las medidas se llevaron a cabo con el dispositivo System 4700c (Malvern Instrument) fijando el detector a  $20^\circ$ . Para hacer comparables los resultados obtenidos por nefelometría, PCS y anisotropía angular con los de turbidimetría, se llevaron a cabo todas las experiencias tal y como describimos en el apartado anterior; sin embargo, como para realizar las medidas de dispersión de luz la concentración de partículas tenía que ser mucho menor ( $3.5 \cdot 10^8$  part/ml), se diluía la muestra problema unas 100 veces, una vez transcurrido el tiempo de incubación. Los resultados están representados en la Figura V.23.

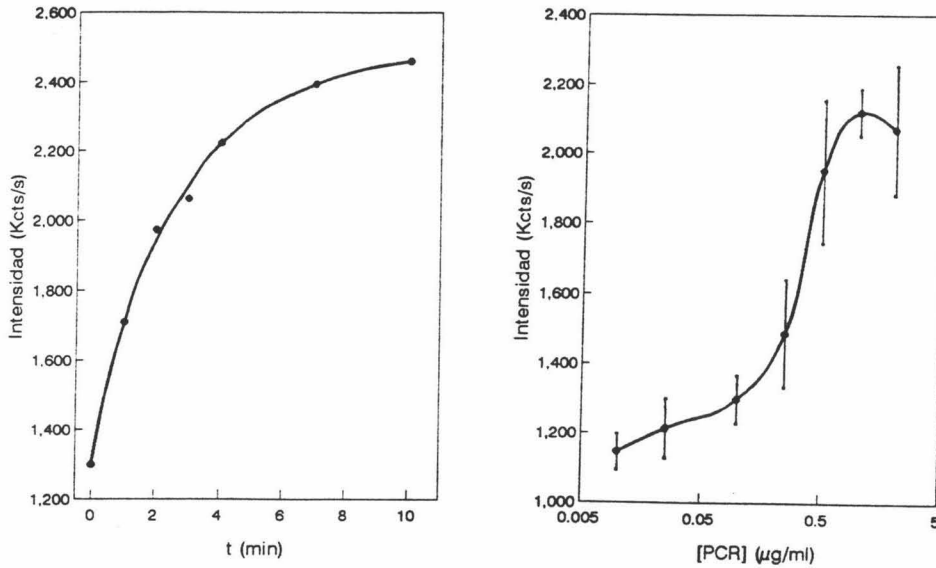


Fig. V.23 (a) Variación temporal de la intensidad de luz dispersada a 20° de una disolución que contiene 1µg/ml de PCR. (b) Dependencia de esta intensidad con la concentración de antígeno.

La cinética de la reacción es igual a la obtenida por medidas turbidimétricas. Sin embargo, en la dependencia de la intensidad dispersada frente a la concentración de antígeno encontramos dos diferencias con respecto a la anterior técnica: por un lado, tenemos más sensibilidad, que se traduce en una disminución del límite de detección; pero, por otro lado, nos encontramos con que la reproducibilidad de las medidas es bastante mala. Este hecho se debió, en gran parte, a ciertos problemas que tuvimos con la alineación del fotomultiplicador del instrumento.

Hay algunos trabajos [19,20,32] donde los autores realizan estudios comparativos entre turbidimetría y nefelometría en reacciones de inmunoprecipitación sin partículas de látex; todos ellos coinciden en la mayor reproducibilidad de los resultados y simplicidad en el trabajo de las medidas turbidimétricas. No obstante, cuando se usan microesferas poliméricas para magnificar la reacción inmunológica, hay autores, como Kapmeyer [33] y Montagne y col [34], que obtienen resultados reproducibles, con un error medio del 8 % y 7.5 %, respectivamente. En este último trabajo logran detectar hasta 1 ng/ml de agente aglutinante, cuando trabajan a ángulos de medida muy bajos ( $\theta = 10^\circ$ ), en los cuales, según las teorías descritas previamente, aumenta drásticamente la intensidad de la luz dispersada a medida que aumenta el tamaño del agregado. Debido a la alta sensibilidad que, potencialmente, posee

esta técnica, en nuestro Departamento se ha empezado a trabajar con un nefelómetro no comercial capaz de medir la luz dispersada a tres ángulos diferentes ( $4^\circ$ ,  $9^\circ$  y  $18^\circ$ ), con el que se ha conseguido detectar hasta 1.5 ng/ml de PCR. Por ello, la detección nefelométrica de la aglutinación de partículas está planteada en nuestro grupo de investigación como una de las principales líneas de trabajo a realizar en un futuro a corto plazo.

### Espectroscopía de fotocorrelación

Como comentamos previamente, es una técnica más orientada a la determinación del tamaño de partículas que al seguimiento de la inmunoaglutinación de microesferas de látex [35,36]. Los resultados se muestran en la Figura V.24 y como puede verse son similares a los obtenidos anteriormente.

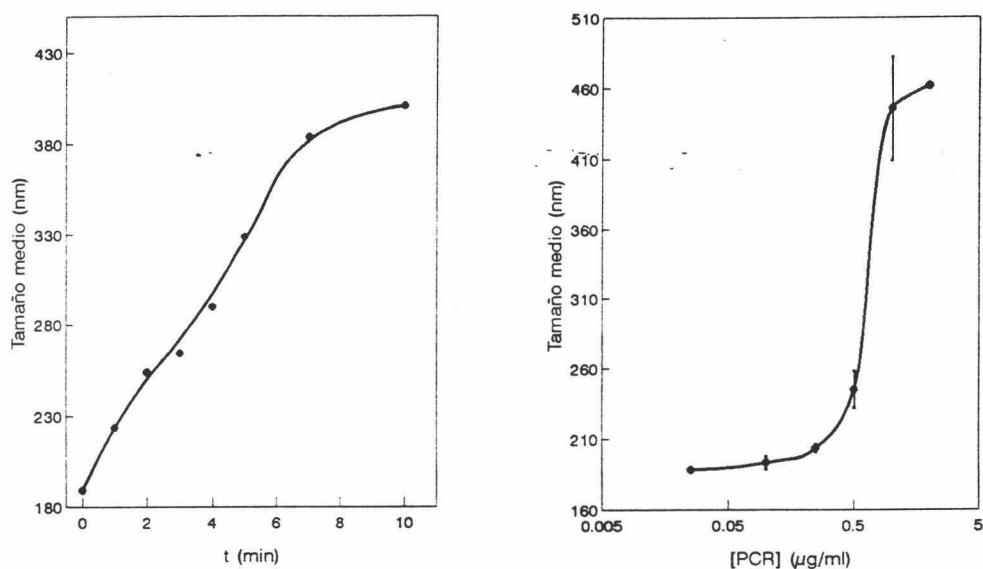


Fig. V.24. (a) Variación temporal del tamaño medio del agregado en una disolución que contiene 1 µg/ml de PCR.  
(b) Dependencia con la concentración de antígeno.

Aunque no es una técnica muy sensible y su instrumentación es algo más compleja, demuestra ser una alternativa eficaz para detectar los LIA.

## CAPÍTULO V

### Anisotropía angular

Hace uso de la nefelometría, pero intenta aumentar su sensibilidad comparando las intensidades dispersadas a dos ángulos diferentes. Como se vio en el apartado teórico de este capítulo, a medida que aumenta el tamaño del dispersor se incrementa el "forward scattering" disminuyendo el "back scattering". Von Schulthess y col. [37] realizan un estudio exhaustivo sobre esta técnica, consiguiendo un máximo de sensibilidad cuando los ángulos escogidos son uno menor o igual que  $15^\circ$  y, el otro, cualquiera comprendido en el intervalo de  $60^\circ$  a  $100^\circ$ . En nuestro trabajo, el menor ángulo con el que pudimos trabajar fue el de  $20^\circ$ , debido a limitaciones del instrumento de medida. Como conocemos la distribución angular de la luz dispersada por partículas de diferentes tamaños (ver Fig. V.11-15) se realizó una primera estimación del valor que tomaría la razón de intensidades ( $R(\theta_1/\theta_2) = i(\theta_1)/i(\theta_2)$ ) para diferentes pares de ángulos. La Figura V.25 muestra los resultados obtenidos para los látex JL1, JL8, JL3, JL7 y JL10.

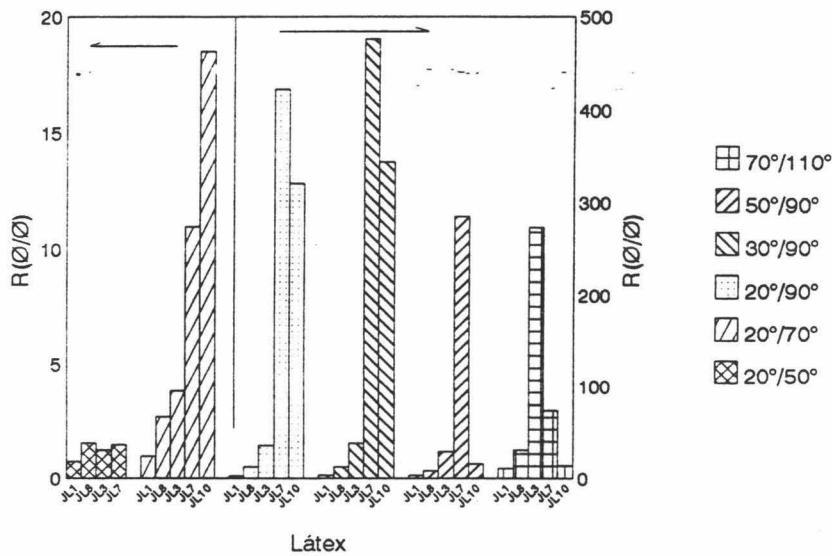


Fig. V.25. Razón de anisotropía para diferentes látex y distintos ángulos.

De estos resultados se ve que sólo la razón  $R(20^\circ/70^\circ)$  crece a medida que lo hace el tamaño del dispersor; para las demás siempre aparece alguna excepción que podría inducir errores en la aplicación de esta técnica en la cuantificación de agentes aglutinantes.

La Figura V.26 muestra la intensidad de luz dispersada por el coloide a varios ángulos a

## INTERACCIÓN LUZ - PARTÍCULA

medida, después de 10 minutos de incubación del complejo JL8-F(ab') inmune con diferentes cantidades de PCR. En ella podemos ver que a medida que aumenta la concentración de antígeno y mayor es el tamaño del agregado, se incrementa la dispersión a 20°, disminuyendo de forma acusada a 50° y 70°. Por ello se eligieron las razones  $R(20^\circ/50^\circ)$  y  $R(20^\circ/70^\circ)$  para seguir la inmunoaglutinación de las partículas de látex.

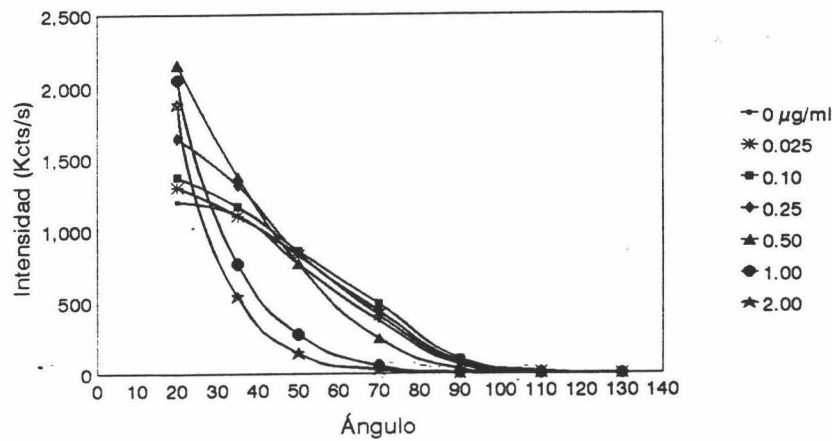


Fig. V.26. Intensidad dispersada por la disolución coloidal a diferentes ángulos, tras 10 minutos de incubación con distintas concentraciones de PCR.

En la Figura V.27 mostramos su dependencia frente al tiempo (a) y frente a la concentración de PCR (b). Lo más destacable es la baja reproducibilidad obtenida sin conseguir una buena sensibilidad, con respecto a las otras técnicas. Teóricamente, podría pensarse que la anisotropía angular sería una técnica muy reproducible, pues al ser una medida de valores relativos, y no absolutos, podrían eliminarse errores debidos, por ejemplo, a una mala alineación del detector. Sin embargo, en la práctica, esta razón de intensidades parece acumular los errores cometidos en la medida de la intensidad de la luz dispersada a cada ángulo, por lo que su aplicabilidad en la cuantificación de antígeno sería, en principio, cuestionable.

No obstante, y como dijimos anteriormente, la información que se puede obtener de la anisotropía angular mejoraría considerablemente si se realizasen medidas a ángulos  $\leq 15^\circ$ .

## CAPÍTULO V

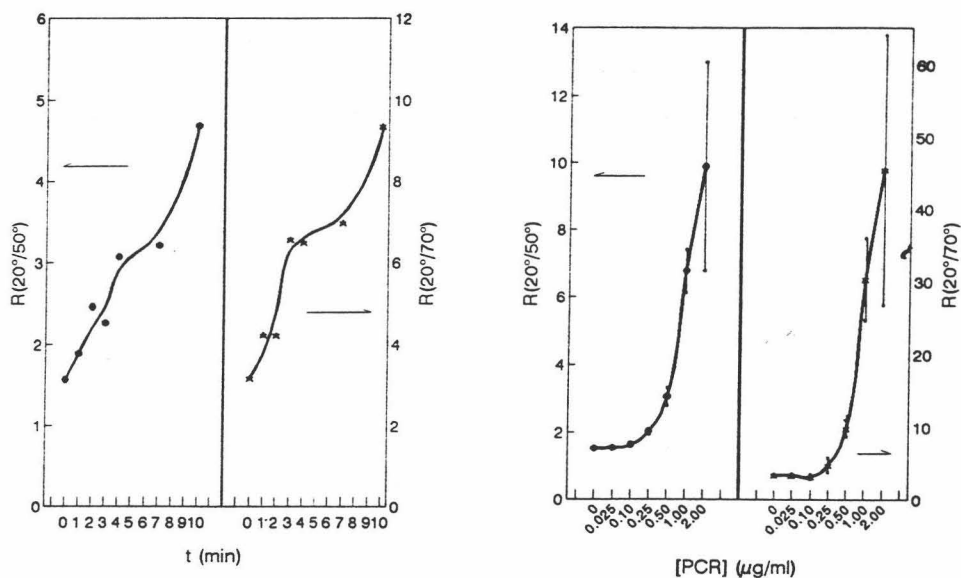


Fig. V.27. (a) Variación temporal de la razón de anisotropía de una disolución que contiene 1  $\mu\text{g/ml}$  de PCR. (b) Dependencia de esta razón con la concentración de antígeno.

Por todas las razones dadas hasta ahora y considerando los problemas que surgieron con el detector del dispositivo System 4700c, se ha optado por la turbidimetría como técnica a emplear en la optimización de los procesos de inmunoaglutinación con partículas de látex, tema al que le dedicamos el siguiente capítulo.

### V.6. BIBLIOGRAFÍA.

1. J.M. Singer. "The latex fixation test in rheumatoid diseases". *Am. J. Med.* **31** : 766 (1961).
2. H.N. Eisen. *Immunology*. Harper and Row. New York. (1974).
3. H. Hager. Patente U.S. N° 3.857.931. (1974).
4. J. Stratton. "Electromagnetic Theory". Mc Graw-Hill. New York. (1941).
5. M. Kerker. "The scattering of light and other electromagnetic radiation". Academic Press. London. (1969).
6. K.E. van Holde. "Bioquímica física". Ed. Alhambra. Madrid. (1979).
7. P. Debye. *J. Phys. Chem.* **51** : 18 (1951).

8. B.H. Zimm. *J. Chem. Phys.* **16** : 1093(a) y 1099(b) (1948).
9. C.F. Bohren y D.R. Huffman. "Absorption and scattering of light by small particles". J. Willy & sons. New York. (1983).
10. Tamaño F(ab')
11. G. Sittampalam y G.S. Wilson. *Anal. Chem.* **56** : 2170 (1984).
12. G. Sittampalam y G.S. Wilson. *Anal. Chem.* **56** : 2176 (1984).
13. D.P. Flaming y M.A. Cusanovitch. *Biochemistry.* **20** : 6760 (1980).
14. W.B. Dandliker. *J. Am. Chem. Soc.* **72** : 5110 (1950).
15. S.H. Maron y M.E. Elder. *J. Colloid Sci.* **18** : 107 (1963).
16. S.H. Maron, y M.E. Elder. *J. Colloid Sci.* **18** : 107 (1963).
17. S.B. Easterbrook-Smith. *Molecular Immunology.* Vol.**30**, N°7 : 637 (1993).
18. P. Debye y W.M. Cashin. *Phus. Rev.* **52** : 1307 (1949).
19. J.W. Skoug y H.L. Pardue. *Clin. Chem.* Vol.**34**, N°2 : 300 (1988).
20. J.W. Skoug y H.L. Pardue. *Clin. Chem.* Vol.**34**, N°2 : 309 (1988).
21. M.T. Kenny. "Bibliography: Biomedical uses of latex particles". The Dow Chemical Co. Indianapolis. (1976).
22. M.T. Kenny. "Bibliography: Biomedical uses of latex particles (1976-1977)". The Dow Chemical Co. Indianapolis. (1978).
23. T. Sudo, S. Tsutsui, M. Ito, S. Morita y M. Sawai. *Kitasato Archives of Experimental Medicine.* Vol.**53**, N°1 : 55 (1980).
24. S. Ikawa, T. Kitazima y K. Ikeda. XII World Congress of Pathology. Tokio, Octubre 1983. *World Association of Societies of Pathology.* Abstract N°FP-13 : 341. (1983).
25. N. Nakamura, O. Senju, S. Mochizuki, M. Hirasawa, Y. Takagi, K. Gomi y T. Ishii. XII World Congress of Pathology. Tokio, Octubre 1983. *World Association of Societies of Pathology.* Abstract N°FP-45 : 373. (1983).
26. H. Kitano, S. Iwai, T. Okubo y N. Ise. *J. Am. Chem. Soc.* **109** : 7608 (1987).
27. W. Heller y W.J. Pangonis. *J. Chem. Phys.* Vol.**26**, N°3 : 498 (1957).
28. C.P. Price y D.J. Newman. "Principles and Practice Immunoassay". M. Stockton Press. New York. (1991).
29. H. Kimura. *J. Immunol. Methods.* **38** : 353 (1980).
30. K. Spencer y C.P. Price. *UV Spectro Group Bull.* **8** : 38 (1981).
31. L.M. Killingsworth y J. Savory. *Clin. Chem.* **17** : 936 (1971).
32. C.P. Price, K. Spencer y J. Whicher. *Ann. Clin. Biochem.* **20** : 1 (1983).
33. W. Kapmeyer. *Pure & Appl. Chem.* Vol.**63**, N°8 : 1135 (1991).
34. P. Montagne, P. Varcin, M.L. Cuillière y J. Duheille. *Bioconjugate Chem.* **3** : 187 (1992).

## CAPÍTULO V

---

35. E.E. Uzgiris. *J. Immunol. Methods.* **10** : 85 (1976).
36. V.B. Elings y D.F. Nicoli. *American Laboratory.* Vol.16, N°6 : 34 (1984).
37. G.K. von Schulthess, M. Giglio, D.S. Cannell y G.B. Benedek. *Molecular Immunology.* **17** : 81 (1980).



**VI. SEGUIMIENTO ÓPTICO DE LA AGLUTINACIÓN**

**DE SISTEMAS LÁTEX-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR**

## VI.1. INTRODUCCIÓN.

En los capítulos anteriores ya se han hecho uso de reacciones inmunológicas antígeno-anticuerpo. No obstante, será en este último capítulo donde estudiaremos con más profundidad y detalle los principales parámetros físico-químicos que influyen en los procesos de inmunoagregación de partículas de látex. En primer lugar describiremos de forma resumida algunos detalles de la reacción antigénica, así como definiremos ciertos vocablos empleados frecuentemente en inmunología.

De todo el fragmento proteico  $F(ab')_2$  (o de la molécula de IgG), sólo una pequeña parte de sus aminoácidos van a contactar directamente con el antígeno. Si recordamos la estructura de un anticuerpo (**Capítulo III**), comprobaremos que está formada por dos cadenas largas o pesadas y otras dos ligeras. Los 110 residuos aminoacídicos de la parte  $-NH_2$  terminal de ambos tipos de cadena constituyen la parte *variable* de las moléculas de IgG. La variación en la secuencia de aminoácidos produce múltiples interacciones no covalentes entre diferentes partes de la/s cadena/s, hecho que genera conformaciones espaciales determinadas en los extremos de los "brazos" Fab, lugares conocidos como **sitios de unión** del anticuerpo al antígeno. Como máximo sólo unos 17 residuos aminoacídicos están directamente involucrados en los contactos del anticuerpo con la molécula antigénica. Por tanto, el sitio de unión no puede reconocer toda la secuencia de aminoácidos de un antígeno; sólo presentará afinidad por ciertas partes de ésta. Estas regiones o zonas antigénicas que son compatibles con el sitio de unión del anticuerpo son conocidas como **epitopos** determinantes de un antígeno. Un epitopo suele estar constituido por 5-10 aminoácidos. Debido a la disimetría estructural de las proteínas, la superficie de una misma molécula de antígeno puede presentar multitud de epitopos. Las uniones intermoleculares entre el sitio activo del anticuerpo y el epitopo antigénico son de naturaleza no covalente. Para que la unión se dé es necesario que no haya impedimentos estéricos, pues hace falta que se ajusten ambas partes de manera que puedan establecerse las interacciones atractivas en este centro de combinación inmunológico. En la Figura VI.1 se representa un par de ejemplos de la interacción entre un sitio de unión y un epitopo [1].

De las interacciones que tienen lugar entre ambas proteínas, se suele diferenciar entre aquellas que tienen lugar en los primeros estadios del proceso, que son de largo alcance pero débiles, y las interacciones que se dan en segundo lugar (las cuales fortalecen la unión e impiden la reversibilidad del proceso de reconocimiento). Entre las primeras se encuadran las atracciones electrostáticas y las de Van der Waals; las interacciones hidrofóbicas y los

puentes de hidrógeno son ejemplo de las segundas [2].

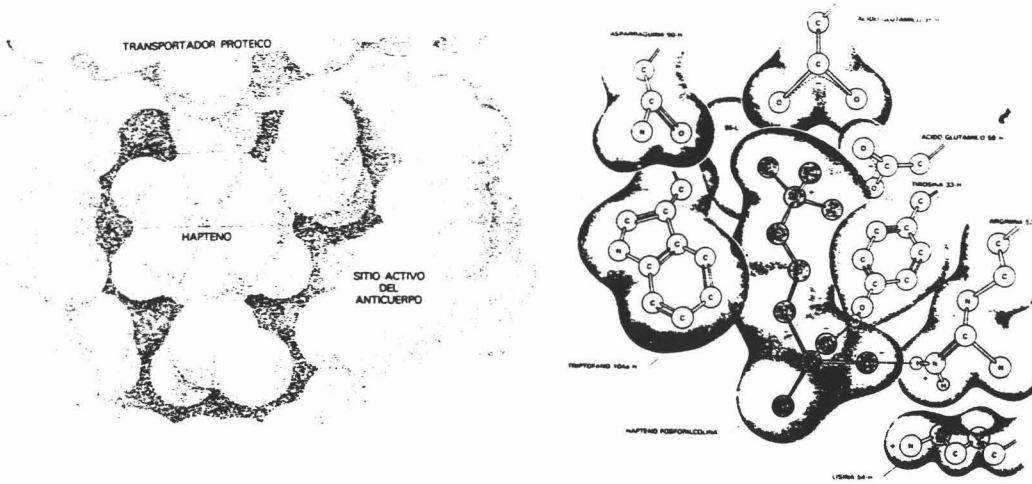


Fig. VI.1. Interacciones entre el sitio de unión de un anticuerpo y un epitopo antigénico.

La **afinidad** es uno de los términos más utilizados en inmunología. Hace referencia a la fortaleza de la unión del sitio de unión de un anticuerpo con su epitopo respectivo. La afinidad depende por tanto de la suma de las interacciones que tienen lugar entre estos segmentos moleculares. Se puede definir la constante de afinidad (K) desde un punto de vista termodinámico a partir de la constante de equilibrio químico de la reacción: antígeno (Ag) + anticuerpo (Ab) = antígeno-anticuerpo (AgAb), siendo  $K = \frac{[AgAb]}{[Ag][Ab]}$ .

Cuando un antígeno multivalente (es decir, con varios epitopos superficiales) se combina con un anticuerpo también multivalente, por ejemplo IgG (divalente) o IgM (decavalente), se define la **avidez** como la fortaleza del enlace entre ambas moléculas, y será igual a la suma de las interacciones individuales epitopo-sitio de unión. Por tanto la **avidez** se corresponde con la suma de las **afinidades** de cada uno de estos puntos de anclaje o enlace.

Otra característica importante en estos sistemas es la **especificidad** de un anticuerpo, que se define como la capacidad del mismo por unir a sus centros de combinación un sólo tipo de epitopo. En la Figura VI.2 aparece un ejemplo acerca de la especificidad de un sitio de unión: la estructura espacial del gráfico de la izquierda permite establecer enlaces no

covalentes con un grupo dinitrofenilo; sin embargo, no puede enlazar el trinitrofenilo. En el gráfico de la derecha se representa un sitio de combinación de menor especificidad que el anterior, pues ambos grupos químicos pueden encajar en este centro de unión.

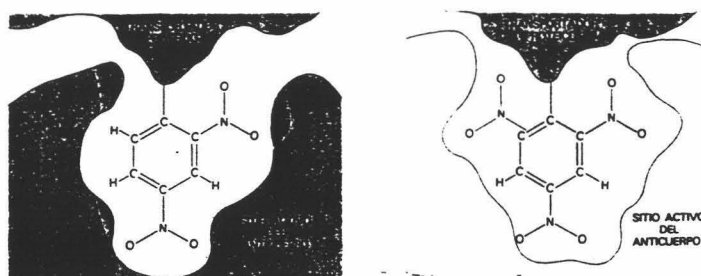


Fig. VI.2. En la izquierda se representa un centro de combinación más específico que el de la derecha.

La falta de especificidad en los anticuerpos puede dar lugar a **reacciones cruzadas** en donde se unen a moléculas que no operan como su antígeno correspondiente.

Por último, antes de pasar a los inmunoensayos de agregación de partículas de látex, comentaremos brevemente algunas características de la proteína que hemos empleado como antígeno en todas nuestras experiencias: la proteína C reactiva (PCR). Su peso molecular es de 120.000 g/mol y está formada por varias subunidades, por lo que puede presentar bastantes epitopos superficiales. La PCR está considerada como uno de los indicadores más fiables que existen para poder pronosticar procesos inflamatorios causados por infecciones, pues en estos casos su concentración sanguínea aumenta enormemente (hasta 1000 veces su valor normal). Tras un tratamiento antibacteriano sus niveles plasmáticos disminuyen rápidamente [3,4]. La medida de la concentración de PCR se hace especialmente útil para poder distinguir infecciones virales de las bacterianas. Asimismo, su concentración sanguínea

también se eleva en algunos procesos inflamatorios no infecciosos, como la artritis reumatoide, o en necrosis celulares, tal y como ocurre con el infarto de miocardio [5].

## VI.2. CINÉTICA DE REACCIÓN. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN.

Se suele distinguir entre la *inmunoprecipitación* y lo que es la *aglutinación* de partículas de látex sensibilizadas con inmunoproteínas (LIA). El primer término se reserva a la agregación de las moléculas de anticuerpo (p. ej., IgG) producida por la presencia del antígeno conjugado. Ya vimos un ejemplo de inmunoprecipitación en el análisis de BSA con IgG-aBSA cuando se realizaron los estudios de la coadsorción secuencial de  $F(ab')_2$  y de albúmina. El método LIA está basado en la misma reacción antigénica, pero la respuesta (o la detección) de la unión antígeno-anticuerpo se va a magnificar unas 1000 veces por la presencia de las partículas de látex [6]. En la Figura VI.3 se esquematizan ambos procesos.

