

71/98

**MECANISMOS DE ESTABILIDAD  
COLOIDAL:  
TEORÍA Y APLICACIÓN A  
INMUNOENSAYOS**

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha ..19/2/99.....  
ENTRADA NUM. 547.....

**José Antonio Molina Bolívar**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**



**Tesis Doctoral**

**Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides**

**Departamento de Física Aplicada**

**Granada 1999, España**

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
11 FEB. 1999  
COMISION DE DOCTORADO

**MECANISMOS DE ESTABILIDAD COLOIDAL:  
TEORÍA Y APLICACIÓN A INMUNOENSAYOS**

**por**

José Antonio Molina Bolívar

**DIRECTORES DE LA TESIS**

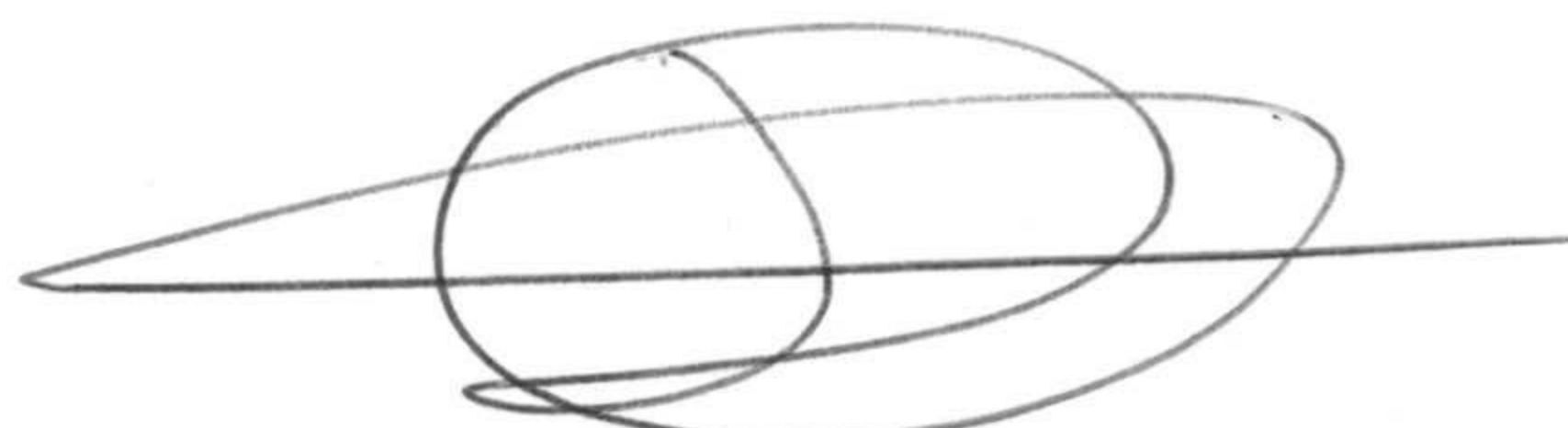
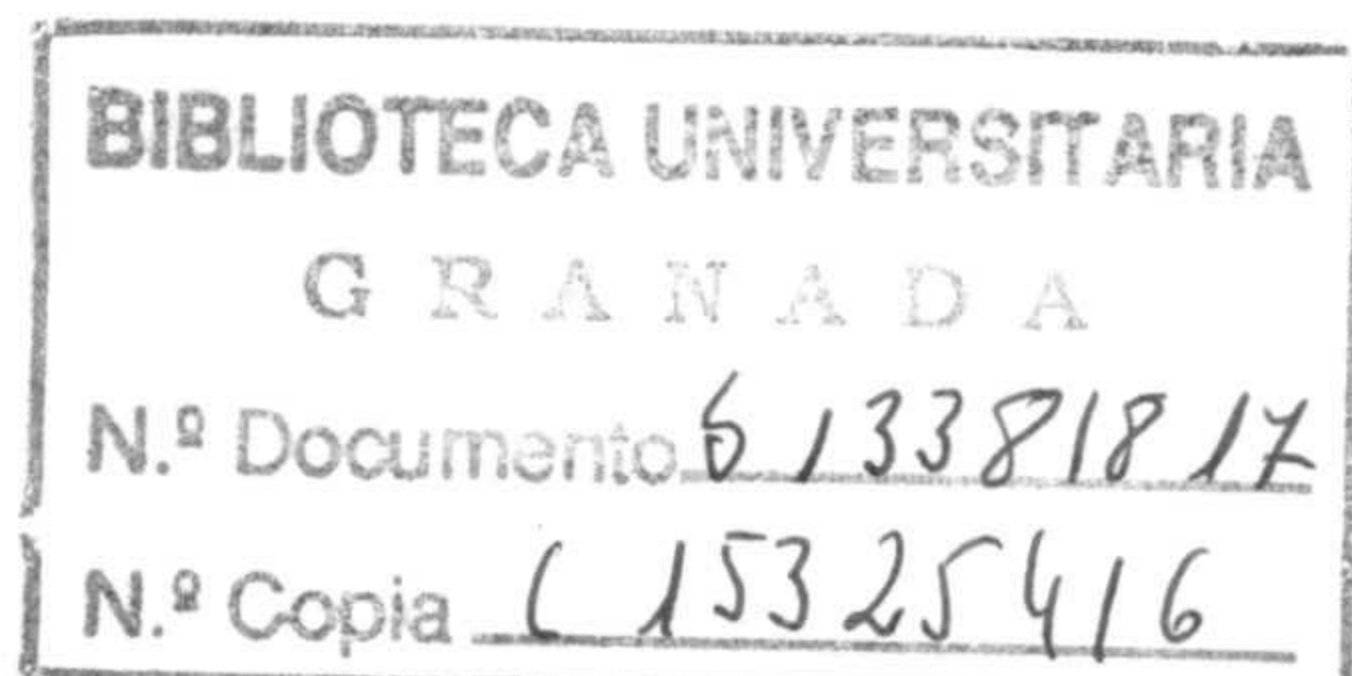


**Dr. Roque Hidalgo Álvarez**  
Catedrático de Física Aplicada  
Dpto. Física Aplicada  
Universidad de Granada



**Dr. Francisco Galisteo González**  
Prof. Titular de Física Aplicada  
Dpto. Física Aplicada  
Universidad de Granada

Memoria presentada para aspirar al grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS FÍSICAS**



José Antonio Molina Bolívar  
Granada, Abril de 1999

“Esta trabajo ha sido el fruto de la paciencia y la perseverancia”

**Quiero dedicar esta tesis a las personas que más me han  
apoyado: mis padres, mis hermanas y muy especialmente a  
Carmen**

# CONTENIDOS

## INTRODUCCIÓN

I

## CAPÍTULO I

### CARACTERIZACIÓN DE COLOIDES POLIMÉRICOS

1. Introducción	3
2. Fundamentos de la polimerización en emulsión	4
3. Sistemas coloidales usados en el trabajo	6
4. Limpieza de los látex	7
5. Determinación del tamaño de partícula	11
6. Determinación de la densidad de carga superficial	20
7. La doble capa eléctrica	26
8. Electroforesis	36
9. Determinación de los grupos clorometilo superficiales	39
10. Estabilidad de los grupos clorometilo	48
11. Morfología de la superficie de las partículas poliméricas	51

## CAPÍTULO II

### ESTABILIDAD COLOIDAL DE SISTEMAS LIOFÓBICOS: TEORÍA DLVO

1. Introducción	77
2. Dispersión de luz a ángulos pequeños	78
3. Descripción del nefelómetro a bajo ángulo	84
4. Validez de la dispersión de luz a ángulos pequeños	86
5. Interacciones entre partículas coloidales	91

<b>6. Teoría DLVO</b>	97
<b>7. Cinética de agregación</b>	100
<b>8. Influencia de la densidad de carga superficial sobre la estabilidad coloidal</b>	105
<b>9. Influencia de la valencia del contraión en la estabilidad coloidal</b>	121
<b>10. Floculación en mínimos secundarios: reeptización</b>	126
<b>11. Factor de estabilidad para la floculación en mínimos secundarios</b>	143
<b>12. Estabilización estérica</b>	146

### **CAPÍTULO III**

#### **ESTABILIDAD COLOIDAL DE SISTEMAS LIOFÍLICOS: FUERZAS DE HIDRATACIÓN**

<b>1. Introduction</b>	151
<b>2. Obtención de los complejos látex-proteína</b>	153
<b>3. Isotherma de adsorción de <math>F(ab')_2</math> sobre el látex S4CS9</b>	154
<b>4. Estabilidad coloidal anómala de complejos S4CS9-<math>F(ab')_2</math></b>	156
<b>5. Influencia del pH sobre la estabilidad coloidal de los complejos látex-<math>F(ab')_2</math></b>	160
<b>6. Influencia del catión sobre la estabilidad coloidal de los complejos S4CS9-<math>F(ab')_2</math></b>	168
<b>7. Influencia del anión sobre la estabilidad coloidal de los complejos látex-<math>F(ab')_2</math></b>	170
<b>8. Influencia de la temperatura sobre la estabilidad coloidal de los complejos S4CS9-<math>F(ab')_2</math></b>	173
<b>9. Influencia de agentes deshidratantes sobre la estabilidad coloidal de los complejos látex-<math>F(ab')_2</math></b>	174

10. ¿Aparece este mecanismo de estabilidad coloidal no-DLVO con otras proteínas?	176
11. Influencia de la conformación de la proteína adsorbida	181
12. Influencia del sustrato polimérico	185
13. Adsorción específica de cationes sobre complejos latex-proteína	187
14. Estabilidad coloidal de complejos látex-proteína en la zona DLVO	198
15. Descripción teórica de las fuerzas de hidratación: teoría DLVO extendida	220

#### CAPÍTULO IV

### CARÁCTER FRACTAL DE LA AGREGACIÓN COLOIDAL: RELACIÓN ENTRE CINÉTICA Y MORFOLOGÍA DE LOS AGREGADOS

1. Introducción	229
2. Constante de agregación rápida para partículas de látex	230
3. Constante de agregación rápida para complejos látex-F(ab') <sub>2</sub>	243
4. Morfología de los agregados: dimensión fractal	254
5. Obtención experimental de la dimensión fractal	262
6. Seguimiento de la cinética de agregación por dispersión dinámica de luz	264
7. Morfología de agregados formados por partículas liofóbicas: látex MB0	265
8. Morfología de agregados formados por partículas liofílicas: complejo látex MB0-F(ab') <sub>2</sub>	269
9. Cinética de agregación seguida por PCS para el látex MB0 y	278

el complejo MBO-F(ab')<sub>2</sub>

## CAPÍTULO V

### APLICACIÓN DE PARTÍCULAS COLOIDALES SENSIBILIZADAS CON PROTEÍNA PARA TESTS DE INMUNOAGLUTINACIÓN

1. Introducción	285
2. Generalidades sobre la adsorción de proteínas	289
3. Características de los anticuerpos IgG y F(ab') <sub>2</sub> , y del antígeno PCR	294
4. Adsorción covalente a látex cloroactivado	296
5. Seguimiento óptico de la inmunoaglutinación	310
6. Estabilidad coloidal de reactivos para test de inmunoaglutinación	330
7. Comparación entre reactivos obtenidos por fisisorción y por quimisorción	351
CONCLUSIONES	371
REFERENCIAS	375

## Introducción

Hace cuatro años comencé mis estudios de postgraduado en el seno del Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada. El presente trabajo es el fruto de las investigaciones acometidas durante estos años. El carácter interdisciplinar del grupo de investigación queda reflejado a lo largo de la presente Tesis Doctoral en la que se han tratado aspectos concernientes a la física, la química y la biología.

Los temas abordados en esta Tesis Doctoral tratan de descubrir y comprender algunos de los secretos del mundo coloidal. Un problema clave de toda dispersión coloidal es su capacidad de permanecer durante largo tiempo como sistema formado por partículas aisladas sin llegar a agregarse. Las partículas de dimensiones coloidales permanecen dispersas en un medio líquido como consecuencia de la existencia de un mecanismo estabilizador (repulsión electrostática, impedimentos estéricos ...). Sin embargo, bajo condiciones adversas como pueden ser temperaturas altas, elevadas concentraciones de electrolito, fuertes agitaciones, etc. las partículas tienden a unirse para formar agregados. El estudio de los límites entre estabilidad e inestabilidad coloidal es fundamental en la física coloidal.

La agregación coloidal no sólo tiene importancia a nivel teórico sino también desempeña un relevante papel en la industria química, minera, electrónica, farmacéutica, medio ambiente, medicina... En algunas ocasiones interesa mantener estable un sistema coloidal pero en otras interesa controlar la velocidad y la extensión de la agregación para formar agregados con la morfología deseada. La agregación desempeña un papel importante en el transporte de sustancias contaminantes en medio acuoso así como en el ciclo geoquímico de los elementos disueltos en los océanos. La agregación en ríos, lagos y océanos es un importante mecanismo que controla el tamaño de las partículas, y en consecuencia, controla sus ciclos de sedimentación.

Uno de los principales objetivos de esta Tesis Doctoral es el estudio de las diferentes fuerzas que aparecen cuando dos partículas coloidales interaccionan, y



que van a determinar su estabilidad coloidal. Para ello se han empleado dos tipos de coloides bien diferentes: liofóbicos y liofílicos. El primer grupo lo constituyen coloides de matriz polimérica dispersos en agua, también conocidos como **látex** por su similitud con la secreción vegetal de la que se obtiene el caucho. Adsorbiendo moléculas de proteína sobre estas partículas se obtienen coloides de marcado carácter liofílico.

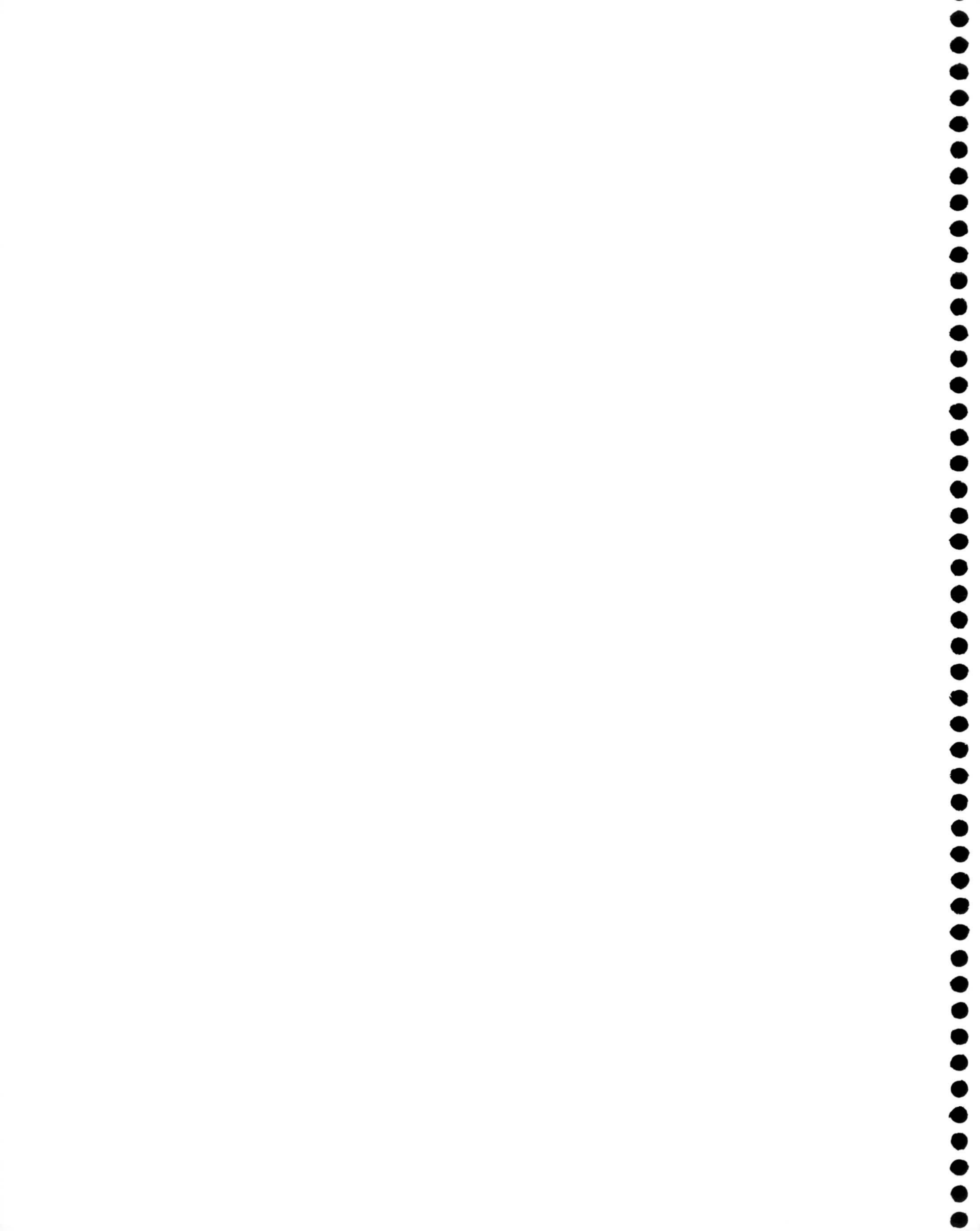
Un caso especial de agregación coloidal ocurre cuando partículas recubiertas con anticuerpos reaccionan con una disolución que contiene el antígeno complementario. La existencia de reacciones anticuerpo-antígeno entre diferentes partículas induce la aglutinación del coloide. Este es el fundamento de los inmunoensayos de aglutinación de látex. Una muestra biológica (sangre, orina, etc.) diluida apropiadamente se introduce en un tubo que contiene un tampón y el complejo látex-anticuerpo deseado. Si el medio contiene el antígeno que reacciona específicamente con el anticuerpo adsorbido sobre las partículas de látex se producirá la agregación del látex, confirmándose la existencia de la sustancia buscada. En caso contrario, la ausencia de aglutinación (test negativo) indicará la no presencia (en cantidad suficiente) de dicha sustancia. Sin embargo, un positivo falso ó un test negativo puede ocurrir si el complejo látex-anticuerpo es inestable coloidalmente ó la proteína se desorbe del soporte polimérico. Por otra parte, para cuantificar la aglutinación del complejo látex-anticuerpo se pueden emplear diferentes técnicas.

En esta tesis se han empleado látex con grupos clorometilo superficiales que permiten unir covalentemente los anticuerpos evitando de esta forma la desorción. Estos látex se han empleado para preparar reactivos en los que se han empleado los anticuerpo IgG y F(ab')<sub>2</sub>. De igual forma se ha propuesto una nueva metodología de enorme interés industrial (patente solicitada) para estabilizar complejos látex-anticuerpo.



# Capítulo I

## Caracterización de coloides poliméricos



# 1 Caracterización de Coloides Poliméricos

## 1. Introducción

La síntesis de coloides orgánicos mediante la polimerización en emulsión permite obtener fácilmente partículas coloidales de forma esférica y con una distribución de tamaño estrecha (monodispersidad). Como resultado, estos sistemas tienen un gran interés para la ciencia de los coloides. Generalmente, a una dispersión de partículas coloidales poliméricas en medio acuoso se le conoce con el nombre de **látex**. Mediante la polimerización en emulsión se pueden sintetizar esferas con un diámetro desde 50 nm (0.05  $\mu\text{m}$ ) hasta 1000 nm (1  $\mu\text{m}$ ). Actualmente, y debido al gran desarrollo experimentando en los últimos años, estos látex se emplean en una gran variedad de aplicaciones como puede ser la obtención de cauchos, pinturas, recubrimientos, adhesivos, agentes floculantes, etc (Candau, 1990; Albright et al., 1996). Así mismo, gracias a sus propiedades, como son su forma esférica, diámetro, superficie caracterizable, elevada área superficial..., se han utilizado en aplicaciones dirigidas a la estandarización y calibración de contadores de partículas o microscopios electrónicos (Bangs, 1987), cromatografía de afinidad (Margell et al., 1982), liberación de medicamentos (Petch et al., 1982), separación y marcaje de células (Rembaum et al., 1982), inmunoensayos (Borque, 1992). El uso de las mismas como sistema modelo para el estudio de propiedades físicas tales como la dispersión de luz, el proceso de electroforesis, la reología o las teorías de estabilidad coloidal (Bangs, 1987)..., ha dado lugar a muchos trabajos de investigación.

Una exhaustiva caracterización superficial de las partículas coloidales es necesaria, no sólo si se va a utilizar el látex como un coloide modelo sino también para sus posibles aplicaciones. El problema de la caracterización de un coloide se puede abordar comenzando por la enumeración de sus propiedades esenciales: (1) distribución de tamaños, (2) tamaño hidrodinámico, (3) grupos químicos superficiales, (4) carácter hidrófobo/hidrófilo de la superficie de la partícula, (5) interfase sólido-líquido eléctrica, (6) estabilidad coloidal, etc.

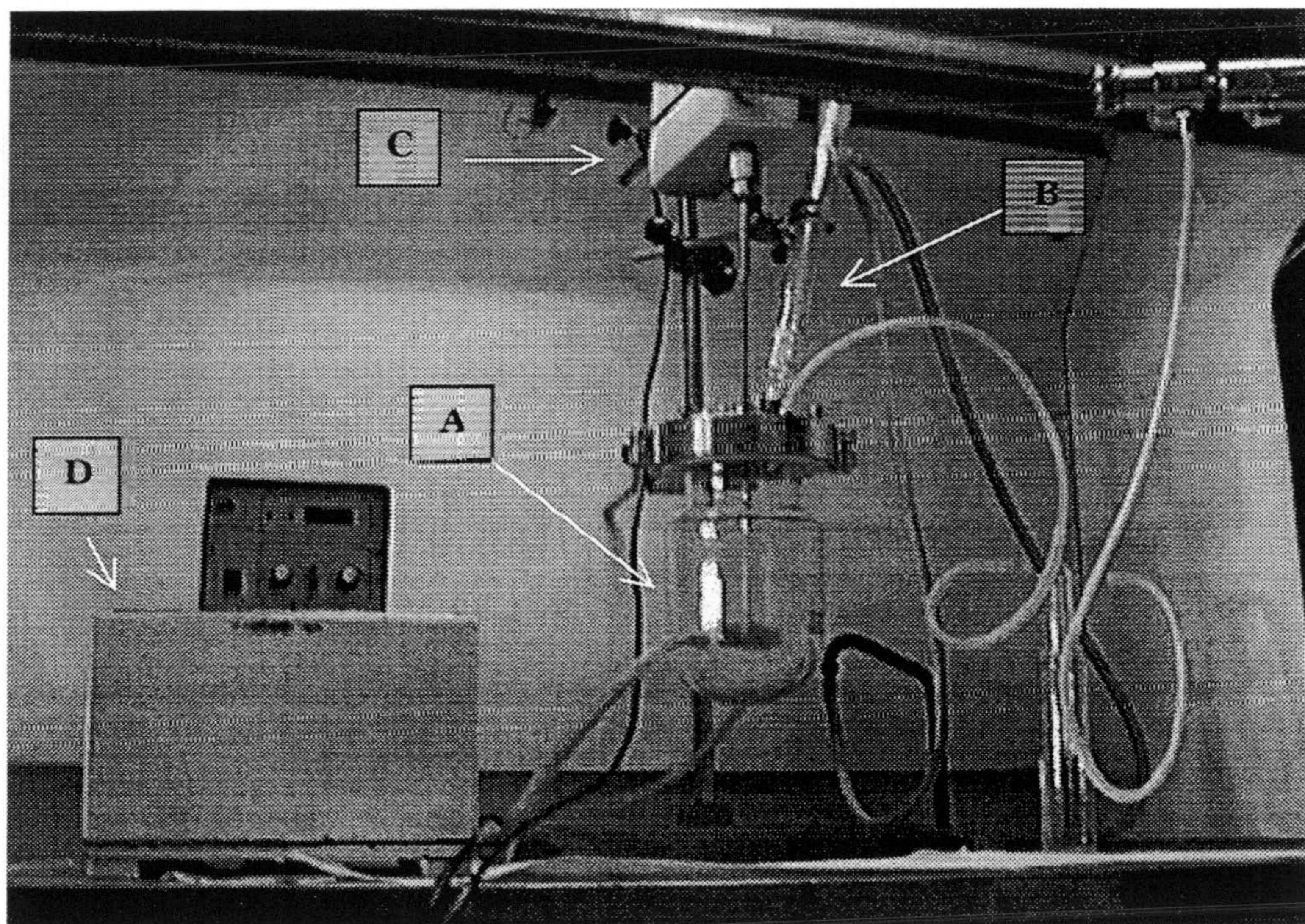
Las partículas coloidales empleadas en este trabajo de investigación poseen matriz polimérica. Básicamente son partículas obtenidas por polimerización en emulsión de estireno. En este trabajo no se han sintetizado ninguno de los látex usados, sin embargo considero útil incluir dentro de este capítulo una serie de fundamentos básicos de la polimerización en emulsión ya que la mayoría de las propiedades que caracterizan un coloide polimérico dependen, directa ó indirectamente, del proceso de síntesis. Así, por ejemplo el tipo de monómero que se use determinará el carácter hidrófilo/hidrófobo de la partícula, el iniciador empleado en la reacción controlará los grupos químicos cargados de la superficie y en consecuencia el comportamiento electroforético y la estabilidad coloidal. Algunos de los datos sobre tamaño de las partículas y densidad de carga presentados en este capítulo fueron aportados por los compañeros que me cedieron las muestras de látex. Aprovechando esta oportunidad quiero mostrar a todos ellos mi más profunda gratitud.

## **2. Fundamentos de la polimerización en emulsión**

Una de las razones por las que la polimerización en emulsión es ampliamente utilizada para la síntesis de coloides poliméricos es su enorme sencillez. Para llevar a cabo una reacción de este tipo es necesario: agua, un monómero que sea poco soluble en agua y completamente miscible con su polímero, un surfactante (opcional) para dar estabilidad coloidal a la emulsión y a las partículas de látex generadas y un iniciador capaz de generar radicales libres en la fase acuosa. A pesar de esta simplicidad, la variedad de coloides poliméricos es tan extensa que no hay un mecanismo de síntesis unificado que explique la formación de las partículas, ni existe

una cinética definida. Todo dependerá del uso o no de surfactantes, tipo de monómeros usados, disolvente utilizado y condiciones de reacción (temperatura, pH, fuerza iónica, velocidad de agitación) etc.

El proceso de polimerización en emulsión es heterogéneo y exotérmico, pudiéndose realizar de forma discontinua, en la que todos los ingredientes se añaden al principio de la reacción; de forma semicontinua, en la que uno o más ingredientes se añaden continuamente o a incrementos; y de forma continua, en la que todos los ingredientes se añaden continuamente y el producto se recoge continuamente. Industrialmente el método semicontinuo es el más empleado, mientras que en el ámbito de laboratorio se suele seguir el proceso discontinuo. El esquema del reactor utilizado para la síntesis de los diferentes látex aparece a continuación.



**Figura I.1.** Imagen del sistema de síntesis.

Se trata de un reactor termostatzado de un litro (A) equipado con: un condensador de flujo (B), un agitador de paletas de acero inoxidable, una válvula de

dos vías para borbotear  $N_2$  o extraer muestras del reactor, entradas para una posible carga y/o alimentación, un termómetro y un agitador mecánico (C). La camisa del reactor está conectada a un baño de termostatación para controlar la temperatura de la reacción (D).

La mayoría de las polimerizaciones en emulsión se realizan en presencia de un surfactante. El papel de este agente es muy variado. Solubilizar el monómero altamente insoluble en agua es determinante en el mecanismo de nucleación de las partículas, manteniendo la estabilidad coloidal durante el crecimiento de la partícula. El surfactante juega también un papel importante una vez sintetizadas las partículas, fundamentalmente en los aspectos relacionados con la estabilidad coloidal del sistema. Por otra parte controla el tamaño medio de las partículas y su grado de monodispersidad. No obstante, presenta ciertos inconvenientes, ya que el empleo de moléculas de surfactante dará lugar a partículas de látex en cuya superficie quedarán adsorbidas. Aunque gran parte de estas moléculas de emulsificante se podrán eliminar con el proceso de lavado, nunca existe seguridad de una limpieza total.

La mayoría de los látex usados en este trabajo han sido sintetizados en ausencia de surfactante.

### **3. Sistemas coloidales usados en el trabajo**

Todos los látex aquí empleados fueron sintetizados usándose como monómero principal el estireno. Esta elección se debe a que: i) la síntesis de poliestireno está ampliamente estudiada, pudiéndose encontrar una extensa bibliografía relativa a condiciones de reacción (*Goodwin et al., 1974*); ii) estas partículas se pueden considerar como sistemas modelo por su esfericidad y monodispersidad; iii) su superficie es fácilmente caracterizable y altamente hidrofóbica, condición indispensable para realizar adsorción física de proteínas; iv) debido a su geometría esférica y su elevado índice de refracción, las suspensiones coloidales de poliestireno presentan unas propiedades ópticas excepcionales para el estudio de la dispersión de luz y el seguimiento óptico de la agregación de las partículas.

Los látex empleados se pueden clasificar en dos grandes grupos (ver tabla I.1 en página 26):

1. Látex de poliestireno sintetizados en ausencia de surfactante y con el persulfato potásico como iniciador térmico. Estos sistemas presentan en su superficie grupos sulfato provenientes del iniciador. Dentro de este grupo, algunos látex fueron sintetizados empleando el estirensulfonato sódico como comonomero. En este caso existen dos tipos de grupos superficiales: sulfato y sulfonato, éstos últimos provenientes del comonomero. Ambos grupos superficiales se caracterizan por ser ácido fuerte y son los responsables de que las partículas estén cargadas negativamente. Todos estos sistemas fueron sintetizados por nuestro grupo de investigación, excepto el látex IDC que fue suministrado por la empresa Interfacial Dynamics Corporation (U.S.A.).
2. El segundo grupo está formado por los látex clorometilo, que fueron donados por Joxe Sarobe y Jacqueline Forcada del Grupo de Ingeniería Química de la Universidad del País Vasco. Estos látex fueron sintetizados por polimerización en emulsión sembrada en dos etapas. En la primera etapa se sintetiza un núcleo o siembra de poliestireno, usándose el persulfato potásico como iniciador y el sulfocianato dihexil sódico como emulsificante (Aerosol MA-80). Esta siembra es utilizada como núcleo en una posterior copolimerización de estireno y clorometilestireno. Este último monómero empleado en la segunda síntesis va a ser el responsable de que los látex presenten grupos clorometilo superficiales. Estos grupos no aportan carga a las partículas, pero son capaces de enlazarse covalentemente con proteínas. Estas partículas presentan como grupos cargados los grupos sulfato del iniciador y algunos grupos sulfonato del surfactante. Algunos de los látex clorometilo fueron sintetizados con una pequeña cantidad de ácido metacrílico con el fin de que presentaran grupos carboxilo en la superficie.

#### **4. Limpieza de los látex**

Antes de poder usar un látex como coloide modelo o llevar a cabo estudios de adsorción proteica es necesario realizar una rigurosa limpieza del mismo, entendiéndose por ésta la eliminación del iniciador y monómeros residuales,



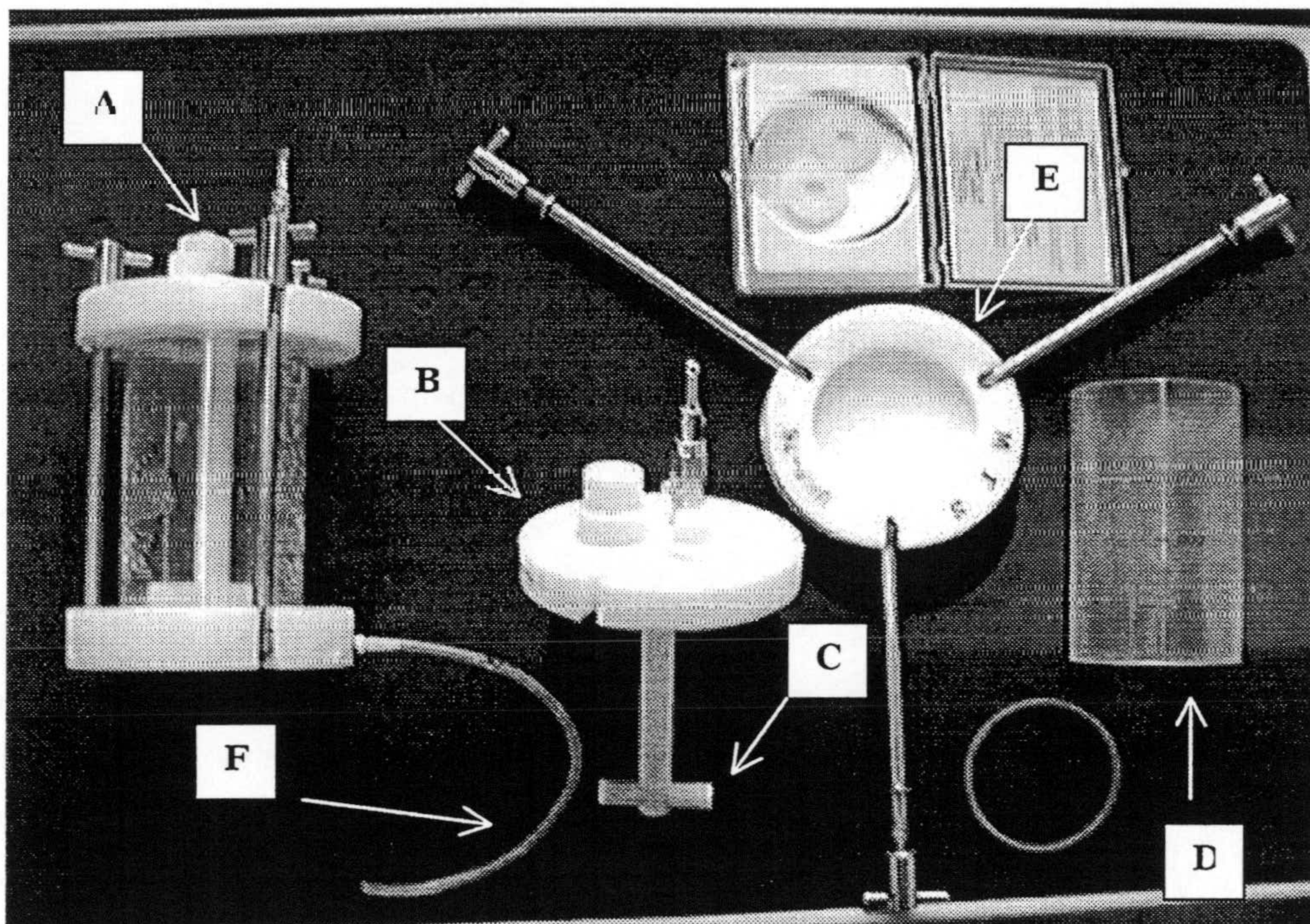
posibles oligómeros disueltos o anclados débilmente en la superficie de las partículas, sales y tampón empleados, y emulsificante (si se hubiera usado).

El empleo de un método de limpieza que no sea efectivo puede llevar a obtener diferentes densidades superficiales de carga y tipo de grupos superficiales, aunque se hayan seguido estrategias similares en la preparación del látex (*Ahmed et al., 1980; de las Nieves et al., 1991*). Varios autores han estudiado la influencia en la carga superficial del látex utilizando distintos métodos de limpieza (*Tsaur et al., 1987; van Streun et al., 1991*).

El proceso de limpieza del látex comienza por filtrarlo a través de una malla de nylon con lana de vidrio (Merck), previamente hervida, una vez que la reacción de síntesis ha finalizado. De esta forma se retiran los grumos y agregados formados. A continuación se ha de elegir un método de limpieza ó combinación de métodos que permita eliminar las especies químicas disueltas en la fase acuosa. Los diferentes procedimientos existentes son:

1. Desplazamiento de suero (serum replacement): Esta técnica consiste en el paulatino cambio de la fase acuosa y la consiguiente eliminación de las sustancias en ella disueltas. El agua que va siendo eliminada a través de un filtro es continuamente repuesta por agua desionizada, de forma que el proceso finaliza cuando el agua que se elimina tiene la conductividad del agua desionizada (menor de  $1 \mu\text{S}/\text{cm}$ ). No hay que olvidar que la conductividad de la disolución coloidal siempre será mayor debido a la existencia de iones que neutralizan la carga superficial de las partículas, oscilando entre 10 y  $20 \mu\text{S}/\text{cm}$ . En la figura I.2 se muestran las distintas partes de una célula de serum replacement. El agua desionizada que va a arrastrar las impurezas es introducida en la célula a través de la apertura (A). La tapa a rosca (B) permite cerrar la célula y es de poliacetato. El agitador magnético (C) está recubierto de teflón y está continuamente girando durante el proceso de limpieza con el fin de facilitar el mismo e impedir la sedimentación de las partículas. La cámara (D) está hecha de policarbonato. El filtro tiene un tamaño de poro menor al diámetro de las partículas coloidales y se encuentra depositado sobre un disco poroso de polietileno. La tapa inferior de

poliacetato (E) permite cerrar la célula y en ella se encuentra la salida del agua (F).



*Figura I.2. Dispositivo de limpieza "serum replacement".*

El dispositivo de serum replacement utilizado fue suministrado por Micro Filtration System, MFS. Este método de limpieza es lento pero poco agresivo. Aún así, cuando el coloide tiene muy baja densidad de carga se suelen encontrar problemas de estabilidad coloidal, produciéndose en la célula de limpieza la agregación del látex. Este método es el más aceptado.

2. Ciclos de centrifugación/redispersión: Se trata del tratamiento más drástico que permite eliminar las impurezas disueltas y los polielectrolitos que estén más débilmente adheridos a la superficie del coloide. Consiste en someter al látex a centrifugación a una determinada velocidad de forma que sedimente completamente. A continuación se decanta el agua con todas las sustancias disueltas en ella y por último se redispersan las partículas en agua desionizada.

Este proceso se repite varias veces hasta que la conductividad del agua decantada sea igual a la del agua desionizada. El empleo de este método está limitado porque: i) sólo se pueden centrifugar óptimamente partículas con un diámetro superior a los 150 nm; ii) es aconsejable sólo para limpiar látex con alta densidad de carga, y por tanto elevada estabilidad coloidal. En caso contrario, debido a la centrifugación se produce la agregación de las partículas.

3. Intercambio iónico con resinas cambiadoras de iones: consiste en la sustitución de un ión en disolución por otro del mismo signo que está fijado en la resina (*van der Hul et al., 1968*). De esta forma los iones presentes en el medio, como por ejemplo el  $K^+$  procedente del iniciador, se cambian por  $H^+$  mientras que los posibles aniones se cambian por  $OH^-$ . Hay que tener cuidado con los látex con elevada densidad de carga que pueden actuar como intercambiadores por sí mismos y el proceso se realiza a la inversa (*Galisteo, 1992*). Previamente las resinas son sometidas a un proceso de limpieza con varias etapas de calentamiento a  $70^\circ C$  y posterior enfriamiento con cambio del agua del sobrenadante. El proceso finaliza cuando la conductividad es constante y menor a  $1 \mu S/cm$ . El inconveniente de este método de limpieza es que no permite eliminar el surfactante usado si éste no es iónico, las moléculas del monómero que no hayan reaccionado ni los posibles oligómeros formados. Este método es el más específico.

El proceso de limpieza de los látex utilizados en esta memoria se simplificó bastante dado que se conocían completamente las condiciones de síntesis, y fueron limpiados por serum replacement. Para algunos experimentos puntuales se realizaron limpiezas por centrifugación o por cambio iónico.

Una vez limpio el látex, se conserva en el frigorífico a una temperatura de  $5^\circ C$ . Un dato muy importante que es necesario determinar en toda suspensión coloidal es el contenido en sólido del látex. A partir de este dato se puede conocer la concentración y área total existente en cualquier muestra. Para hacer esta determinación se prepararon 6 muestras de cada látex y se mantuvieron durante 4 horas en el horno a

una temperatura de 70°C con el fin de eliminar todo el agua, quedando sólo las partículas. Por diferencia de pesadas se obtiene el contenido en sólido de cada látex.

### **5. Determinación del tamaño de partícula**

Las características más significativas de muchas dispersiones son el tamaño y la forma, ya que muchas propiedades del sistema están condicionadas en cierta medida por estos factores (*Hunter, 1987*). A partir del tamaño se podrá conocer la concentración de partículas que tendremos en una dispersión dada así como el área de superficie polimérica, dato muy importante en los estudios de adsorción de proteínas. Por otra parte, conociendo la distribución de tamaños del látex se sabrá el índice de polidispersidad. Sólo un látex monodisperso (estrecha distribución de tamaños) se va a poder utilizar como sistema modelo para aplicar las diferentes teorías. De todas las posibles técnicas, se ha elegido la determinación del tamaño a partir de la observación del látex con microscopio electrónico de transmisión (TEM). Esta elección se debe fundamentalmente a su excelente resolución (cerca de 1 nm). Las muestras de la dispersión, que han de estar muy diluidas, se colocan en unas rejillas de cobre de aproximadamente 0.5 cm de diámetro, con poros de unas cuantas micras y se dejan secar en el horno a baja temperatura. Posteriormente se toman las fotografías. Tanto el revelado como positivado de éstas, así como la preparación y fijación de las muestras, fueron realizados en los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada y en el Grupo de Ingeniería Química de la Universidad del País Vasco. Una vez obtenidas las fotografías, éstas se escanean y mediante un programa informático (Bolero, AQ system), diseñado especialmente por nuestro grupo de investigación, es posible realizar un análisis estadístico de los datos. Después de analizar unas 600 partículas como media el programa suministra, entre otros, los datos de la distribución de tamaños, así como los parámetros más significativos de la misma, como puede ser un valor promedio para el diámetro de partícula, y el índice de polidispersidad (I.P.D) que nos da idea de la distribución de tamaños de la muestra (*Zamora, 1991*).

**Diámetro promedio en número**

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

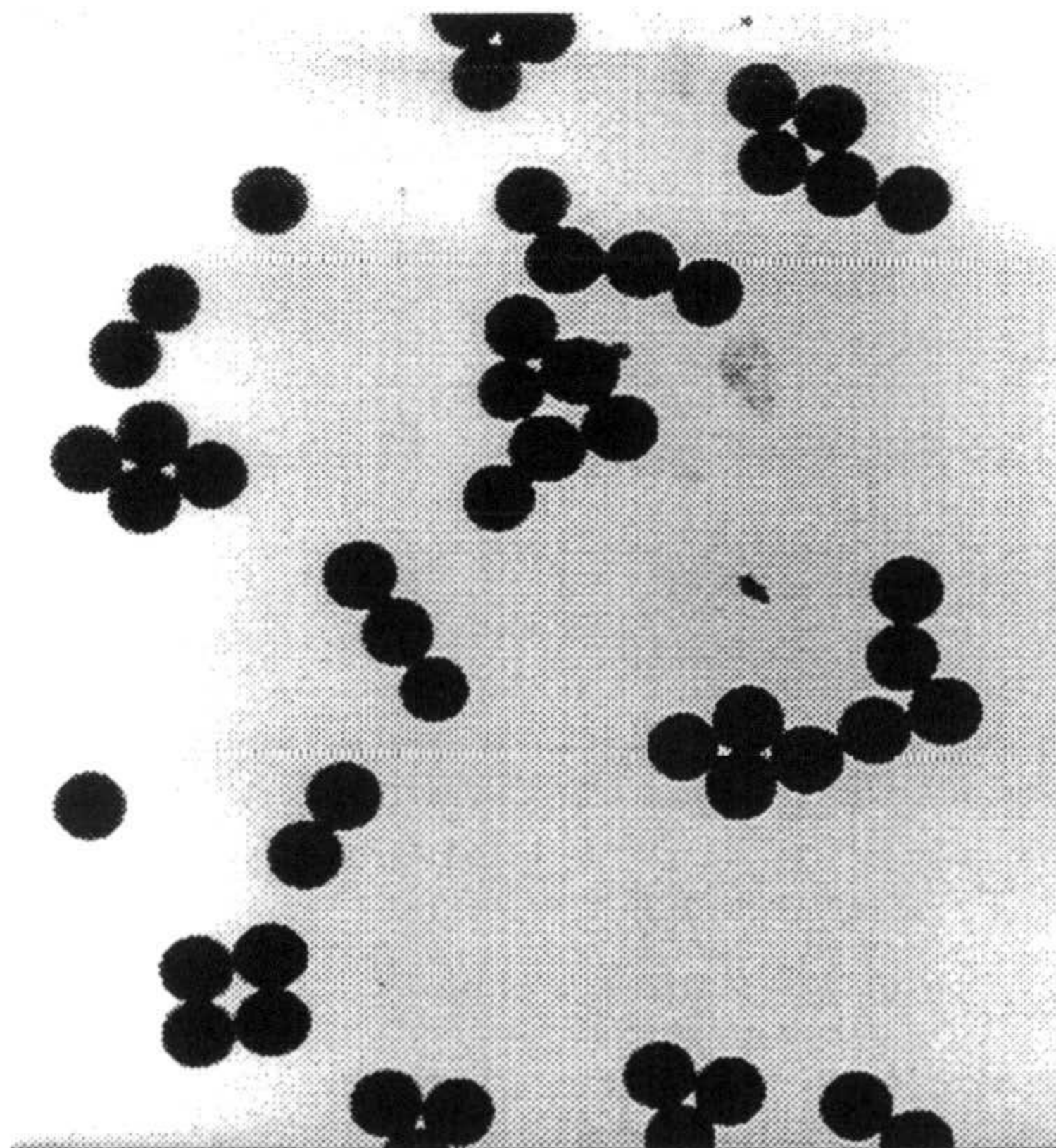
**Diámetro promedio en peso**

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

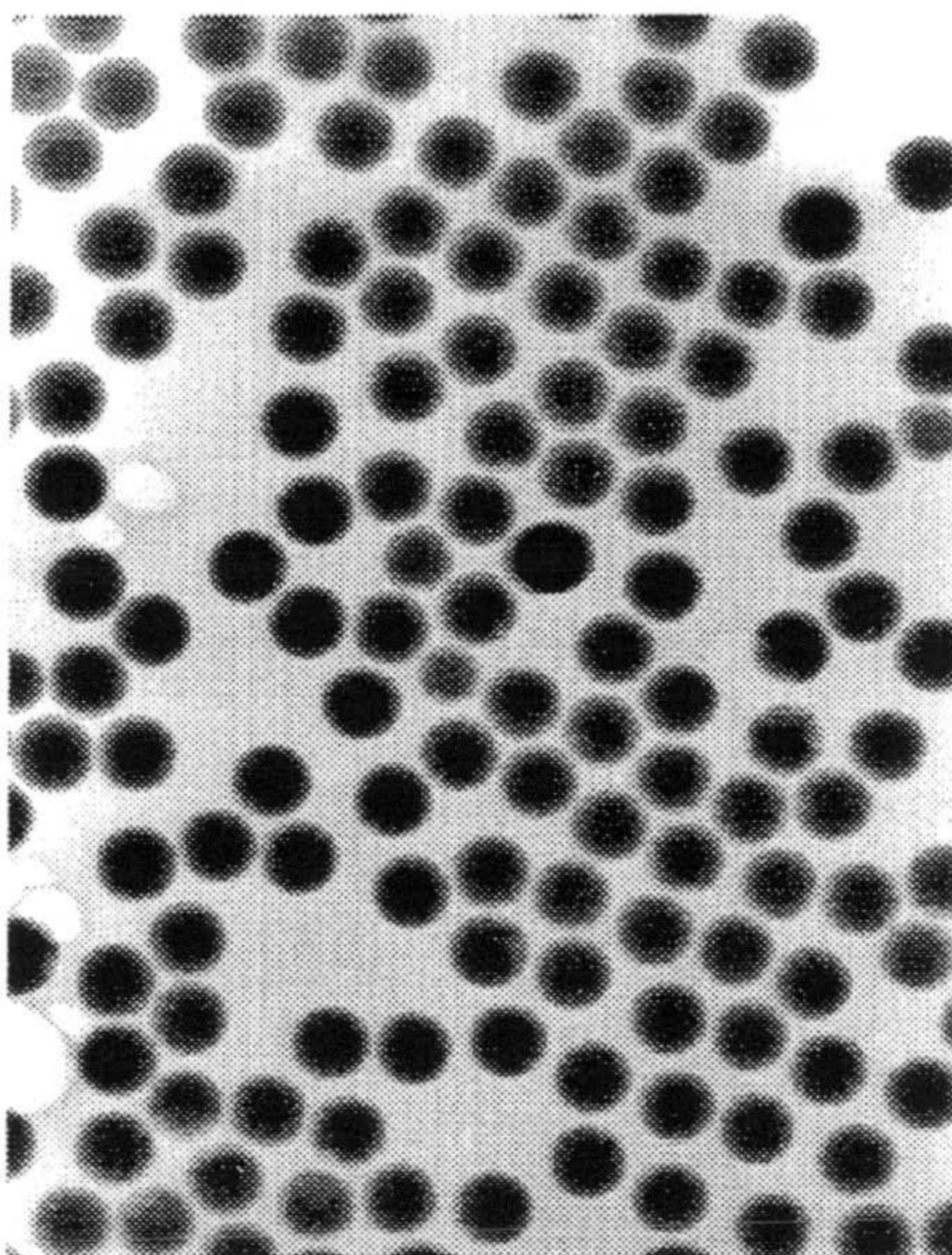
**Índice de polidispersidad**

$$I.P.D. = \frac{d_w}{d_n} \quad (\text{I.3})$$

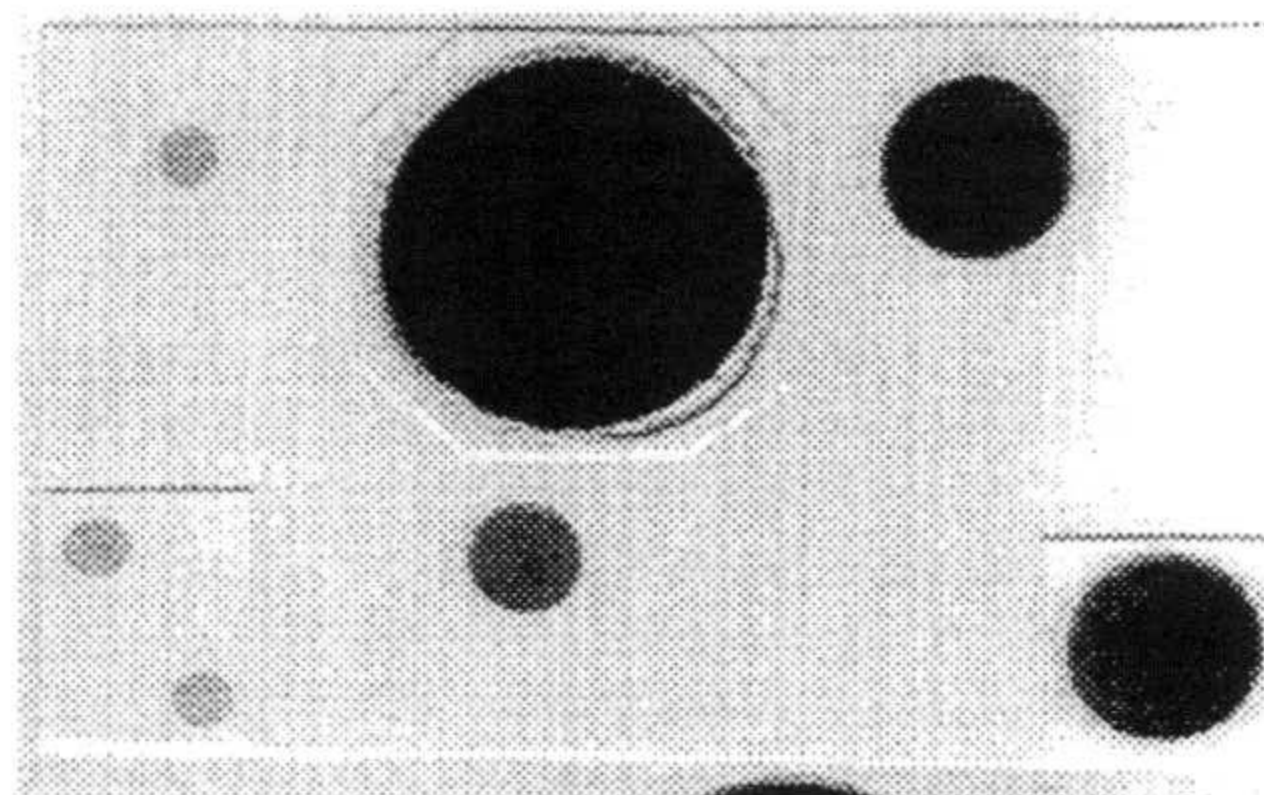
Las siguientes fotografías muestran el aspecto de algunos de los látex. En primer lugar cabe resaltar la geometría esférica de las partículas. Esta propiedad es una de las más características de los coloides poliméricos. Tal geometría permite utilizar estas partículas como sistemas modelo, dado que la mayoría de las teorías sobre dispersión de luz, estabilidad coloidal, electroforesis, etc, han sido desarrolladas para partículas esféricas. Otra importante propiedad de este tipo de coloides puede ser extraída de las fotografías: su alta monodispersidad. La distribución de tamaños es lo suficientemente estrecha como para considerar a la dispersión coloidal como monodispersa (tal y como muestran los datos estadísticos).



*Figura I.3. Fotografía obtenida por TEM del látex JX2.*



*Figura I.4. Fotografía obtenida por TEM del látex MB0.*

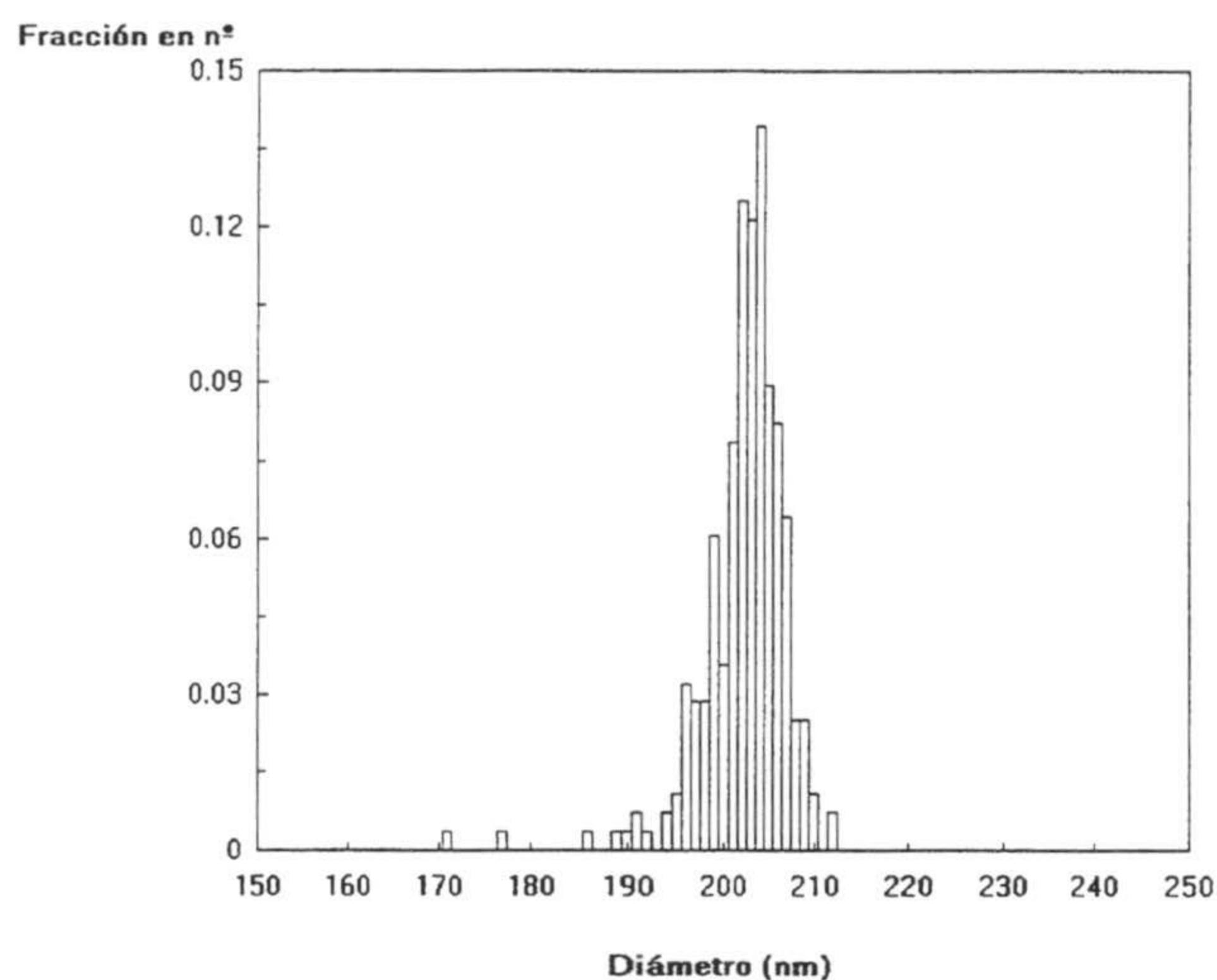


*Figura I.5. Comparación de tamaños para los látex AS11, MP2, S4CS9 y PS3Ma.*

Los resultados obtenidos sobre el diámetro de partícula y el índice de polidispersidad para los látex aparecen en la Tabla I.1 (página 26).

De la lectura de estos datos se puede comprobar la buena monodispersidad de los látex usados en ese trabajo, ya que todos los valores de I.P.D. son inferiores a 1.05 que es el límite que se considera para diferenciar polidispersidad de monodispersidad (Tsaour et al., 1987).

Si el valor de I.P.D. fuera 1, significaría que todas las partículas son exactamente iguales y el sistema sería totalmente monodisperso. A medida que el I.P.D. se aleja de la unidad, la distribución de tamaños será cada vez más ancha. La figura I.6 corresponde a la distribución de tamaños del látex S5CS2.



*Figura I.6. Distribución de tamaños del látex S5CS2.*

Se han utilizado una gran variedad de sistemas coloidales, cubriendo el intervalo comprendido entre los 100 nm de diámetro a los 660 nm. Esta elección se realizó para estudiar uno de los puntos importantes de esta tesis: la diferenciación entre coagulación y floculación.

Otra técnica que se puede utilizar para medir el tamaño de partículas coloidales es la espectroscopía de fotocorrelación (PCS) basada en la dispersión dinámica de luz por parte de una dispersión coloidal. Esta técnica permite obtener el radio hidrodinámico de las partículas, a diferencia del TEM que determina el diámetro previo secado de la muestra.

El desarrollo de la técnica de PCS se debe fundamentalmente a la aparición de ordenadores con gran capacidad de cálculo, junto con la mejora de los procesos de síntesis, que permitieron obtener partículas ideales.

Una de las propiedades características de los coloides es el movimiento aleatorio o Browniano al que se encuentran sometidas las partículas por efecto de la agitación

térmica. La velocidad de este movimiento dependerá de su coeficiente de difusión ( $D$ ), que a su vez es función del radio de la partícula esférica ( $r$ ) según la relación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (\text{I.4})$$

donde  $T$  es la temperatura,  $\eta$  la viscosidad y  $k_B$  la constante de Boltzman.

Este movimiento Browniano será el responsable de que la luz dispersada tenga una frecuencia ligeramente diferente a la incidente cuando es detectada por un fotomultiplicador.

La técnica PCS se basa en un fenómeno conocido como "correlación", mediante el cual se 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 a partir del análisis de la correlación se puede conocer el coeficiente de difusión translacional de los dispersores, y por consiguiente su tamaño. Así pues, la espectroscopía de fotocorrelación estudia la dependencia temporal de las fluctuaciones de la intensidad que viene caracterizada por la función de autocorrelación de la intensidad definida como (Pecora, 1985):

$$g_1(\vec{q}, t) = \left\langle i(\vec{q}, t_0) i(\vec{q}, t + t_0) \right\rangle \quad (\text{I.5})$$

donde  $\vec{q}$  es el vector de onda. Para un sistema en equilibrio la función de autocorrelación de la intensidad es independiente de  $t_0$ .

Se define la función de autocorrelación del campo eléctrico  $g_E$  como:

$$g_E(\vec{q}, t) = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\epsilon_f}{\mu}} \left\langle (\vec{E}_s(0) \cdot \hat{n}_s) (\vec{E}_s^*(t) \cdot \hat{n}_s) \right\rangle \quad (\text{I.6})$$

siendo  $\mu$  la permeabilidad magnética,  $\epsilon_f$  la constante dieléctrica y  $\hat{n}_s$  el vector unitario que indica la dirección de polarización de la luz dispersada.



La función de autocorrelación de la intensidad se puede escribir como:

$$g_1(\vec{q}, t) = I^2 + \left| g_E(\vec{q}, t) \right|^2 \quad (\text{I.7})$$

Esta ecuación se conoce como relación de Siegert donde  $I$  es la intensidad media dispersada. Es conveniente poner esta relación en términos de las funciones de correlación normalizadas:

$$\hat{g}_1(\vec{q}, t) = g_1(\vec{q}, t) / I^2 \quad (\text{I.8})$$

$$\hat{g}_E(\vec{q}, t) = g_E(\vec{q}, t) / I^2 \quad (\text{I.9})$$

La relación de Siegert queda así:

$$\hat{g}_1(\vec{q}, t) = I^2 + \left| \hat{g}_E(\vec{q}, t) \right|^2 \quad (\text{I.10})$$

Las funciones de correlación dependientes del tiempo han sido muy útiles en algunas áreas de la física estadística y la espectroscopía. Estas funciones proporcionan un método conciso, para expresar el grado en el que dos propiedades dinámicas se correlacionan sobre un periodo de tiempo (*Berne et al., 1990*).

La luz es dispersada debido a inhomogeneidades en la polarizabilidad de la muestra. El exceso de polarizabilidad de un elemento de volumen en la posición  $\vec{r}$ , se define como:

$$\delta\alpha(\vec{r}) = \alpha(\vec{r}) - \langle \alpha \rangle \quad (\text{I.11})$$

donde  $\langle \alpha \rangle$  es la polarizabilidad media de la muestra. La transformada de Fourier de  $\delta\alpha(\vec{r})$  es  $\delta\alpha(\vec{q})$ . La amplitud del campo dispersado para polarizaciones verticales del haz incidente y dispersado, es proporcional a la amplitud instantánea de esta componente de Fourier.

Para partículas pequeñas en disoluciones diluidas, el exceso de polarizabilidad se aproxima por las fluctuaciones en concentración de partículas,  $\delta c$ , en este caso:

$$E_s(t) \propto \delta c(\vec{q}, t) \quad (\text{I.12})$$

La dependencia temporal del campo dispersado se relaciona con el movimiento Browniano de las partículas, el cual es responsable de las fluctuaciones en densidad

que son proporcionales a las fluctuaciones en concentración. Para una disolución de partículas pequeñas monodispersas, se calcula la evolución temporal de las fluctuaciones en concentración. Partiendo de la ecuación de difusión:

$$\frac{\partial \delta c(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 \delta c(\vec{r}, t) \quad (\text{I.13})$$

y expresando  $c(\vec{r}, t)$  como la transformada de Fourier,

$$c(\vec{r}, t) = \int d^3 \vec{q} e^{i \vec{q} \cdot \vec{r}} c(\vec{q}, t) \quad (\text{I.14})$$

se obtiene

$$\frac{\partial}{\partial t} \int d^3 \vec{q} e^{i \vec{q} \cdot \vec{r}} \delta c(\vec{r}, t) = D \nabla^2 \int d^3 \vec{q} e^{i \vec{q} \cdot \vec{r}} \delta c(\vec{q}, t) \quad (\text{I.15})$$

y finalmente

$$\frac{\partial \delta c(\vec{q}, t)}{\partial t} = -q^2 D \delta c(\vec{q}, t) \quad (\text{I.16})$$

que tiene la solución

$$\delta c(\vec{q}, t + \tau) = \delta c(\vec{q}, t) e^{-q^2 D \tau} \quad (\text{I.17})$$

Se calcula la media estadística multiplicando ambos miembros de la anterior ecuación por  $c(\vec{q}, t)$ , y tomando valores medios

$$\left\langle \delta c(\vec{q}, t + \tau) \delta c(\vec{q}, t) \right\rangle = \left\langle \delta c(\vec{q}, t)^2 \right\rangle e^{-q^2 D \tau} \quad (\text{I.18})$$

$1/q^2 D$  se conoce como tiempo de relajación y es el tiempo que tarda una esfera en difundir una distancia  $1/q^2$ .

Dado que la amplitud del campo dispersado es proporcional a la fluctuación en concentración, y teniendo en cuenta las ecuaciones I.6 y I.9 se tiene:

$$\frac{\left\langle E_s(\vec{q}, t + \tau) E_s(\vec{q}, t) \right\rangle}{\left\langle E_s(\vec{q}, t)^2 \right\rangle} = e^{-q^2 D \tau} = g_E(\tau) \quad (\text{I.19})$$

donde  $g_E(\tau)$  es la función de autocorrelación de primer orden del campo dispersado y  $\tau$  es el tiempo de correlación.

La relación de Siegert para un sistema diluido y monodisperso, queda:

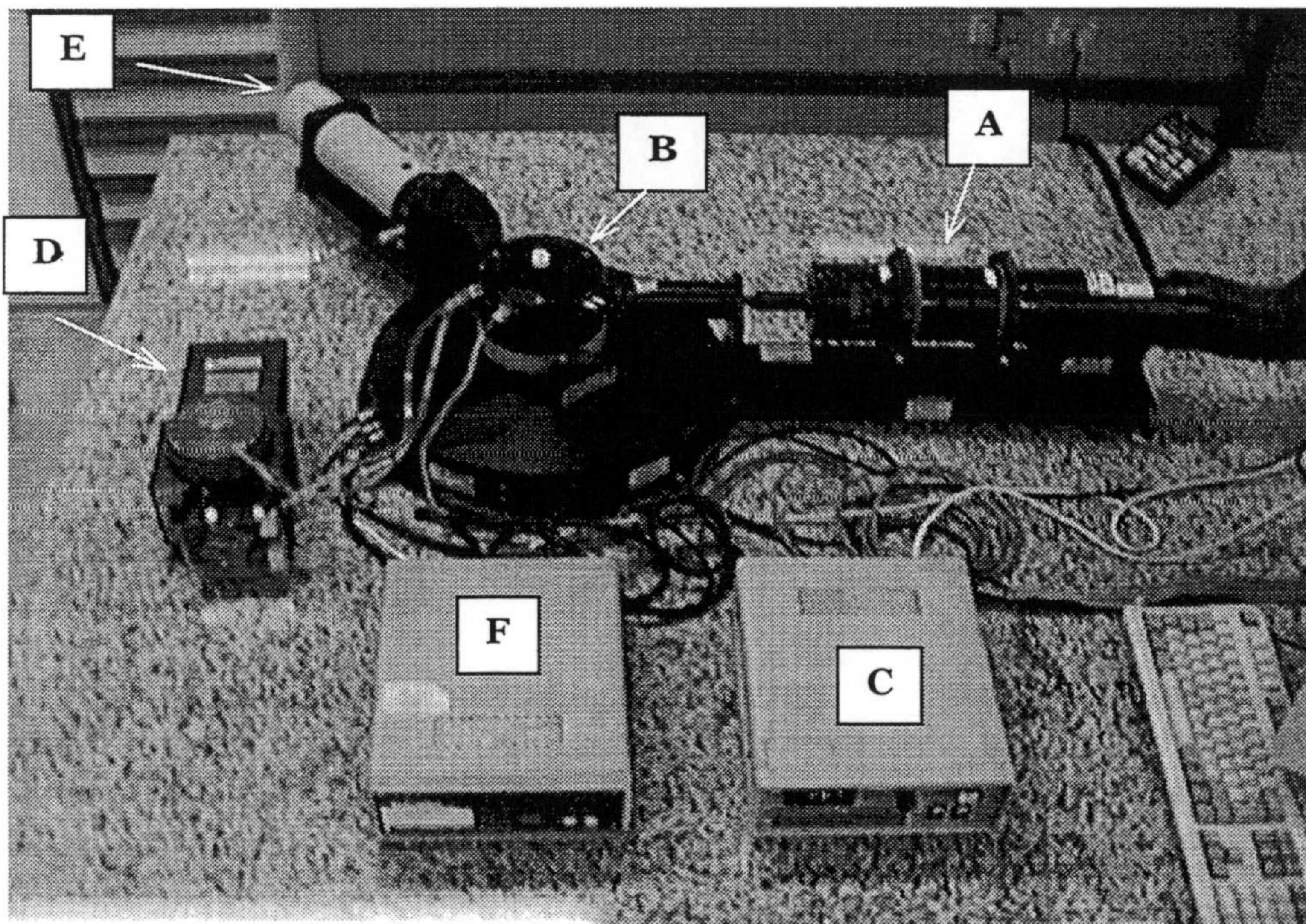
$$g_1(\tau) = I^2 + B^2 e^{-2q^2 D\tau} \quad (\text{I.20})$$

Esta función de autocorrelación se mide directamente en el experimento de dispersión, obteniéndose el coeficiente de difusión de las partículas y de ahí su radio. Si la muestra contiene una mezcla de  $N$  especies diferentes con coeficientes de difusión  $D_i$ ,  $g_1(\tau)$  es la suma de exponenciales simples de la forma (Pecora, 1985):

$$g_1(\tau) = A + \left[ \sum_{i=1}^N a_i e^{-q^2 D_i \tau} \right]^2 \quad (\text{I.21})$$

De esta forma se puede obtener un diámetro promedio de agregado para el caso en el que estemos siguiendo un proceso de agregación.

El dispositivo empleado para realizar las medidas de tamaño por PCS es el sistema 4700 de Malvern Instruments cuya perspectiva general aparece a continuación.



*Figura I.7. Imagen del sistema 4700*

A continuación se especifica cada uno de estos componentes.

*Fuente de luz (A):* Se trata de un láser de Argón de una potencia de 75 mW y una longitud de onda de 488 nm. El diámetro del haz es de 0.65 mm, estando polarizado verticalmente y proporcionando un perfil gaussiano de la intensidad.

*Baño (B):* La célula de medida se encuentra introducida en un baño termostatzado para evitar refracciones debido al elevado índice de refracción relativo entre el cuarzo y el aire (aproximadamente 1.5). El agua que contiene el baño está desgasificada, destilada y tratada con azida ( $\text{NaN}_3$ ) para evitar la contaminación por microorganismos que pueden afectar a la dispersión de la muestra. La ventana de entrada del baño es plana para suprimir reflexiones y refracciones del haz incidente.

*Célula de medida:* Esta célula cilíndrica contiene la dispersión a estudiar. Su diámetro es de 1 cm y está hecha de cuarzo.

*Controlador de temperatura (C):* Mantiene constante la temperatura del baño durante el proceso de medida con una precisión de  $0.1^\circ$ . Este hecho es muy importante debido a la dependencia del coeficiente de difusión con la temperatura.

*Bomba peristáltica con filtro (D):* Filtra el agua del baño antes de realizar un experimento. Su función es eliminar cualquier suciedad que haya podido generarse o caerse en el baño. Durante la realización de la medida la bomba está inactivada.

*Detector (E):* Consiste en un fotomultiplicador y un amplificador discriminador de pulsos. Su posición define el ángulo de dispersión, que en este caso se extiende desde  $10^\circ$  a  $140^\circ$ . Debe de estar muy bien alineado para asegurar que enfoca perfectamente al centro del volumen de dispersión. Es capaz de detectar del orden de 20 millones de fotones por segundo (20 Mhz en frecuencia). El amplificador-discriminador permite la detección con un tiempo de respuesta de 50 nanosegundos.

*Motor (F):* Posiciona automáticamente el detector al ángulo deseado con una precisión de  $0.1^\circ$ .

*Correlador:* Quizás sea el componente más importante del sistema. Su misión es calcular la función de autocorrelación trabajando como contador de pulsos procedentes del detector.

Todo el dispositivo se encuentra sobre una mesa antivibratoria.

Esta técnica no se ha utilizado para medir el tamaño de todos los látex, sino que se ha utilizado para seguir procesos de agregación y para realizar un estudio sobre el efecto del medio en el tamaño de los látex carboxílicos que se mostrará más adelante.

## 6. Determinación de la densidad de carga superficial

Muchas de las propiedades más importantes de los coloides vienen determinadas, directa ó indirectamente, por la carga eléctrica que presentan las partículas. Fenómenos como electrocatálisis, corrosión, adsorción, crecimiento de cristales, estabilidad coloidal, flujo de un coloide a través de un medio poroso, etc., no pueden ser explicados correctamente sin conocer la carga del coloide. Esta carga se puede deber a la existencia de grupos superficiales cargados que provienen del iniciador, del monómero o surfactantes iónicos empleados en el proceso de síntesis, o iones adsorbidos específicamente.

La determinación de la carga neta nos va a proporcionar la primera información acerca de la estabilidad del coloide.

Al conocer el proceso de síntesis de nuestros látex se puede saber que sus grupos superficiales cargados son ácidos. Los grupos sulfato y sulfonato son ácidos fuertes mientras que los carboxilos son débiles. Aprovechando esta propiedad su medida se puede realizar a través de valoraciones conductimétricas o potenciométricas basadas en la reacción de neutralización con NaOH como agente valorante (*Labid et al., 1980; de las Nieves et al., 1991; Bastos et al., 1995*).

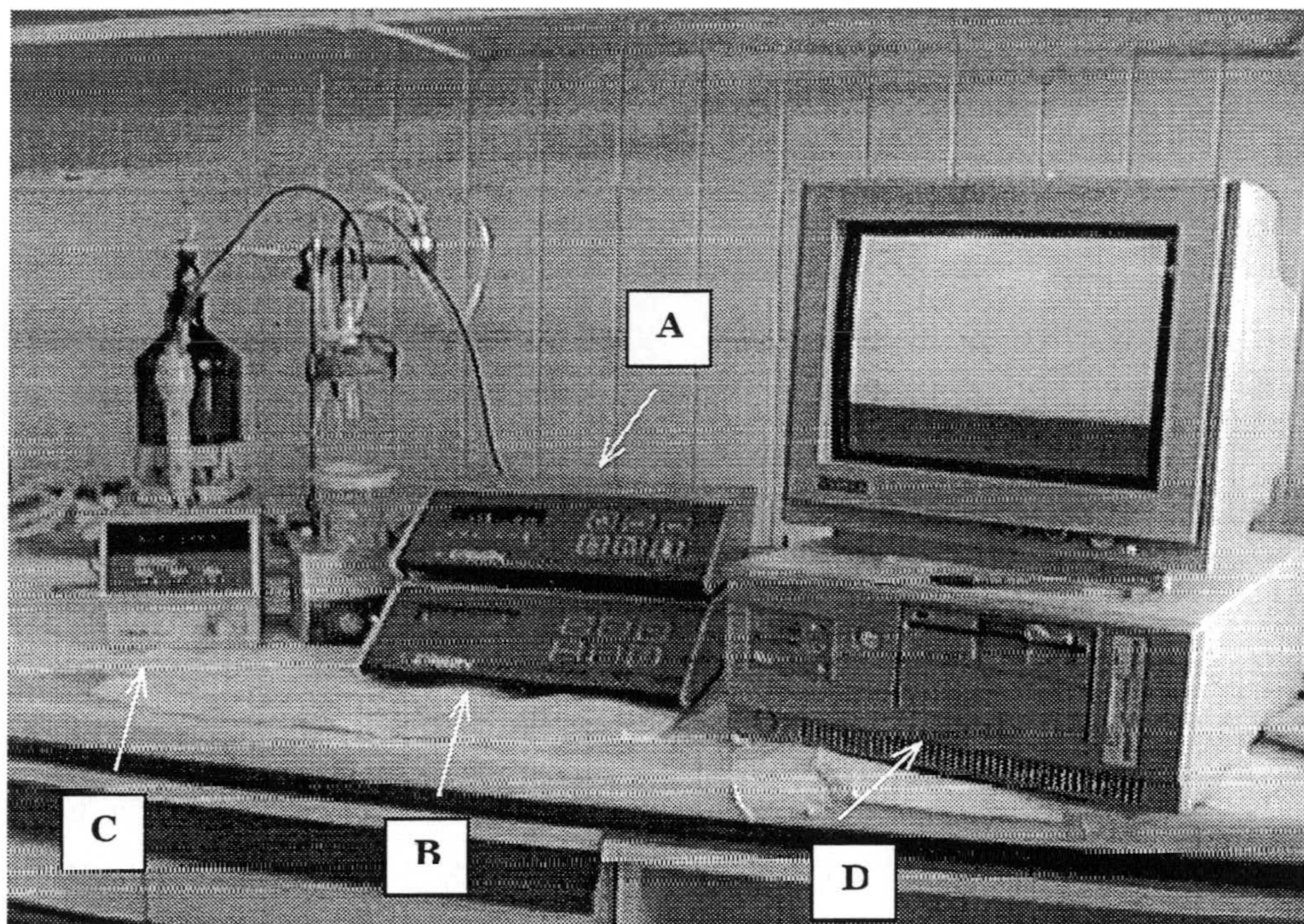
En nuestro caso, la carga total se determinó por valoración conductimétrica, debido a la facilidad y precisión que presenta este método en la determinación del punto de equivalencia. Además esta técnica permite diferenciar entre grupos ácido fuerte y débil con fiabilidad, ya que una pendiente negativa indica la presencia de un ácido fuerte y una pendiente positiva, la presencia de un ácido débil (ver figuras I.10 y I.27).

El dispositivo utilizado consta de (figura I.8):

- un *pH*-metro (A): de la casa Crison Instruments, modelo 2002.
- un conductímetro (B): de la casa Crison Instruments, modelo 525.

- un dosificador (C): de la casa Metrohm, modelo 665 Dosimat, encargado de añadir el agente valorante con una precisión de 1  $\mu\text{l}$ .
- un ordenador (D): para controlar automáticamente el proceso de valoración y almacenamiento de datos.

Durante la valoración se hace pasar  $\text{N}_2$  por la célula con objeto de mantener una atmósfera inerte y eliminar el anhídrido carbónico del medio de valoración.



*Figura I.8. Montaje para la realización de valoraciones*

La densidad de carga superficial viene dada por la siguiente expresión:

$$\sigma_0 = \frac{cF}{S} \quad (\text{I.22})$$

donde  $c$  es la cantidad de agente valorante utilizada hasta alcanzar el punto de equivalencia expresado en moles,  $F$  es la constante de Faraday expresada en  $\text{Cmol}^{-1}$  y  $S$  es la superficie total de las partículas expresada en  $\text{cm}^2$ .

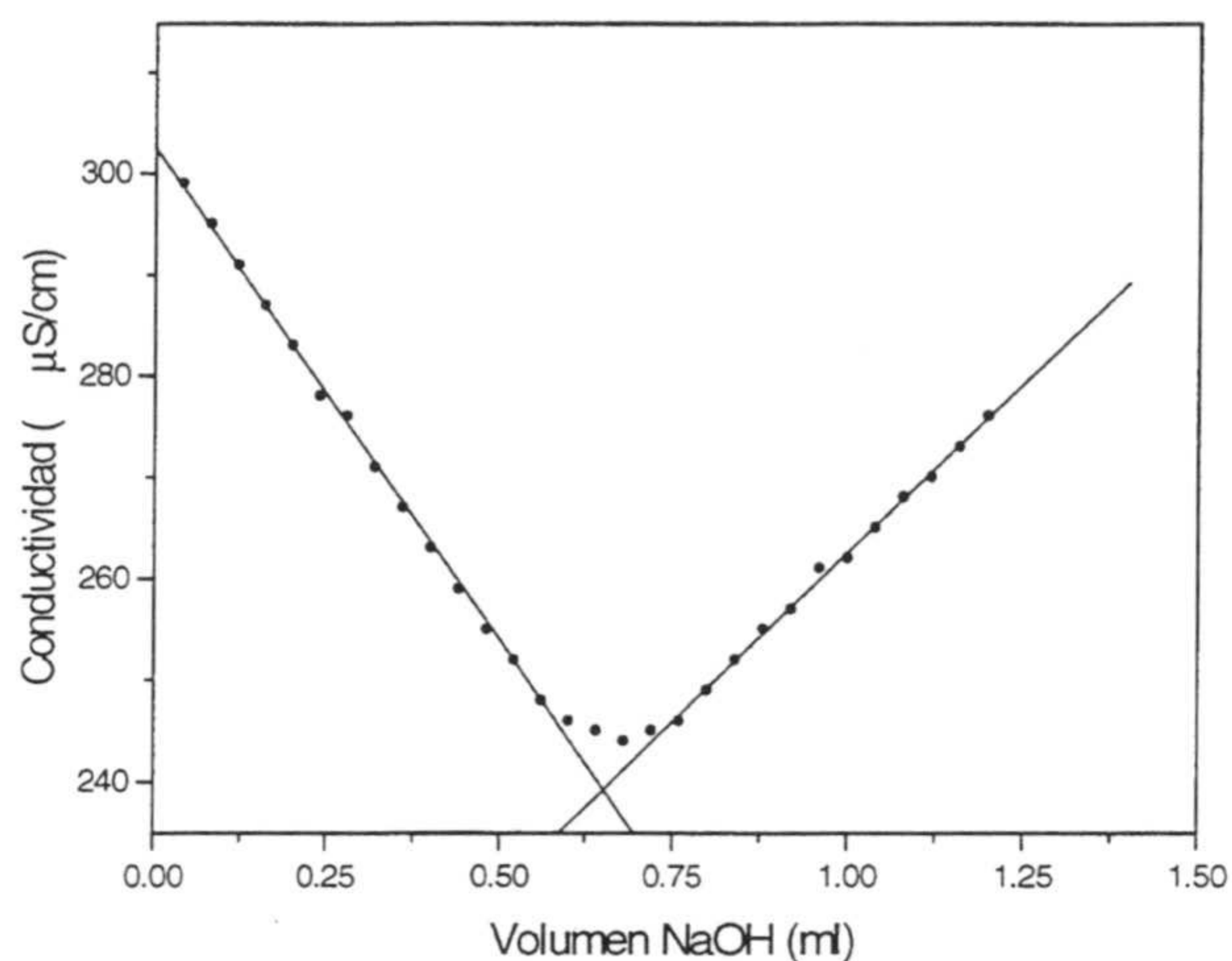
El procedimiento básico que se ha seguido en las valoraciones ha sido el siguiente: se tomaba una cantidad conocida de látex (entre 15 y 20 ml). Como se conoce el tamaño de partícula y el contenido en sólido, podemos calcular el área total de polímero que va a ser valorada (unos 12 m<sup>2</sup> aproximadamente). Sobre este volumen se añadía un electrolito inerte (NaCl) con el fin de comprimir la doble capa de contraiones que rodea a las partículas y así liberar protones hacia el medio, para que se encuentren más accesibles para reaccionar con el agente valorante (*Labib et al., 1980*). En este sentido hay que tener precauciones para no provocar la agregación del coloide.

Este procedimiento sufre algunas alteraciones según se vaya a valorar grupos fuertes como sulfato/sulfonato ó grupos débiles como carboxilos. En el primer caso, debemos asegurarnos de que todos los cationes que contrarrestan la carga superficial sean H<sup>+</sup> para así valorarlos con NaOH. Por ello estos látex, una vez limpiados por desplazamiento de suero (serum replacement), se incubaron con resinas de cambio iónico (Amberlite) durante una hora, manteniendo una agitación suave (*Vanderhoff, et al., 1970*). Antes de mezclarlas con el látex se lavaron 3 veces con agua caliente desionizada. Las figuras I.9. e I.10 corresponden a la valoración del látex S4CS9 y S3CS2 respectivamente, con una disolución de NaOH de concentración conocida. Resultados similares fueron obtenidos para los restantes látex sulfato y sulfonato valorados.

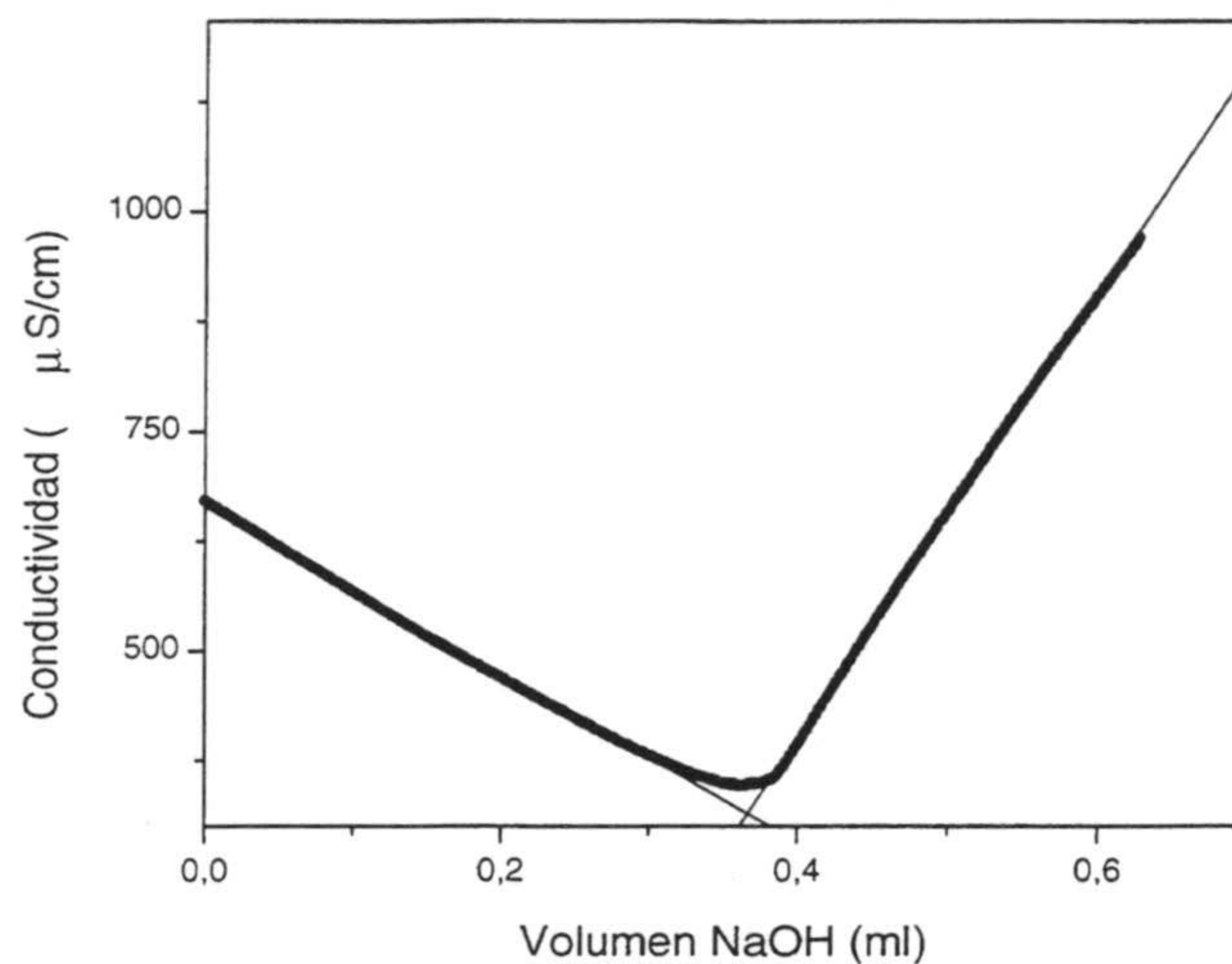
Durante el primer tramo, de pendiente negativa, se está neutralizando los protones que provienen de los grupos superficiales sulfato (sulfonato), los cuales se encuentran completamente ionizados debido a su carácter ácido fuerte. El segundo tramo de conductividad creciente corresponde al exceso de NaOH añadido.

Cada tramo de la curva es ajustado a una recta por el método de mínimos cuadrados de forma que el punto de corte de los tramos determina el punto final de la valoración. Como se puede observar, el cambio de pendiente en la curva de conductividad no ocurre de forma brusca. Este resultado ha sido obtenido también por otros autores (*Bagchi et al., 1979; Peula, 1992; Bastos, 1993; Ortega, 1995*) para sistemas coloidales parecidos a los nuestros, y se han formulado dos posibles explicaciones que no son excluyentes: i) Existen protones que están próximos a la

superficie de la partícula y para que sean valorados los iones  $\text{OH}^-$  deben difundir hasta ellos.



**Figura I.9.** Valoración conductimétrica directa del látex S4CS9

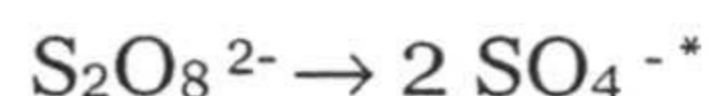


**Figura I.10.** Valoración conductimétrica directa del látex S3CS2

Esta 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 grupos tienen su origen en la llamada reacción de Kolthoff (*Kolthoff et al., 1951*), que consiste en una transformación de los grupos sulfato a hidroxilos y carboxilos.



Como ya se ha mencionado los grupos sulfato provienen de la descomposición del iniciador persulfato:

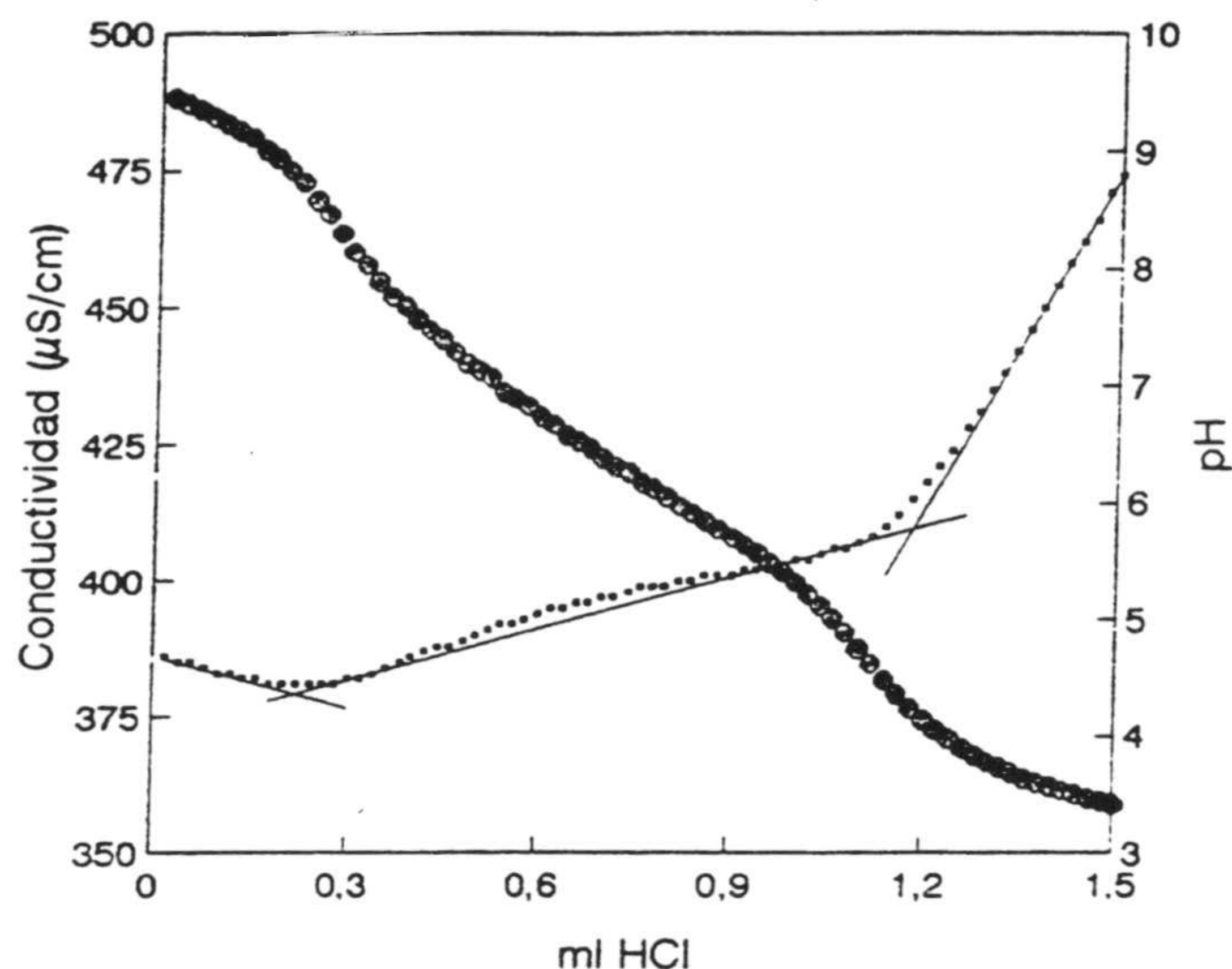


El radical  $\text{SO}_4^{\cdot -}$  puede reaccionar con el agua mediante la reacción de Kolthoff que conduce a la generación de grupos hidroxilo:



Éstos se incorporan a la reacción de polimerización a expensas de los grupos sulfato. El persulfato potásico, que es un agente oxidante, oxida los grupos hidroxilo a carboxilo (ácido débil). Si la cantidad de grupos ácido débil fuera apreciable aparecerían dos cambios de pendiente separados en la curva de valoración. En caso contrario, ambos cambios aparecen próximos y poco definidos.

Cuando se quiere valorar un grupo ácido débil como el carboxilo es necesario hacer una retrovaloración. Si se quisiera hacer una valoración directa con NaOH sería necesario que todos los grupos carboxilos estuvieran protonados lo cual ocurre a un pH próximo a 3. A este pH la carga neta del látex sería cero con lo que se produciría la agregación del látex. La única forma de obtener la densidad de carga para estos látex es cargar completamente las partículas llevándolas a pH básico (>10) por adición de NaOH. Así, todos los grupos carboxilos estarán en su forma iónica y se podrán valorar con un ácido como es el HCl. En esta retrovaloración se distinguen tres procesos. El primero corresponde a la valoración del exceso de NaOH añadido. En este tramo se produce una disminución inicial de la conductividad al neutralizarse el exceso de los 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 carboxilo 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 positivo lo encontramos en el aumento de iones cloruro que hay en el medio. Finalmente, una vez valorados todos los grupos carboxilo, la conductividad del medio aumenta rápidamente como consecuencia del exceso de ácido clorhídrico. En la figura I.11 aparece la retrovaloración del látex JL4.



*Figura I.11. Retrovaloración conductimétrica y potenciométrica del látex JL4.*

De esta forma se obtiene la densidad de carga de los látex carboxilos cuando están completamente desprotonados. Evidentemente la densidad de carga de un látex carboxilo dependerá del pH del medio, aumentando con éste. Los datos de densidad de carga que aparecen en esta memoria para los látex carboxilos corresponden a la máxima carga (situación de total desprotonación).

En la tabla I.1 aparecen los valores de la densidad de carga de los látex así como los resultados obtenidos para los tamaños e índices de polidispersidad.

Como se puede observar en esta tabla se han utilizado una gran variedad de sistemas coloidales. Así, por ejemplo, hay látex con densidad de carga similar pero diferentes tamaños, látex de igual tamaño pero diferente densidad de carga, látex convencional y látex funcionalizado con grupos clorometilo de igual tamaño y densidad de carga, látex con grupos carboxilo cuya densidad de carga dependerá del pH del medio, etc... Todas estas relaciones entre los diferentes látex nos han permitido realizar numerosos estudios que serán presentados a lo largo de esta memoria.

**Tabla I.1.** Características fundamentales de los látex.

Látex	Grupo superficial	$D_n$ (nm)	I.P.D	Desviación estándar (nm)	$\sigma_0$ ( $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ ) total	$\sigma_0$ ( $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ ) débil
PS3MA	Sulfato	99	1.007	4	-3.3±0.4	
MB0	Sulfonato	151	1.002	4	---	
SN8	Sulfonato	178	1.003	5	-12.3±0.6	
JL1	Sulfonato	185	1.014	10	-4.0±0.3	
JM1	Sulfonato	195	1.005	10	-4.2±0.6	
S5CS1	Sulfato Carboxilo Clorometilo	196	1.003	6	-31±4	-28±3
S5CS2	Sulfato Carboxilo Clorometilo	199	1.004	7	-70±7	-67±6
S4CS9	Sulfato Clorometilo	201	1.003	6	-3.7±0.2	
S5CS3	Sulfato Carboxilo Clorometilo	202	1.004	8	-150±12	-147±11
JX3	Sulfato Clorometilo	203	1.003	5	-3.2±0.5	
JX2	Sulfato Clorometilo	204	1.004	4	-3.1±0.4	
S3CS2	Sulfato Clorometilo	227	1.004	3	-3.9±0.2	
JL4	Carboxilo	331	1.002	9	-12.1±0.2	-12.1±0.2
MP2	Sulfato	361	1.005	14	-4.8±0.9	
MP1	Sulfato	414	1.003	14	-3.2±0.6	
IDC	Sulfato	530	---	27	-3.9	
AS11	Sulfato	661	1.002	18	-4.0±0.2	

## 7. La doble capa eléctrica

Tal y como se acaba de ver, nuestras partículas de látex presentan una densidad de carga negativa como consecuencia de la desprotonación de grupos ácidos (fuertes ó débiles) provenientes del iniciador o del monómero usado en la síntesis. En consecuencia, la interfase sólido-líquido presentará una estructura característica formada por contraiones rodeando a la partícula coloidal para mantener así la

electroneutralidad de la disolución. Esta estructura se conoce como *doble capa eléctrica*.

Algunas propiedades de los sistemas coloidales dependen de las fuerzas de interacción entre partículas. Entre estas fuerzas se encuentra la repulsión electrostática que experimentan dos partículas cuando se aproximan como consecuencia de la interacción entre sus dobles capas. Esta interacción repulsiva es fundamental a la hora de determinar si un coloide es estable o inestable. Así pues es necesaria la descripción, a través de un modelo físico, de la capa eléctrica que rodea a una partícula coloidal.

La doble capa eléctrica estará formada, esencialmente, por un exceso de contraiones y por un defecto de coiones. Estos contraiones estarán sometidos a dos fuerzas opuestas: i) una atracción electrostática que tenderá a ordenarlos cerca de la superficie y ii) una energía térmica que tiende a difundir desordenadamente a los iones.

En este apartado del capítulo se van a estudiar los diferentes modelos existentes sobre la capa eléctrica. Pero antes de abordar este aspecto es necesario ver algunas de las ecuaciones fundamentales que van a describir la distribución de los contraiones y los coiones alrededor de la partícula.

La primera que necesitamos es la *ecuación de Poisson* que describe la atenuación del campo eléctrico creado por una superficie plana cuando atraviesa un medio dieléctrico como es el agua:

$$\nabla \cdot (\epsilon_r \nabla \psi) = -\frac{\rho(x)}{\epsilon_0} \quad (\text{I.23})$$

donde  $\psi$  es el potencial eléctrico,  $\epsilon_0$  es la permitividad eléctrica en el vacío,  $\epsilon_r$  es la permitividad eléctrica relativa del medio y  $\rho$  es la densidad volumétrica de carga.

Para  $\epsilon_r$  constante, la ecuación I.25 queda como:

$$\nabla^2 \psi = -\frac{\rho(x)}{\epsilon_0 \epsilon_r} \quad (\text{I.24})$$

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 de la partícula y perpendicular a ésta, donde existe un potencial eléctrico  $\psi(x)$ ; y sea  $n_i^0$  el número de iones de la especie  $i$  en una

posición suficientemente alejada de la superficie como para que el potencial eléctrico sea nulo.

En el equilibrio el potencial químico  $\mu_i^0=0$ , luego la variación del potencial químico del ión  $i$ ,  $\Delta\mu_i=kT\ln(n_i/n_i^0)$ , debe ser compensada por la energía de interacción eléctrica,  $z_i e\psi$ . Así pues:

$$-z_i e\psi = kT \ln\left(\frac{n_i}{n_i^0}\right) \quad (\text{I.25})$$

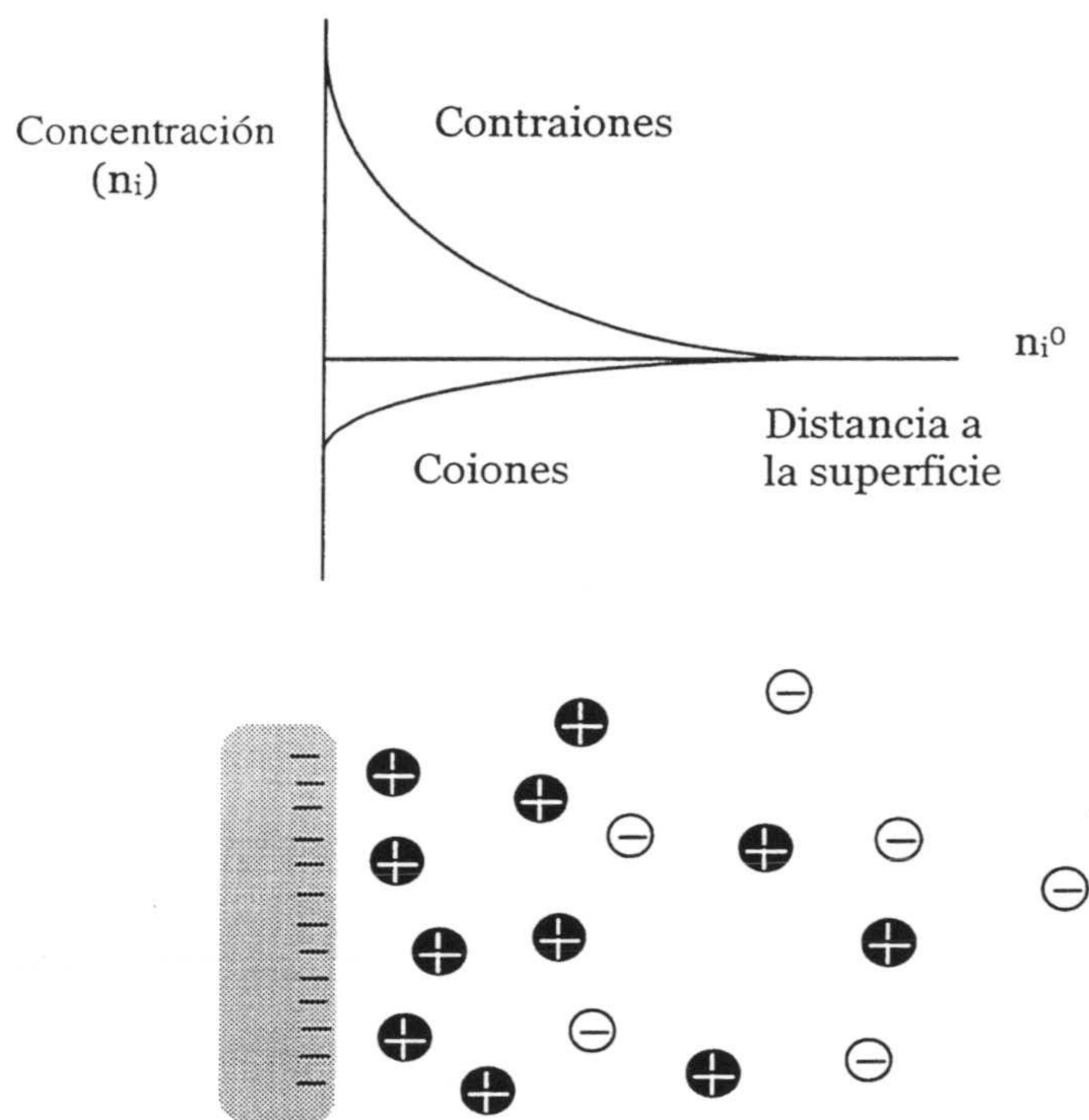
el signo menos se introduce para tener en cuenta el signo de los iones. Esta ecuación se puede escribir como:

$$n_i = n_i^0 \exp\left(-\frac{z_i e\psi}{kT}\right) \quad (\text{I.26})$$

Y se conoce como distribución de Boltzmann.

Para hacernos una idea de la estructura de una doble capa eléctrica existente alrededor de una partícula coloidal, es interesante representar la concentración de contraiones y coiones en función de la distancia a la partícula de acuerdo con la ecuación de Boltzmann (figura I.12).

En torno a la partícula existe un exceso de contraiones y un defecto de coiones, que van a depender del potencial eléctrico creado por la partícula. El exceso de contraiones aparece debido a la atracción electrostática ejercida sobre ellos por parte de la superficie cargada negativamente. Al alejarnos de la superficie la atracción es menor y con ello la concentración de contraiones decrece hasta alcanzar el valor existente en el seno de la dispersión, lejos del efecto del potencial eléctrico creado por la partícula. Por otra parte, la concentración de coiones cerca de la superficie es pequeña debido a la repulsión electrostática. Puesto que esta repulsión disminuye con la distancia a la partícula, la cantidad de coiones aumenta hasta alcanzar el valor del seno del electrolito.



*Figura I.12. Distribución de iones cerca de una superficie negativamente cargada.*

Teniendo en cuenta que la densidad volumétrica de carga está relacionada con  $n_i$  a través de la siguiente ecuación:

$$\rho(x) = \sum_i z_i e n_i = \sum_i z_i e n_i^0 \exp\left(-\frac{z_i e \psi(x)}{kT}\right) \quad (\text{I.27})$$

La distribución de Boltzmann y la ecuación de Poisson se pueden unir para formar la llamada ecuación de Poisson-Boltzmann, que constituye una de las expresiones más importantes de la física estadística:

$$\nabla^2 \psi = -\frac{1}{\epsilon_0 \epsilon_r} \sum_i n_i^0 z_i e \exp\left(-\frac{z_i e \psi(x)}{kT}\right) \quad (\text{I.28})$$

Pasemos a continuación a estudiar los diferentes modelos de la capa eléctrica que han sido formulados.

### 7a. Modelo de capa eléctrica de Gouy-Chapman

Este modelo fue propuesto independientemente por Gouy (*Gouy, 1910*) y Chapman (*Chapman, 1913*). Se conoce como modelo de la capa difusa y está basado en una serie de hipótesis:

1. La interfase es plana.
2. Los iones se consideran como cargas puntuales sin volumen.
3. La carga superficial y el potencial eléctrico están distribuidos uniformemente a lo largo de la superficie.
4. El medio de dispersión se considera continuo y con propiedades (especialmente la permitividad) que son independientes de la distancia a la superficie.
5. Los contraiones interaccionan sólo electrostáticamente con la superficie.

Estas cinco hipótesis de partida pueden ser más o menos criticables dando origen a los distintos refinamientos existentes sobre esta teoría. Así por ejemplo, la suposición de considerar la carga superficial como distribuida uniformemente es cuestionable, ya que como se ha visto, la carga de la partícula se genera por la disociación de grupos iónicos que ocupan una posición determinada en la superficie y cuya distribución no tiene por qué ser homogénea.

La descripción matemática de este modelo parte de la ecuación de Poisson-Boltzmann (I.28). Esta ecuación diferencial no lineal no se puede resolver analíticamente para todos los casos, pero sí se pueden suponer dos condiciones límites:

#### i) Resolución para potenciales bajos

Si suponemos que la energía eléctrica es pequeña comparada con la térmica ( $|z_i e \psi| < kT$ ), la ecuación se puede resolver fácilmente al desarrollar en serie el término exponencial de la ecuación I.27 y considerando sólo los dos primeros términos:

$$\nabla^2 \psi = -\frac{1}{\epsilon_0 \epsilon_r} \left( \sum_i n_i^0 z_i e - \sum_i \frac{z_i^2 e^2 n_i^0 \psi(x)}{kT} \right) \quad (\text{I.29})$$

Esta aproximación es válida para  $\psi < 25/z$  mV y se conoce como aproximación de Debye-Hückel. El primer término del paréntesis debe de ser 0 para mantener la electroneutralidad en el seno de la dispersión:

$$\nabla^2 \psi = \frac{\sum_i z_i^2 e^2 n_i^0}{\epsilon_0 \epsilon_r kT} \psi(x) = \kappa^2 \psi(x) \quad (\text{I.30})$$

donde

$$\kappa = \left( \frac{\sum_i z_i^2 e^2 n_i^0}{\epsilon_0 \epsilon_r kT} \right)^{1/2} \quad (\text{I.31})$$

El valor de  $1/\kappa$ , se conoce como longitud de Debye y depende sólo de las propiedades del medio donde están las partículas y de la temperatura, no del potencial ni la densidad de carga de éstas. Para una temperatura de 25°C, la ecuación I.31 queda como:

Para electrolitos 1:1,  $1/\kappa$  vale  $0.304/[\text{NaCl}]^{1/2}$  (nm)

Para electrolitos 2:1,  $1/\kappa$  vale  $0.176/[\text{CaCl}_2]^{1/2}$  (nm)

Para electrolitos 2:2,  $1/\kappa$  vale  $0.152/[\text{MgSO}_4]^{1/2}$  (nm)

donde la concentración de la sal viene expresada en moles/litro. Este parámetro es muy importante pues va a limitar la distancia a partir de la cual el efecto del campo eléctrico creado por la partícula es nulo. Un aumento de la concentración de electrolito produce una compresión de esta longitud  $1/\kappa$ . De igual forma que el uso de sales divalentes produce una mayor compresión de la capa eléctrica que una sal monovalente.

Si consideramos que en la superficie de la partícula el potencial vale  $\psi_0$  y que en el seno de la dispersión  $\psi=0$ , la ecuación I.30 se puede resolver obteniéndose las siguientes soluciones para una superficie plana y para una partícula esférica de radio  $a$ :

$$\psi(x) = \psi_0 \exp(-\kappa x) \quad (\text{I.32})$$

$$\psi(r) = \psi_0 a \frac{\exp(-\kappa(r-a))}{r} \quad (\text{I.33})$$

donde  $r$  representa la distancia desde el centro de la esfera al punto considerado.



## ii) Resolución para potenciales altos

Para el caso de potenciales altos, la ecuación de Poisson-Boltzmann se puede resolver fácilmente para superficies planas y electrolitos simétricos ( $z_i = z_- = z_+ = z$ ). Para ello es necesario utilizar la identidad matemática  $\sinh p = (\exp p - \exp(-p))/2$  con lo que la ecuación I.26 se puede escribir así:

$$\frac{d^2\psi}{dx^2} = \frac{2n^0ze}{\epsilon_0\epsilon_r} \sinh \frac{ze\psi}{kT} \quad (\text{I.34})$$

Multiplicando esta ecuación por  $2(d\psi/dx)$ , se puede integrar teniendo en cuenta como condición de contorno que  $\psi=0$  y  $d\psi/dx=0$  en el seno de la disolución:

$$\frac{d\psi}{dx} = - \left( \frac{8n^0kT}{\epsilon_0\epsilon_r} \right)^{1/2} \sinh \frac{ze\psi}{2kT} = - \frac{2\kappa kT}{ze} \sinh \frac{ze\psi}{2kT} \quad (\text{I.35})$$

El signo negativo indica que  $d\psi/dx$  es siempre negativo, tanto para  $\psi < 0$  como para  $\psi > 0$ , asegurando que  $|\psi|$  siempre disminuye al alejarse de la superficie hasta hacerse cero en un punto suficientemente alejado de la misma.

La ecuación I.35 puede integrarse desde el seno de la disolución hasta la superficie, obteniendo la expresión:

$$\tanh \left( \frac{ze\psi}{4kT} \right) = \tanh \left( \frac{ze\psi_0}{4kT} \right) \exp(-\kappa x) \quad (\text{I.36})$$

Para potenciales muy bajos se puede considerar que  $\tanh p \approx p$ , con lo que la ecuación I.36 queda reducida a la aproximación de Debye-Hückel obtenida para potenciales bajos.

Otro resultado interesante de la teoría de Gouy-Chapman es la relación existente entre la densidad de carga superficial,  $\sigma_0$ , y el potencial superficial  $\psi_0$ .

La densidad de carga se puede evaluar fácilmente puesto que está contrarrestada por el exceso de carga que existe en la capa difusa. La carga total, por unidad de área, en esta capa viene dada por:

$$\sigma_0 = - \int_0^\infty \rho dx = \epsilon_0\epsilon_r \int_0^\infty \frac{d^2\psi}{dx^2} dx = -\epsilon_0\epsilon_r \left( \frac{d\psi}{dx} \right)_{x=0} \quad (\text{I.37})$$

donde, sustituyendo la ecuación I.35, se obtiene:

$$\sigma_0 = \frac{2\kappa kT\epsilon_0\epsilon_r}{ze} \sinh\frac{ze\psi_0}{2kT} = \frac{4n_0ze}{\kappa} \sinh\frac{ze\psi_0}{2kT} \quad (\text{I.38})$$

Esta ecuación es para un electrolito simétrico y su valor a 25°C es:

$$\sigma_0 = 11.74c^{1/2} \sinh(19.46z\psi_0) \quad (\text{I.39})$$

donde la densidad de carga viene en  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ ,  $\psi_0$  en voltios y  $c$  en moles/litro.

Para electrolitos no simétricos, se puede demostrar que:

$$\sigma_0 = \sqrt{2\epsilon_0\epsilon_r kT \sum_i n_i^0 \left[ \exp\left(-\frac{z_i e \psi_0}{kT}\right) - 1 \right]} \quad (\text{I.40})$$

Aunque es imposible obtener una solución analítica para la ecuación de Poisson-Boltzman aplicada a partículas esféricas (de radio  $a$ ) y potenciales altos, algunas expresiones aproximadas existen en la bibliografía. Todas ellas han sido revisadas por Hunter (*Hunter, 1981*), concluyendo que la ecuación semiempírica propuesta por Loeb (*Loeb et al., 1961*) para la densidad de carga es la más exacta:

$$\sigma_0 = -4\pi\epsilon_0\epsilon_r \frac{kT}{ze} \kappa a^2 \left( 2\sinh\frac{ze\psi_0}{2kT} + \frac{4}{\kappa a} \tanh\frac{ze\psi_0}{4kT} \right) \quad (\text{I.41})$$

Una justificación teórica de esta ecuación ha sido dada por Dukhin (*Dukhin et al., 1970*).

Uno de los puntos cuestionables de este modelo es el hecho de que la densidad de carga superficial disminuya al aumentar la concentración de electrolito puesto que los iones, que se consideran cargas puntuales, podrían situarse sobre la misma superficie. Para nuestros sistemas (y en ausencia de adsorción específica) la densidad de carga superficial se genera por la disociación de grupos iónicos superficiales y por tanto la densidad de carga de nuestras partículas es independiente de la concentración de electrolito. Si suponemos que  $\sigma_0$  es constante, el potencial superficial ha de variar con la concentración de electrolito según la ecuación I.38.

#### 7b. Modelo de doble capa eléctrica de Stern

Los iones en disolución no son cargas puntuales sino que tienen un tamaño finito. El diámetro de un ión hidratado suele rondar los 0.5 nm. Si suponemos que la carga del ión se encuentra en el centro de una esfera de tamaño finito, entonces la carga no

puede tocar la superficie de la partícula debido al tamaño finito del ión. Esta distancia se suele representar como  $\Delta$  y define la región que es inaccesible a la carga del contraión.

Por otra parte los iones pueden adsorberse específicamente sobre la superficie. Teniendo en cuenta estas dos correcciones de la teoría de Gouy-Chapman, Stern (*Stern, 1924*) propuso que la capa eléctrica se puede dividir en dos zonas (de ahí el nombre de doble capa eléctrica) denominadas interna y externa. En la región externa las fuerzas de adsorción y las dimensiones de los iones son despreciables, y su descripción viene dada por la teoría de Gouy-Chapman. Se trata pues de la zona difusa de la doble capa.

En la región interna, a su vez, se pueden distinguir dos planos. Un primer plano desde la superficie hasta la línea que pasa por los centros de los iones específicamente adsorbidos sobre la superficie, llamado plano interior de Helmholtz (IHP) (ver figura I.13). Otro plano desde el IHP hasta la zona en la que comienza la parte difusa de la doble capa, denominado plano exterior de Helmholtz (OHP). La capa entre la superficie y el OHP se conoce como capa de Stern.

Distintos potenciales eléctricos se pueden distinguir en este modelo según la figura I.13:

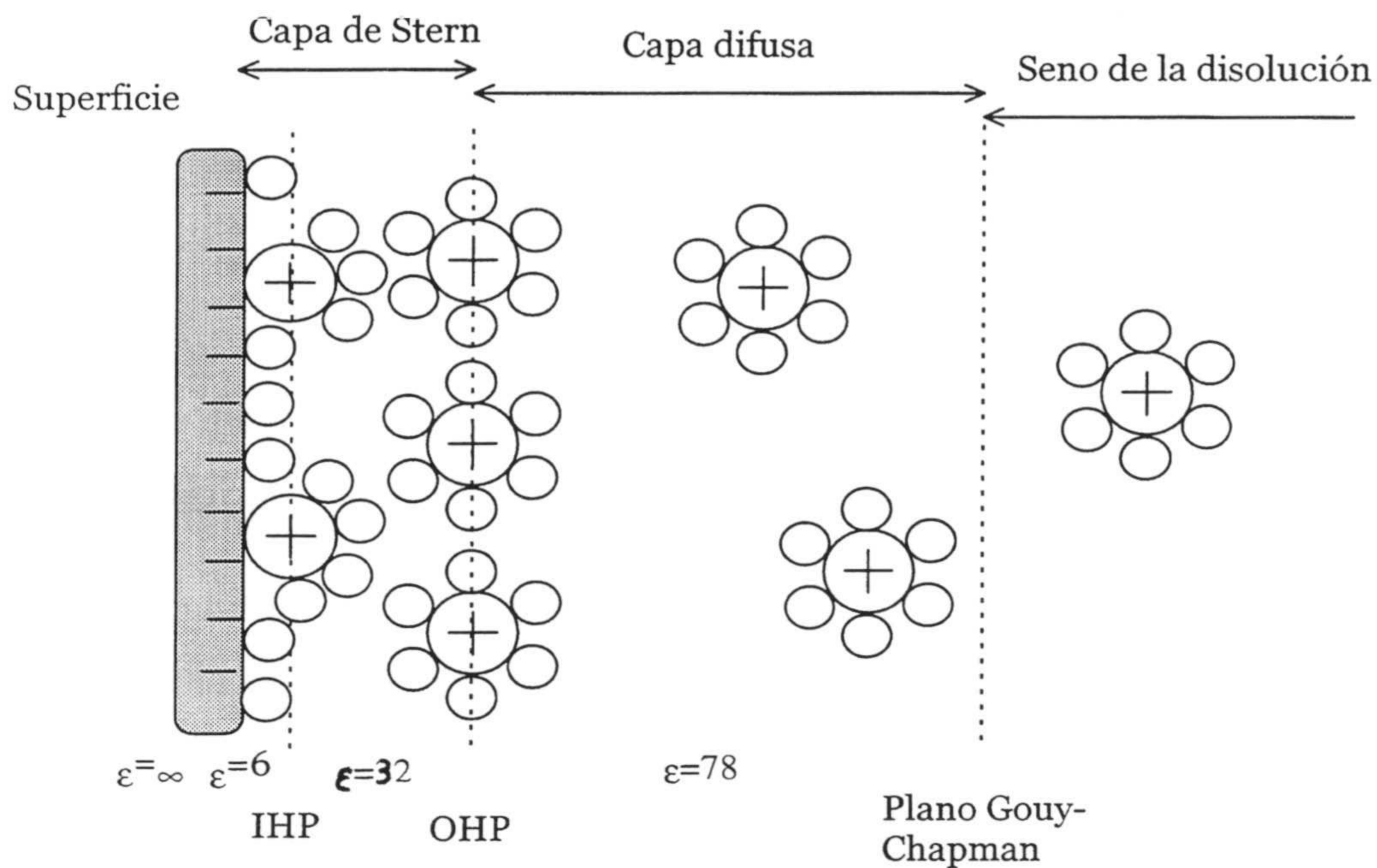
- El potencial sobre la superficie  $\psi_0$ .
- El potencial situado en el IHP denominado potencial de Stern  $\psi_s$ .
- El potencial sobre el OHP llamado potencial difuso  $\psi_d$ .

La carga superficial  $\sigma_0$  es compensada por la suma de la carga de Stern  $\sigma_s$  y la existente en la capa difusa  $\sigma_d$ . Teniendo en cuenta que la zona difusa se rige por la teoría de Gouy-Chapman, se puede obtener el valor de  $\sigma_d$ :

$$\sigma_d = \frac{4n_0ze}{\kappa} \sinh \frac{ze\psi_d}{2kT} \quad (\text{I.42})$$

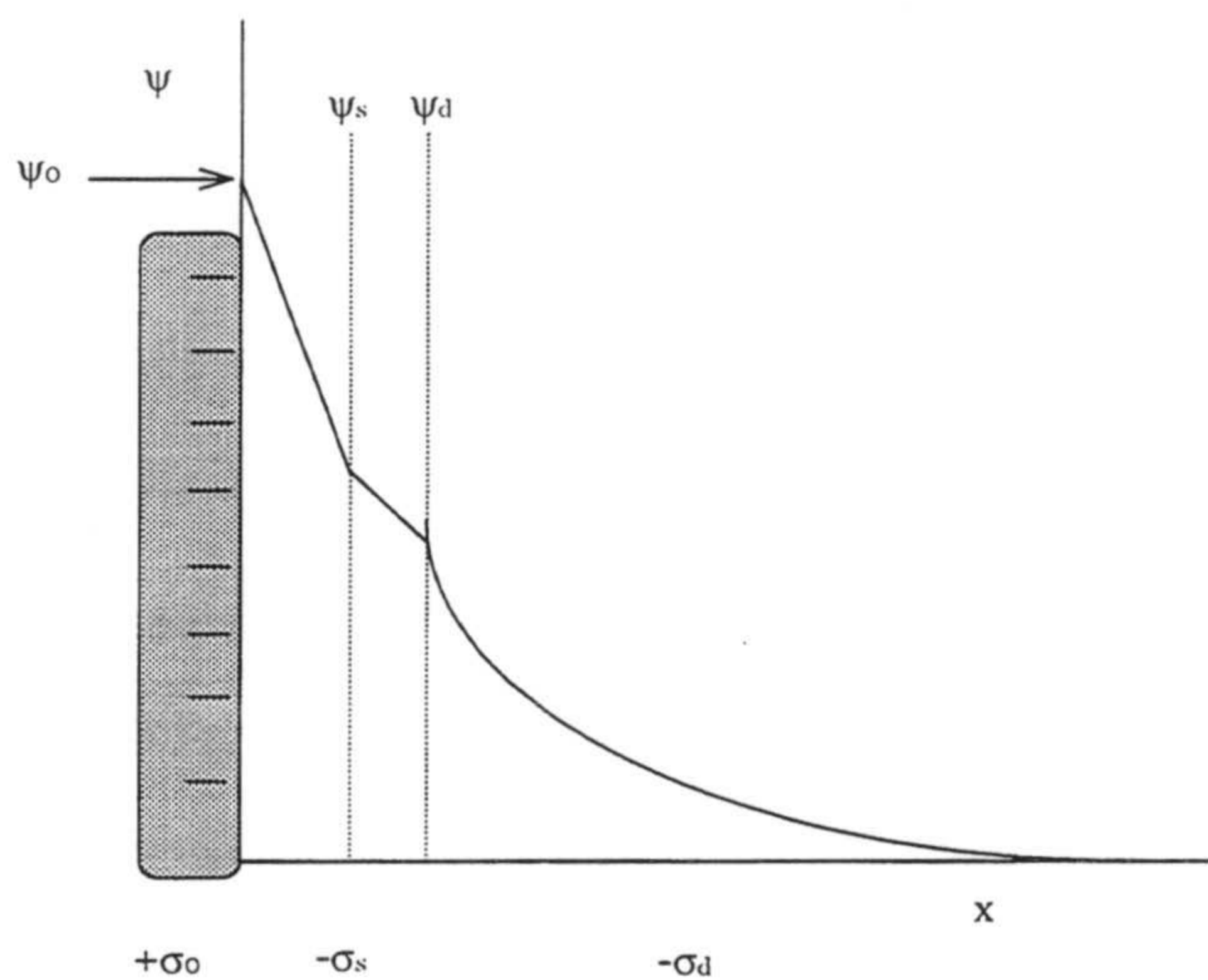
O bien, para el caso de una partícula esférica:

$$\sigma_d = -4\pi \epsilon_0 \epsilon_r \frac{kT}{ze} \kappa a^2 \left( 2 \sinh \frac{ze\psi_d}{2kT} + \frac{4}{\kappa a} \tanh \frac{ze\psi_d}{4kT} \right) \quad (\text{I.43})$$



**Figura I.13.** Modelo de doble capa eléctrica de Stern.

En la siguiente figura se representa la distribución de densidad de carga y potencial en una doble capa eléctrica de Stern.



**Figura I.14.** Densidad de carga y potencial de la doble capa eléctrica.

## 8. Electroforesis

Cuando en una interfase cargada se produce el movimiento tangencial de una fase con respecto a la otra se habla de fenómeno electrocinético. Los fenómenos electrocinéticos son ampliamente utilizados para acceder experimentalmente a las magnitudes que caracterizan una doble capa eléctrica. Uno de estos fenómenos electrocinéticos es la llamada electroforesis, que consiste en someter a las partículas coloidales a un potencial eléctrico externo. Estas partículas se moverán respecto al medio de dispersión arrastrando consigo parte de su doble capa eléctrica. El plano de la doble capa que separa esta zona de líquido firmemente adherida a la partícula de la zona que no es arrastrada en el movimiento se conoce como plano de deslizamiento ó cizalladura. El potencial eléctrico existente en este plano se denomina potencial zeta ( $\zeta$ ).

Generalmente se supone que el plano de deslizamiento está fuera de la capa de Stern pero muy próximo a ella. Esto implica que la capa difusa no se mueve con la partícula al someterla a un potencial eléctrico.

La magnitud que se obtiene experimentalmente a través de la electroforesis es la llamada movilidad electroforética, definida como:

$$\mu_e = \frac{v_e}{E} \quad (\text{I.44})$$

donde  $v_e$  es la velocidad de desplazamiento de la partícula en el seno de la disolución cuando se aplica un campo eléctrico de intensidad  $E$ .

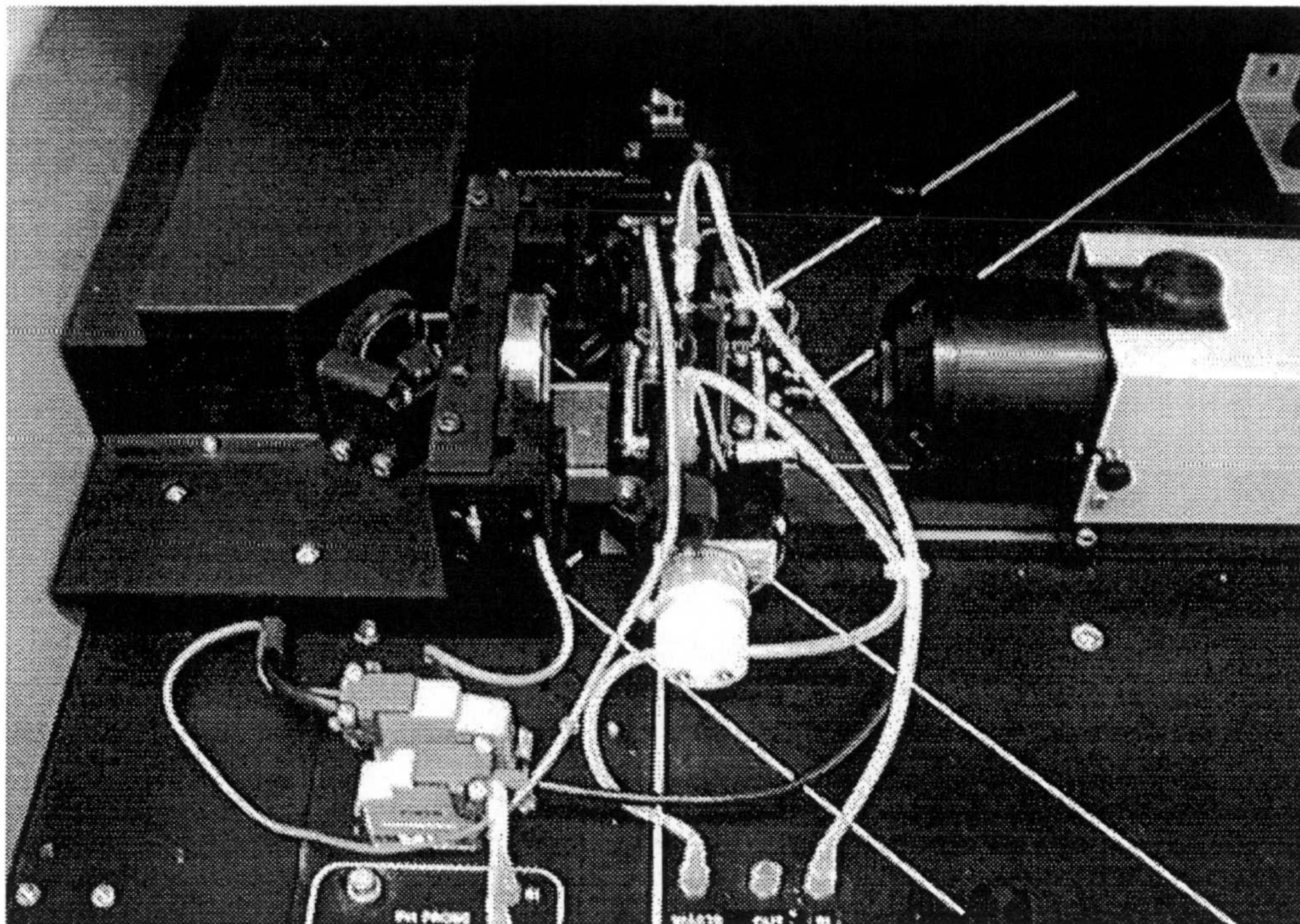
La relación existente entre la movilidad electroforética (variable obtenida experimentalmente) y el potencial zeta, y en consecuencia la estructura de la doble capa, acapara hoy en día la atención de numerosos estudios (*Hidalgo et al., 1992, 1996*). A pesar del debate al que se encuentra sometido este tema en la actualidad, las medidas de movilidad electroforética tienen un valor práctico enorme en la ciencia de los coloides, ya que se obtiene información inaccesible de otra forma. Así por ejemplo existe una relación clara entre la estabilidad de un coloide y el potencial zeta.

El dispositivo de microelectroforesis que se describe a continuación ha sido utilizado para caracterizar electrocinéticamente las partículas coloidales así como los complejos látex-proteína estudiados. Éste es un dispositivo comercial Zeta-Sizer IV, de Malvern Instrument (U.K.) que está formado por un ordenador, un correlador y una unidad óptica.

La parte óptica consta de:

- *una célula de medida*, formada por un capilar de cuarzo con una longitud 10 veces mayor que su diámetro, de 4 mm, y dos electrodos situados a cada lado en la dirección del eje del capilar. El capilar se encuentra sumergido en un baño de agua desgasificada y termostatzada. Los electrodos se encuentran fuera del ángulo de medida. En la figura I.15 se muestra esta célula.
- *un láser* de Helio-Neón de 5 mW de potencia y longitud de onda de 633 nm. El haz que procede de él se desdobla en dos haces que se hacen intersectar en un punto dentro de la célula de medida.
- *un fotomultiplicador* que recoge la luz dispersada por la muestra con un tiempo de respuesta mínimo de 50ns. El ángulo de medida es de 90°.

Al aplicar el campo eléctrico se origina un flujo de iones cerca de las paredes de la célula. Al ser ésta cerrada y el líquido incompresible, se produce un contraflujo de iones por la zona central de la misma. El lugar idóneo para medir es el anillo en que ambos flujos se anulan, denominándose a esta zona "nivel estacionario" (se puede comprobar que existen dos niveles estacionarios, una a 14.6% y otra a 85.4% del diámetro del capilar). Los dos haces de luz se hacen cruzar en una de las dos zonas estacionarias, definiéndose así el volumen de medida de 50 micras de tamaño nominal. En esta zona aparecen una serie de bandas de interferencia estables por la intersección de los dos haces cuyo espaciado depende de la longitud de onda del láser y del ángulo que forman los dos haces al cruzarse. Al aplicar el campo eléctrico las partículas se mueven perpendicularmente a las bandas de interferencia de modo que al cruzarlas se produce una variación periódica en la iluminación del fotomultiplicador con una frecuencia que dependerá del espaciado de las bandas y de la velocidad de desplazamiento de las partículas. De esta frecuencia se puede por tanto determinar la velocidad de las partículas.



*Figura I.15. Imagen de la célula de medida y del fotomultiplicador.*

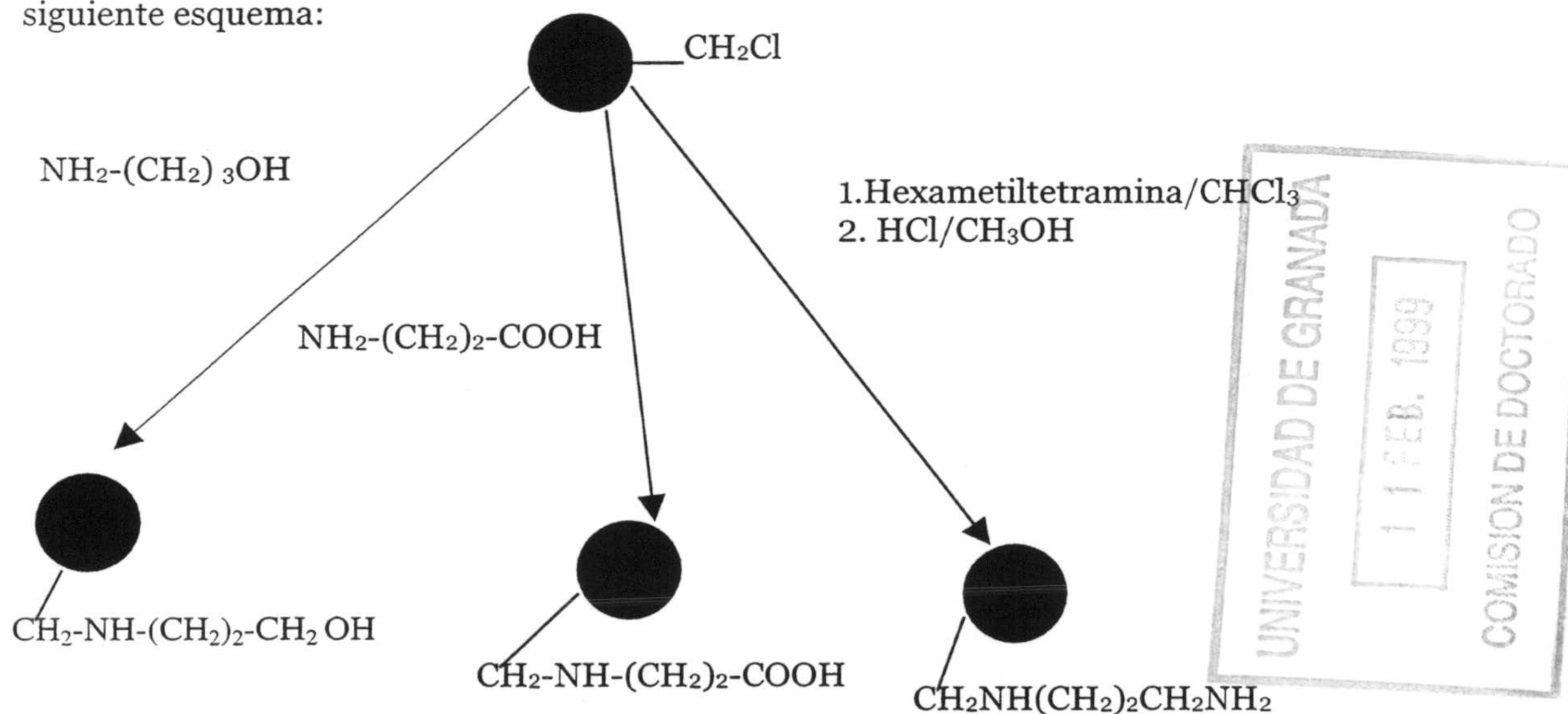
La misión del correlador es calcular la función de autocorrelación que servirá para obtener la distribución de velocidades de las partículas. Esta función es analizada mediante un procedimiento de ajuste de polinomios para obtener el espectro de velocidades. La función ajustada se normaliza y se realiza una transformada de Fourier para pasar al dominio de frecuencia. Así se obtiene el espectro de frecuencias que, mediante la aplicación de los correspondientes parámetros ópticos y eléctricos, se puede convertir en valores de movilidad electroforética o potencial zeta con el uso de la correspondiente teoría de conversión.