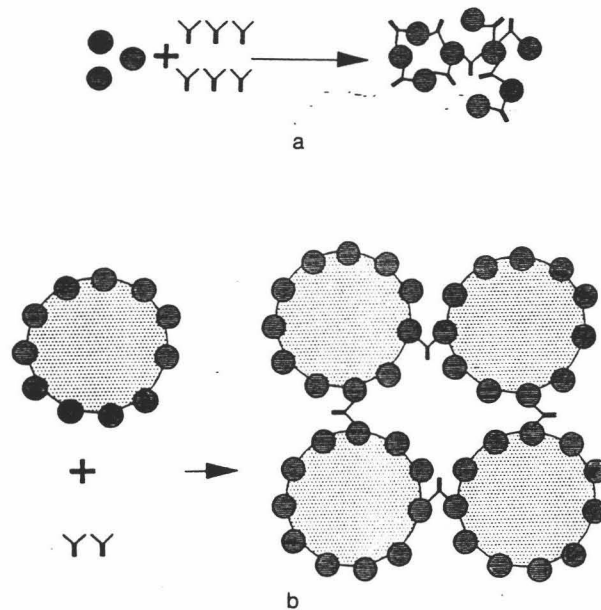


Fig. VI.3. (a) Reacción de inmunoprecipitación. (b) Reacción de aglutinación.

La cinética de las reacciones LIA es, aun hoy en día, un problema para el que no se ha encontrado una solución analítica exacta. Las principales causas que originan este problema son las siguientes:

- Por lo general se trabaja con anticuerpos policlonales, los cuales tienen diferentes especificidades y una amplia distribución de afinidades. Por consiguiente, no hay una constante de unión al antígeno (K) definida, sino que existirá una variada combinación de diferentes constantes de reacción. No obstante, este problema se puede evitar trabajando con anticuerpos monoclonales (es decir, aquellos producidos por una misma célula).

- Sin embargo, la principal causa que evita el desarrollo matemático de las cinéticas de reacciones LIA es su complicado mecanismo de reacción. Ni siquiera la simple unión de una molécula de anticuerpo con una de antígeno transcurre a través de cinéticas de primer orden. En este caso es necesario que, en primer lugar, se una un antígeno a un anticuerpo previamente adsorbido sobre una partícula polimérica y que posteriormente éste haga de puente de unión con otra partícula sensibilizada con proteína. Sin embargo, uno sólo detecta la unión de las partículas cuando se ha producido la segunda reacción inmunológica, pero no detectamos la primera.

No obstante, hay autores que han estudiado cinéticas de inmunoreacciones cuando únicamente una de las proteínas se halla unida a un soporte sólido y la otra se encuentra libre en disolución [7,8]. Kitano y col [9] sí han estudiado la cinética de inmuoaglutinación de microesferas de látex, pero trabajando con 2 poblaciones de partículas: una de ellas tiene adsorbida moléculas de antígeno y la otra población contiene partículas con las moléculas del anticuerpo específico. Por tanto, la unión de dos microesferas poliméricas se produce como respuesta a una única reacción antígeno-anticuerpo, por lo que este mecanismo difiere bastante con respecto al que tiene lugar en los tests convencionales de LIA. Los anteriores autores comparan su proceso de aglutinación con la heterocoagulación de partículas de látex de signo opuesto [10], aunque obtienen una constante de asociación de monómeros (para dar dímeros de látex-anticuerpo-antígeno-látex) dos órdenes de magnitud inferior que la reacción de heterocoagulación ( $1.3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  frente a  $1.9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ); curiosamente, la constante de reacción entre las mismas moléculas de antígeno y de anticuerpo libres en disolución es menor ( $1.9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Decimos que este resultado es llamativo porque se supone que cuando un anticuerpo está adsorbido en una superficie, su reactividad disminuye hasta el 10 ó 20 % de su valor original, debido a los cambios de estructura y conformación causados por el proceso de adsorción interfacial [11]. Kitano y col justifican el resultado en base a la alta concentración local de ambas inmunoproteínas que tiene lugar cuando se acercan dos partículas complementarias.

Pese a todos estos problemas, Heidelberger y Kendall [12] propusieron en 1935 un modelo cinético simple que explica cualitativamente las reacciones de aglutinación. Para poder

describirla, haremos uso del esquema que representamos en la Figura VI.4.

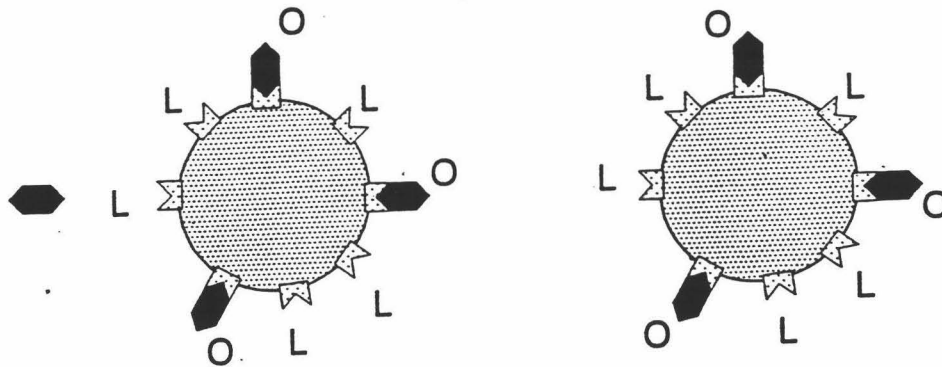


Fig. VI.4. Anticuerpos adsorbidos sobre partículas de látex. Los símbolos negros representan las moléculas de antígeno.

A través de los métodos ópticos podemos seguir el proceso de unión de dos partículas. Para que esto se dé es necesario que un antígeno que esté unido a un anticuerpo adsorbido sobre una partícula de látex se enlace con otra molécula de anticuerpo adherida a otra microesfera. La reacción que tiene lugar podemos expresarla como



en la que dos partículas monoméricas ( $pl$ ) originan tras su unión un dímero ( $pl_2$ ). La constante de equilibrio vendrá dada por

$$K = \frac{[pl_2]}{[pl][pl]} = \frac{[pl_2]}{[pl]^2} \quad (VI.1)$$

Si nos fijamos en la Figura VI.4 podemos llamar "n" al número total de sitios activos que hay por partícula; "n<sub>o</sub>" el número de sitios ocupados por antígeno y "n<sub>L</sub>" (que es igual a "n - n<sub>o</sub>") será el número de sitios activos que quedan libres por partícula. Para la anterior reacción

tendremos que la constante de equilibrio vale

$$K = \frac{[pI_2]}{n_o [pI] n_L [pI]} = \frac{[pI_2]}{n_o (n - n_o) [pI]^2} \quad (\text{VI.2})$$

por lo que la concentración de dímeros en el medio será

$$[pI_2] = K n_o (n - n_o) [pI]^2 \quad (\text{VI.3})$$

De la anterior ecuación podemos ver las condiciones bajo las cuales la formación de dímeros es máxima o mínima. Se puede comprobar de forma inmediata que no se producirá aglutinación alguna cuando:

$$n_o \rightarrow 0 \quad \text{o cuando} \quad n_o \rightarrow n$$

En la primera situación todos los sitios activos se encuentran libres, pero no hay antígeno que haga de puente entre dos partículas; en el segundo caso, todos los sitios activos se encuentran bloqueados y por consiguiente no podrán unirse a través de moléculas antigénicas. La máxima formación de dímeros tiene lugar cuando:

$$n_o = n_L = n/2$$

Esta cinética de reacción puede esquematizarse en la llamada curva de la precipitina de Heidelberger-Kendall, la cual aparece en la Figura VI.5.

Sin embargo, este mecanismo es muy simple en comparación con los procesos reales que tienen lugar en el medio de reacción, ya que la formación de trímeros, tetrámeros y aglomerados de mayor número de monómeros es un resultado que ocurre con frecuencia. Recientemente, Stoll y col [13] han realizado estudios cinéticos de la desestabilización de partículas de látex, sensibilizadas con IgG, causada por la presencia de antígeno. Proponen modelos de formación no sólo de dímeros, sino de agregados mayores; además consideran la posibilidad de que pueda haber rupturas de estos agregados, ya que es fácil que dos partículas de gran tamaño (en relación con las moléculas proteicas) se puedan separar si sólo



existe un punto de contacto entre ellas. No obstante, no logran proponer un mecanismo cinético; lo que hacen es ver en qué situaciones el régimen de la aglutinación es de tipo DLCA (cinética de agregación limitada por la difusión de las partículas) y cuando es RLCA (limitada por la reacción entre las partículas). Su estudio lo llevan a cabo con un contador de partículas, pudiendo realizar distribuciones temporales de el número de monómeros que constituyen los agregados. Entre sus conclusiones destacamos las siguientes: i) en presencia de altas cantidades de antígeno, la cinética es de tipo DLCA reversible (es decir, puede haber fragmentación de agregados); ii) en presencia de una pequeña cantidad de antígeno el proceso es inicialmente RLCA irreversible, tornándose en RLCA reversible tras largos periodos de tiempo de reacción.

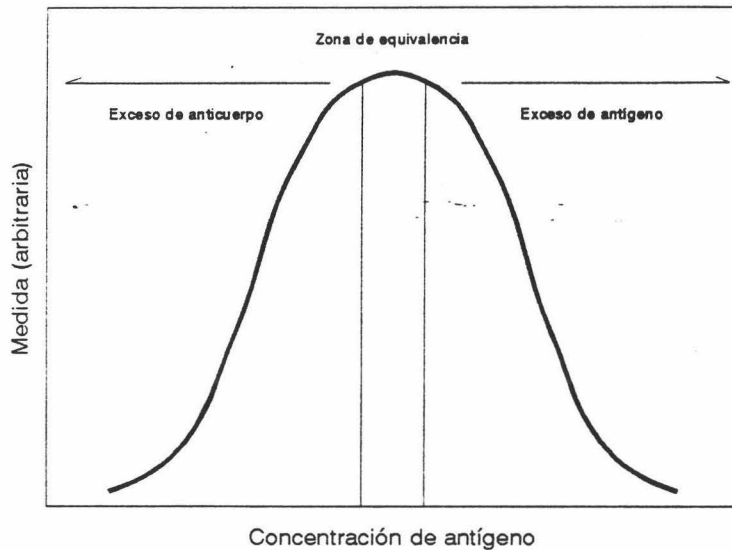


Fig. VI.5. Curva de la precipitina de Heidelberger-Kendall.

Ante la imposibilidad de aplicar teorías cinéticas a nuestros experimentos de inmunoaglutinación, hemos preferido realizar un estudio sistemático de las variables experimentales más importantes que afectan a la velocidad de reacción. Aun teniendo en cuenta las limitaciones teóricas de las cinéticas de las reacciones LIA, Puig [14] ha intentado obtener una expresión analítica que gobierna el comportamiento de la variación de la turbidez de un sistema cuando en él tiene lugar un proceso de inmunoagregación. Sin embargo, existen dos parámetros desconocidos en las ecuaciones que este investigador plantea, hecho

que hace que no podamos aplicar su teoría sobre nuestros resultados obtenidos espectrofotométricamente. A continuación pasamos a comentar brevemente algunos de los métodos que se pueden usar para realizar medidas cuantitativas de la concentración de antígeno en un sistema coloidal.

#### Métodos de cuantificación de antígeno.

Para poder conocer la cantidad de antígeno que tiene una muestra, siempre será necesario realizar curvas patrón. Inicialmente los datos que se obtienen son resultados cinéticos en los que se mide la variación de la turbidez en función del tiempo. Skoug y Pardue [15] plantean que a partir de estas curvas se pueden realizar tres tipos diferentes de análisis, que los llaman: i) de *velocidad*, ii) de *dos puntos* y iii) de *regresión cinética*. Éste último sólo es aplicable cuando se tienen expresiones analíticas que reflejan la cinética del proceso. Los anteriores autores pueden aplicar esta última opción [15,16] pues ellos trabajan con sistemas antígeno-anticuerpo en ausencia de partículas de látex. En nuestro caso, donde trabajamos con reacciones LIA detectadas turbidimétricamente, sólo podemos hacer uso de los dos primeros métodos de análisis. Para ello, haremos uso de los resultados de inmunoagregación obtenidos con los látex JL2 y JL8 sensibilizados con  $F(ab')_2$  anti-PCR, y que se muestran en la Figura VI.6.

Antes recordaremos muy brevemente el método experimental empleado. Todos estos ensayos se realizaron en BSA salina (borato 13 mM (pH 8), NaCl 150 mM,  $N_3Na$  1 mg/ml y BSA comercial 1 mg/ml). Se partía de 950  $\mu$ l de una disolución de látex sensibilizado cuya concentración de partículas se encontraba entre  $5 \cdot 10^9$  y  $5 \cdot 10^{10}$  part/ml (dependiendo de la muestra) y sobre ella se añadían 50  $\mu$ l de una disolución de PCR de concentración conocida; se agitaba rápidamente y se medía la absorbancia de la muestra a una longitud de onda determinada (por lo general  $\lambda = 570$  nm).

El método del análisis de la velocidad consiste en calcular la velocidad con que varía la turbidez de la muestra ( $d\tau/dt = dAbs/dt$ ) y ver cual es la velocidad máxima que se alcanza a lo largo de todo el proceso cinético ( $V_{max,\tau}$ ). Este  $V_{max,\tau}$  lo podremos relacionar con la concentración de antígeno presente en el medio.

El método denominado por "dos puntos" consiste en medir la variación de absorbancia que tiene lugar entre dos instantes de tiempo fijados ( $\Delta Abs$ ), donde por lo general uno de ellos es el inicial.

A partir de las graficas de la Figura VI.6 podemos obtener la variación de la velocidad de la aglutinación con el tiempo; estos resultados se representan en la Figura VI.7, y a partir de ellos podremos obtener la curva  $V_{max,\tau}$  frente a la concentración de PCR. Estos nuevos datos

se representan en la Figura VI.8 junto con aquellos obtenidos con el método de los 2 puntos cuando se mide  $\Delta Abs$ , entre el tiempo  $t = 5$  s y el instante  $t = 330$  s.

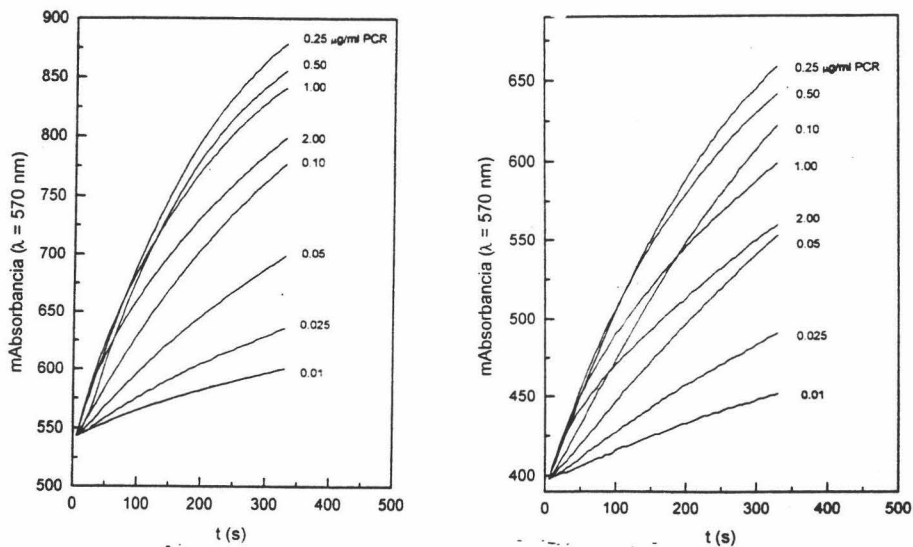


Fig. VI.6. Variación de la absorbancia ( $\lambda = 570$  nm) de los complejos **JL2-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR** ( $3.2 \text{ mg/m}^2$ ) (izquierda). Variación de la absorbancia ( $\lambda = 570$  nm) de los complejos **JLB-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR** ( $4.1 \text{ mg/m}^2$ ) (derecha).

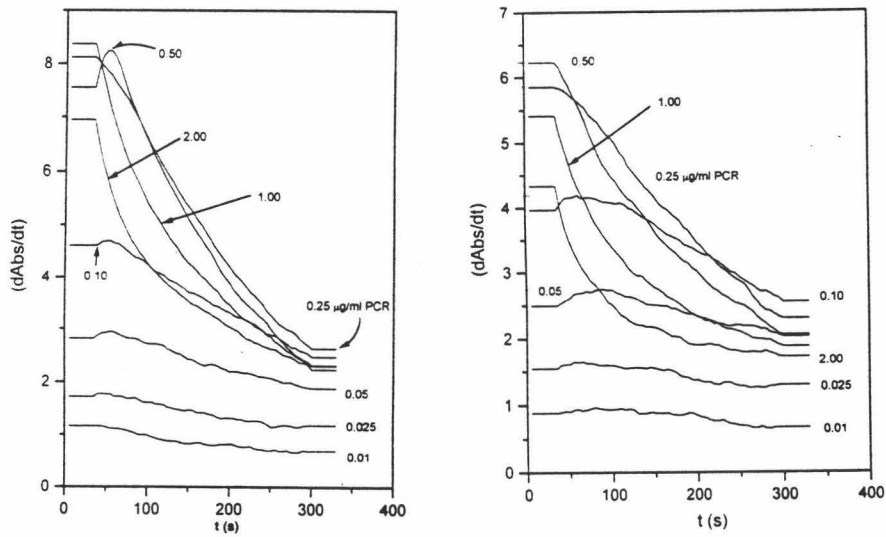


Fig. VI.7. Velocidad de agregación en función del tiempo para el complejo **JL2-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR** ( $3.2 \text{ mg/m}^2$ ) (izquierda) y el **JLB-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR** ( $4.1 \text{ mg/m}^2$ ) (derecha).

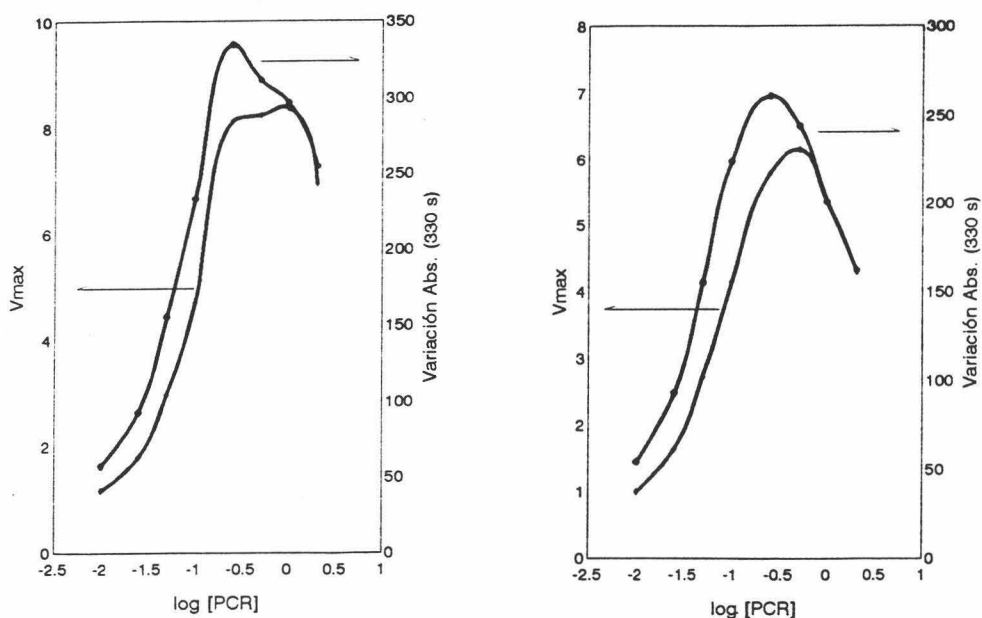


Fig. VI.8.  $V_{\max, \tau}$  (◆) y  $\Delta Abs_t$  (●) para los complejos JL2-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (3.2 mg/m<sup>2</sup>) (izquierda) y JL8-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (4.1 mg/m<sup>2</sup>) (derecha) obtenidos a partir de las Figuras VI.6 y 7.

Como se puede ver, el método de la velocidad tiene ciertos inconvenientes; el principal es que la velocidad máxima siempre se obtiene en el inicio de la reacción. Si la mezcla de las disoluciones de antígeno y del látex sensibilizado no se homogeneiza bien, pueden aparecer discontinuidades que parecen ilógicas si pensamos en el proceso de reacción, tal y como ocurre con la muestra del complejo JL2-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR cuando reacciona con 1.0 µg/ml de PCR. Para evitar estos errores lo mejor es trabajar con el método de los dos puntos ( $\Delta Abs_t$ ) utilizando intervalos de tiempo elevados. De esta forma se obtienen curvas más reproducibles y similares a la de la precipitina de Heidelberger-Kendall. No obstante, existen disoluciones diferentes de antígeno que producen idéntico incremento en la absorbancia, una vez transcurrido el tiempo que hayamos establecido. Una de estas situaciones se encuentra en la zona comúnmente denominada como "exceso de anticuerpo", y la otra pertenece a la región donde hay un "exceso de antígeno". Para poder determinar en qué zona nos encontramos se pueden hacer 2 cosas: i) por un lado, seguir la cinética de la variación de la turbidez del sistema con el tiempo. La velocidad con que varía la absorbancia es prácticamente lineal y pequeña en la región de "exceso de anticuerpo", siendo bastante

elevada en la región contraria, tal y como puede comprobarse en las gráficas de las Figuras VI.6 y 7. ii) El otro método consiste en diluir un poco la muestra problema y volver a realizar el inmunoensayo. Si la respuesta de  $\Delta Abs_t$  disminuye en la medida en que hayamos hecho la dilución, estaríamos en la zona de "exceso de anticuerpo"; si la nueva medida es superior, igual o sólo ligeramente inferior a la primera medida, la región en la que nos encontraríamos sería la del "exceso de antígeno".

Tras obtener los anteriores resultados, decidimos llevar a cabo un estudio sobre la optimización del proceso de inmunoagregación en base a las medidas de la variación de la absorbancia que tiene lugar en un intervalo de tiempo determinado, ya que la medida de  $V_{max,t}$  requiere un tratamiento adicional de datos, sin proporcionar mejores (ni peores) resultados que la  $\Delta Abs_t$ .

### VI.3. ESTUDIO DE LAS VARIABLES FÍSICOQUÍMICAS QUE AFECTAN A LA INMUNOREACCIÓN.

Existen numerosos parámetros, tanto de índole química como física, sobre los que podemos actuar para optimizar el seguimiento de la aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con inmunoproteínas. Entre las más importantes están las que a continuación se enumeran:

- 1) Tiempo de reacción.
- 2) Concentración de partículas.
- 3) Longitud de onda y tamaño de las partículas.
- 4) Cantidad de proteína adsorbida.
- 5) Fuerza iónica y pH de la adsorción.
- 6) Fuerza iónica y pH de reacción.
- 7) Monodispersidad de la muestra inicial (Ultrasonificación).
- 8) Temperatura de reacción.
- 9) Uso de aditivos hidrofílicos.

A continuación veremos los experimentos que se llevaron a cabo enfocados a estudiar cada una de estas variables independientemente. De esta forma se conseguirá obtener las mejores condiciones experimentales en las que se puede desarrollar tests de inmunodiagnóstico fiables, reproducibles, altamente sensibles y con bajo límite de detección.

No todas las experiencias se hicieron con el mismo látex; para el estudio de cada variable

se emplearon diferentes complejos látex-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR y determinadas condiciones experimentales que se describirán en cada uno de los apartados.

### Tiempo de reacción.

El tiempo de reacción es una de las variables que más influye sobre el resultado final de un ensayo LIA. Este periodo de medida será más o menos largo según sea la técnica escogida para realizar el seguimiento óptico de la aglutinación. Por ejemplo, von Schulthess y col [17,18] proponen un tiempo de reacción de 4 horas cuando emplean espectroscopía de fotocorrelación (PCS) y 5 horas cuando aplican la anisotropía angular de la luz dispersada por el sistema [19]. Esto se debe a que utilizan muestras muy diluídas y, por consiguiente, deben esperar largos periodos de tiempo hasta que se alcance el equilibrio.

En estudios nefelométricos, Montagne y col [20] emplean tiempos de 30 minutos en la incubación del antígeno con las partículas de látex sensibilizadas. Asimismo, Kapmeyer [21] lleva a cabo la detección de sus inmunoensayos por nefelometría una vez que sus muestras han sufrido un largo proceso de incubación.

En experimentos turbidimétricos, las concentraciones de partículas que se emplean son más altas y por tanto, las cinéticas de reacción son más elevadas. Normalmente, los tiempos de reacción que se usan con este tipo de técnica son de 5 a 10 minutos. Al menos, este tiempo "standard" es el que emplea la empresa de biotecnología Biokit S.A. (Barcelona) y así lo recomiendan para realizar análisis en departamentos clínicos hospitalarios (por ejemplo, en el Departamento de Bioquímica Clínica del London Hospital Medical College).

Nosotros hemos realizado el seguimiento óptico de la reacción inmunológica durante 30 minutos. Para ello empleamos las siguientes condiciones experimentales:  $5 \cdot 10^{10}$  part/cm<sup>3</sup>;  $\lambda = 570$  nm, y siendo el medio de reacción BSA salina. Empleamos dos complejos látex proteína: JL2-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR, sensibilizado en pH 7 y con un recubrimiento proteico de 2.5 mg/m<sup>2</sup>, y el JL8-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR, sensibilizado al mismo pH con un grado de recubrimiento de 4.0 mg/m<sup>2</sup>. Los resultados se muestran en la Figura VI.9.

Como puede verse, no se alcanza el equilibrio total ni con media hora de reacción. Sólo para aquellas concentraciones de PCR que se encuentran en la zona de equivalencia (vease Figura VI.5) se ve que van alcanzando el "plateau". Sin embargo, para concentraciones de PCR que se corresponden con las zonas de exceso de antígeno o de anticuerpo de la curva de la precipitina, la absorbancia sigue aumentando lentamente. Aunque la variación de la turbidez de las muestras sea inicialmente mayor para altas concentraciones de PCR que para bajas, al cabo de cierto tiempo el incremento de absorbancia es superior para los segundos. Por lo tanto, si midiésemos el valor de  $\Delta Abs_t$  en función de la cantidad de antígeno para

diferentes tiempos de incubación, variaría la forma de la curva de la precipitina. En la Figura VI.10 representamos este resultado para el mismo complejo JL2-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR usado en la experiencia anterior, cuando se le hace reaccionar con diferentes concentraciones de antígeno.

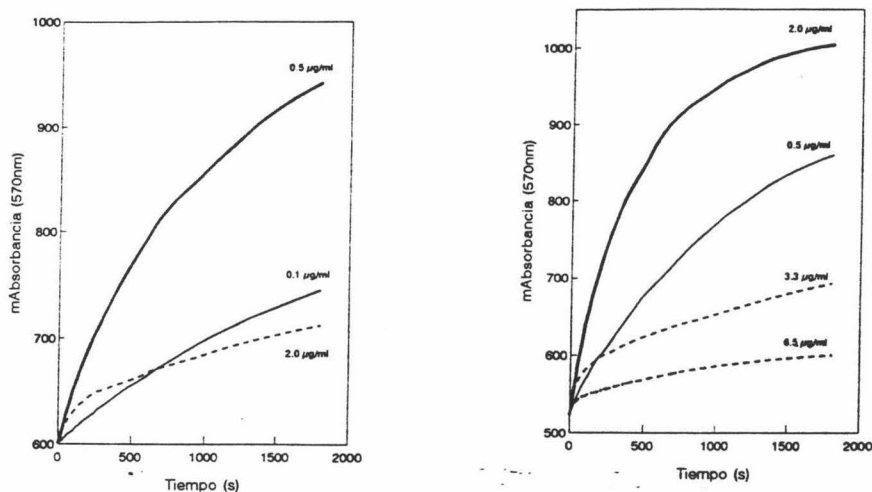


Fig. VI.9. Variación de la absorbancia en un proceso LIA para los complejos JL2-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (2.5 mg/m<sup>2</sup>) (izquierda) y JL8-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (4.0 mg/m<sup>2</sup>) (derecha).