Con objeto de obtener las condiciones óptimas para las medidas de movilidad electroforética, se realizó un barrido de concentraciones para cada látex con el fin de encontrar el intervalo en que la movilidad era constante. Previamente el dispositivo se calibra con un látex estándar para verificar el buen funcionamiento del mismo.

Cada punto experimental consta de la media de diez medidas, con un tiempo automatizado de cerca de 60 segundos. A lo largo de la memoria irán apareciendo los resultados obtenidos sobre la caracterización electrocinética de los látex.

### 9. Determinación de los grupos clorometilo superficiales

Los látex empleados se pueden clasificar en dos grandes grupos según se mencionó en el apartado de síntesis. El primero está formado por los látex “convencionales” sintetizados con estireno como monómero. El segundo grupo tiene la peculiaridad de presentar en su superficie grupos clorometilo que provienen del uso del monómero clorometilestireno en la síntesis de la corteza de estas partículas. Este grupo lo forman los látex con funcionalidad clorometilo. En la bibliografía se pueden encontrar partículas de látex que presentan en su superficie diferentes grupos funcionales tales como carboxilos, aldehidos, amino, etc; pero existe poca bibliografía acerca de estas nuevas partículas con grupos clorometilo en su superficie. Una peculiaridad importante que presentan es que se pueden obtener otras funcionalidades a partir de los grupos clorometilo, tal y como ilustra el siguiente esquema:



**Figura I. 16.** Funcionalización de látex clorometilo.

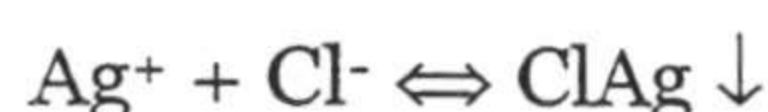


Así se pueden obtener grupos hidroxilo, carboxilo y amino dependiendo de la reacción que se lleve a cabo.

En esta reacción nucleofílica, los dos electrones desapareados del nitrógeno del grupo amino atacan al enlace que une al grupo cloro con el grupo metileno (CH<sub>2</sub>). Como resultado, el grupo amino queda unido al grupo CH<sub>2</sub>, liberándose protones e iones cloruro. La extensión de la reacción entre el grupo amino y el clorometilo aumenta al aumentar la temperatura y el pH del medio (*Margel et al., 1991*).

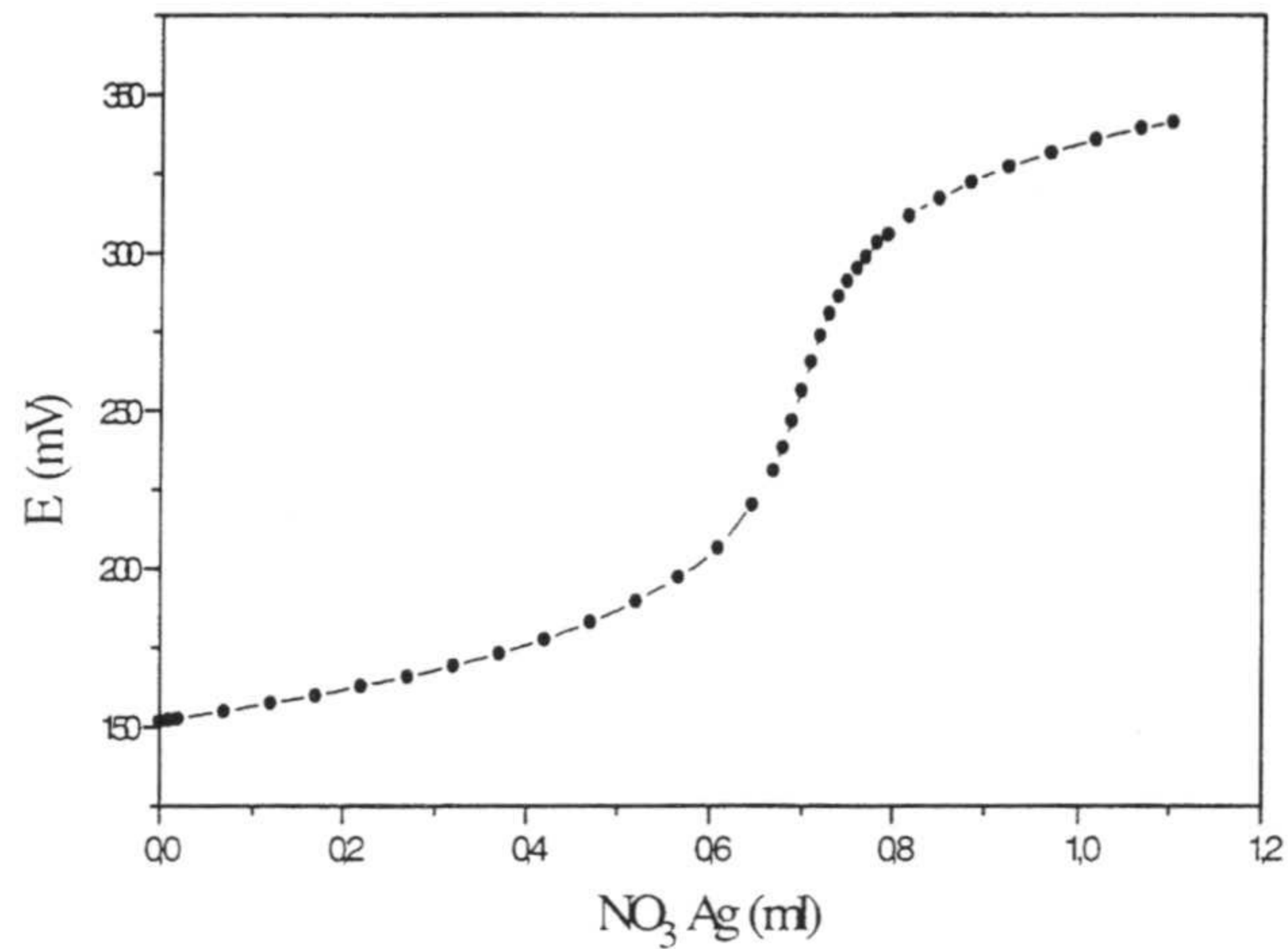
Esta reacción constituye el fundamento de una de las aplicaciones más importantes de los látex con funcionalidad clorometilo, y es concretamente la unión covalente de proteínas a la superficie de las partículas. Este aspecto será comentado en próximos capítulos.

Los iones cloruro liberados se pueden cuantificar para así determinar la cantidad de grupos clorometilo superficiales de las partículas. Para llevar a cabo esta cuantificación se puso a punto un método consistente en valorar los iones cloruro con una disolución de AgNO<sub>3</sub> (dosificador Metrohm, modelo 665 Dosimat) en presencia de un electrodo selectivo de iones cloruro (casa Ingold), previa acidificación de la muestra con HNO<sub>3</sub> (pH 3):



El electrodo selectivo de iones cloro mide un potencial eléctrico que depende de la concentración de iones cloruro presentes en la disolución. Al comienzo de la valoración los iones Ag<sup>+</sup> añadidos van reaccionando con los iones Cl<sup>-</sup> presentes en el medio produciéndose un precipitado de ClAg (la pendiente del potencial frente al volumen añadido va aumentando). Después del punto de equivalencia, al existir un exceso de iones Ag<sup>+</sup>, mientras que antes existía un exceso de iones Cl<sup>-</sup>, se produce un descenso en la pendiente del potencial. La figura I.17 muestra un ejemplo de valoración realizada. Todo el proceso de dosificación, almacenamiento y tratamiento de datos se realiza de forma automática mediante un ordenador personal. La concentración de la disolución valorante de AgNO<sub>3</sub> era de 15 mM.

Se ha diseñado un programa para tratar las curvas del potencial frente al volumen de agente valorante con el fin de obtener el punto de inflexión que corresponde con el punto final de la valoración.

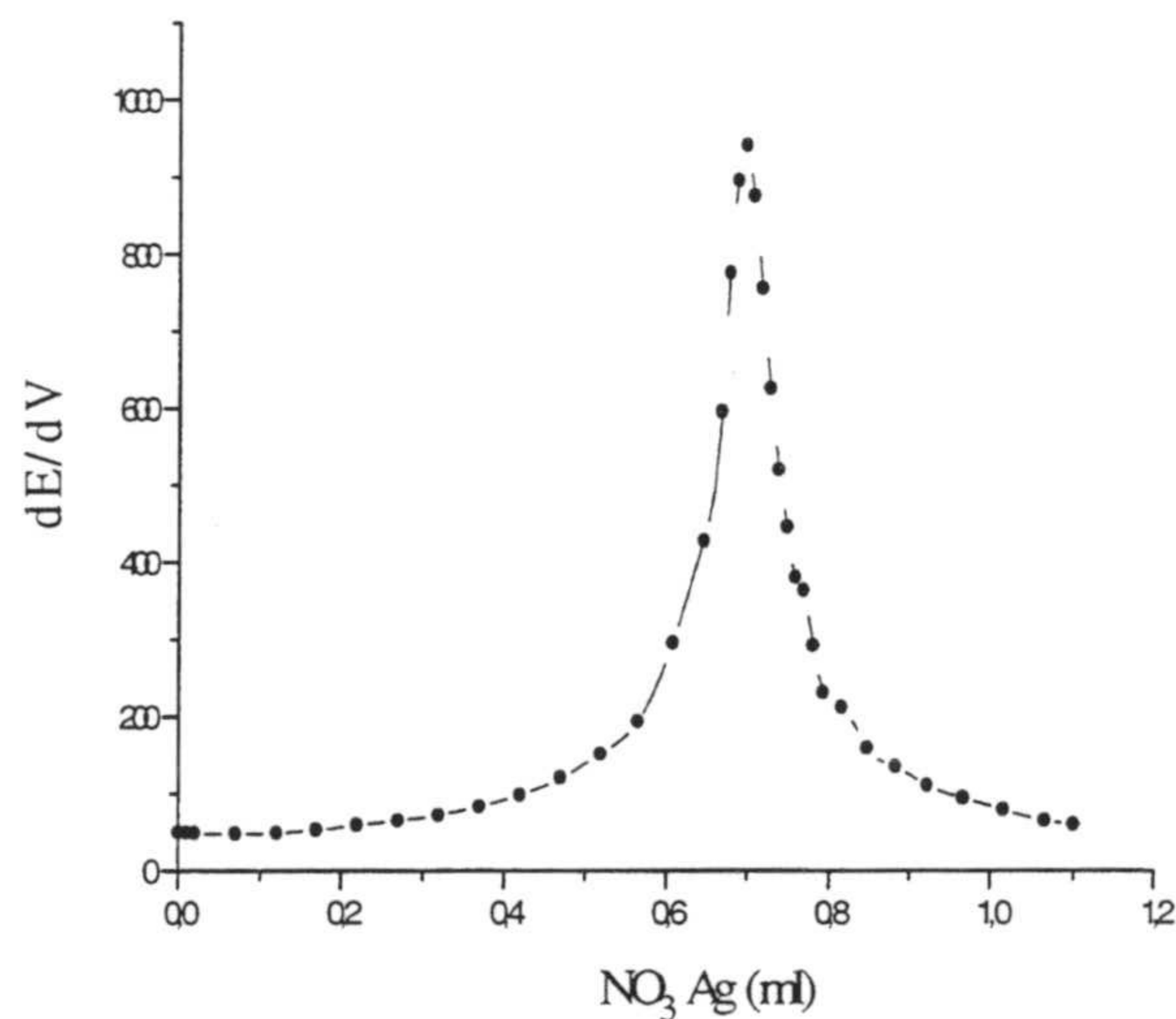


**Figura I.17.** Valoración de una disolución de iones cloruro con  $\text{AgNO}_3$ .

Mediante este programa se calcula la pendiente en cada punto de la valoración obteniéndose resultados como los que aparecen en la figura I.18. Esta curva es ajustada a la ecuación:

$$y = y_0 + \frac{2A}{\pi} \frac{w}{4(x - x_c) + w^2} \quad \text{I.45}$$

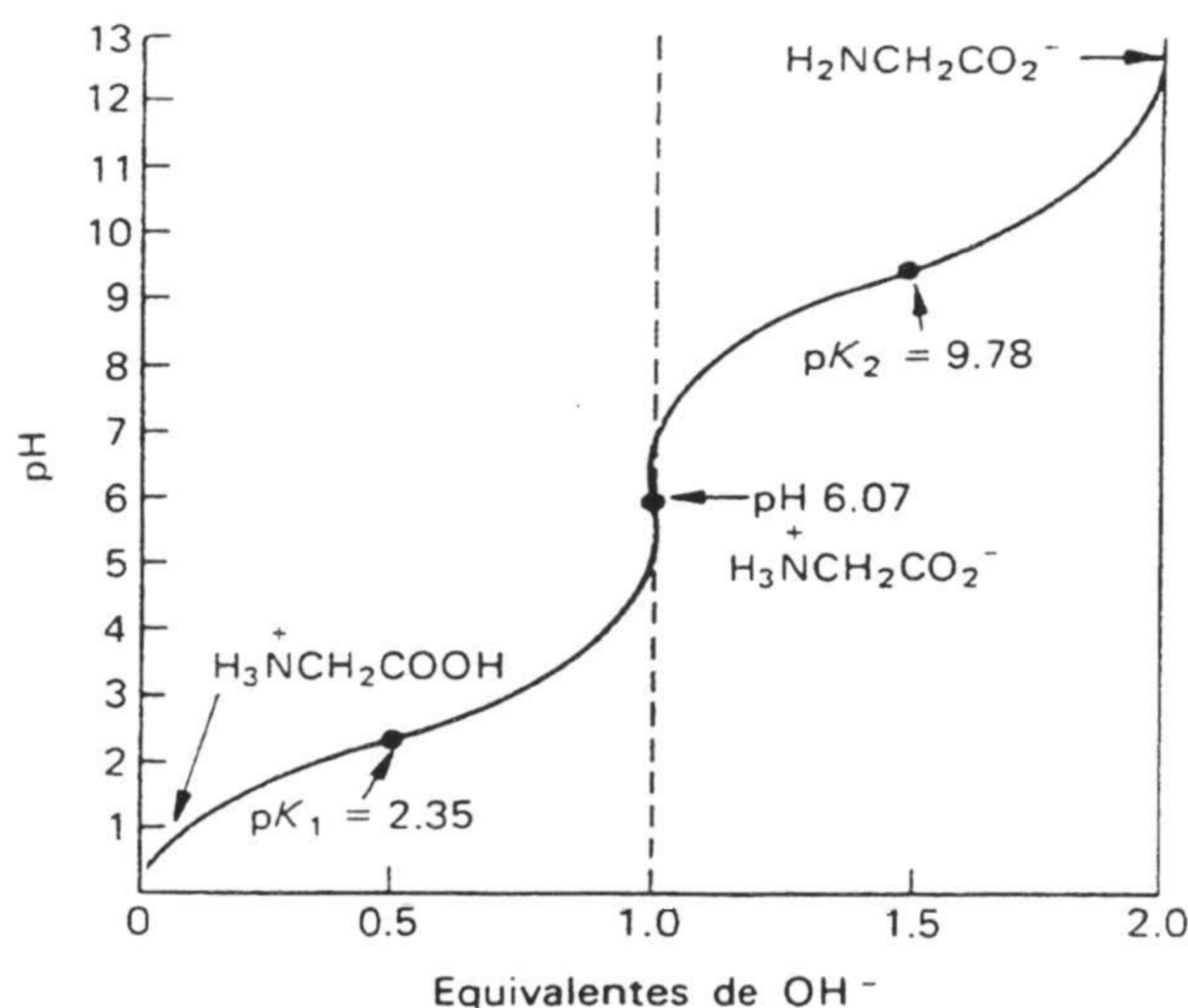
donde  $A$  es el área encerrada bajo la curva,  $w$  es la anchura de la misma, y  $x_c$  e  $y_0$  son las coordenadas del máximo que corresponde al punto final.



**Figura I.18.** Obtención del punto final de la valoración.

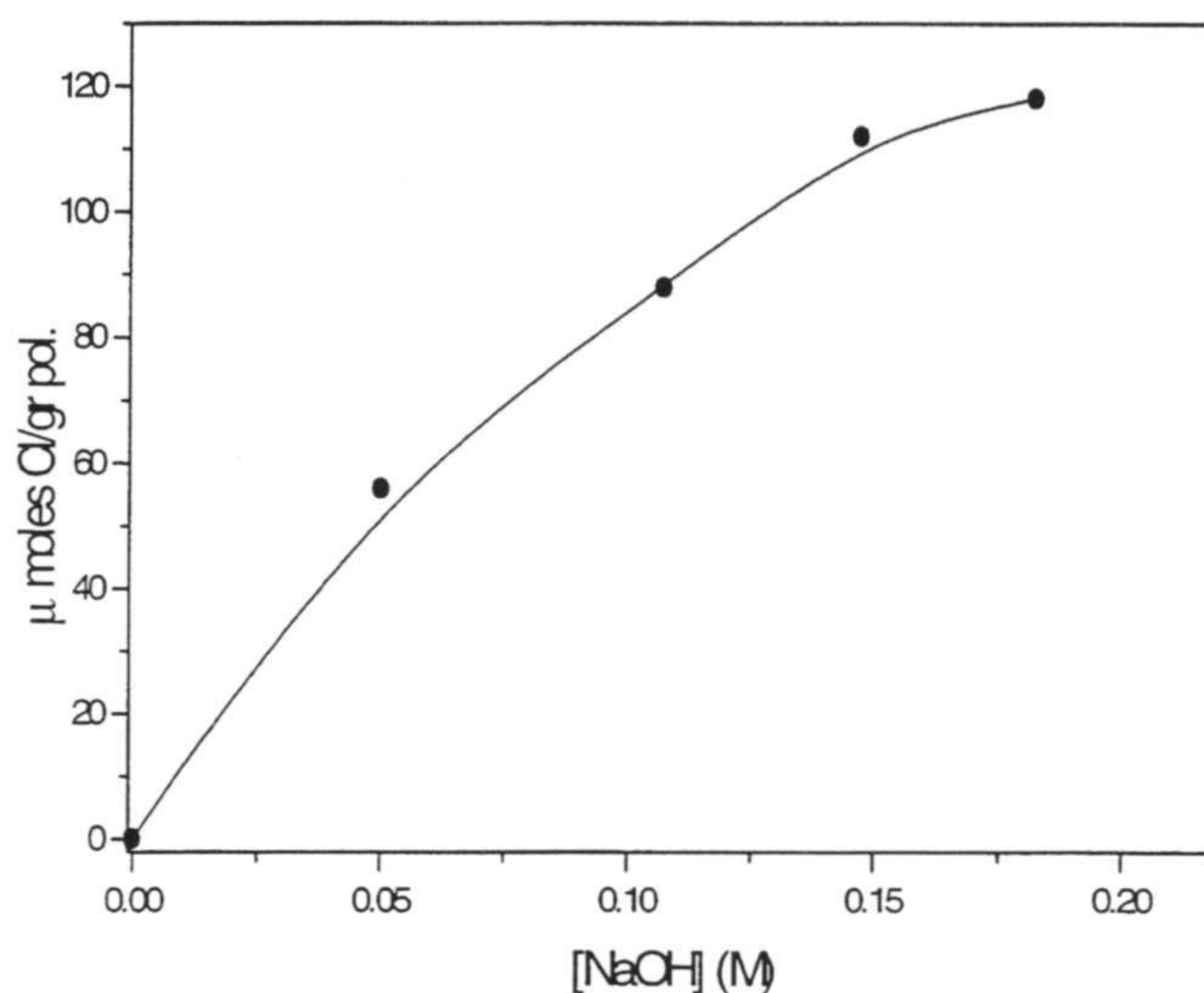
¿Qué especie química con un grupo amino es la más adecuada para la reacción con los grupos clorometilo superficiales de la partícula?. Esta reacción está controlada por la difusión del nucleófilo desde la fase acuosa hasta la partícula (*Suen et al., 1984*). Así pues es necesario usar una especie pequeña que pueda difundir rápidamente hasta la superficie. Por otra parte la amina ha de ser insoluble en la fase orgánica que constituye el látex, de modo que sólo los grupos clorometilo superficiales reaccionen.

Con estas premisas la amina que se eligió fue la glicina. Este aminoácido sólo actúa como nucleófilo cuando tiene carga negativa, es decir, cuando está desprotonada (*Suen et al., 1984*). De acuerdo con la curva de valoración de la glicina que aparece en la Figura I.19, esta situación se da para pHs superiores a 9.78.



**Figura I.19.** Curva de valoración de la glicina.

Con el fin de encontrar la relación NaOH/glicina adecuada (mediante el NaOH se controla el pH del medio), se incubaron distintas muestras del látex JX2 con una cantidad constante de glicina de 0.24 M y diferentes concentraciones de NaOH. Al cabo de 6 días de incubación a 35°C el contenido en iones cloruro se cuantificó obteniéndose los resultados que aparecen en la figura I.20.



**Figura I.20.** Reacción entre JX2 y 0.24 M Gly con diferentes concentraciones de NaOH.

Como se puede observar en esta figura, cuanto mayor es el pH más eficaz es la reacción.

Por otra parte es importante que la fuerza iónica del medio de reacción sea elevada, evitando que el látex se agregue, para que la glicina desprotonada, que tiene carga negativa, se puede aproximar a la superficie negativa de la partícula coloidal.

Teniendo todo esto en cuenta las condiciones que se eligieron para determinar la concentración superficial de los grupos clorometilo fueron:

- incubación a 35°C en un baño termostatzado bajo agitación.
- el medio contenía 0.182 M de NaOH y 0.24 M de glicina (relación NaOH/Glicina 0.76) El pH era de 10.5.

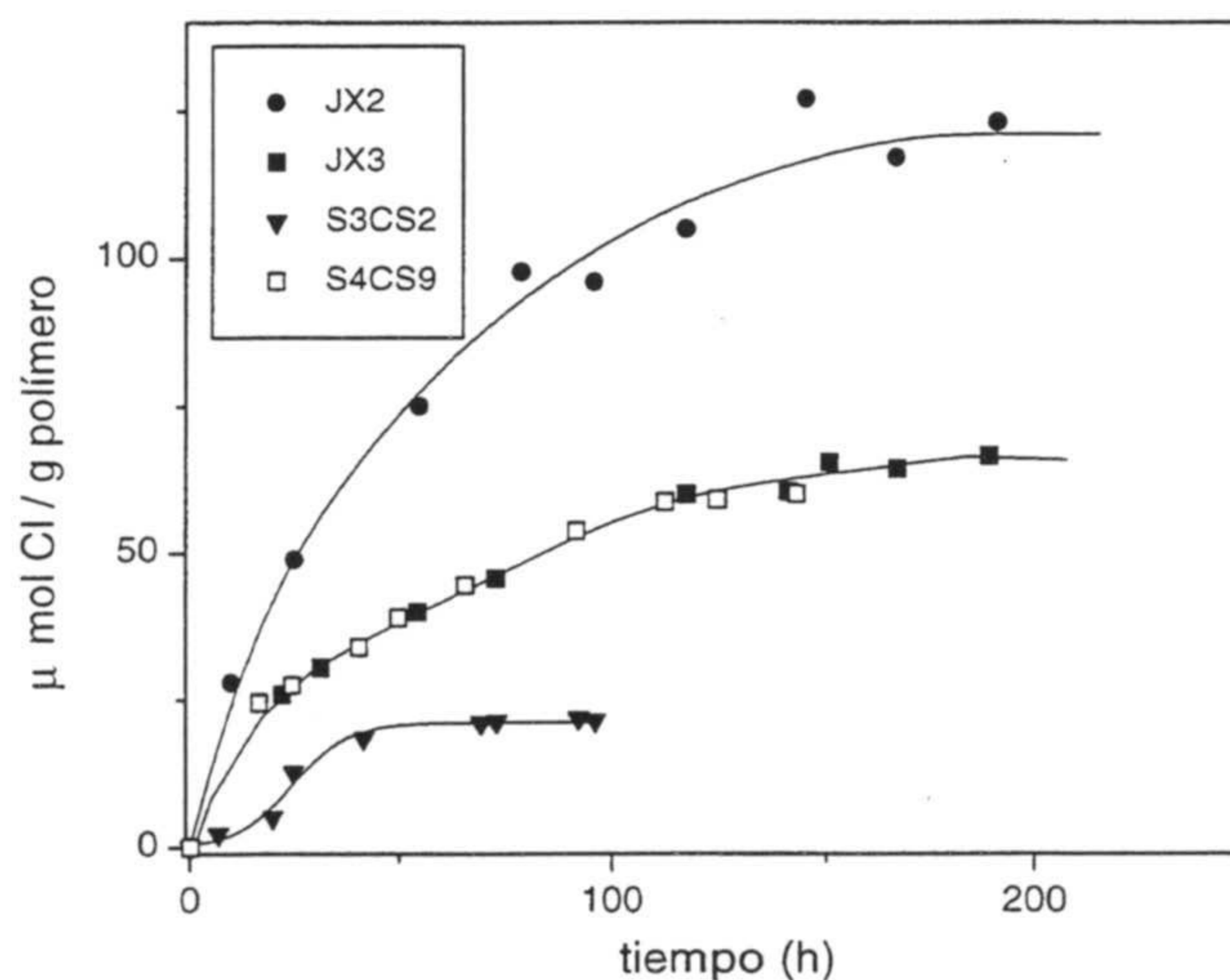
Una vez finalizada la reacción, la muestra de látex era centrifugada para separar las partículas del medio de dispersión, y los iones cloruro existentes en el sobrenadante eran determinados. En todas las determinaciones se utilizaba un blanco que contenía la misma cantidad de látex que la muestra pero sin medio de reacción. Al analizar estos blancos se obtuvo un resultado relevante: se detectaban iones cloruros que se liberaban por efecto de la temperatura. Este hecho será comentado más adelante.

Así pues, la cantidad de cloros superficiales se determinaba por diferencia de la cantidad liberada por reacción con la glicina (muestra) y la cantidad liberada por efecto térmico (blanco).

A través de esta reacción entre el látex y la glicina, cada grupo clorometilo superficial de la partícula está siendo sustituido por una molécula de glicina que tiene un grupo carboxilo. Así se está transformando la funcionalidad clorometilo en carboxilo. En este sentido el grupo clorometilo es muy versátil tal y como se ha mostrado en la figura I.16.

Se ha realizado la determinación de grupos clorometilo superficiales de 4 látex: S3CS2, S4CS9, JX2 y JX3. Los resultados obtenidos aparecen en la figura I.21, donde para cada una de las medidas se hizo un blanco.

Lo primero que cabe resaltar es la cinética lenta que caracteriza la reacción entre la glicina y los grupos clorometilo superficiales de las partículas. La cantidad de iones cloruro liberados aumenta con el tiempo de incubación hasta alcanzarse un plateau que corresponde a la cantidad de grupos clorometilo superficiales.



**Figura I.21.** Dependencia temporal de los iones cloruro liberados por reacción con NaOH/Gly.

Cuanto mayor es esta cantidad más tiempo se tarda en conseguir el plateau. Los valores correspondientes al plateau aparecen reflejados en la tabla I.2 junto con la

receta de la síntesis de la corteza de cada uno de los látex. Las condiciones de la síntesis nos van a permitir explicar los diferentes valores del contenido superficial en grupos clorometilo.

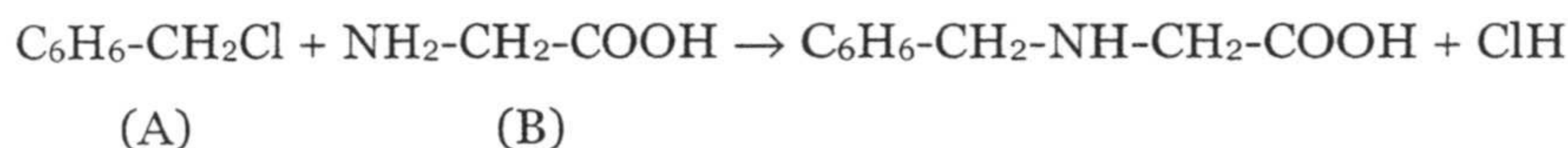
**Tabla I.2.** Contenido superficial de grupos clorometilo y condiciones de síntesis de la corteza.

	S3CS2	S4CS9	JX3	JX2
Temperatura	80°C	60°C	60°C	60°C
Cantidad de estireno (g)	9.2	9.2	9.2	0
Cantidad de clorometilestireno (g)	9.2	9.2	9.2	18.4
[Cl] ( $\mu\text{mol/g pol}$ )	21 $\pm$ 3	59 $\pm$ 4	65 $\pm$ 7	121 $\pm$ 16

En la síntesis de la corteza del JX2 sólo se utilizó clorometilestireno, por este motivo es el látex con mayor contenido superficial de grupos clorometilo. El S3CS2 y S4CS9 fueron sintetizados con la misma cantidad de estireno y clorometilestireno, y en consecuencia deberían tener la misma cantidad de grupos superficiales. Sin embargo, se observa que el látex que fue sintetizado a mayor temperatura (S3CS2 a 80°C) tiene 2/3 menos de grupos clorometilo. Este resultado está en concordancia con la idea anteriormente apuntada sobre la hidrólisis de los grupos clorometilo por efecto de la temperatura.

El látex S4CS9 y JX3 fueron sintetizados en las mismas condiciones. Tal y como se observa en la figura I.21 la cinética en la liberación de iones cloruro es similar, así como el valor del plateau (posiblemente si se hubieran hecho más medidas del látex S4CS9 se hubiera alcanzado el mismo plateau que el JX3). Por otra parte sus diámetros e índices de polidispersidad son coincidentes (Tabla I.1). Todo esto muestra la reproducibilidad en la síntesis y caracterización de los coloides poliméricos.

La reacción entre el clorometilestireno y la glicina es un ejemplo típico de reacción de segundo orden que transcurre vía nucleofílica tipo SN2:



donde la velocidad de la reacción, expresada como desaparición de clorometilestireno, es:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A][B] \quad \text{I.46}$$

siendo  $k$  la constante de segundo orden de reacción,  $[A]$  la concentración de clorometilestireno y  $[B]$  la concentración de glicina.

En principio, cabría esperar que cuando el clorometilestireno se encuentra unido a una cadena polimérica como es el caso de una partícula de látex, el mecanismo fuera el mismo. Sin embargo se ha comprobado que la cinética no es de segundo orden (*Suen et al., 1984*).

Hay que tener presente que la reacción está ocurriendo en una interfase sólido-líquido, y su velocidad va a estar controlada por la difusión del reactivo hacia la superficie de la partícula. Además, la reacción está ralentizada debido a la repulsión electrostática existente entre la glicina y la superficie del látex, pues ambas tienen carga negativa.

La concentración de glicina en el medio es mucho mayor a la de grupos clorometilo anclados en la superficie de la partícula. Se puede suponer que la concentración de glicina a lo largo de la reacción es prácticamente constante, quedando entonces la ecuación I.46, para el caso de la reacción en partículas de látex, como:

$$-\frac{d[A^p]}{dt} = k^*[A^p] \quad \text{I.47}$$

donde la nueva constante de velocidad  $k^*$  engloba a  $k$  y a la concentración de glicina.  $[A^p]$  es la concentración de grupos clorometilo superficiales. De esta forma, la cinética de la reacción con coloides debe ser de primer orden, cuando era de segundo orden en reacción homogénea.

A partir de la ecuación I.47 se puede llegar a la ley de velocidad para reacciones de primer orden en su forma integrada:

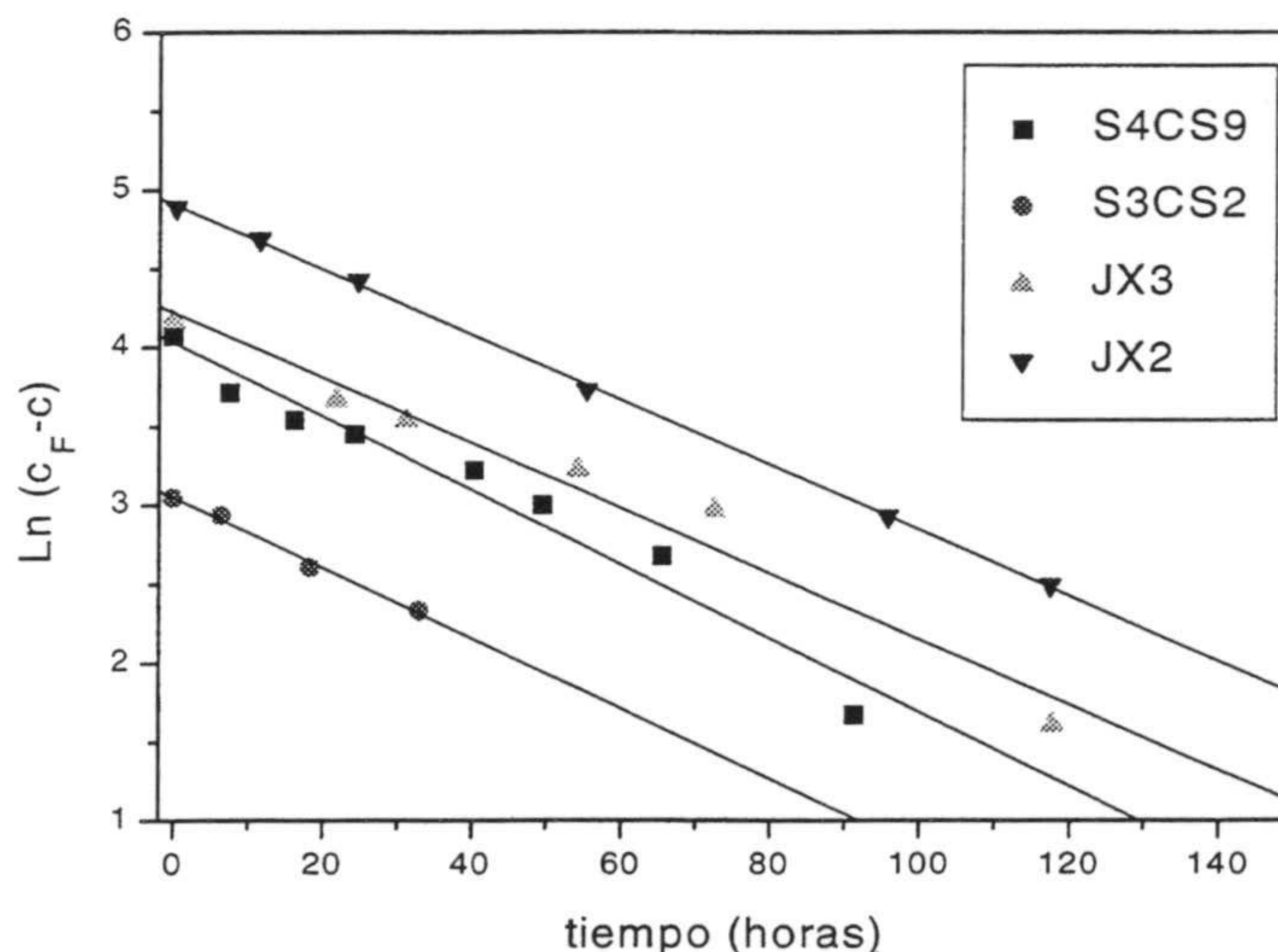
$$-\int_{A_0}^A \frac{d[A^p]}{[A^p]} = \int_0^t k^* dt \quad \text{I.48}$$

$$\ln A^p = \ln A_0^p - k^* t \quad \text{I.49}$$

$A_0^p$  es la concentración de grupos clorometilo superficiales, que coincide con los grupos cloruro ( $c_F$ ) detectados en la zona de plateau (ver Figura I.21). Por otra parte  $A^p$  es la cantidad de grupos que quedan anclados en la partícula para un instante  $t$  y su valor es  $c_F - c$ , siendo  $c$  los cloruros medidos para  $t$ . Así la ecuación I.49 queda expresada en función de los iones cloruro liberados como:

$$\ln(c_F - c) = \ln c_F - k^* t \quad \text{I.50}$$

Según este razonamiento, si la reacción es de primer orden una representación de  $\ln(c_F - c)$  frente al tiempo debe de ser una línea recta. Esta suposición se ha comprobado para los cuatro látex tal y como muestra la figura I.22.



**Figura I.22.** Reacción de primer orden entre la glicina y los látex.

En los cuatro casos el ajuste a una línea recta es bueno, lo que nos permite afirmar que la reacción entre la glicina y los grupos clorometilo de la partícula es de



primer orden. Los datos de la pendiente, que corresponde a la constante cinética, obtenidos por ajuste de mínimos cuadrados aparecen en la tabla I.3. Se puede observar que, dentro de los márgenes de error, la constante cinética es semejante para los cuatro látex.

**Tabla I.3.** Constantes de reacción

Látex	$k^* \times 10^2 \text{ (h}^{-1}\text{)}$
S3CS2	$2.2 \pm 0.1$
S4CS9	$2.3 \pm 0.2$
JX3	$2.1 \pm 0.2$
JX2	$2.07 \pm 0.02$

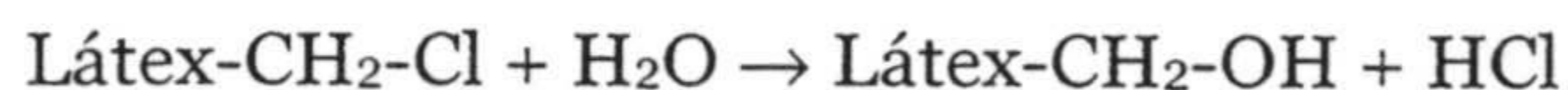
La velocidad de la reacción debe de estar controlada por la difusión de la glicina hacia la partícula. Esta difusión está fuertemente influenciada por la repulsión electrostática existente entre ambas. Como la densidad de carga de los cuatro látex es parecida (ver Tabla I.1), cabría esperar la constancia obtenida en el coeficiente de velocidad  $k^*$ .

Por otra parte, al tratarse de una reacción heterogénea que ocurre en la superficie de la partícula coloidal, la velocidad de la reacción debe de ser directamente proporcional al área de la partícula (*Suen et al., 1984, Margel et a., 1991*). En nuestro caso, dado que el tamaño de los látex es muy parecido, la constante de velocidad que se ha obtenida es semejante.

## 10. Estabilidad de los grupos clorometilo

En el apartado anterior ya se había apuntado una cierta inestabilidad de los grupos clorometilo frente a la temperatura. El estudio de este aspecto es relevante ya que va a permitir obtener las condiciones óptimas de conservación de un látex clorometilo, así como su vida media.

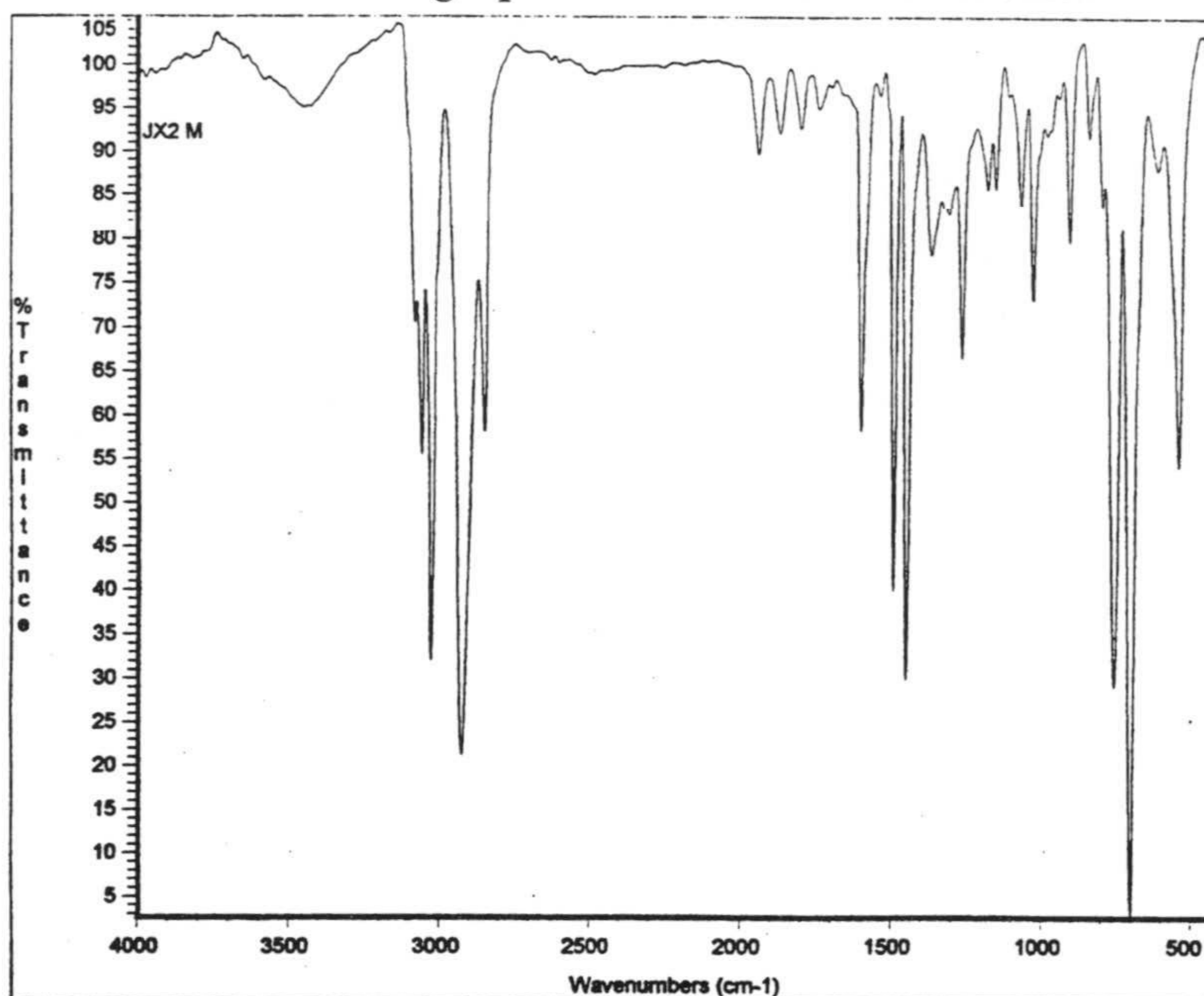
Esta inestabilidad se debe a la hidrólisis en medio acuoso (*Charleux et al., 1991*):



El mecanismo de esta reacción es de tipo SN1, y su velocidad tiene una gran dependencia con la temperatura. En esta hidrólisis, los grupos cloro son sustituidos por grupos hidroxilo.

Para comprobar si esta reacción era la culpable de la pérdida de grupos clorometilo por parte de los látex, se realizó un espectro de IR de una muestra de JX2 tras haber permanecido 2 días a 60°C (Figura I.23).

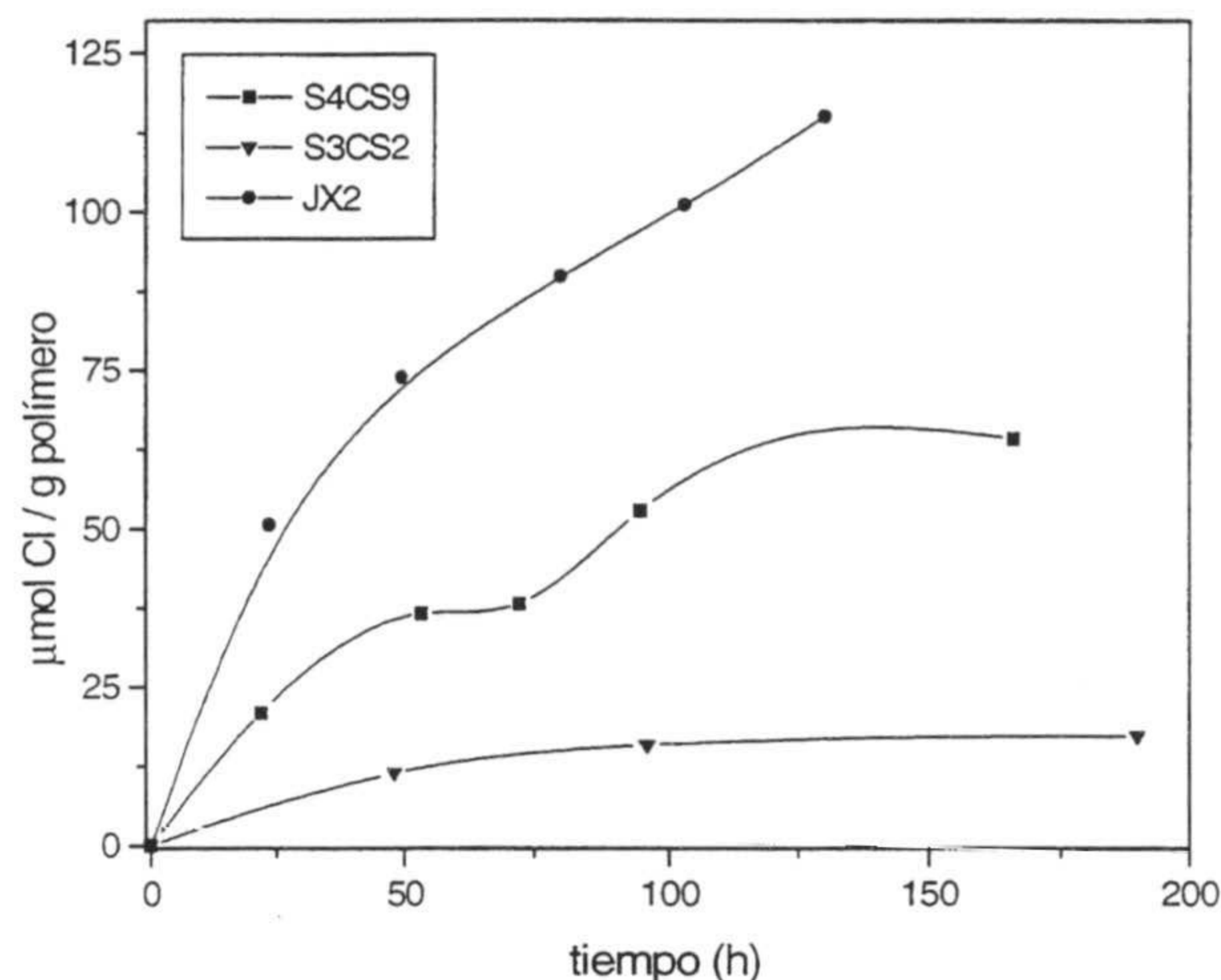
En esta figura aparece una banda ancha a 3435 cm<sup>-1</sup> característica del grupo O-H y una banda estrecha a 1266 cm<sup>-1</sup> característica del grupo C-O. Este resultado confirma la transformación del grupo clorometilo a hidroximetilo.



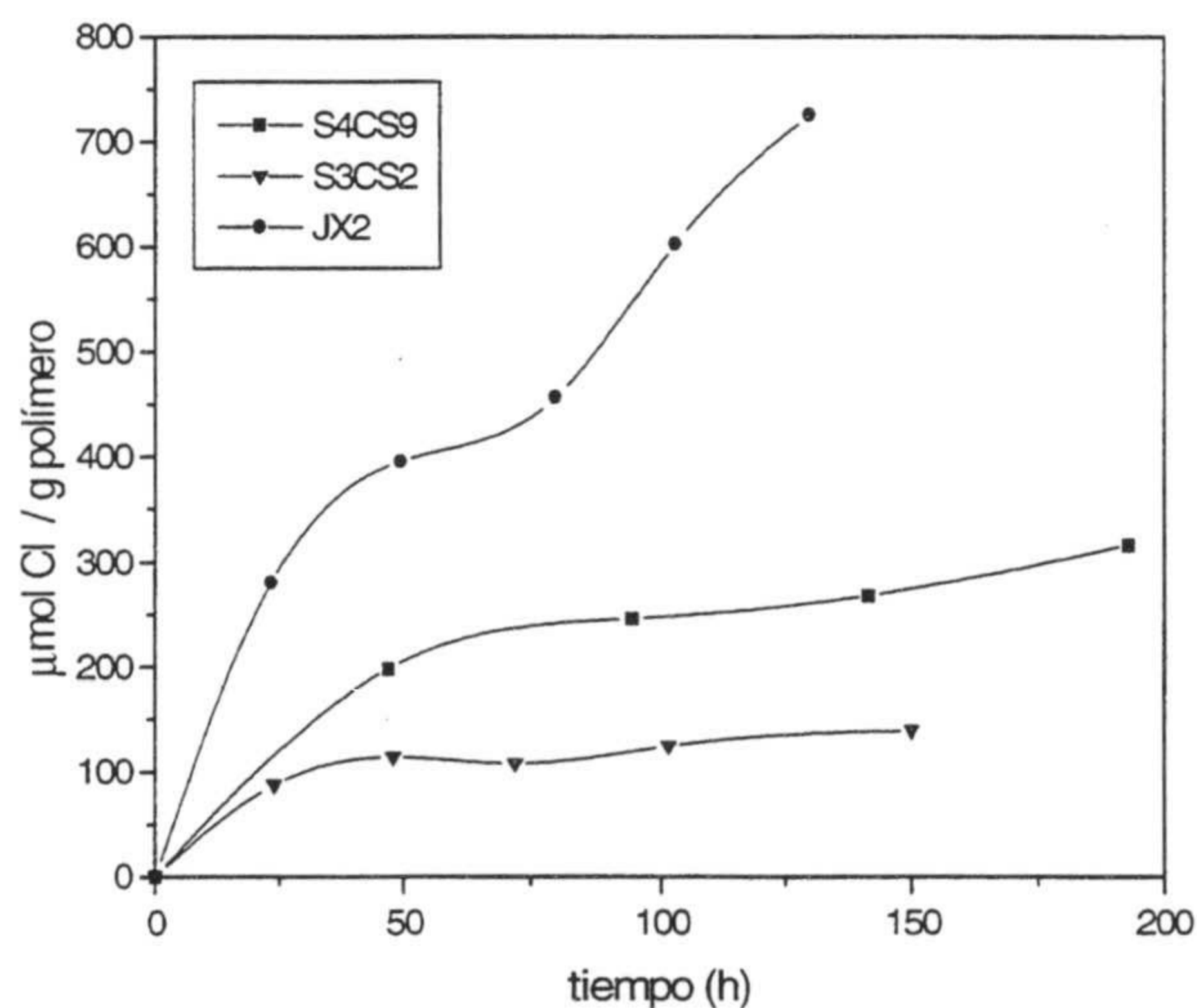
*Figura I.23.* Espectro de IR de una muestra de JX2 conservada a 60°C.

Se estudió la influencia de la temperatura sobre esta hidrólisis del grupo clorometilo. Para ello se incubaron varias muestras de S3CS2, S4CS9 y JX2 a 50°C y 80°C durante varios días. Pasados ciertos intervalos de tiempo de incubación se

midió el contenido en iones cloruro de los sobrenadantes, previa centrifugación. Los datos aparecen a continuación:



**Figura I.24.** Estabilidad de los grupos clorometilo a 50°C.



**Figura I.25.** Estabilidad de los grupos clorometilo a 80°C.

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad química de los grupos clorometilo es importante. Sin embargo, un hecho curioso es que a 80°C la cantidad de iones cloruro determinados es muy superior a la cantidad existente en la superficie (ver tabla I.2). Inevitablemente estos iones cloruro liberados deben de provenir del

interior de la partícula. No sólo se están destruyendo los grupos clorometilo superficiales por hidrólisis, sino que también se está produciendo una reacción en el interior de la partícula conocida como reticulación que ocurre a temperaturas elevadas (Negre *et al.*, 1979; Feng *et al.*, 1995).

La hidrólisis del grupo  $\text{CH}_2\text{Cl}$  por efecto térmico permite explicar por qué el látex S4CS9 tiene un contenido superior de grupos clorometilo que el S3CS2, cuando la cantidad de estireno y clorometilestireno usados en ambas síntesis fueron iguales, ya que la temperatura de síntesis del primero fue  $60^\circ\text{C}$  mientras que la del S3CS2 fué de  $80^\circ\text{C}$ .

Llegado este punto, se plantea la siguiente cuestión: ¿cuál será la pérdida de grupos clorometilo en las condiciones de conservación de los látex?. La respuesta se puede extraer a partir de los datos que aparecen en la siguiente tabla y que corresponden a la cantidad de grupos clorometilo que quedan en la superficie de los látex conservados en el frigorífico a  $4^\circ\text{C}$  durante estos años.

**Tabla I.4.** Pérdida de grupos clorometilo en condiciones de almacenamiento.

Látex	Tiempo (meses)	[Cl] ( $\mu\text{mol/g pol.}$ ) superficiales	% perdido
S3CS2	19	15.2	28
	35	11	48
S4CS9	13	47	20
	29	38	36
JX2	7.5	100	17
	23.5	86	28

Incluso almacenando los látex a  $4^\circ\text{C}$  se produce pérdida de grupos clorometilo, aunque también hay que tener en cuenta que el período considerado está entre 1 y 3 años.

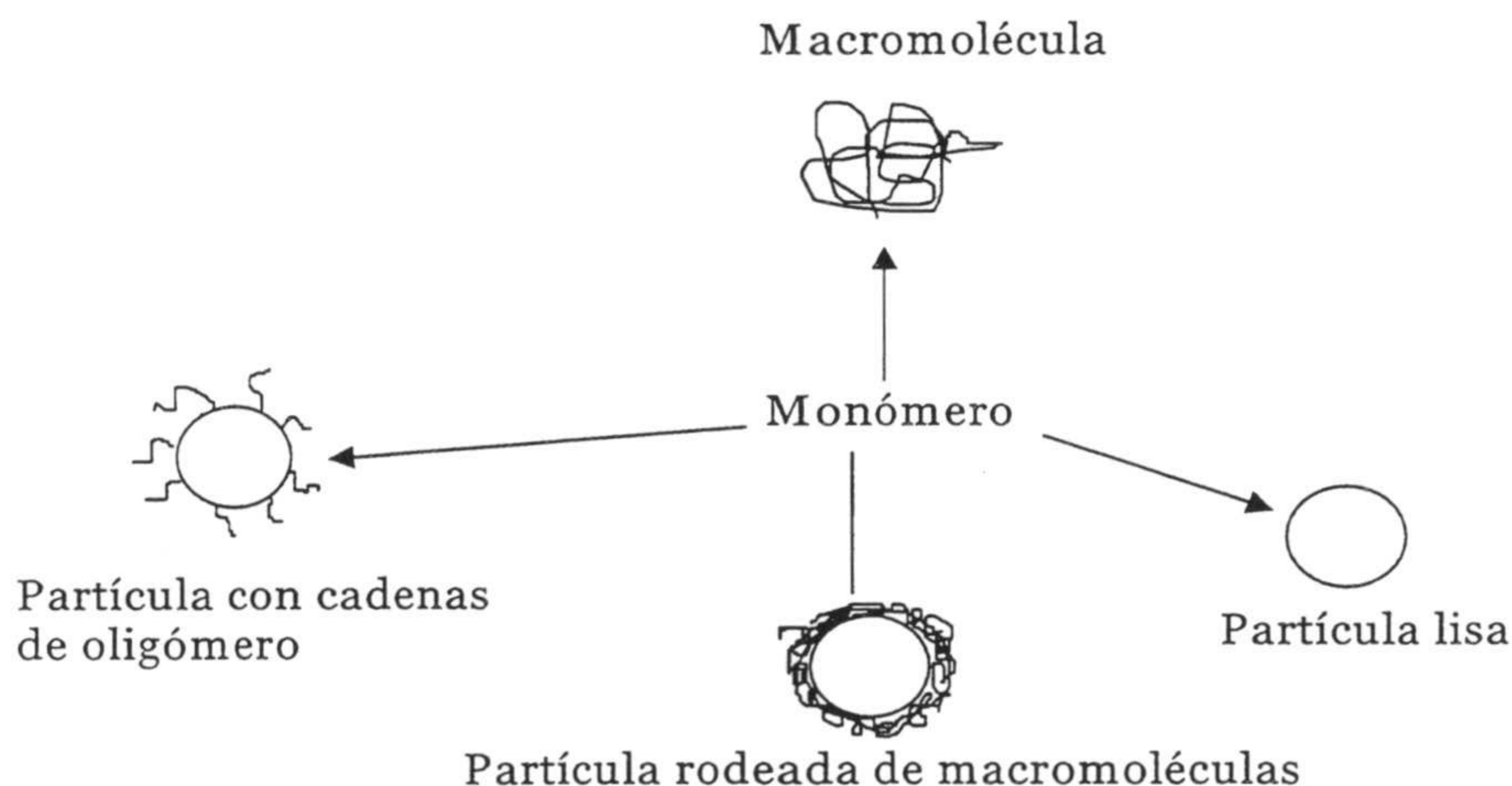
## 11. Morfología de la superficie de las partículas poliméricas

En general, se suele suponer que la superficie de una partícula de látex es lisa y que los grupos superficiales ionizables están anclados rígidamente a la misma. Sin embargo, existen en la bibliografía resultados sobre estabilidad coloidal y

electroforesis que no pueden ser explicados fácilmente mediante este modelo (Homola et al., 1977; van der Put et al., 1983; Chow et al., 1988; Midmore et al., 1988; Elimelech et al., 1990a). Zimehl (Zimehl et al., 1987) sugirió que como resultado de una polimerización en emulsión se podrían obtener cuatro productos diferentes (Ver Figura I.26): i) macromoléculas más o menos largas; ii) partículas coloidales con su superficie lisa; iii) partículas coloidales con una cierta cantidad de oligómeros en su superficie; iv) partículas coloidales rodeadas de una maraña de macromoléculas.

A las partículas que presentan cadenas flexibles de oligómeros en su superficie se les suele llamar partículas “peludas” ó “hairy”. En estas partículas, generalmente, los oligómeros presentan grupos iónicos que provienen del iniciador usado o de los monómeros. En tal caso, las cadenas se encuentran extendidas hacia la disolución debido a la repulsión electrostática que existe entre ellas.

La obtención de uno u otro tipo de partícula como resultado de la polimerización depende tanto de las condiciones de la síntesis como de los monómeros empleados para la misma. Tan sólo partículas lisas se pueden considerar como coloides modelo.



**Figura I.26.** Polimerización de un monómero para dar diferentes productos.

Los látex S4CS9, S5CS1, S5CS2 y S5CS3 fueron sintetizados a la misma temperatura y con la misma cantidad de clorometilestireno. La diferencia entre ellos radica en que en la síntesis de los tres últimos se utilizaron cantidades crecientes del comonomero ácido metacrílico con el fin de que existieran grupos carboxilos en la superficie de las partículas (ver los datos de densidad de carga superficial en la tabla I.1). De acuerdo con las recetas de la síntesis, cabría esperar que los cuatro látex tuvieran la misma cantidad de grupos clorometilo superficiales. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron:  $59 \pm 4$ ,  $65 \pm 5$ ,  $92 \pm 9$ ,  $127 \pm 12$   $\mu\text{mol/g}$  pol. para el S4CS9, S5CS1, S5CS2 y S5CS3, respectivamente. Como vemos la cantidad de grupos clorometilo aumenta de la misma forma que lo hace la densidad de carga de las partículas.

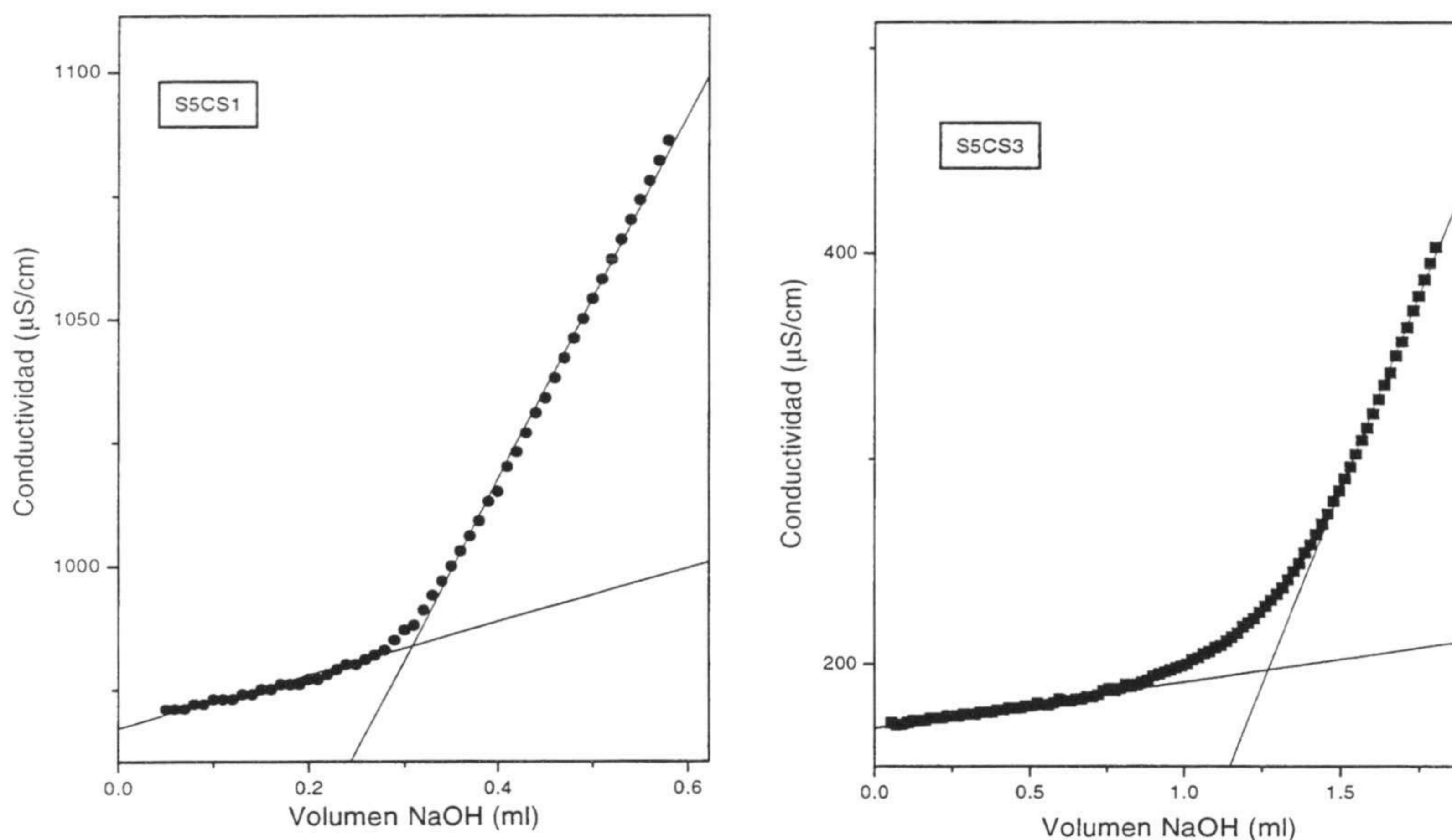
El ácido metacrílico usado como comonomero en la síntesis de estos látex tiene un marcado carácter hidrofílico, además de estar cargado a pHs neutros y básicos lo que nos indica que puede formar cadenas de oligómeros solubles en agua que se encontrarían en la superficie de las partículas extendidas hacia la dispersión. Es decir, estos látex pueden ser "peludos".

La mayoría de los látex con alta densidad de carga y sintetizados con monómeros hidrofílicos (ácido acrílico, acrilamida, HEMA, etc) están formados por partículas con cadenas oligoméricas en su superficie (*Tamai et al., 1989*).

Partiendo de esta hipótesis se podría explicar por qué la cantidad de grupos clorometilo valorados aumenta con la densidad de carga de la partícula. Si el látex más cargado es el que presenta una mayor cantidad de cadenas oligoméricas y de una mayor longitud, el número de grupos clorometilo que pueden reaccionar con la glicina que está difundiendo entre estas cadenas es mayor.

Otros resultados que podrían corroborar esta hipótesis son las valoraciones conductimétricas directas de los látex S5CS1 y S5CS3 (figura I.27). Como se puede ver, el cambio en la pendiente es menos brusco cuanto mayor es la densidad de carga del látex. En estas valoraciones, los iones  $\text{OH}^-$  deben difundir entre las cadenas oligoméricas para reaccionar con los protones de los grupos carboxilo. Cuanto mayor sea el espesor de esta capa peluda que rodea a la partícula más lenta será la reacción

y en consecuencia la neutralización no será instantánea, creándose una dependencia con el tiempo, y por tanto un cambio menos brusco en la pendiente.