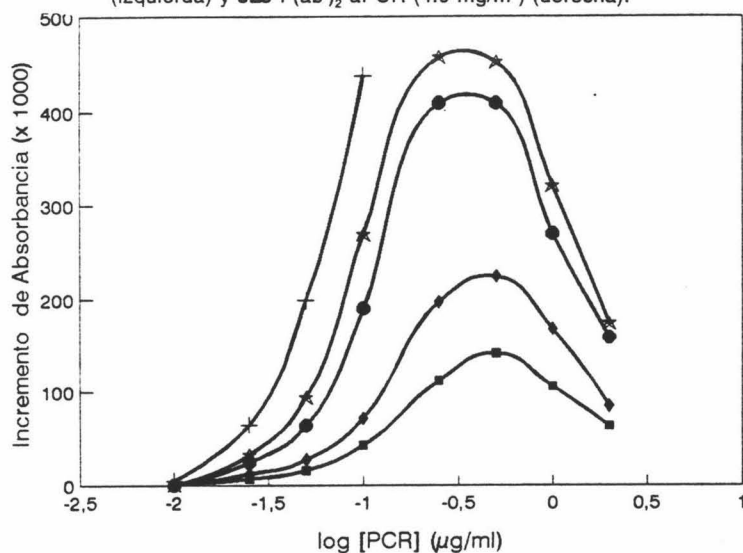


Fig. VI.10. Curva de la precipitina para el complejo JL2-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (2.5 mg/m<sup>2</sup>) para diferentes tiempos de reacción: 5 minutos (■), 10 m (◆), 25 m (●), 1 hora (★) y 5 h (+).

De esta figura se pueden extraer principalmente 2 conclusiones: i) la zona de equivalencia se desplaza hacia concentraciones menores de antígeno a medida que aumenta el tiempo de reacción, pues como ya hemos comentado, las variaciones de absorbancia se incrementan de forma más acusada en la región de exceso de anticuerpo que la de exceso de antígeno, hecho que también se puede comprobar en esta misma gráfica. ii) El resultado más destacable es el fuerte aumento del límite de detección que tiene lugar conforme aumenta el tiempo de reacción. Para altos periodos de incubación, las muestras con mayores concentraciones de PCR se encuentran precipitadas en el fondo de la cubeta debido al gran tamaño de los agregados. Este resultado parece indicar que los agregados que se forman en la región de exceso de antígeno son de mayor número de monómeros que los que se forman en la del exceso de anticuerpo, donde parece haber más cantidad de oligómeros pero de con menor número de partículas constituyentes. Estos indicios concuerdan con los resultados de las cinéticas DLCA y RLCA que plantean Stoll y col [13] para este tipo de reacciones. No obstante, actualmente se están llevando a cabo en nuestro Departamento estudios nefelométricos y de PCS para poder confirmar la anterior conclusión.

### Concentración de partículas.

En la realización de estas experiencias se mantuvieron como variables fijas la longitud de onda ( $\lambda = 570$  nm), tiempo de reacción (5 minutos), medio de reacción (BSA salina) y la concentración final de PCR (0.25  $\mu\text{g/ml}$ ). Se optó por hacer las experiencias con 4 complejos diferentes: JL1-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (2.9 mg/m<sup>2</sup>), JL2-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (2.9 mg/m<sup>2</sup>), JL4-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (3.1 mg/m<sup>2</sup>) y JL8-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (4.1 mg/m<sup>2</sup>), cuyas adsorciones se realizaron a pH 7. Los resultados se muestran en la Figura VI.11.

Para los látex cuyo diámetro de partícula es próximo a 200 nm (JL1, JL2 y JL8) la inmunorespuesta aumenta a medida que lo hace la concentración inicial de partículas en la cubeta. Este resultado es el que se esperaría para cualquier cinética general de reacción que rigiera la formación de dímeros,

$$\frac{dN_2}{dt} = k [N_1]^x \quad (\text{VI.4})$$

(siendo "x" el orden de la reacción). No obstante, debemos tener cuidado con la información que suministra el equipo de medida, ya que con el espectrofotómetro no es aconsejable



alcanzar absorbancias superiores a 2, pues además de perder sensibilidad puede llegar a saturarse la medida del aparato. Este es el caso que encontramos con el látex más grande (JL4), con el que a concentraciones superiores a  $10^{10}$  part/cm<sup>3</sup> ya se alcanzan absorbancias iniciales cercanas a 2, originando lecturas poco reproducibles una vez transcurrido el tiempo de reacción. Lo mismo sucede con los látex más pequeños a concentraciones de  $10^{11}$  part/cm<sup>3</sup>, si bien este valor crítico de absorbancia se alcanza al final de la reacción y no en el inicio. Para evitar estos resultados poco fiables, recomendamos emplear concentraciones menores; por ejemplo,  $5 \cdot 10^{10}$  part/cm<sup>3</sup> (en látex pequeños) proporciona variaciones de la señal bastante aceptables sin que la lectura del espectrofotómetro se sature en ningún momento.

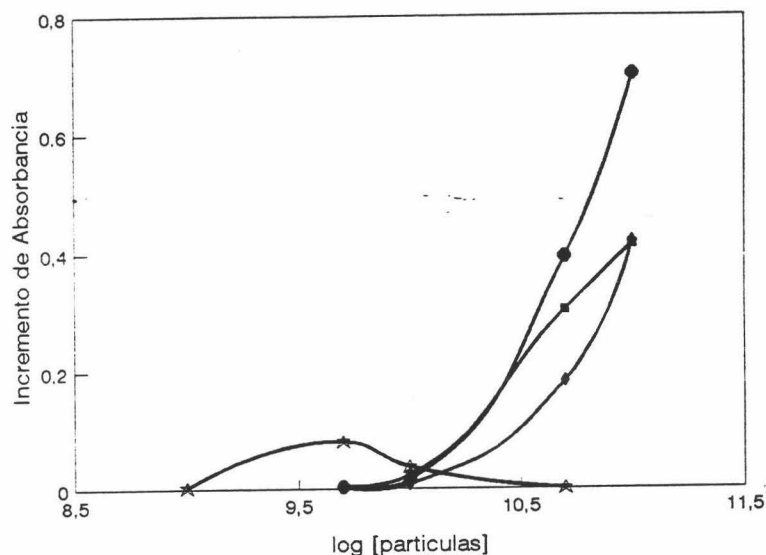


Fig. VI.11. Variación del incremento de absorbancia tras 5 minutos de reacción en función de la concentración inicial de partículas: JL1-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (2.9 mg/m<sup>2</sup>) (■), JL2-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (2.9 mg/m<sup>2</sup>) (◆), JL4-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (3.1 mg/m<sup>2</sup>) (★) y JLB-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (4.1 mg/m<sup>2</sup>) (●).

#### Longitud de onda y tamaño de las partículas.

Como vimos en el capítulo anterior, estas dos variables no son independientes sino que están estrechamente relacionadas. En este apartado lo correcto sería hablar de la influencia

del factor  $\alpha$  ( $\alpha = 2\pi n_p/\lambda_0$ , ecuación V.34). En la Figura VI.12 se muestran los resultados de los inmunoensayos llevados a cabo con un látex de 200 nm (JL8) y con otro de mayor diámetro: 337 nm (JL4). Las condiciones experimentales fueron las siguientes: concentración de partículas fue de  $5 \cdot 10^{10}$  part/cm<sup>3</sup> para el látex catiónico y  $5 \cdot 10^9$  part/cm<sup>3</sup> para el aniónico; 5 minutos de tiempo de reacción; BSA salina como medio reactivo, y 0.25 µg/ml de PCR. Las cantidades de F(ab')<sub>2</sub> depositada sobre las superficies poliméricas y el pH de la adsorción son las mismas que se emplearon en la experiencia anterior.

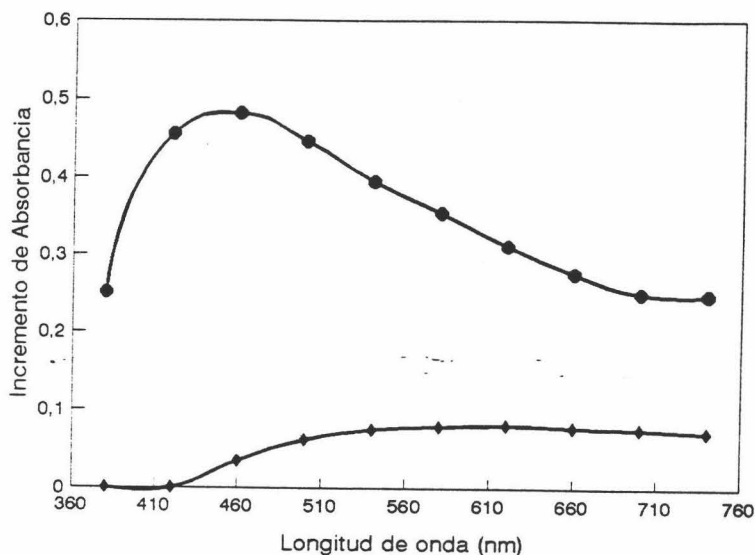


Fig. VI.12. Variación de  $\Delta Abs$ , en función de la longitud de onda para los complejos JL4-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (3.1 mg/m<sup>2</sup>) (◆) y JL8-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (4.1 mg/m<sup>2</sup>) (●).

Para poder explicar estos resultados hace falta que recurramos a la Figura V.21, extraída de un trabajo de Heller y Pangonis [22]. En ella debemos fijarnos en la variación de la turbidez específica con respecto al parámetro  $\alpha$  cuando el índice de refracción de las partículas (relativo al medio) vale  $n = 1.20$ . Asimismo, debemos tener bien presente que en la Figura VI.12 se representan diferencias entre las absorbancias del sistema agregado y del sistema inicialmente monodisperso. Los valores absolutos se muestran en las gráficas de la Figura VI.13.

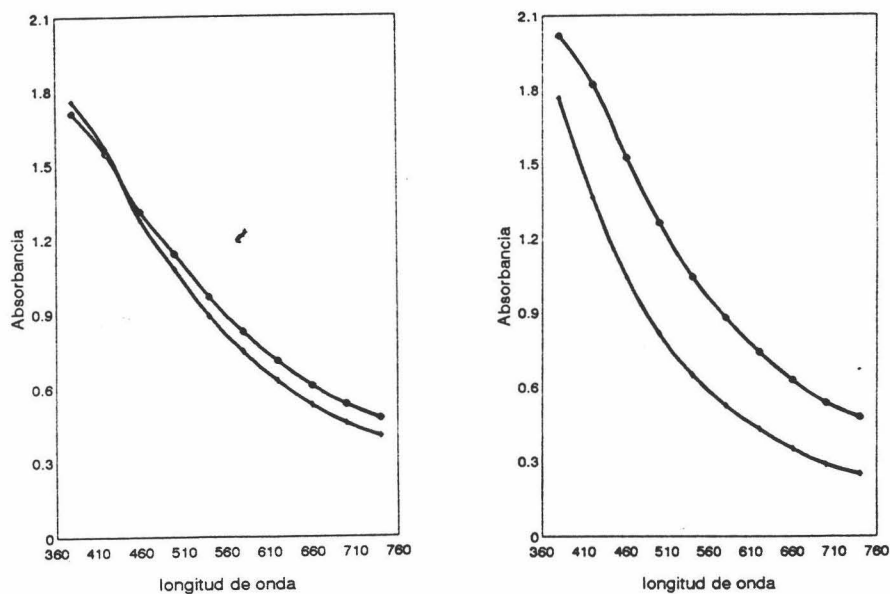


Fig. VI.13. Variación de la absorbancia con la longitud de onda para el complejo JL4-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (3.1 mg/m<sup>2</sup>) en el estado inicial (◆) y tras 5 minutos de inmunoreacción (●) (izquierda); para el complejo JL8-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (4.1 mg/m<sup>2</sup>) en el estado inicial (◆) y tras 5 minutos de inmunoreacción (●) (derecha).

Es fácil correlacionar los datos de estas gráficas, cuando el sistema se encuentra en el estado inicial, con los de la Figura V.21, pues en esta situación podemos conocer el parámetro  $\alpha$  ya que el sistema presenta sus partículas esféricas en estado monodisperso. Se ve como la turbidez aumenta a medida que lo hace dicho parámetro, es decir, a medida que disminuye la longitud de onda. Para el látex JL4 el valor inicial de  $\alpha$  para  $\lambda = 380$  nm es de  $\alpha = 3.9$  y para  $\lambda = 740$  nm es de  $\alpha = 2.0$ . Asimismo, para los complejos del látex JL8 los valores iniciales son de  $\alpha = 2.3$  para  $\lambda = 380$  nm y  $\alpha = 1.2$  para  $\lambda = 740$  nm. (Datos calculados suponiendo un espesor de capa proteica de 8 nm y un índice de refracción del agua de  $n_0 = 1.337$ ). Para los sistemas agregados los valores del parámetro  $\alpha$  serán mayores. El hecho de que la absorbancia del estado final no aumenta con respecto al inicial, cosa que sucede con el JL4 a bajas  $\lambda$ , quiere indicar que el sistema agregado se encuentra en el lado derecho del máximo que aparece en la Figura V.21, lo cual se corresponde con un valor de  $\alpha$  de aproximadamente 12 (valor que se obtendría si el agregado final fuese de forma esférica y tuviese un tamaño de 1  $\mu$ m). Conforme aumentamos la longitud de onda de medida, desplazamos hacia la izquierda los valores de  $\alpha$  (tanto los iniciales como los finales), por lo que es lógico que la diferencia  $\Delta Abs_{\lambda}$  aumente en principio y luego se estabilice.



Para explicar los resultados obtenidos con el látex más pequeño tenemos algo similar, solo que en el estado agregado (y para longitudes de onda pequeñas) el valor teórico de  $\alpha$  se localizaría en las proximidades del máximo de la Figura V.21 ( $\alpha \approx 8$ , dato que se corresponde con un tamaño de agregado de  $0.7 \mu\text{m}$  si el mismo tuviese forma esférica).

En vista a los resultados de las Figuras anteriores, podemos afirmar que la justificación anterior es más cualitativa que cuantitativa, pues no se pueden correlacionar los valores de turbidez de sistemas polidispersos, cuyos dispersores son agregados no esféricos, con los datos teóricos que proporciona la gráfica del trabajo de Heller y Pangonis. De hecho, no aparece ningún máximo en las medidas experimentales de absorbancia frente a  $\lambda$  en los sistemas aglutinados (Figura VI.13). Como conclusión general podemos decir que es difícil predecir "a priori" la mejor longitud de onda de medida; lo que sí debemos intentar es que la  $\lambda$  escogida haga que el parámetro  $\alpha$  del sistema inicial sea próximo a 2, con objeto de que el incremento de la turbidez del sistema sea máximo a medida que se produce la agregación de éste (es decir, a medida que  $\alpha$  aumenta).

#### **Cantidad de proteína adsorbida. pH y fuerza iónica de adsorción.**

Hemos agrupado en este apartado tres variables diferentes. La razón es la siguiente: la cantidad de proteína adsorbida depende de las condiciones físicoquímicas en las que se lleva a cabo la adsorción. Como ya vimos, el pH de adsorción ejerce un marcado efecto sobre el grado de recubrimiento proteico de las partículas de látex. Además, al variar el pH podemos comprobar si existe alguna orientación preferencial de las moléculas de proteína en la interfase al poseer éstas diferentes estados eléctricos. Si esto fuese así, deberían existir diferencias entre los inmunoensayos llevados a cabo con complejos sensibilizados a distintos pHs, así como diferencias sustanciales entre aquellos que se originan a partir de los látex aniónicos y los que provienen del látex catiónico.

A continuación mostramos en las Figuras VI.14-21 los resultados de las experiencias realizadas con partículas sensibilizadas en diferentes pHs pero que poseen dos grados de recubrimiento distintos; en un caso, los complejos tienen la máxima carga proteica que puede adsorberse en cada pH ( $J_{p_i}$ ); la otra población de partículas proviene de adsorciones en donde la cantidad de  $F(ab')_2$  inicialmente añadida sólo cubre parcialmente la superficie polimérica de las microesferas. Las otras condiciones experimentales que permanecieron fijas fueron la fuerza iónica de la adsorción ( $I = 0.002$ ), la longitud de onda ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ ), el tiempo de reacción (5 minutos), medio de reacción (BSA salina) y la concentración de partículas ( $4 \cdot 10^{10}$

part/cm<sup>3</sup> para los látex más pequeños y 5 10<sup>9</sup> part/cm<sup>3</sup> para el látex JL4).

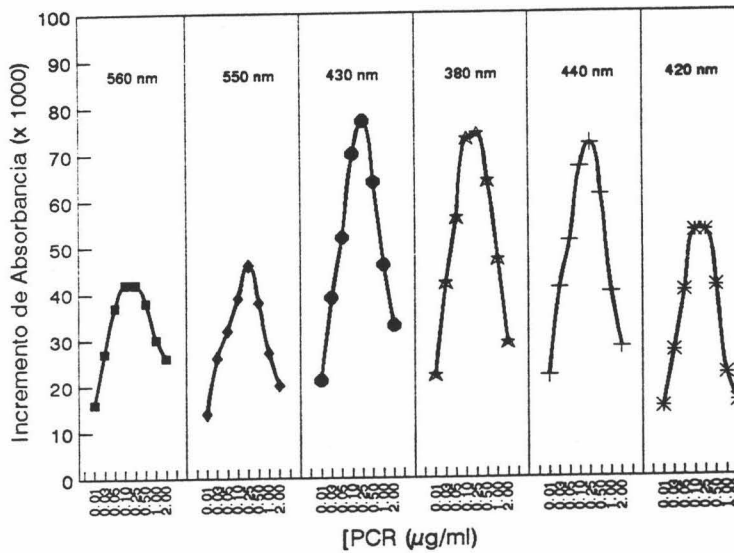


Fig. VI.14. Variación de absorbancia para los complejos JL1-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR con parcial recubrimiento proteico: adsorción a pH 4 (■) (0.9 mg/m<sup>2</sup>), pH 5 (◆) (1.3 mg/m<sup>2</sup>), pH 6 (●) (1.3 mg/m<sup>2</sup>), pH7 (★) (1.2 mg/m<sup>2</sup>), pH 8 (+) (0.9 mg/m<sup>2</sup>) y pH 9 (✱) (0.9 mg/m<sup>2</sup>).

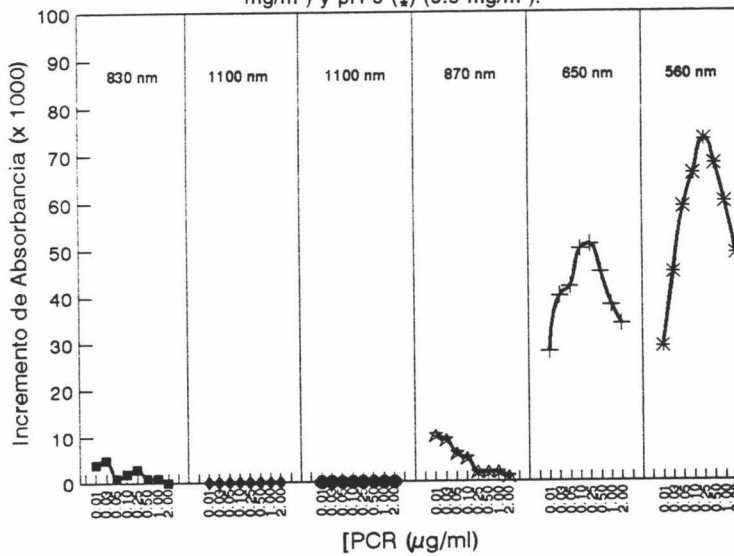


Fig. VI.15. Variación de absorbancia para los complejos JL1-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR con máximo recubrimiento proteico: adsorción a pH 4 (■) (2.8 mg/m<sup>2</sup>), pH 5 (◆) (3.1 mg/m<sup>2</sup>), pH 6 (●) (2.9 mg/m<sup>2</sup>), pH7 (★) (2.8 mg/m<sup>2</sup>), pH 8 (+) (2.3 mg/m<sup>2</sup>) y pH 9 (✱) (1.8 mg/m<sup>2</sup>).

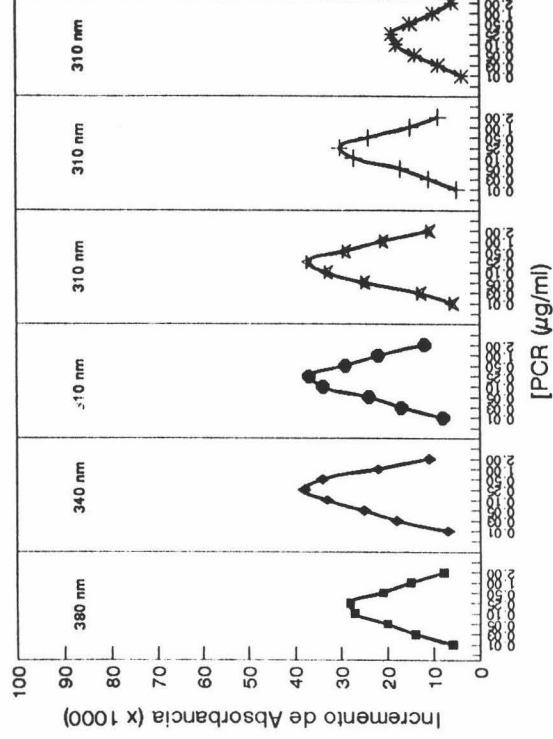


Fig. VI.16. Variación de absorbancia para los complejos JL2-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR con parcial recubrimiento proteico: adsorción a pH 4 (■) (1.4 mg/m<sup>2</sup>), pH 5 (◆) (1.6 mg/m<sup>2</sup>), pH 6 (●) (1.5 mg/m<sup>2</sup>), pH7 (★) (1.2 mg/m<sup>2</sup>), pH 8 (+) (0.9 mg/m<sup>2</sup>) y pH 9 (✱) (0.8 mg/m<sup>2</sup>).

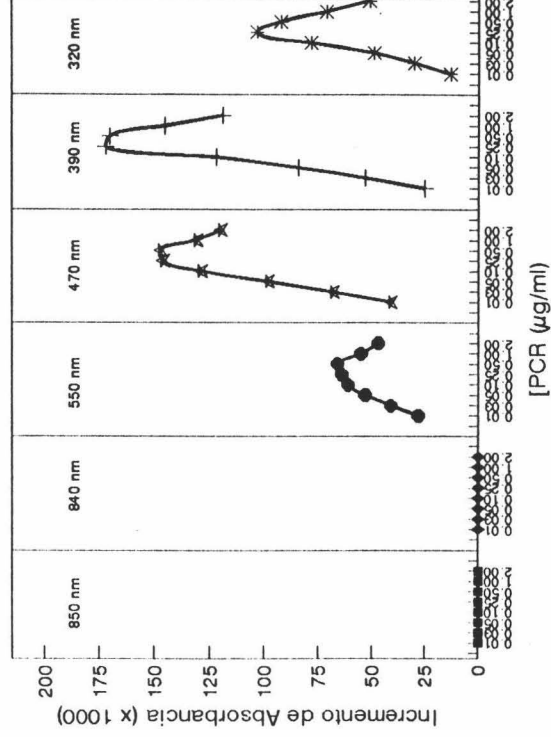


Fig. VI.17. Variación de absorbancia para los complejos JL2-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR con máximo recubrimiento proteico: adsorción a pH 4 (■) (4.2 mg/m<sup>2</sup>), pH 5 (◆) (4.0 mg/m<sup>2</sup>), pH 6 (●) (3.5 mg/m<sup>2</sup>), pH7 (★) (3.1 mg/m<sup>2</sup>), pH 8 (+) (2.5 mg/m<sup>2</sup>) y pH 9 (✱) (1.7 mg/m<sup>2</sup>).

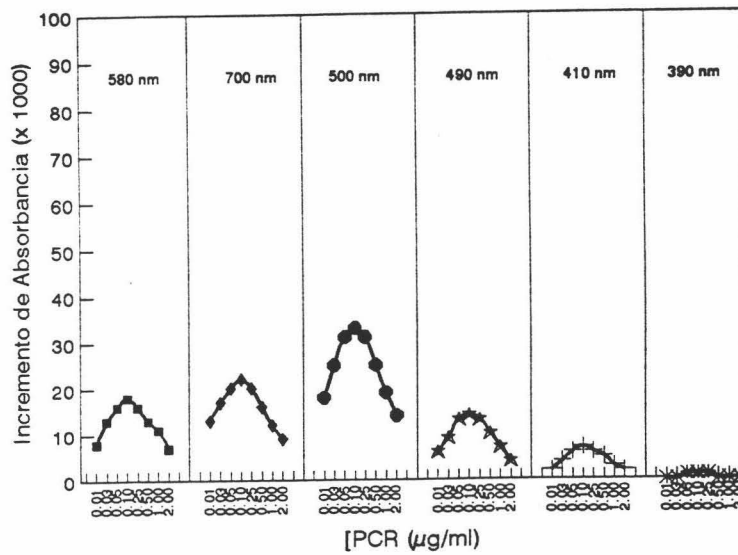


Fig. VI.18. Variación de absorbancia para los complejos JL4-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR con parcial recubrimiento proteico: adsorción a pH 4 (■) (1.8 mg/m<sup>2</sup>), pH 5 (◆) (1.8 mg/m<sup>2</sup>), pH 6 (●) (1.8 mg/m<sup>2</sup>), pH7 (★) (1.6 mg/m<sup>2</sup>), pH 8 (+) (1.2 mg/m<sup>2</sup>) y pH 9 (✱) (0.9 mg/m<sup>2</sup>).

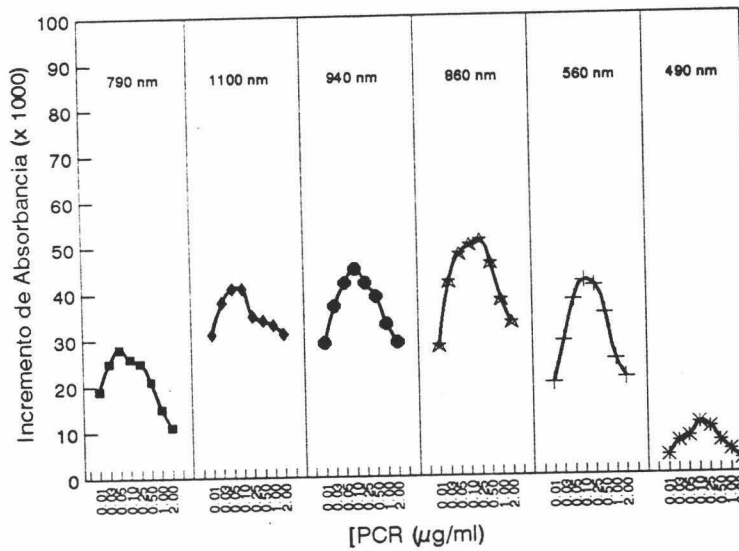


Fig. VI.19. Variación de absorbancia para los complejos JL4-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR con máximo recubrimiento proteico: adsorción a pH 4 (■) (3.1 mg/m<sup>2</sup>), pH 5 (◆) (3.4 mg/m<sup>2</sup>), pH 6 (●) (2.9 mg/m<sup>2</sup>), pH7 (★) (2.6 mg/m<sup>2</sup>), pH 8 (+) (2.1 mg/m<sup>2</sup>) y pH 9 (✱) (1.4 mg/m<sup>2</sup>).