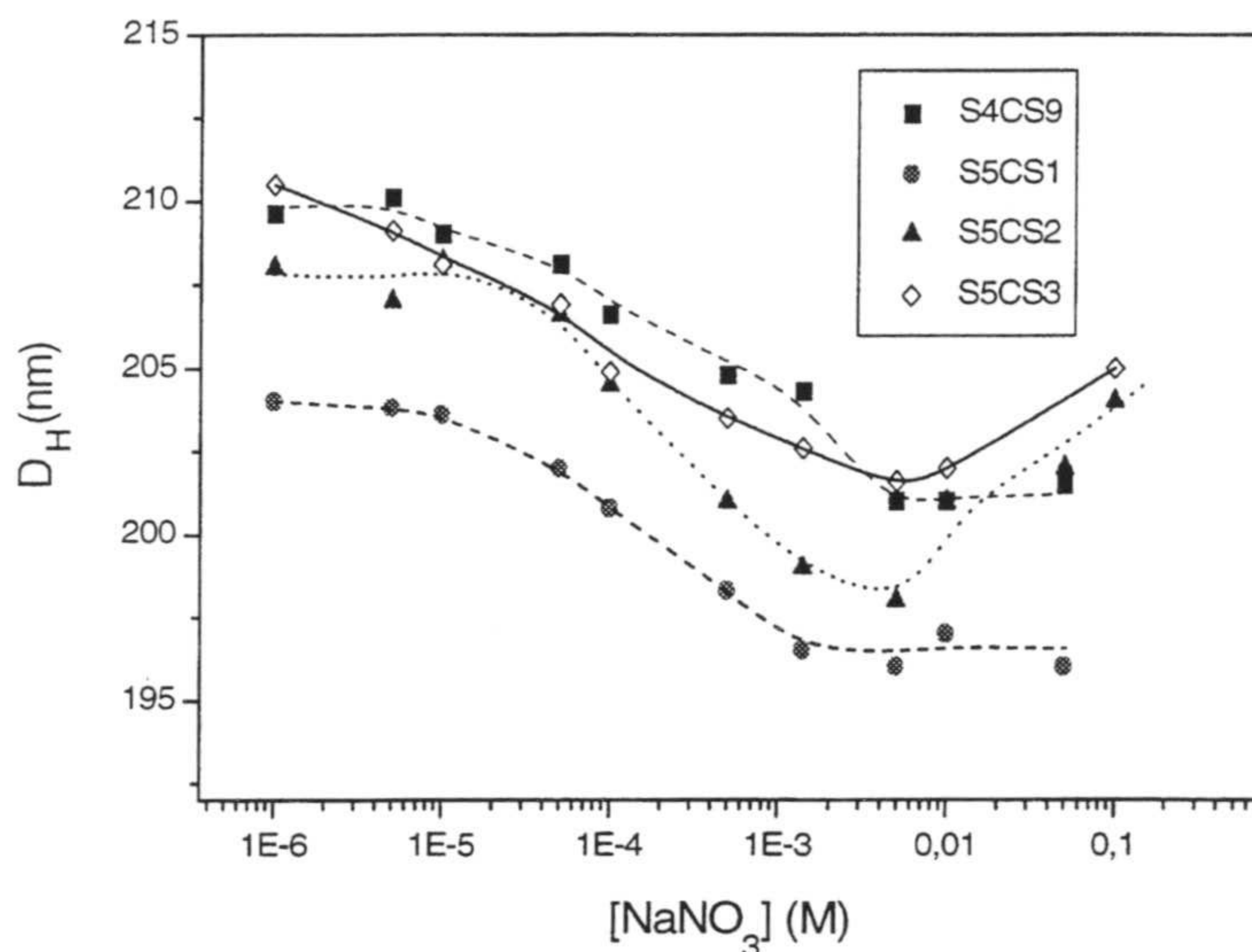
**Figura I.27.** Valoración conductimétrica directa de los látex S5CS1 y S5CS3.

No obstante, el admitir que las partículas S5CS1, S5CS2 y S5CS3 presentan cadenas oligoméricas flexibles en su superficie sigue siendo una hipótesis basada en la determinación de la densidad de carga y, la cantidad de grupos clorometilo superficiales de estos látex.

¿Cómo se puede distinguir experimentalmente una partícula lisa de una partícula peluda?. Los látex S4CS9, S5CS1, S5CS2 y S5CS3 tienen un tamaño medido por TEM muy parecido, en torno a 200 nm. Si se ha supuesto que el látex S5CS3 es el que tiene una mayor cantidad y extensión de cadenas oligoméricas, su tamaño debería de ser el más grande. Sin embargo, no debemos de olvidar que las muestras para ser medidas por TEM han de estar secas. En consecuencia, aunque un látex sea peludo, las cadenas se van a colapsar hacia la superficie cuando las partículas no estén en dispersión.

Por espectroscopía de fotocorrelación si se debe de diferenciar una partícula peluda de otra lisa, ya que por medio de esta técnica se mide el tamaño hidrodinámico de las partículas.

La figura I.28 muestra el diámetro hidrodinámico en función de la concentración de  $\text{NaNO}_3$  para los cuatro látex a  $25^\circ\text{C}$  y a pH 5.



**Figura I.28.** Dependencia del diámetro hidrodinámico con la concentración de  $\text{NaNO}_3$ .

El error experimental para los datos de tamaño que se van a presentar desde ahora en adelante es de  $\pm 2$  nm. No se han incluido las barras de error en las gráficas para no complicar su aspecto.

En todos los casos se pueden distinguir dos zonas bien diferenciadas. En la primera, el diámetro de los cuatro látex desciende al aumentar la fuerza iónica del medio hasta llegar a un valor mínimo cercano al tamaño obtenido por TEM.

Este tamaño mínimo se alcanza, en los cuatro casos, para una misma concentración de  $\text{NaNO}_3$  de aproximadamente  $5 \times 10^{-3}$  M. En la segunda zona, o bien el tamaño permanece constante (látex S4CS9 y S5CS1) ó el tamaño vuelve a aumentar con la fuerza iónica (S5CS2 y S5CS3). La primera región se puede explicar si suponemos que la superficie de las partículas no es lisa sino que existen cadenas flexibles de oligómeros. Estas cadenas se encuentran extendidas hacia la disolución



cuando la fuerza iónica es baja debido a la repulsión electrostática que existe entre ellas. Al aumentar la fuerza iónica, esta repulsión disminuye debido al apantallamiento producido por los contraiones y por tanto la extensión de las cadenas disminuye, colapsando sobre la superficie de la partícula (ver figura I.29).



**Figura I.29.** Comportamiento de una partícula peluda con la fuerza iónica.

A la concentración de  $\text{NaNO}_3$  de  $5 \times 10^{-3}$  M las cadenas flexibles existentes en la superficie de las partículas parecen alcanzar el máximo de compresión. El espesor de la capa formada por las cadenas de oligómero no sólo va a depender de la fuerza iónica del medio, sino que también dependerá de los grupos iónicos existentes en esas cadenas, así como de su hidratación (Goossens et al., 1979).

Una explicación alternativa a este comportamiento fue propuesta por Sasaki (Sasaki, 1984). Según este autor, el descenso en el tamaño hidrodinámico se debe a la destrucción, por parte de los iones añadidos, de una capa de agua rígida que rodea a la partícula.

El descenso de tamaño hidrodinámico que sufren los látex está en torno a 9 nm para todos ellos. Este dato está en concordancia con otros resultados obtenidos por diferentes autores. Así por ejemplo, Seebergh ha encontrado para dos látex de sulfato de tamaño 86 nm y 168 nm, y con una densidad de carga de  $-0.62 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  y  $-0.43 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  respectivamente, un descenso de 7 y 13 nm. Para un látex de amidina con una carga de  $8.3 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  ha obtenido un valor de 12 nm (Seebergh et al., 1995).

Un descenso de 10 nm en diámetro ha sido obtenido para diferentes látex aniónicos por Goossens (*Goossens et al., 1981*) y Prescott (*Prescott et al., 1993*).

La explicación propuesta por Sasaki no parece adecuada, ya que la estructura del agua que rodea a la partícula debe de ser más rígida cuanto más hidrofílica es la superficie, y por tanto el látex S5CS3 debería sufrir un menor descenso de tamaño. Lo que se ha obtenido, sin embargo, es una independencia con el tipo de superficie.

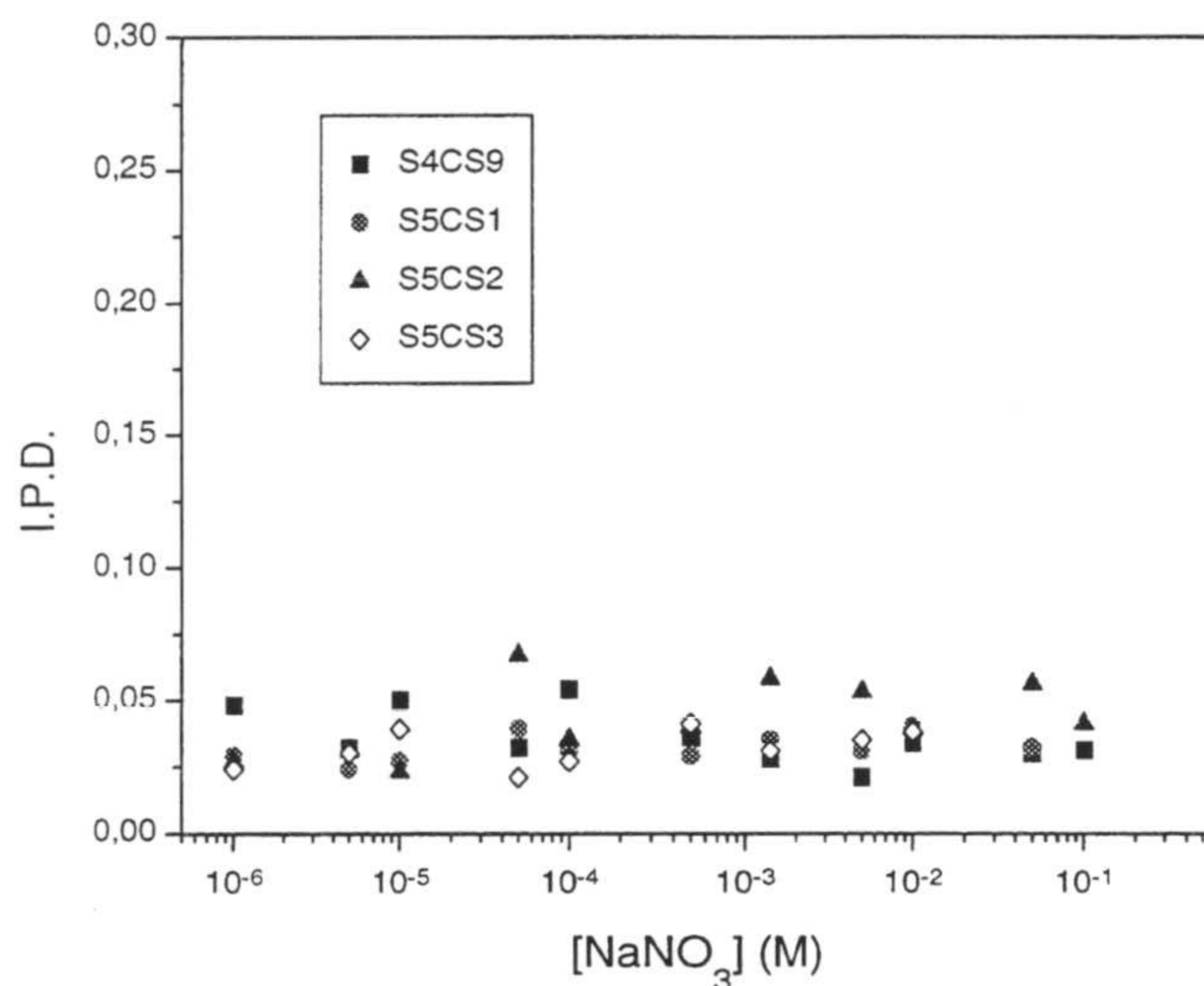
Esta constancia en el descenso es inesperada, ya que era de suponer que el látex más cargado (S5CS3) debería tener las cadenas oligoméricas más extendidas que el látex menos cargado (S4CS9). Más aún, este último látex no fue sintetizado con ácido metacrílico, y sin embargo presenta un comportamiento semejante a los otros coloides.

El primer punto se puede explicar si tenemos en cuenta que el pKa de los grupos carboxilo está en torno a 4.8 (*Yoon et al., 1996*). Los experimentos se realizaron a pH 5 y se puede pensar que hay pocos grupos ácido débil desprotonados.

El hecho de que el S4CS9 presente también este comportamiento nos hace pensar que la existencia de cadenas oligoméricas en la superficie de un látex no sólo puede deberse al uso o no de monómeros hidrofílicos en la síntesis, sino al mismo proceso de síntesis. De hecho los descensos de tamaños observados por Seebergh y otros autores corresponden a látex sulfato. En nuestro caso la síntesis se llevó a cabo en dos etapas: se sintetizó primero un núcleo de poliestireno que posteriormente fue usado para crear una corteza a su alrededor. Bastos (*Bastos et al., 1993b*) y Peula (*Peula et al., 1997*) sintetizaron látex con funcionalidad sulfonato en dos etapas y demostraron que estas partículas presentaban cadenas de oligómeros flexibles en su superficie. Así pues se podría pensar que el proceso de síntesis puede ser el responsable de la existencia de estas cadenas.

Cuando las cadenas se encuentran colapsadas por efecto de la fuerza iónica, el tamaño de la partícula debería mantenerse constante con la concentración de electrolito. Este comportamiento lo presentan los dos látex de menor densidad de carga. Sin embargo, los otros dos látex se comportan de modo diferente, produciéndose un cierto aumento de tamaño. Una posible explicación a este aumento sería que se estuviera produciendo la agregación de los látex. Sin embargo

esta posibilidad queda descartada si se observa el comportamiento del índice de polidispersidad obtenido por PCS (ver figura I.30). Además, no tendría sentido que los látex con mayor densidad de carga fueran los más inestables coloidalmente.



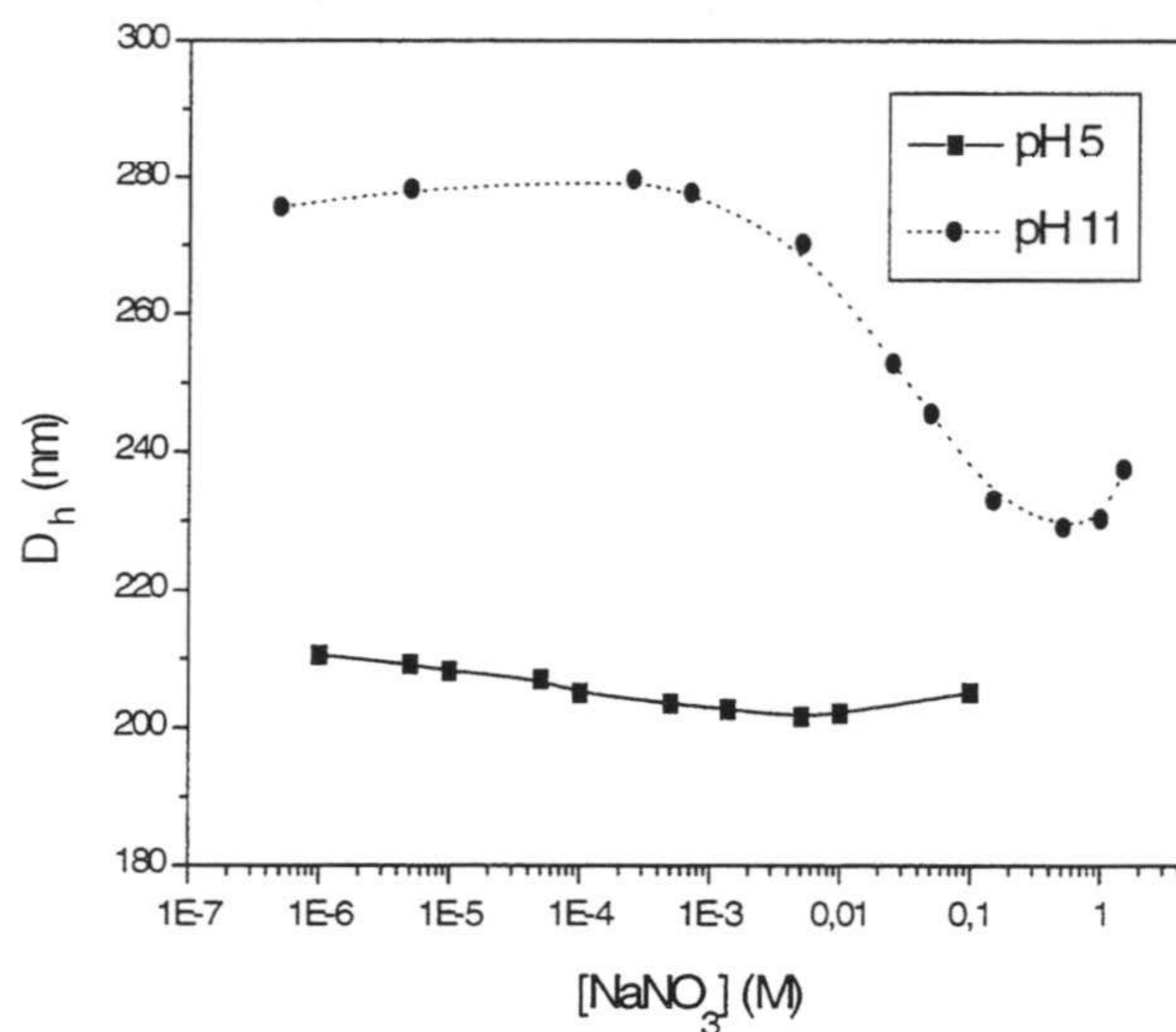
**Figura I.30.** Índices de polidispersidad (I.P.D.) correspondientes a las medidas representadas en la figura I.28.

El índice de polidispersidad (I.P.D.) permanece prácticamente constante para todos los látex y con valores inferiores o iguales a 0.05. Algunos autores consideran que un sistema es monodisperso cuando el I.P.D. obtenido por PCS es igual o inferior a 0.3 (Chu, 1991; Griffin et al., 1993) mientras que otros autores proponen como límite 0.1 (Ostrowsky, 1993; Delgado et al., 1997). En cualquier caso, nuestros sistemas permanecen monodispersos a lo largo del intervalo de concentraciones estudiadas.

Resultados similares a este aumento del diámetro hidrodinámico con la fuerza iónica han sido obtenidos por Brown y Zhao (Brown et al., 1993;1994; Zhao et al., 1996). La explicación dada por estos autores se basa en la adsorción de coiones en posiciones neutras de la superficie (Zukoski et al., 1986a; 1986b). Esta adsorción provoca un cambio en la carga superficial así como en la hidratación de la partícula, produciéndose una nueva expansión de las cadenas oligoméricas. Según estos mismos autores, la adsorción de coiones aumenta con la hidrofiliidad de la

partícula. Los dos látex con menor carga (S4CS9 y S5CS1) son los menos hidrofílicos, pudiéndose suponer la ausencia de adsorción de coiones. Los látex S5CS2 y S5CS3 son más hidrofílicos por presentar en su superficie mayores cantidades de ácido metacrílico, un monómero más hidrofílico que el estireno.

Si el descenso en el tamaño hidrodinámico se debe a la contracción de las cadenas oligoméricas superficiales, la bajada observada a pH 5 debe de ser diferente si el pH del medio es lo suficientemente básico como para desprotonar los grupos carboxilo. En la siguiente figura se compara el comportamiento del tamaño hidrodinámico del látex S5CS3 frente a la concentración de  $\text{NaNO}_3$  a pH 5 y 11. A este pH todos los grupos carboxílicos superficiales deben de estar desprotonados mientras que a pH 5 deben de estar protonados.



**Figura I.31.** Dependencia del diámetro hidrodinámico con la concentración de  $\text{NaNO}_3$  a pH 5 y 11 para el látex S5CS3.

A pH 5 se produce un descenso de 9 nm y se alcanza un diámetro mínimo de 202 nm, a pH 11 el descenso es de 50 nm y el diámetro mínimo es de 230 nm. Un descenso tan grande sólo puede ser atribuido a la contracción de cadenas oligoméricas altamente cargadas a pH 11. En la situación de máximo colapso el diámetro de la partícula sigue siendo 28 nm más grande que el valor obtenido por

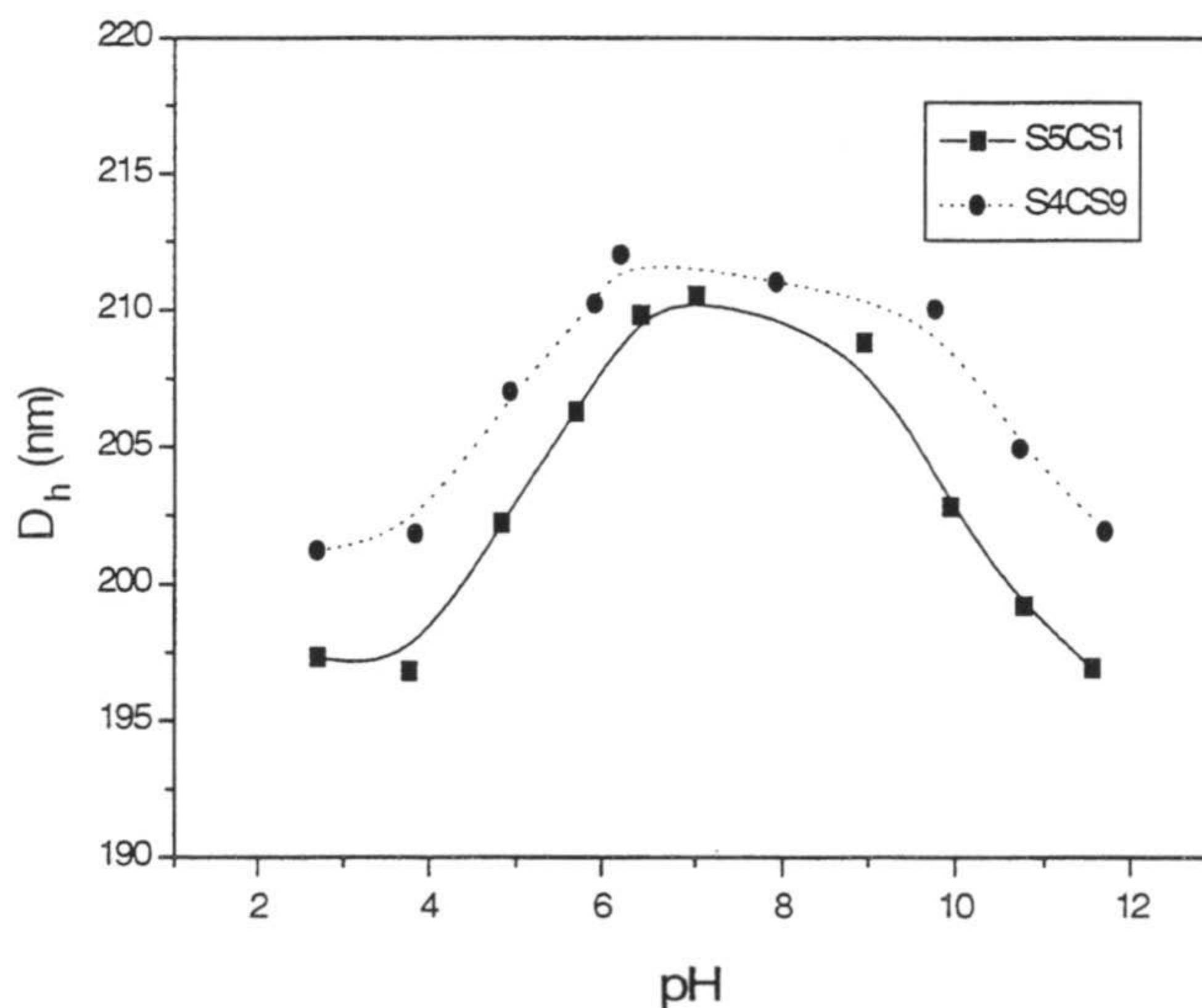
TEM. La superficie de las partículas a ambos pH puede venir representada por el esquema que aparece en la figura I.32.

La zona de subida de tamaño vuelve a aparecer a pH 11, pero ésta surge a una concentración de  $\text{NaNO}_3$  de 0.5 M mientras que a pH 5 es de  $5 \times 10^{-3}$  M, debido a que la cantidad de electrolito necesaria para colapsar las cadenas oligoméricas ha de ser mayor cuanto más cargadas se encuentren estas.



**Figura I.32.** Comportamiento de una partícula peluda con el pH.

Por otro lado, la disminución de tamaño con el aumento del pH dependerá de la densidad de carga del látex. En la siguiente figura se muestra la influencia del pH del medio sobre el diámetro hidrodinámico de los látex S4CS9 y S5CS1.



**Figura I.33.** Dependencia del diámetro hidrodinámico con el pH para los látex S4CS9 y S5CS1.

El patrón de comportamiento es semejante para ambos látex aunque el S5CS1 tenga una mayor densidad de carga. Para pHs comprendidos entre 6 y 9 el tamaño de los látex es prácticamente constante y máximo, produciéndose un incremento de cerca de 10 nm en el diámetro. Goossens (*Goossens et al., 1979, 1981*) y Zhao (*Zhao et al., 1996*) han observado un comportamiento similar para sistemas sintetizados con estireno y butadieno con grupos carboxilo en su superficie. Estos autores han indicado que cuando coexisten en una partícula grupos ácido fuerte y grupos ácido débil, o incluso cuando sólo hay grupos carboxilo, el tamaño no varía en el intervalo de pHs indicado.

Esta zona de pHs corresponde a la más baja fuerza iónica con lo que las cadenas están lo más extendidas posible. A ambos lados de esta zona la fuerza iónica aumenta y se produce su compresión.

El aumento de diámetro producido al pasar de pH 3 a pH 6 es semejante al que se obtuvo al estudiar el efecto de la fuerza iónica a pH 5 (ver figura I.28).

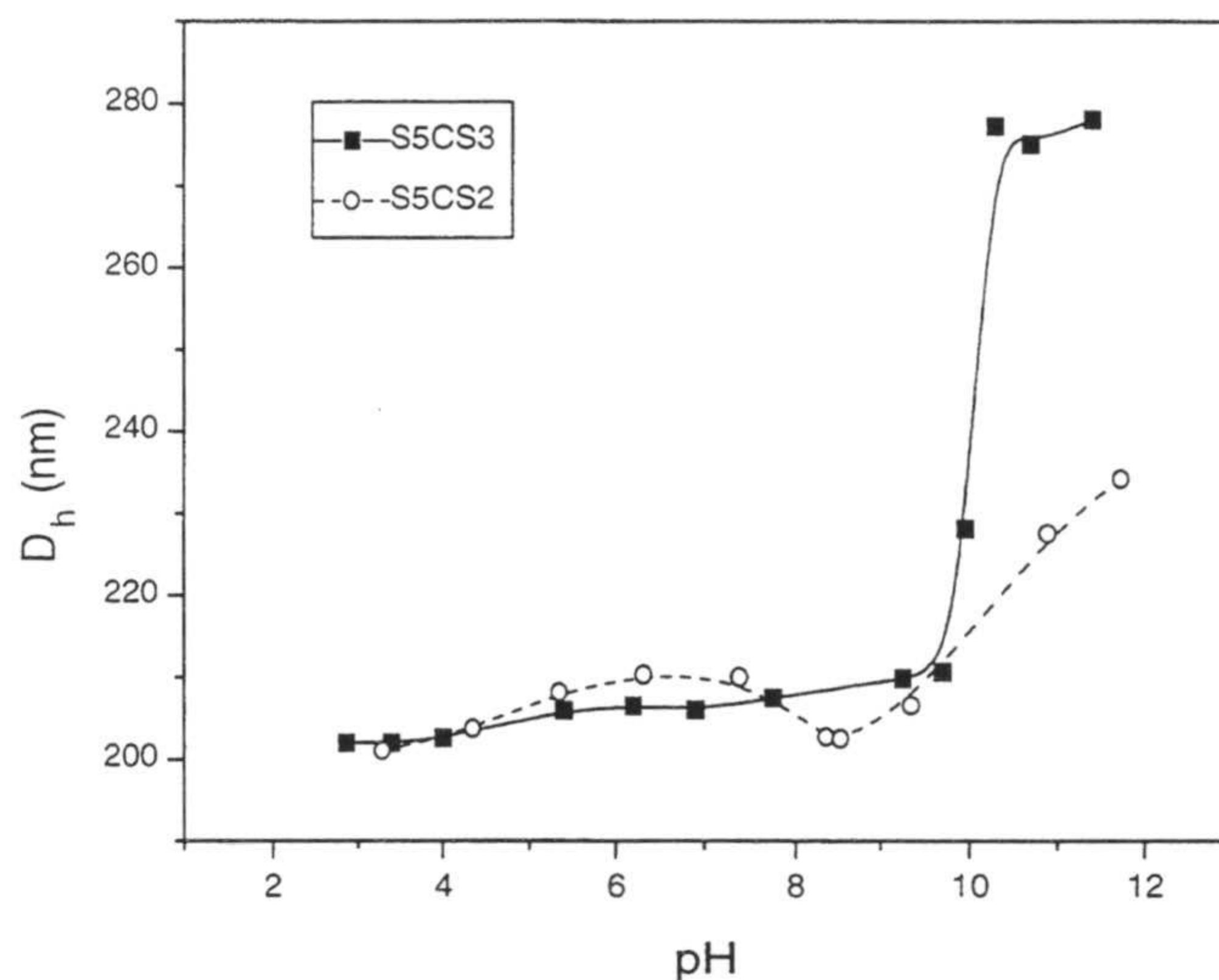
Al disminuir el pH del medio por debajo de 6 los grupos carboxilo se están protonando, además de producirse un aumento de la fuerza iónica, con lo que las cadenas oligoméricas se van colapsando. El látex S4CS9 presenta una cierta cantidad de grupos carboxilos originados por la reacción de Kolthoff en el proceso de síntesis, tal y como se apuntó en el apartado I.6 dedicado a la carga superficial. A pHs entre 2.5 y 4 los grupos carboxilos están protonados y el tamaño es constante y próximo al medido por TEM. A pH 11 cabe esperar que todos los grupos carboxilo estén desprotonados y el látex S5CS1 debe presentar cadenas oligoméricas. Sin embargo, este efecto se ve afectado por la compresión de las cadenas al aumentar la fuerza iónica. Por este motivo, su diámetro hidrodinámico coincide con los valores obtenidos a pHs ácidos.

El comportamiento obtenido para los látex con una elevada densidad de carga superficial de grupos carboxilo, S5CS2 y S5CS3 aparece en la figura I.34.

Hasta pH 9.5 el comportamiento del S5CS2 es semejante al del S4CS9 y al del S5CS1, produciéndose un incremento máximo de 9 nm a pH 7. El mismo aumento se produce en el S5CS3 aunque de forma progresiva hasta pH 9.5. A partir de este pH,

ambos látex experimentan un aumento brusco y progresivo con el pH, siendo mayor cuanto mayor es la densidad de carga.

Todos estos resultados nos hacen pensar en la existencia de una capa de oligómeros flexibles en la superficie de las partículas que han sido originados como consecuencia del proceso común de síntesis para los cuatro látex. Esta capa se extiende y contrae, en función de las condiciones de pH y concentración de electrolito del medio, unos 9 nm como media en diámetro.



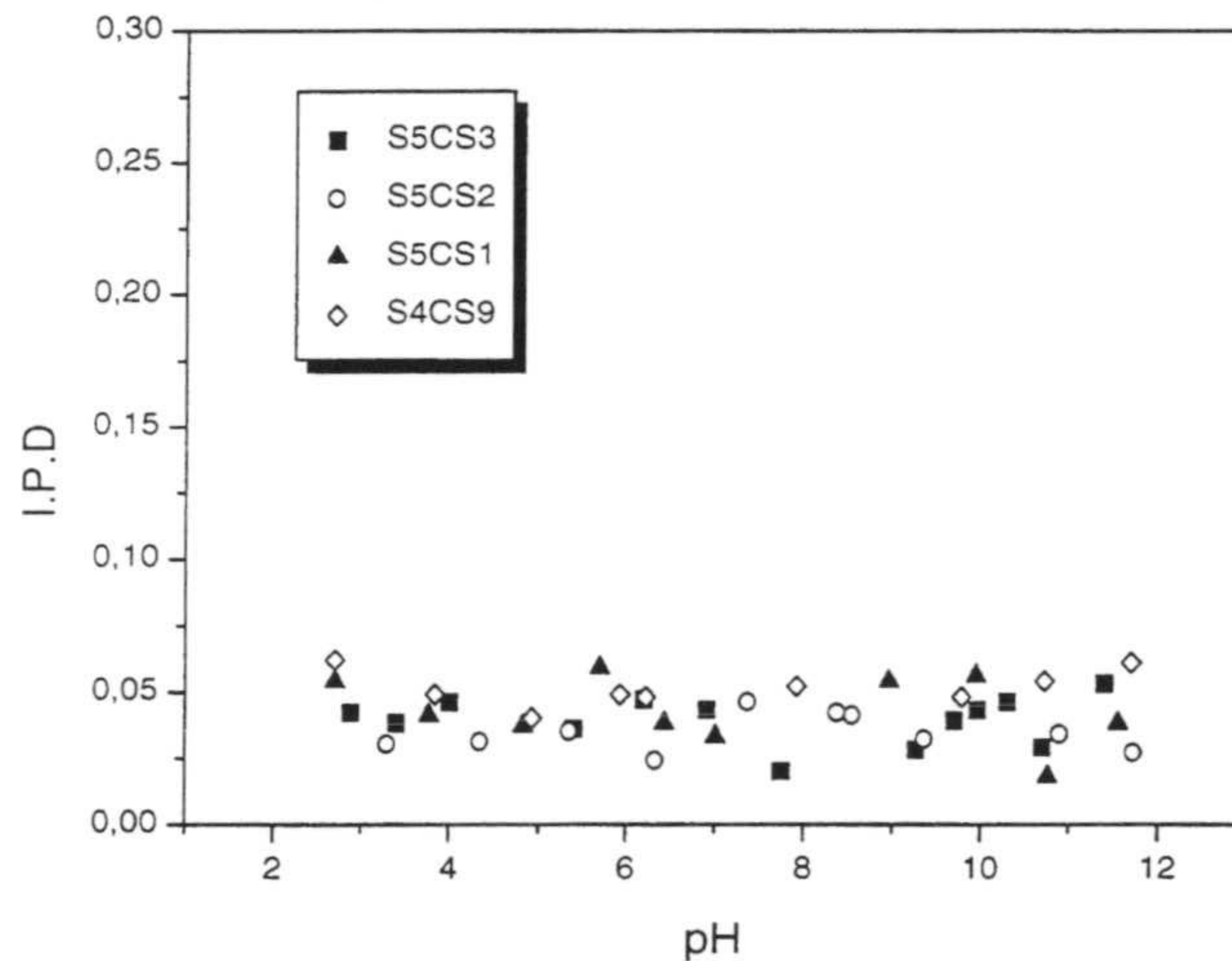
**Figura I.34.** Dependencia del diámetro hidrodinámico con el pH para los látex S5CS2 y S5CS3.

Sin embargo, cuando el látex tiene una elevada densidad de carga originada por los grupos carboxilo, a partir de pH 9.5 una segunda extensión de cadenas produce un aumento espectacular del diámetro hidrodinámico debido a la desprotonización masiva de los grupos carboxilo. Si el número de grupos carboxilo no es lo suficientemente grande, el aumento de fuerza iónica que conlleva el aumentar el pH producirá una compresión de las cadenas, tal y como le ocurría al S5CS1.

De los datos del índice de polidispersidad en función del pH se puede concluir que estos aumentos no se deben a la agregación del látex (figura I. 35).

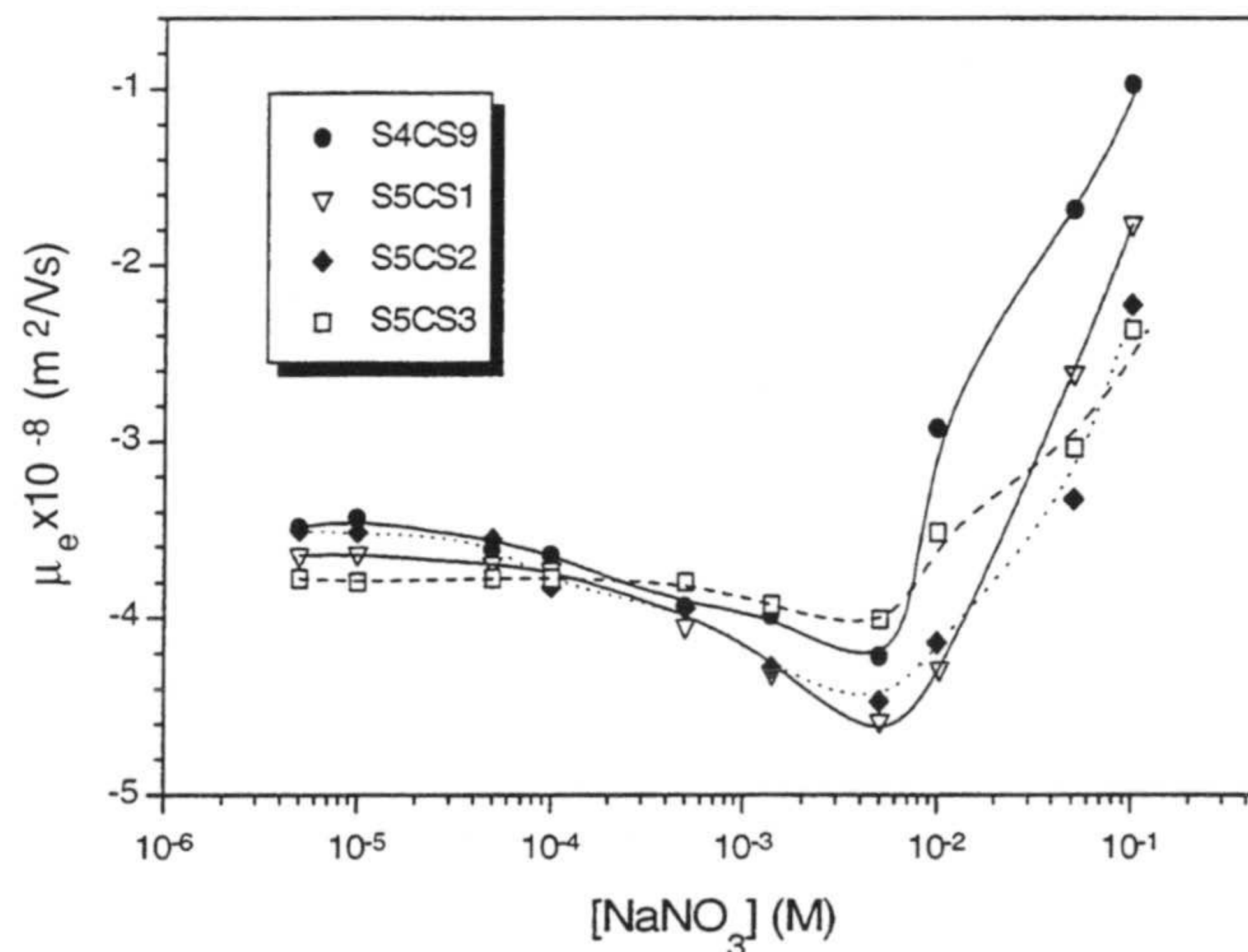
### 11.a. Comportamiento electroforético de los látex

La movilidad electroforética de un látex va a depender de la posición y valor del potencial eléctrico en el plano de deslizamiento. Estudiando el comportamiento electroforético en función del pH, la concentración y el tipo de electrolito del medio se puede acceder a información sobre la estructura de la interfase sólido-líquido.



**Figura I.35.** Índices de polidispersidad (I.P.D.) correspondientes a las medidas representadas en la figura I.33 y I.34.

La movilidad electroforética ( $\mu_e$ ) de los látex S4CS9, S5CS1, S5CS2 y S5CS3 fue medida a pH 5.5 en presencia de  $\text{NaNO}_3$  a diferentes concentraciones:



**Figura I.36.** Movilidad electroforética en función de la concentración de  $\text{NaNO}_3$ .



La movilidad electroforética comienza permaneciendo constante, a continuación aumenta con la concentración del electrolito hasta alcanzar un máximo (en valor absoluto), para terminar disminuyendo.

Este comportamiento no se ajusta al teórico que predice que el potencial  $\zeta$  debería disminuir al aumentar la fuerza iónica debido a la compresión de la doble capa eléctrica, lo cual se traduciría en un descenso continuo de la movilidad electroforética.

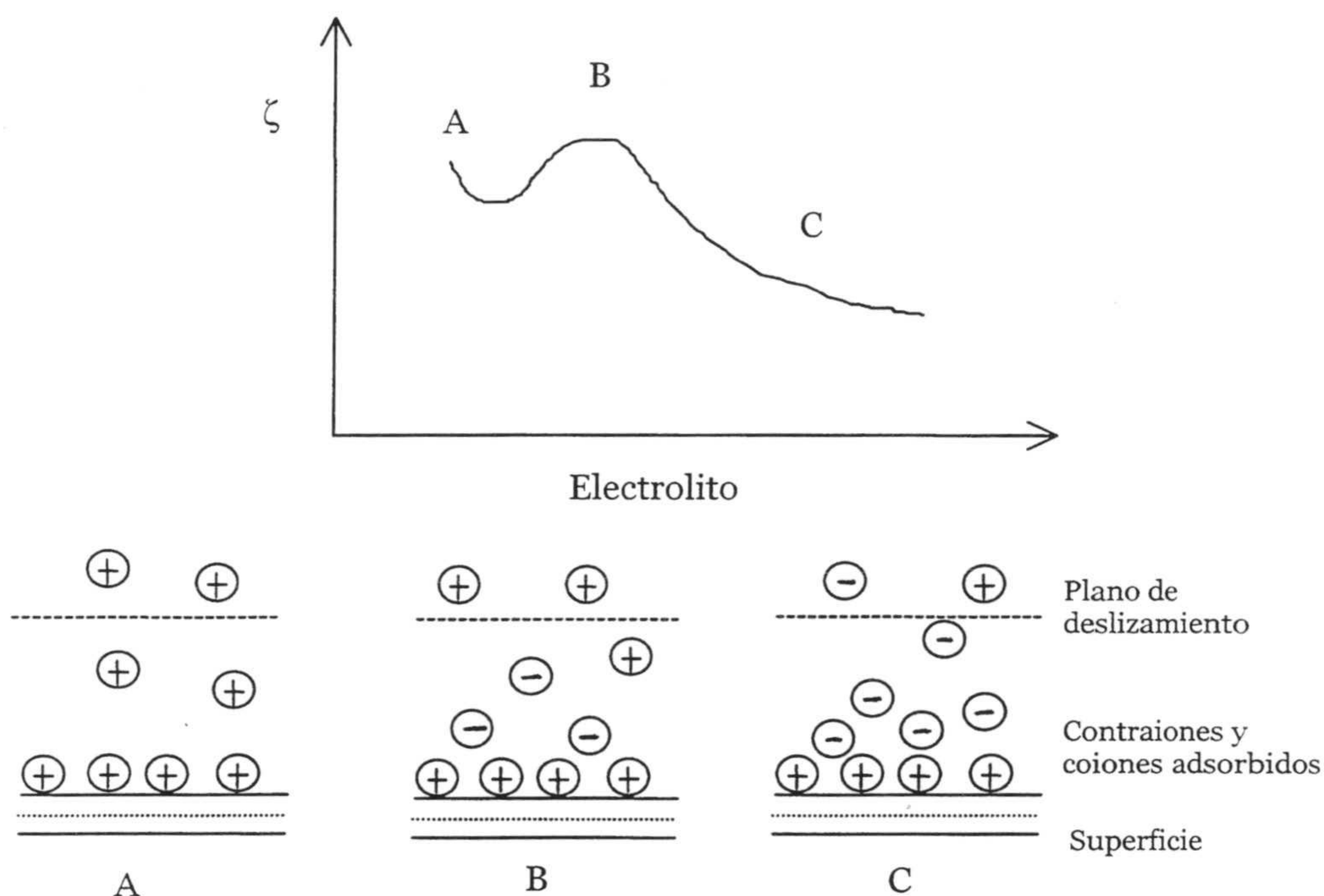
Esta dependencia de la movilidad electroforética con la fuerza iónica del medio para sistemas coloidales ha sido observada por numerosos autores y, aún hoy en día, origina un punto de controversia entre los científicos de la física del estado coloidal, pues todavía no existe una explicación satisfactoria que justifique la aparición de este máximo en la movilidad.

Existen varias teorías que intentan explicar la presencia de este máximo:

1. Adsorción preferencial de coiones (*Midmore et al., 1988; Elimelech et al., 1990b; Kamel et al., 1981; Voegtli et al., 1991*): Este mecanismo, que se propone para explicar cualitativamente el 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 (A); ii) a medida que aumenta la fuerza iónica hay una aproximación de coiones hacia la superficie causando un aumento del potencial electrocinético (B); iii) para altas concentraciones de electrolito se comprime la capa difusa de la doble capa eléctrica haciendo disminuir el potencial electrocinético (C). Estos procesos se esquematizan en la figura I.37. El modelo se basa en la distinta extensión en la adsorción de los contraiones y los coiones.

Este modelo presenta varias críticas, siendo la más importante el que no se conozca con claridad la fuerza que conduce a la adsorción de un coión simple e inerte sobre la superficie polimérica (*Zukoski et al., 1986b; Verdegan et al., 1993*). Por otra parte, este modelo no puede explicar la no influencia sobre la movilidad del coión existente en el medio. Midmore (*Midmore et al., 1988*) demostró que la movilidad

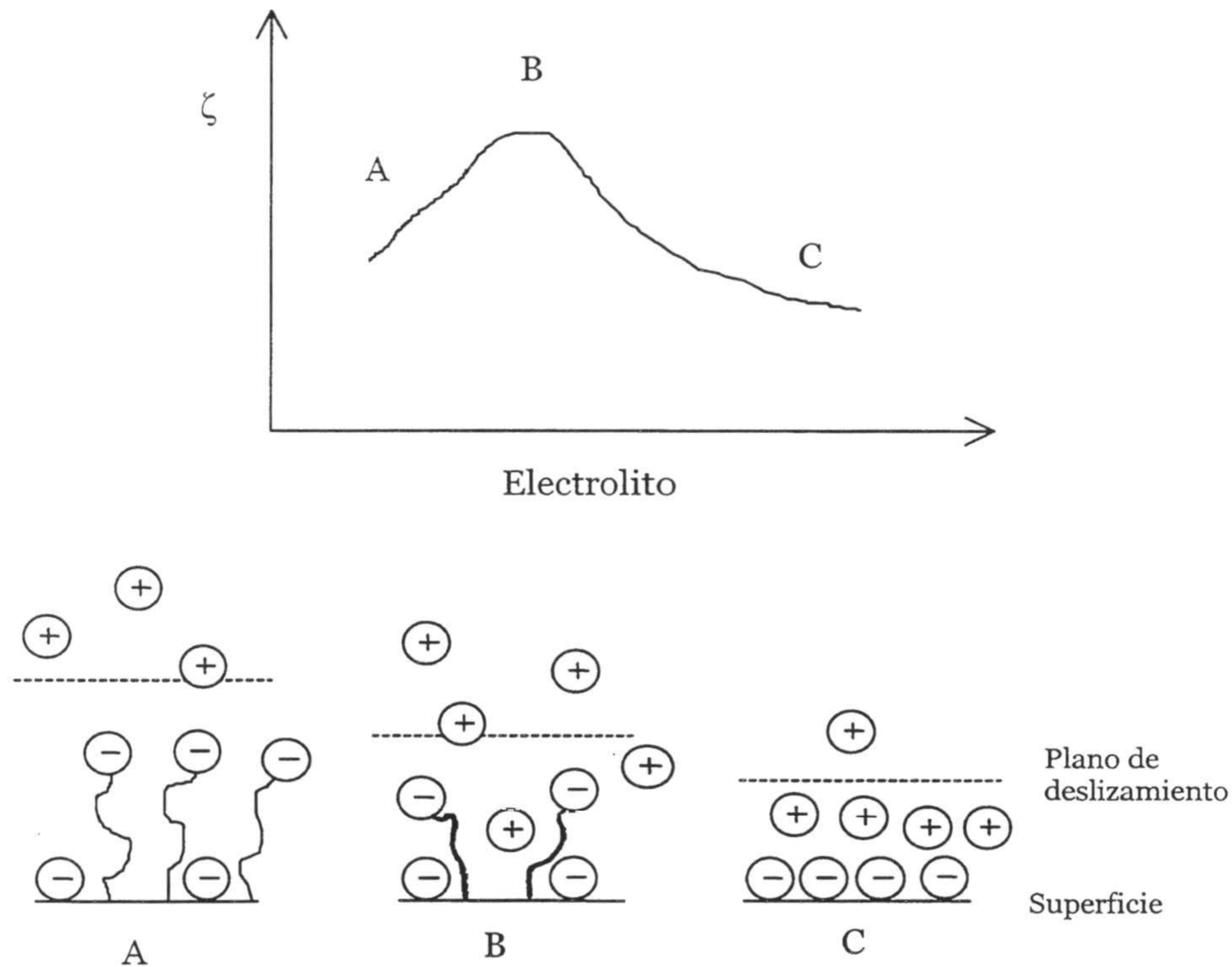
electroforética era la misma para un látex aniónico independientemente de que la sal fuera KF, KCl, KBr ó KI.



**Figura I.37.** Mecanismo de adsorción preferencial de coiones.

2. Capa de polielectrolitos extendida hacia la fase acuosa (“hairy layer” ó partículas peludas): Este modelo se basa en la hipótesis anteriormente expuesta de considerar que la superficie de la partícula coloidal no es completamente lisa, sino que existen cadenas de oligómeros con carga. A baja fuerza iónica estos oligómeros están extendidos hacia la fase acuosa, con lo que una fracción de la carga total de la partícula está localizada en la capa de Stern y/o en la capa difusa. El plano de deslizamiento se encuentra alejado de la superficie, siendo el potencial  $\zeta$  menor al que tendría la partícula si fuera lisa y con igual cantidad de carga (A). Al aumentar el contenido salino las cadenas colapsan hacia la partícula debido al apantallamiento, acercándose el plano de deslizamiento a la superficie y aumentando el potencial  $\zeta$  (B). A altas fuerza iónicas, se produce la compresión de la doble capa con la

consecuente disminución del potencial electrocinético (C). El esquema que aparece en la siguiente página resume los tres procesos que engloba este mecanismo.



**Figura I.38.** Mecanismo de hairy layer.

Las críticas que ha recibido este modelo provienen de la observación de un segundo máximo a concentraciones de electrolito muy bajas, que no puede ser explicado por este modelo (*Elimelech et al., 1990b; Prescott et al., 1993*). Por otra parte, Midmore (*Midmore et al., 1988*) ha estudiado la movilidad de un látex iónico en función de la concentración de KCl añadiendo una cantidad pequeña y constante de  $\text{La}^{3+}$ . Este catión se adsorbe fuertemente a la superficie del látex y debería colapsar las cadenas oligoméricas, desapareciendo el máximo. Sin embargo, este autor ha observado que el máximo no desaparece.

3. Conducción superficial anómala (*Dukhin et al., 1970, 1974; Chabalgoity et al., 1991; Hidalgo et al., 1992; Martín et al., 1995*): en un proceso electrocinético podemos diferenciar dos mecanismos de conducción eléctrica de iones: i) transferencia tangencial de cargas a través de la porción más fluida de la doble capa eléctrica y ii) movimiento tangencial de cargas en la capa comprendida entre el plano de deslizamiento y la superficie sólida (conducción superficial anómala). A baja fuerza iónica, se dará el proceso de conducción superficial anómala en mayor medida, como consecuencia de ser mayor la distancia entre la interfase sólido-líquido y el plano de deslizamiento. Esto se traduce en una disminución de la movilidad electroforética.

Conforme va aumentando la concentración salina, la movilidad aumenta hasta alcanzar un máximo, a partir del cual, el efecto de la compresión de la d.c.e. cada vez tiene más importancia y comienza a disminuir la movilidad. Este modelo también ha sido ampliamente criticado (*Russell et al., 1995*).

Ninguno de estos modelos por sí solos son capaces de explicar todos los resultados experimentales que existen en la bibliografía. Algunos autores defienden que los tres mecanismos coexisten simultáneamente en el coloide (*Goossens et al., 1981; Rosen et al., 1992*).

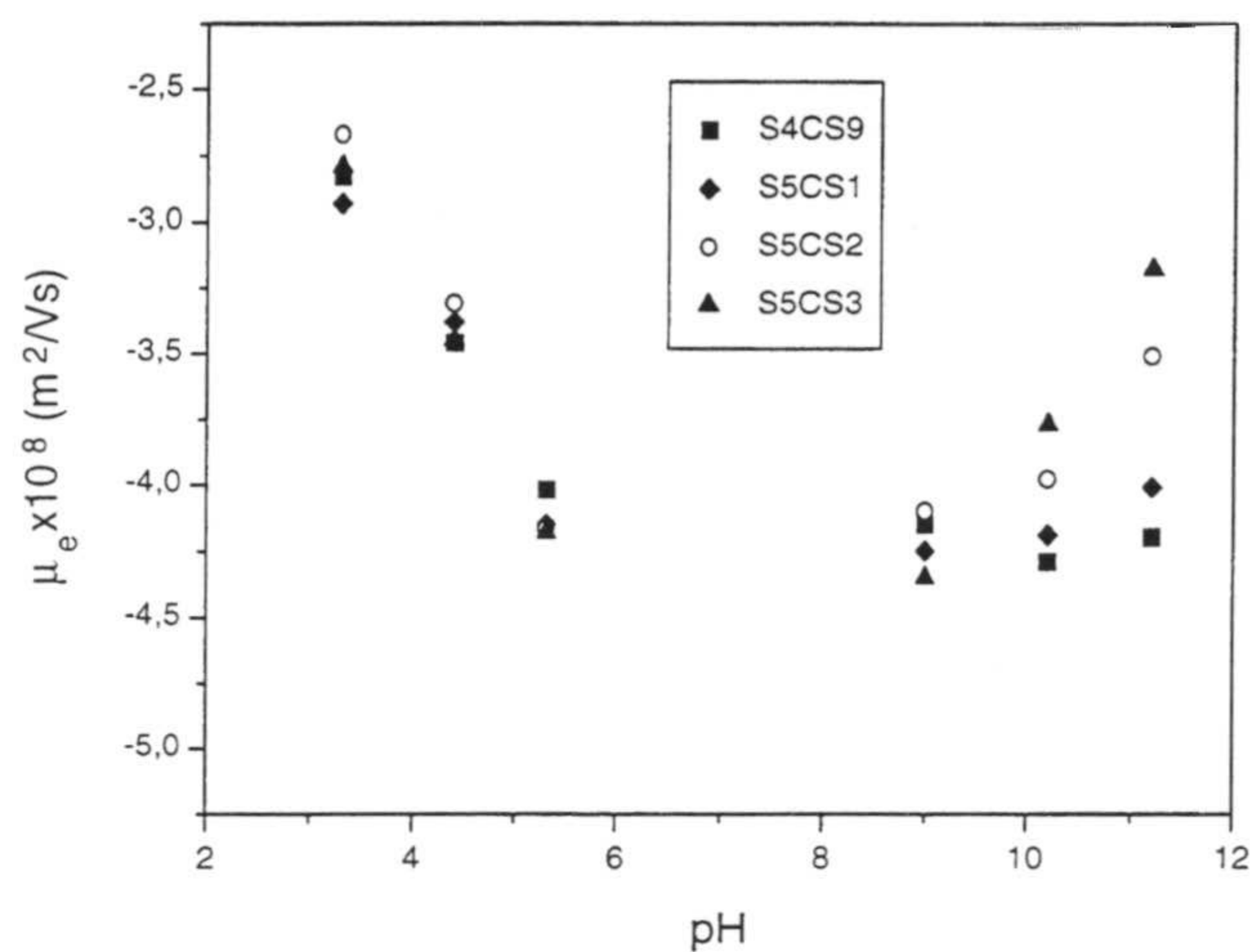
Los resultados comentados anteriormente sobre medidas realizadas de los diámetros hidrodinámicos de los látex S4CS9, S5CS1, S5CS2 y S5CS3 han sugerido la existencia de cadenas oligoméricas sobre la superficie de estas partículas. Así pues, en principio, se puede asumir el modelo de "hairy layer" para explicar las medidas de movilidad electroforética en función de la fuerza iónica de estos látex (figura I.36). Esta hipótesis adquiere peso si observamos que la concentración de electrolito a la cual aparece el máximo de movilidad es de  $5 \times 10^{-3}$  M, que es la misma concentración para la que el diámetro de las partículas alcanzaba el mínimo (figura I.28). A esta concentración las cadenas de polielectrolito se encuentran colapsadas, estando el plano de deslizamiento próximo a la superficie y aumentando la movilidad electroforética. A partir de esa concentración de electrolito la doble capa se va comprimiendo y la movilidad empieza a bajar. Esta bajada es más acusada cuando menor es la densidad de carga del látex (sistema S4CS9), tal y como cabría esperar.

El látex S4CS9 es el látex con menor cantidad de cadenas oligoméricas en su superficie, ya que fue sintetizado sin ácido metacrílico y su máximo es uno de los menos acusados. Los látex S5CS1 y S5CS2 presentan un máximo parecido entre sí y mayor al del S4CS9 pues su superficie es más “peluda”. Sin embargo, el látex S5CS3, que debería presentar el mayor máximo según este modelo de “hairy layer”, es el que presenta el comportamiento más ideal. Una posible explicación se podría encontrar si suponemos que el modelo de conducción anómala superficial es compatible con el modelo de “hairy layer”. En este caso, el aumento en la movilidad por la fuerza iónica tiene dos contribuciones: 1) las cadenas de oligómeros cargados se van comprimiendo, con lo que el plano de deslizamiento se acerca a la superficie; 2) la conducción anómala superficial existente en la región comprendida entre la superficie y el plano de deslizamiento disminuye. Ambos efectos producen un aumento en la movilidad electroforética y no tienen por qué ser excluyentes. Pero, si la densidad de cadenas oligoméricas es grande (caso del látex S5CS3), existe un impedimento estérico al paso de iones a través de la zona intermedia donde se produce la conducción anómala superficial. En este caso, una de las dos causas que producía el aumento de movilidad desaparece, y en consecuencia el aumento neto es menor que el de los látex S5CS1 ó S5CS2, que no tienen tanta densidad de cadenas en la superficie. Como estamos viendo, es difícil explicar este conjunto de resultados de movilidad en función de un sólo modelo.

También, se ha estudiado el efecto del pH del medio sobre la movilidad electroforética de estos látex. Los resultados obtenidos aparecen en la figura I.39.

El pH era ajustado con NaOH/HCl. No se han utilizado tampones para evitar la existencia de iones que pudieran adsorberse específicamente sobre las partículas. Para la zona de pHs comprendida entre 6 y 8 no se pudieron obtener datos experimentales porque la fuerza iónica del medio es muy baja y las medidas de movilidad electroforética no son fiables ni reproducibles.

La movilidad electroforética es similar para los cuatro látex en la zona ácida. En esta zona, la movilidad aumenta en valor absoluto como consecuencia de la desprotonación de los grupos carboxilos existentes en la superficie de las partículas conforme el pH aumenta.



**Figura I.39.** Movilidad electroforética en función del pH.

Un comportamiento distinto se observa a pHs básicos donde la movilidad disminuye al aumentar el pH del medio (sistemas S5CS2 y S5CS3) o permanece prácticamente constante (látex S4CS9 y S5CS1). Estos dos últimos látex están completamente desprotonados y la movilidad es independiente del pH del medio.

Si miramos la figura I.34 donde se estudió el efecto del pH sobre el diámetro hidrodinámico de los látex S5CS2 y S5CS3, éste comenzaba a aumentar bruscamente a partir de pH 10. Esta extensión de las cadenas de polielectrolito produce un alejamiento del plano de deslizamiento de la superficie, disminuyendo con ello la movilidad electroforética. Esta disminución es mayor para el látex más cargado.

#### 11.b. Efecto del calentamiento de los látex sobre la "hairy layer"

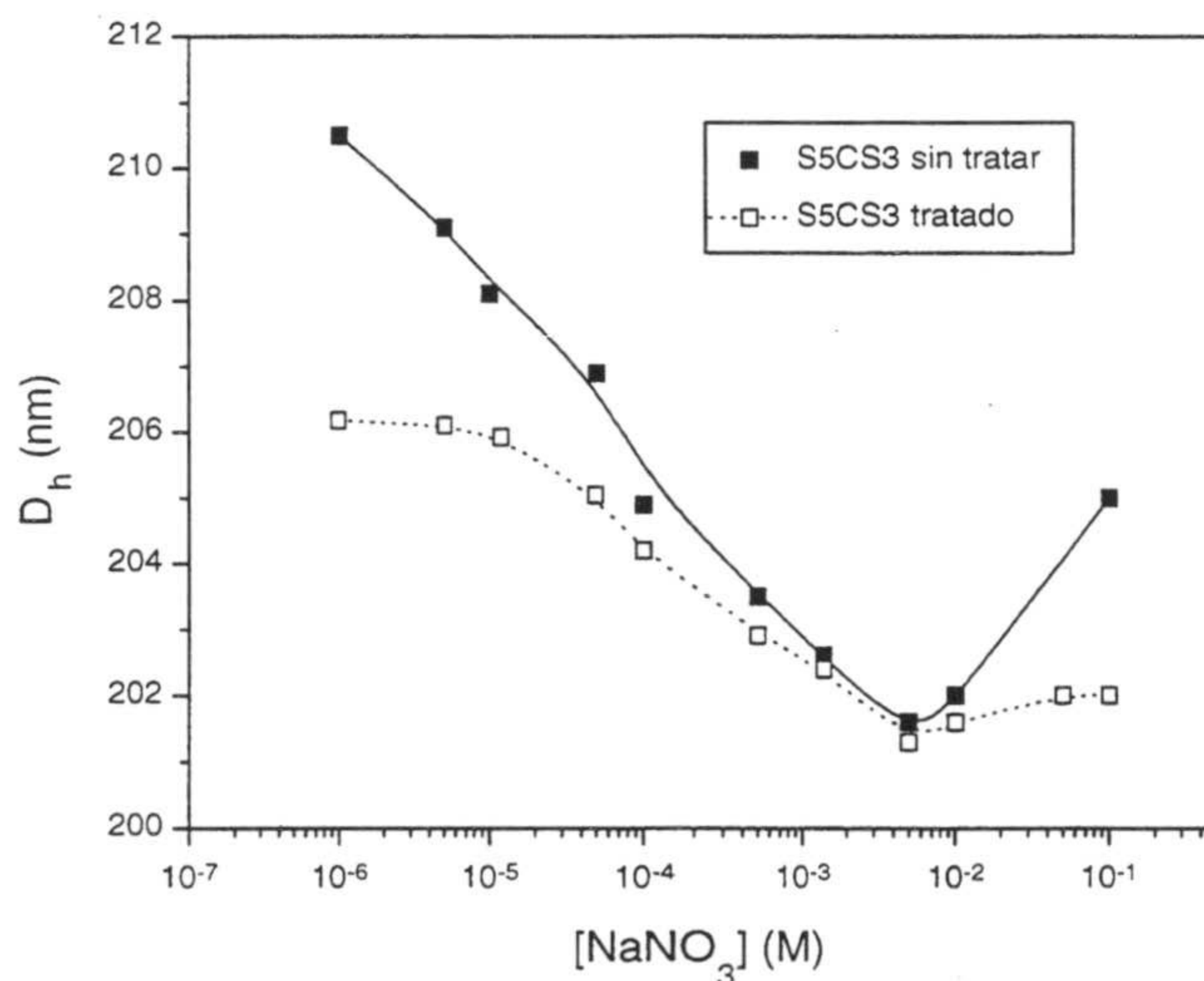
Si una partícula presenta cadenas oligoméricas en su superficie, un tratamiento térmico debería alterar la estructura de esta capa peluda, bien colapsando las cadenas o eliminándolas. Cualquier cambio estructural de este tipo debe influir en las propiedades superficiales de la partícula. Por ejemplo, si el tamaño hidrodinámico de una partícula con cadenas oligoméricas disminuía con la fuerza iónica (tal y como se ha comprobado), después del tratamiento térmico su diámetro debería de ser independiente del contenido salino del medio (*Polverari et al., 1994*).

Por otro lado, el máximo en la movilidad electroforética que predice el modelo "hairy layer" debería desaparecer tras el calentamiento del látex (Chow *et al.*, 1988).

Con el fin de comprobar si estos látex carboxílicos presentan una superficie tipo "hairy layer", una muestra del sistema S4CS9 y otra del S5CS3 se calentaron a una temperatura de 120°C en un tubo de vidrio tipo autoclave durante 20 horas. Esta temperatura fue elegida porque es superior a la temperatura de transición vítrea del poliestireno (Chow *et al.*, 1988).

Finalizado el tratamiento térmico, y tras un periodo de enfriamiento, se realizaron las siguientes medidas.

En primer lugar se determinó la dependencia del diámetro hidrodinámico del látex S5CS3 tratado térmicamente a pH 5 en función de la concentración de  $\text{NaNO}_3$ . En la figura I.40 se presentan estos junto a los obtenidos previamente para el látex sin tratar con el fin de poder compararlos.



**Figura I.40.** Diámetro hidrodinámico en función de la concentración de  $\text{NaNO}_3$  para el látex S5CS3 tratado y sin tratar térmicamente.

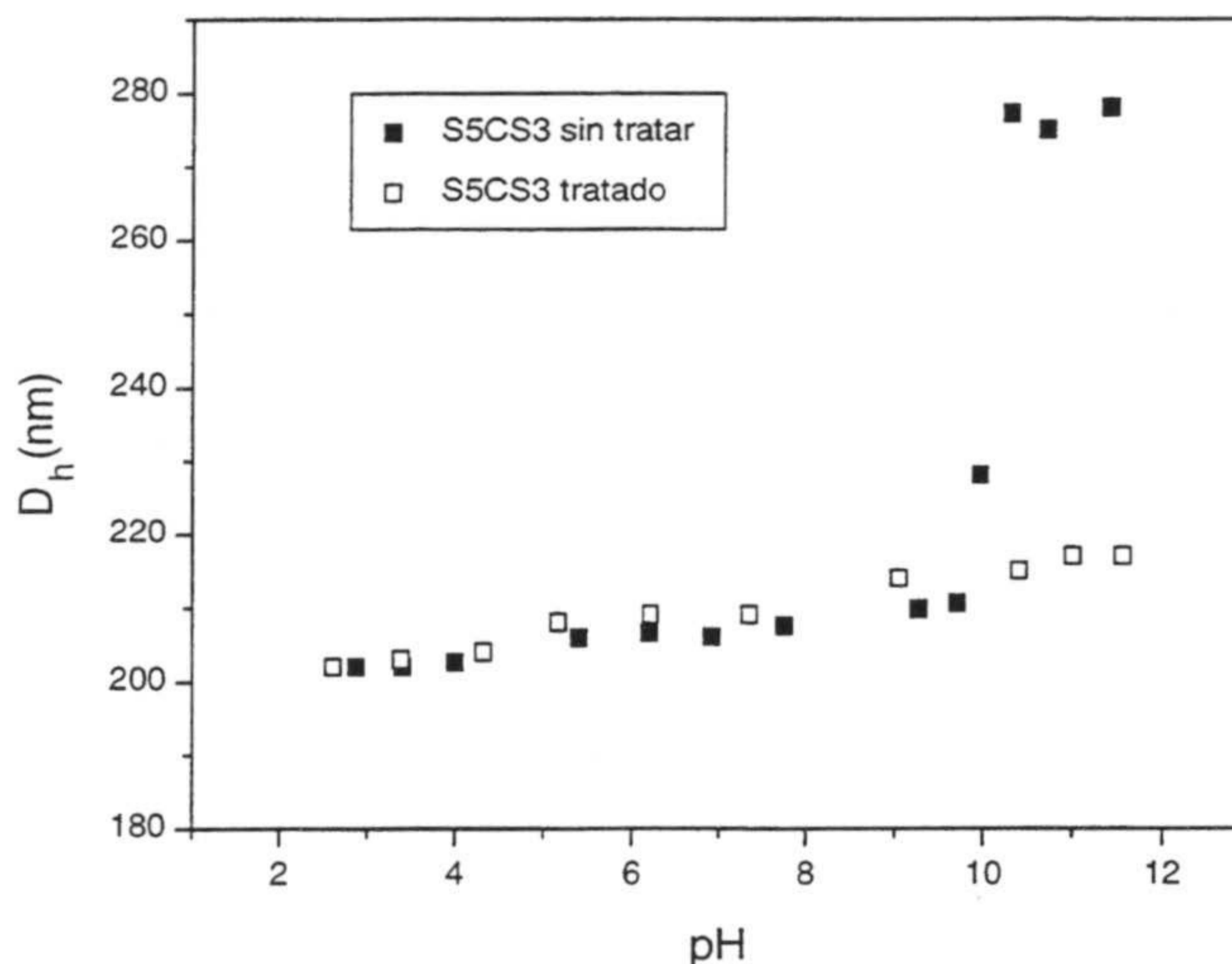
El descenso de tamaño debido al aumento de la fuerza iónica es menor para la muestra que ha sido tratada térmicamente. Este tratamiento ha podido destruir ó colapsar parcialmente las cadenas oligoméricas existentes en la superficie. El mínimo tamaño se alcanza a la misma concentración de sal, y a partir de esa concentración el tamaño permanece prácticamente constante para el látex calentado.

El aumento de tamaño que experimenta el látex sin tratar a partir del mínimo se explicó anteriormente por la existencia de adsorción de coiones. Al calentar la muestra, ésta es menos hidrofílica no habiendo ya adsorción de coiones. De esta forma su comportamiento es similar al que presentaba el látex S4CS9 o el látex S5CS1.

Posiblemente la destrucción por calentamiento de las cadenas oligoméricas no sea total, tal y como apuntan algunos autores (Polverari et al., 1994).

El mismo estudio se ha realizado para el látex S4CS9, obteniéndose que su tamaño era independiente de la concentración de  $\text{NaNO}_3$  en un valor de 203 nm.

En la siguiente figura aparece la dependencia del tamaño del látex S5CS3 tratado térmicamente y sin tratar con el pH del medio. Se puede llegar a una conclusión parecida al caso de la dependencia con la fuerza iónica. Al calentar las partículas coloidales se produce un "suavizado parcial" de su superficie no apareciendo el incremento brusco de tamaño a pH 10. Evidentemente, esta alteración de la superficie de las partículas debe afectar a su comportamiento electrocinético.

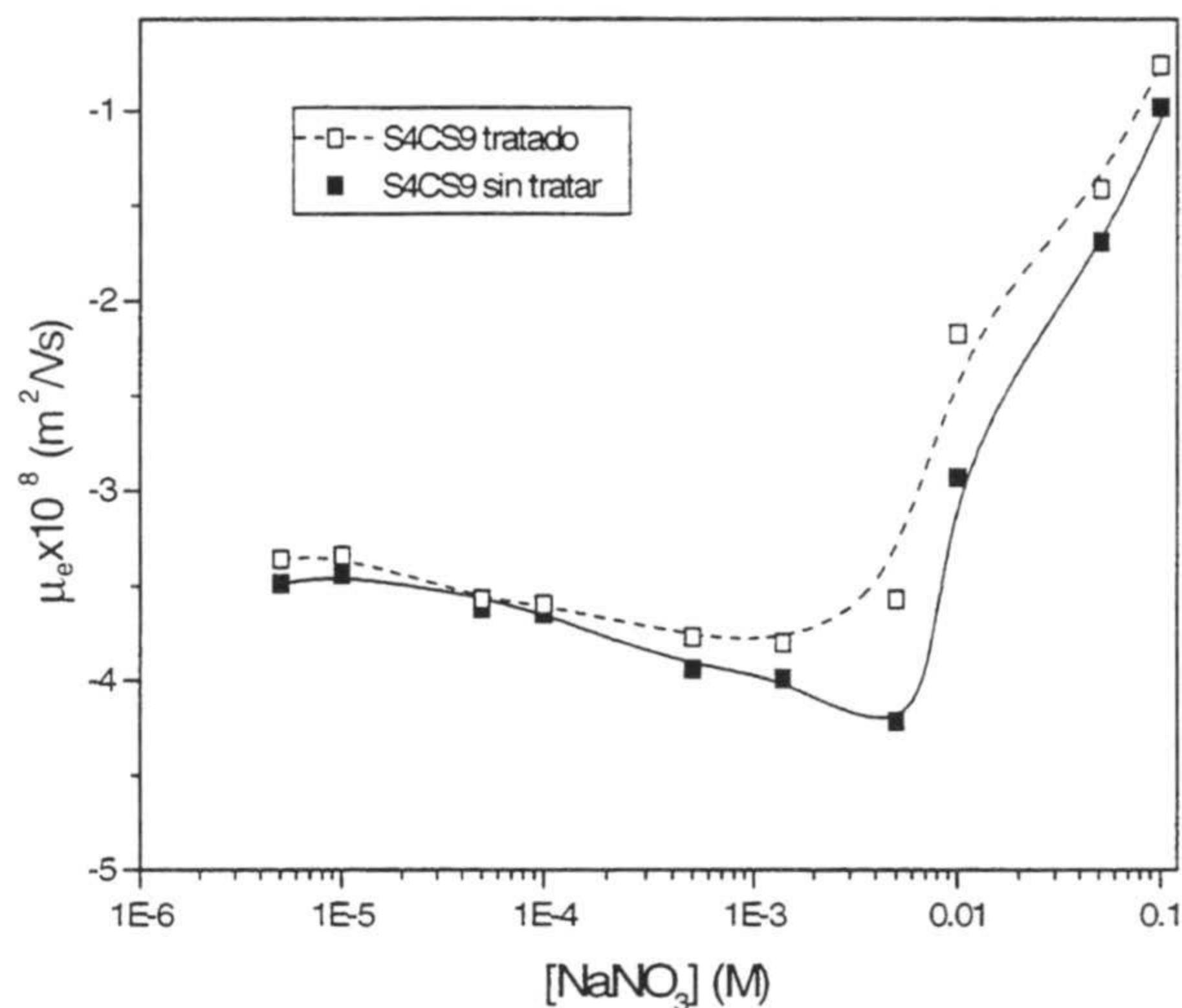


**Figura I.41.** Diámetro hidrodinámico en función del pH para el látex S5CS3 tratado y sin tratar térmicamente.

Así por ejemplo, en la figura I.42 se puede observar que el máximo en la movilidad electroforética que presentaba el látex S4CS9 sin tratar, prácticamente ha desaparecido si el látex ha sido calentado. La aparición del máximo la habíamos

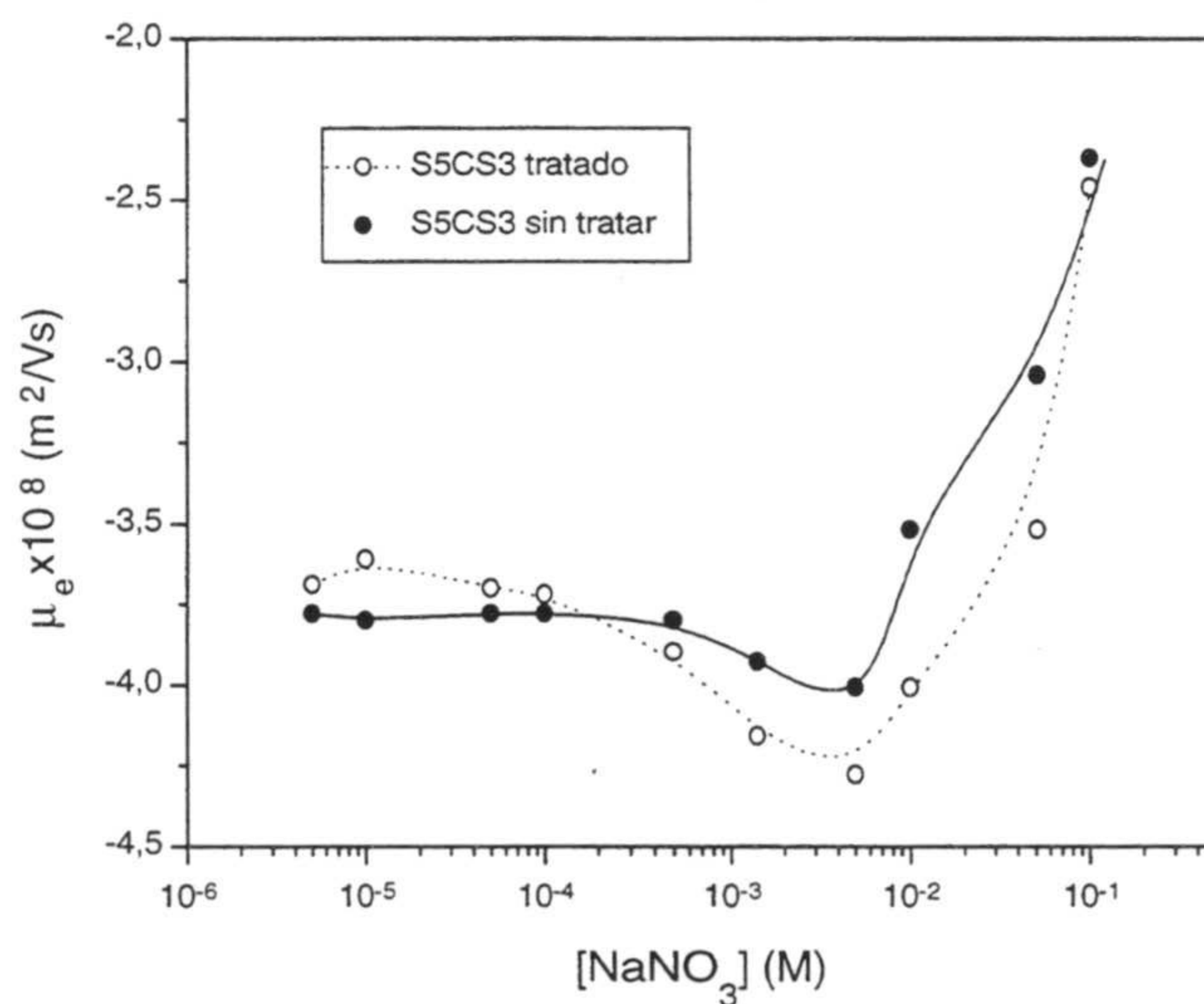


explicado anteriormente a través del modelo de "hairy layer". Al eliminarse parte de las cadenas superficiales, el máximo llega a desaparecer.



**Figura I.42.** Movilidad electroforética en función de la concentración de  $\text{NaNO}_3$  para el látex S4CS3 tratado y sin tratar térmicamente.

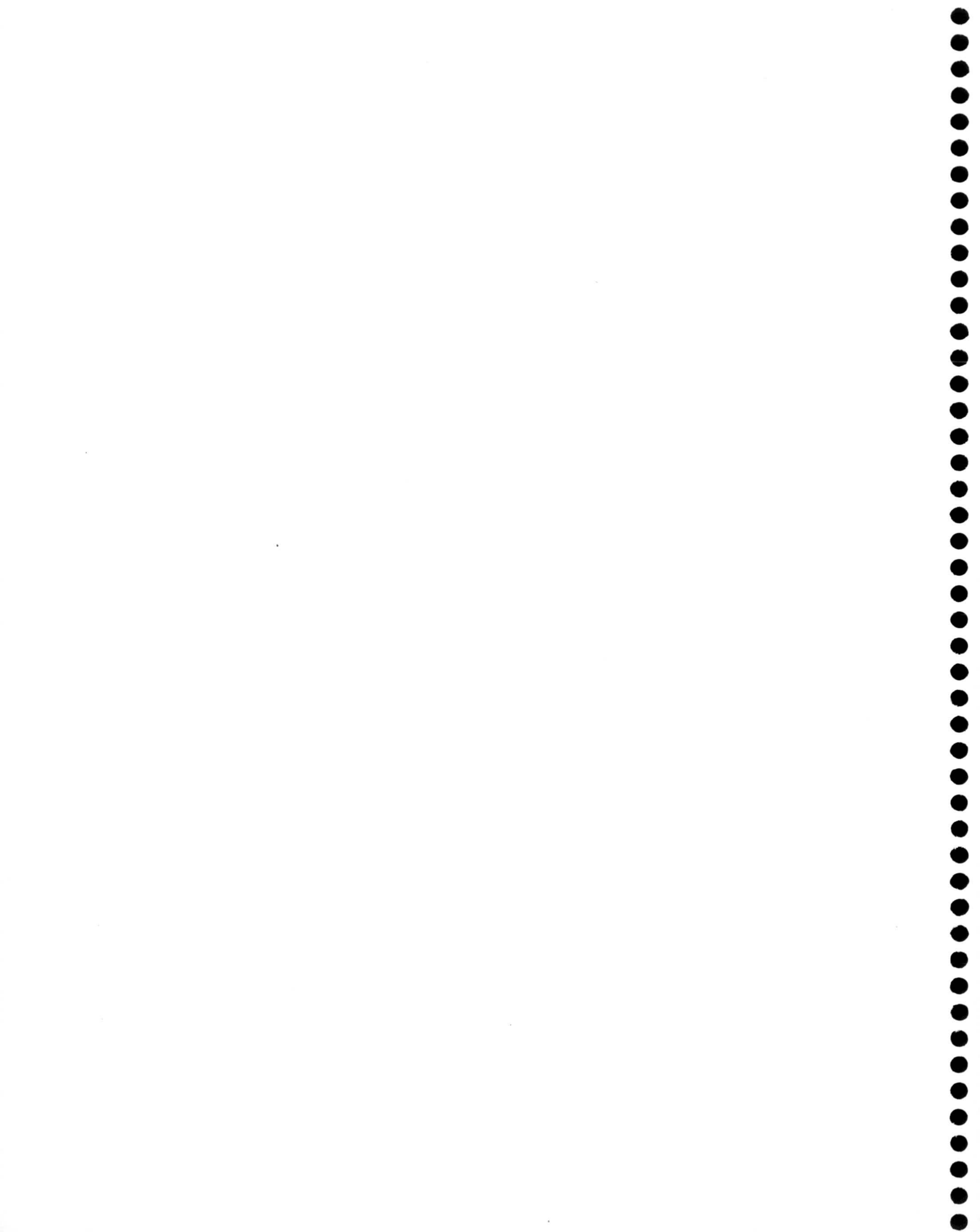
Sin embargo, para el caso del S5CS3 se ha obtenido que la muestra calentada presenta un máximo más acusado que la muestra no tratada (figura I.43).



**Figura I.43.** Movilidad electroforética en función de la concentración de  $\text{NaNO}_3$  para el látex S5CS3 tratado y sin tratar térmicamente.

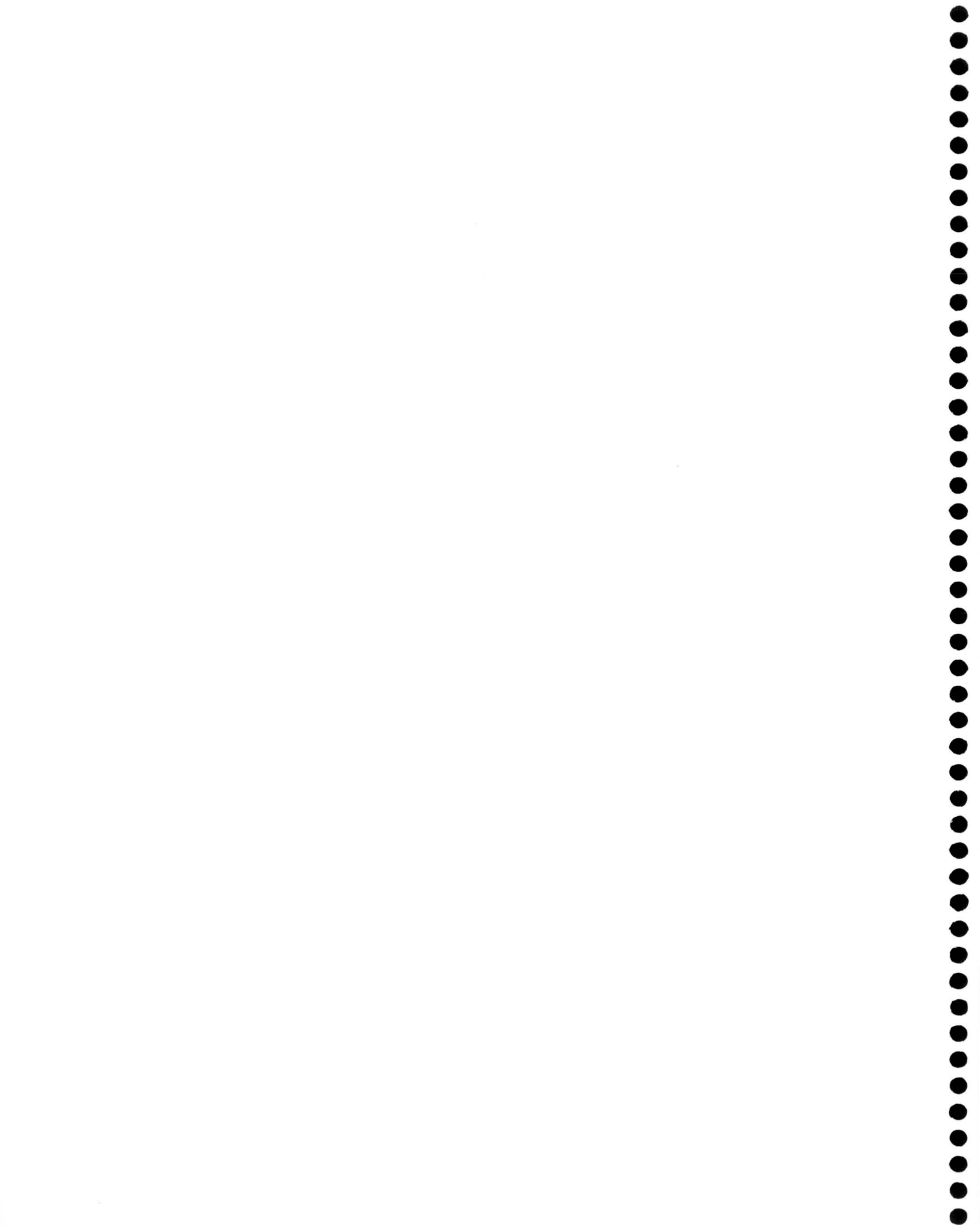
Con anterioridad se vio que este látex era el que presentaba el máximo menos atenuado de los cuatro látex. La explicación que dimos se basaba en que tanto el modelo de "hairy layer" como la conducción superficial anómala eran responsables de la aparición del máximo, y que ésta última aportación era pequeña en este látex debido a la elevada densidad de cadenas que debe presentar en su superficie. Si se calienta el látex, esta densidad disminuye, con lo que la contribución de la conducción anómala al aumento de la movilidad se ve incrementada presentando así el látex una superficie más parecida a la del látex S5CS2 o el S5CS1, que eran los que presentaban un mayor máximo.

Como conclusión definitiva se puede decir que estos látex no pueden ser utilizados como coloides modelo, pues su superficie no es lisa.



# Capítulo III

**Estabilidad coloidal de  
sistemas liofóbicos: teoría  
DLVO**



## 2 Estabilidad coloidal de sistemas liofóbicos: teoría DLVO

### 1. Introducción

Una característica fundamental de las dispersiones coloidales es la existencia de un gran área de contacto entre la fase dispersa y el medio de dispersión. La energía libre de Gibbs ( $G$ ) asociada a la creación de este área ( $A$ ) es elevada ( $dG=\gamma dA$ , donde  $\gamma$  es la tensión interfacial), por lo que el sistema coloidal tenderá espontáneamente hacia la agregación para disminuir su área. Ahora bien, si entre dos partículas que se aproximan entre sí existe una barrera energética superior a su energía cinética ( $k_B T$ ), el sistema permanecerá cinéticamente estable. El valor de dicha barrera dependerá de las interacciones que van a surgir entre las dos partículas, dentro de las cuales siempre se darán:

- Interacción atractiva tipo van der Waals, que favorece la agregación.
- Interacción repulsiva electrostática, que surge por el solapamiento de la doble capa eléctrica de ambas partículas y tiende a mantener el sistema discreto.

Una clasificación ampliamente aceptada de los coloides los divide en dos grandes grupos: coloides liofóbicos y coloides liofílicos. En este último caso la afinidad de la superficie por el medio de dispersión es alta, mientras que en el primero la afinidad es baja.

La estabilidad coloidal de un sistema liofóbico viene controlada sólo por la carga eléctrica de la partícula. Así pues, la interacción atractiva de van der Waals y la repulsiva electrostática determinarán su estabilidad coloidal.

En el caso de un sistema liofílico, la estabilidad dependerá de la carga eléctrica y de la solvatación de la partícula. Por lo tanto una nueva interacción puede aparecer en estos sistemas debido a su afinidad por el medio de dispersión.

Otro tipo de interacción, la estérica, puede surgir si las partículas coloidales están recubiertas de algún polímero.

En este capítulo nos vamos a centrar en la estabilidad coloidal de sistemas liofóbicos, aplicando la teoría propuesta independientemente por Derjaguin y Landau (*Derjaguin y Landau, 1941*) y Verwey y Overbeek (*Verwey y Overbeek, 1948*).

Antes de abordar el tema de la estabilidad coloidal es necesario elegir un método experimental adecuado para poder cuantificar la estabilidad de un sistema. En este caso se ha elegido un método basado en una de las propiedades más características de las suspensiones coloidales: la dispersión de luz.

## **2. Dispersión de luz a ángulos pequeños**

Existen diferentes técnicas para seguir un proceso de agregación y obtener información acerca de su cinética, dentro de las cuales hay un grupo que se basa en la dispersión estática de luz.

Cuando un haz de luz incide sobre una partícula sufre una serie de fenómenos: dispersión, reflexión, absorción y transmisión. Como consecuencia se produce una atenuación de la intensidad de luz incidente tras atravesar la suspensión. Aplicando el principio de conservación de la energía, esta atenuación o extinción debe ser igual a la energía absorbida más la dispersada. Cuando las partículas dispersoras no absorben, como ocurre en el caso de suspensiones de poliestireno, la disminución de energía es debida sólo a la dispersión.

En un experimento de dispersión de luz el detector puede estar colocado:

- Enfrente de la fuente de luz (turbidimetría), es decir, formando un ángulo de cero grados respecto a la dirección del haz incidente. Con esta configuración se realizará una medida de la luz transmitida. Conociendo la intensidad incidente y la transmitida se puede determinar la turbidez de la muestra.

- Formando un ángulo  $\theta$  con respecto a la dirección incidente (nefelometría). Se está midiendo la luz dispersada por la muestra a ese ángulo.

A lo largo de un proceso de agregación las partículas dispersoras pasan de ser simples esferas de un tamaño definido a agregados de morfologías muy variadas. Como la intensidad dispersada por una partícula es directamente proporcional al tamaño de la misma, cabe esperar que a lo largo de un proceso de agregación dicha intensidad vaya aumentando conforme aumenta el tamaño de los agregados.

La relación existente entre la dispersión y el tamaño del dispersor viene a ser explicada por diferentes teorías. La más antigua fue propuesta por Rayleigh (*Rayleigh, 1899*), partiendo de las siguientes hipótesis:

- El tamaño de la partícula es pequeño comparado con la longitud de onda del haz incidente, concretamente el radio debe ser inferior a  $\lambda/20$ .

- El campo eléctrico en el que está inmersa la partícula, considerada como isotrópica, es homogéneo.

- La partícula ha de ser esférica y el campo eléctrico dentro de la misma uniforme y paralelo al campo eléctrico externo.

Bajo estas hipótesis se puede obtener que, para un haz incidente sin polarizar, la intensidad dispersada por  $N$  partículas idénticas por unidad de volumen para un ángulo  $\theta$  vale:

$$I_{\theta} = \frac{I_0 9\pi^2 NV^2}{2r^2 \lambda^4} \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 1} \right)^2 (1 + \cos^2 \theta) \quad (\text{II.1})$$

donde  $I_0$  es la intensidad incidente,  $V$  el volumen de la partícula,  $r$  la distancia desde la partícula al detector y  $n$  el índice de refracción relativo, definido como el cociente entre el índice de refracción de la partícula y el del medio.

Cabe resaltar la dependencia de la intensidad dispersada con el cuadrado del volumen de la esfera.

Evidentemente esta teoría no nos permite conocer la variación temporal de la dispersión de luz a lo largo de la agregación. Una vez que comience el proceso, las partículas responsables de la dispersión dejan de ser esféricas. Aún en el caso de que



podamos suponer que la morfología de los agregados es semejante a la esférica, el tamaño de los mismos será tan grande que la teoría tampoco se podrá cumplir.

Rayleigh, Gans y Debye propusieron una teoría que puede ser aplicada a partículas de cualquier geometría siempre y cuando se cumplan estas tres condiciones (*Kerker, 1969*):

1.

$$\frac{4\pi a}{\lambda} |n-1| \ll 1 \quad (\text{II.2})$$

Esta condición indica que la onda incidente no sufre un cambio de fase o amplitud apreciable tras interaccionar con la partícula de radio  $a$ .

2. El valor del índice de refracción relativo,  $n$ , debe ser próximo a 1:

$$|n-1| \ll 1 \quad (\text{II.3})$$

Esta condición puede ser interpretada como que la onda incidente se refleja poco en la superficie de la interfase partícula-medio.

3. El tamaño de la partícula es comparable con la longitud de onda.

Esta teoría se basa en suponer que se puede dividir el volumen de la partícula en pequeños elementos  $dV$ , de forma que se considera a cada uno de estos diferenciales como dispersores tipo Rayleigh. Tras un proceso de integración se calcula la dispersión para todo el volumen  $V$ , suponiendo que la existencia de un diferencial de volumen no afecta a la dispersión de otro diferencial próximo al mismo.

Se define el llamado factor de forma  $P(\theta)$  como el cociente entre la intensidad dispersada si la partícula fuera tipo Rayleigh y la realmente dispersada por la partícula. Este factor de forma tiene en cuenta la influencia en la dispersión de la morfología de la partícula y de su tamaño.

Para esta teoría la luz dispersada será igual al producto de la intensidad dispersada si la partícula fuera tipo Rayleigh ( $I$ ) y el factor de forma  $P(\theta)$ :

$$I_{\theta} = IP(\theta) \quad (\text{II.4})$$

donde el factor de forma vale:

$$P(\theta) = \frac{1}{V^2} \left| \int e^{i\delta} dV \right|^2 \quad (\text{II.5})$$

siendo  $\delta$  el desfase.

En principio esta teoría se podría utilizar para seguir un proceso de agregación, pues no se limita a la dispersión de esferas sino de partículas de cualquier morfología, pero sólo se puede aplicar a partículas cuyo tamaño sea menor o igual a la longitud de onda del haz incidente.

La solución exacta al problema de la dispersión de luz por parte de una esfera isotrópica, homogénea y de tamaño arbitrario fue dada por Mie (*Mie, 1908*). Esta no nos es útil puesto que, aunque la limitación del tamaño del dispersor desaparece, solamente se puede aplicar a esferas.

Ninguna de estas teorías, por sí sola, puede explicar la variación de la intensidad dispersada a lo largo de un proceso de agregación de partículas de látex que en un principio son esféricas.

Lips y colaboradores han propuesto un modelo para la dispersión de luz de una muestra polidispersa de agregados de esferas que se fundamenta en los siguientes postulados (*Lips et al., 1971; 1973*):

- Utilizar la teoría de Mie para calcular la dispersión de luz provocada por una esfera inicial.
- Las interferencias entre las ondas dispersadas por las partículas se describirán a través de un factor de forma del tipo Rayleigh-Gans-Debye.
- La dispersión es simple, es decir, la luz que incide en cada partícula es el rayo incidente y no la luz dispersada por las partículas que la rodean.
- Las partículas dispersoras son independientes, y por tanto la intensidad dispersada total es suma de la intensidad dispersada por cada partícula.

Teniendo en cuenta estos postulados se puede demostrar que la intensidad dispersada por un agregado formado por  $j$  esferas originarias a un ángulo  $\theta$  vale:

$$I_j = j I_1(\theta) [1 + (2/j) A_j] \quad (\text{II.6})$$

donde  $A_j$  es el factor de forma del agregado  $j$ , e  $I_1$  la luz dispersada por un monómero.

Para un instante  $t$  la intensidad dispersada por unidad de volumen será:

$$I(t, \theta) = \sum_{j=1}^{\infty} I_j(\theta) n_j \quad (\text{II.7})$$

donde  $n_j$  es la concentración del agregado  $j$  expresada en número de agregados por unidad de volumen.

Si se introduce la ecuación II.6 en II.7 se obtiene:

$$I(t, \theta) = \sum_{j=1}^{\infty} n_j j I_1(\theta) + 2 \sum_{j=1}^{\infty} n_j I_1(\theta) A_j \quad (\text{II.8})$$

El primer término de esta ecuación corresponde a la intensidad dispersada al principio por las  $n_s$  esferas originarias, y se representa por  $I_{\theta}(0)$ . Teniendo esto en cuenta la ecuación II.8 se puede escribir de la siguiente forma:

$$I(t, \theta) = I_{\theta}(0) + 2 I_1(\theta) \sum_{j=1}^{\infty} n_j A_j \quad (\text{II.9})$$

Si tenemos en cuenta que:

$$\frac{I_{\theta}(0)}{n_s} = I_1(0) \quad (\text{II.10})$$

se puede obtener finalmente:

$$I(t, \theta) = I_{\theta}(0) \left[ 1 + 2 \sum_{j=1}^{\infty} \frac{n_j}{n_s} A_j \right] \quad (\text{II.11})$$

Esta ecuación es válida para cualquier polarización posible del haz incidente.

El factor de forma  $A_j$  depende de la morfología del agregado  $j$  en cuestión. Evidentemente, como para cada instante  $t$  tenemos diferentes agregados con diferentes morfologías, esta ecuación no se puede resolver con exactitud. La morfología de los agregados será función de la cinética de agregación.

El factor de forma  $A_j$  se ha definido como del tipo Rayleigh-Gans-Debye y su expresión general es la siguiente:

$$A_j(\theta) = \sum_{i=1}^{j-1} \sum_{l=i+1}^j \text{sen} \left[ \left( 4\pi n_2 h_{ij} / \lambda \right) \text{sen} \theta / 2 \right] / \left[ \left( 4\pi n_2 h_{ij} / \lambda \right) \text{sen} \theta / 2 \right] \quad (\text{II.12})$$

donde  $h_{ij}$  es la distancia entre la partícula  $i$  y la partícula  $l$  medida desde sus centros en el agregado  $j$ , y  $n_2$  es el índice de refracción del medio.

En la práctica esta ecuación no se puede determinar debido a su complejidad, y más si no se conoce la morfología exacta de los agregados. Ahora bien, se puede suponer que existen dos casos límites:

- geometría lineal, que es la más abierta.
- geometría hexagonal, que es la más compacta.

La morfología de un agregado determinado estará comprendida entre la hexagonal y la lineal.

Lips y Willis (*Lips et al., 1971; 1973*) calcularon el valor teórico del cociente,  $R(\theta)$ , entre la intensidad dispersada para un instante determinado de la agregación y la intensidad inicial para la morfología hexagonal y lineal. Como resultado observaron que en ambos casos, y para un ángulo de dispersión de cero grados, este cociente valía 3.0. Este resultado implica que el factor de forma se reduce a la expresión:

$$A_j = \frac{j(j+1)}{2} \quad (\text{II.13})$$

para ángulos próximos a cero, y además:

$$R_{\theta \rightarrow 0}^{LIN} = R_{\theta \rightarrow 0}^{HEX} = \frac{I(t, \theta)}{I_{\theta}(0)} = 1 + 2Kn_s t \quad (\text{II.14})$$

donde  $K$  es la constante de agregación.

Por lo tanto el factor de forma, debido a la disminución en el número de interferencias a ángulos pequeños, es independiente de la morfología del agregado, dependiendo sólo del número de monómeros que constituyen el mismo.

Esta ecuación es válida cuando se cumpla que:

$$\frac{\theta}{2} \ll 1 \text{ rad} \quad (\text{II.15})$$

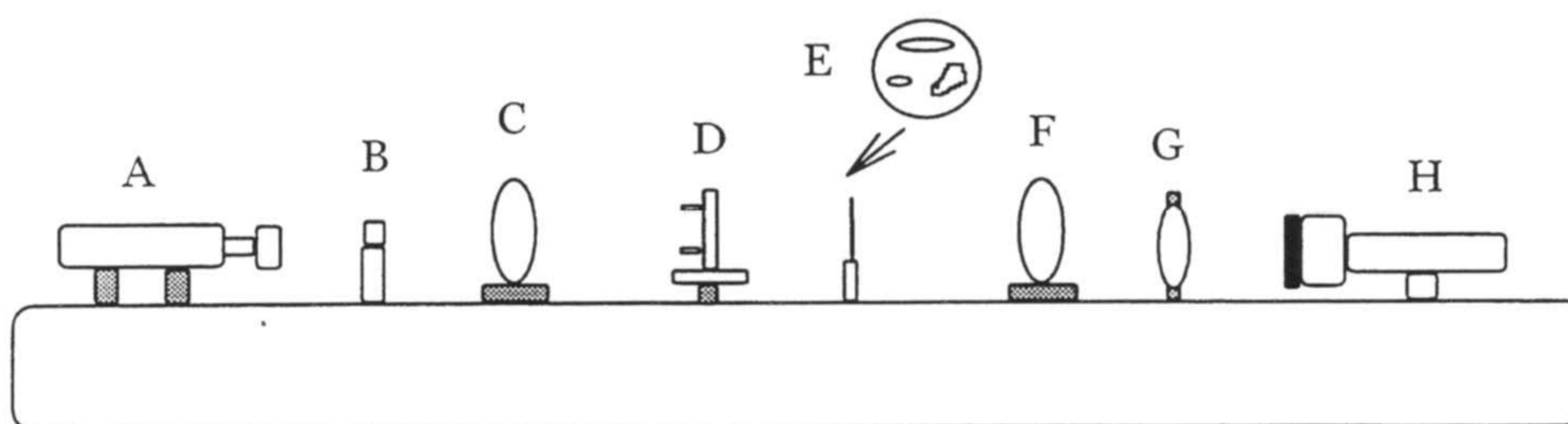
$$\frac{4\pi h_{ij}}{\lambda} \left( \frac{\theta}{2} \right) \ll 1 \text{ rad} \quad (\text{II.16})$$

Gracias a este desarrollo, que no deja de ser un modelo aproximado, el problema de la dispersión de luz por una muestra polidispersa se facilita enormemente. Según indica la ecuación II.14, la luz dispersada a ángulos pequeños por una suspensión coloidal que está agregando aumenta linealmente con el tiempo. A partir de la pendiente se puede obtener la constante de agregación.

### 3. Descripción del nefelómetro a bajo ángulo

Las constantes de agregación han sido obtenidas usando un nefelómetro que permite medir la luz dispersada a tres ángulos pequeños. Este nefelómetro fue donado por la empresa Biokit S.A. (Barcelona) y puesto a punto por nuestro compañero Artur Schmitt.

La figura II.1 corresponde al esquema general del nefelómetro cuyos componentes principales se describen a continuación:



**Figura II.1.** Esquema general del nefelómetro.

**Láser (A):** que actúa como fuente de luz. Se trata de un láser de He-Ne con una longitud de onda de 632.8 nm y una potencia de 10 mW.

**Filtro espacial (B):** para suavizar el perfil del rayo incidente y ampliar su diámetro.

**Sistema de enfoque (C):** consta de un conjunto de lentes y un diafragma cuya misión es focalizar el haz del láser al volumen de dispersión dentro de la célula.

**Célula (D):** Se trata de una célula rectangular cuyo paso óptico es de 2 mm. Está hecha de cuarzo y presenta un orificio de entrada para la muestra y otro de salida. Una imagen de la célula aparece en la figura II.2.

**Diafragma (E):** consta de un plato que tiene tres orificios. La posición de este diafragma así como el área de los orificios van a determinar los tres ángulos de dispersión. El valor de estos ángulos es:  $4.5 \pm 1^\circ$ ,  $10 \pm 2^\circ$ ,  $20 \pm 3^\circ$ .

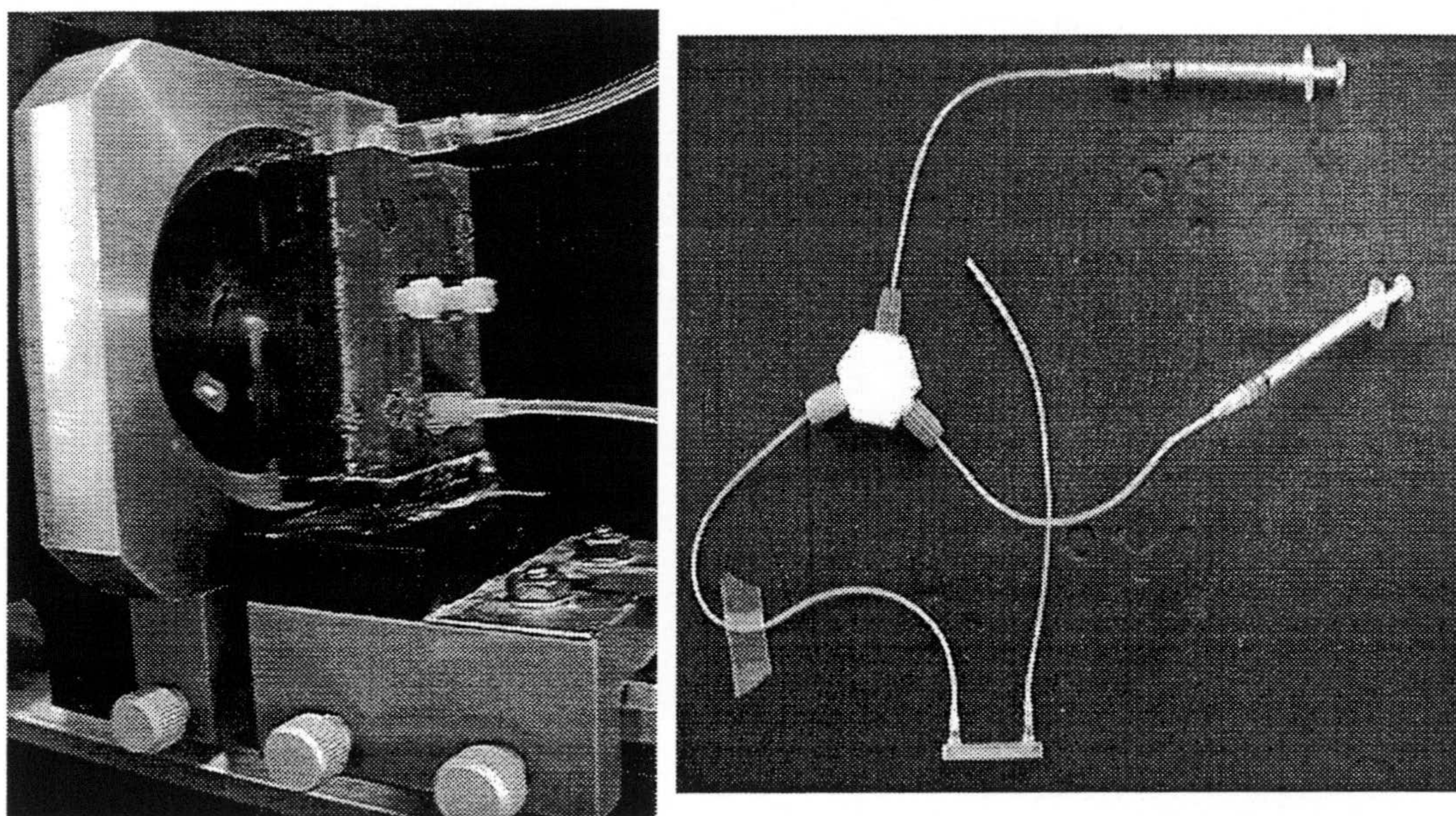
**Lentes (F):** conjunto de lentes que permiten separar los rayos provenientes de cada ángulo de dispersión.

**Prisma (G):** que desvía los tres haces a sus detectores correspondientes.

*Detectores (H)*: están formados por fotodiodos. Existen tres detectores, y sobre cada uno de ellos incide el haz que proviene de cada ángulo de dispersión. La señal que mandan los fotodiodos es recibida por unos conversores que transforman la corriente en tensión, I/V. Estos conversores están conectados a multiplexores que seleccionan el canal y la ganancia. Finalmente un amplificador manda las señales a la tarjeta digitalizadora de un ordenador.

Todo el sistema óptico está montado sobre un raíl que a su vez está dentro de una caja negra.

A través de un sistema de inyección automático por aire comprimido se introduce 1 ml de dispersión coloidal y 1 ml de disolución de electrolito en la célula. Mediante este sistema de inyección se consigue que el tiempo que transcurre entre la mezcla de los reactivos y el comienzo de la medida sea lo más pequeño posible.



*Figura II.2. Imagen de la célula que contiene la muestra y del montaje de inyección.*

Es muy importante que la célula esté limpia con el fin de disminuir al máximo posible la intensidad basal (aquella que registran los detectores en ausencia de muestra). Para ello la célula se trata con mezcla crómica antes de ser usada y se conserva en cloroformo.

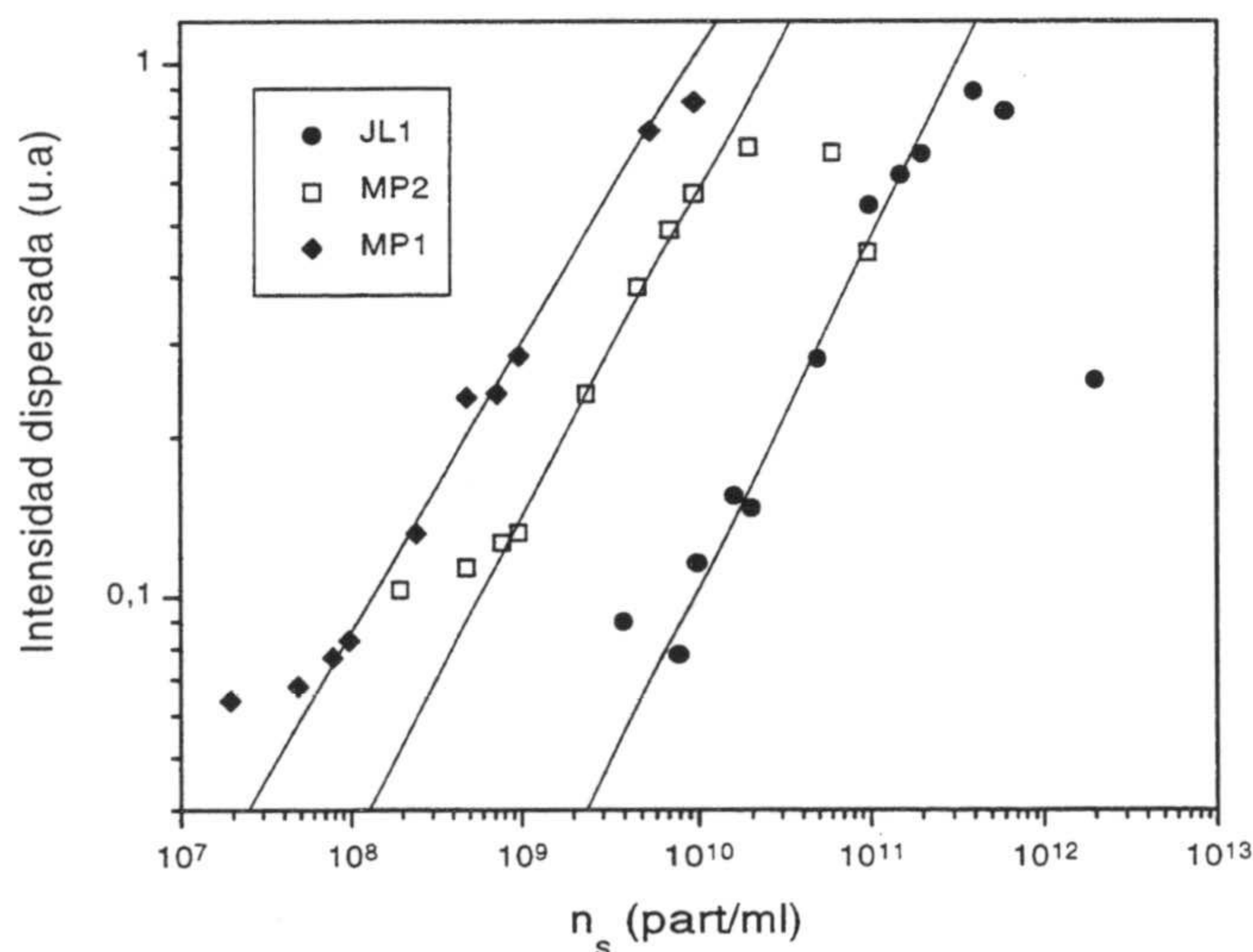
#### 4. Validez de la dispersión de luz a ángulos pequeños

La comprobación de que la respuesta del nefelómetro ante un proceso de agregación se ajusta a la ecuación II.14, se puede realizar de varias formas:

- Comprobar que existe linealidad entre la luz dispersada y el tiempo de agregación.
- Verificar que las partículas coloidales se comportan como dispersores tipo Rayleigh para un intervalo amplio de tamaños de partícula, es decir, hay que ver si la intensidad dispersada es proporcional al cuadrado del volumen del dispersor.

Pero antes de nada es necesario elegir la concentración óptima de partículas.

En la siguiente figura se muestra la dependencia de la luz dispersada a  $4.5^\circ$  con la concentración de partículas para diferentes tamaños.



**Figura II.3.** Determinación de la concentración óptima de partículas.

Para los tres látex existen dos zonas de concentración para las cuales la intensidad dispersada deja de ser proporcional a la concentración de partículas. La zona de desviación a baja concentración aparece como consecuencia de que la intensidad dispersada por la muestra es muy pequeña, llegando a ser mayor la dispersión basal. En un estudio previo (*Molina, 1995*) se comprobó que la concentración mínima de partículas que se puede utilizar es aquella cuya intensidad dispersada es el triple de la intensidad basal.

La desviación de la linealidad a altas concentraciones se debe a la existencia de dispersión múltiple. Esta ocurre aproximadamente a la misma intensidad independientemente del tamaño de la partícula.

El intervalo de concentraciones para el cual hay linealidad es el óptimo para hacer las medidas. Este intervalo depende del tamaño de la partícula. Para partículas grandes la concentración ha de ser más baja que para partículas pequeñas.

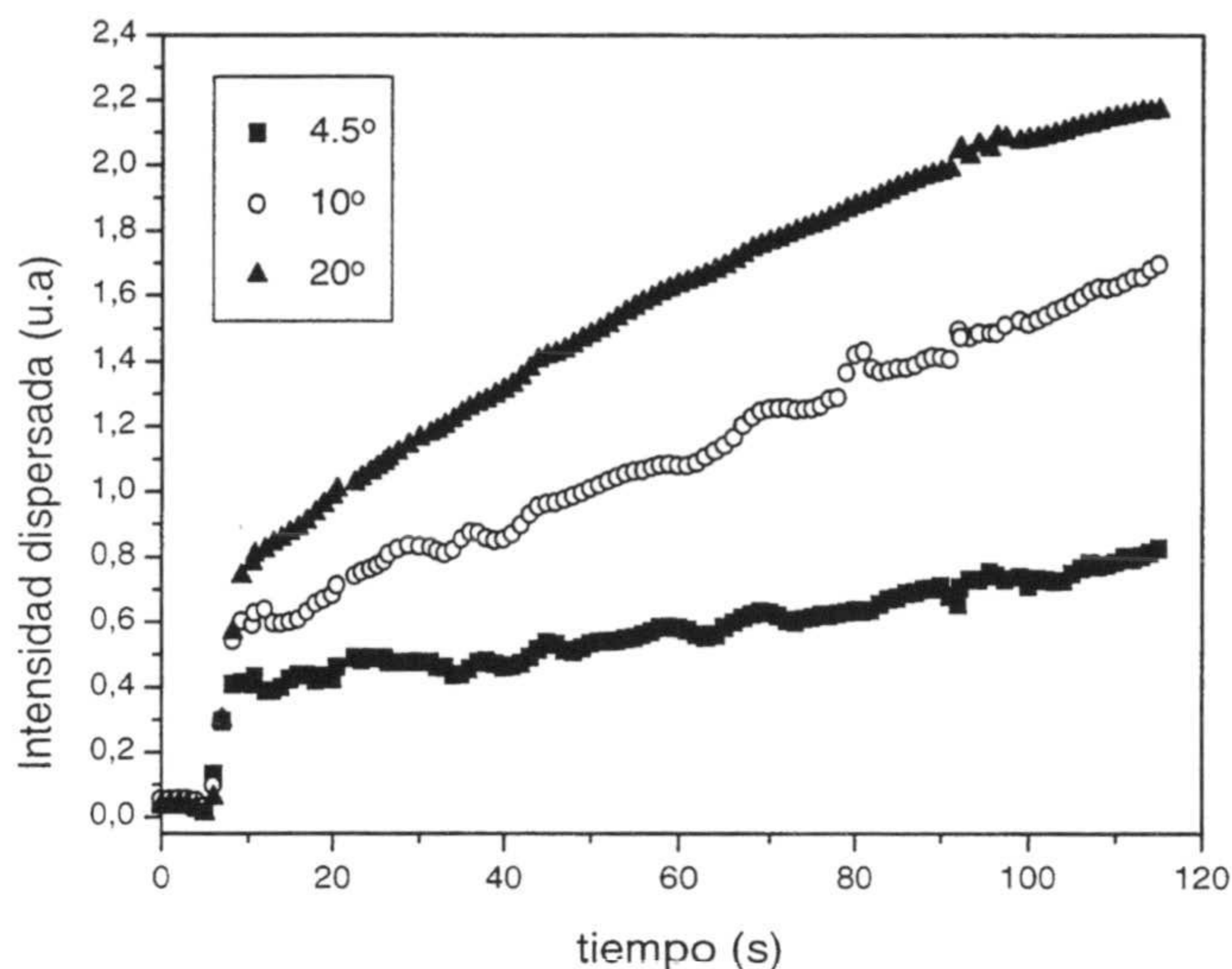
#### *i) Linealidad entre la luz dispersada y el tiempo durante una agregación*

De acuerdo con el modelo de Lips y colaboradores, si el ángulo de dispersión es lo suficientemente pequeño la intensidad dispersada debe aumentar linealmente con el tiempo a lo largo de un proceso de agregación.

En la figura II.4 se muestran los resultados obtenidos para la agregación del látex JL1 con 150 mM NaCl y una concentración de partículas de  $6.08 \times 10^{10}$  partículas/ml.

La linealidad aparece para los dos ángulos más pequeños. Para el ángulo de  $20^\circ$  también existe linealidad durante los primeros 60 segundos de agregación. A partir de ese instante se produce una desviación, momento en el que los agregados comienzan a ser demasiado grandes y deja de cumplirse la condición II.16. El momento en el que la señal de  $20^\circ$  comienza a desviarse de la linealidad depende de la concentración de partículas y de la velocidad de la agregación. Cuanto más rápida es la cinética mayores son los agregados para un instante determinado. Si la concentración de partículas es muy elevada, incluso la señal de  $10^\circ$  puede presentar un comportamiento no lineal.

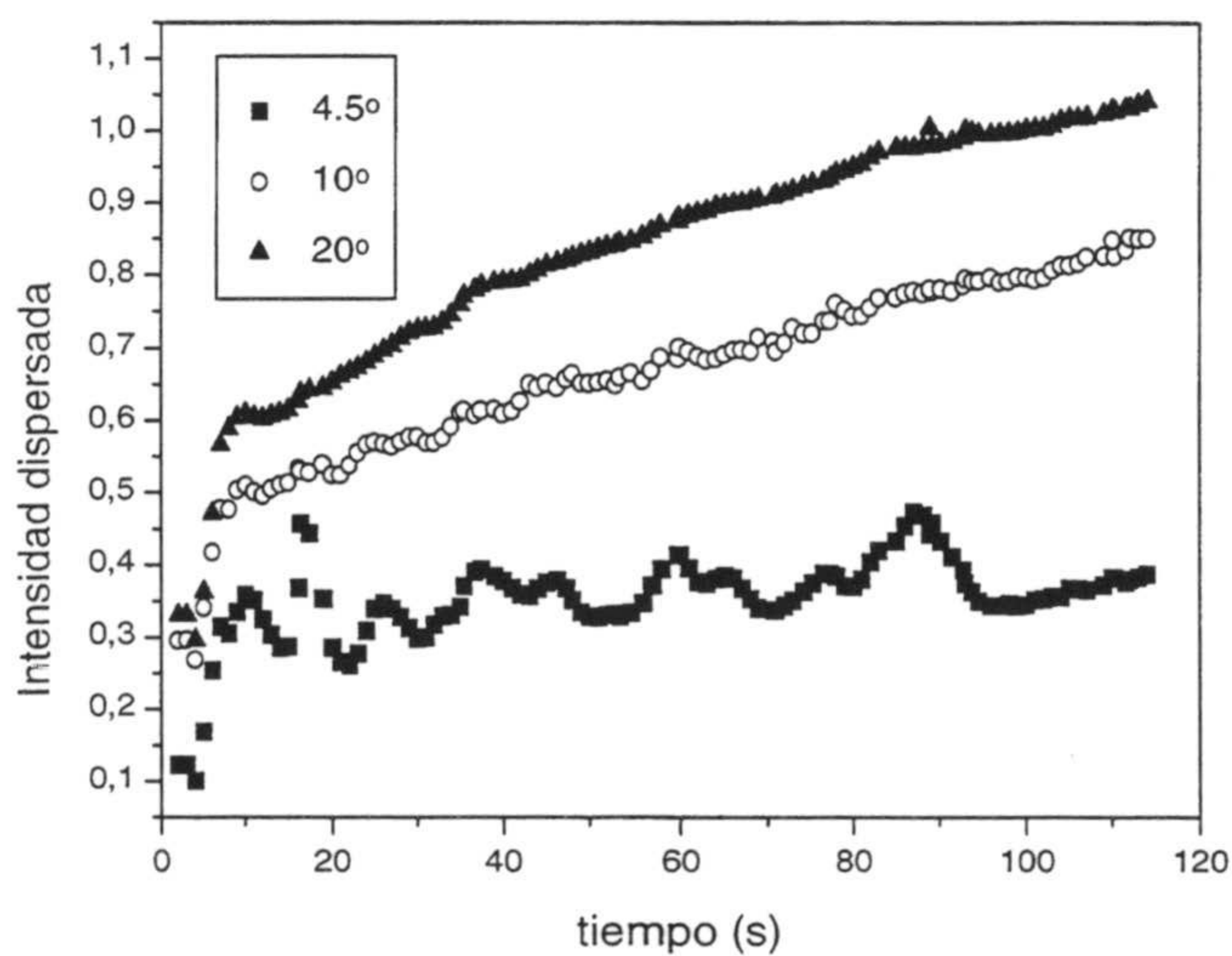




**Figura II.4.** Agregación del látex JL1 con  $n_s=6.08 \times 10^{10}$  part/ml.

Se puede obtener un valor para la constante de agregación a partir de los datos registrados para cada ángulo, limitándonos para el caso del ángulo mayor a la zona lineal.

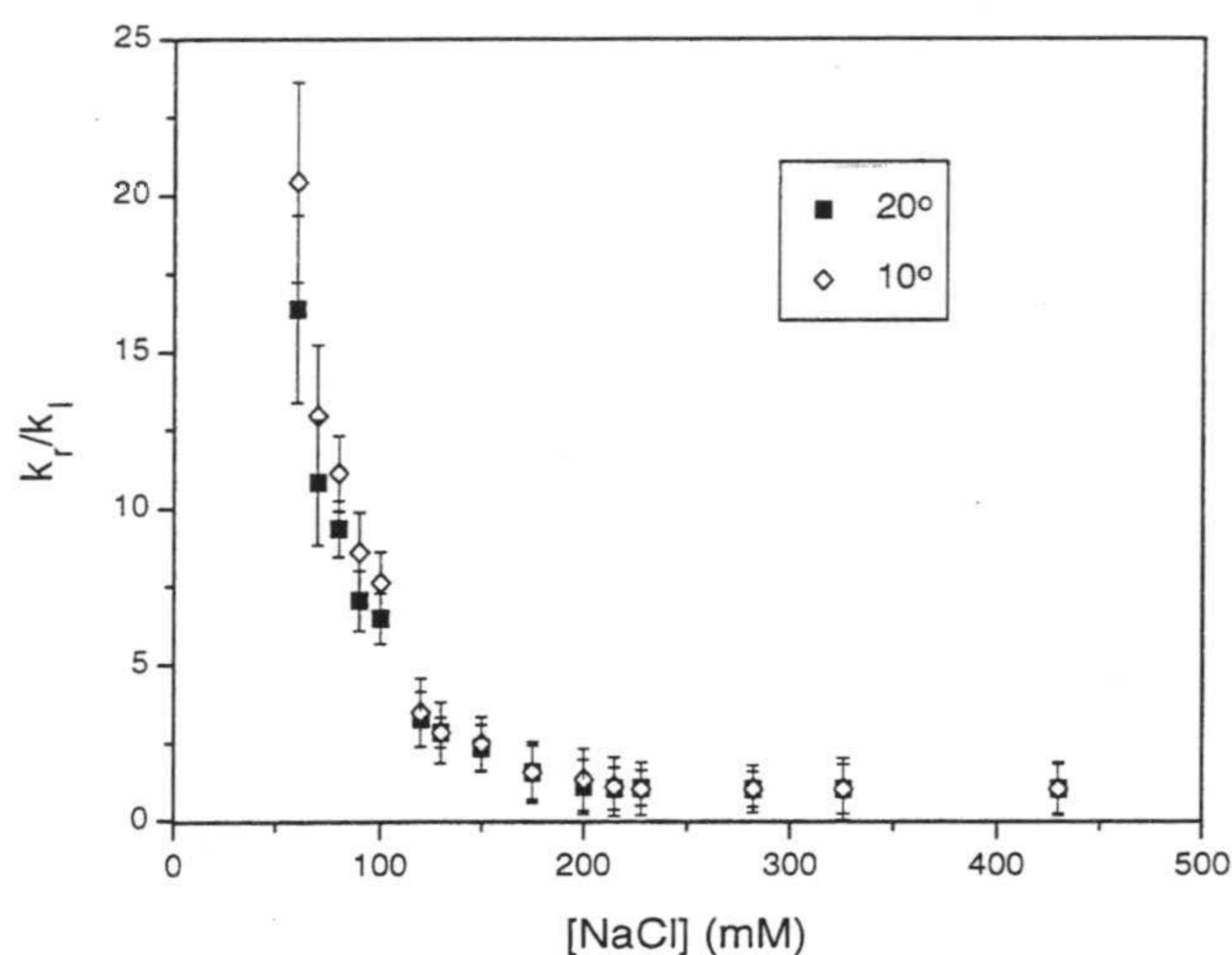
Si el ensayo presentado en la figura II.4 se realiza con una concentración de partículas de  $2.03 \times 10^{10}$  part/ml se obtiene el siguiente resultado:



**Figura II.5.** Agregación del látex JL1 con  $n_s=2.03 \times 10^{10}$  part/ml.

La señal registrada para el ángulo de  $4.5^\circ$  presenta una gran dispersión de puntos. Al haber pocas partículas la dispersión de luz es baja, como consecuencia la relación señal-ruido disminuye y con ello la sensibilidad. La dispersión a ángulos pequeños se ve muy afectada por cualquier mota de polvo que pueda cruzar el haz dispersado. Incluso es sensible a vibraciones y a fluctuaciones de tensión en el suministro eléctrico.

La elección del ángulo va a depender del aspecto que presenten las señales. El valor de la constante de agregación que se obtiene es independiente del ángulo elegido. Prueba de ello es la siguiente figura que corresponde al sistema JL1 para los ángulos de  $10^\circ$  y  $20^\circ$ . En esta figura se ha representado el cociente entre la constante de agregación más rápida ( $k_r$ ) y la constante de agregación obtenida para cada concentración de electrolito ( $k_l$ ). Más adelante se mostrará que esta es la definición del factor de estabilidad.



**Figura II.6.** Agregación del látex JL1 para los ángulos de  $10^\circ$  y  $20^\circ$ .

El procedimiento que se sigue para obtener la constante de agregación es el siguiente:

- Se introduce 1 ml de dispersión coloidal y 1 ml de agua. Se registra durante 120 segundos la intensidad dispersada. Esta intensidad corresponde al valor de  $I_\theta(0)$ .

- Se introduce 1 ml de dispersión coloidal y 1 ml de electrolito. Se registra durante 120 segundos la intensidad. Se ajustan los resultados a una línea recta por el método de mínimos cuadrados. El valor de la pendiente se divide entre el doble del número de partículas y el valor de  $I_0(0)$ . De esta forma se calcula la constante de agregación de acuerdo con la ecuación II.14.
- Se hace pasar por la célula 10 ml de agua desionizada para limpiarla.
- Se repite el experimento con otra concentración de electrolito.

### ii) Comportamiento tipo Rayleigh

El factor de forma, según la ecuación II.13, de un agregado para ángulos pequeños es función sólo del número  $j$  de esferas que lo forman, y no de su morfología.

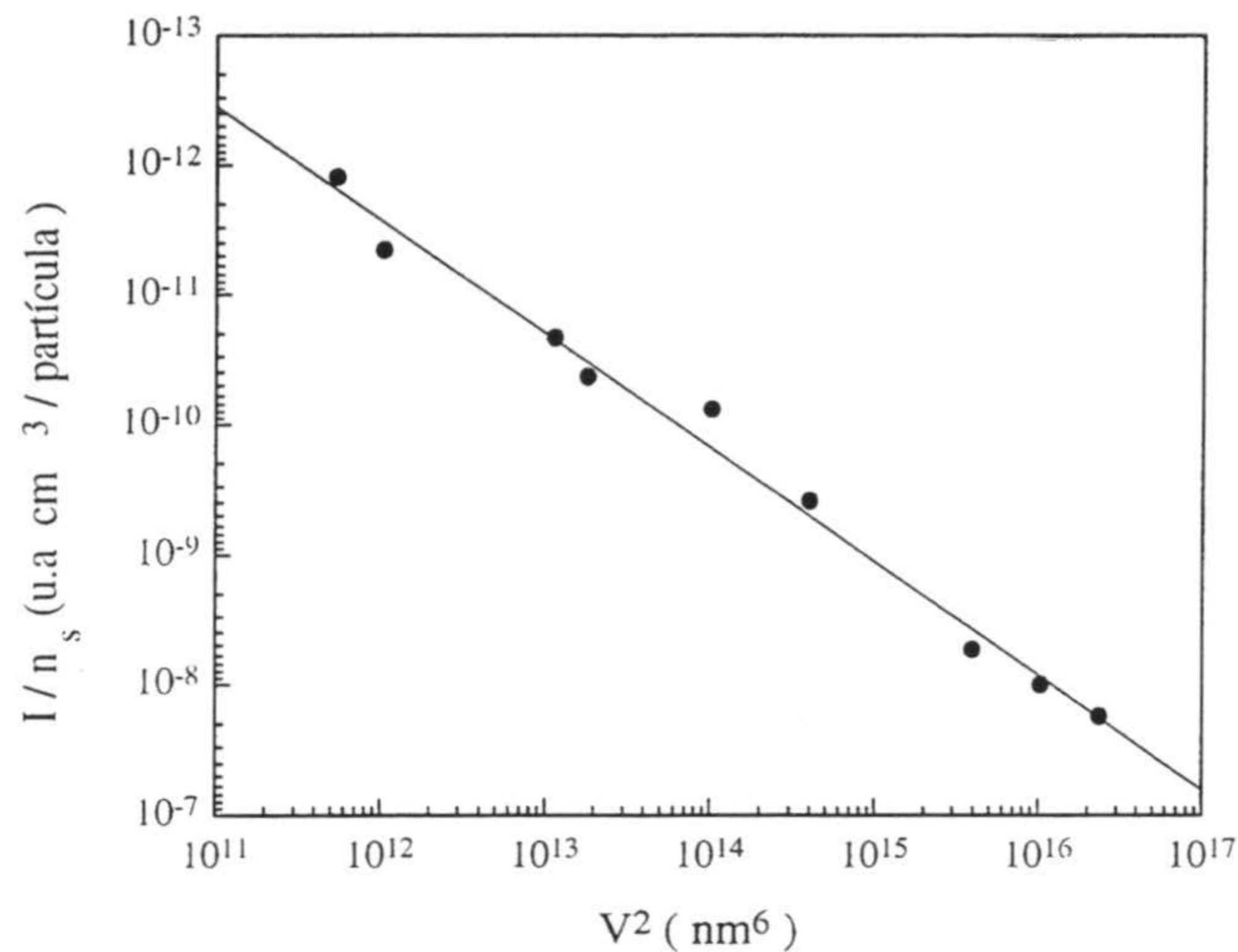
Para un sistema estable que no está agregando cabe esperar que el factor de forma valga 1. En este caso la intensidad dispersada depende sólo del volumen de la partícula comportándose como dispersor tipo Rayleigh.

Para la teoría de Rayleigh-Gans-Debye la partícula dispersora se puede dividir en diferenciales de volumen que se comportan como dispersores Rayleigh. La luz dispersada por estos diferenciales de volumen, que se encuentran en diferentes posiciones del espacio, puede producir interferencias.

Para tener en cuenta los efectos de estas interferencias se define el factor de forma. Cuando no hay interferencias este factor valdrá 1. Las partículas grandes dispersan más luz a ángulos pequeños que a grandes, pues para éstos las interferencias destructivas predominan. Sin embargo las partículas pequeñas dispersan casi por igual a ángulos pequeños que a grandes.

Las interferencias destructivas a ángulos pequeños prácticamente desaparecen, por lo que las partículas dispersan luz en función del cuadrado de su volumen, tal y como predice la teoría de Rayleigh.

En la siguiente gráfica aparece la intensidad dispersada por partícula para un conjunto de látex (con diámetros comprendidos entre los 100 nm a los 660 nm) para el ángulo de  $10^\circ$ .



**Figura II.7.** Intensidad dispersada por partícula en función del volumen de la misma.

A pesar de las diferencias tan grandes existentes en concentración y volumen entre los látex, la intensidad dispersada por partícula es proporcional al cuadrado de su volumen. Un comportamiento semejante se ha obtenido para los datos registrados a 20° (datos no mostrados).

Todos estos resultados otorgan validez a la teoría de dispersión de luz a ángulos pequeños y su utilidad en el cálculo de constantes de agregación.

## 5. Interacciones entre partículas coloidales

Como consecuencia del movimiento Browniano las partículas coloidales están continuamente colisionando. La estabilidad del coloide vendrá determinada por el signo y magnitud de la interacción neta entre las partículas durante tales encuentros. Analizaremos a continuación los diferentes tipos de interacciones que pueden aparecer.

Para coloides liofóbicos básicamente existen dos tipos de interacciones:

- fuerzas atractivas de van der Waals
- fuerzas repulsivas electrostáticas.

La forma funcional de estas dos energías es tal que la atractiva domina sobre la repulsiva tanto a grandes como a pequeñas distancias de separación entre las superficies de las partículas.

En el análisis que se va a llevar a cabo no se estudiará la repulsión de Born (*Elimelech et al., 1995*) que provocaría, debido al solapamiento de las cortezas electrónicas de los átomos, un incremento de gran magnitud en la contribución repulsiva a cortísimas distancias de separación.