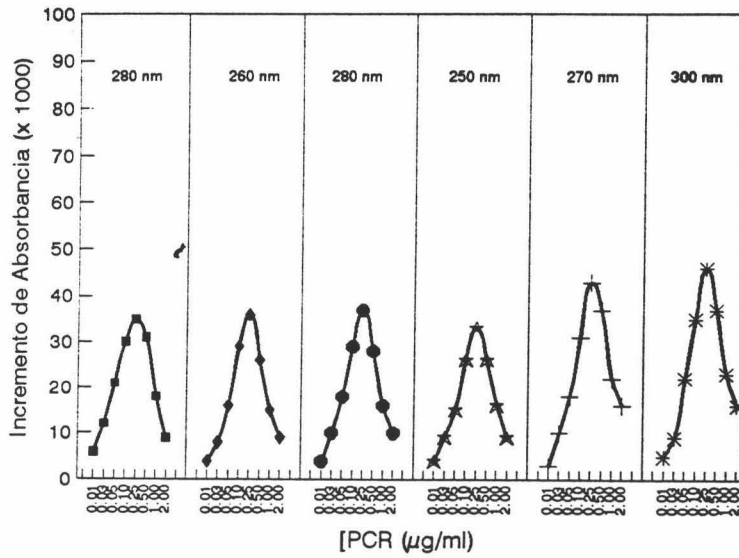


Fig. VI.20. Variación de absorbancia para los complejos JLB-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR con parcial recubrimiento proteico: adsorción a pH 4 (■) (1.5 mg/m<sup>2</sup>), pH 5 (◆) (1.9 mg/m<sup>2</sup>), pH 6 (●) (1.9 mg/m<sup>2</sup>), pH 7 (★) (1.9 mg/m<sup>2</sup>), pH 8 (+) (2.0 mg/m<sup>2</sup>) y pH 9 (✱) (2.0 mg/m<sup>2</sup>).

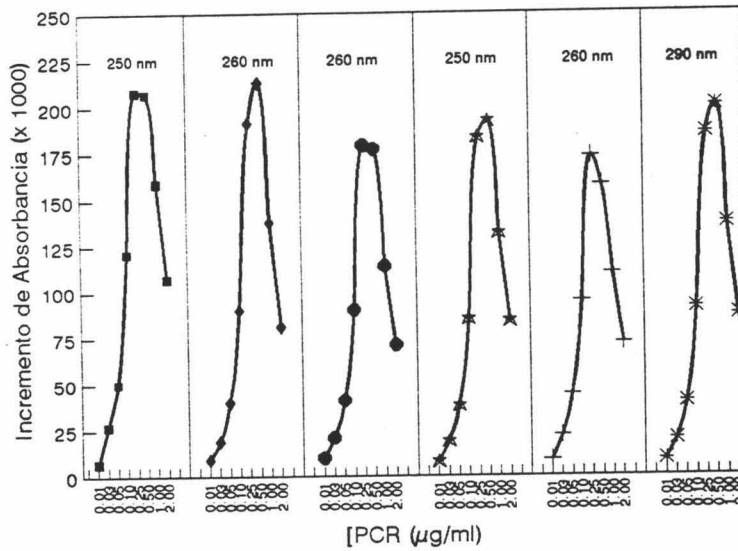


Fig. VI.21. Variación de absorbancia para los complejos JLB-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR con máximo recubrimiento proteico: adsorción a pH 4 (■) (3.0 mg/m<sup>2</sup>), pH 5 (◆) (5.1 mg/m<sup>2</sup>), pH 6 (●) (5.0 mg/m<sup>2</sup>), pH 7 (★) (4.9 mg/m<sup>2</sup>), pH 8 (+) (4.4 mg/m<sup>2</sup>) y pH 9 (✱) (3.8 mg/m<sup>2</sup>).



En estas gráficas también aparecen los diámetros medios de las partículas en BSA salina antes de comenzar la reacción, dato que nos puede dar una idea del estado de agregación previo de nuestros sistemas. Hay que tener cuidado cuando se intenten comparar resultados entre los diferentes complejos, pues la escala del eje "y" de las anteriores figuras no es siempre la misma. Empezaremos comentando los resultados del látex sulfonatado menos cargado (JL1). Las partículas que tienen menor recubrimiento son capaces de dar reacción inmunológica, sin embargo, las que tienen una alta carga proteica absorbida sobre su superficie no reaccionan. La explicación nos la proporciona los tamaños medios de los dispersores antes de producirse la inmunoreacción. Como puede verse los complejos que tienen más de  $2.5 \text{ mg/m}^2$  de  $F(ab')_2$  son inestables y, debido a la presencia inicial de agregados, hace que estos sistemas sean inviables para desarrollar con ellos tests de diagnóstico. La baja estabilidad de estos sistemas concuerda con la pequeña cantidad de BSA que es capaz de alcanzar la superficie polimérica para poder estabilizarlos (Figura IV.5). Las muestras de máximo recubrimiento que se sensibilizaron a pH 8 y 9 poseen menor cantidad de inmunoproteína en superficie, hecho que permite una mayor adsorción de albúmina que hace aumentar la estabilidad de estos complejos. En las muestras que tienen un parcial recubrimiento se obtiene algo similar, pero con una pequeña diferencia: aquellas que se adsorbieron a pH 4 y 5 deberían ser estables pero presentan cierto grado de agregación previa. Esto es debido a que en el proceso de adsorción inicial, todas las muestras de los látex aniónicos que se sensibilizaron a estos pHs precipitaban, siendo imposible llevar a cabo su completa redispersión en BSA salina. Por ello, el resultado final que se obtiene con los látex aniónicos depende de la "historia" de su sensibilización. Por ejemplo, a pH 4 y a pH 8 se adsorben idénticas cantidades de  $F(ab')_2$  ( $0.9 \text{ mg/m}^2$ ), sin embargo la respuesta del primero es peor que la del segundo, debido al grado de agregación inicial que presentan estos complejos y no a una orientación preferencial de las moléculas en un estado inmunológicamente desfavorable. Esta anterior afirmación es extensible a los demás látex aniónicos.

La gran diferencia entre los resultados obtenidos con el látex JL1 y con el sulfonatado más cargado (JL2) es que el segundo es más estable en BSA salina. Esto se puede comprobar con los tamaños medios de las muestras, resultados que concuerdan con las experiencias de coadsorción de  $F(ab')_2$  y BSA sobre estas partículas. Asimismo, la mayor densidad de carga de las microsferas del látex JL2 ejerce un cierto efecto de estabilización, hecho que ya fue comprobado en las medidas de estabilidad de los complejos látex- $F(ab')_2$  (Capítulo III). La principal conclusión a la que se llega tras estudiar los resultados de los látex aniónicos es que hay que lograr un compromiso con respecto a la cantidad de inmunoproteína que recubre

las partículas, puesto que cuanto mayor es el recubrimiento mejor será la respuesta del sistema pero menor es la estabilidad del mismo [23]. Por tanto, debemos elegir la situación óptima que maximice la inmunoaglutinación sin que se produzca una desestabilización del sistema bajo las condiciones físicoquímicas del medio de reacción.

Para el látex JL4 la respuesta no es tan elevada, ya que: i) la concentración inicial de partículas es menor que en los demás casos, ii) numerosas muestras están parcialmente agregadas y iii) que el tamaño de las propias partículas también es superior en comparación con los otros látex (esto supone que el parámetro  $\alpha$  en el punto de partida sea ya algo elevado, hecho que, como previamente comentamos, no es favorable para el seguimiento turbidimétrico de la agregación de partículas de látex [22]).

Los resultados más relevantes los obtenemos con los complejos formados con el látex catiónico JL8. De él podemos extraer más información sobre el efecto del pH de adsorción, pues todas las muestras son estables en BSA salina. Curiosamente, incluso aquellos complejos que sufrieron agregación en el proceso de sensibilización (pH 7 y 8) lograban ser redispersados por completo en un medio rico en albúmina. Este resultado se puede explicar en base a que se adsorbe gran cantidad de BSA debido a la alta hidrofobicidad de la superficie polimérica y a que proteína y partícula tienen signo de carga opuesto (**Capítulo IV**). De las Figuras VI.20 y 21 se puede concluir que las moléculas de  $F(ab')_2$  no se adsorben preferencialmente en una determinada orientación en función de su estado eléctrico, pues las respuestas son similares para todo el intervalo de pHs de adsorción. Asimismo, el signo de carga del látex no parece influir en tales orientaciones hipotéticas, pues tanto el látex JL2 como el JL8 dan lugar a complejos inmunoreactivos.

De todo el conjunto de resultados también se puede sacar las siguientes conclusiones.

a) Cuando el recubrimiento no es máximo la deformación de las moléculas de proteína sobre las superficies poliméricas puede ser mayor que cuando las partículas tienen una carga proteica elevada; esto puede hacer que sean menos reactivos por estar parcialmente desnaturalizadas. De hecho, Platsoucas y col [24] afirman que la inmunoreactividad de moléculas de las IgG que saturan sólo parcialmente una superficie polimérica, poseen características inmunológicas similares a las mismas moléculas cuando son desnaturalizadas térmicamente.

b) Al haber un máximo recubrimiento, la inmunorespuesta mejora, siempre y cuando el sistema sea estable (como ya apuntamos con anterioridad). Esto es debido a que, probabilísticamente, el número de sitios de unión que permanecen activos es superior con respecto a complejos con menor cantidad de  $F(ab')_2$  adsorbida. También, un alto grado de empaquetamiento proteico influye sobre la actividad de los sitios de unión, pues es estos

casos la estructura nativa permanece casi inalterada tras la adsorción, hipótesis que defienden Waldmann-Meyer y Knippel [25]. Tampoco nuestros resultados contradicen las afirmaciones realizadas por Kitano y col [9], que opinan que en superficies saturadas por inmunoproteínas la eficiencia de la reacción antigénica está desfavorecida debido a impedimentos estéricos entre las moléculas, reduciéndose la afinidad de los sitios de unión hasta en un 99% de su valor efectivo con respecto a disoluciones libres de partículas de látex.

c) Por último, recordar una conclusión que ya apuntamos en el **Capítulo IV**: la BSA que alcanza las partículas se adsorbe sobre la superficie polimérica y no sobre las moléculas de  $F(ab')_2$  previamente adsorbidas, pues en caso contrario la reactividad de nuestros sistemas sería nula.

A modo de colorario diremos que el pH de adsorción afecta de dos maneras diferentes. Por un lado, sobre la cantidad de proteína adsorbida y por otra parte en el estado de agregación final de los complejos sensibilizados. Siempre que los sistemas permanezcan estables mejor inmunorespuestas obtendremos cuanto mayor sea el recubrimiento proteico. Sin embargo, al aporte de  $F(ab')_2$  desestabiliza coloidalmente la disolución de látex, y por consiguiente hay que llegar a una solución de compromiso. Esta afirmación (así como la que el pH de adsorción influye sobre el estado final de la agregación) sólo son aplicables a los látex aniónicos. La alta hidrofobicidad del látex catiónico JL8 hace que se adsorba suficiente BSA sobre las partículas como para mantener el sistema estabilizado en condiciones fisiológicas y a su vez permite que quede gran cantidad de moléculas de  $F(ab')_2$  adsorbidas, causa responsable de que estos complejos sean los que proporcionan los mejores resultados.

Sobre *la fuerza iónica* del medio de sensibilización (I) sabemos que un aumento de la misma actúa apantallando las cargas tanto de la proteína como de la superficie polimérica, por lo que se atenúan las interacciones electrostáticas. Por lo general, si comparamos con los resultados de adsorciones llevadas a cabo a bajas fuerzas iónicas se ve que al incrementar "I" disminuye la cantidad adsorbida, aumentando únicamente en aquellos pHs en los que existía una acusada repulsión coulombiana [26,27]. Para estudiar este efecto hemos empleado el látex sulfonatado JL2. En él hemos intentando alcanzar el máximo recubrimiento manteniendo el pH de adsorción fijo en 7.0; las cantidades adsorbidas se muestran en la Tabla VI.1.

Fuerza iónica	$J_{pi}$ (mg/m <sup>2</sup> )	Diámetro medio (nm)
0.002	$3.1 \pm 0.1$	$244 \pm 5$
0.010	$2.8 \pm 0.1$	$232 \pm 8$
0.050	$2.4 \pm 0.1$	$276 \pm 7$
0.100	$2.3 \pm 0.1$	$300 \pm 10$

Tabla. VI.1. Cantidades de F(ab')<sub>2</sub>-aPCR adsorbidas sobre el látex JL2 a pH7 y diferentes fuerzas iónicas.

Al sensibilizar las muestras en  $I = 0.050$  y  $I = 0.100$  se agregaba el sistema, si bien al ser redispersados en BSA salina las disoluciones parecían reestabilizarse por completo, al menos a simple vista. No obstante, medidas de PCS confirman que existe cierto grado de agregación en las muestras sensibilizadas a estas fuerzas iónicas, tal y como puede verse en la última columna de la tabla anterior. Por lo tanto, se vuelve a poner de manifiesto que el estado final del sistema depende de la "historia" de cómo se han obtenido los complejos. Los resultados de la inmunoprecipitación se muestran en la Figura VI.22. Las condiciones del ensayo fueron:  $\lambda = 570$  nm, medio de reacción BSA salina, tiempo de incubación 5 minutos y concentración inicial de partículas de  $5 \cdot 10^{10}$  part/cm<sup>3</sup>.

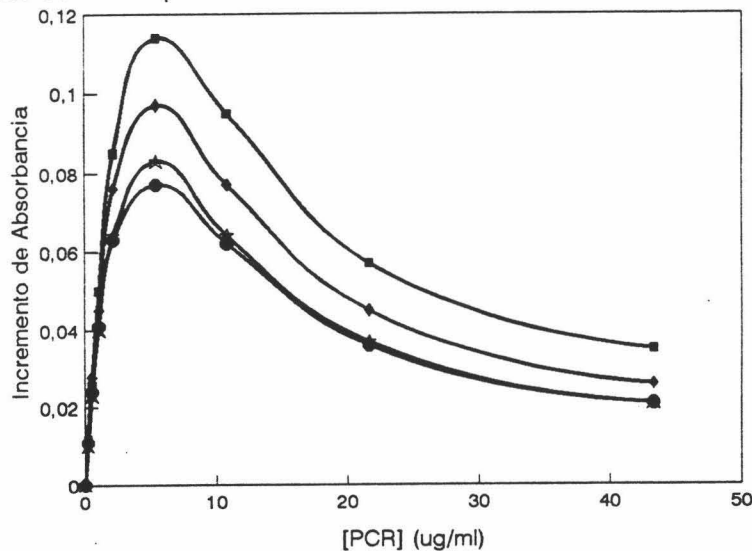


Fig. VI.22. Variación de  $\Delta Abs$ , en función de la concentración de antígeno, para los complejos JL2 sensibilizados a diferentes fuerzas iónicas: 0.002 (■), 0.010 (◆), 0.050 (★) y 0.100 (●).

Estos resultados concuerdan con la idea de que a menor grado de recubrimiento peor es la inmunorepuesta, hecho que también se produce a medida que mayor es el estado inicial de agregación del sistema. Y es justamente sobre estas dos variables donde más influye la fuerza iónica del medio de adsorción, de forma que a medida que aumenta ésta la reactividad de los complejos disminuye.

#### **Monodispersidad de la muestra inicial. Ultrasonificación.**

De todos los anteriores resultados sobresale el hecho de que para tener un buen sistema de inmunodiagnóstico basado en reacciones LIA es necesario tener disoluciones coloidales formadas por un conjunto de partículas discretas (no agregadas) con un alto grado de monodispersidad. Para tal fin se recomienda proceder a la ultrasonificación de las muestras antes de realizar el inmunoanálisis.

#### **Fuerza iónica y pH de reacción.**

La concentración de sal del medio de reacción no ha sido una de las variables experimentales que hemos estudiado, ya que siempre nos ha interesado trabajar a fuerza iónica fisiológica, si bien es uno de los parámetros que influyen de manera importante en el resultado de la inmunoreacción. Conviene elegir una fuerza iónica óptima en la que se evite la autoagregación del sistema en ausencia de antígeno, pero que a su vez no favorezca la existencia de fuertes repulsiones eléctricas entre las partículas que impidan la aproximación de las mismas. Aunque la mayoría de autores prefiere trabajar a  $I = 0.15$ , (por ejemplo, Montagne y col [20] u Okubo y col [28]), otros están obligados a disminuir la fuerza iónica de reacción para evitar la precipitación de sus partículas, como ocurre con Nakamura y col [29] (que trabajan a  $I = 0.03 - 0.05$ ) o con Lutanie y col [30] (que lo hacen a  $I = 0.10$ ).

Aunque en esta Tesis no presentamos resultados experimentales del efecto causado por la variación de la concentración salina, diremos que la anterior afirmación de trabajar a una fuerza iónica óptima sí fue experimentalmente confirmada en el desarrollo de la Acción Integrada Hispano-Británica 247B (1993-94) concertada entre nuestro grupo de investigación y el dirigido por los doctores C.P. Price y D.J. Newman del Departamento de Bioquímica Clínica del London Hospital Medical College. Estos mismos investigadores afirman en su libro [2] que además de afectar esta variable a las interacciones entre las partículas, un aumento de fuerza iónica influye sobre la unión antígeno-anticuerpo pero no de una forma acusada, ya que si por un lado hace disminuir las interacciones electrostáticas entre estas moléculas,

por otro favorece la formación de enlaces de hidrógeno.

El pH del medio de reacción también afecta en el resultado final de una manera notable. Su efecto es doble puesto que, al afectar sobre el estado eléctrico de las proteínas adsorbidas sobre las partículas poliméricas, puede hacer disminuir la repulsión entre las microesferas sensibilizadas produciendo la agregación del sistema en ausencia de antígeno. Por otra parte también influye sobre la unión antígeno-anticuerpo. Pensemos que para que se produzca el reconocimiento antigénico el sitio de unión ha de tener una conformación determinada, originada por un balance de fuerzas que actúa sobre la cadena polipeptídica (hidrofóbicas, van der Waals, eléctricas, etc). El medio natural de actuación de los anticuerpos es el plasma sanguíneo, por lo que un aumento o descenso del pH con respecto al fisiológico (pH 7.4) hace variar la estructura molecular del sitio de combinación además de afectar a las interacciones coulombianas que se establecen con el epitopo antigénico. En la Figura VI.23 aparecen los resultados obtenidos con los látex JL1, JL2 y JL8 para recubrimientos de  $F(ab')_2$ -aPCR de 2.9 mg/m<sup>2</sup>, 3.1 mg/m<sup>2</sup> y 4.1 mg/m<sup>2</sup> respectivamente. Condiciones de reacción:  $\lambda = 570$  nm; concentración de partículas  $5 \cdot 10^{10}$  part/cm<sup>3</sup>; 5 minutos de incubación, concentración de PCR = 0.25  $\mu$ g/ml y fuerza iónica = 0.15. Además se quiso probar si mejoraba la inmunorespuesta al emplear el tampón MES (ácido 2-N-morfolino etanosulfónico, SIGMA), sustancia recomendada por los anteriormente citados Price y Newman.

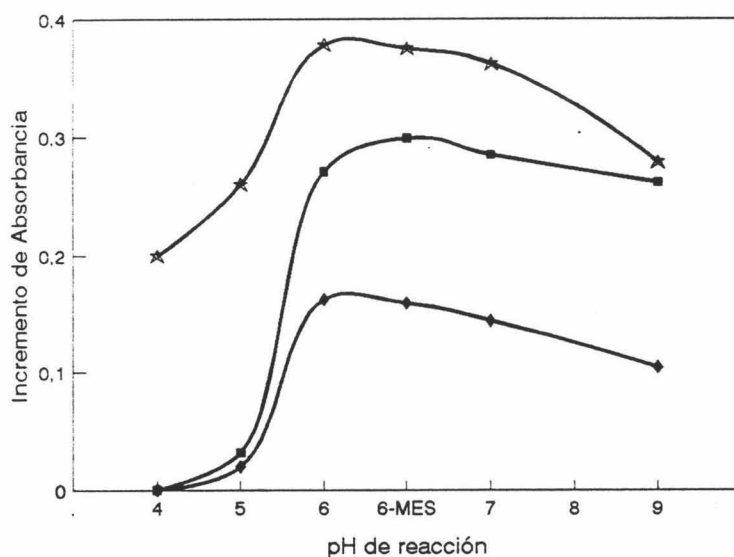


Fig. VI.23. Variación del pH de reacción para las muestras JL1- $F(ab')_2$ -aPCR (2.9 mg/m<sup>2</sup>) (■), JL2- $F(ab')_2$ -aPCR (3.1 mg/m<sup>2</sup>) (◆) y JL8- $F(ab')_2$ -aPCR (4.1 mg/m<sup>2</sup>) (●).



Como se puede observar, es en torno al pH fisiológico donde se obtienen las mejores respuestas (pH 6-8). Al desplazarnos hacia pHs básicos la aglutinación disminuye ligeramente, pero es a pHs ácidos donde la respuesta inmunológica se anula por completo. Para los látex JL2 y JL8 se produce precipitación en ausencia de antígeno; para el látex JL1, que curiosamente permaneció coloidalmente estable, no hubo agregación alguna durante los 5 minutos de la reacción, hecho que nos hace pensar que a estos pHs (4 y 5) la unión a nivel molecular de la  $F(ab')_2$  con el PCR está desfavorecida. También se puede comprobar que el tampón MES no proporciona ninguna mejora apreciable en la respuesta del sistema.

### **Temperatura de reacción.**

Las variaciones de la temperatura ejercen una acción muy importante en cualquier reacción química. Sobre las reacciones antigénicas, un aumento de la temperatura puede favorecer o desfavorecer la combinación entre el anticuerpo y su proteína conjugada, dependiendo de la propia naturaleza de ambas moléculas. Por lo general un incremento de temperatura hace disminuir las interacciones electrostáticas atractivas, aumenta la posibilidad de que se establezcan puentes de hidrógeno y afecta ligeramente sobre las interacciones de Lifshitz - van der Waals [2]. Lo cierto es que al aumentar el movimiento browniano de las partículas, se favorece las aproximaciones y los choques entre ellas. Si recordamos la reacción cinética de formación de dímeros (ecuación VI.4), la temperatura va a afectar sobre la constante cinética  $k$ . En nuestros sistemas se ha comprobado que un aumento en el valor de esta variable produce una mejora notable en la respuesta final del sistema. Véase la Figura VI.24.

Sin embargo hay que tener cuidado con no aumentar excesivamente la temperatura, pues la desnaturalización térmica de las proteínas puede empezar a producirse incluso a partir de los 45°C [31]. A la vista de los resultados sería recomendable realizar los experimentos a temperaturas próximas a la corporal donde la inmunoreacción se dará rápidamente sin peligro de que se produzca la desnaturalización de las proteínas que participan en el proceso.

### **Uso de aditivos hidrofílicos.**

Numerosos autores recomiendan el uso de cierta cantidad de polietilenglicol (PEG) en el medio de reacción para así mejorar la reactividad del anticuerpo sobre el antígeno [2,15,32]. El PEG es un polímero altamente hidrofílico cuya estructura molecular es del tipo  $-(CHOH - CHOH)_n-$ . Se supone que tiene el siguiente modo de actuación: al ser moléculas tan

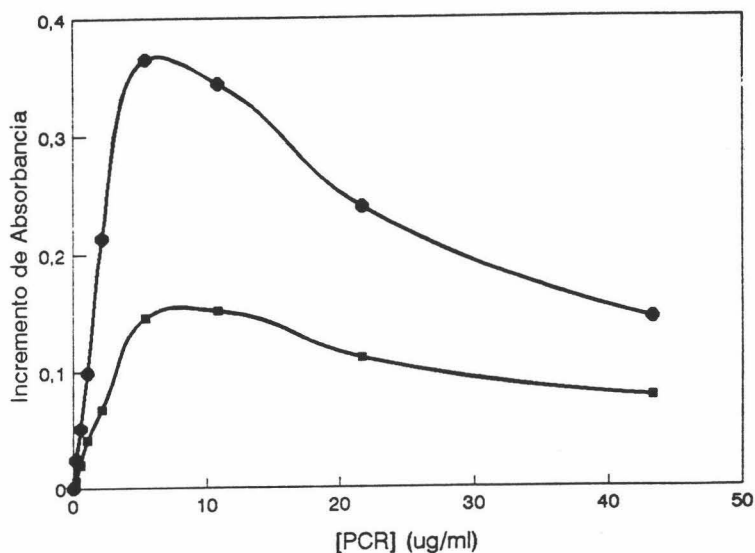


Fig. VI.24. Inmunoreactividad del complejo JL8-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (4.1 mg/m<sup>2</sup>) en BSA salina, tras 5 minutos de reacción a 0°C (■) y a 27°C (●).

hidrofílicas actúan como agentes deshidratantes. Si recordamos la teoría de exclusión molecular (la cual nos dice que cualquier molécula de disolución tiende a excluir a otras moléculas del volumen o dominio que ella misma ocupa), entenderemos el mecanismo de acción de estos aditivos hidrofílicos. El principal efecto que causa la presencia de una cantidad significativa de un polímero no iónico e hidrofílico (tal como el PEG) en un medio de reacción es que las proteínas reactivas (tanto anticuerpos como antígenos) quedan excluidas de las capas de hidratación de las moléculas poliméricas, quedando dichas proteínas (o los complejos látex-proteína) confinadas en un volumen de agua menor. Esto se traduce en un aumento efectivo de su concentración, lo cual origina un aumento de la velocidad de reacción, tal y como predice la ley de acción de masas. Asimismo, pueden deshidratar las regiones de unión del anticuerpo al antígeno, aumentando las interacciones electrostáticas, de van der Waals y de enlaces de hidrógeno entre tales macromoléculas [2].

Lo cierto es que si éste es el mecanismo de acción de los polímeros hidrofílicos no iónicos, no debería influir la longitud de su cadena. Nos propusimos comprobar el efecto de esta variable realizando los siguientes experimentos: para los complejos JL2-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (3.1 mg/m<sup>2</sup>) y JL8-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (4.1 mg/m<sup>2</sup>) se realizaron los inmunoensayos en disoluciones de BSA salina que contenían diferentes cantidades de etilenglicol (CH<sub>2</sub>OH - CH<sub>2</sub>OH, n = 1), PEG 600 cuyas cadenas poliméricas tienen un peso molecular medio de 600 g/mol ( $n_{\text{medio}} = 10$ ), y



PEG 8000 ( $n_{\text{medio}} \approx 130$ ), todos ellos de la casa SIGMA. Las condiciones de reacción fueron:  $\lambda = 570 \text{ nm}$ ; 5 minutos de incubación, y concentración de PCR =  $0.25 \mu\text{g/ml}$ . En este caso tuvimos que reducir la concentración inicial de partículas a  $4 \cdot 10^{10} \text{ part/cm}^3$  pues la cantidad de reactivo que teníamos cuando realizamos estas últimas experiencias era muy limitada. En las Figuras VI.25 y 26 se representan los resultados obtenidos.

Como puede comprobarse, sólo pequeñas concentraciones de PEG 8000 dan lugar a mejoras en la respuesta inmunológica de los reactivos. Es llamativo que ni el etilenglicol ni el PEG 600 produzcan ningún efecto, pues son agentes igualmente hidrofílico/deshidratantes que el PEG 8000; sin embargo no hemos encontrado una explicación lógica que justifique los resultados. No obstante, Price y Newman [2] aseguran que la capacidad que tiene el polietilenglicol para mejorar la inmunoreacción depende de la longitud de las cadenas, y que para cada tipo de inmunoensayo ha de buscarse experimentalmente cuál es la longitud óptima del polímero que proporciona los mejores resultados. También aseguran que la casa comercial que los suministra puede hacer variar tales resultados, pues la distribución de tamaños de cadena dentro de un compuesto que tiene igual denominación (por ejemplo "PEG 6000") puede ser muy amplia (desde 4500 a 7500 g/mol) en unos casos y más estrecha (5500 - 6500 g/mol) para otros.