### 5.a Interacción de van der Waals

En las primeras décadas de este siglo se sospechaba ya que las fuerzas que actuaban sobre las partículas coloidales, debido a la interacción de sus dobles capas, no eran las únicas a la hora de interpretar el aspecto físico de las suspensiones. Diversos fenómenos sugerían la presencia de fuerzas atractivas de largo alcance.

Las fuerzas de van der Waals siempre van a existir entre dos partículas coloidales que interaccionan. Su carácter es atractivo. En ausencia de cualquier interacción repulsiva todo sistema coloidal será inestable debido a la existencia de estas fuerzas de van der Waals. Estas fuerzas pueden ser:

- fuerzas de dispersión de London
- fuerzas de orientación de dipolos o de Keelson.
- fuerzas de inducción de dipolos o de Debye.

Las fuerzas de dispersión de London son las más importantes para el caso de partículas coloidales. Desde ahora en adelante hablaremos de interacciones de van der Waals sin olvidar que no estamos refiriendo a London-van der Waals.

Hamaker (*Hamaker, 1936, 1937*) extendió el tratamiento de London (*London, 1934*) para obtener una expresión de la energía de atracción entre dos partículas mediante la integración de la energía de dispersión interatómica a lo largo del interior del volumen de las dos partículas que interaccionan:

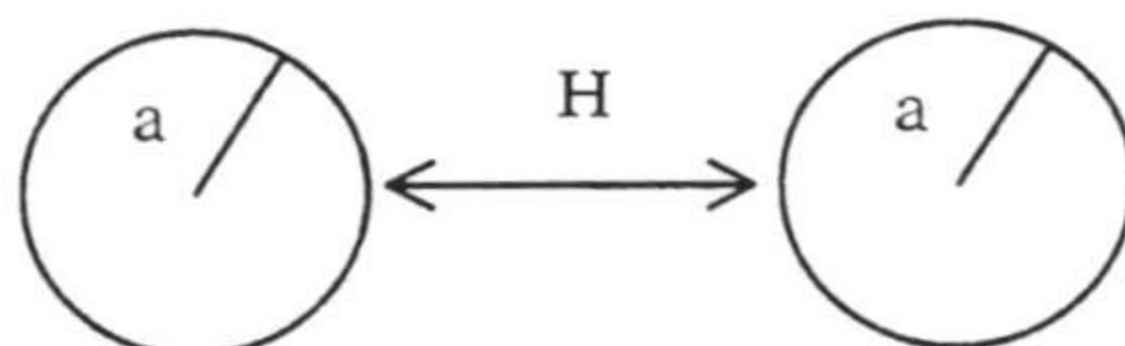
$$V_A = - \int_{v_1} \int_{v_2} \frac{q^2 \beta}{s^6} dv_1 dv_2 \quad (\text{II.17})$$

donde  $v_1$  y  $v_2$  son los volúmenes de las dos partículas,  $dv_1$  y  $dv_2$  son los diferenciales de volumen para una distancia  $s$ ,  $q$  es el número de átomos y  $\beta$  es la constante de London.

La integración de la ecuación II.17 para simetría esférica y para dos esferas de igual radio vale:

$$V_A(H) = \frac{-A}{6} \left[ \frac{2a^2}{H(4a+H)} + \frac{2a^2}{(2a+H)^2} + \ln \frac{H(4a+H)}{(2a+H)^2} \right] \quad (\text{II.18})$$

donde  $A$  es la constante de Hamaker para el poliestireno en agua (en nuestro caso), y  $H$  es la distancia de separación entre la superficie de las dos esferas:



**Figura II.8.** Interacción entre dos partículas de radio  $a$ .

Esta expresión se puede simplificar para distancias de separación mucho menores al radio de la partícula obteniéndose:

$$V_A(H) = -\frac{Aa}{12H} \quad (\text{II.19})$$

El potencial de interacción atractivo de van der Waals tiene dos importantes restricciones:

- Asumir la aditividad de las atracciones interatómicas entre las dos partículas que interaccionan.
- No incluir el efecto del retardo electromagnético basado en la velocidad finita de propagación de las ondas electromagnéticas.

Actualmente existe una teoría correcta que incluye ambos efectos debida a Lifshitz (*Lifshitz, 1956*), generalizada por Dzyaloshinskii (*Dzyaloshinskii et al., 1961*) y posteriormente elaborada por Mahanty (*Mahanty et al., 1976*). Sin embargo, la desventaja de la teoría exacta es que tiene escasa utilidad práctica debido a la complejidad de los cálculos.

No obstante un tratamiento aproximado que tiene en cuenta el efecto de retardo ha sido propuesto por Gregory (*Gregory, 1981*):

$$V_A(H) = -\frac{Aa}{12H} \left[ 1 - \frac{bH}{\lambda} \ln \left( 1 + \frac{\lambda}{bH} \right) \right] \quad (\text{II.20})$$

donde  $\lambda$  es la longitud de onda característica de la interacción y cuyo valor es de 100 nm (*Schenkel et al., 1969; Gregory, 1981*), y  $b$  es una constante que para valores de  $H$  mucho menores al radio de la partícula vale 5.32. Esta ecuación es válida para valores de  $H \ll a$  y aceptable hasta distancias  $H$  del orden del 10% del radio de la partícula o incluso algo superiores. El término entre corchetes es el factor correctivo debido al retardo electromagnético para la ecuación II.19.

### 5.b Interacciones electrostáticas

La interacción entre las dobles capas eléctricas que rodean a las partículas coloidales conduce a un término repulsivo de tipo eléctrico en el balance energético total.

Cuando dos partículas se aproximan, las partes difusas de las dobles capas comienzan a interpenetrarse dando lugar a una fuerza repulsiva. Si el valor de esta fuerza es superior a la atracción de van der Waals se dice que el coloide está estabilizado electrostáticamente. Un aumento de la concentración de sal o una disminución del potencial difuso conduce a una disminución de la estabilidad del coloide.

Esta interacción repulsiva puede ser analizada desde dos puntos de vista diferentes: i) considerar el cambio de energía libre de Gibbs al solaparse las dobles capas eléctricas, ii) considerar la presión osmótica generada por la acumulación de iones entre las partículas.

Por otra parte nos podemos encontrar en diferentes situaciones cuando dos partículas interaccionan:

- Potencial constante: si la aproximación entre las partículas es lenta se establece constantemente el equilibrio termodinámico entre los iones de la

partícula en conjunto y el medio. En este caso el potencial eléctrico de las partículas permanece constante. Para que esto ocurra es necesario que el tiempo de relajación de la doble capa sea menor al tiempo de una colisión Browniana. Este caso ha sido ampliamente estudiado y es la base de la teoría sobre estabilidad coloidal conocida como DLVO.

- Carga de la partícula constante: Si el tiempo de reajuste de la doble capa es superior al tiempo de agregación la carga eléctrica permanecerá constante.
- Otra posibilidad aparece si existe adsorción específica de iones en la capa de Stern.

Siguiendo a Parfitt (*Parfitt, 1981*) es posible que ninguna de las tres aproximaciones sea estrictamente cierta, pudiendo darse en la práctica casos intermedios (*Overbeek, 1977a*), y estando la verdadera energía repulsiva entre la que proponen estos métodos (*Hunter, 1981*). De cualquier manera los resultados finales de dichos métodos no son significativamente diferentes (*Parfitt, 1981*).

En nuestros estudios se ha supuesto como válida la aproximación de potencial constante.

Utilizando la aproximación de Derjaguin (*Derjaguin, 1934*) y considerando la expresión del potencial proporcionado por el modelo de Gouy-Chapman, en su resolución para potenciales bajos, la expresión del potencial de repulsión por unidad de área viene dada por:

$$V_R = 2\pi\epsilon_0\epsilon_r a \left( \frac{4k_B T}{ze} \gamma \right)^2 \ln(1 + \exp(-\kappa H)) \quad (\text{II.21})$$

donde

$$\gamma = \tanh \frac{ze\psi_d}{4k_B T} \quad (\text{II.22})$$

Esta ecuación es válida para valores de  $\kappa a$  suficientemente elevados ( $\kappa a > 10$ ), electrolitos simétricos y distancias relativamente grandes ( $\kappa H$  grande).

Cuando la doble capa que rodea a la partícula está extendida, es decir para valores de  $\kappa a$  pequeños ( $\kappa a < 5$ ), la aproximación de Derjaguin empieza a fallar. Verwey y



Overbeek (*Verwey y Overbeek, 1948*) desarrollaron un procedimiento alternativo para el caso de potenciales bajos. De esta forma obtuvieron la siguiente expresión de la energía potencial repulsiva:

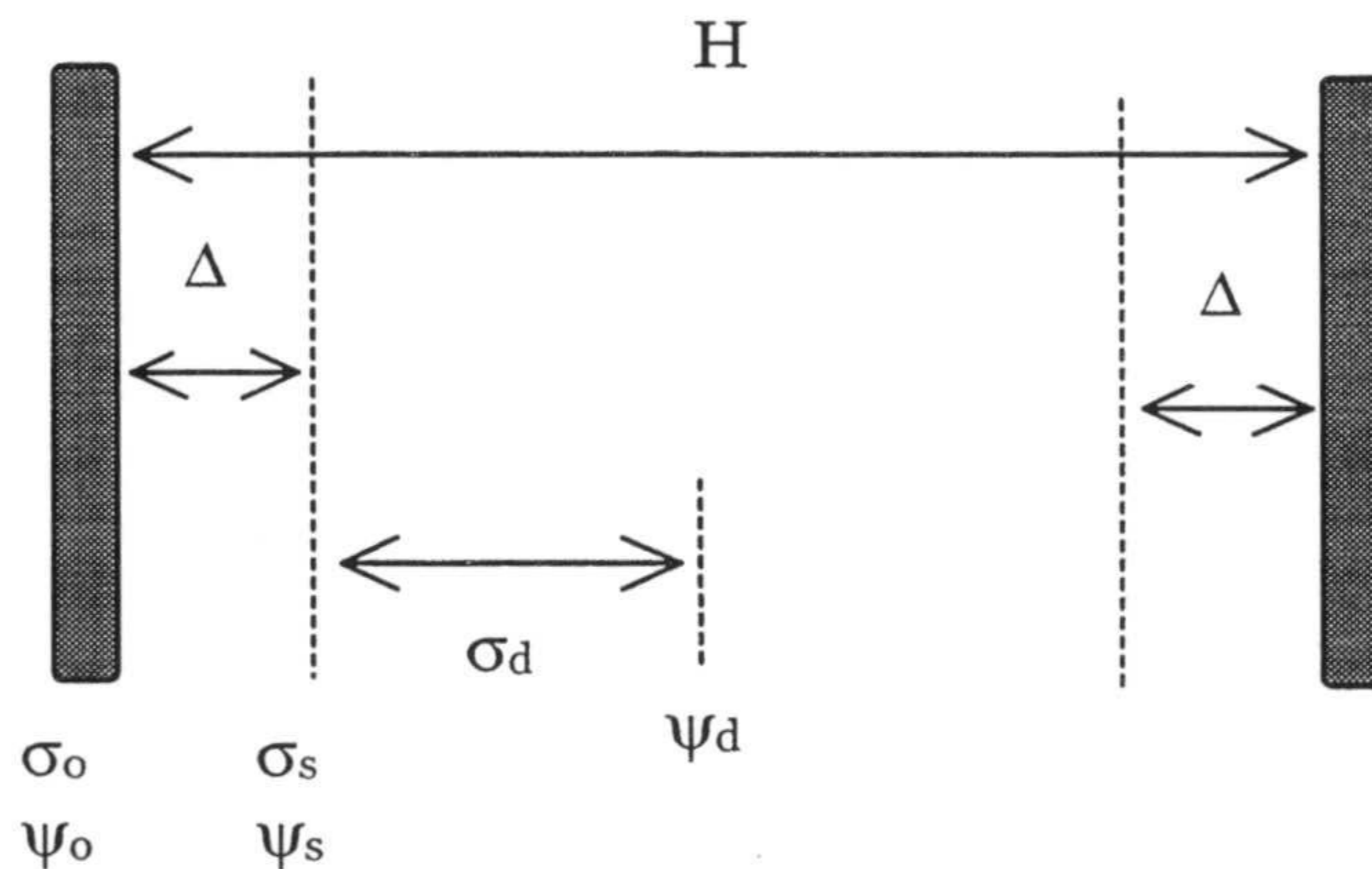
$$V_R = 2\pi\epsilon_0\epsilon_r a \left( \frac{4k_B T}{ze} \gamma \right)^2 \exp(-\kappa H) \quad (\text{II.23})$$

que es una buena aproximación para valores de  $\psi_d < 50$  mV y para  $\kappa H > 1$ .

Estas ecuaciones se obtienen a partir del modelo de Gouy-Chapman. Si se considera el modelo de doble capa eléctrica de Stern, el cual tiene en cuenta el tamaño finito de los iones, las ecuaciones propuestas hasta ahora cambiarán (*Overbeek, 1980*). Si nos fijamos en la figura II.9 que tiene 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  $H-2\Delta$ , siendo  $\Delta$  el espesor de la capa de Stern.

Si esta corrección se introduce en la ecuación II.23 se obtiene la siguiente expresión modificada por el espesor de la capa de Stern (*Matijevic et al., 1961; Vincent et al., 1970; Bastos et al., 1994; Romero et al., 1998a; Peula et al., 1998*):

$$V_R = 2\pi\epsilon_0\epsilon_r (a + \Delta) \left( \frac{4k_B T}{ze} \gamma \right)^2 \exp(-\kappa (H - 2\Delta)) \quad (\text{II.24})$$



**Figura II.9.** Influencia de la capa de Stern en la interacción entre dos partículas.

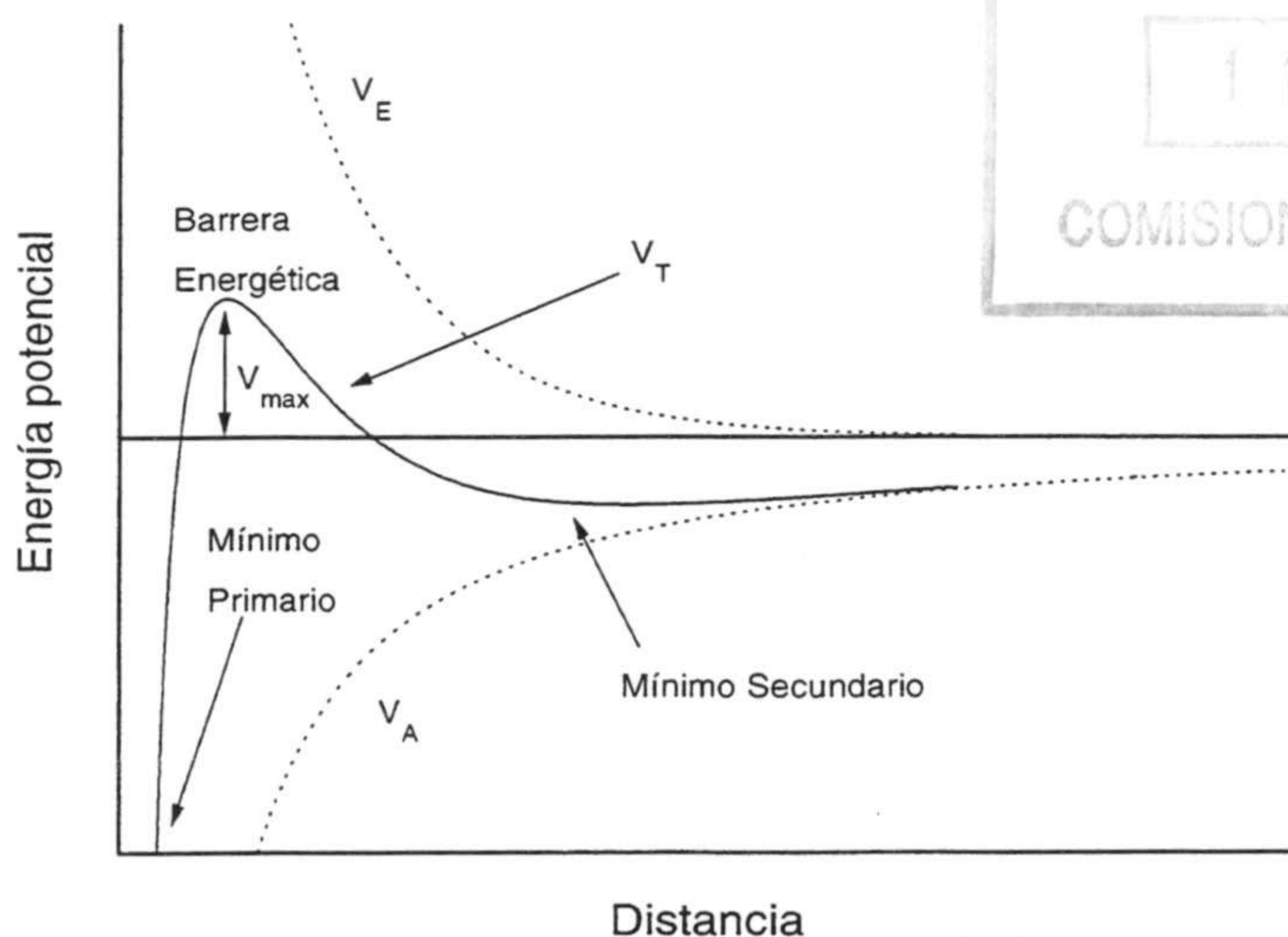
## 6. Teoría DLVO

Desde principios de este siglo se conocía la capacidad que tienen los electrolitos para provocar la agregación de numerosos coloides (*Schulze, 1882; Hardy, 1900; Freundlich, 1926*) y las expresiones para la velocidad de formación de dobletes en un proceso de agregación debido al movimiento Browniano (*Smoluchowski, 1917*). Sin embargo, hasta que no se desarrollaron expresiones para los potenciales de interacción entre dos partículas no se pudo obtener una teoría que explicara los hechos experimentales. Esta teoría, conocida como DLVO, fue desarrollada independientemente por Derjaguin y Landau (*Derjaguin y Landau, 1941*) y, Verwey y Overbeek (*Verwey y Overbeek, 1948*) para coloides liofóbicos. Se basa esencialmente en la aditividad del potencial atractivo de van der Waals y el potencial repulsivo electrostático. La combinación de ambos potenciales origina un potencial total de interacción en función de la distancia entre dos partículas que se aproximan:

$$V_T = V_A + V_E \quad (\text{II.25})$$

donde  $V_A$  es el potencial atractivo y  $V_E$  el repulsivo.

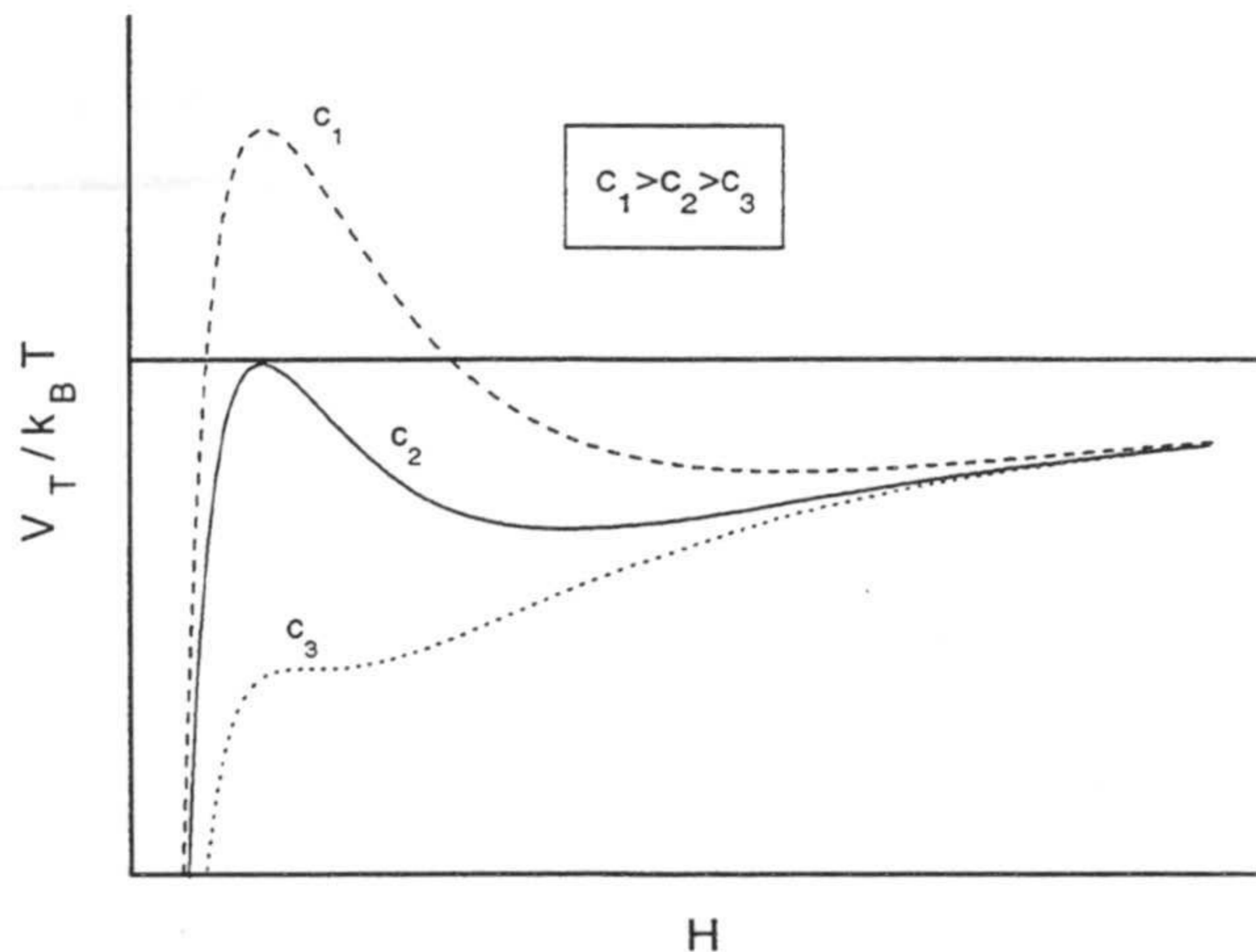
La siguiente figura muestra una curva de potencial de interacción típica obtenida por combinación de las ecuaciones II.18 y II.23:



**Figura II.10.** Curva típica de energía potencial total de interacción entre partículas coloidales según la teoría DLVO.

Estas curvas han sido obtenidas para los siguientes valores:  $a=100\text{nm}$ ,  $A=1 \times 10^{-20}$  J,  $\psi_d = -27$  mV y una concentración de NaCl de 250 mM.

El potencial de van der Waals domina a distancias grandes y a pequeñas. A distancias pequeñas  $V_E$  tiene un valor finito, mientras que  $V_A$  aumenta rápidamente tendiendo a infinito. A estas distancias en el diagrama aparece el mínimo primario en el que se produce la coagulación del sistema. A distancias intermedias aparece una barrera de potencial cuya altura es  $V_{\text{max}}$ . La altura de esta barrera determinará la estabilidad del coloide, y dependerá del potencial eléctrico difuso de las dobles capas, de la constante de Hamaker y de la concentración de electrolito. Algunos autores suponen que una barrera igual o superior a  $20 k_B T$  es suficiente para que el coloide exhiba estabilidad en un gran intervalo temporal (Hunter et al., 1987; Elimelech et al., 1995). Otros autores ponen como límite potenciales superiores a  $15 k_B T$  (Adamczyk et al., 1983; Usui, 1984; Chow, 1991). Un aumento de la concentración de sal provoca un descenso en  $V_E$  y con ello una disminución de la barrera de potencial. De esta forma el número de colisiones que conduce a la coagulación en el mínimo primario aumenta, disminuyendo la estabilidad del coloide. Alcanzada una concentración de electrolito, conocida como concentración crítica de coagulación (c.c.c), la barrera energética desaparece y todas las colisiones entre partículas son eficaces, siendo máxima la inestabilidad del sistema. Esta influencia de la fuerza iónica sobre  $V_T$  queda esquematizada en la siguiente figura.



**Figura II.11.** Influencia de la concentración de sal ( $c$ ) sobre la estabilidad coloidal.

Para la concentración  $c_1$  el sistema presenta una cierta estabilidad que viene dada por la altura de la barrera energética. El valor de  $c_2$  es la *c.c.c* en la que se alcanza la máxima inestabilidad. Para esta concentración de sal se cumple que  $V_T=0$  y  $dV_T/dH=0$ . En  $c_3$  el coloide es igual de inestable que para  $c_2$  ya que en ambos casos no existe barrera energética que se oponga a la coagulación.

A distancias intermedias puede aparecer un segundo mínimo llamado secundario. Si este mínimo es lo suficientemente profundo la agregación también puede ocurrir en él. Cuando la agregación se produce en el mínimo primario se habla de coagulación, mientras que si ocurre en el secundario se denomina floculación. La floculación está muy poco estudiada a pesar de que numerosas propiedades de los coloides vienen determinadas por la existencia de este mínimo secundario. La teoría DLVO fue desarrollada originalmente para el caso de agregación sólo en el mínimo primario (coagulación),

La forma del potencial total de interacción dependerá de todos aquellos parámetros que influyen tanto sobre  $V_A$  como en  $V_E$ . Así dependerá del potencial difuso, de la concentración de electrolito, de la valencia del contraión, del tamaño de partícula, de la constante de Hamaker y de la temperatura.

Evidentemente la cinética de agregación ha de estar íntimamente conectada con la forma del potencial total de interacción. La barrera de potencial es en realidad un obstáculo que se opone a la agregación. Aquellas partículas que en su colisión superen la barrera coagularán en el mínimo primario. Para concentraciones de electrolito en las cuales existe barrera energética, la constante cinética de agregación aumenta al aumentar la fuerza iónica pues la barrera va disminuyendo de altura. Cuando la barrera desaparezca (*c.c.c*) todas las colisiones serán eficaces y la constante de velocidad será máxima e independiente de la concentración de sal. En esta situación la velocidad del proceso ha de estar controlada por la difusión entre las partículas.

La existencia de la *c.c.c* permite diferenciar dos regímenes de agregación: agregación lenta para concentraciones inferiores a la *c.c.c* y agregación rápida para concentraciones superiores a la *c.c.c*.

La eficacia de la barrera energética en prevenir la agregación puede ser cuantificada a través del factor de estabilidad  $W$  introducido por Fuchs (Fuchs, 1934):

$$W = \frac{\text{numero de colisiones entre particulas}}{\text{numero de colisiones que terminan en agregacion}} = \frac{K_R}{K_I} \quad (\text{II.26})$$

donde  $K_R$  es la constante de agregación rápida y  $K_I$  es la constante para la agregación lenta. La inversa del factor de estabilidad determinaría la eficacia de las colisiones.

## 7. Cinética de agregación

### 7.a Régimen de agregación rápida

Para concentraciones de electrolito superiores a la *c.c.c.* la velocidad de agregación está controlada por la difusión de las partículas, ya que no existe barrera energética. La cinética de un proceso controlado por difusión viene dada por la teoría de Von Smoluchowski (*Smoluchowski, 1917*). Este autor consideró una partícula central y calculó el número de partículas que difundían hacia ésta como consecuencia del movimiento Browniano. Definió una esfera de acción de radio  $R$  de tal forma que para distancias de separación entre dos partículas mayores a  $R$  no existiría ninguna interacción. A distancias menores a  $R$  las partículas se atraerían y agregarían irreversiblemente.

El movimiento Browniano de las partículas origina un gradiente de concentración que dará lugar a un flujo de difusión. Esta difusión viene descrita por la primera ley sobre el transporte de materia de Fick:

$$I = -D \frac{dn}{dr} \quad (\text{II.27})$$

donde  $n$  es la concentración de partículas y  $D$  es coeficiente de difusión de la partícula cuya definición es:

$$D = \frac{k_B T}{f_s} \quad (\text{II.28})$$

donde  $f_s$  es un coeficiente de fricción. Su valor para una partícula esférica de radio  $a$ , mucho mayor al radio de las moléculas de disolvente y bajo condiciones de flujo laminar es:

$$f_s = 6\pi \eta a \quad (\text{II.29})$$

siendo  $\eta$  la viscosidad del medio de dispersión.

Definiendo  $n_s$  como la concentración inicial de esferas se puede obtener que el flujo de materia  $I$  para las colisiones entre dos esferas de igual radio vale:

$$I_{11} = 8\pi R D_1 n_s \quad (\text{II.30})$$

donde se ha supuesto que  $D_1 + D_2 = D_{12} = 2D_1$ .

Si este flujo de partículas iniciales se considera igual a la velocidad de agregación, la velocidad de desaparición de esferas iniciales valdrá:

$$-\frac{dn_s}{dt} = 8\pi R D_1 n_s^2 = 2 K_s n_s^2 \quad (\text{II.31})$$

donde  $K_s$  es la constante de velocidad de agregación rápida de acuerdo con la teoría de Von Smoluchowski. Su valor, si suponemos que el radio de la esfera de acción  $R$  es la suma de los radios de las dos esferas, es:

$$K_s = \frac{4 k_B T}{3 \eta} = 6.05 \times 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1} \text{ a } 25^\circ \text{ C} \quad (\text{II.32})$$

La expresión II.31 ha sido obtenida suponiendo que el coeficiente de difusión entre dos partículas es la suma de los coeficientes de difusión de las partículas individuales. Esta suposición es válida para distancias entre partículas suficientemente alejadas ( $r \gg 2a$ ). Para distancias pequeñas el coeficiente de fricción  $f$  no es constante, sino que depende de la distancia que separa a las partículas. Esta dependencia se debe a la interacción hidrodinámica entre la partícula y el medio de dispersión:

$$f(r) = f_s \beta\left(\frac{r}{a}\right) \quad (\text{II.33})$$

donde  $\beta$  es una función cuyo valor es 1 para  $r \gg 2a$ .

La interacción hidrodinámica se refiere al hecho de que en los estadios finales de aproximación de las partículas, éstas son parcialmente frenadas a causa de la

dificultad que encuentra el líquido para escapar de entre las superficies de las mismas a medida que se aproximan.

Derjaguin y colaboradores (*Derjaguin 1956; Derjaguin et al., 1967*), y posteriormente otros autores (*Brenner, 1961; Spielmann, 1970; Honing et al., 1971*) han demostrado la importancia de esta interacción hidrodinámica en el proceso de agregación que puede incluso reducir la velocidad de agregación a la mitad del valor dado por la teoría de Smoluchowski.

Una expresión exacta de la función  $\beta$  para partículas esféricas de igual radio fue propuesta por Brenner (*Brenner, 1961*). Sin embargo, debido a su complicación numérica han surgido diferentes aproximaciones siendo la más útil la propuesta por Honing (*Honing et al., 1971*):

$$\beta(H) = \frac{6H^2 + 13H + 2a^2}{6H^2 + 4Ha} \quad (\text{II.34})$$

Este efecto hidrodinámico tiende a retardar la cinética de agregación formulada por Smoluchowski.

Una representación de  $\beta(H)$  en función de  $H$  viene a indicar que a distancias grandes su valor es 1, mientras que a distancias pequeñas tiende a infinito. Según este resultado la agregación coloidal por difusión nunca se debería producir.

Sin embargo no debemos de olvidar que hasta ahora no se ha tenido en cuenta que existe un potencial de interacción atractivo de van der Waals. Este potencial es el responsable de la inestabilidad del coloide.

El flujo neto relativo al movimiento de dos partículas teniendo en cuenta la corrección hidrodinámica y la existencia del potencial de van der Waals es (*Sonntag et al., 1987*):

$$I_{12} = I_D + I_F = 4\pi r^2 \left( D_{12} \frac{dn}{dr} + \frac{n}{f} \frac{dV_A}{dr} \right) \quad (\text{II.35})$$

donde  $I_D$  es el flujo relativo de las dos partículas debido al movimiento Browniano e  $I_F$  es el flujo resultante de las fuerzas de interacción (hidrodinámica y van der Waals). Aplicando las condiciones de contorno:

- $n = n_s$  para  $r = \infty$
- $n = 0$  para  $r = 2a$

se obtiene que el flujo de difusión teniendo en cuenta la atracción de van der Waals y la interacción hidrodinámica es:

$$I = \frac{8\pi D_1 n_s a}{\int_0^\infty \frac{\beta(H)}{(H+2a)^2} \exp \frac{V_A(H)}{k_B T} dH} \quad (\text{II.36})$$

Si como antes suponemos que este flujo coincide con la velocidad de agregación, el valor de la constante de agregación rápida teniendo en cuenta las dos correcciones introducidas vale:

$$K = \frac{K_s}{2 \int_0^\infty \frac{\beta(H)}{(H+2a)^2} \exp \frac{V_A(H)}{k_B T} dH} \quad (\text{II.37})$$

siendo  $K_s$  la constante de Smoluchowski introducida en la ecuación II.31.

Esta constante debe corresponder a la constante de agregación rápida y depende de la naturaleza del coloide, ya que la constante de Hamaker es diferente según el material del que estén constituidas las partículas coloidales.

Este resultado viene a indicarnos que la cinética de agregación no es un proceso que sólo comprende la difusión relativa de dos partículas sino también la interacción entre las mismas.

### 7.b Régimen de agregación lenta

Las partículas que están colisionando en un régimen de agregación lenta se encuentran ante una barrera energética cuya altura determinará la eficacia de las colisiones y por tanto la estabilidad coloidal.

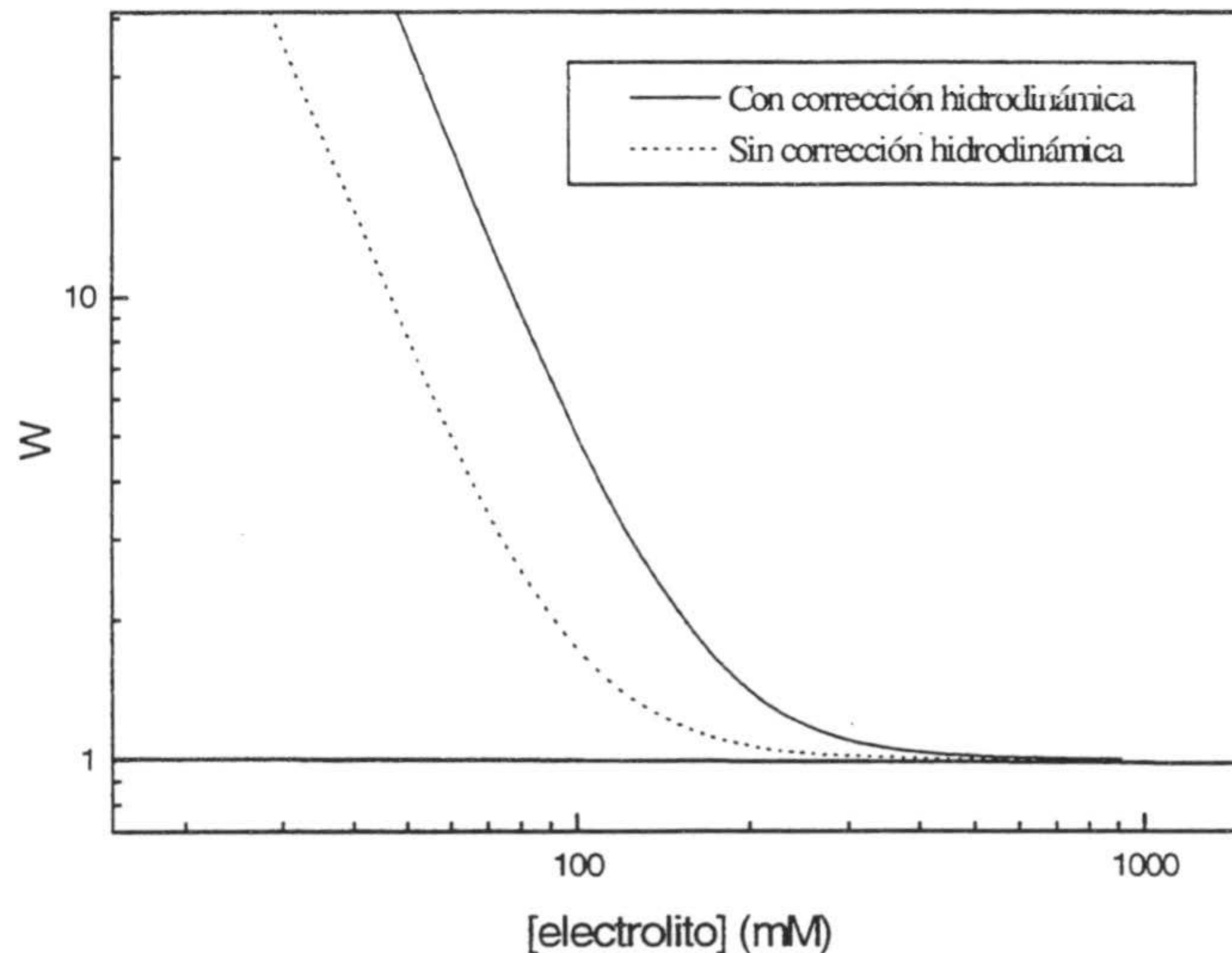
La expresión de la constante de agregación lenta se puede obtener a partir de la ecuación II.35 sin más que introducir el valor del potencial total de interacción  $V_T$  en lugar del potencial atractivo  $V_A$ , obteniendo una expresión similar a la ecuación II.36. Incluyendo las expresiones de la constante de agregación rápida y la lenta en el factor de estabilidad definido a través de la ecuación II.26, se obtiene (McGown et al., 1967):



$$W = \frac{\int_0^\infty \frac{\beta(H)}{(H+2a)^2} \exp \frac{V_T(H)}{k_B T} dH}{\int_0^\infty \frac{\beta(H)}{(H+2a)^2} \exp \frac{V_A(H)}{k_B T} dH} \quad (\text{II.38})$$

Esta expresión del factor de estabilidad es ampliamente utilizada en la física de los coloides (*Osmond et al., 1973; Barouch, 1988*). Su valor es 1 cuando la repulsión eléctrica está totalmente apantallada, es decir, en la situación de agregación rápida.

En figura II.12 se ha representado el factor de estabilidad frente a la concentración de electrolito según la ecuación II.38, incluyendo y sin incluir el factor hidrodinámico cuantificado a través de  $\beta(H)$ . La ecuación II.18 se ha empleado para  $V_A$  y la II.24 para  $V_E$ . El radio de las partículas es 95 nm,  $\psi_d = -15$  mV,  $A = 0.35 \times 10^{-20}$  J y  $\Delta = 0.095$  nm. La inclusión de la interacción hidrodinámica desplaza la curva hacia concentraciones de electrolito mayores. Aunque la constante de Hamaker y el potencial eléctrico son el mismo en ambos casos, el sistema coloidal es más estable como consecuencia del retardo hidrodinámico.



**Figura II.12.** Efecto de la interacción hidrodinámica en la estabilidad coloidal.

## 8. Influencia de la densidad de carga superficial sobre la estabilidad coloidal

Los coloides liofóbicos son coloidalmente estables cuando existe un potencial eléctrico lo suficientemente fuerte como para superar la atracción de van der Waals a la que se ven sometidas las partículas. Este potencial repulsivo depende de la fuerza iónica del medio y del potencial difuso de la doble capa eléctrica.

Variando la densidad de carga de las partículas se puede controlar el potencial superficial (y por tanto el potencial difuso). Hay dos formas posibles de llevar a cabo esto: i) utilizar diferentes cantidades de iniciador en la síntesis, ii) usar un monómero tipo ácido débil y modificar su densidad de carga con el pH del medio.

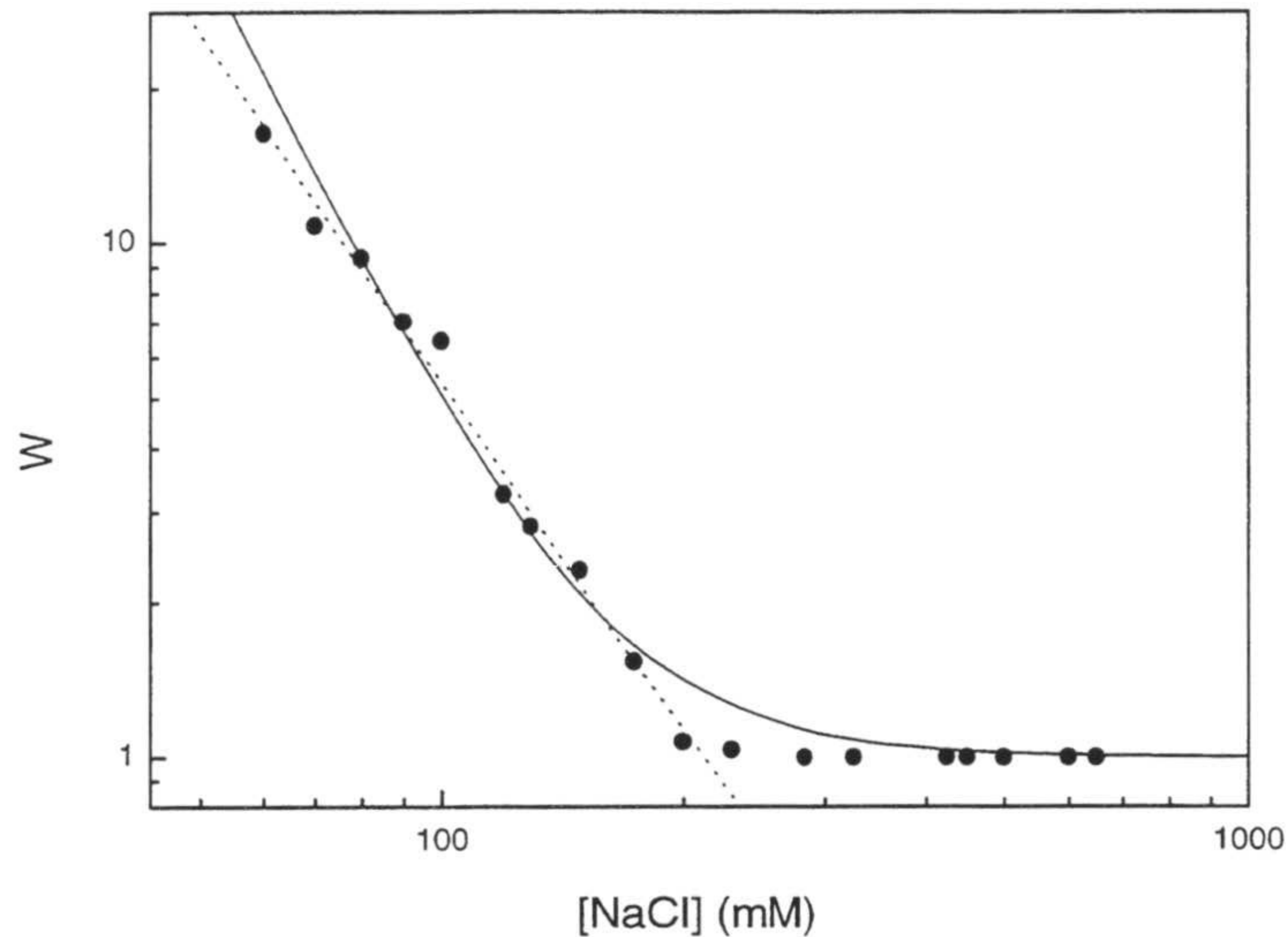
El objetivo de este apartado es estudiar la influencia de la densidad de carga superficial del látex sobre su estabilidad. Para ello, en primer lugar, estudiaremos la estabilidad de los látex JL1 y SN8, ambos con un tamaño muy parecido (diámetro cercano a 180 nm) pero con diferentes densidades de carga:  $-4 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  y  $-12.3 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ , respectivamente. En segundo lugar se investigará la influencia del pH sobre la estabilidad del látex carboxilo JL4.

### 8.a. Estabilidad coloidal de los látex JL1 y SN8

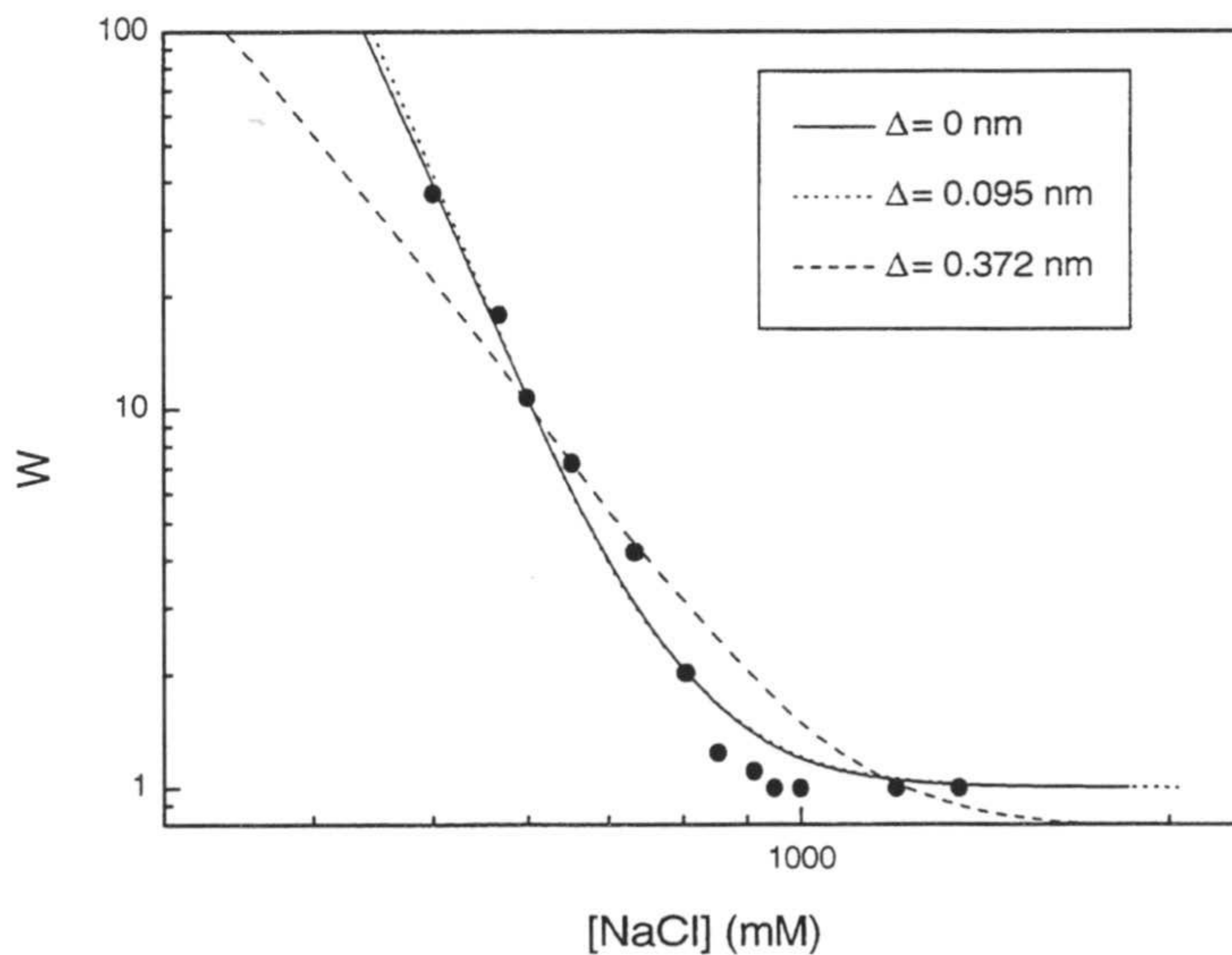
Los diagramas de estabilidad coloidal han sido obtenidos mediante el nefelómetro. Para cada concentración de electrolito se ha calculado su constante de agregación (procedimiento experimental previamente descrito) y se han obtenido los factores de estabilidad según la ecuación II.26.

Mediante un programa informático, cedido amablemente por Antonio Puertas y Manuel Servando de la Universidad de Almería, los resultados experimentales han sido ajustados a la ecuación teórica II.38, existiendo dos parámetros libres que son la constante de Hamaker ( $A$ ) y el potencial eléctrico difuso ( $\psi_d$ ). El ajuste se basa en que estos dos parámetros son independientes, el potencial eléctrico afecta a la pendiente de la curva, mientras que la constante de Hamaker lo hace sobre el punto de corte con el eje de abscisa.

Las figuras II.13 y II.14 corresponden a diagramas de estabilidad coloidal de los látex JL1 y SN8, respectivamente. Se han obtenido a partir de la dispersión para el ángulo de  $10^\circ$  y a pH 7. La concentración de partículas usada fue de  $3.05 \times 10^{10}$  part/ml y  $6.7 \times 10^{10}$  part/ml, respectivamente.



**Figura II.13.** Estabilidad coloidal del látex JL1.



**Figura II.14.** Estabilidad coloidal del látex SN8.

Reerink y Overbeek demostraron (*Reerink y Overbeek, 1954*), introduciendo varias aproximaciones, que existe una relación lineal entre  $\log W$  y  $\log$  (concentración de electrolito) para valores próximos a la *c.c.c.*

Esta linealidad se puede comprobar en la gráfica II.13 (para el látex SN8 no se ha representado la línea recta para no complicar la imagen). A partir del ajuste por mínimos cuadrados se puede obtener el valor de la *c.c.c.* de los látex, siendo de  $220 \pm 20$  mM para el JL1 y  $950 \pm 70$  mM para el SN8. El látex con más densidad de carga superficial es el que tiene la mayor estabilidad coloidal, dicha estabilidad se puede controlar a través del proceso de síntesis. Se ha estudiado la influencia del retardo electromagnético sobre  $V_A$ . Para ello los datos experimentales del látex JL1 fueron ajustados usando la ecuación teórica del factor de estabilidad II.38 y la expresión II.23 para calcular  $V_E$  (expresión que no tiene en cuenta el espesor de la capa de Stern). Para el potencial  $V_A$  se usaron las ecuaciones II.18 (no retardo) y II.20 (retardo). Los datos del ajuste aparecen en la tabla II.1

**Tabla II.1** Parámetros de ajuste obtenidos utilizando la teoría DLVO para el látex JL1.

	Sin retardo en $V_A$ (Ec. II.18)	Con retardo en $V_A$ (Ec. II.20)
$\psi_d$ (mV)	-14.19	-14.20
$A \times 10^{20}$ (J)	0.22	0.22

El efecto del retardo sobre el potencial atractivo de van der Waals es despreciable para nuestro sistema. El ajuste realizado con la expresión del potencial atractivo sin retardo ha tardado 15 minutos mientras que con retardo ha tardado 15 horas. En los cálculos que se van a realizar a lo largo de este trabajo, se utilizará el potencial atractivo de van der Waals que no tiene en cuenta el retardo electromagnético. Un resultado similar se ha obtenido con el látex SN8.

Para calcular el potencial de interacción eléctrico se puede utilizar la ecuación II.23 ó la ecuación II.24, que tiene en cuenta el espesor de la capa de Stern a través del parámetro  $\Delta$ . El valor de  $\Delta$  debe depender del tamaño del contraión adsorbido en

la capa de Stern. En este sentido, existe una gran controversia en la literatura en cuanto si se debería usar el radio hidratado o el no hidratado (*Bijsterbosch, 1978; Duckworth et al., 1978; Papenhuijen et al., 1985; Peula et al., 1997*). Es de suponer que en la práctica nos vamos a encontrar con situaciones intermedias a la total deshidratación/hidratación, dependiendo de las características del látex y el tipo de contraión.

Grygiel y colaboradores (*Grygiel et al., 1995*) han realizado recientemente un estudio acerca de las propiedades interfaciales de esferas de látex carboxiladas. En este trabajo se obtienen resultados acerca del estado de hidratación de los iones cuando interaccionan con la superficie. Para partículas con elevada carga superficial ( $-32.3 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ ) se obtienen resultados que indican la ausencia de agua entre el ión y la superficie, mientras que en partículas de baja densidad de carga ( $-2.6 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ ) los iones pierden sólo una parte de su agua de hidratación.

Los datos de estabilidad de los dos látex se han ajustado utilizando las expresiones II.23 y II.24, y considerando la situación de completa deshidratación ( $\Delta=0.096 \text{ nm}$ ) y total hidratación del  $\text{Na}^+$  ( $\Delta=0.372 \text{ nm}$ ) (*Israelachvili, 1991*). Los resultados de los ajustes aparecen en la tabla II.2.

**Tabla II.2** Potencial eléctrico y constante de Hamaker obtenidos utilizando la teoría DLVO para los látex JL1 y SN8 considerando una capa de Stern.

$\Delta$ (nm)	Látex JL1		Látex SN8	
	$\psi_d$ (mV)	$A \times 10^{20}$ (J)	$\psi_d$ (mV)	$A \times 10^{20}$ (J)
0	-14.19	0.22	-21.79	0.25
0.096	-14.81	0.33	-26.09	0.69
0.372	-20.20	1.39	-28.22	2.48

En la gráfica II.13 aparece el ajuste correspondiente a la situación de  $\Delta=0$  para el látex JL1. Las líneas de los otros dos ajustes de este látex eran prácticamente coincidentes con la representada. Sin embargo, para el látex SN8 el ajuste con  $\Delta=0.372$  es muy malo (ver figura II.14).

Como se puede observar de la tabla II.2, el potencial difuso es mayor para el látex SN8 tal y como cabría esperar, pues es el que tiene una mayor densidad de carga.

La inclusión de la capa de Stern provoca un aumento de la constante de Hamaker, siendo mayor al aumentar el tamaño del contraión adsorbido sobre la capa. De igual forma el potencial difuso también aumenta pero de forma más moderada.

Llegado este punto es interesante buscar algún criterio que nos permita elegir el ajuste más adecuado.

La primera vía de discriminación podría ser la comparación de la constante de Hamaker obtenida con el valor teórico para la interacción poliestireno-agua-poliestireno.

Los valores de la “constante” de Hamaker que podemos encontrar en la bibliografía varían dentro del margen comprendido entre  $10^{-20}$  J y  $10^{-21}$  J. Así por ejemplo se han obtenido los siguientes valores (en  $10^{-20}$ J): 0.1-1.1 (*Otewill et al., 1966*), 0.1-0.5 (*Schild et al., 1978*), 0.2-1.1 (*Watillon et al., 1961*), 0.1-0.6 (*Curtisy et al., 1970*), 0.3-0.8 (*Goldstein et al., 1971*), 0.2-0.9 (*Ortega, 1995a*), 0.1-1.2 (*Romero, 1998b*). Se puede comprobar como los valores bibliográficos de la “constante” de Hamaker son muy variados. Visser (*Visser, 1972*) realizó una revisión de los diferentes métodos usados para calcular la constante de Hamaker y los comparó con los valores propuestos teóricamente. Este autor concluye que las diferencias existentes se deben al uso de teorías incompletas.

La expresión de la constante de Hamaker teórica para la interacción entre dos fases iguales 1 a través de un medio 3, fue obtenida por Russel y colaboradores (*Russel et al., 1989*) a partir de la teoría de Lifshitz:

$$A_{131} = A_{v=0} + A_{v \geq 1} = \frac{3}{4} k_B T \left( \frac{\epsilon_1 - \epsilon_3}{\epsilon_1 + \epsilon_3} \right)^2 + \frac{2h\nu_e}{16\sqrt{2}} \frac{(n_1^2 - n_3^2)^2}{(n_1^2 + n_3^2)^{3/2}} \quad (\text{II.39})$$

donde  $h$  es la constante de Planck.

El primer término de esta ecuación ( $A_{v=0}$ ) corresponde a la energía de frecuencia cero de la interacción de van der Waals e incluye la contribución dipolar de Keeson y Debye. El segundo término ( $A_{v \geq 1}$ ) corresponde a la energía de dispersión e incluye la contribución de London.

Según esta ecuación, para calcular la constante de Hamaker de la interacción poliestireno-agua-poliestireno es necesario conocer la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ) y el índice de refracción de ambos medios, así como la frecuencia de absorción característica del poliestireno en el UV ( $\nu_e$ ).

En la siguiente tabla podemos encontrar los datos que necesitamos para calcular la constante de Hamaker (*Bowen et al., 1995*). A partir de estos datos y con la ecuación II.39 se obtiene el siguiente valor para la interacción poliestireno-agua-poliestireno:

$$A_{131} = A_{\nu=0} + A_{\nu \geq 1} = 0.266 \times 10^{-20} + 1.113 \times 10^{-20} = 1.379 \times 10^{-20} \text{ J}$$

**Tabla II.3** Datos espectroscópicos del agua y el poliestireno.

Material	$\epsilon$ (a 20°C)	$n^2$	$\nu_e$ ( $\times 10^{16}$ rad s <sup>-1</sup> )
Agua	79.67	1.762	1.992
Poliestireno	2.557	2.554	1.535

Este valor ha sido posteriormente confirmado por Prieve y Russel (*Prieve et al., 1988*).

Es importante resaltar que la expresión II.39 permite obtener la constante de Hamaker no retardada. El término  $A_{\nu=0}$  permanece constante, no sufriendo el retardo electromagnético. Sólo el término dispersivo ( $A_{\nu \geq 1}$ ) se ve afectado por el retardo a través del siguiente factor:

$$F(D) = \frac{4\sqrt{2}}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{(1+2Dx)e^{-2Dx}}{(1+2x^2)^2} dx \quad (\text{II.40})$$

donde

$$D = n_3(n_1^2 - n_3^2)^{1/2} \frac{H\nu_e}{c} \quad (\text{II.41})$$

siendo  $H$  la distancia entre la superficie de las dos partículas y  $c$  la velocidad de la luz en el vacío.

Una expresión aproximada de la ecuación II.40 es:

$$F(D) = \left[ 1 + \left( \frac{\pi D}{4\sqrt{2}} \right)^{3/2} \right]^{-2/3} \quad (\text{II.42})$$

Según este planteamiento la constante de Hamaker no es tal constante, sino que depende de la distancia de separación entre las dos partículas. Sin embargo cuando se ha calculado la constante de Hamaker con retardo no hemos encontrado diferencias apreciables con la constante sin retardar.

La inmensa mayoría de los valores de la constante de Hamaker obtenidos experimentalmente son inferiores al valor obtenido a partir de la teoría de Lifshitz.

Un efecto que hay que considerar es la influencia de la concentración de electrolito. No debemos de olvidar que el medio en el que se produce la interacción entre las partículas de poliestireno es una disolución electrolítica. En este caso los campos electromagnéticos se apantallan debido a la polarización de los iones. Tan sólo el término  $A_{v=0}$  sufre el apantallamiento por el electrolito. El término dispersivo no se apantalla debido a que los iones no se polarizan a frecuencias tan altas. Mahanty y colaboradores (*Mahanty et al., 1976*) han demostrado que el efecto de la existencia de un electrolito en el medio se puede cuantificar mediante la multiplicación del término  $A_{v=0}$  por:

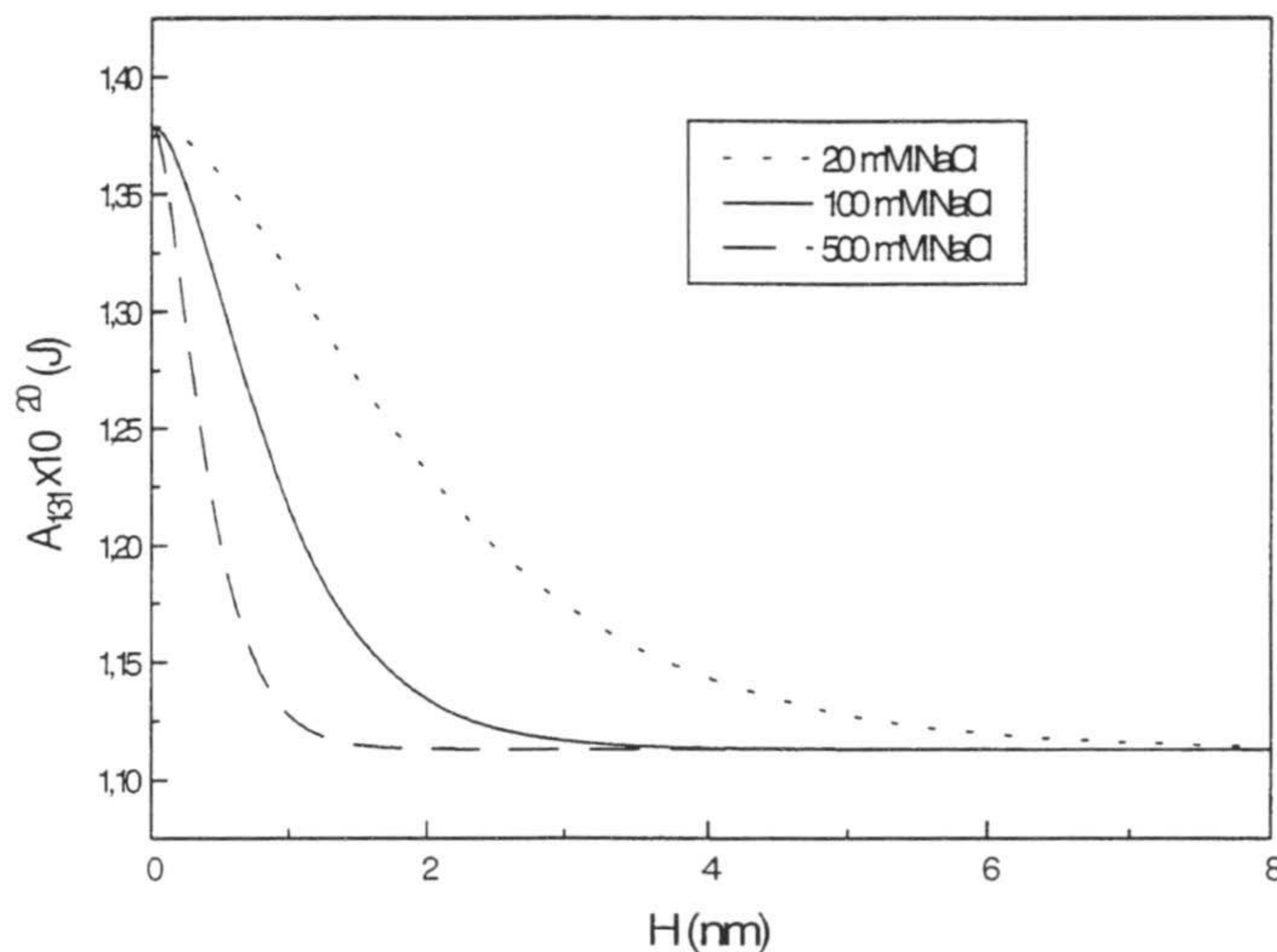
$$(1 + 2\kappa H) \exp(-2\kappa H) \quad (\text{II.43})$$

donde  $\kappa$  es la longitud de Debye.

En la gráfica II.15 se muestra el efecto de la concentración de NaCl sobre la constante de Hamaker, obtenido a partir de la ecuación II.39 y II.43.

El apantallamiento de la constante de Hamaker aumenta con la distancia entre las partículas y con la concentración electrolito. Para distancias grandes el término  $A_{v=0}$  puede llegar a estar totalmente apantallado, siendo  $A_{131} = A_{v \geq 1} = 1.113 \times 10^{-20}$  J, mientras que a distancias pequeñas el valor de la constante está próximo a la constante no apantallada ( $1.379 \times 10^{-20}$  J). Teóricamente, por efecto de la concentración de electrolito la constante de Hamaker puede llegar a disminuir hasta un 20%.





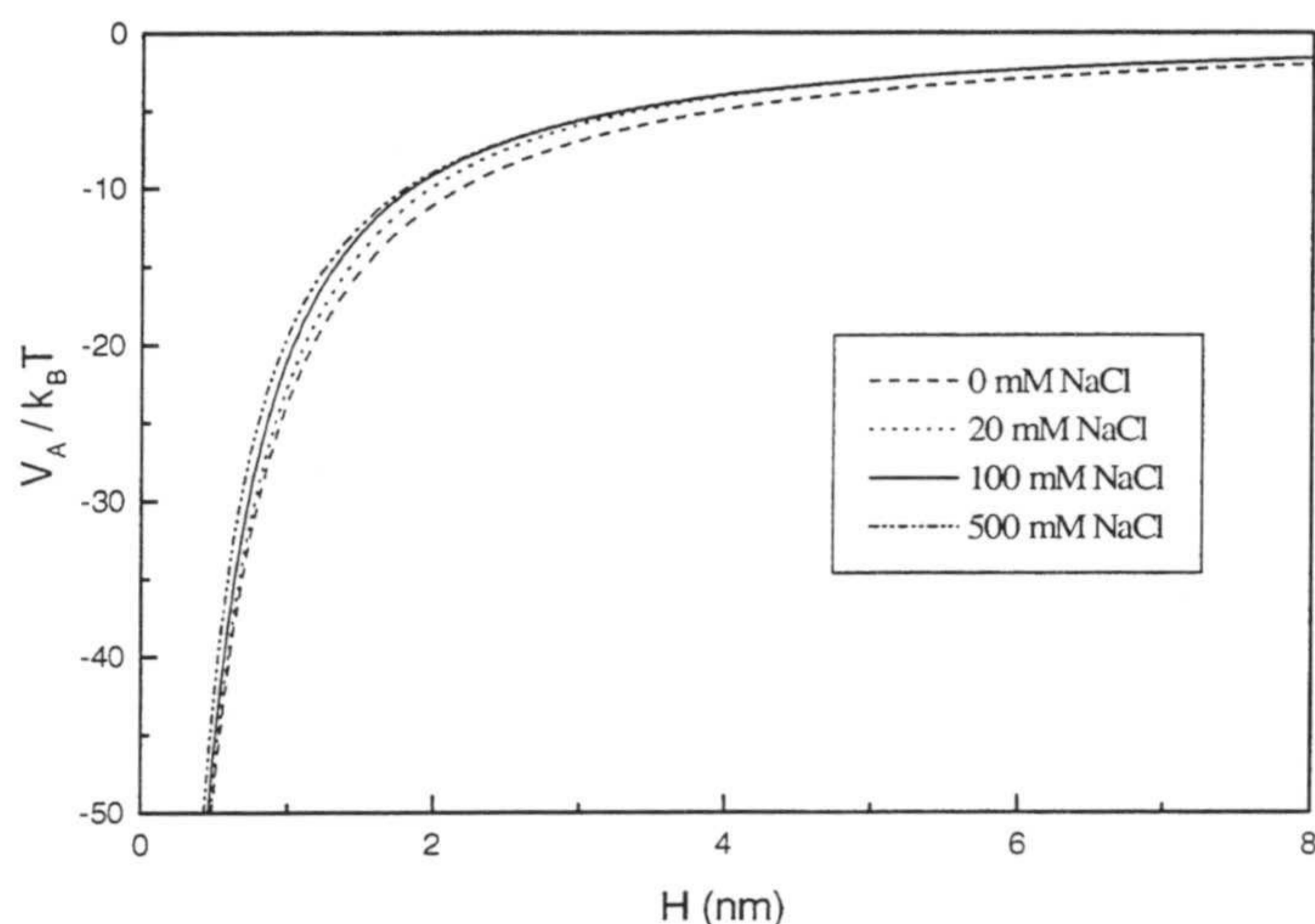
**Figura II.15.** Efecto de la fuerza iónica sobre la constante de Hamaker.

Toda las ecuaciones utilizadas hasta ahora corresponden a la constante de Hamaker del poliestireno sin carga eléctrica. Sin embargo nuestras partículas están constituidas por poliestireno cargado. Posiblemente esta carga produzca un mayor apantallamiento de la constante de Hamaker que habría que sumárselo al producido por el electrolito presente en la dispersión. Así por ejemplo Feke (*Feke et al., 1985*) ha obtenido una constante de Hamaker para partículas de poliestireno  $0.48 \times 10^{-20}$  J a una concentración de electrolito de 0.6 M NaCl.