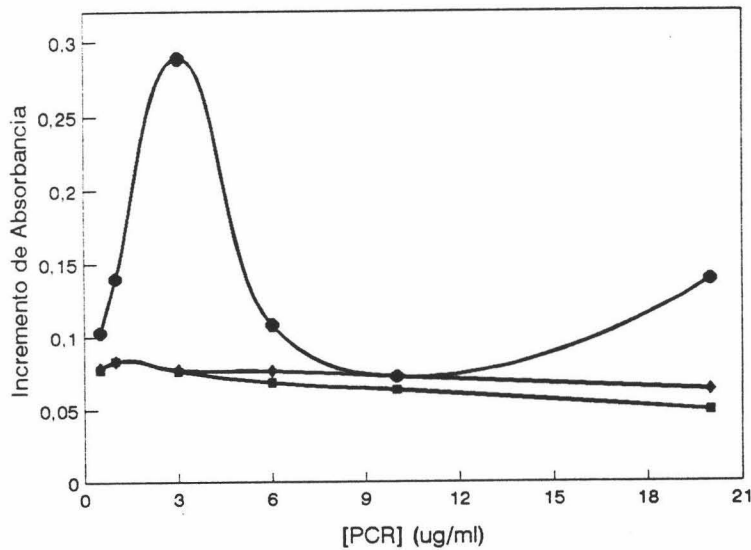


Fig. VI.25. Variación del incremento de absorbancia producido por la aglutinación de los complejos JL2-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR ( $3.1 \text{ mg/m}^2$ ) en función de la cantidad de etilenglicol (■), PEG 600 (◆) y PEG 8000 (●).

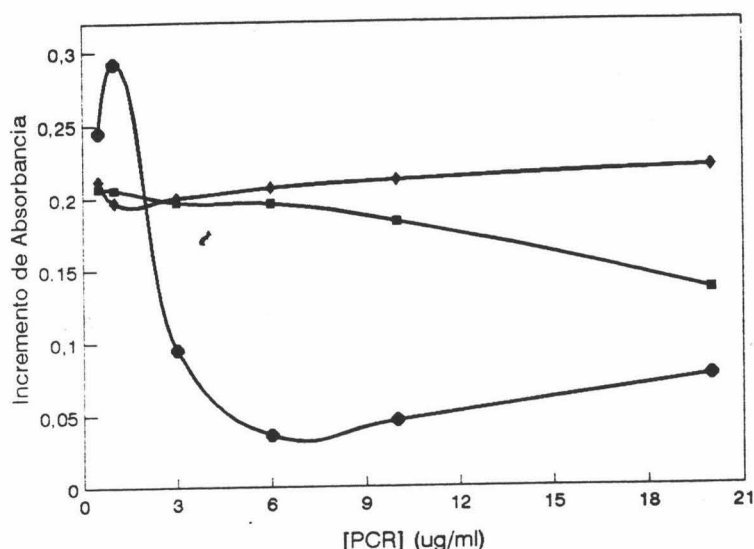


Fig. VI.26. Variación del incremento de absorbancia producido por la aglutinación de los complejos JL8-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR (4.1 mg/m<sup>2</sup>) en función de la cantidad de etilenglicol (■), PEG 600 (◆) y PEG 8000 (●).

Lo que sí está claro es que para cada sistema látex-proteína existe una concentración de PEG 8000 que optimiza el resultado final: 1 % en peso/volumen para los complejos JL8-F(ab')<sub>2</sub> y 3 % (p/v) para el JL2-F(ab')<sub>2</sub>. Para mayores concentraciones el sistema se hace inestable en ausencia de antígeno. Recordemos que la capa de agua que hay alrededor de las partículas ejerce una acción protectora frente a la coagulación (efecto viscoso o hidrodinámico, **Capítulo II**). Conforme aumenta la cantidad de polietilenglicol en el medio, la estructura de la capa de hidratación que rodea los complejos látex-proteína puede variar, disminuyendo su espesor, y por tanto favoreciéndose la agregación de las partículas en ausencia de PCR cuando la fuerza iónica es media o alta. Por ello, esta cantidad óptima de PEG depende de la naturaleza de las partículas.

#### Otros parámetros que afectan a los inmunoensayos LIA.

La naturaleza de la superficie del látex debe influir, al menos teóricamente como a continuación veremos. Ya comprobamos que el signo de la carga de estas partículas portadoras de proteína no parece afectar sobre la orientación con la que se disponen las moléculas proteicas en la interfase látex/disolución, al menos cuando la superficie polimérica

era hidrófoba. Sin embargo, el grado de hidrofobicidad del polímero, además de influir en la cantidad de proteína adsorbida, puede afectar a la disposición de las moléculas, orientándolas de una forma preferencial sobre la subfase sólida. Lu y col [33] demuestran de forma teórica que, considerando únicamente las energías de solvatación y las de Lifshitz - van der Waals para la adsorción de diferentes proteínas sobre diferentes sustratos, existen orientaciones energéticamente favorables. Al variar la naturaleza de la superficie polimérica, estas orientaciones preferenciales cuando una proteína se adsorbe sobre ésta pueden cambiar. Esta hipótesis se podría confirmar con reacciones LIA. Okubo y col [28] ya se plantearon esta idea y proponen el esquema que representamos en la Figura VI.27 para la adsorción de moléculas de IgG sobre una superficie hidrofóbica y una hidrofílica (como puede ser la que proporciona un látex de poliHEMA).

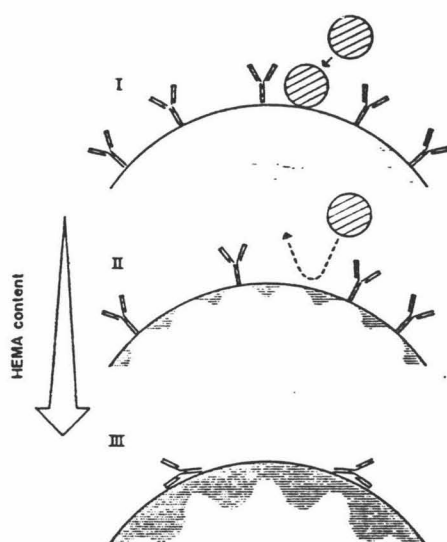


Fig. VI.27. Modelo de la adsorción de IgG sobre partículas de poli(estireno/HEMA) con distintos contenidos relativos de monómeros.

Estos autores obtienen una inmunoreactividad nula cuando trabajan con partículas poliméricas ricas en HEMA, y justifican sus resultados en base a que la disposición que adoptan la mayoría de las moléculas de IgG adsorbidas es de tal forma que sus sitios de unión al antígeno se encuentran ocultos cerca de la superficie de la partícula, y por tanto son

inalcanzables para los epitopos antigénicos. En nuestro caso hemos realizado experiencias inmunológicas con el látex JL10, si bien el seguimiento de la reacción lo hemos realizado visualmente en placa (**Capítulo IV**). Los resultados fueron negativos; no hubo ningún proceso de inmunoaglutinación pese a que probamos diferentes grados de recubrimiento de  $F(ab')_2$  (adsorbidas a diferentes pHs). Resultados como estos también fueron obtenidos por Martín [34] trabajando con látex de igual naturaleza pero con IgG adsorbida en superficie. Por consiguiente, parece ser que el grado de hidrofobicidad/hidrofilicidad afecta a la orientación de las moléculas proteicas que se adsorben sobre las partículas, (además de ser un parámetro que influye de manera importante sobre la cantidad de proteína adsorbida).

Por último, otra variable que también afecta en los tests basados en reacciones LIA es el origen o la naturaleza del anticuerpo unido a las partículas de látex. Nosotros no hemos estudiado la influencia de este parámetro, si bien Price y col [35] han demostrado que afecta muy notablemente al resultado final del inmunoensayo. Al trabajar con IgG de 4 orígenes diferentes, de cabra (Atlantic Antibodies), de oveja (Binding Site), de conejo (Dako) y de conejo (pero esta vez de la casa Serological Reagents), consiguen resultados muy variados: inmunorespuestas nulas con los anticuerpos de oveja, casi nulas con las de cabra, bajas con las de conejo de la casa comercial Serological Reagents y muy altas con las de la casa Dako.

#### VI.4. BIBLIOGRAFÍA.

1. Libros de Investigación y Ciencia. "Inmunología". Ed. Lábor. Barcelona. 1983.
2. C.P. Price y D.J. Newman. "Principles and Practice of Immunoassay". Stockton Press. New York. 1991.
3. M.B. Pepys y M.L. Balz. *Adv. Immunol.* **34** : 141 (1983).
4. R.E. Chambers, J.T. Whicker y P.A. Dieppe. *Clin. Diagnosis Lab.* **1** : 29 (1988).
5. P. Urdal, S.M. Borch, S. Landaas, M.B. Krutnes, G.O. Gogstad y P. Hjortdahl. *Clin. Chem.* **38** : 580 (1992).
6. L. Borque. *Boletín Bibliográfico Behring.* **6** : 13 (1992).
7. M. Stenberg y H. Nygren. *J. Immunol. Methods.* **113** : 3 (1988).
8. A. Sadana y D. Sii. *J. Colloid Interface Sci.* **151** : 166 (1992).
9. H. Kitano, S. Iwai, T. Okubo y N. Ise. *J. Am. Chem. Soc.* **109** : 7608 (1987).
10. J.A. Maroto y F.J. de las Nieves. *Colloids and Surfaces.* **96** : 121 (1995).
11. H. Nakamura y T. Sugiura. "Methods in Immunological Biochemistry". Editores T. Osawa y T. Nagai. Tokyo Kagaku Dojin. Tokyo. 1986.

12. M. Heidelberger y F.W. Kendall. *J. Exp. Med.* **62** : 467 (1935).
13. S. Stoll, V. Lanet y E. Pefferkorn. *J. Colloid Interface Sci.* **157** : 302 (1993).
14. J. Puig. Comunicación personal. Diciembre 1994.
15. J.W. Skoug y H.L. Pardue. *Clin. Chem.* **34** : 300 (1988).
16. J.W. Skoug y H.L. Pardue. *Clin. Chem.* **34** : 309 (1988).
17. G.K. von Schulthess, R.J. Cohen, N. Sakato y G.B. Benedek. *Immunochem.* **13** : 955 (1976).
18. G.K. von Schulthess, R.J. Cohen, N. Sakato y G.B. Benedek. *Immunochem.* **13** : 963 (1976).
19. G.K. von Schulthess, M. Giglio, D.S. Cannell y G.B. Benedek. *Molecular Immunology.* **17** : 81 (1980).
20. P. Montagne, P. Varcin, M.L. Cuillère y J. Duheille. *Bioconjugate Chem.* **3** : 187 (1992).
21. W. Kapmeyer. *Pure & Appl. Chem.* **63** : 1135 (1991).
22. W. Heller y W.J. Pangonis. *J. Chem. Phys.* **26** : 498 (1957).
23. J.L. Ortega-Vinuesa, M.J. Gálvez Ruiz y R. Hidalgo Álvarez. "Trends in colloid and interface Science IX"; en *Progress in Colloid and Polymer Science*. En prensa. 1995.
24. C.D. Platsoucas, T.A. Wilkins, F.N. Hansen, M.E. Jolley, K. Nustad, M. Papamichail, J. Ugelsad y C.J. Wang. "Future Directions in Polymer Colloids". Editores M.S. El-Aasser y R.M. Fitch. NATO ASI Series E Applied Sciences Nº 138. NATO. 1987.
25. H. Waldmann-Meyer y R. Knippel. *J. Colloid Interface Sci.* **148** : 508 (1992).
26. F. Galisteo González. "Adsorción de proteínas sobre modelos coloidales". Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1992.
27. A.V. Elgersma. "Competitive adsorption of albumin and monoclonal  $\gamma$ -globuline molecules on polystyrene surfaces". Tesis Doctoral. Universidad de Wageningen. Holanda. 1990.
28. M. Okubo, Y. Yamamoto, M. Uno, S. Kamei y T. Matsumoto. *Colloid & Polymer Sci.* **265** : 1061 (1987).
29. M. Nakamura, H. Ohshima y T. Kondo. *J. Colloid Interface Sci.* **154** : 393 (1992).
30. E. Lutanie, J.C. Voegel, P. Schaaf, M. Freund, J.P. Cazenave y A. Schmitt. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.* **89** : 9890 (1992).
31. P.L. Privalov. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18** : 47 (1989).
32. K. Hellring. "Automated immunoprecipitin reaction" Editor J.D. Hamm. Technicon Instruments Corporation. Tarrytown (New York). 1972.
33. D.R. Lu, S.J. Lee y K. Park. *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.* **3** : 127. (1991).

34. A. Martín Rodríguez. "Síntesis, caracterización y aplicaciones de coloides poliméricos funcionalizados". Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1993.
35. C.P. Price y D.J. Newman. "1<sup>er</sup> informe cuatrimestral del Proyecto concertado entre el Departamento de Bioquímica Clínica del London Hospital Medical College (Gran Bretaña) y la empresa Instrumentation Laboratories (IL) (U.S.A.). 1992.

**VII. CONCLUSIONES.**

1. Es posible sintetizar partículas poliméricas en ausencia de surfactantes, con un alto grado de monodispersidad. La síntesis puede ser programada para que los polímeros obtenidos difieran en propiedades tan diversas como son el tamaño, la naturaleza y número de grupos polares superficiales, o el grado de hidrofobicidad/hidrofilicidad. De las características interfaciales de tales partículas dependen el comportamiento electroforético y la estabilidad coloidal.
2. Una adecuada caracterización superficial requiere el empleo de técnicas no sólo propias del análisis de polímeros, sino de otras alternativas como pueden ser las técnicas espectroscópicas (IR o  $^1\text{H-RMN}$ ).
3. La adsorción del fragmento  $\text{F(ab')}_2$  depende fuertemente de las características fisicoquímicas de las partículas coloidales que actúan de soporte. A partir de medidas electroforéticas se puede obtener una valiosa información sobre la capa de proteína unida a la superficie. El uso de dicho fragmento proteico mejora la estabilidad de los complejos látex-proteína en comparación con aquellos obtenidos con moléculas de IgG.
4. La coadsorción de BSA se presenta como una alternativa eficaz para conseguir aumentar la estabilidad de partículas con  $\text{F(ab')}_2$  previamente adsorbida. Las cantidades de albúmina que se adsorben dependen del grado de recubrimiento inicial de la superficie polimérica así como del grado de hidrofobicidad y estado eléctrico de ésta.
5. La coadsorción de DSDMA no logra aumentar la estabilidad de los sistemas, si bien puede convertirse en un método de análisis útil para poder conocer la cantidad de grupos de carácter ácido fuerte que se encuentran localizados en la interfase látex/disolución.
6. Existen diversas técnicas ópticas para realizar el seguimiento de la aglutinación de partículas de látex. En función del objetivo que se persiga convendrá detenerse en pensar en las ventajas que proporciona cada una sobre las otras. Para realizar ensayos rutinarios de inmunoanálisis, la turbidimetría se presenta como una técnica

## CONCLUSIONES

---

muy útil. Si nuestro objetivo se centra en detectar pequeñas cantidades de antígeno, recomendamos el uso de la nefelometría o de la anisotropía angular de la luz dispersada, pues pueden trabajar con sistemas muy diluidos.

7. Los complejos látex-F(ab')<sub>2</sub>-aPCR poseen una alta actividad inmunológica, la cual depende de las condiciones fisicoquímicas tanto del medio de adsorción como el de reacción. Por tanto, son sistemas que tienen una potencial aplicación en el desarrollo de test de inmunodiagnosís.



**APÉNDICE I**

**SÍNTESIS DE COLOIDES POLIMÉRICOS**

### A.I.1. INTRODUCCIÓN.

La polimerización en emulsión es un proceso heterogéneo que se produce, y propaga, a través de reacciones químicas radicalarias. Como resultado final se obtienen largas cadenas moleculares cuyos eslabones o unidades repetitivas se llaman monómeros. La amplia variedad de monómeros que existe, permite producir, a nivel industrial, diferentes polímeros coloidales (polibutadieno, copolímeros de butadieno y estireno, acetato de polivinilo, cloruros de polivinilo (PVC), poliestireno ...), encontrándose multitud de aplicaciones, tal y como ya se ha comentado en la introducción de esta memoria.

Para conseguir un polímero mediante polimerización en emulsión sólo hace falta un pequeño número de componentes, aparte del agua que se necesita para llevar a cabo en ella la reacción de polimerización, como son: un monómero que tenga poca solubilidad en agua pero que sea completamente miscible con su polímero, de modo que las partículas que se van formando se empapen de monómero; un surfactante o tensioactivo (aunque no es necesario) que ayude a formar la emulsión inicial a la vez que estabiliza coloidalmente tanto el sistema reaccionante como el sistema final (látex); y por último, un iniciador capaz de generar radicales libres en la fase acuosa. A pesar de esta aparente simplicidad, la variedad de coloides poliméricos es tan extensa que no hay un mecanismo de síntesis unificado que explique la formación de partículas, ni existe una cinética definida. Todo dependerá del uso o no de surfactantes, tipo/s de monómero/s empleado/s, disolvente utilizado, condiciones de reacción (temperatura, fuerza iónica, pH, velocidad de agitación, etc.) y proceso cinético de síntesis (en continuo, semi-continuo, o discontinuo).

Del amplio abanico de posibilidades que encontramos, nos hemos centrado en la polimerización en emulsión de estireno en ausencia de surfactantes. Las razones que han dado lugar a esta elección se justifican a continuación.

a) Inicialmente destacaremos las ventajas que tiene el uso de surfactantes en la síntesis de polímeros: i) solubilizan monómeros que son muy insolubles en agua; ii) determinan el mecanismo de nucleación de las partículas, conocido por **nucleación micelar**, que fue propuesto por Harkins en 1947 [1]; en él se considera que el centro o "locus" más importante del proceso de nucleación de las partículas son las micelas de surfactante rellenas de monómero; iii) el número de partículas nucleadas y, por tanto, la velocidad de polimerización, depende de la concentración de tensioactivo [2]; iv) mantienen la estabilidad coloidal del sistema tanto en el periodo de crecimiento como en el estado final del látex; v) por último,

controlan el tamaño medio de las partículas y su grado de monodispersidad.

Sin embargo presentan ciertos inconvenientes, ya que el empleo de moléculas de surfactante dará lugar a partículas de látex en cuya superficie quedarán adsorbidas. Durante la limpieza de la dispersión coloidal, cierta cantidad del surfactante adsorbido se puede desorber originando una disminución de la estabilidad de las partículas y provocando la coagulación del sistema. Por otro lado, siempre quedarán moléculas de tensioactivo en la superficie del polímero que pueden dificultar la adsorción de otros biopolímeros [3], tales como proteínas o lípidos, o bien pueden llegar a desnaturalizarlos. Como uno de los principales objetivos de este trabajo es la adsorción de la inmunoproteína  $F(ab')_2$ , se ha evitado el uso de surfactantes desde el principio para impedir que éstos cambien las propiedades interfaciales del polímero [4] y compitan con la adsorción del anticuerpo [5].

b) La elección, en nuestro trabajo, del estireno (Figura A.I.1) como monómero, está basada fundamentalmente en que: i) la síntesis de poliestireno está ampliamente estudiada, pudiendo encontrar una extensa bibliografía donde buscar condiciones de reacción y saber combinar las distintas variables que afectan al tamaño final de las partículas [6]; ii) además, estas partículas son esféricas, altamente monodispersas y presentan una permeatividad dieléctrica casi nula, por lo que pueden ser considerados como sistemas modelo; iii) su superficie se caracteriza por ser altamente hidrofóbica, condición indispensable para realizar adsorción física de proteínas; iv) debido a su geometría esférica y a su elevado índice de refracción, las suspensiones coloidales de poliestireno presentan una propiedades ópticas excepcionales para el estudio de la dispersión de luz y el seguimiento óptico de la aglutinación de las partículas de látex.

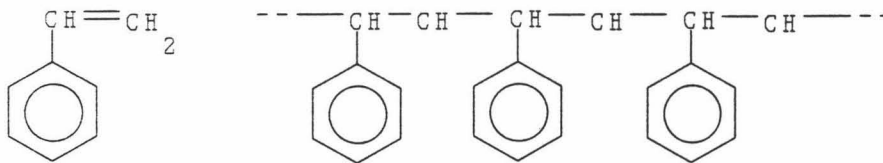


Fig.A.I.1. Moléculas de (a) estireno y de (b) poliestireno.

## A.I.2. REACCIONES IMPLICADAS EN LA POLIMERIZACIÓN EN EMULSIÓN.

El proceso de polimerización suele dividirse en 4 tipos de reacciones principales [7]: iniciación, propagación, terminación y transferencia.

**Iniciación**

La ruptura homolítica del iniciador origina un radical primario capaz de reaccionar con una molécula de monómero formando un monómero radical:



Por lo general la ruptura del iniciador se produce por aumento térmico, por radiación a una longitud de onda determinada o a través de sistemas redox.

**Propagación**

El monómero radical va añadiendo moléculas de monómero sucesivamente, formando una larga cadena de polímero que termina en un radical libre:



siendo  $R_n^{\bullet}$  es un radical macromolecular que contiene  $n$  monómeros.

**Terminación**

Dos radicales poliméricos pueden combinarse dando lugar a una única molécula polimérica (terminación por combinación)

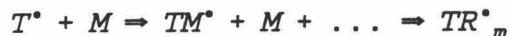
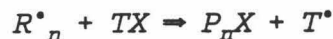


o bien reaccionar entre ellos, cediendo uno el electrón libre, dando lugar a dos macromoléculas de polímero donde una de ellas presenta una insaturación terminal (terminación por desproporción).



### Transferencia

Puede ocurrir que el radical polimérico que está creciendo reaccione con alguna molécula que posea un átomo de hidrógeno o un halógeno (X) en su estructura, pasando éste a terminar con el crecimiento del polímero radicalario y transfiriéndose el radical libre a la nueva molécula, la cual puede adicionar nuevas moléculas de monómero, comenzando el crecimiento de una nueva cadena.



Esta molécula de transferencia (TX) puede ser un monómero, una molécula de disolvente, una molécula polimérica o cualquier otra especie química que pueda estar presente en el medio de reacción como impureza.

### A.I.3. MECANISMOS DE POLIMERIZACIÓN

Aunque sea pequeño el número de componentes que se necesitan para sintetizar un polímero, la cinética y mecanismos de reacción pueden ser extremadamente complejos [8,9,10]. Se acepta que el proceso de síntesis puede dividirse en dos subprocesos generales: **nucleación** y **crecimiento** de las partículas.

Como comentamos anteriormente, en presencia de surfactantes el mecanismo de nucleación es el micelar. Sin embargo, en ausencia de tales tensioactivos el mecanismo por el cual transcurre la polimerización aún no está completamente definido. Tanto la nucleación como el proceso de crecimiento pueden darse simultáneamente a través de uno o más mecanismos que veremos a continuación. La nucleación de la partícula es el proceso más importante y a la vez más controvertido. Su importancia radica en que de él depende el número de partículas presentes en el sistema y, por tanto, la velocidad de polimerización y el tamaño final de las partículas de látex. Sin embargo, existen problemas para determinar qué tipo de mecanismo de nucleación tiene lugar en la síntesis polimérica, pues éste depende en cada caso de la naturaleza del monómero y de las condiciones experimentales. Podemos hablar de dos mecanismos generales:

### **Nucleación homogénea**

Aunque es más aplicable a la síntesis de polímeros cuyos monómeros poseen una solubilidad en agua relativamente grande (cloruro de vinilo (170 mM) o acetato de vinilo (290 mM)), está propuesto como el mecanismo primario o general para la formación de partículas en ausencia de surfactantes [11,12].

En nuestro caso tendremos estireno y agua en un sistema con agitación. Habrá moléculas de monómero disueltas en el disolvente (la solubilidad del estireno en agua es 3.5 mM), pero la mayoría estará localizado en gotas de monómero que actuarán como "almacén" de reactivo. De acuerdo con la teoría de nucleación homogénea, los radicales libres cargados, que se han generado en la fase acuosa por ruptura del iniciador, reaccionan con monómero soluble formando radicales oligoméricos solubles. Estos van creciendo hasta que exceden su límite de solubilidad en agua y tienden a precipitar entre ellos. El precipitado de los oligómeros da lugar a partículas primarias de polímero que pueden absorber o captar moléculas de monómero y crecer por propagación. La estabilización de las partículas, tanto primarias como finales, se debe al mecanismo de estabilización electrostática originado por la presencia de los grupos cargados del iniciador en la superficie de la microesfera.

Este mecanismo de nucleación no es el único posible, pues hay evidencias experimentales de que en algunos casos existe una formación de partículas por fenómenos coagulativos.

### **Nucleación coagulativa**

Se ha propuesto que la nucleación de partículas transcurre en dos etapas [13]. De acuerdo con este planteamiento, en un primer paso se forman partículas "precursoras" (diámetro 3 nm) a través de nucleación homogénea. Luego, se forman partículas de látex "maduras" por floculación o agregación de las precursoras, debido a la pobre estabilidad que poseen como consecuencia de su alto grado de curvatura superficial.

El crecimiento se dará por floculación y por propagación de la reacción de polimerización en las partículas que estarán empapadas de monómero.

Estos mecanismos están esquematizados en la Figura A.I.2.

También podría darse polimerización en las gotas de monómero; sin embargo, la probabilidad de que esto ocurra es muy pequeña, debido a que el área superficial que presentan es casi despreciable en comparación con la superficie total de todas las partículas en crecimiento. Aproximadamente la razón de superficies gotas/partículas es de 1/5000.

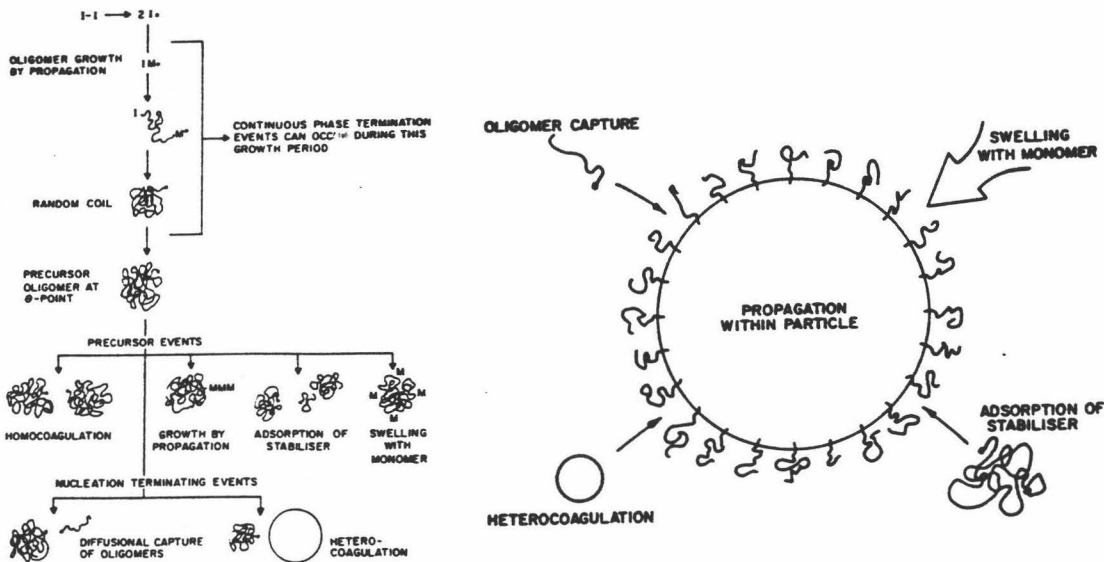


Figure 18: Schematic diagram of the events in coagulative nucleation.

Fig.A.I.2. Diagramas de (a) nucleación y (b) crecimiento de partículas poliméricas.

**A.I.4. CONDICIONES DE SÍNTESIS.**

Nuestro objetivo se ha centrado en la obtención de coloides de poliestireno que difieran en las características superficiales. Ya que el monómero es una variable que hemos fijado a priori, las diferencias entre nuestros sistemas vienen determinadas principalmente por los grupos polares que se encuentran en la superficie y cuya naturaleza depende del tipo de iniciador empleado en la síntesis. Con esta idea se han obtenido látex con grupos sulfonato, carboxilo, amidino e hidroxilo.

En todos los casos el estireno utilizado (Merck) era previamente destilado a presión reducida (40°C y 10 mmHg) con el fin de eliminar los inhibidores de la polimerización. El agua empleada fue bidestilada y posteriormente desionizada a través del dispositivo *Milli-Q, Reagent Water System* (Millipore) en donde el agua pasa primero por una columna de carbón activo, luego por un lecho de resinas cambiadoras de iones y finalmente por un filtro de 0.2 µm de tamaño de poro.

Para la síntesis de los látex con grupo sulfonato, el sistema de reacción fueron botellas de



250 ml, que giraban en un baño termostatzado a 35 r.p.m., tal y como puede verse en la Figura A.1.3. Para el resto de los látex que se sintetizaron el reactor empleado fue un matraz de tres bocas inmerso en un baño de agua a la temperatura de reacción. A través de la boca central pasa el eje de agitación (conectado a un rotor de velocidad regulable), el cual se une al matraz por un adaptador que le permite girar sin rozamiento y sin que haya pérdidas por evaporación. En otra de las bocas laterales se encuentra un sistema de reflujo, refrigerado por un circuito de agua, que impide el escape de materiales volátiles del sistema. La última entrada del matraz se acondiciona para hacer pasar una corriente de  $N_2$  que mantiene una atmósfera inerte en el interior. El nitrógeno también se hacía burbujear en la disolución de agua y estireno, antes de añadir el iniciador, para arrastrar el  $O_2$  y  $CO_2$  que pudieran estar disueltos. Este sistema de reacción también se representa en la Figura A.1.3.

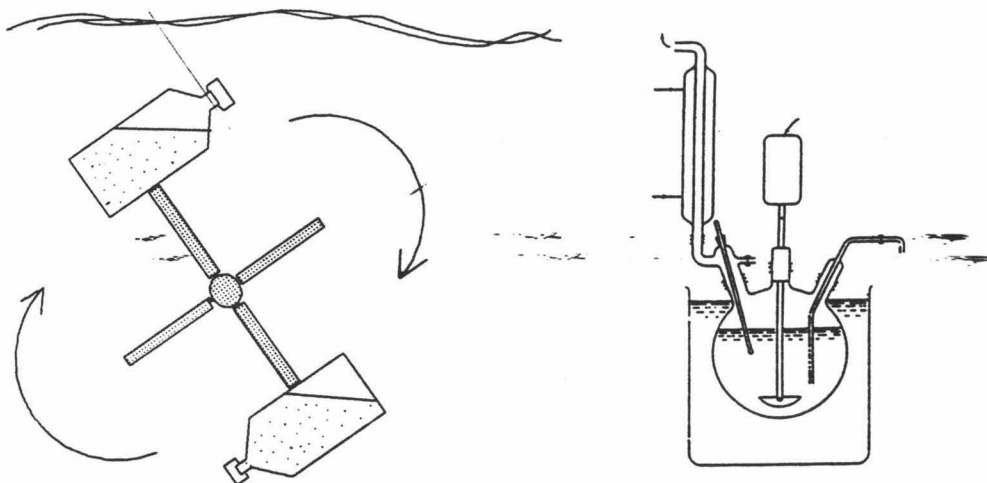


Fig. A.1.3. Diferentes reactores empleados en la síntesis de látex.

En el extremo del eje que está inmerso en la disolución se encuentra una paleta de teflón situada a 1 cm sobre el fondo del matraz para conseguir unas condiciones hidrodinámicas óptimas [6].

#### Polímeros con funcionalidad sulfonato en superficie.

Los grupos superficiales de estos látex son de carácter ácido fuerte ( $-SO_3H$ ), y tienen la ventaja, si comparamos con los grupos sulfato ( $-SO_4H$ ) de otros tipos de látex, de ser resistentes al proceso de hidrólisis [14]. Las condiciones de síntesis están basadas en los estudios de D. Bastos [15]. Para producir los primeros radicales se empleó un sistema



iniciador tipo redox: persulfato/bisulfito. La reacción que tiene lugar es la siguiente



En la primera reacción se producen radicales sulfato y sulfonato, y en la segunda sólo sulfonato. El medio de reacción se tamponó con bicarbonato sódico para minimizar la reacción de Kolthoff [16], que conduce a la generación de grupos hidroxilo a partir de grupos sulfato.

La reacción que tiene lugar es una copolimerización en emulsión entre dos monómeros: estireno (St) y estirensulfonato de sodio (NaSS) (Fluka), el cual representamos en la Figura A.I.4. Si se trabaja en dos etapas se pueden conseguir muestras con tamaño parecido y diferente densidad superficial de carga. En un primer paso se sintetizará un látex que hará de siembra (o "core") en una segunda inyección de monómeros. Cuando la primera reacción de polimerización haya alcanzado el 90% de conversión, se añade una nueva mezcla de monómeros más rica en NaSS, de la que dependerá la densidad superficial de carga final. El tamaño de las partículas "core" sólo aumentará en unos pocos nanómetros.

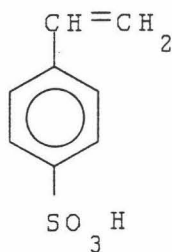


Fig. A.I.4. Molécula de estirensulfonato de sodio

De esta forma se obtuvieron dos látex con grupos sulfonato en superficie. El JL1 se sintetizó en una única etapa; las condiciones de reacción se presentan en la Tabla A.I.1. Esta síntesis se realizó por duplicado, para utilizar una de las muestras como siembra en la obtención de otro látex.

H <sub>2</sub> O (ml)	St (g)	NaSS (mg)	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (mg)	NaHSO <sub>3</sub> (mg)	NaHCO <sub>3</sub> (mg)	Agitac. (r.p.m.)	T <sup>º</sup> (°C)	t. r. (h.)
140	20.0	86	182	71	94	35	45	9

Tabla A.I.1. Condiciones de síntesis del látex JL1. (t.r. es el tiempo de reacción).

La formación de este tipo de partículas se explica [17] por un mecanismo de nucleación homogénea, donde una gran cantidad de oligómeros muy ricos en NaSS y estables en la fase acuosa originarían las partículas primarias de crecimiento por posteriores uniones de St.

Como apuntamos anteriormente, el látex JL2 se sintetizó tomando las partículas de JL1 como núcleos de la polimerización. En la Tabla A.I.2. aparecen las cantidades de reactivos que se añadieron en la segunda inyección.

H <sub>2</sub> O (ml)	St (g)	NaSS (mg)	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (mg)	NaHSO <sub>3</sub> (mg)	NaHCO <sub>3</sub> (mg)	Agitac. (r.p.m.)	T <sup>º</sup> (°C)	t (h.)
14	4.0	344	15	12	19	35	45	10

Tabla A.I.2. Condiciones de síntesis del látex JL2. (t.r. es el tiempo de reacción).

Kim [17] postula que el mecanismo mediante el cual las moléculas de NaSS se incorporan a las partículas de polímero empieza por la reacción de éstas con las del estireno disuelto en agua formando oligoradicales superficialmente activos que tienden a absorberse en las partículas que aún están hinchadas o empapadas con monómero; una vez que se absorben estos radicales continúa la polimerización de ellos dentro de la partícula, impidiendo una salida reversible hacia la fase acuosa.

La razón entre las concentraciones de SSNa y St empleadas en este trabajo han permitido crear dos coloides de igual tamaño, altamente monodispersos.

#### Polímeros con funcionalidad carboxilo en superficie.

Se obtuvieron tres látex (JL3, JL4 y JL7) de estas características. Todos ellos se sintetizaron

en una sola etapa, empleando estireno como único monómero. Los grupos carboxilos que aparecerán en las partículas provienen del iniciador empleado en la síntesis: el 4,4' - Azobis (4 ácido cianopentanoico) (ACPA) de la casa Aldrich (Figura A.I.5). Este azo compuesto, térmicamente inestable, origina los radicales libres por ruptura homolítica de la molécula, desprendiendo en la reacción nitrógeno gaseoso. Las condiciones de síntesis se escogieron en base a los estudios realizados por Guthrie [18]; éstas se encuentran esquematizadas en la Tabla A.I.3.

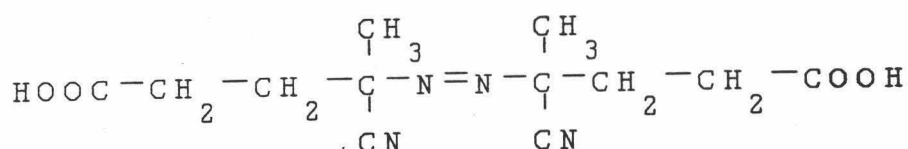


Fig. A.I.5. Molécula del iniciador ACPA.

Látex	H <sub>2</sub> O (ml)	St (g)	ACPA (mg)	NaOH (mg)	Agitac. (r.p.m.)	T <sup>a</sup> (°C)	t. r. (h.)
JL3	720	25.1	372	83	350	80.6	7
JL4	720	20.0	160	96	350	80.6	20
JL7	721	33.4	1480	372	350	80.6	22

Tabla A.I.3. Condiciones de síntesis de los látex JL3, JL4 y JL7. (t.r. es el tiempo de reacción).

El hidróxido sódico empleado aumentó la basicidad del medio de reacción (pH10) con el fin de solubilizar el iniciador de una forma rápida.

En estos tipos de látex no se pueden variar independientemente el tamaño y la densidad superficial de carga de las partículas. Para salvar este problema, planteamos un par de estrategias, en las que no se empleó el ACPA como iniciador, realizando las síntesis en dos etapas similares a las vistas en el apartado anterior: por un lado, se copolimerizó estireno y

ácido acrílico (AA) (previamente destilado), y por otro, se llevó a cabo una terpolimerización de St, SSNa y AA. Aunque se consiguieron partículas monodispersas, en el proceso de limpieza de los látex obtenidos surgieron dificultades que impidieron purificar las disoluciones coloidales, por lo que desechamos utilizar estos polímeros, centrándonos sólo en la caracterización de los obtenidos con el iniciador ACPA.

**Polímeros con funcionalidad amidino en superficie.**

Se sintetizó un único látex con estas características: el **JL8**. Las condiciones de la síntesis se establecieron en base a los trabajos de Guthrie [18], Martín [3] e Hidalgo y col. [19]. Se llevó a cabo una homopolimerización de estireno que dio lugar a partículas coloidales estabilizadas por los grupos cargados que provienen del iniciador empleado: el hidrocloreuro de azobis N,N' dimetilen isobutilamidina (ADMBA 2HCl), suministrado por el Dr. J.W.S. Goossens, de la compañía Bayer AG (Leverkusen, Alemania). Figura A.I.6.

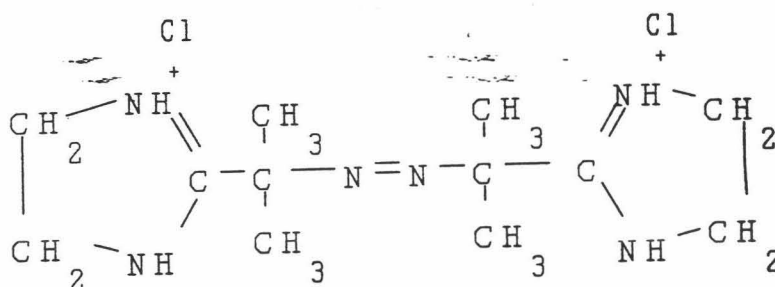


Fig. A.I.6. Molécula del iniciador ADMBA.

La reacción se llevó a cabo en una etapa en las condiciones de síntesis que se muestran a continuación

H <sub>2</sub> O (ml)	St (g)	ADMBA (mg)	CIH(35%) (ml)	Agitac. (r.p.m.)	T <sup>a</sup> (°c)	t. r. (h.)
720	27.3	488	390	350	50	24

Tabla A.I.4. Condiciones de síntesis del látex JL8. (t.r. es el tiempo de reacción).

Como puede verse, se acidificó el medio hasta alcanzar un pH de 2.9, para aumentar la solubilidad del iniciador catiónico.

**Polímeros con funcionalidad hidroxilo en superficie.**

Para lograr sintetizar partículas con este grupo superficial se recurrió a la copolimerización de estireno y 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) (Merck) cuya fórmula química representamos en la Figura A.I.6. Basándonos en las recetas de diferentes autores [20,21,22], escogimos dos estrategias diferentes en la síntesis: por un lado se sintetizó un látex en una etapa, pero la muestra final resultó polidispersa; en el segundo caso se obtuvo un látex, el **JL10**, en un proceso de dos etapas ("core-shell"), donde la naturaleza del núcleo fue de poliestireno, usando el iniciador redox persulfato/bisulfito en su síntesis. Sobre esta siembra se añadió St, HEMA e iniciador. Las condiciones de reacción se resumen en la Tabla A.I.6.

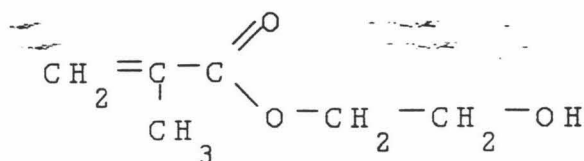


Fig. A.I.7. Molécula del monómero HEMA.

	H <sub>2</sub> O (ml)	St (g)	HEMA (g)	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (mg)	NaHSO <sub>3</sub> (mg)	NaHCO <sub>3</sub> (mg)	Ag. (rpm)	T <sup>a</sup> (°c)	t.r. (h)
1 <sup>a</sup> et.	400	20.0	---	260	102	166	350	70	15
2 <sup>a</sup> et.	10	11.7	3.0	100	---	---	350	70	7

Tabla a.I.5. Condiciones de síntesis del látex **JL10**. (t.r. es el tiempo de reacción).

## A.I.5. LIMPIEZA DE LOS LÁTEX.

Una vez que se ha obtenido una disolución coloidal, es necesario realizar un proceso de purificación con el fin de retirar restos de monómero que no han reaccionado, pequeñas cadenas de polielectrolito y diversos electrolitos disueltos en el medio. Sin este proceso de limpieza sería muy difícil, por no decir imposible, conseguir una caracterización superficial adecuada y fiable, así como los posteriores estudios que pretendemos realizar. Por ejemplo, la utilización o no de métodos de limpieza suficientemente efectivos, puede llevar a obtener densidades superficiales de carga muy diferentes aunque el método de polimerización sea prácticamente el mismo [23].

Hay varios métodos de purificación de látex que han sido estudiados por diferentes autores [24,25,26,27]. Con los tratamientos más enérgicos, por ejemplo, ciclos de centrifugación-decantación-redispersión, se pueden eliminar los polielectrolitos que estén más débilmente adheridos a la superficie del coloide. En nuestro trabajo hemos empleado tres procedimientos diferentes de limpieza: centrifugación, desplazamiento de suero y cambio iónico con resinas. Una vez terminada la reacción de polimerización en todos los látex, el primer paso fue filtrar el producto a través de lana de vidrio (Merck), previamente hervida, para eliminar grumos y coágulos formados en la síntesis, por una posible polimerización en las gotas de monómero.

Posteriormente, las muestras fueron sometidas a tres ciclos de centrifugación/redispersión en donde el sobrenadante se separaba del precipitado por decantación, y luego se diluía éste en agua desionizada. En segundo lugar se introdujeron las disoluciones coloidales en un dispositivo conocido como *Serum Replacement* (Micro Filtration Systems, MFS) y que aparece en la Figura A.I.8.

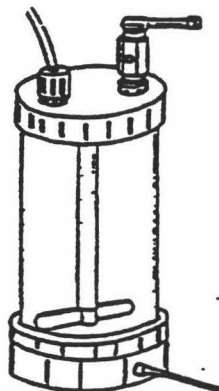


Fig. A.I.8. Dispositivo de limpieza "Serum Replacement".

En la base del cilindro central (donde se encuentra el látex), se coloca una membrana semipermeable (Nucleopore) de tamaño de poro adecuado, que impide el escape de las partículas; por la parte superior se hace pasar un flujo de agua que va arrastrando las impurezas que aún puedan estar solubilizadas en la fase acuosa. Simultáneamente, un caudal de líquido abandona el dispositivo por la parte inferior. A intervalos de tiempo se controla la conductividad de este suero y se considerará que el látex está limpio cuando el valor de ésta se hace estacionario y similar al del agua desionizada (aproximadamente 0.7  $\mu\text{s}/\text{cm}$ ). Debemos tener en cuenta que la conductividad de la disolución coloidal siempre será mayor debido a la existencia de iones que neutralizan la carga superficial de las partículas.

De esta forma se purificaron los látex JL3, JL4, JL7 Y JL8. Debido a que en las muestras que poseen grupos ácido fuerte en su superficie (JL1, JL2 y JL10) éstos no se encuentran en la forma iónica adecuada que permita su valoración, y por tanto la determinación de sus densidades superficiales de carga, fue necesario hacer un intercambio iónico. Hay dos alternativas posibles para alcanzar tal fin: uno de los métodos es pasar una disolución diluida de ácido por el Serum Replacement para favorecer el intercambio de los diversos contraiones por protones; posteriormente, se elimina el exceso de ácido volviendo a pasar agua desionizada por el sistema. El otro método, el cual hemos empleado, consiste en la incubación del látex con resinas de cambio iónico; las resinas que se utilizaron fueron de la casa Amberlite y proporcionadas por la empresa Biokit S.A. (Barcelona).

Los valores de pH y conductividad después del proceso de limpieza, así como el rendimiento de la reacción de polimerización y el contenido final en sólido de todas las muestras, aparecen en la Tabla A.I.6.

Estos datos son previos a la incubación de los látex JL1, JL2 y JL10 con resinas, ya que este paso se realizó únicamente sobre el volumen de muestra que posteriormente sería valorado. Aunque el rendimiento de la polimerización fue alto, siempre se perdía polímero en los coágulos que retirábamos con la lana de vidrio; la presencia de grumos fue significativamente mayor en las disoluciones JL4 y JL10.

Látex	Rendimiento (%)	Conductividad ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ )	pH	Contenido en sólido (%)
JL1	87	5.9	5.2	2.12
JL2	88	10.5	5.1	5.73
JL3	83	9.4	7.0	5.65
JL4	73	7.8	5.5	5.24
JL7	82	9.8	7.8	7.27
JL8	83	9.3	4.9	4.89
JL10	65	7.0	4.3	5.81

Tabla A.I.6. Algunas de las características finales de los látex sintetizados y limpiados.

#### A.I.6. BIBLIOGRAFÍA.

1. W.D. Harkins. *J. Am. Chem. Soc.* **69** :1428 (1947).
2. W.V. Smith y R.H. Ewart. *J. Chem. Phys.* Vol.16, N<sup>o</sup>6 : 592 (1948).
3. A. Martín Rodríguez. "Síntesis, caracterización y aplicaciones de coloides poliméricos funcionalizados". Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1993.
4. F. Galisteo González, M.A. Cabrerizo Vilchez y R. Hidalgo Álvarez. *Colloid Polym. Sci.* **269** : 406 (1991).
5. J.W.Th. Lichtenbelt, W.J.M. Heuvelsland, M.E. Oldenzeel y R.L.J. Zsom. *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces.* **1** :75 (1993).
6. J.W. Goodwin, J. Hearn, C.C. Ho y R.H. Ottewill. *Colloid Polymer Sci.* **252** : 464 (1974).
7. F. Candau y R.H. Ottewill. "An Introduction to Polymer Colloids". Kluwer Academic Publishers. Holanda. 1990.
8. D.C. Blackley. "Emulsion Polymerization". Applied Science. Londres. 1975.
9. J.W. Vanderhoff. "Vinyl Polimerization II". Dekker. New York. 1969.
10. G.Lichti, R.G. Gilbert y D.H. Napper. "Emulsion Polymerization". Academic. New York. 1982.



11. B. Jacobi. *Angew. Chem.* **64** : 539 (1952).
12. J.W. Priest. *J. Phys. Chem.* **56** : 1077 (1952).
13. D.H. Napper y R.H. Gilbert. *Makromol. Chem.* **10** : 503 (1987).
14. M.S.D. Juang y I. Krieger. *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* **14** : 2089 (1976).
15. D. Bastos González. "Coloides modelo de poliestireno sulfonatados: preparación, propiedades electrocinéticas y estabilidad coloidal". Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada. 1992.
16. I.M. Kolthoff y I.K. Miller. *J. Am. Chem. Soc.* **73** : 3055 (1951).
17. J.M. Kim, M. Chainey, M.S. El-Aasser y J.W. Vanderhoff. *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* **27** : 3187 (1989).
18. W.H. Guthrie. "New free radical initiators and their use in the preparation of polystyrene polymer colloids". Tesis Doctoral. Universidad de Lehigh. 1985.
19. R. Hidalgo Álvarez, F.J. de las Nieves, A.J. van der Linde y B.H. Bijsterbosch. *Colloids and Surfaces.* **21** :259 (1986).
20. H. Tamai, H. Hasegawa y T. Suzawa. *J. Appl. Polym. Sci.* **38** : 403 (1989).
21. M. Okubo, Y. Yamamoto, M. Uno, S. Kamei y T. Matsumoto. *Colloid & Polymer Sci.* **265** : 1061 (1987).
22. A. Kondo, S. Oku y K. Higashitani. *Biotechnology and Bioengineering.* **37** : 537 (1991).
23. F.J. de las Nieves, E.S. Daniels y M.S. El-Aasser. *Colloids and Surfaces.* **60** : 107 (1991).
24. D.E. Yates, R.H. Ottewill y J.W. Goodwin. *J. Colloid Interface Sci.* **62** : 356 (1977).
25. S.M. Ahmed, M.S. El-Aasser, G.H. Pauli, G.W. Poehlein y J.W. Vanderhoff. *J. Colloid Interface Sci.* **2** : 388 (1980).
26. Y. Chonde y J.M. Krieger. *J. Colloid Interface Sci.* **77** : 138 (1980).
27. K.H. van Streum, W.J. Belt, P. Piet y A.L. German. *Eur. Polym. J.* **27** : 931 (1991).

**APÉNDICE II**

**ESPECTROSCOPIA DE FOTOCORRELACIÓN**

## A.II. ESPECTROSCOPÍA DE FOTOCORRELACIÓN (PCS).

Como ya se ha podido comprobar en esta memoria, la técnica PCS ha sido empleada tanto en la determinación de los tamaños de las partículas poliméricas, como para estudiar los procesos de inmunoagregación de los complejos látex-F(ab')<sub>2</sub>-antiPCR. Por ello haremos una breve descripción de la teoría de esta dispersión dinámica (o elástica) de luz, así como del dispositivo utilizado. Empezaremos por la parte instrumental.

### A.II.1. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

El instrumento empleado (System 4700c) fue suministrado por la casa comercial Malvern Instruments. En la Figura A.II.1 aparecen esquematizadas las partes principales de las que consta el aparato.

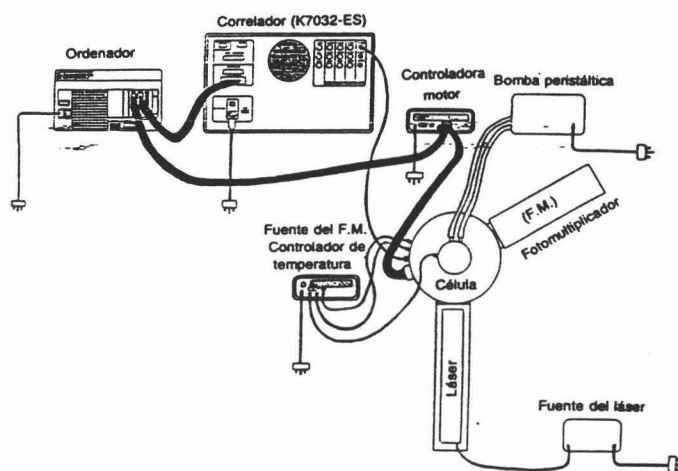


Fig. A.II.1. Dispositivo System 4700c (Malvern Instruments).

Podemos dividirlos en los siguientes apartados:

- Una fuente de luz láser. Para la medida de los tamaños de partícula el láser empleado fue de Helio-Neon, modelo 05 LLP851 (Melles Griots), cuya longitud de onda en el vacío es de 632.8 nm y posee una potencia de 5mW. Para conocer las distribuciones angulares de la luz dispersada por las partículas y en el seguimiento de la reacción inmunológica, la fuente de luz fue un láser de Argón, enfriado por aire, modelo 2213 (Cyonics), de  $\lambda_0 = 488$  nm, 14.7 mW de potencia y polarización perpendicular al plano de dispersión.

- Una cámara de termostatación, aislada de la luz exterior y conectada con un sistema de filtración de agua, dentro de la cual se sitúa una cubeta cilíndrica de cuarzo que contiene la muestra problema.
- Un fotomultiplicador fijado sobre un soporte giratorio con un goniómetro, de precisión  $\pm 0.1^\circ$ , que permite situar el detector en un ángulo comprendido entre  $10^\circ$  y  $150^\circ$  respecto a la dirección del rayo incidente. El fotomultiplicador es capaz de detectar un fotón cada 50 ns.
- Un correlador, cuya función detallaremos posteriormente, conectado a un ordenador personal para análisis y representación de los resultados.
- Una mesa antivibratoria sobre la que descansa todo el dispositivo.

### A.II.2. TEORÍA DE LA DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ.

Las partículas suspendidas en el seno de una disolución poseen un movimiento aleatorio o browniano y cuya velocidad está determinada por el coeficiente de difusión de las mismas. Este hecho es el responsable de que el campo eléctrico de la luz dispersada por la disolución coloidal fluctúe con el tiempo. La técnica PCS se basa en un fenómeno conocido como correlación, que relaciona el campo eléctrico de la luz que llega al detector en dos instantes de tiempo cercanos,  $t$  y  $t + \tau$ . El campo eléctrico ( $E$ ) en esos instantes tendrá valores diferentes, pero si  $\tau$  es menor que el tiempo de fluctuación de la señal,  $E(t + \tau)$  y  $E(t)$  estarán muy próximos, por lo que se dice que están correlacionados. A medida que  $\tau$  aumenta, los valores de  $E(t + \tau)$  y  $E(t)$  se van haciendo diferentes, desapareciendo la correlación entre ambos. Veremos que del análisis de la correlación se puede conocer el coeficiente de difusión de los dispersores y, de ahí, su tamaño.

Consideremos inicialmente el caso más simple: cuando sólo existen dos partículas. Imaginemos estos centros de dispersión idénticos fijos el espacio y sometidos a la acción de una misma fuente de luz. Si se observa la dispersión en un punto alejado de ambos encontraremos una diferencia de fase entre las ondas dispersadas, y la intensidad del campo eléctrico total en ese punto,  $E_D$ , dependerá de dicha diferencia de fase. Si cambiamos la posición relativa de las partículas  $E_D$  se modificará, al igual que la intensidad de luz dispersada. Para el caso de  $N$  partículas idénticas situadas al azar,  $E_D$  estará distribuido como una gaussiana centrada en cero y media cuadrática  $NE^2$ , siendo  $E$  la intensidad del campo dispersado por una partícula.

El campo incidente es una onda que se propaga en el medio con una amplitud de campo  $E_0$ , una frecuencia  $\omega_0$  y un vector de onda  $k_0$  que tiene una magnitud  $2\pi n/\lambda_0$  donde  $\lambda_0$  es la

longitud de onda de la radiación incidente y  $n$  es el índice de refracción de la disolución. De modo análogo la luz dispersada a un ángulo  $\theta$  se caracteriza por un vector de onda  $k_s$ , de magnitud  $2\pi n/\lambda_s$ , tal y como se representa en la Figura A.II.2.