A la vista de todos estos comentarios se puede admitir que no tenemos un valor teórico definitivo de la constante de Hamaker para partículas de poliestireno.

¿Cuál es el efecto de este apantallamiento del electrolito sobre el potencial de interacción de van der Waals?. Para responder a esta pregunta basta con observar la gráfica II.16 en la que se ha representado  $V_A$  a partir de los valores de  $A_{131}$  que aparecen en la figura II.15.

La influencia de la fuerza iónica sobre el potencial de van der Waals es pequeña. Para una distancia de aproximadamente 2 nm el efecto de la concentración iónica es máximo, alcanzando un 12%.



**Figura II.16.** Efecto de la fuerza iónica sobre el potencial de van der Waals para el látex JL1.

La mayor contribución al factor de estabilidad expresado a través de la ecuación II.38 se debe al máximo del potencial de interacción total (*Verwey et al., 1948; Hiemenz et al., 1997*). La posición de esta barrera, en la mayoría de los casos, suele estar alrededor de los 0.5 nm. A esta distancia, según la gráfica II.16, la diferencia máxima entre el potencial atractivo con y sin efecto de la fuerza iónica es del 3%.

Cuando se van a ajustar los datos experimentales del factor de estabilidad a la ecuación II.38 se puede suponer nulo el efecto de la fuerza iónica sobre  $V_A$ .

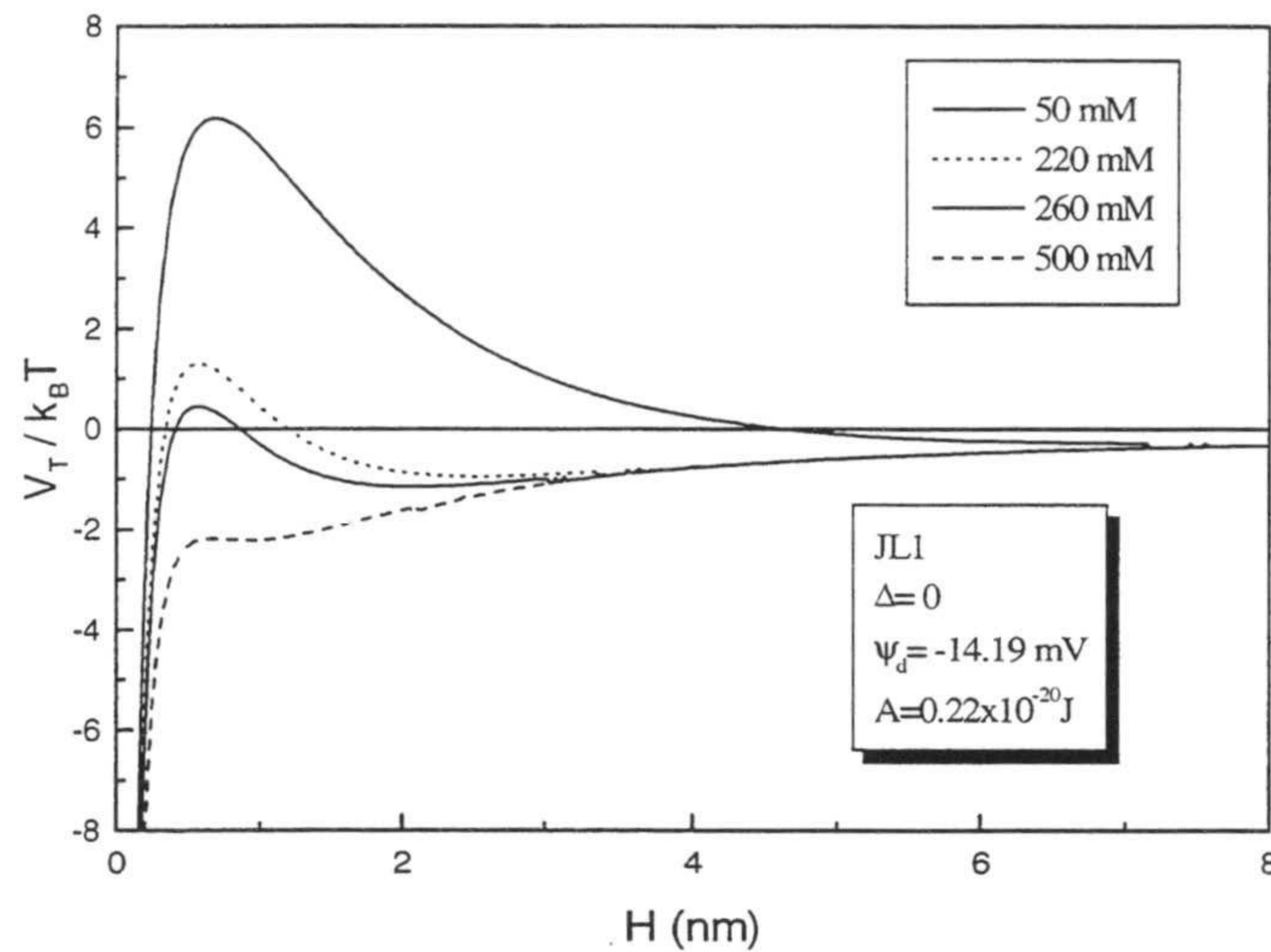
Al no existir un valor teórico de la constante de Hamaker para nuestros sistemas no se puede utilizar este criterio para elegir el ajuste más adecuado.

Otra posibilidad surge al representar los diagramas de potencial total de interacción obtenidos a partir de los valores del potencial difuso y la constante de Hamaker resultantes del ajuste. Estos diagramas deben explicar los datos experimentales de estabilidad.

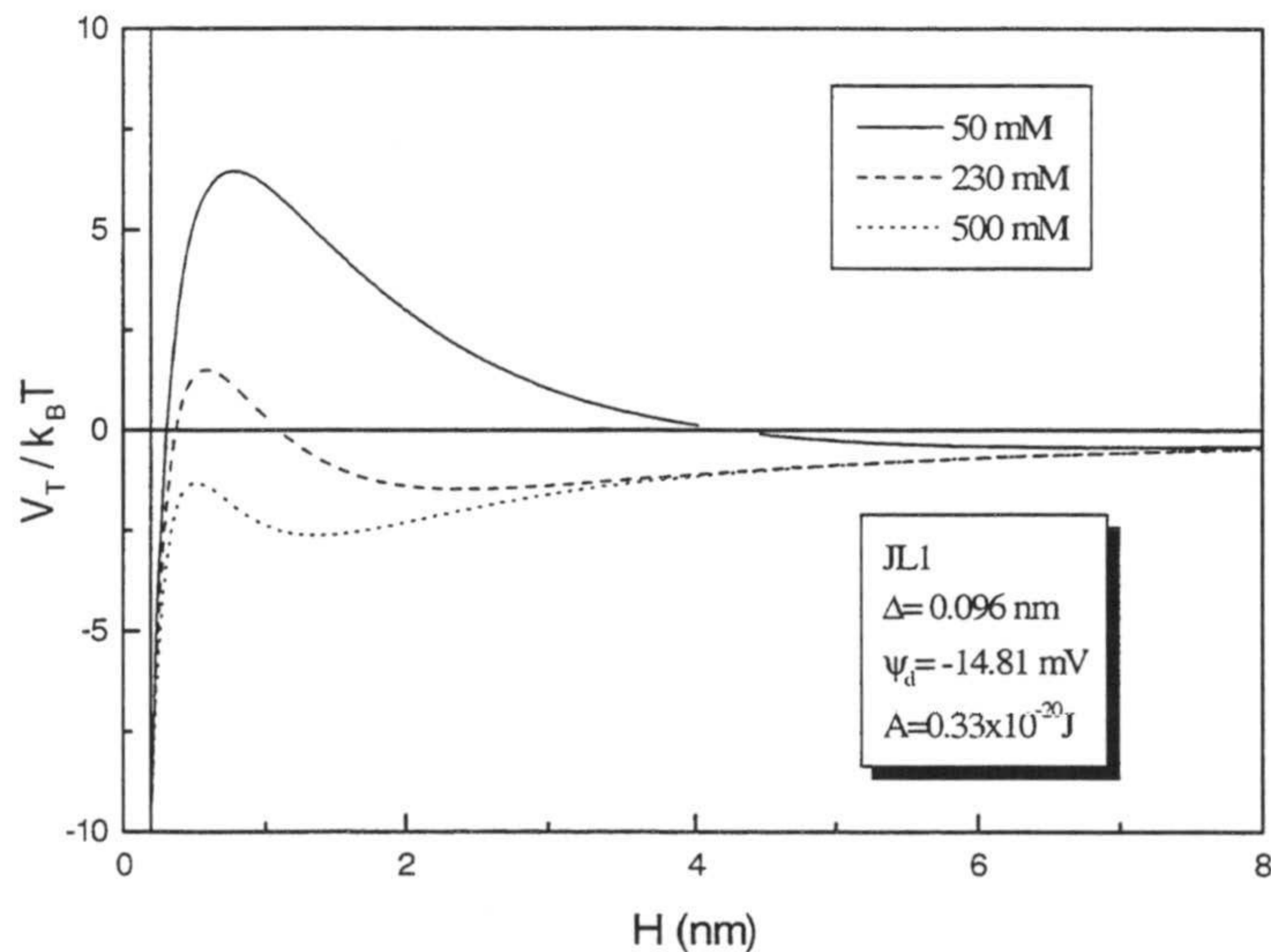
A continuación aparecen los diagramas de interacción del látex JL1 obtenidos a partir de los tres ajustes llevados a cabo.

En el caso de  $\Delta=0$  (figura II.17) para concentraciones superiores a la c.c.c. existe una barrera energética que dificulta la agregación. Para la concentración de

electrolito de 220 mM la barrera es de 1.4  $k_B T$ , siendo de 0.4  $k_B T$  para 260 mM. La agregación rápida se debe alcanzar cuando la barrera energética es igual o inferior a 1  $k_B T$ . Según el diagrama de potencial total de interacción, la c.c.c. del látex debería estar comprendida entre 220 mM y 260 mM. El valor experimental obtenido es de  $220 \pm 20$  mM.



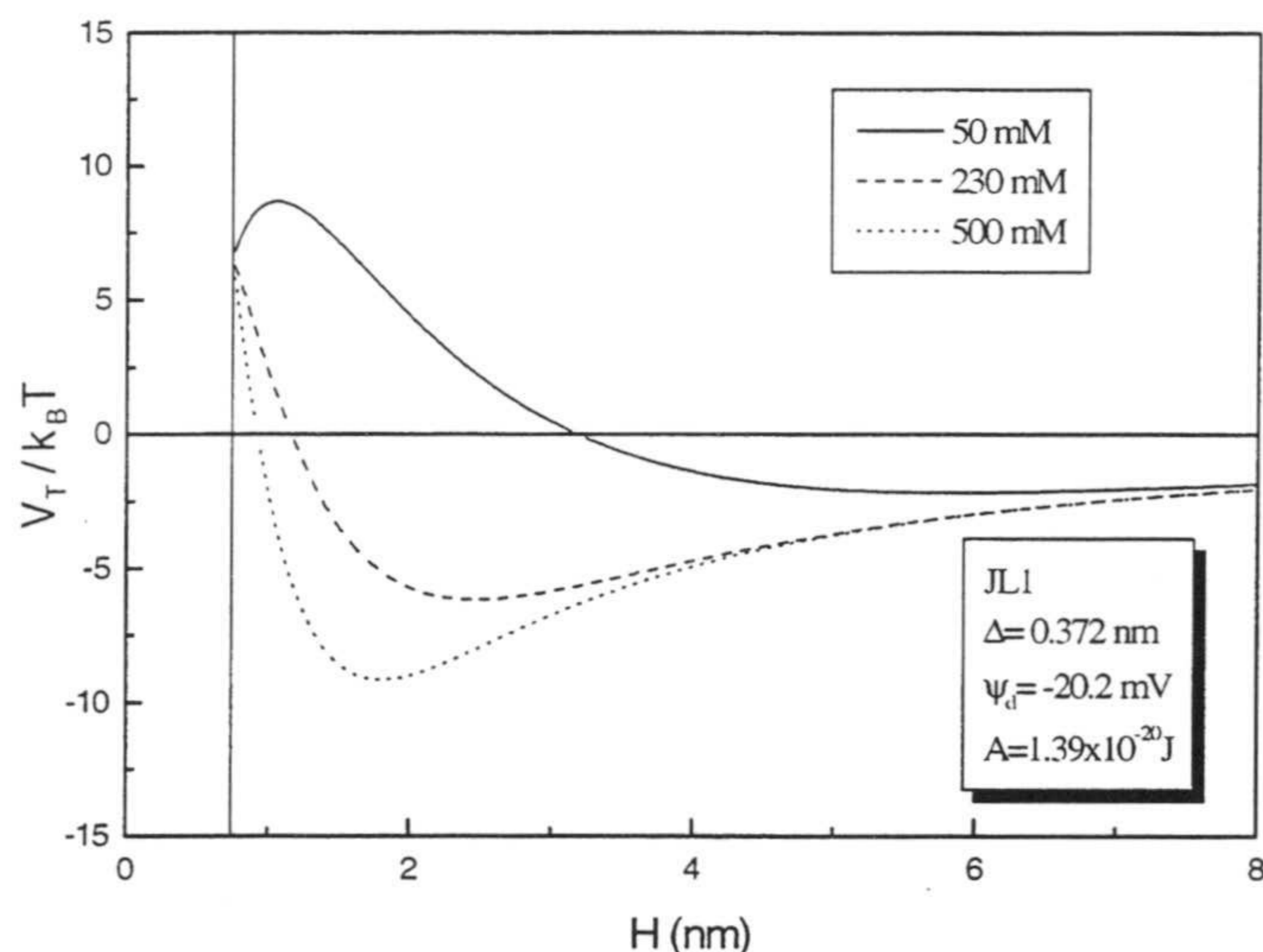
**Figura II.17.** Potencial total de interacción para el látex JL1 sin considerar capa de Stern.



**Figura II.18.** Potencial total de interacción para el látex JL1 con  $\Delta=0.096$  nm.

Las partículas en su colisión no se pueden acercar a una distancia inferior a  $2\Delta$  cuando se considera una capa de Stern de espesor  $\Delta$ . Por ese motivo se ha introducido una línea para los diagramas en los que se ha tenido en cuenta la capa de Stern.

Los potenciales de interacción de la figura II.18 también pueden explicar los datos experimentales de estabilidad coloidal. La barrera energética para 220 mM es de  $1.46 k_B T$ .

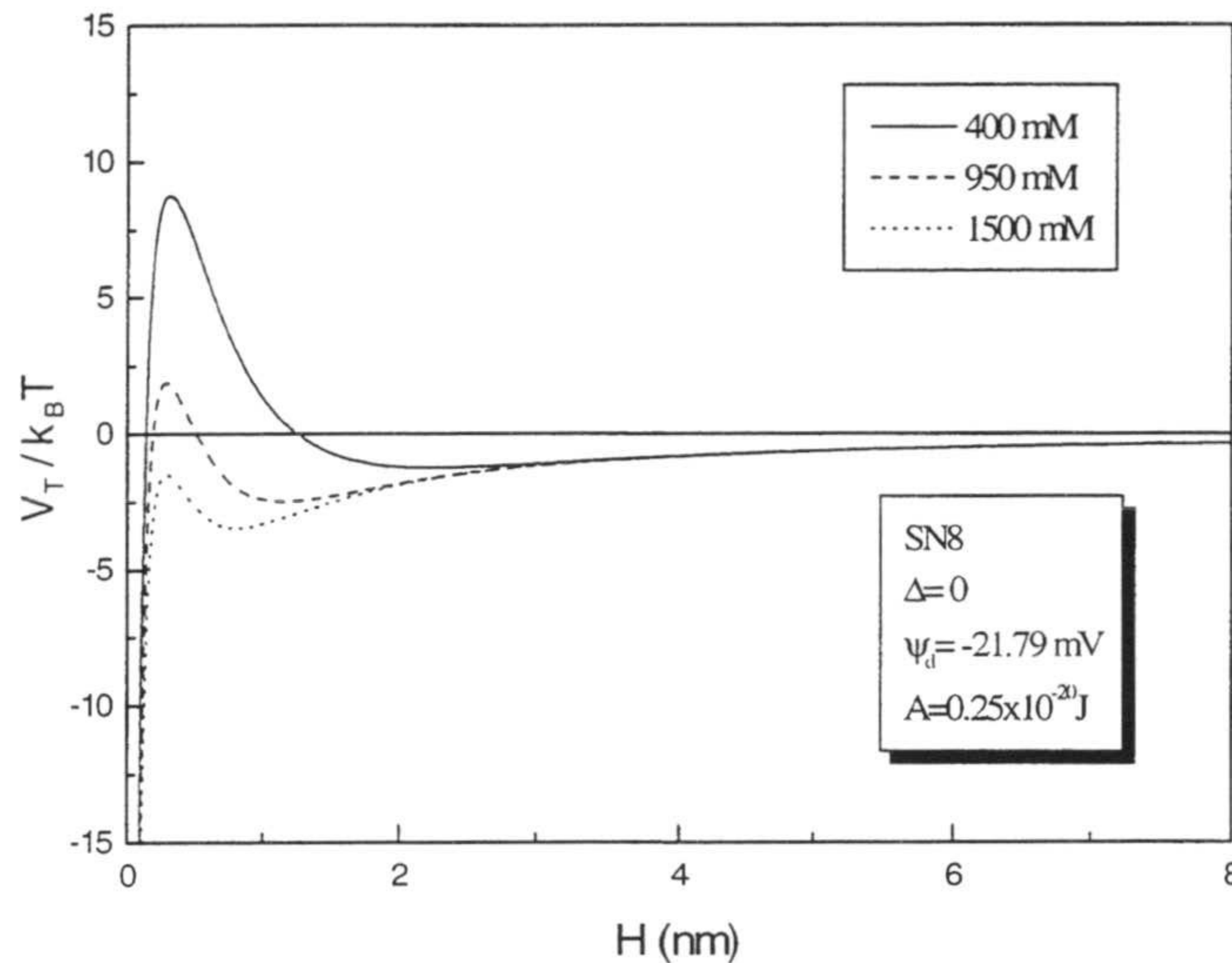


**Figura II.19.** Potencial total de interacción para el látex JL1 con  $\Delta=0.372$  nm.

Cuando el contraión está completamente hidratado el diagrama de potencial correspondiente no puede explicar la estabilidad observada. Aunque no se coloque la distancia mínima de aproximación ( $2\Delta$ ) existe una barrera energética para todas las concentraciones de electrolito estudiadas.

Los potenciales de interacción para el látex SN8 sin considerar el espesor de la capa de Stern aparecen en la figura II.20.

La altura de la barrera para 950 mM es de  $1.6 k_B T$ , cuando la c.c.c. obtenida experimentalmente es de  $950 \pm 70$  mM. Este diagrama explicaría la estabilidad del látex. Las mismas conclusiones que para el látex JL1 se obtienen cuando se introduce la corrección del espesor de Stern. La estabilidad no se puede explicar considerando que el contraión está hidratado.



**Figura II.20.** Potencial total de interacción para el látex SN8 sin considerar capa de Stern.

Evidentemente una capa de Stern en torno a nuestras partículas coloidales debe de existir. Su espesor estará relacionado con el tamaño del contraión, pero también dependerá de las características superficiales de la partículas del látex.

La partícula de poliestireno presenta grupos iónicos distribuidos de forma heterogénea a lo largo de la superficie. Los contraiones, que definirán la capa de Stern, también estarán distribuidos de forma heterogénea apantallando a estos grupos. Así que hablar de una capa de Stern homogénea de un espesor definido dependiente sólo del tamaño del contraión pierde sentido. Por otra parte, la superficie de una partícula de látex no es lisa. Una esfera de látex es realmente un ovillo de polímeros que incluso puede presentar cadenas oligoméricas en su superficie, tal y como se apuntó en el capítulo anterior.

Bijsterboch (*Bijsterboch, 1978*) realizó el cálculo de la constante de Hamaker en diversos sistemas tipo látex teniendo en consideración distintos espesores de la capa de Stern. Este autor encontró unos valores de la constante de Hamaker más afines con el valor considerado por él como teórico cuando tiene en cuenta que no hay moléculas de agua entre el ión y la superficie.

Spitzer (*Spitzer, 1982*) indicó que al aumentar la fuerza iónica del medio se produce una disociación en la carga de Stern de forma que sólo una fracción de los contraiones asociados a la superficie da lugar a dicha capa de Stern.

Teniendo en cuenta estos trabajos y los resultados obtenidos para los dos látex estudiados en este apartado, se ha decidido utilizar la expresión del potencial electrostático que no considera la capa de Stern, y la expresión que si la tiene en cuenta pero usando un espesor igual al radio del catión deshidratado.

Llama la atención el acuerdo existente entre teoría y experimento a pesar de las aproximaciones sobre las que se basa la teoría DLVO.

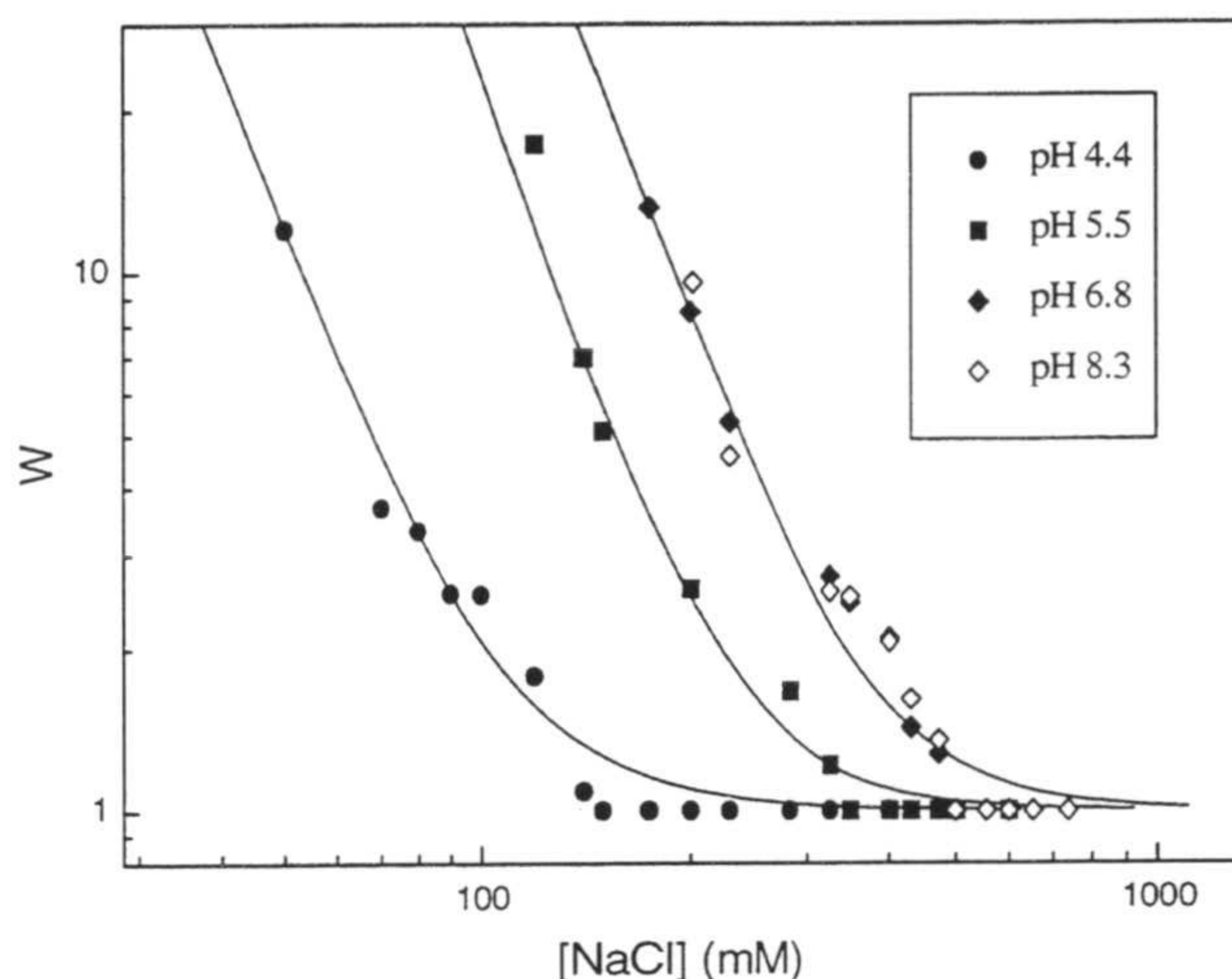
Actualmente esta teoría de la estabilidad coloidal, a pesar de sus limitaciones, ocupa una posición central en la ciencia coloidal, pudiéndose completar mediante parámetros correctores como el espesor de la capa de Stern. Para Hunter (*Hunter, 1987*) "la teoría DLVO es para esta ciencia lo que la ecuación de van der Waals es para los gases reales", ya que ha permitido hacer numerosas y útiles incursiones en otros campos del mundo de los coloides.

#### *8.b. Estabilidad coloidal del látex carboxilo JL4*

La densidad de carga de un látex carboxilo aumenta con el pH debido a la desprotonación de los grupos ácido débil superficiales de la partícula. Este cambio debe influir en la estabilidad del coloide, que debe así mismo aumentar con el pH.

Se ha estudiado la estabilidad coloidal del látex carboxilo JL4 en función del pH. La concentración de partículas usada en los experimentos fue de  $1.22 \times 10^{10}$  part/ml. Los factores de estabilidad se obtuvieron a partir de la dispersión a 20°.

En la figura II.21 se muestra la dependencia del factor de estabilidad con la concentración de NaCl en diferentes pHs. Los datos han sido ajustados a la expresión teórica del factor de estabilidad (ecuación II.38), sin considerar la existencia de una capa de Stern. Los valores de la constante de Hamaker y el potencial difuso obtenidos aparecen en la tabla II.3. A partir del ajuste por mínimos cuadrados de la zona de agregación lenta se han obtenido los valores correspondientes de la *c.c.c.*



**Figura II.21.** Estabilidad coloidal del látex JL4 a diferentes pHs.

Al añadir el látex al tampón de pH 3 se produjo la agregación inmediata del mismo. A este pH la densidad de carga de las partículas es nula porque todos los grupos carboxilo se encuentran protonados. Al no existir un potencial repulsivo electrostático el coloide es inestable.

**Tabla II.3** Potencial eléctrico y constante de Hamaker obtenidos utilizando la teoría DLVO para el látex JL4.

pH	c.c.c. (mM)	$\psi_d$ (mV)	$A \times 10^{20}$ (J)
4.4	150±20	-10.77	0.15
5.5	350±50	-11.40	0.12
6.8	520±30	-11.25	0.09
8.3	510±30	-11.09	0.09

La estabilidad del látex aumenta con el pH debido a la desprotonación de los grupos carboxilo. A pH 6.8 y 8.3 los diagramas de estabilidad coinciden. Es de suponer que a pHs próximos a 6.8 los grupos carboxilos ya están completamente desprotonados y un aumento del pH no produce un incremento en la estabilidad.

Resulta curioso que aunque la densidad de carga del látex esté aumentando con el pH, el potencial difuso permanece prácticamente constante. Por otra parte la constante de Hamaker, que no debería variar con el pH por tratarse del mismo látex, disminuye con el mismo. Resultados similares han sido obtenidos por diferentes autores (*Ortega, 1995a; Puertas et al., 1998; Romero, 1998*).

Si recordamos los datos de estabilidad del látex SN8, éstos eran: *c.c.c.* 950 mM,  $A=0.25 \times 10^{-20}$  J y  $\psi_d = -21.8$  mV, mientras que para el látex JL1 se obtuvo: *c.c.c.* 220 mM,  $A=0.22 \times 10^{-20}$  J y  $\psi_d = -14.2$  mV. En esta ocasión al aumentar la densidad de carga del látex se produce un aumento del potencial eléctrico, tal y como cabría esperar, y aproximadamente la misma constante de Hamaker.

Sin embargo para los látex carboxilo el potencial eléctrico no varía con la densidad de carga de la partícula mientras que la constante de Hamaker disminuye con la densidad de carga.

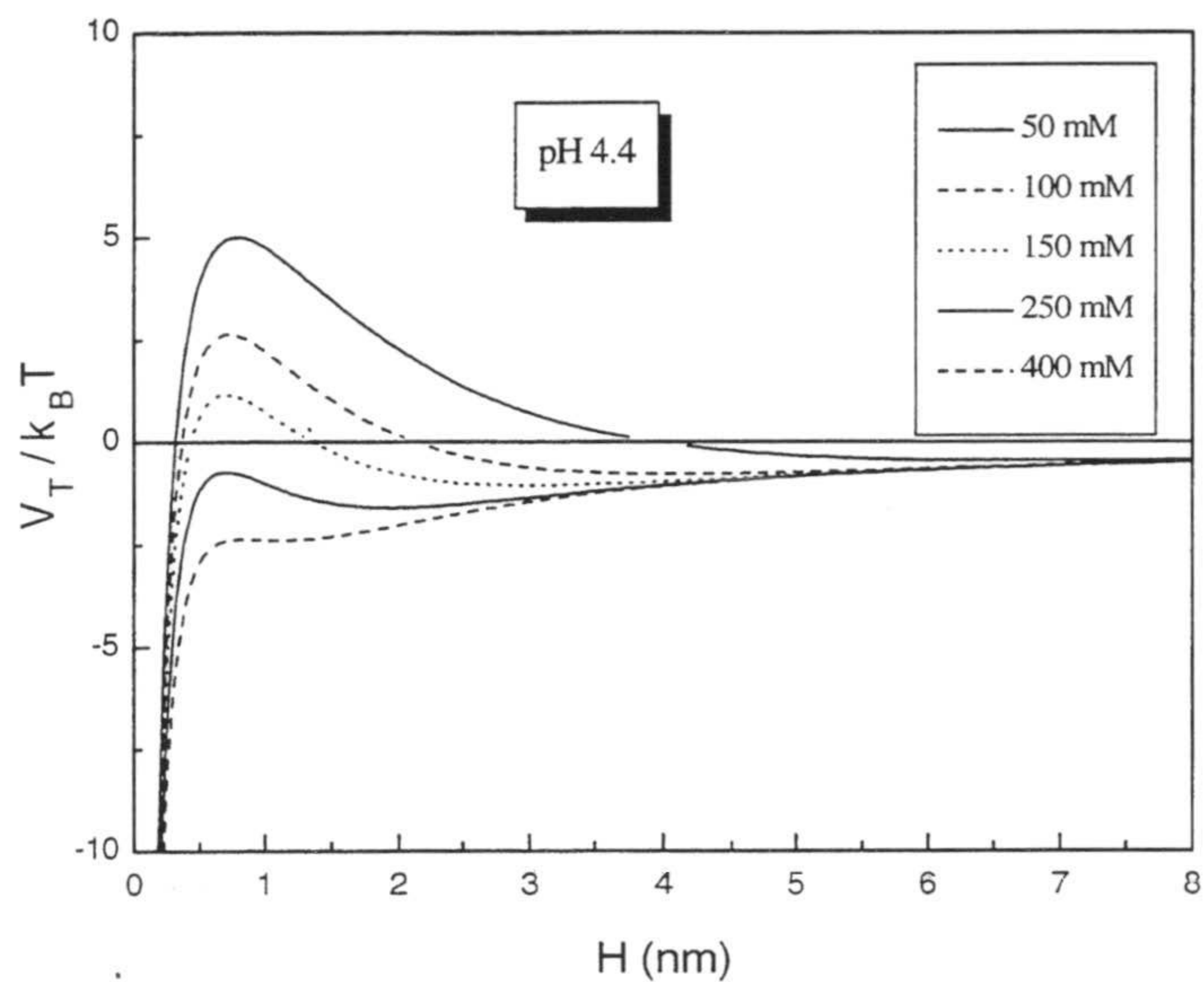
No hemos encontrado una explicación definitiva para este hecho. La explicación debe de estar relacionada con la constante de Hamaker del sistema y con la diferente naturaleza del grupo cargado superficial del látex. Para los látex JL1 y SN8 el grupo es un ácido fuerte (sulfato y sulfonato) mientras que para el JL4 es un ácido débil (carboxilo). Este último puede presentar cadenas oligoméricas en su superficie que estén afectando a su estabilidad. Otra posibilidad es ajustar los datos experimentales considerando la existencia de una capa de Stern cuyo espesor depende del pH del medio (de la densidad de carga del látex).

A partir de los parámetros ajustados se han construido los correspondientes diagramas de potencial de interacción con el fin de comprobar si la estabilidad puede ser explicada (figuras II.22, II.23 y II.24)

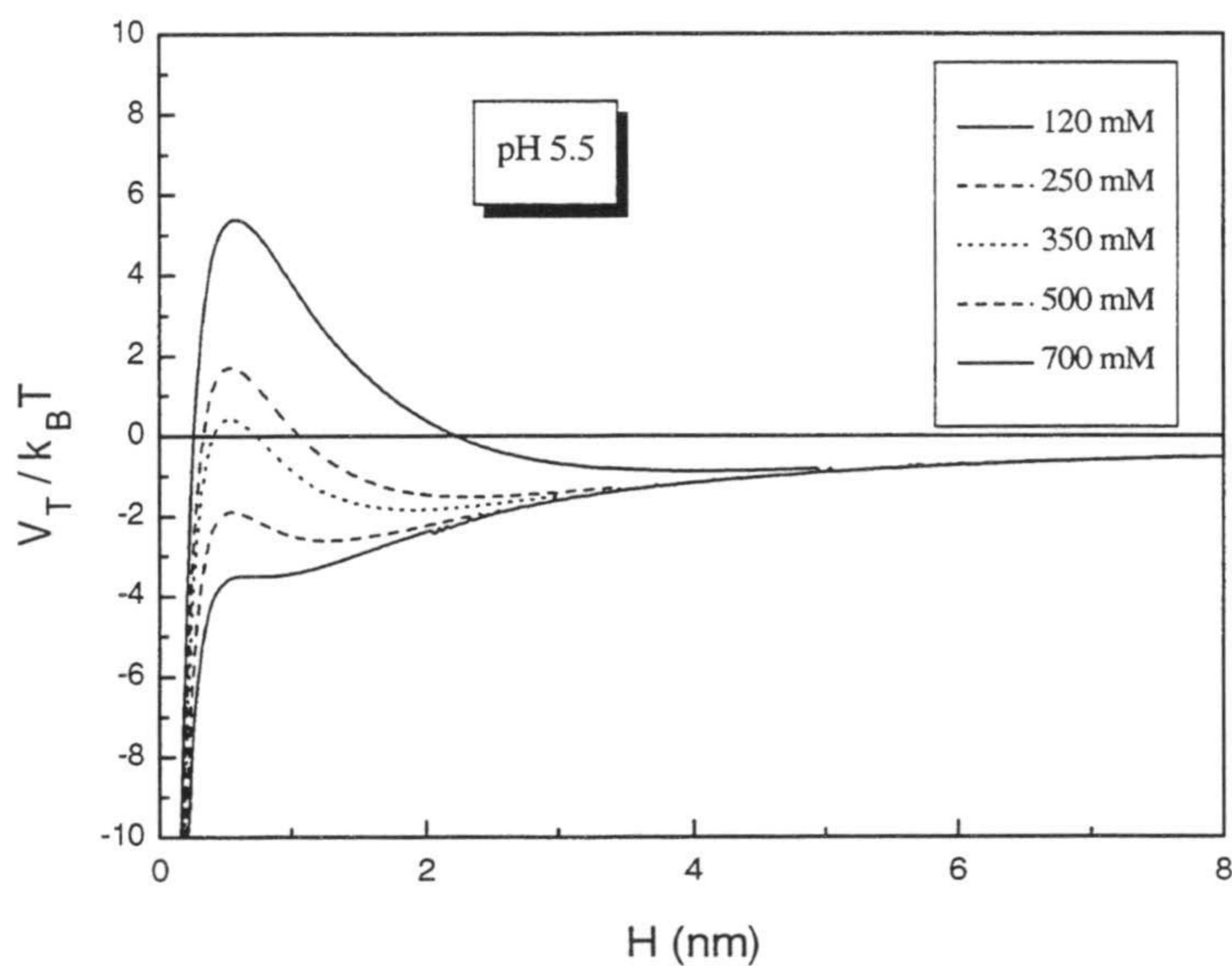
El diagrama de potenciales para pH 8.3 es similar al de pH 6.8 ya que tienen la misma constante de Hamaker y potencial difuso.

La altura de la barrera para las concentraciones de electrolito iguales a la *c.c.c.* experimental para cada pH son: pH 4.4, 1.1  $k_B T$ ; pH 5.5, 0.43  $k_B T$ ; pH 6.8, 0.74  $k_B T$ . En todos los casos el valor de la barrera es igual o inferior a 1  $k_B T$ . La *c.c.c.* teórica deducida de estos diagramas se corresponde con la experimental.

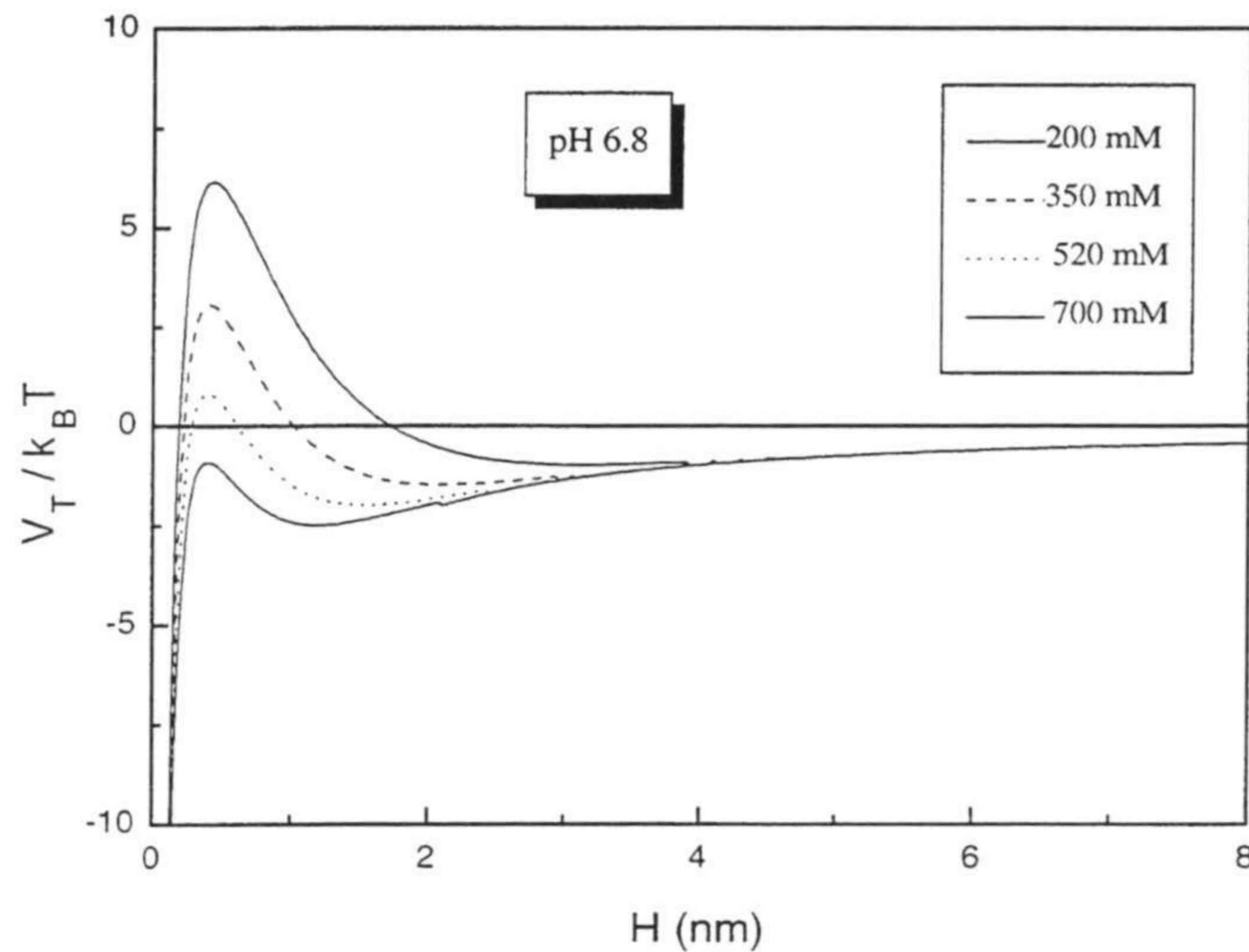




**Figura II.22.** Potencial total de interacción para el látex JL4 a pH 4.4.



**Figura II.23.** Potencial total de interacción para el látex JL4 a pH 5.5.



**Figura II.24.** Potencial total de interacción para el látex JL4 a pH 6.8.

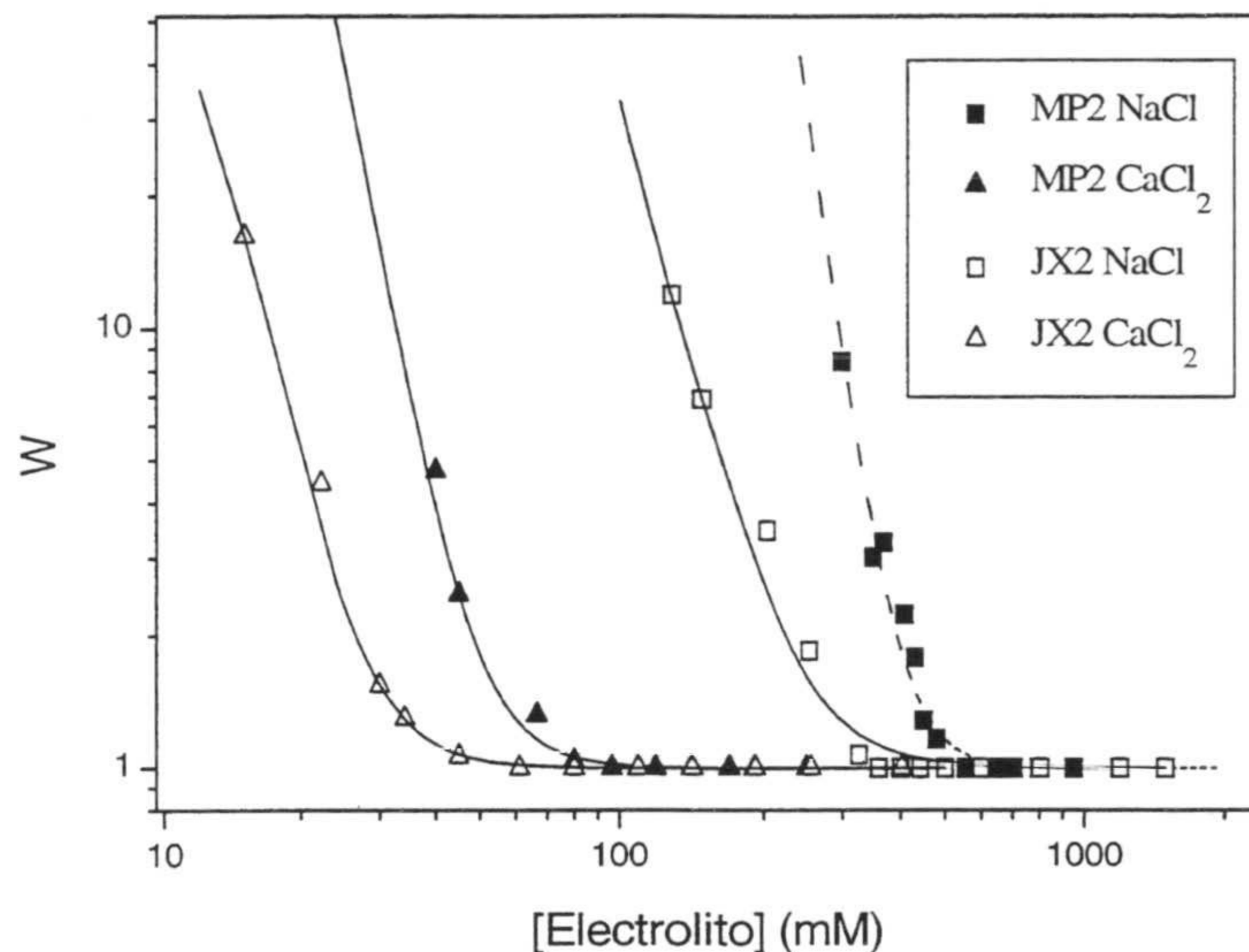
### 9. Influencia de la valencia del contraión en la estabilidad coloidal

Desde el siglo pasado se sabía que el poder coagulante de una sal dependía fuertemente de la valencia del contraión. Esta idea se conoce como regla de Schulze-Hardy en honor al primer científico que la formuló (*Schulze, 1882; 1883*). Sin embargo, hasta que medio siglo después apareció la teoría DLVO no se ha podido explicar teóricamente este hecho.

Se ha estudiado la estabilidad coloidal de los látex JX2 y MP2 usando NaCl y CaCl<sub>2</sub> como agentes coagulantes con el fin de comprobar si la teoría DLVO puede explicar los resultados experimentales. El pH del medio de agregación fue 7. En la figura II.25 se muestran los factores de estabilidad para cada látex y electrolito.

El poder coagulante de cada contraión queda de manifiesto si analizamos los valores de la *c.c.c.* obtenidos para cada electrolito. Estos son: 340±40 mM NaCl y 40±8 mM CaCl<sub>2</sub> para el látex JX2; 500±40 mM NaCl y 75±8 mM CaCl<sub>2</sub> para el látex MP2. La relación entre estas concentraciones críticas es 100:11 para el JX2 y 100:15 para el MP2, en acuerdo con la relación aproximada 100:10 encontrada por otros

autores (Ottewill et al., 1966; Jayasuriya et al., 1985; Molina et al., 1989; Carrique, 1989).



**Figura II.25.** Dependencia del factor de estabilidad con la valencia del contraión para los látex JX2 y MP2.

La relación obtenida para el MP2 es un poco superior a la referenciada, y una posible explicación la podemos encontrar en la agregación en mínimos secundarios como se comentará en la siguiente sección del capítulo. La teoría DLVO predice que cuando  $ze\psi_d/4k_B T \gg 1$  la c.c.c. es proporcional a  $z^{-6}$ , mientras que para potenciales eléctricos bajos ( $ze\psi_d/4k_B T < 1$ ) es proporcional a  $z^{-2}$ , siendo  $z$  la carga del contraión (Elimelech et al., 1995). El potencial difuso para los látex JX2 y MP2 es aproximadamente -15 mV (ver tabla II.4) con lo que el valor de  $ze\psi_d/4k_B T$  es 0.146 para el  $\text{Na}^+$  y 0.29 para el  $\text{Ca}^{2+}$ , encontrándonos en el caso límite de potencial bajo. De hecho nuestros datos experimentales de c.c.c. son proporcionales a  $z^{-2.7}$ .

Este comportamiento del contraión coagulante está relacionado básicamente con la mayor compresión de la doble capa de la partícula que tiene lugar, a una concentración de electrolito dada, al aumentar la valencia del contraión. La mayor fuerza iónica a una concentración constante para una mayor valencia del contraión provoca una drástica disminución del potencial de repulsión electrostático. El efecto neto es un descenso de la altura de la barrera que conducirá a una mayor eficacia de

los choques. Esto explicaría el que para una concentración fija el valor que toma el factor de estabilidad crezca rápidamente cuando disminuye la valencia del contraión. Podemos verlo claramente en la figura II.25.

Los resultados experimentales del factor de estabilidad han sido ajustados a la expresión teórica. La expresión del potencial eléctrico II.23 se obtuvo a partir de la descripción de la capa eléctrica del modelo de Gouy-Chapman que sólo es aplicable a electrolitos simétricos. No obstante la hemos usado como primera aproximación para el caso del  $\text{CaCl}_2$ , incluyendo la expresión correspondiente a electrolitos 2:1 de la longitud de Debye e igualando  $z$  a 2.

El cambio de catión no sólo afecta a la mayor o menor compresión de la doble capa sino también al espesor de la capa de Stern. Por eso se han realizado ajustes considerando que no existe y que existe capa de Stern. En la tabla II.4 aparecen los valores de la constante de Hamaker y el potencial difuso obtenidos.

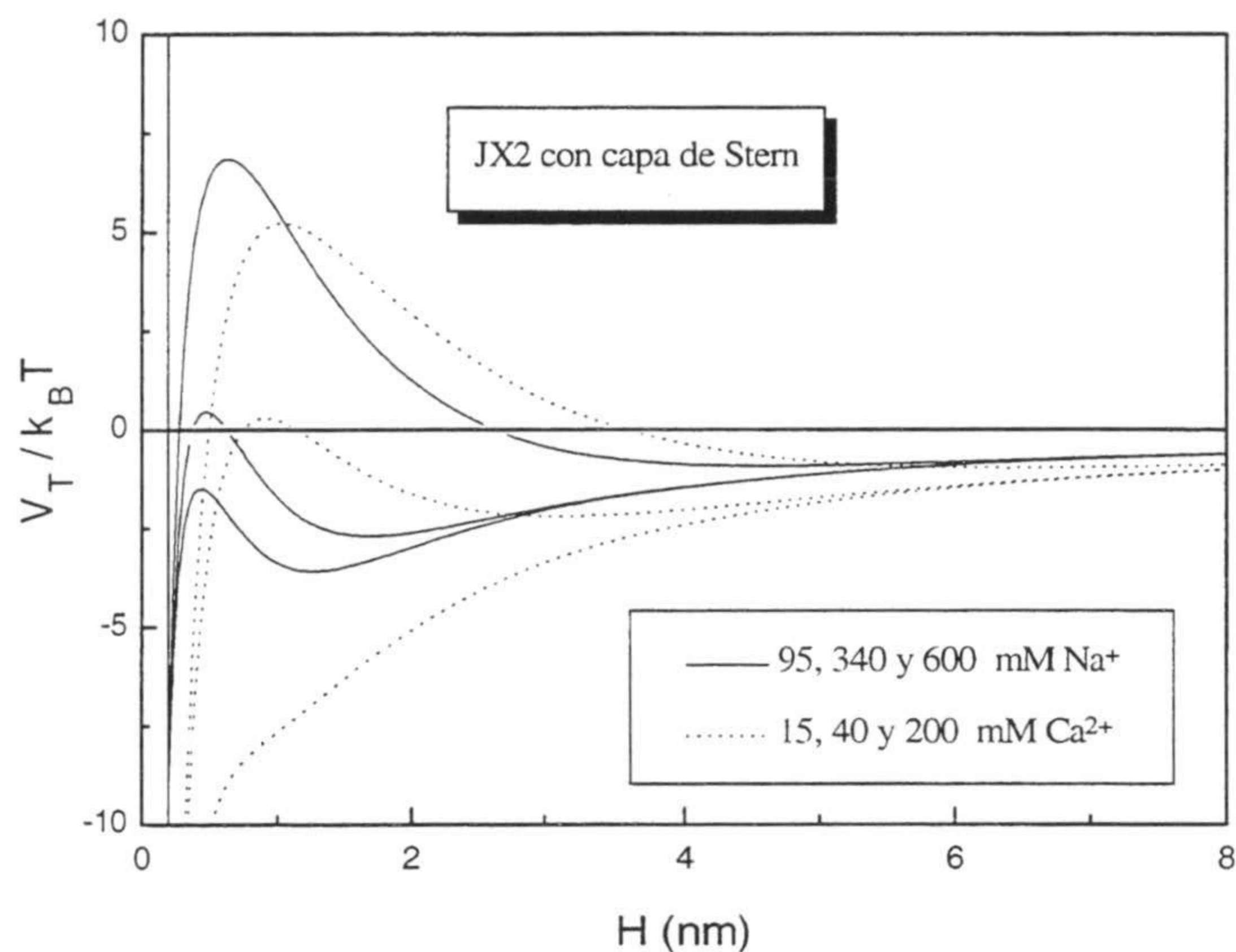
No se han incluido los datos cuando se considera el tamaño del catión hidratado ya que algunos ajustes no se podían hacer, ó se obtienen valores muy altos de la constante de Hamaker, ó los diagramas de potencial de interacción no explican los datos experimentales de estabilidad.

**Tabla II.4** Potencial eléctrico y constante de Hamaker obtenidos utilizando la teoría DLVO para los látex JX2 y MP2.

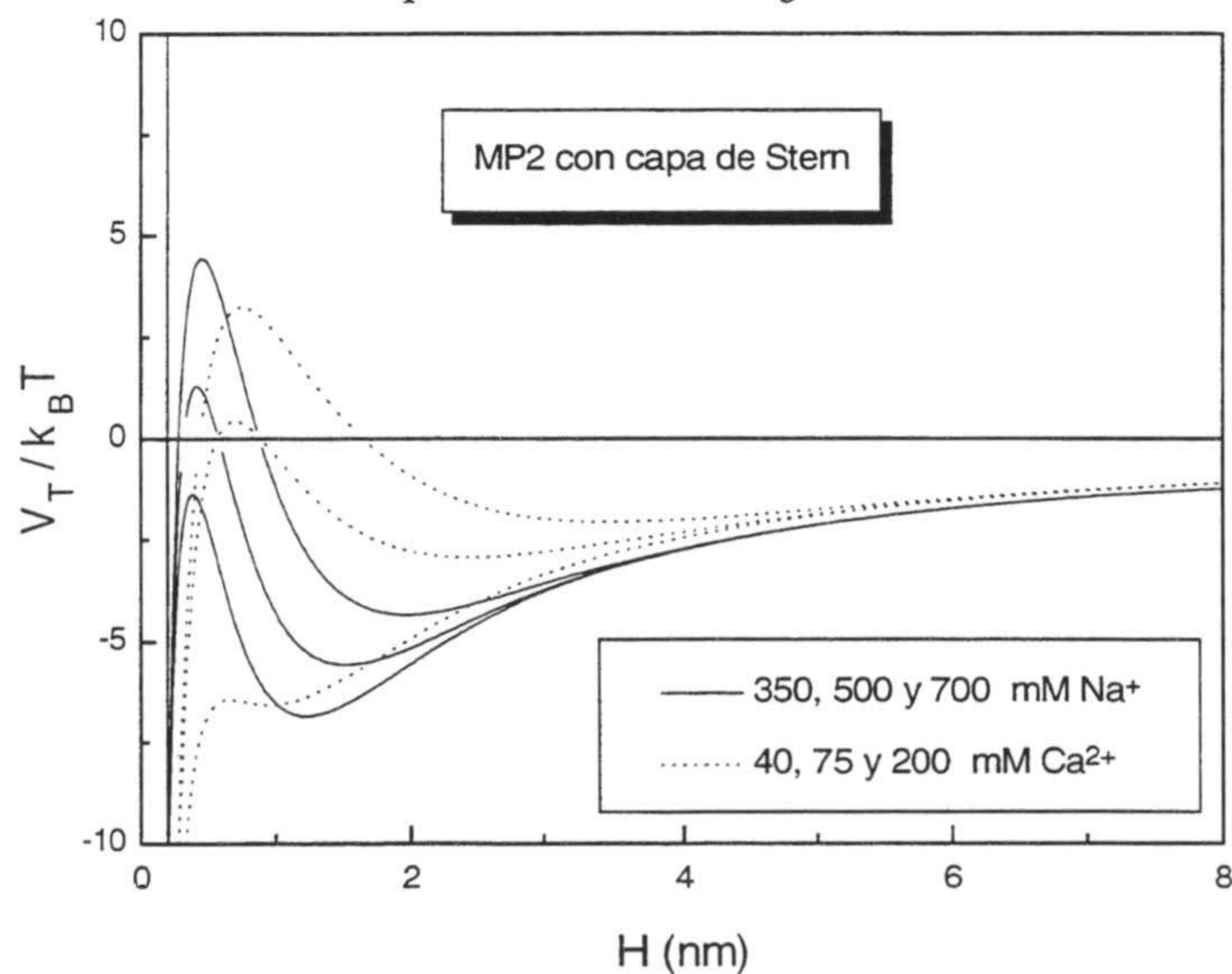
	$\Delta$ (nm)	Látex JX2		Látex MP2	
		$\psi_d$ (mV)	$A \times 10^{20}$ (J)	$\psi_d$ (mV)	$A \times 10^{20}$ (J)
$\text{Na}^+$	0	-15.53	0.23	-15.18	0.18
$\text{Na}^+$	0.096	-16.36	0.37	-16.94	0.36
$\text{Ca}^{2+}$	0	-16.65	0.47	-13.31	0.23
$\text{Ca}^{2+}$	0.099	-17.01	0.60	-13.60	0.32

Cuando se incluye la existencia de una capa de Stern se obtienen valores más altos de la constante de Hamaker sin variar el potencial eléctrico difuso. A partir de estos datos se han construido los diagramas de potencial de interacción con el fin de comprobar si se pueden explicar los valores experimentales de *c.c.c.* El resultado ha

vido que con todos ellos se puede explicar la estabilidad de los látex. Como ejemplos se muestran los diagramas para los dos látex con capa de Stern para NaCl y CaCl<sub>2</sub>.



**Figura II.26.** Potencial total de interacción considerando capa de Stern para el látex JX2 en presencia de NaCl y CaCl<sub>2</sub>.



**Figura II.27.** Potencial total de interacción considerando capa de Stern para el látex MP2 en presencia de NaCl y CaCl<sub>2</sub>.

En la tabla II.5 se muestran los valores de altura de la barrera para concentraciones de electrolito iguales a la *c.c.c.* experimental. Así mismo se incluye la posición de la barrera para dichas concentraciones.

**Tabla II.5** Altura y posición de la barrera de potencial para los látex JX2 y MP2.

	$\Delta$ (nm)	Látex JX2		Látex MP2	
		$V_{\max}/k_B T$	Posición (nm)	$V_{\max}/k_B T$	Posición (nm)
Na <sup>+</sup>	0	0.47	0.50	0.73	0.41
Na <sup>+</sup>	0.096	0.42	0.49	1.1	0.42
Ca <sup>2+</sup>	0	0.45	0.91	0.37	0.68
Ca <sup>2+</sup>	0.099	0.42	0.90	0.5	0.67

En todos los casos la altura de la barrera es igual o inferior a 1  $k_B T$  con lo que la *c.c.c.* teórica es similar a la experimental.

Resulta interesante observar como la posición de la barrera se desplaza hacia distancias mayores cuando la agregación se produce con Ca<sup>2+</sup>.

Esto implica que la distancia de equilibrio a la que se encuentran las partículas dentro del agregado es mayor cuando el catión es divalente. Además esta distancia es mayor para el látex JX2 que para el MP2 con ambos cationes.

Según el modelo DLVO, para un potencial eléctrico dado la distancia interpartícula a la que se da el máximo de la barrera de energía potencial de interacción disminuye con el aumento de la fuerza iónica (figuras II.24 y II.25) por compresión de la doble capa.

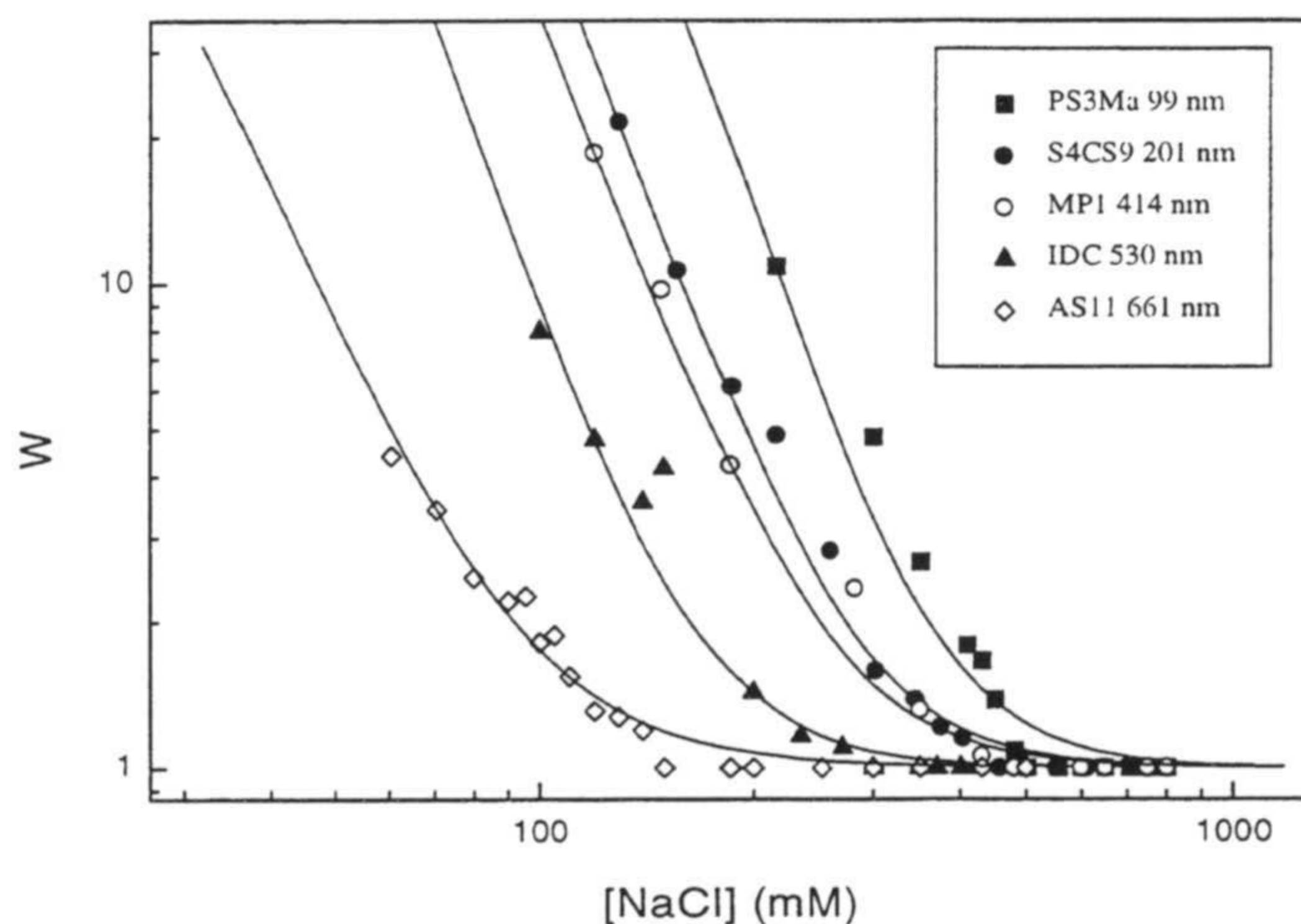
La teoría predice una distancia entre la superficie de las partículas de aproximadamente  $\kappa^{-1}$  en la situación de barrera de energía potencial de altura nula (Verwey y Overbeek, 1948; Rubio, 1996).

Las distancias de la tabla II.5 se pueden contrastar con la teórica para los valores de la *c.c.c.*, que son: 0.52 nm para 340 mM de NaCl, 0.43 nm para 500 mM NaCl, 0.88 nm para 40 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.64 nm para 75 mM CaCl<sub>2</sub>. Como vemos existe un buen acuerdo en todos los casos.

Un hecho interesante que se puede observar al comparar los potenciales de interacción para los látex JX2 y MP2, figuras II.26 y II.27 respectivamente, es la existencia de mínimos secundarios profundos en los diagramas del látex MP2. Como a continuación se tratará, estos mínimos pueden ser los responsables de la existencia de floculación en el caso de partículas coloidales grandes.

### 10. Floculación en mínimos secundarios: reptización

Hasta ahora hemos estudiado como afecta la densidad de carga de la partícula y la valencia del contraión a la estabilidad de un coloide. Otro parámetro que se puede controlar a través del proceso de síntesis y cuya influencia en la estabilidad coloidal es muy importante, es el tamaño de partícula. Sobre este tema existen pocos trabajos debido a la dificultad de sintetizar partículas con diferente tamaño manteniendo invariable el resto de características del coloide, como puede ser la densidad de carga superficial. Por nuestra parte se ha podido disponer de una serie de látex con semejante densidad de carga (comprendida entre  $-3.2$  y  $-4.8 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ ) y cubriendo un amplio intervalo de tamaños de partícula desde 100 a 660 nm de diámetro. Estos látex son: PS3Ma, S4CS9, MP2, MP1, IDC y AS11, cuyas características aparecen en la tabla I.1. En la figura II.28 aparecen los diagramas de estabilidad a pH 7 para estos látex, salvo el caso del látex MP2 que ya se representó en la figura II.25.



**Figura II.28.** Dependencia del factor de estabilidad con el tamaño de partícula.

Los datos han sido ajustados a la ecuación teórica del factor de estabilidad teniendo en cuenta la existencia de una capa de Stern (con catión deshidratado) en el potencial electrostático. Los resultados de los ajustes aparecen en tabla II.6 junto con los valores experimentales de c.c.c. y las pendientes del ajuste lineal ( $d \log W/d \log C$ ).

**Tabla II.6** Parámetros que caracterizan la estabilidad coloidal de los látex PS3Ma, S4CS9, MP2, MP1, IDC y AS11.

Látex	c.c.c. (mM)	$d \log W/d \log C$	$A \times 10^{-20}$ (J)	$\psi_d$ (mV)	$V_{\max}/k_B T$
PS3Ma	495±40	-3.02±0.20	0.38	-18.59	0.9
S4CS9	407±35	-2.74±0.21	0.33	-16.12	0.78
MP2	500±40	-2.38±0.25	0.36	-16.94	0.73
MP1	410±35	-2.09±0.16	0.16	-10.95	0.46
IDC	275±30	-1.79±0.20	0.15	-9.82	0.51
AS11	148±10	-1.57±0.08	0.11	-7.72	0.84

Con los correspondientes valores de  $A$  y  $\psi_d$  se han obtenido los diagramas de potencial total de interacción para cada uno de los látex. En todos los casos la barrera de potencial para la c.c.c. experimental es igual o inferior a  $1 k_B T$  (ver Tabla II.6).

Numerosos resultados de los que aparecen en la tabla II.6 no pueden ser interpretados en el ámbito de la teoría clásica DLVO.

1. Como se ha mencionado con anterioridad, Reerink y Overbeek (*Reerink et al., 1954*), considerando una serie de aproximaciones, mostraron la existencia de una dependencia lineal entre  $\log W$  y  $\log C$  cuya pendiente viene dada por la siguiente expresión:

$$\frac{d \log W}{d \log C} = -(2.15 \times 10^7) \frac{a}{z^2} \tanh^2(0.00973 z \psi_d) \quad (\text{II.43})$$

donde  $a$  viene expresado en cm y  $\psi_d$  en mV. Según esta ecuación, para partículas con igual densidad de carga y por tanto igual potencial eléctrico ( $\psi_d$ ), la pendiente debería aumentar en valor absoluto con el radio de la partícula. Nuestros resultados



muestran un decrecimiento de la pendiente con el diámetro en contra de estas predicciones de Reerink y Overbeek.