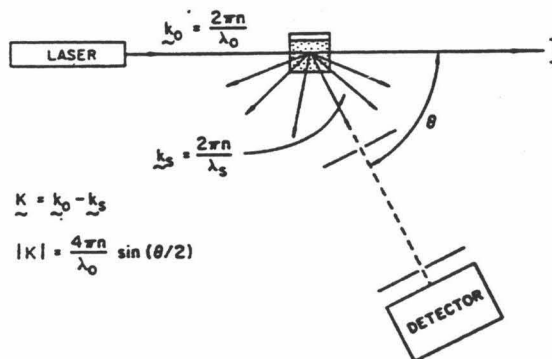


Fig. A.II.2. Esquema del experimento de luz láser.

Podemos representar el campo incidente como

$$E(r, t) = E_0 e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega_0 t)} \tag{A.II.1}$$

donde  $r$  es el vector de posición respecto de algún origen fijo, en el que la fase  $\phi = \vec{k}_0 \cdot \vec{r}$  es cero. Para el caso de que los centros dispersantes se pueden mover unos con respecto a otros, se puede calcular el valor de  $E_0$ . La intensidad del campo observado en el punto P y que proviene de cada punto de dispersión  $j$ , vendrá dada por

$$E_j(r, t) = A_j e^{i(\phi_j - \omega_0 t)} \tag{A.II.2}$$

donde la amplitud  $A_j$  depende de la orientación y movimiento interno del centro dispersor.

La fase  $\phi_j$  es igual a

$$\phi_j = \vec{k}_0 \cdot \vec{r}_j - \vec{k}_d \cdot \vec{r}_j = (\vec{k}_0 - \vec{k}_d) \cdot \vec{r}_j = \vec{K} \cdot \vec{r}_j \quad (\text{A.II.3})$$

siendo  $K$  el vector de dispersión o de scattering. Como las longitudes de onda de de la luz incidente y dispersada es la misma ( $\lambda_0 = \lambda_d$ ) también lo son  $|k_0| = |k_d|$ . Por tanto la magnitud de  $K$  será

$$K = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \text{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{A.II.4})$$

luego

$$E_j(r, t) = A_j(t) e^{i(\vec{K} \cdot \vec{r}_j - \omega_0 t)} \quad (\text{A.II.5})$$

El campo producido por  $N$  centros de dispersión en un instante  $t$  será

$$E_D(r, t) = \sum_{j=1}^N E_j(r, t) = \sum_{j=1}^N A_j(t) e^{i(\vec{K} \cdot \vec{r}_j - \omega_0 t)} \quad (\text{A.II.6})$$

y para un tiempo posterior  $t + \tau$

$$E_D(r, t + \tau) = \sum_{j=1}^N E_j(r, t + \tau) = \sum_{j=1}^N A_j(t + \tau) e^{i(\vec{K} \cdot \vec{r}_j - \omega_0(t + \tau))} \quad (\text{A.II.7})$$

Es ahora cuando podemos definir la función de autocorrelación del campo eléctrico, expresada como

$$C(\tau) = \langle E_D^*(t) E_D(t + \tau) \rangle \quad (\text{A.II.8})$$

que, como ya dijimos, relaciona los valores del campo eléctrico de la luz dispersada hacia el detector en dos instantes diferentes de tiempo. El superíndice \* indica complejo conjugado. La función de autocorrelación puede presentarse de forma normalizada.

$$\gamma(\tau) = \frac{\langle E_D^*(t) E_D(t+\tau) \rangle}{\langle [E_D(t)]^2 \rangle} \quad (\text{A.II.9})$$

y desarrollando términos lo que tendremos será

$$\gamma(\tau) = \frac{\left\langle \sum_{j=1}^N A_j^*(t) e^{-i(\vec{k} \cdot \vec{r}_j(t) - \omega_0 t)} \cdot \sum_{m=1}^N A_m(t+\tau) e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r}_m(t+\tau) - \omega_0(t+\tau))} \right\rangle}{\left\langle \sum_{j=1}^N A_j^*(t) e^{-i(\vec{k} \cdot \vec{r}_j(t) - \omega_0 t)} \cdot \sum_{m=1}^N A_m(t) e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r}_m(t) - \omega_0 t)} \right\rangle} \quad (\text{A.II.10})$$

Si las N partículas que tenemos son idénticas, independientes y simétricas entonces  $A(t) = A(t + \tau)$ , con lo que

$$A^*(t) A(t+\tau) = A^*(t) A(t) = A^2 \quad (\text{A.II.11})$$

y la función de correlación queda reducida a

$$\gamma(\tau) = e^{-i\omega_0\tau} \frac{\left\langle \sum_{j=1}^N \sum_{m=1}^N e^{i\vec{k} \cdot (\vec{r}_j(t+\tau) - \vec{r}_m(t))} \right\rangle}{\left\langle \sum_{j=1}^N \sum_{m=1}^N e^{i\vec{k} \cdot (\vec{r}_j(t) - \vec{r}_m(t))} \right\rangle} \quad (\text{A.II.12})$$

Para poder interpretar mejor esta ecuación separaremos los términos que se refieren a la misma partícula de los que corresponden a distintas partículas.

$$\gamma(\tau) = e^{-i\omega_0\tau} \frac{\left\langle \sum_{j=1}^N e^{i\vec{k} \cdot (\vec{r}_j(t+\tau) - \vec{r}_j(t))} + \sum_{j=1}^N \sum_{m=1}^N e^{i\vec{k} \cdot (\vec{r}_j(t+\tau) - \vec{r}_m(t))} \right\rangle}{\left\langle \sum_{j=1}^N e^{i\vec{k} \cdot (\vec{r}_j(t) - \vec{r}_j(t))} + \sum_{j=1}^N \sum_{m=1}^N e^{i\vec{k} \cdot (\vec{r}_j(t) - \vec{r}_m(t))} \right\rangle} \quad (\text{A.II.13})$$

donde ahora  $j \neq m$ .

El primer término del denominador tiene exponente 0 y se reduce a N. En cuanto al segundo término, si suponemos que los centros de dispersión son estadísticamente independientes, todos estos términos cruzados son cero. En el caso del numerador el primer

término expresa la correlación entre la posición de una partícula en un instante  $t$  y su posición en otro instante  $t + \tau$ . El segundo término establece la correlación entre la posición de una partícula en un tiempo  $t$  y la posición de otra en otro tiempo  $t + \tau$ , de tal forma que si no hay interacciones entre ellas este término también es cero. Por lo tanto, la función de autocorrelación para partículas no interaccionantes será

$$\gamma(\tau) = \frac{e^{-i\omega_0\tau}}{N} \left\langle \sum_{j=1}^N e^{i\vec{k} \cdot (\vec{r}_j(t+\tau) - \vec{r}_j(t))} \right\rangle = e^{-i\omega_0\tau} \left\langle e^{i\vec{k} \cdot (\vec{r}_j(t+\tau) - \vec{r}_j(t))} \right\rangle \quad (\text{A.II.14})$$

Si llamamos  $R_j(\tau)$  a  $[\vec{r}_j(t + \tau) - \vec{r}_j(t)]$ , que es el desplazamiento temporal de la partícula  $j$  en un tiempo  $\tau$ , nos quedará

$$\gamma(\tau) = e^{-i\omega_0\tau} \left\langle e^{i\vec{k} \cdot R_j(\tau)} \right\rangle \quad (\text{A.II.15})$$

Ahora, más que intentar calcular la media temporal que aparece en la ecuación anterior, se puede hacer uso de la hipótesis que establece que la media temporal puede ser reemplazada por una media de posiciones. Si el sistema es homonéneo, isotrópico y estacionario, entonces el promedio temporal resulta

$$\left\langle e^{i\vec{k} \cdot R_j(\tau)} \right\rangle = \int_0^\infty G_s(R, \tau) e^{i\vec{k} \cdot \vec{R}(\tau)} d\vec{R} \quad (\text{A.II.16})$$

donde  $G_s(R, \tau)$  es la función de autocorrelación espacio-temporal de van Hove, que nos da la probabilidad de que la partícula realice un desplazamiento  $R$  en el tiempo  $\tau$ ; puede demostrarse que es una gaussiana

$$G_s(R, \tau) = cte \cdot e^{-\frac{3}{2} \frac{R^2}{(R^2)}} \quad (\text{A.II.17})$$

Sustituyendo la ecuación anterior en la (A.II.16), integrando y sustituyendo el resultado en la ecuación (A.II.15), la función de autocorrelación quedará como



$$\gamma(\tau) = e^{-i\omega_0\tau} e^{-\frac{\kappa^2(R^2)\tau}{6}} \quad (\text{A.II.18})$$

En el límite de movimiento difusivo, el desplazamiento cuadrático medio es simplemente  $6D\tau$ , resultado de un camino aleatorio tridimensional, siendo  $D$  el coeficiente de difusión. Finalmente la función de autocorrelación del campo eléctrico queda como

$$\gamma(\tau) = e^{-DK^2\tau} e^{-i\omega_0\tau} \quad (\text{A.II.19})$$

donde vemos que la amplitud,  $\exp(-DK^2\tau)$ , actúa como un factor de modulación de las oscilaciones,  $\exp(-i\omega_0\tau)$ , que son mucho más rápidas.

En algunos libros llaman función de autocorrelación sólo a esta amplitud, que nosotros la denominaremos  $\gamma^A(\tau)$

$$\gamma^A(\tau) = e^{-DK^2\tau} \quad (\text{A.II.20})$$

y de ella podremos obtener el tamaño de las partículas como veremos a continuación.

### A.II.3. EL CORRELADOR.

El correlador es el dispositivo fundamental del análisis de la dispersión dinámica de luz. Es un sistema de 8 bits, con 64 canales disponibles para la medición de la función de autocorrelación. Cada canal mide el número de fotones que llega al fotomultiplicador en un instante de tiempo  $t$  y en otro momento posterior; así, el  $k$ -ésimo canal almacena los datos  $n(t)$  y  $n(t + k\tau')$ , siendo  $n$  el número de fotones y  $\tau'$  el tiempo fundamental de muestreo más pequeño (por lo que el tiempo  $\tau$  para cada canal será  $k\tau'$ ). De estos datos el correlador puede obtener la función de autocorrelación de las fotocuentas

$$\gamma_c(\tau) = \frac{\langle n(t) n(t+\tau) \rangle}{\langle [n(t)]^2 \rangle} \quad (\text{A.II.21})$$

## APÉNDICE II

Como tenemos la función de autocorrelación de las fotocuentas (que es igual a la de la intensidad), y la que nos da la información del coeficiente de difusión es la de los campos eléctricos, debemos relacionarlas. Esto se consigue gracias a la relación de Siegert:

$$\gamma_c(\tau) = 1 + c [\gamma^A(\tau)]^2 = 1 + c e^{-2DK^2\tau} \quad (\text{A.II.22})$$

siendo  $c$  la constante de Siegert, cuyo valor depende de las características del dispositivo utilizado.

La representación de  $1/2 \ln(\gamma_c(\tau) - 1)$  frente a distintos tiempos fundamentales,  $\tau$ , debe dar una línea recta cuya pendiente es  $-DK^2$ . Sin embargo, en la práctica se utiliza el método de los cumulantes, en el que el logaritmo de la función de autocorrelación se desarrolla en una serie de potencias en  $\tau$

$$\frac{1}{2} \ln[\gamma_c(\tau) - 1] = \ln\gamma^A(\tau) = a + b\tau + c\tau^2 + \dots \quad (\text{A.II.23})$$

donde  $b = -DK^2$ . Conocido el ángulo de medida, la magnitud del vector de dispersión,  $K$ , queda determinada (ecuación (A.II.4)), y por consiguiente conoceremos el coeficiente de difusión. El método de los cumulantes permite además calcular la polidispersidad de la muestra, que vendrá definida por el siguiente cociente

$$\text{Polidispersidad} = \frac{c}{b^2} \quad (\text{A.II.24})$$

Conocido el coeficiente de difusión podremos calcular el tamaño de las partículas, a través de la ecuación de Stokes- Einstein para esferas.

$$D = \frac{RT}{6\pi\eta_0 a} \quad (\text{A.II.25})$$

donde  $a$  es el radio de la microesfera.

También se podría obtener información a partir de los diferentes desplazamientos de la frecuencia ( $\omega$ ) de la luz láser dispersada por el sistema, ya que estos desplazamientos dependen de la velocidad difusiva de las partículas. El espectro de frecuencia de la luz dispersada,  $I(\omega)$ , se puede obtener a partir de la función de correlación sin normalizar, mediante una transformación de Fourier

$$I(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} C(\tau) e^{i\omega\tau} d\tau \quad (\text{A.II.26})$$

que resulta ser

$$I(\omega) = \frac{DK^2/\pi}{(\omega - \omega_0)^2 + (DK^2)^2} \quad (\text{A.II.27})$$

Vemos como  $I(\omega)$  presenta una distribución de frecuencias lorentziana centrada en  $\omega = \omega_0$  y con una semianchura de pico igual a  $DK^2$ . Este espectro de frecuencias es causado por el efecto Doppler de la luz láser que interacciona con partículas en movimiento.

El dispositivo System 4700c permite calcular los coeficientes de difusión haciendo uso de los dos métodos matemáticos esquematizados en este apéndice: método de los cumulantes o por transformada de Fourier, aunque todos los datos experimentales de tamaños medios de partículas presentados en esta memoria han sido obtenidos a través del primero.

#### A.II.4. BIBLIOGRAFÍA.

1. Manuales del sistema 4700 SM, Malvern Instruments. (1987).
2. B.J. Berne y R. Pécora. "Dynamic light scattering". R. Krieger. Malabar, Florida. (1990).
3. B. Chu. "Laser light scattering". Academic Press. San Diego, California. (1991).
4. D.E. Koppel. *J. Chem. Phys.* **57** : 4814 (1972).
5. J.C. Brown y P.N. Pusey. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **7** : 31 (1974).
6. B.R. Ware. *Adv. Colloid Interface Sci.* **4** : 1 (1974).

**APÉNDICE III**

**MODELOS DE DOBLE CAPA ELÉCTRICA**

### A.III.1. INTRODUCCIÓN.

Cuando dos fases diferentes se ponen en contacto, la región interfacial generalmente adquiere una carga eléctrica. Si una de las fases es una partícula coloidal cargada y la otra una disolución de electrolito, los iones de signo contrario a la carga de la partícula (contraiones) tenderán a orientarse alrededor de ésta, de forma que se contrarreste el exceso de carga y pueda mantenerse la electroneutralidad de la disolución. La distribución de los iones de la disolución está gobernada por un balance de fuerzas térmicas y eléctricas. A la disposición de la carga eléctrica en la partícula y el balance de cargas en la disolución se le denomina *doble capa eléctrica* (d.c.e.) en la interfase. Una característica importante de estos sistemas es que presentan ciertas propiedades bajo la influencia de un campo eléctrico, de manera que puede darse un movimiento relativo de parte de la d.c.e. Estos procesos se conocen como *fenómenos electrocinéticos*. Todos los fenómenos electrocinéticos implican el movimiento tangencial de una fase con respecto a la otra, lo que da lugar a la aparición de un plano de cizalladura o deslizamiento entre la parte del líquido fuertemente adherido a la partícula y el resto del líquido inmóvil. El potencial de este plano se denomina *potencial  $\zeta$*  y es uno de los parámetros más característicos de la d.c.e.. La obtención del potencial  $\zeta$  a partir de medidas experimentales ha dado lugar a numerosas teorías y la interpretación de este parámetro sigue siendo en la actualidad una de las mayores controversias dentro de la física coloidal [1].

### A.III.2. DOBLE CAPA ELÉCTRICA ALREDEDOR DE UNA PARTÍCULA COLOIDAL

#### Modelo de Helmholtz

El modelo más simple de d.c.e. se atribuye a Helmholtz [2], quien considera a aquella como un condensador plano paralelo, cuya capa interna está formada por las cargas del sólido y la capa externa por las localizadas en el líquido. Según este planteamiento el potencial debe disminuir linealmente con la distancia a la superficie, ser proporcional a la densidad superficial de carga e independiente de la concentración iónica de la disolución, hecho que está en contradicción con los resultados experimentales.

#### Modelo de Gouy-Chapman

Gouy [3] y Chapman [4] independientemente desarrollaron un modelo, hoy conocido como doble capa difusa, en el que establecen la distribución de iones (coiones y contraiones) no

sólo considerando la interacción electrostática sino también la agitación térmica .

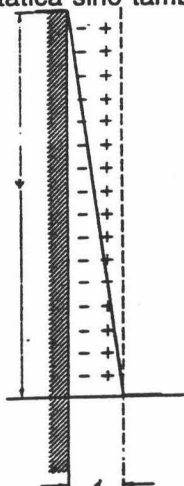


Fig. A.III.1. Modelo de d.c.e. de Helmholtz

A diferencia de los iones determinantes del potencial, cuya característica principal es su fuerte interacción específica con la superficie, los contraiones, incluso cerca de la superficie,

interaccionan en general sólo electrostáticamente. Es más, como están solvatados, incluso en las posiciones más cercanas de la superficie se mantienen a bastante distancia de ella, de manera que su energía de interacción electrostática con la superficie no puede exceder apreciablemente a la energía de agitación térmica  $kT$ . Si la energía de los iones en el campo de atracción de la carga superficial es del orden de  $kT$ , la agitación térmica provocará que esta capa sea difusa. Estas consideraciones indican que el primer modelo de d.c.e. de Helmholtz no es válido.

La intensidad del campo eléctrico en la doble capa disminuye cuando aumenta la distancia desde la superficie, ya que la carga superficial está apantallada por la carga de los contraiones localizada entre el punto dado y la superficie. La desaparición del campo eléctrico en el límite más exterior de la doble capa ocurre como resultado de la electroneutralidad en ésta, ya que la capa difusa apantalla a la carga superficial.

Puesto que la intensidad del campo eléctrico que determina la atracción de los iones de signo opuesto a la superficie (contraiones), disminuye conforme la distancia desde la superficie aumenta, hay una disminución similar en la concentración de contraiones desde el valor máximo, que se dará en la superficie, hasta llegar al valor normal que tuviera la disolución. En el límite más exterior de la doble capa, por tanto, no habría exceso de

concentración de contraiones en comparación con el seno del electrolito. Los iones que tienen carga del mismo signo que los de la superficie, denominados coiones y que obviamente son repelidos por ella, se encuentran en una concentración más baja dentro de la capa que en el seno del electrolito, puesto que la fuerza con la que éstos son repelidos disminuye conforme la distancia desde la superficie aumenta.

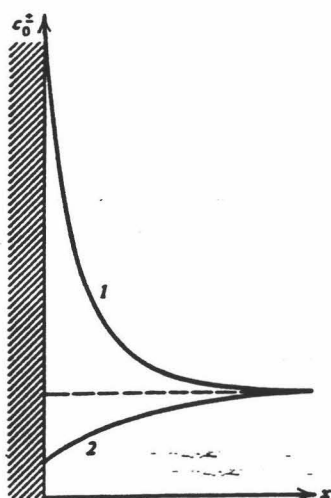


Fig. A.III.2. Distribución de iones cerca de la superficie cargada: (1) Contraiones ; (2) Coiones.

Esta figura describe la distribución espacial para el caso de una partícula con un potencial superficial elevado.

El modelo se aplica a una superficie plana con carga uniformemente repartida y sumergida en el interior de una disolución de electrolito. La superficie tiene un potencial eléctrico  $\Psi_0$  y los iones se consideran como cargas puntuales inmersos en un medio continuo.

Sean  $n_i$  el número de iones de la especie  $i$  por  $\text{cm}^3$  en una posición situada a una distancia  $x$  con respecto a la superficie sólida y perpendicular a ésta, donde existe un potencial  $\Psi$ ; y sea  $n_{i0}$  el número de iones de la especie  $i$  en una posición suficientemente alejada de la superficie como para que el potencial eléctrico se considere nulo.

En el equilibrio, el potencial electroquímico  $\mu_i = 0$ , 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 :

$$-z_i e \Psi = kT \ln \frac{n_i}{n_{i0}} \quad (\text{A.III.1})$$

(el signo menos se introduce para tener en cuenta el signo de los iones); por tanto,

$$n_i = n_{i0} e^{-\frac{z_i e \Psi}{kT}} \quad (\text{A.III.2})$$

que corresponde a la distribución de Boltzmann.

La densidad de carga en cualquier punto será la suma de las densidades de carga de cada especie iónica:

$$\rho(x) = \sum_i z_i e n_i = \sum_i z_i e n_{i0} e^{-\frac{z_i e \Psi(x)}{kT}} \quad (\text{A.III.3})$$

La ecuación de Poisson se escribe para este sistema como:

$$\frac{d^2 \Psi}{dx^2} = -\frac{\rho(x)}{\epsilon \epsilon_0} \quad (\text{A.III.4})$$

en la que se ha utilizado coordenadas cartesianas y se ha considerado que  $\Psi$  es sólo función de la coordenada  $x$ ,  $\Psi = \Psi(x)$ . En dicha ecuación  $\epsilon$  es la constante dieléctrica del medio y  $\epsilon_0$  la permitividad del vacío.

Sustituyendo (A.III.3) en (A.III.4) obtenemos la denominada ecuación de Poisson-Boltzmann:

$$\frac{d^2 \Psi(x)}{dx^2} = -\frac{e}{\epsilon \epsilon_0} \sum_i n_{i0} z_i e^{-\frac{z_i e \Psi(x)}{kT}} \quad (\text{A.III.5})$$



Esta es una ecuación diferencial no lineal y, aunque no se puede resolver analíticamente, lo vamos a hacer para el caso de potenciales bajos  $\Psi_0 < kT/ze$ . Como trabajamos a 25° C, la aproximación será válida si  $\Psi < 25/z$  mV; así pues, si  $e^{-x} = 1 - x$ , la ecuación anterior se convierte en :

$$\frac{d^2\Psi}{dx^2} = -\frac{e}{\epsilon\epsilon_0} \sum_i n_{i0}z_i \left(1 - \frac{z_i e\Psi}{kT}\right) \quad (\text{A.III.6})$$

y, como la disolución es eléctricamente neutra,  $\sum n_{i0}z_i = 0$ , resulta que:

$$\frac{d^2\Psi(x)}{dx^2} = \left(\frac{e^2}{\epsilon\epsilon_0 kT} \sum_i n_{i0}z_i^2\right) \Psi(x) = \kappa^2 \Psi(x) \quad (\text{A.III.7})$$

siendo

$$\kappa = \left(\frac{e^2}{\epsilon\epsilon_0 kT} \sum_i n_{i0}z_i^2\right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{A.III.8})$$

La solución de la ecuación (A.III.7) es

$$\Psi(x) = \Psi_0 e^{-\kappa x} \quad (\text{A.III.9})$$

admitiendo que  $d\Psi/dx = \Psi = 0$  en el seno de la disolución ( $x = \infty$ ). El signo (-) en (A.III.9) implica que cuando  $\Psi$  es positivo, el potencial debe disminuir hasta el valor cero en el seno de la disolución.

A la distancia  $\kappa^{-1}$ , a la cual el potencial cae una fracción 1/e, recibe el nombre de espesor o longitud de la d.c.e.

$$\kappa^{-1} = \left( \frac{\epsilon \epsilon_0 kT}{e^2 \sum_i n_{i0} z_i^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{A.III.10})$$

Por lo tanto un aumento en la concentración de electrolito implica una disminución de esa longitud, lo que supone una compresión de la doble capa.

También se puede demostrar, aunque no lo haremos, que para una superficie esférica:

$$\Psi(r) = \Psi_0 a \frac{e^{-\kappa(r-a)}}{r} \quad (\text{A.III.11})$$

donde  $a$  es el radio de la partícula y  $r$  representa la distancia desde el centro de la esfera al punto considerado.

Vamos a determinar ahora la relación que existe entre la carga superficial y el potencial. Puesto que la condición de electroneutralidad exige que la carga en la superficie debe ser igual y de signo opuesto a la carga que existe en la capa difusa, la carga por unidad de área en la superficie la podemos describir como:

$$\sigma_0 = - \int_0^{\infty} \rho(x) dx = \epsilon \epsilon_0 \int_0^{\infty} \frac{d^2 \Psi}{dx^2} dx = - \epsilon \epsilon_0 \left( \frac{d\Psi}{dx} \right)_{x=0} \quad (\text{A.III.12})$$

Para electrolitos no simétricos la solución es:

$$\sigma_0 = \sqrt{2 \epsilon \epsilon_0 kT \sum_i n_{i0} \left[ e^{-\frac{z_i e \Psi_0}{kT}} - 1 \right]} \quad (\text{A.III.13})$$

y para simétricos:

$$\sigma_0 = \frac{4n_0 z e}{\kappa} \sinh\left(\frac{ze\Psi_0}{2kT}\right) \quad (\text{A.III.14})$$

Este modelo es criticable en el siguiente sentido: considera que los iones son puntuales y por tanto, la carga en la superficie del sólido ( $x = 0$ ) puede variar en función de la fuerza iónica del medio, disminuyendo  $\sigma_0$  a medida que aumenta la concentración de electrolito, puesto que los iones podrían situarse sobre la misma superficie. Sin embargo, cuando la carga superficial proviene de grupos químicos disociables, (tal y como ocurre en nuestros látex), y en ausencia de adsorción específica de iones, la densidad superficial de carga es independiente de la concentración de electrolito, hecho que no queda reflejado en la anterior ecuación.

### Modelo de Stern

Mientras que con la teoría de Gouy-Chapman la estructura de la doble capa se determina solamente por la interacción eléctrica de unos iones con otros y con la carga de la superficie, y se tiene en cuenta una única característica de los iones: su valencia. Stern [5] en 1924 considero el importante papel que desempeñan dentro de la d.c.e., la adsorción específica y la dimensión de los iones.

La adsorción específica se define generalmente como la adsorción que tiene lugar a potencial electrostático superficial nulo. El radio de acción de las fuerzas que dan lugar a la adsorción específica, al contrario que las fuerzas electrostáticas, de acuerdo con la suposición de Stern, es tan pequeño, que estas fuerzas se deben considerar solo para distancias desde la pared de orden de dimensiones iónicas. En consecuencia se consideran los efectos de las fuerzas de adsorción y las dimensiones finitas de los iones que estuvieran a la distancia mínima de la pared.

Stern divide la d.c.e. en dos partes, las denominadas regiones externa e interna. En la región externa las fuerzas de adsorción y las dimensiones de los iones son despreciables, esta sería la parte difusa de la doble capa y por lo tanto se puede aplicar la teoría de Gouy-Chapman.

En la región interna, a su vez, se pueden distinguir dos planos. Un primer plano a una distancia  $x_1$  (Figura A.III.3) que pasa por los centros de los iones específicamente adsorbidos, llamado plano interior de Helmholtz (IHP) y otro plano a una distancia  $x_2$ , a partir de la cual comienza la parte difusa de la d.c.e., denominado plano exterior de Helmholtz (OHP). La capa

entre la superficie y el OHP se denomina capa de Stern.

Entre  $x=0$  y  $x=x_1$  el potencial disminuye linealmente con la distancia como en el modelo de Helmholtz.

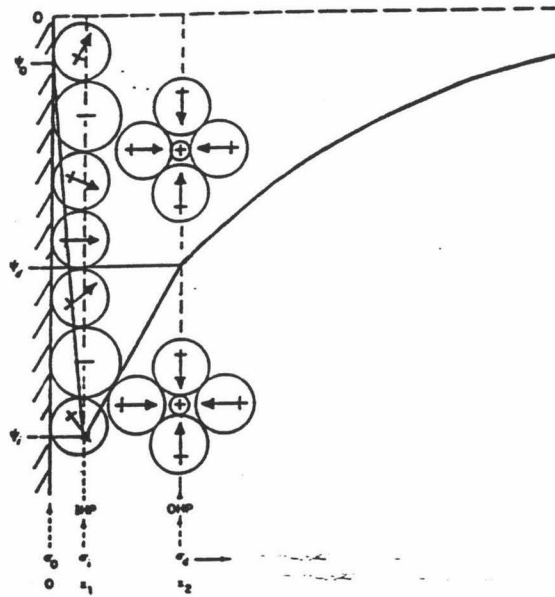


Fig. A.III.3. Doble capa eléctrica según el modelo de Stern en la que se observa el "plano interior de Helmholtz" (IHP) y "plano exterior de Helmholtz" (OHP).

Vamos a poder distinguir, por tanto, varios potenciales según los planos considerados como podemos observar en la Figura A.III.4. El potencial sobre la superficie de la partícula  $\Psi_0$ ; el potencial situado sobre el IHP, denominado potencial de Stern,  $\Psi_s$ ; el potencial sobre el OHP llamado potencial difuso  $\Psi_d$ ; y por último, el potencial situado en el plano de deslizamiento  $\zeta$ .

Teniendo en cuenta que en la capa difusa del modelo de Stern es válido el modelo de Gouy-Chapman, se puede aplicar la relación (A.III.14) en el plano OHP, solo que ahora tendremos:

$$\sigma_d = \frac{4 n_0 z e}{\kappa} \sinh\left(\frac{ze\Psi_d}{2kT}\right) \quad (\text{A.III.15})$$

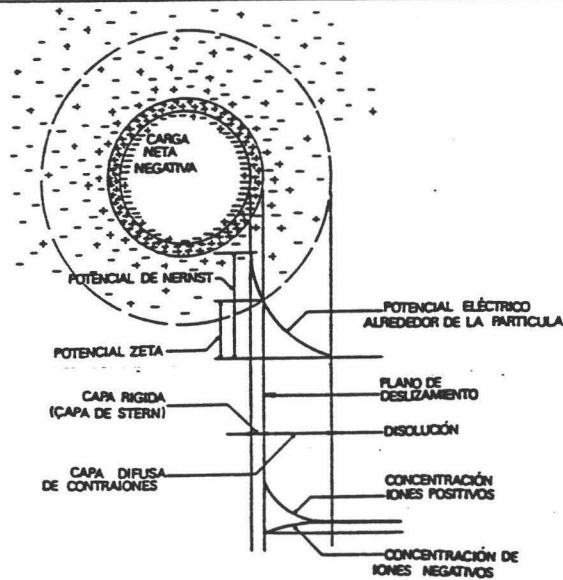


Fig. A.III.4. Doble capa eléctrica alrededor de una partícula coloidal.

### A.III.3. RELACIÓN ENTRE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA Y POTENCIAL $\zeta$

#### Teoría 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  $\zeta$  se debe a Helmholtz [2] en 1.879.

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

- 1) 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. ( $\kappa^{-1}$ ). Por tanto,  $\kappa a \gg 1$ . Recordemos que según este modelo la d.c.e. se puede considerar como un condensador plano de caras paralelas.
- 2) La partícula coloidal se considera como no conductora y el líquido que lo rodea como conductor.
- 3) 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 .
- 4) La superficie de la partícula tiene un potencial  $\zeta$  con respecto al líquido que se encuentra

lejos de ella. Si admitimos que existe una capa molecular adherida a la superficie,  $\zeta$  representa la diferencia de potencial entre esta capa y el líquido móvil.

5) 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.

6) La constante dieléctrica  $\epsilon$  y la viscosidad  $\eta$  tienen el mismo valor tanto en la d.c.e. como en el seno de la disolución adyacente.

A partir de estas consideraciones teóricas, sin embargo, no se obtuvo una interpretación cuantitativa satisfactoria del fenómeno hasta que Smoluchowski [6], en 1903, propuso la siguiente ecuación para la movilidad electroforética de una partícula cargada sometida a un campo eléctrico:

$$\mu_e = \frac{v_e}{E} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta} \quad (\text{A.III.16})$$

donde  $v_e$  representa la velocidad de la partícula coloidal y  $E$  la intensidad del 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  $2/3$ .

#### Teoría de Henry.

Henry [7] demostró que la discrepancia entre las ecuaciones de Smoluchowsky 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 y Smoluchowski admitió que el campo es uniforme y paralelo a la superficie, tal como se muestra en la Figura A.III.5.

A partir de las Figuras A.III.5 a y b, es claro que cuando  $ka \ll 1$  estaremos en el caso de Hückel y cuando  $ka \gg 1$  será 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 incomprensible y que el plano en el que el potencial vale  $\zeta$  no se mueve con respecto a la partícula. El campo

eléctrico resultante sobre la partícula es la suma del campo externo más el debido al de la doble capa eléctrica.

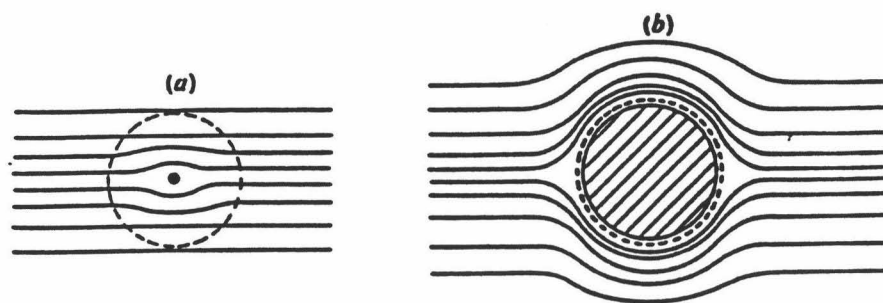


Fig. A.III.5. Líneas de campo eléctrico que rodean a una partícula coloidal según el tratamiento de Hückel (a) y el de Smoluchowski (b).

Para una partícula no conductora esférica de radio  $a$  se obtiene:

$$\mu_e = \frac{2}{3} \frac{\epsilon \zeta}{\eta} f_1(\kappa a) \quad (\text{A.III.17})$$

donde para  $\kappa a < 1$

$$f_1(\kappa a) = 1 + \frac{(\kappa a)^2}{16} - \frac{5(\kappa a)^3}{48} - \frac{(\kappa a)^4}{96} - \frac{(\kappa a)^5}{96} - \left[ \frac{(\kappa a)^4}{8} - \frac{(\kappa a)^6}{96} \right] e^{\kappa a} \int_{\infty}^{\kappa a} \frac{e^{-t}}{t} dt \quad (\text{A.III.18})$$

y para  $\kappa a > 1$

$$f_1(\kappa a) = \frac{3}{2} - \frac{9}{2\kappa a} + \frac{75}{2(\kappa a)^2} - \frac{330}{(\kappa a)^3} \quad (\text{A.III.19})$$

En la Figura A.III.6 se puede ver la forma que adopta esta función representada frente al  $\log(\kappa a)$ . En esta figura se observa cómo en los casos extremos esta función tiende a los valores 3/2 y 1.

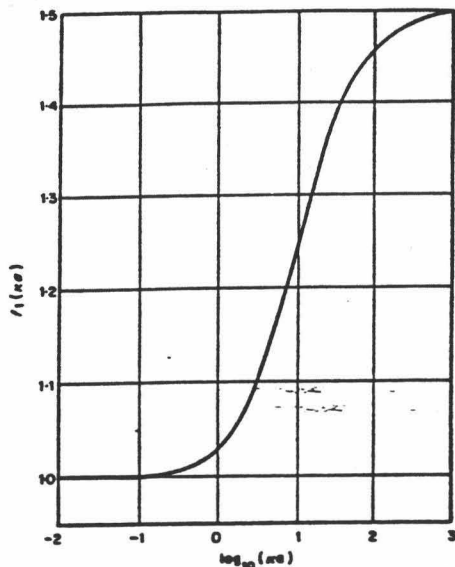


Fig. A.III.6. Función de Henry  $f_1(\kappa a)$ .

#### Teoría 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 éste 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 de la doble capa inducida por el movimiento de la partícula.

Como la partícula y la parte difusa de la doble capa tiene 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 se 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**, hecho que reflejamos en la Figura A.III.7. 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**. Ambas perturbaciones provocan la pérdida de simetría de la d.c.e. y polarizan a ésta.

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 es esencial para poder deducir las expresiones propias de la electroforesis, complicándose bastante como consecuencia de que no se puede utilizar a priori 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 consideración especial [8].

Overbeek [9] y Booth [10] 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 por el movimiento de la partícula en el seno del campo eléctrico.

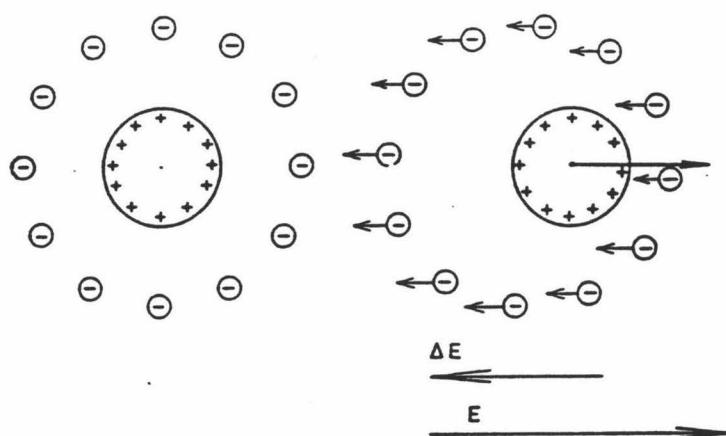


Fig. A.III.7. Esquema del efecto de relajación ( $\Delta E$ ) debido a la aplicación de un campo eléctrico externo ( $E$ ).

Verwey y Overbeek [11] desarrollaron 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  $\sigma_0$ , sin campo eléctrico aplicado.
- 4.- El potencial electrostático  $\Psi(r)$  fuera de la partícula cumple la ecuación de Poisson:

$$\nabla^2 \Psi(r) = -\frac{4\pi}{\epsilon \epsilon_0} \rho(r) \quad (\text{A.III.20})$$

donde

$$\rho(r) = \sum_{i=1}^N z_i e n_i(r) \quad (\text{A.III.21})$$

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 ( $\nabla \Psi(r)_{r \rightarrow \infty} = -E$ ); y la otra condición para  $\Psi$ , o para su gradiente en la superficie, dependerá del modelo de d.c.e. usado.

- 5.- La fuerza neta sobre el líquido es nula, es decir:

$$\eta \nabla^2 u - \nabla p = \rho \nabla \Psi \quad \nabla u = 0 \quad (\text{A.III.22})$$

De estas dos ecuaciones, la primera es la ecuación de Stokes para un fluido newtoniano incomprensible, siendo  $p$  la presión en el electrolito y  $u$  la velocidad del fluido.

Las condiciones límite serán:

$$\begin{array}{ll} u = 0 & \text{en } r = a \\ u = -\mu E & \text{en } r = \infty \end{array}$$

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:

1) La fuerza eléctrica:

$$f_1 = q E$$

siendo  $q$  la carga total de la esfera.

2) La fuerza viscosa de Stokes:

$$f_2 = -6 \pi \eta a v_e$$

Como se ha comentado anteriormente hay que introducir la fuerza de retardo electroforético ( $f_3$ ) y la debida al efecto de relajación ( $f_4$ ). En el estado estacionario la partícula se mueve con velocidad uniforme, por lo que la suma de todas las fuerzas ejercidas sobre ella debe ser igual a cero.

$$v_e = \frac{1}{6 \pi \eta a} (qE + f_3 + f_4) \quad (\text{A.III.23})$$

El cálculo de estas fuerzas se hace por integración de las tensiones viscosas y eléctrica en la superficie de la partícula, llegándose a un sistema de ecuaciones diferenciales que no tiene solución analítica general.

La primera resolución numérica aplicable de este sistema se debe a Overbeek [12], 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  $\zeta$ . 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  $\kappa a = 1$  (Figura A.III.8, realizada 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 ( $\zeta$ ), definidos como:

$$\bar{\mu} = \frac{3}{2} \frac{\eta e \mu}{\epsilon k T} \quad (\text{A.III.24})$$

$$\zeta = \frac{e\zeta}{kT} \quad (\text{A.III.25})$$

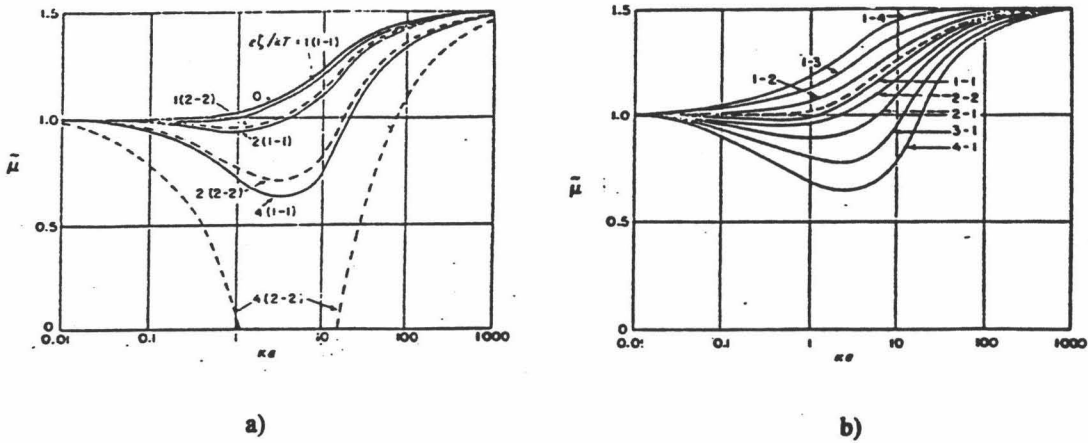


Fig. A.III.8. Movilidad electroforética adimensional según la expresión de Overbeek.  
 a) Electrolitos simétricos; b) Electrolitos asimétricos.

Más tarde, Wiersema y col. [13], en 1966, obtuvieron una solución por ordenador para un mayor intervalo de valores de  $\zeta$ . En la Figura A.III.9 podemos ver comparados los resultados de varios autores.

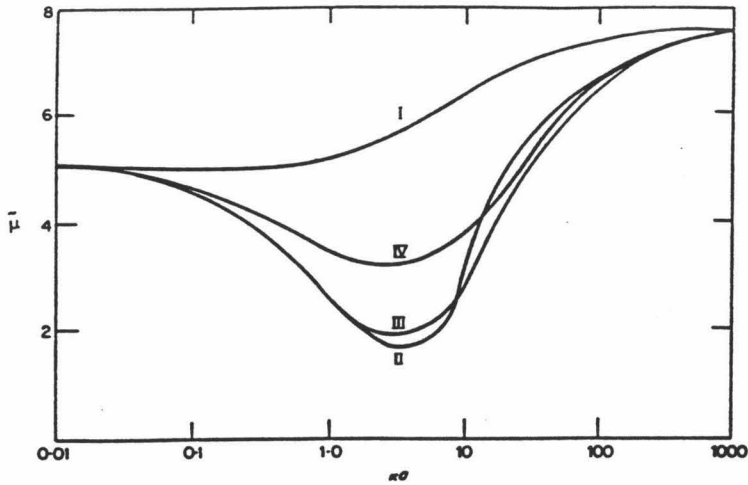


Fig. A.III.9. Movilidad electroforética adimensional en función de  $ka$  de acuerdo con: I-Henry (1931); II-Overbeek (1943); III-Booth (1950);IV-Wiersema (1966).

Se puede observar que las soluciones aproximadas son buenas, aunque sobreestiman el efecto de relajación para valores intermedios de  $\kappa a$ . La corrección de la ecuación de Henry para la relajación disminuye notablemente cuando el valor de  $\zeta$  es pequeño (Figura A.III.10), y esta corrección depende del valor de la movilidad adimensional de los iones y contraiones:

$$m_{\pm} = \frac{2}{3} \frac{\epsilon RT}{\eta \Lambda_{\pm}^0} z_{\pm}^2 \tag{A.III.26}$$

El método de Wiersema no es simple. Se necesitan gráficas de las funciones usadas para interpolar sus valores. Además el valor máximo de  $\zeta$  que se puede usar está limitado, especialmente para  $z_{\pm} > 1$ .

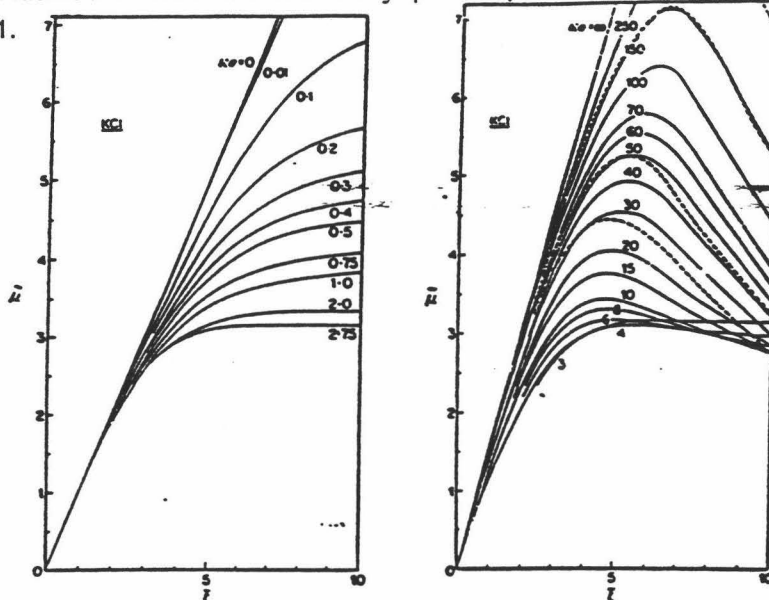


Fig. A.III.10. Movilidad electroforética adimensional en función de  $\kappa a$  según Wiersema.

En la Figura A.III.10 se puede ver el comportamiento de la solución general. Podemos destacar que  $\mu_e$  se aproxima a la ecuación de Hückel para valores pequeños de  $\kappa a$  (como obtuvo Henry).

En 1978, O'Brien y White [14] obtuvieron la solución descomponiendo el problema en dos casos más simples (suponiendo pequeños la velocidad y el campo eléctrico 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  $\alpha$  y  $\beta$  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:

$$\mu_e = -\beta/\alpha$$

Para comentar los resultados de estos autores hemos representado en la Figura A.III.11 la movilidad electroforética adimensional en función del potencial zeta adimensional para distintos valores de  $\kappa a$ .

A la vista de estas gráficas podemos destacar varios aspectos:

- 1.- En la Figura A.III.11a se observa que la movilidad es una función monótona creciente de  $\zeta$ , cuando  $\kappa a \leq 2.7$ .
- 2.- Para valores pequeños de  $\zeta$  todas las curvas convergen asintóticamente a la forma de Hückel ( $\bar{\mu}_e = \zeta$ ).
- 3.- A valores de  $\kappa a = 2.75$  la  $\bar{\mu}_e$  presenta una zona plana a un valor de  $\approx 3.17$ .
- 4.- en la Figura A.III.11b observamos la presencia de un máximo en la movilidad para todos los valores de  $\kappa a > 3$ . Este máximo aumenta con  $\kappa a$ . Las curvas tienden a la ecuación de Smoluchowski al aumentar  $\kappa a$  ( $\bar{\mu}_e = 3/2 \zeta$ ).

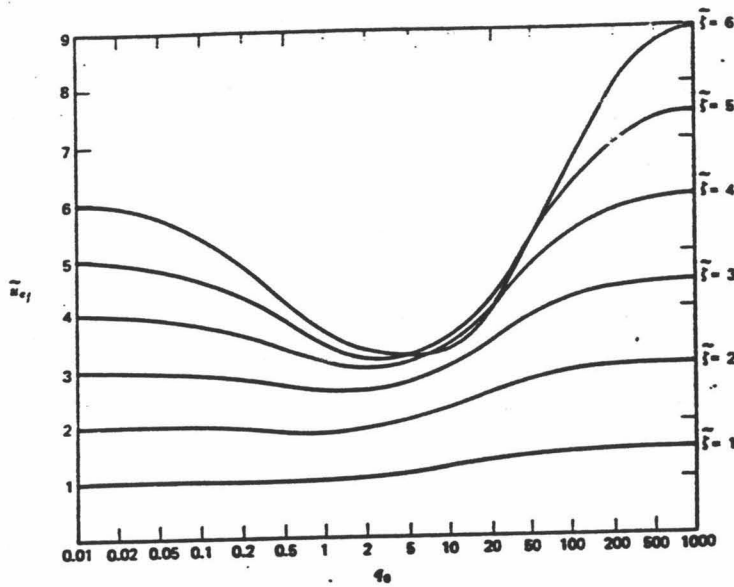


Fig. A.III.11. Movilidad electroforética adimensional en función de  $\zeta$  adimensional para diferentes valores de  $ka$  según la teoría de O'Brien y White. a) Valores de  $ka$  bajos; b) Valores de  $ka$  altos.

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  $\zeta$  al cuadrado, mientras que la fuerza eléctrica sólo es proporcional a  $\zeta$ . Por tanto, cuando el valor de  $\zeta$  aumenta el retardo electroforético también lo hace de forma más rápida que la fuerza eléctrica. Cuando  $ka$  es pequeño ( $\leq 2.75$ ) no aparece el máximo pues la distorsión de la doble capa decrece con  $ka$ .

Todos los tratamientos anteriores suponen que no existe conducción iónica dentro del plano de deslizamiento. Podemos distinguir dos mecanismos diferentes de conducción eléctrica asociados a la doble capa cuando ésta se desplaza en el seno de un campo eléctrico: una 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 tenida en cuenta por la teoría de Overbeek-Booth-Wiersema, y una conducción superficial anómala, relacionada con los movimientos de carga tangenciales que se producirían entre el plano de deslizamiento y la superficie de la partícula. Han sido Dukhin y col. [8,15] 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 [8], 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:

$$\bar{\mu}_e = \frac{3}{2} \zeta - \frac{6\zeta \left(1 + \frac{3m}{z^2}\right) \operatorname{senh}^2\left(\frac{z\zeta}{4}\right) + \left[\frac{2}{z} \left(1 + \frac{3m}{z^2}\right) \operatorname{senh}\left(\frac{z\zeta}{2}\right) - 3m\zeta\right] \ln\left(\cosh \frac{z\zeta}{4}\right)}{\kappa a + 8 \left(1 + \frac{3m}{z^2}\right) \operatorname{senh}^2\left(\frac{z\zeta}{4}\right) - \left(\frac{24m}{z^2}\right) \ln\left(\cosh \frac{z\zeta}{4}\right)} \quad (\text{A.III.27})$$

donde el segundo término representa el efecto causado por la polarización suponiendo que el coeficiente de arrastre viscoso  $m$  es igual para contra- y co-iones ( $m_+ = m_- = m$ ):

$$m = \frac{2}{3} \frac{\epsilon}{\eta D} \left(\frac{kT}{e}\right)^2 \quad (\text{A.III.28})$$

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 coincide con la superficie de la partícula, y la capa estacionaria de la doble capa afecte a la transferencia de iones por difusión y electromigración, la ecuación (A.III.27) se transforma en

$$\bar{\mu}_e = \frac{3}{2} \zeta - \frac{3}{2} \frac{\zeta \left[4(1+3m) \operatorname{senh}^2\left(\frac{\zeta}{4}\right) + 2g_1\right] + \left[2(1+3m) \operatorname{senh}^2\left(\frac{\zeta}{2}\right) - 3m\zeta + 2g_2\right] 4 \ln\left(\cosh \frac{\zeta}{4}\right)}{\kappa a + 8(1+3m) \operatorname{senh}^2\left(\frac{\zeta}{4}\right) - 24m \ln\left[\cosh\left(\frac{\zeta}{4}\right)\right] + 4g_1} \quad (\text{A.III.29})$$

donde

$$g_1 = p \left[ \cosh\left(\frac{\Psi_s}{2}\right) - \cosh\left(\frac{\zeta}{2}\right) \right] \quad (\text{A.III.30})$$



$$g_2 = p \left[ \operatorname{senh} \left( \frac{\Psi_s}{2} \right) - \operatorname{senh} \left( \frac{\zeta}{2} \right) \right] \quad (\text{A.III.31})$$

siendo  $p$  la razón de 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 (A.III.28).

En un principio,  $\Psi_s$ ,  $\zeta$  y  $p$  se podrían calcular midiendo la  $\mu_e$  de partículas esféricas de diferentes tamaños, siempre y cuando esos parametros no dependieran de dicho tamaño.

Por otra parte, los efectos de conductancia superficial ejercen una marcada influencia sobre la electroforesis. En el caso de la teoría debida a Dukhin y Semenikhin se considera sólo un caso particular de conducción anómala relacionada con la presencia de una capa iónica límite. Para valores elevados de  $\zeta$  y  $\Psi_s$  como es el caso de la mayor parte de los coloides poliméricos, el valor de la movilidad viene dada por:

$$\tilde{\mu}_e = \frac{3}{2} \zeta \left( \frac{1 + R_{el}}{1 + 2R_{el}} \right) \quad (\text{A.III.32})$$

$$R_{el} = \frac{\lambda_s}{a\lambda} = \frac{e^{(\Psi_s/2)} + 3me^{(\zeta/2)}}{\kappa a} \quad (\text{A.III.33})$$

donde  $\lambda$  es la conductividad específica de la disolución,  $\lambda_s$  es la conductividad superficial y el término  $R_{el}$  cuantifica el efecto de la conductividad superficial anómala, y donde el potencial de polarización de corto alcance supone que es despreciable. Si este se incluyera, entonces la expresión para la movilidad electroforética adimensional sería:

$$\tilde{\mu}_e = \frac{3}{2} \zeta \left[ \frac{1 + \left( \frac{2}{\zeta} \ln 2 \right) R_{el}}{1 + 2R_{el}} \right] \quad (\text{A.III.34})$$

En consecuencia, cuando  $R_{\eta} > 1$ , una correcta interpretación de la electroforesis debe tener en cuenta no sólo los efectos debidos a los flujos difusivos, sino que también debe considerarse el cambio en el potencial de polarización a través de la capa difusa delgada [1].

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 más externa de la doble capa eléctrica, donde la concentración de iones y contraiones difieren 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 supone, 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 tenga 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 se mueven, y esta conducción superficial anómala es la que reduce enormemente la movilidad electroforética de una partícula para un determinado valor del potencial  $\zeta$ .

El mecanismo de conducción anómala en la superficie de las partículas, aumenta conforme lo hace la densidad de carga superficial de acuerdo con la ecuación de Bikerman [16].

Van der Linde y Bijsterbosch [17] 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 electrolito o el radio electrocinético son pequeños.

#### A.III.4. BIBLIOGRAFÍA.

1. R. Hidalgo Álvarez. *Adv. Colloid Interface Sci.* **34** : 217 (1991).
2. H. von Helmholtz. *Am. Phys. Chem.* **7** : 337 (1879).
3. G. Gouy. *J. Phys. Radium.* **9** : 457 (1910).
4. D.L. Chapman. *Phylos. Mag.* **25 (6)** : 475 (1913).

5. O. Stern. *Z. Elektrochem.* **30** : 508 (1924).
6. M. Smoluchowski. *Bull. Acad. Sci. Cracovie.* **182** (1903).
7. D.C. Henry. *Proc. Roy. Soc. Phys. A.* **133** : 106 (1931).
8. S.S. Dukhin y B.V. Derjaguin. *Surface and Colloid Sci.* **7** : 274 (1974).
9. J.Th.G. Overbeek. *Kolloidchem. Beih.* **54** : 298 (1943).
10. F. Booth. *Proc. Roy. Soc. (Londres) Ser. A.* **203** : 514 (1950).
11. E.J.W. Verwey y J.Th.G. Overbeek. "Theory of the Stability of Lyophobic Colloids". Elsevier. Amsterdam (1948).
12. J.Th.G. Overbeek. *Adv. Colloid Sci.* **III** : 97 (1950).
13. P.H. Wiersema, A.L. Loeb y J.Th.G. Overbeek. *J. Colloid Interface Sci.* **22** : 78 (1966).
14. R.W. O'Brien y L.R. White. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II.* **74** : 1607 (1978).
15. S.S. Dukhin y N.M. Semenikhin. *Kolloidn. Zh.* **31** : 36 (1970).
16. F.J. de las Nieves López y R. Hidalgo Álvarez. *Eur. Polym. J.* **23** (5) : 337 (1987).
17. ojo A.J. van der Linde y B.H. Bijsterbosch. *Croatia Chimica Acta.* En prensa