En general los datos existentes en la bibliografía no satisfacen la ecuación II.43. Algunos autores han encontrado que la estabilidad aumenta con el tamaño de partículas (*Kruyt et al., 1920; 1921; Tuorilla, 1926; Watillon et al., 1959; Matthews et al., 1967; Ottewill et al., 1974*) mientras que otros han observado que aumenta para luego disminuir (*Ottewill et al., 1966; Kotera et al., 1970*). Actualmente la dependencia del factor de estabilidad con el tamaño de partícula constituye uno de los puzzles más importantes dentro del campo de los coloides. La mayoría de los autores defienden que la dependencia de la estabilidad coloidal con el tamaño de partícula se debe a la agregación de partículas grandes en mínimos secundarios (*Hogg et al., 1976, Marmur, 1979; Penners et al., 1987; Wang, 1991; Tsuruta et al., 1995*). Pero existen otras posibles explicaciones como la propuesta por Ruckenstein y colaboradores (*Ruckenstein et al., 1980*) basada en un modelo que supone una distribución heterogénea de densidades de carga sobre la partícula. También la existencia de rugosidades superficiales puede explicar la influencia del tamaño de partícula sobre el factor de estabilidad según algunos autores (*Prieve et al., 1982; Ofoli, 1994; Shulepov et al., 1995a; 1995b; 1996*).

2. Las constantes de Hamaker obtenidas en apartados anteriores, teniendo en cuenta como espesor de la capa de Stern el tamaño deshidrato del catión, suelen rondar el valor de  $0.35 \times 10^{-20}$  J (tablas II.2 y II.4). Similares valores han sido obtenidos para los látex PS3Ma, S4CS9 y MP2. Sin embargo la constante de Hamaker empieza a disminuir al aumentar el diámetro de partícula más allá de los 360 nm, alcanzando valores pequeños ( $0.10 \times 10^{-20}$  J) en comparación con los existentes en la bibliografía.

3. Los látex utilizados presentan una densidad de carga similar, con lo que se podría esperar que el potencial difuso obtenido por ajuste de los datos del factor de estabilidad fuera también semejante. Hay varias formas de obtener experimentalmente un potencial difuso representativo de la interacción electrostática. Una de ellas es mediante la medida de la movilidad electroforética que

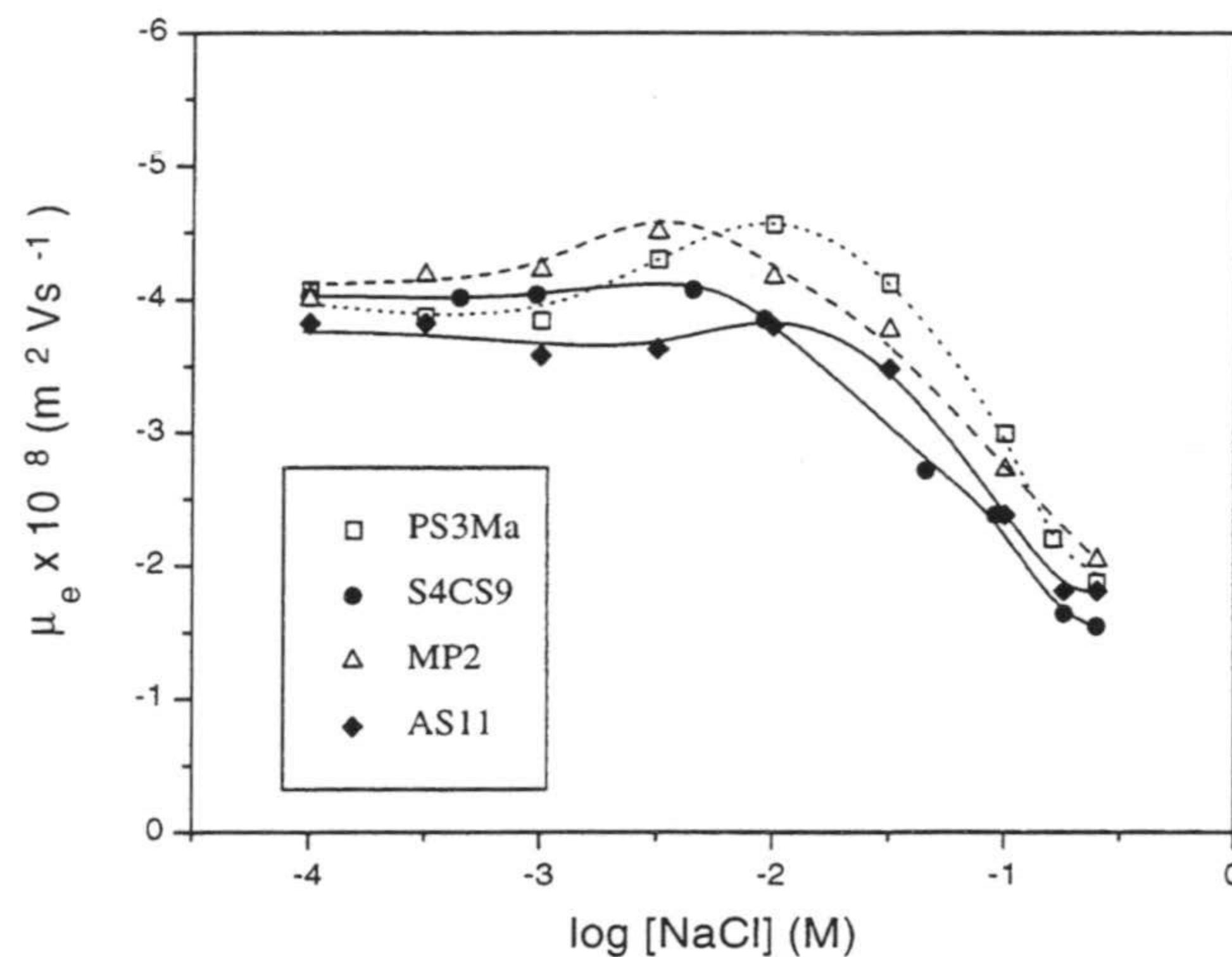
permite obtener el potencial zeta (Schenkel *et al.*, 1969; Hunter, 1987; Nakamura *et al.*, 1992; Stoll *et al.*, 1992; Bastos *et al.*, 1994). El problema de este método es que el potencial zeta en las proximidades de la *c.c.c.*, que es el que se debe emplear, es difícil medirlo pues el coloide está agregando, y además debido a la alta fuerza iónica hay polarización de los electrodos.

Otra forma es a través de la relación dada por la teoría de Gouy-Chapman para la densidad de carga (ecuación I.40):

$$\sigma = 11.74c^{1/2} \sinh(19.46z\psi) \quad (\text{II.44})$$

El problema en este caso es similar de la movilidad. Necesitaríamos la densidad de carga difusa para la *c.c.c.*

La siguiente figura muestra la dependencia de la movilidad electroforética con la concentración de NaCl para los látex PS3Ma, S4CS9, MP2, MP1 y AS11.



**Figura II.29.** Movilidad electroforética versus concentración de NaCl para los látex PS3Ma, S4CS9, MP2, AS11.

De igual forma se ha medido la movilidad a la concentración de electrolito más cercana a la *c.c.c.* experimental de cada látex (250 mM). Usando la teoría de Smoluchowski, que es válida para concentraciones altas de electrolito, se han obtenidos los valores del potencial zeta. Los datos están reflejados en la tabla II.7 junto con los potenciales obtenidos a partir de la ecuación II.44.

Los resultados de movilidad muestran que el potencial difuso es prácticamente constante para los cuatro látex. A través de la teoría de Gouy-Chapman se predice un aumento del potencial difuso correlativo a las ligeras diferencias en densidad de carga que existen entre estos látex.

**Tabla II.7** Potencial eléctrico obtenido por diferentes métodos.

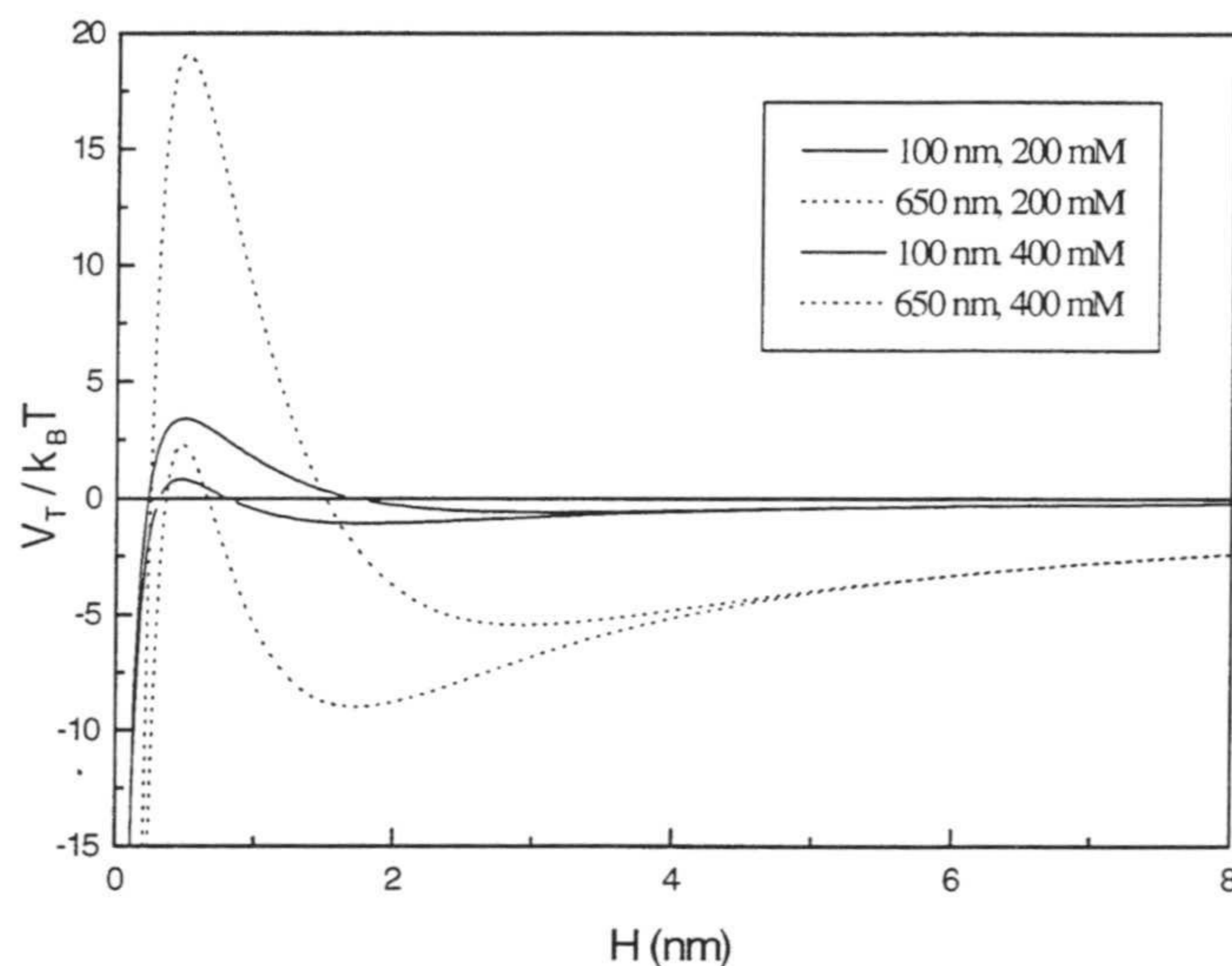
	Movilidad (mV)	Ec. II.44 (mV)
PS3MA	-24±3	-20±2
S4CS9	-21±4	-24±2
MP2	-26±3	-29±4
AS11	-23±3	-41±2

Los datos del ajuste de la Tabla II.6 muestran una cierta constancia en el potencial difuso para diámetros comprendidos entre 100 y 360 nm. Pero para tamaños mayores el potencial difuso comienza a decrecer con el diámetro de partícula cuando éste debería permanecer casi constante, según los datos de movilidad, ó en todo caso aumentar de acuerdo con los datos obtenidos a partir de la ecuación II.44.

4. De igual forma, la concentración crítica de coagulación debería ser similar para todos los látex. Llama la atención, sin embargo, que la *c.c.c.* llegue a decrecer un 70% al pasar de una partícula de diámetro 100 nm (PS3Ma) a 661 nm (AS11).

La teoría DLVO supone que la agregación sólo ocurre en el mínimo primario de la curva de potencial. Sin embargo, en determinados sistemas el mínimo secundario puede ser lo suficientemente profundo como para que exista agregación en él. En el primer caso se habla de coagulación, mientras que el segundo corresponde a la floculación. Ambos términos son utilizados indiferentemente por numerosos autores, un error como se podrá comprobar más adelante.

Supongamos dos partículas de diámetro 100 nm y 650 nm, con un mismo potencial difuso de -20 mV y una constante de Hamaker de  $0.35 \times 10^{-20} \text{J}$ . Los potenciales de interacción para estos dos sistemas serían los siguientes:



*Figura II.30. Influencia del tamaño de partícula sobre la aparición de mínimos secundarios.*

La partícula de 100 nm no presenta mínimos secundarios con lo que sólo habrá coagulación. Sin embargo la partícula grande presenta profundos mínimos secundarios. En este sistema la agregación se podrá deber a: coagulación y floculación. Para concentraciones pequeñas de electrolito la barrera de potencial es grande, no habiendo coagulación pero pudiendo haber agregación en el mínimo secundario. Conforme aumenta la fuerza iónica la barrera disminuye a la vez que aumenta la profundidad del mínimo secundario. Una fracción de partículas estarán coaguladas y otra floculadas.

Si el mínimo secundario es lo suficientemente profundo todo choque entre partículas será efectivo y estaremos en el régimen de agregación rápida. Sería por tanto más correcto hablar de una concentración crítica de coagulación, que corresponde a la concentración de electrolito para la cual la barrera de potencial es inferior de  $1 k_B T$ , y de una concentración crítica de floculación (c.c.f.) que sería la

concentración de electrolito para la cual la profundidad del mínimo secundario es lo suficientemente grande como para encontrarnos en régimen de agregación rápida.

Las partículas de tamaño pequeño vendrían caracterizadas por una *c.c.c.* y las partículas grandes por una *c.c.f.* Evidentemente en medio de estas dos situaciones límites tenemos un intervalo de tamaños de partícula en los cuales puede haber coagulación y floculación conjuntamente. En este caso habría dos factores de estabilidad, uno primario y otro secundario. La definición teórica del factor de estabilidad usada hasta ahora sólo tenía en cuenta la coagulación y por ello que los datos de  $A$  y  $\psi_d$  obtenidos por el ajuste para los látex grandes se desvía del comportamiento esperado.

La existencia de floculación conduce a una disminución de la concentración de electrolito a la que se alcanza la agregación rápida en comparación con la coagulación.

¿Cómo se puede comprobar experimentalmente la existencia de la floculación?. La respuesta la podemos encontrar si examinamos la figura II.30. Al disminuir la concentración salina la profundidad del mínimo secundario decrece, permaneciendo constante la del mínimo primario. Si un agregado está floculado, una disminución de la concentración de sal producirá la ruptura parcial del mismo por pasar a un mínimo menos profundo. Este fenómeno se conoce como reptización (*Frens et al., 1971; Carmona, 1993*). La dilución, sin embargo, no debería influir a un agregado que se ha formado por coagulación.

Para comprobar la hipótesis de que nuestras partículas grandes estaban floculando en lugar de coagulando se diseñaron una serie de experimentos de reptización con los látex PS3Ma, S4CS9, MP2 y AS11 usando dos métodos diferentes:

1. Midiendo el tamaño medio de los agregados por PCS. El método seguido consiste en mezclar 0.25 ml de una dispersión del látex con 0.25 ml de electrolito en la cubeta del dispositivo de PCS y medir el tamaño en función del tiempo. Pasados aproximadamente 600 segundos del inicio de la agregación se saca la cubeta y se añade lentamente 2 ml de agua desionizada, reduciendo de esta forma la concentración de electrolito a su quinta parte. Después de la dilución se continúa

midiendo el tamaño de los agregados. Los resultados obtenidos por este método para los cuatro látex aparecen en la siguiente tabla.

**Tabla II.8** Ruptura de agregados por dilución medida mediante PCS.

[NaCl](M)	PS3Ma	S4CS9	MP2	AS11
70	---	---		SI
100	---	---		SI
115	NO	---		SI
130	NO	---		
150	NO	SI		SI
200	NO	SI		SI
251	NO	NO	SI	SI
300	NO	NO	SI	SI
351	NO	NO		NO
409		NO	SI	NO
556	NO	NO	NO	NO
752			NO	
1250			NO	

2. Mediante diálisis y lectura espectrofotométrica. Por este procedimiento se mezclan 3 ml de la dispersión coloidal con 3 ml de electrolito. De igual forma otros 3 ml de dispersión se mezclan con 3 ml de agua desionizada para tener un blanco. Se mide la absorbancia de la muestra, que es igual a la del blanco, con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 nm ( $A_{10}$ ). Pasadas dos horas de agregación se vuelve a medir la absorbancia ( $A_1$ ). Entonces se introducen 5 ml de la muestra en una membrana de diálisis (Visking Dialysis Tubing) de 14.3 mm de diámetro y se dializa frente a 1 litro de agua desionizada durante 6 horas. De esta forma se elimina el electrolito sin variar la concentración de partículas. De nuevo se vuelve a medir la absorbancia de la muestra ( $A_2$ ) y del blanco ( $A_{20}$ ).

El cociente entre  $A_{10}/A_{20}$  es un factor que tiene en cuenta el posible descenso de la absorbancia por la disminución de la concentración de partículas contenidas en la

membrana de diálisis. A partir de estas variables se define el coeficiente de reptización ( $R$ ) como (Tsuruta *et al.*, 1996):

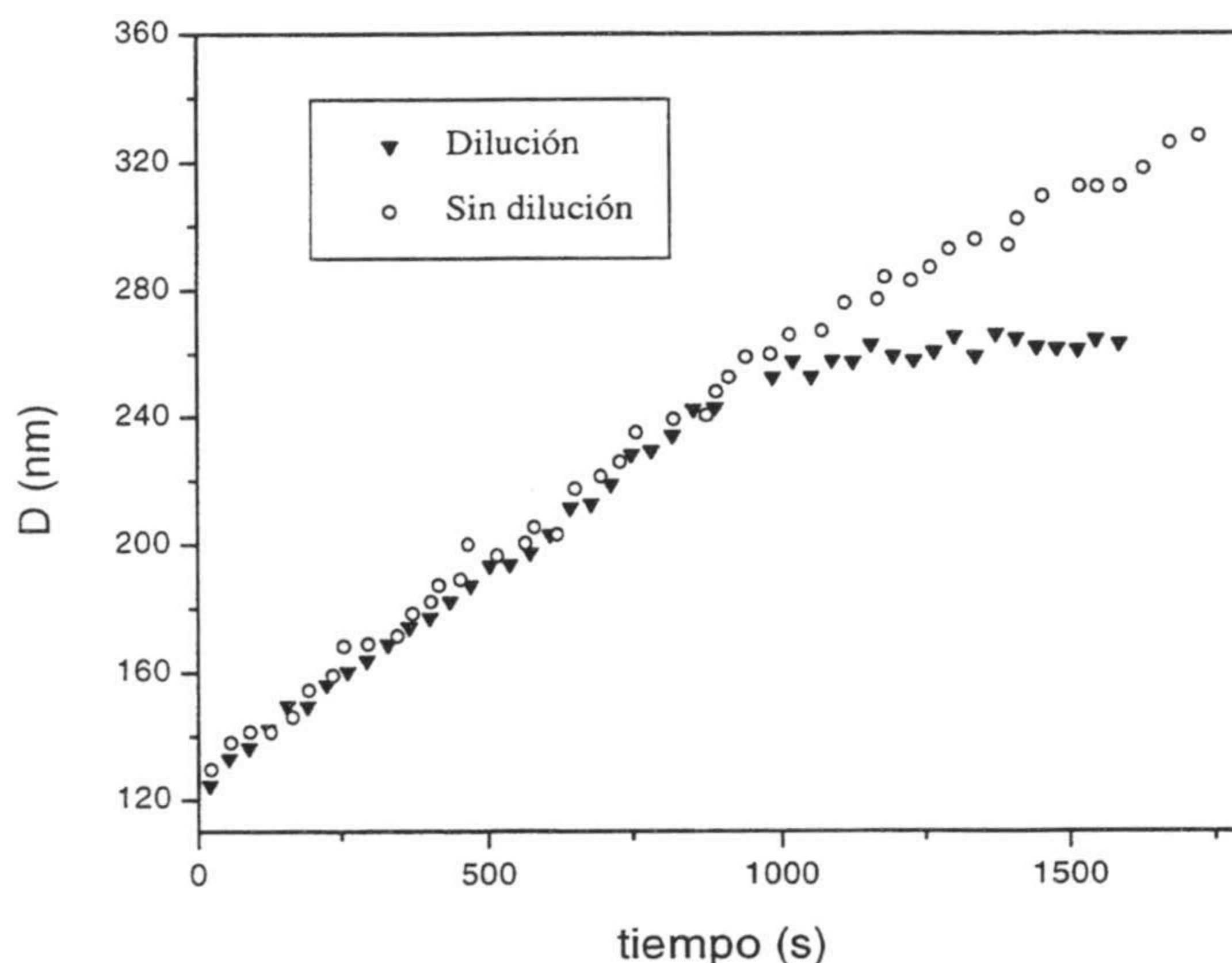
$$R = 1 - \left[ \frac{A_{10}}{A_{20}} \left( \frac{A_2 - A_{20}}{A_1 - A_{10}} \right) \right] \quad (\text{II.45})$$

Si todos los agregados se han roto volviendo a existir sólo monómeros, reptización total, el valor de  $R$  es 1. En el caso de que no haya reptización  $R$  valdrá 0.

Vamos a ir analizando los resultados de reptización por diálisis y por PCS obtenidos para cada látex.

- Látex PS3MA. El coeficiente de reptización ( $R$ ) para este látex fue medido en el intervalo de concentraciones de 150-800 mM NaCl. Para todas las concentraciones el valor de  $R$  fue 0 indicando que no hay ruptura de agregados por dilución.

En la figura II.31 se muestra la evolución temporal del tamaño medio de agregado de este látex en presencia de 250 mM NaCl habiendo diluido y sin diluir.



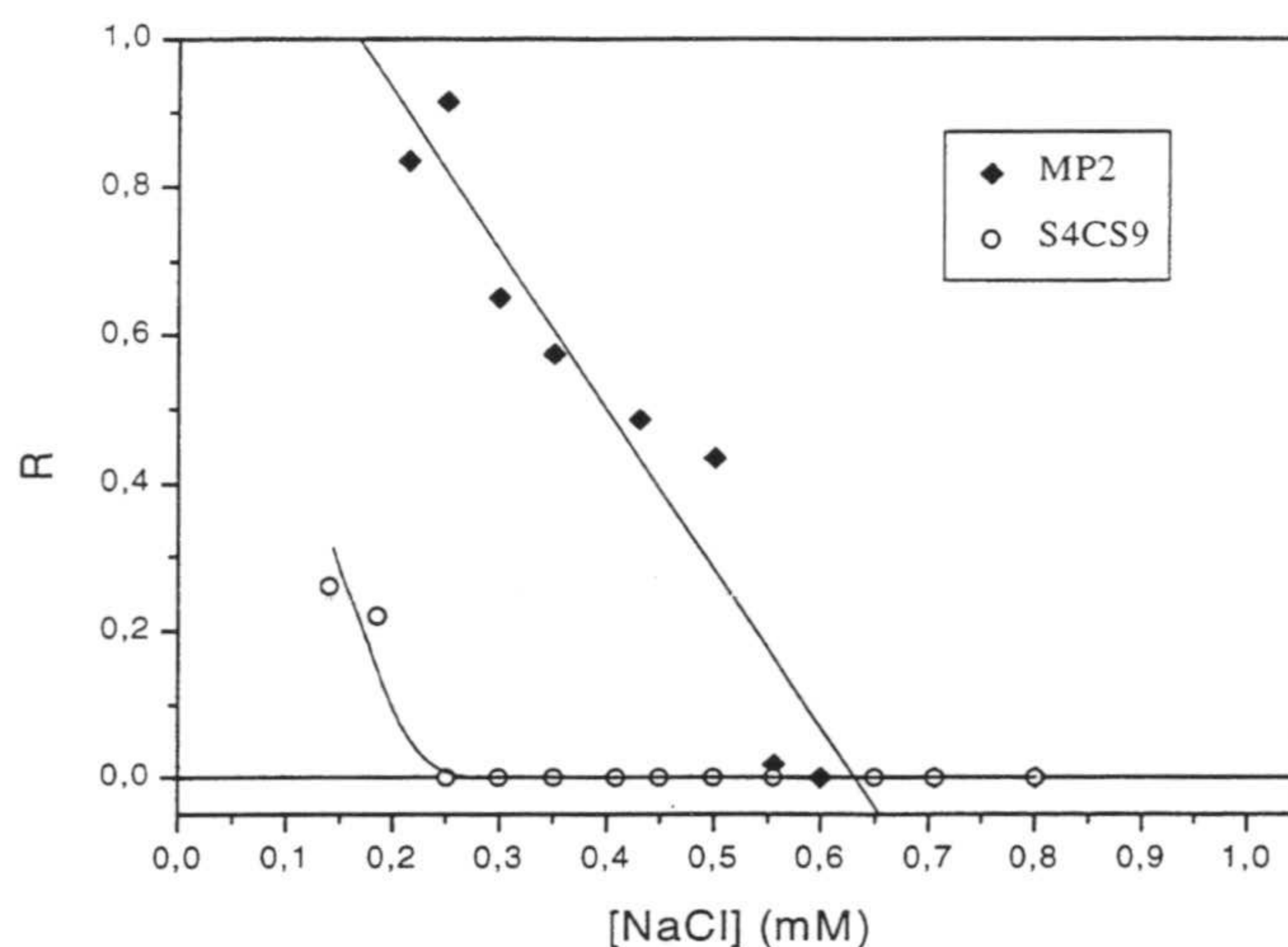
**Figura II.31.** Efecto de la dilución sobre un sistema que no reptiza.

Al producirse la dilución el tamaño de los agregados no disminuye, indicando que no hay reptización. Una vez realizada la dilución la cantidad de partículas

disminuye tanto que la cinética de la agregación se ralentiza, no aumentando por ello el diámetro del agregado.

Los dos procedimientos experimentales muestran que el látex PS3Ma no sufre reptización, sugiriendo que este sistema sólo agrega en mínimos primarios (coagulación).

- Látex S4CS9. Los resultados obtenidos para este látex por diálisis aparecen en la siguiente gráfica junto con los del látex MP2.



**Figura II.32.** Coeficiente de reptización ( $R$ ) en función de la concentración de NaCl.

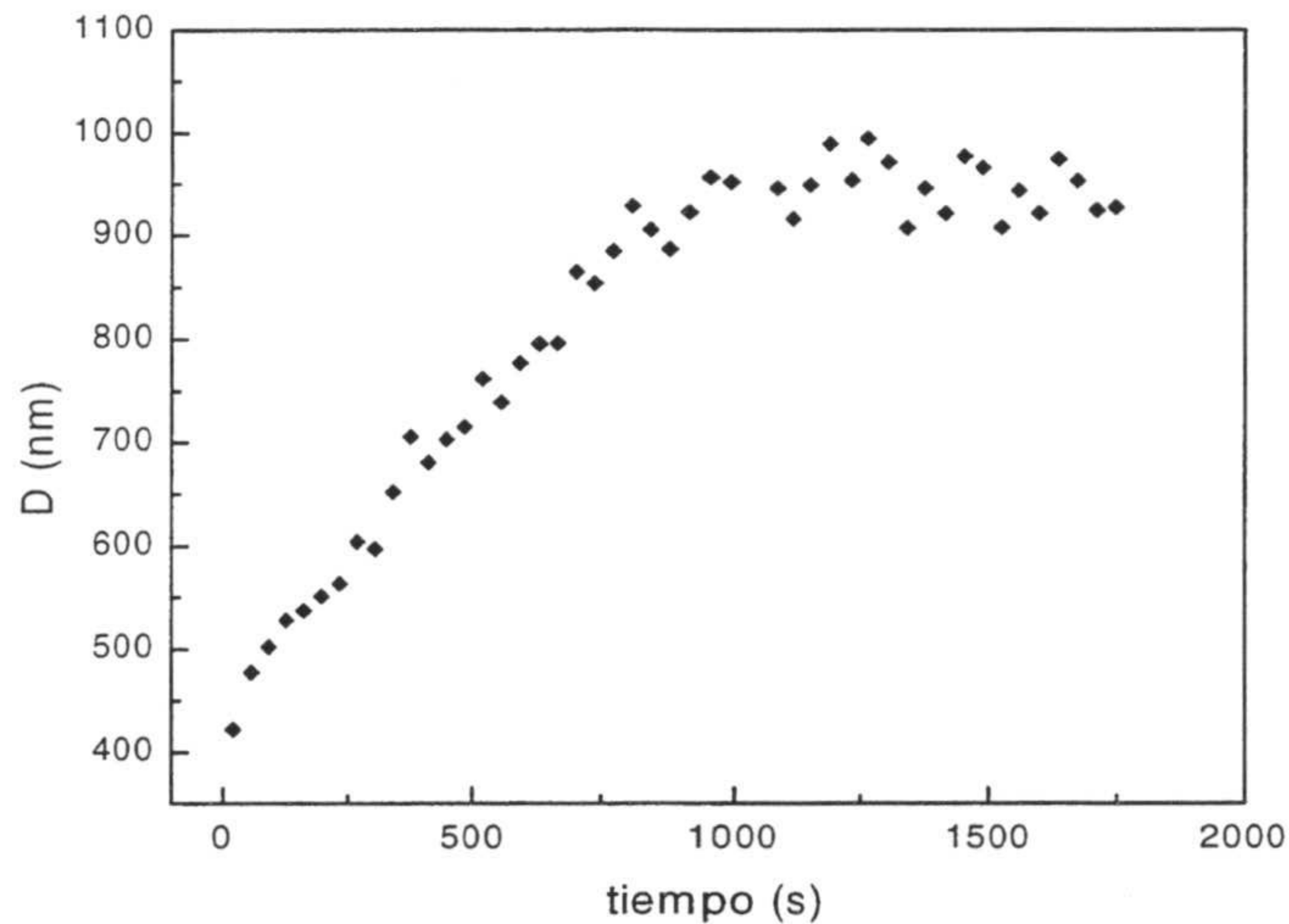
Existe una pequeña reptización en el látex S4CS9 para concentraciones inferiores a 250 mM. Esta ruptura de agregados por dilución puede estar asociada a la existencia de una fracción de agregación en un mínimo secundario. Este resultado está en concordancia con la información obtenida por medida de tamaños por PCS tal y como muestra la tabla II.8.

- Látex MP2. Este látex presenta claramente ruptura de agregados por dilución para concentraciones inferiores ó iguales a 500 mM según se desprende de la figura II.32. Los datos obtenidos por PCS conducen a esta misma conclusión. Estos resultados, que muestran la ruptura de agregados por dilución, concuerdan con la hipótesis de

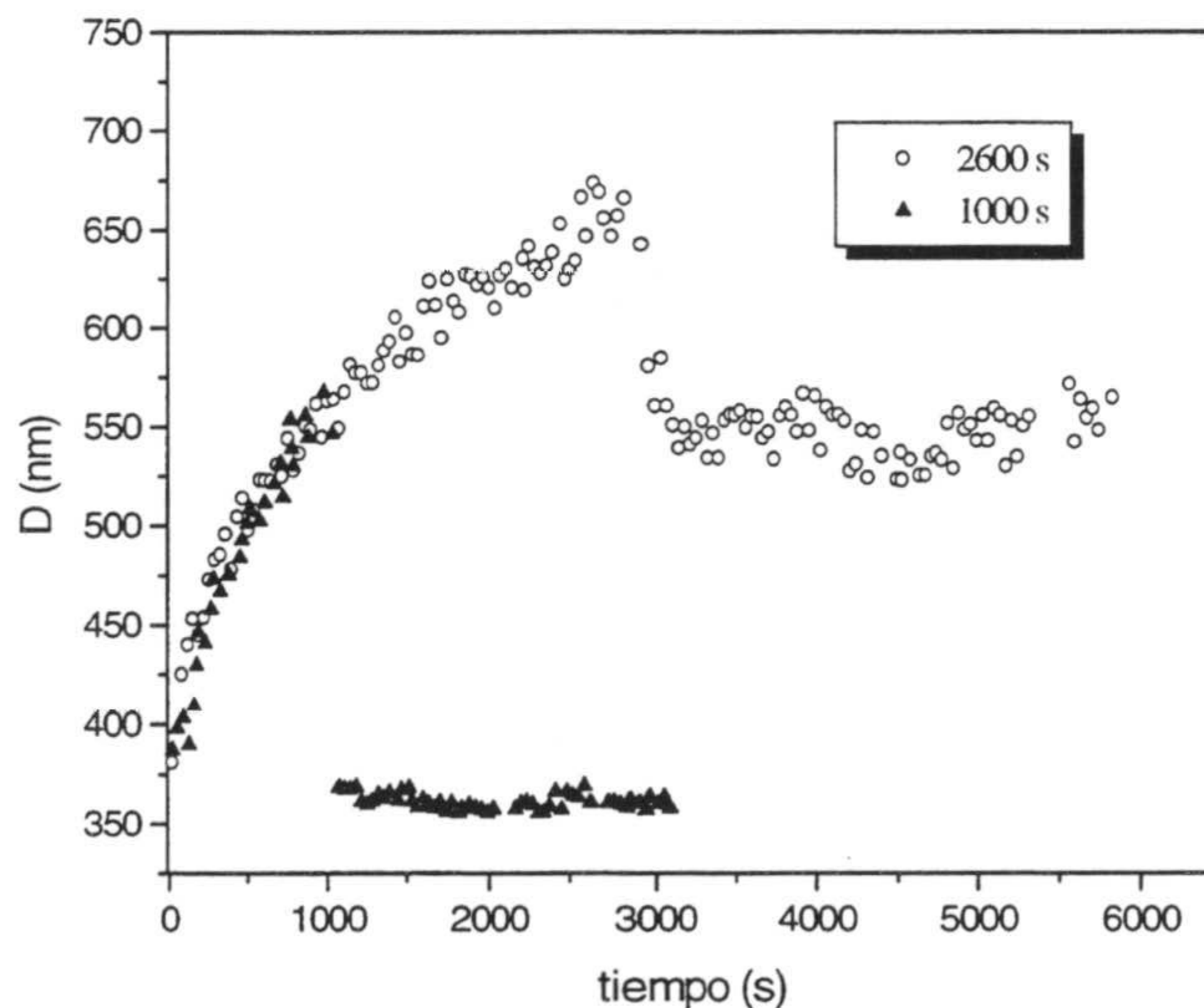


partida de que las partículas grandes pueden estar agregando en mínimos secundarios además de en primarios.

Las siguientes figuras muestran un ejemplo de ausencia de reptización para el látex MP2 a una concentración de 556 mM (figura II.33) y otro de reptización a 300 mM de NaCl (figura II.34).



**Figura II.33.** Tamaño medio de agregado ( $D$ ) en función del tiempo para la agregación del látex MP2 en presencia de 556 mM NaCl realizándose dilución.



**Figura II.34.** Tamaño medio de agregado ( $D$ ) en función del tiempo para la agregación del látex MP2 en presencia de 300 mM NaCl realizándose dilución.

La reeptización provoca una disminución del tamaño de los agregados después de la dilución. Como se puede ver en la figura II.34, la reeptización es un proceso muy rápido. En esta figura se puede observar la dependencia de la reeptización con el tiempo de agregación. Cuanto más tiempo lleve formado el agregado más difícil es romperlo. Este resultado también ha sido observado por otros autores (*Frens et al., 1971; 1972; Stoll et al., 1992*).

Es importante resaltar la similitud entre la dependencia del coeficiente de reeptización ( $R$ ) y del factor de estabilidad con la concentración de sal para el látex MP2 (figuras II.32 y II.25). Este hecho sugiere que un proceso es el inverso del otro, es decir, que las partículas pueden ser capturadas o pueden escapar del mínimo secundario de forma reversible.

- Látex AS11. El seguimiento de la reeptización de este látex por diálisis no ha sido posible debido a la existencia de sedimentación y por no poderse medir bien la absorbancia a una longitud de onda similar al diámetro de la partícula. Sin embargo, si se ha podido obtener información por PCS (tabla II.8). Este látex, que es el más grande de los usados, es el que presenta también el mayor intervalo de concentraciones de electrolito con reeptización.

Los látex S4CS9 y MP2 han presentado reeptización para concentraciones inferiores a sus *c.c.c.* Sin embargo el látex AS11 sufre reeptización para concentraciones inferiores o iguales al doble de su *c.c.c.* Puede ser que, tal y como se apuntó anteriormente, el concepto clásico de *c.c.c.* no sea el más adecuado para definir el tránsito de agregación lenta a rápida para partículas grandes donde hay floculación. Podemos estar en condiciones de agregación rápida si el mínimo secundario es lo suficientemente profundo como para que todos los choques entre partículas sean eficaces y no haya salida del mínimo por reversibilidad. Esta idea ya fue planteada por Prieve y colaboradores (*Prieve et al., 1980*).

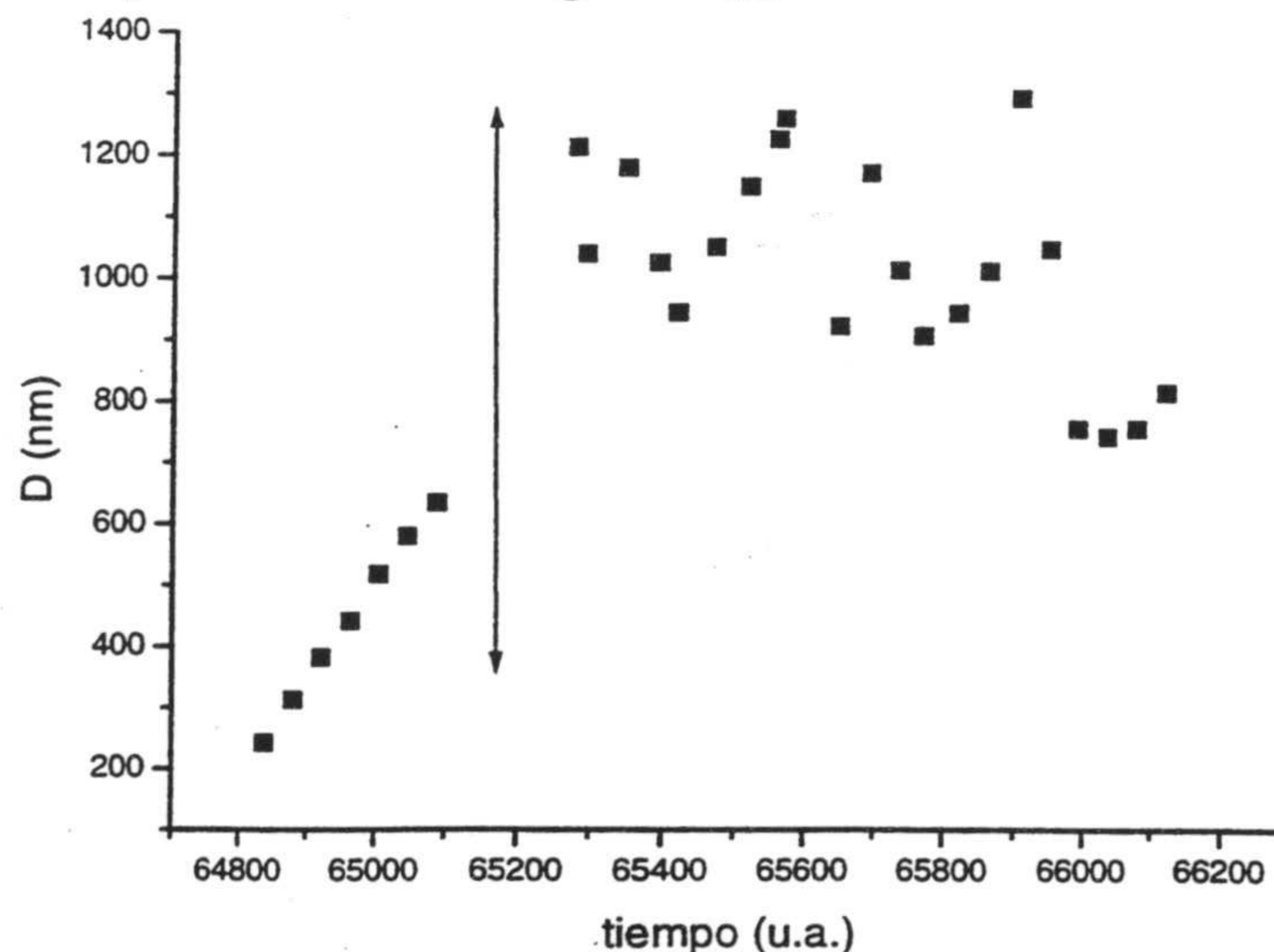
Esta suposición explicaría la *c.c.c.* tan pequeña que presenta el látex AS11 en el que la floculación es muy importante.

Existe una diferencia fundamental entre un mínimo primario y uno secundario: la profundidad del primario es mayor. En consecuencia la floculación es reversible si la profundidad del mínimo secundario no es grande (Ruckenstein, 1984; Penners et al., 1987; Jeffrey et al., 1988; 1990; Litton et al., 1996; Kumar et al., 1996). Existirá equilibrio entre las partículas que caen en el mínimo y las que escapan del mismo.

Si a un agregado floculado se le comunica la suficiente energía como para que las partículas escapen del mínimo secundario, bien por calentamiento o por agitación, se producirá también reptización (Yu et al., 1996).

Para hacer más comprobaciones de la existencia de agregación en mínimos secundarios para partículas grandes se realizaron una serie de experimentos de reptización por agitación. En estos experimentos se mezclaba el látex con el electrolito y se comenzaba a medir el tamaño. Pasado un tiempo se agitaba durante 20 segundos la muestra en un agitador automático de forma reproducible, y se volvía a medir el tamaño.

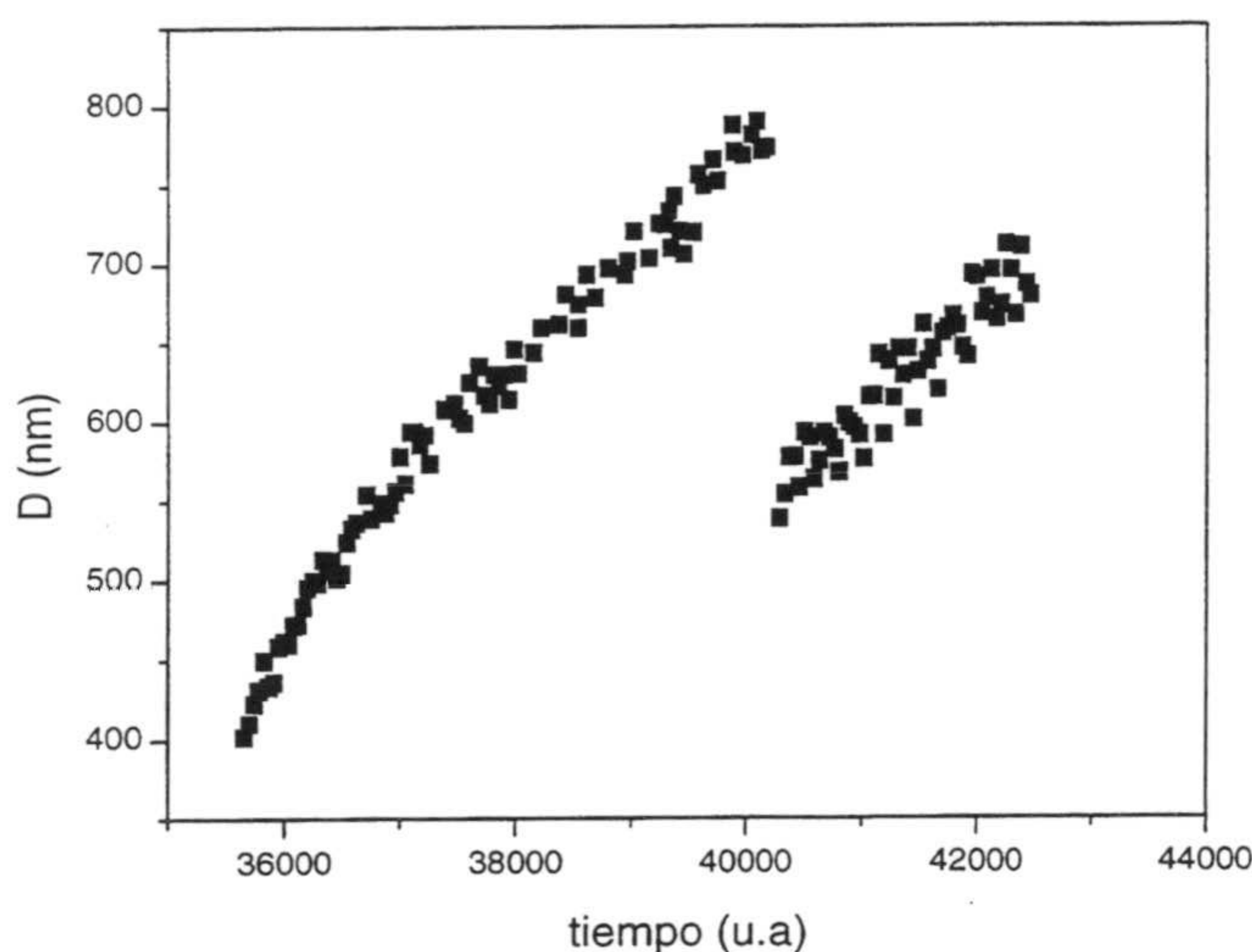
Para el látex PS3MA se realizaron experimentos a 150 mM, 250 mM, 350 mM y 1000 mM. En ningún caso se observó reptización. El tamaño medio de agregado permanecía invariable después de la agitación. En el caso de 1000 mM (concentración superior a la c.c.c. del látex) incluso se produce un aumento del tamaño de partícula, como muestra la figura II.35.



**Figura II.35.** Efecto de la agitación en la agregación del látex PS3Ma a 1000 mM NaCl.

La línea indica el momento de la agitación. A esta concentración de sal superior a la *c.c.c.* la cinética está controlada por la difusión de las partículas que coagulan en el mínimo primario. El número de colisiones entre partículas aumenta al agitar incrementándose el tamaño medio de agregado.

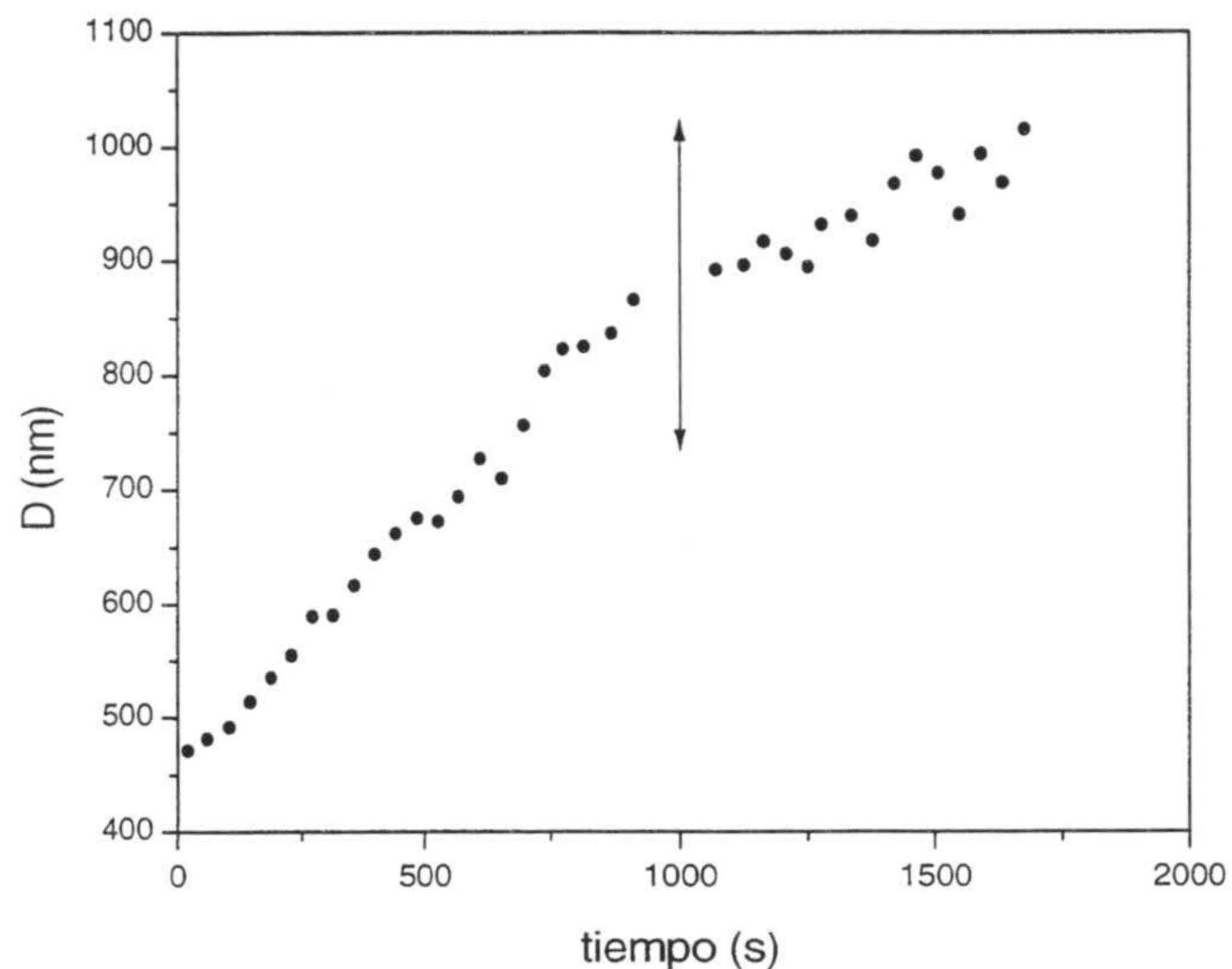
Sin embargo el comportamiento frente a la agitación es diferente para los látex MP2 y AS11 en los que había floculación. La siguiente figura muestra como el látex MP2 sufre reptización al agitarlo a una concentración de 350 mM.



**Figura II.36.** Efecto de la agitación en la agregación del látex MP2 a 350 mM NaCl.

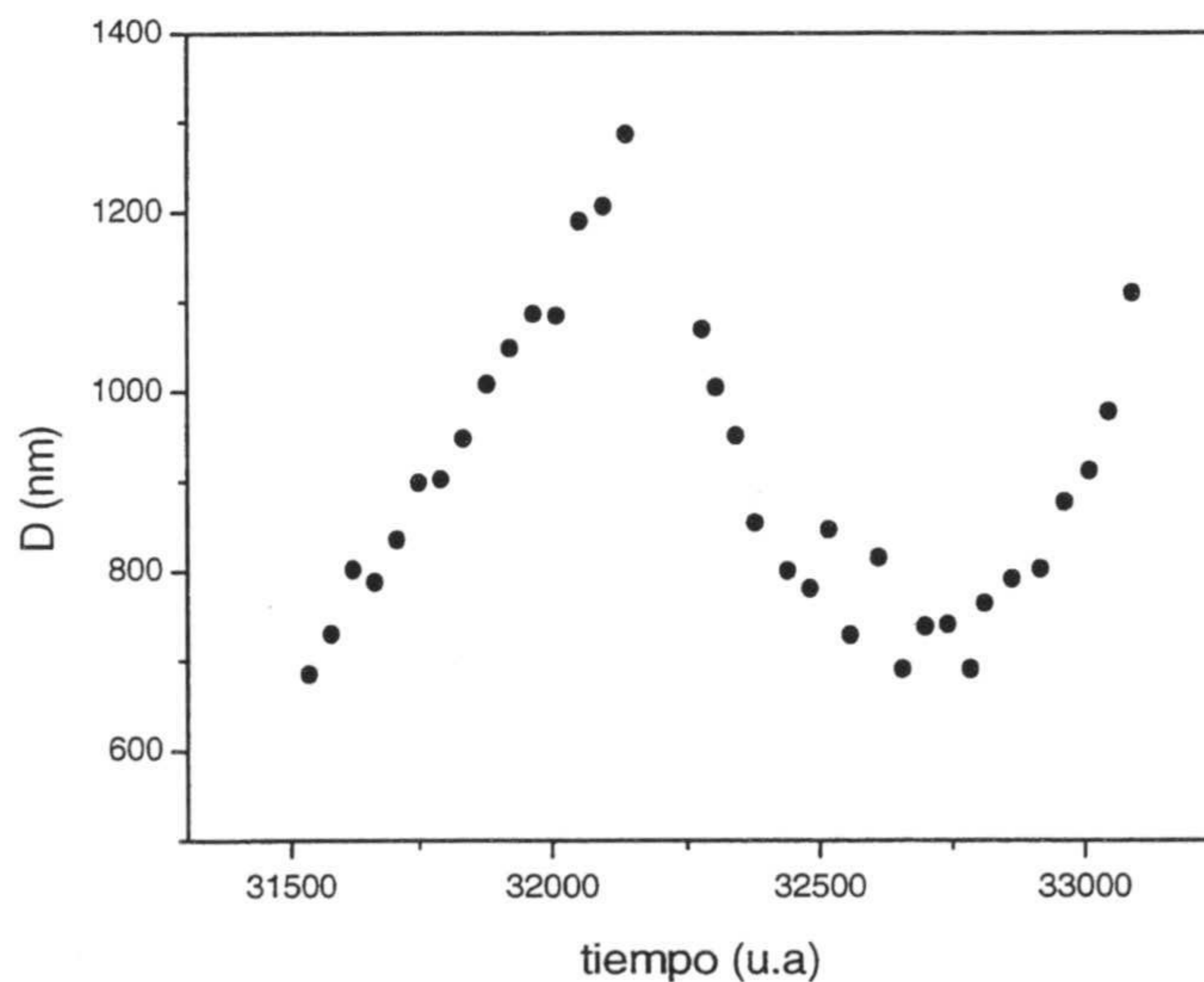
A esta concentración de electrolito las partículas están agregando en un mínimo secundario y comentar el paralelismo en la cinética de agregación antes y después de agitar (reversibilidad). Para una concentración de electrolito de 1000 mM, superior a la *c.c.c.* del látex, no existe reptización al agitar como se observa en la figura II.37.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos sobre la reptización por dilución. La agregación en mínimos secundarios ocurre en partículas grandes y a concentraciones bajas de electrolito. Para concentraciones altas de sal se produce coagulación.



*Figura II.37. Efecto de la agitación en la agregación del látex MP2 a 1000 mM NaCl.*

El látex AS11 sigue la pauta de comportamiento descrita por el látex MP2. No obstante, el látex AS11 ha presentado una reptitización muy curiosa como se desprende de la siguiente figura.

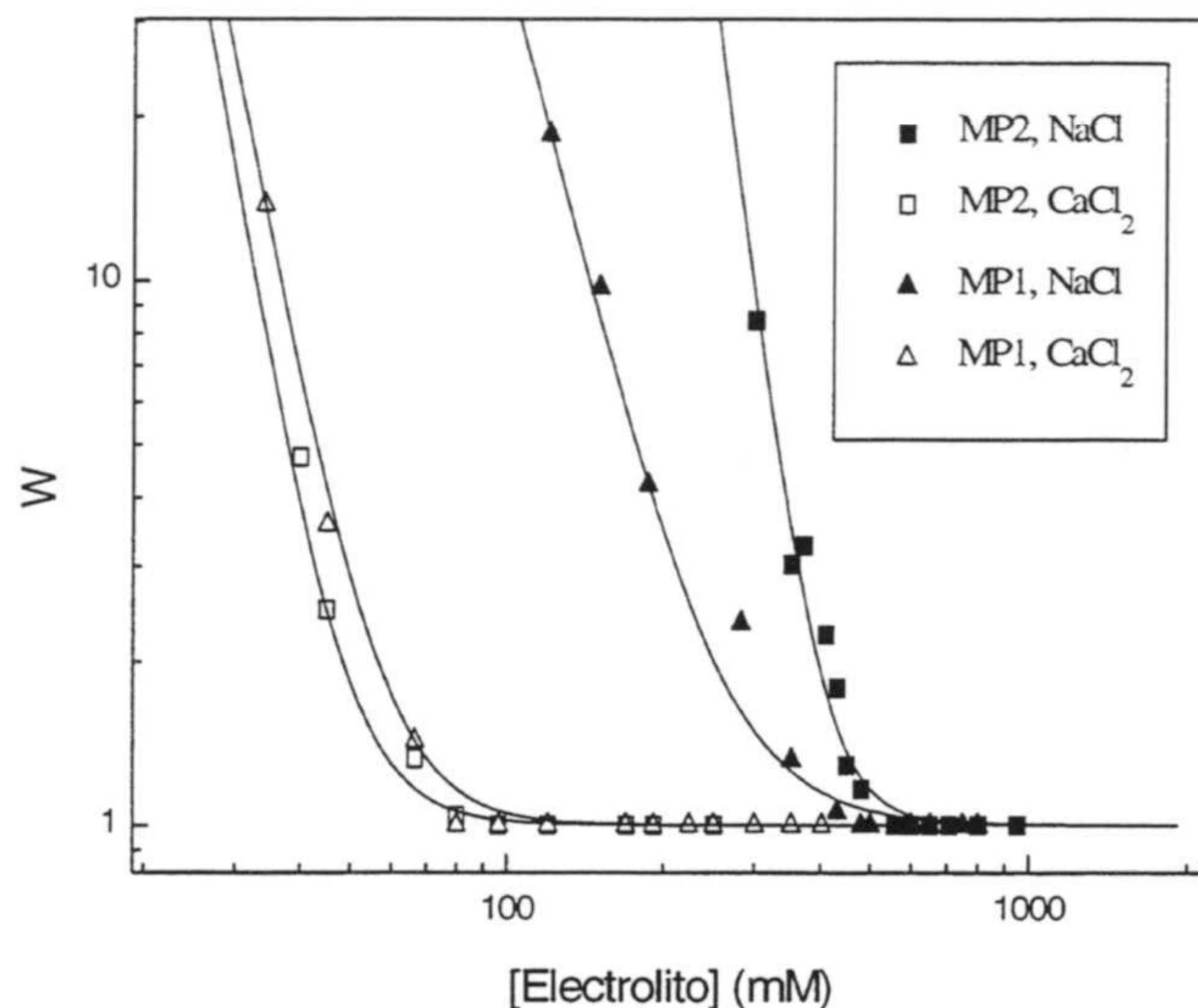


*Figura II.38. Efecto de la agitación en la agregación del látex AS11 a 150 mM NaCl.*

La ruptura de agregados de AS11 por agitación es más lenta que la ruptura por dilución.

Estos estudios son preliminares y se han mostrado como una prueba más de la hipótesis defendida a lo largo de esta sección de la tesis sobre la agregación en mínimos secundarios. Evidentemente queda mucho que investigar sobre la floculación/desfloculación por agitación. A partir de estos estudios se puede obtener información importante acerca de la forma de las curvas de potencial de interacción, tal y como indicó Overbeek (*Overbeek, 1982*).

Se ha estudiado también la estabilidad coloidal del látex MP1 usando  $\text{CaCl}_2$  como electrolito agregante con el fin de compararla con la del látex MP2. En la siguiente figura se muestran los factores de estabilidad para ambos látex en presencia de  $\text{NaCl}$  y  $\text{CaCl}_2$ .



**Figura II.39.** Estabilidad coloidal de los látex MP2 y MP1 en disoluciones de  $\text{NaCl}$  y  $\text{CaCl}_2$ .

Queda de manifiesto la similitud entre la estabilidad de ambos látex cuando se usa  $\text{CaCl}_2$  como electrolito. La c.c.c. del látex MP2 es de  $75 \pm 8$  mM y la del MP1  $78 \pm 10$  mM de  $\text{CaCl}_2$ . Sin embargo en presencia de  $\text{NaCl}$  la estabilidad del látex más grande, MP1, es menor existiendo una diferencia en sus c.c.c. de 100 mM. La relación entre la c.c.c. para electrolito monovalente y divalente es de 100:18 para el látex MP1 y de

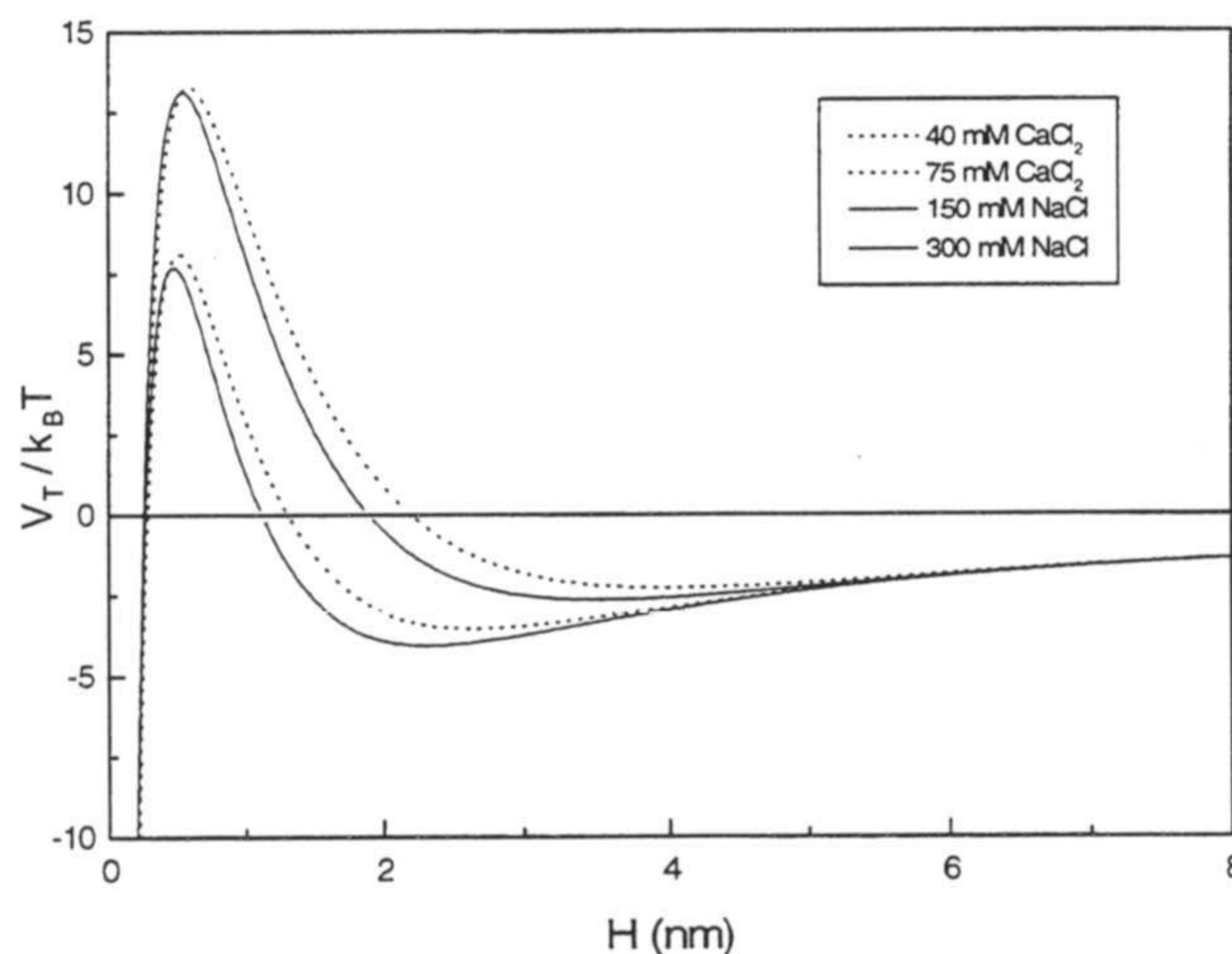
100:15 para el MP2. Al aumentar el tamaño del látex esta relación se aleja del encontrado experimentalmente por otros autores de 100:10.

En la Tabla II.9 aparecen los valores de  $A$  y  $\psi_d$  para ambos látex obtenidos por ajuste de los datos experimentales a la expresión teórica del factor de estabilidad que sólo tiene en cuenta la coagulación.

**Tabla II.9** Potencial eléctrico y constante de Hamaker obtenidos utilizando la teoría DLVO para los látex MP2 y MP1.

	Látex MP2			Látex MP1	
	$\Delta$ (nm)	$\psi_d$ (mV)	$A \times 10^{20}$ (J)	$\psi_d$ (mV)	$A \times 10^{20}$ (J)
Na <sup>+</sup>	0.096	-16.94	0.36	-10.95	0.16
Ca <sup>2+</sup>	0.099	-13.60	0.32	-12.81	0.24

Cuando la agregación se produce con NaCl las diferencias entre la constante de Hamaker y el potencial difuso se hacen más acusadas que si el electrolito es el CaCl<sub>2</sub>. Una posible explicación la podemos encontrar si analizamos el efecto de la valencia del contraión sobre los mínimos secundarios. Para ello se ha representado el potencial de interacción total (figura II.40) en presencia de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> para una partícula de radio 200 nm, constante de Hamaker de  $0.35 \times 10^{-20}$  J y potencial difuso de -17 mV.



**Figura II.40.** Influencia de la valencia del contraión en el mínimo secundario.

Los diagramas de potenciales para cationes divalentes muestran mínimos secundarios menos profundos que para cationes monovalentes. La fracción de agregados formados por floculación disminuye al usar cationes divalentes. Por este motivo la correlación en la estabilidad coloidal de los látex MP2 y MP1 es mayor cuando el electrolito es  $\text{CaCl}_2$ . Cuando la sal es  $\text{NaCl}$  el látex MP1, que es más grande, presenta más floculación que el látex MP2 produciéndose mayores desviaciones del comportamiento clásico DLVO.

Por otra parte este resultado concuerda con estudios realizados por diferentes autores que muestran que la reptización por dilución es más fácil cuando el contraión es monovalente que cuando es polivalente (*Frens et al, 1972, Jeffrey et al., 1988*).

Todos estos estudios ponen de manifiesto el papel relevante que desempeña la teoría DLVO en la física de los coloides. A pesar de las numerosas aproximaciones en las que se fundamenta la teoría, ésta es capaz de predecir cualitativamente y semicuantitativamente los fenómenos de agregación de coloides liofóbicos.

## 11. Factor de estabilidad para la floculación en mínimos secundarios

La floculación ocurre cuando las partículas coloidales caen en un mínimo secundario y no tienen suficiente energía como para salir de él. En la historia de la física coloidal se le ha prestado menos atención a este tipo de agregación debido al tamaño clásico de las partículas coloidales (menor a 1000 nm). No obstante la importancia de la floculación tanto en el ámbito teórico como el aplicado está aumentando considerablemente.

Marmur (*Marmur, 1979*) desarrolló un modelo cinético para la agregación en un mínimo primario, en un mínimo secundario o la combinación de los dos. Para ello supuso que la partículas agregarían en el mínimo primario si la suma de sus energías cinéticas era superior al máximo de potencial ( $V_{max}$ ) más la profundidad del mínimo secundario ( $V_{min}$ ), mientras que agregarían en el mínimo secundario si sus energías eran inferiores al potencial de ese mínimo. Las expresiones de los factores de



estabilidad obtenidos por Marmur tienen limitada utilidad práctica debido a la complicación de los cálculos necesarios. Partiendo de este modelo Wang (Wang, 1991) ha propuesto las siguientes expresiones para:

- la fracción de partículas agregadas en el mínimo primario,  $f_p$ :

$$f_p = (1 + \Delta V) \exp(-\Delta V) \quad (\text{II.46})$$

- la fracción de partículas agregadas en el mínimo secundario,  $f_s$ :

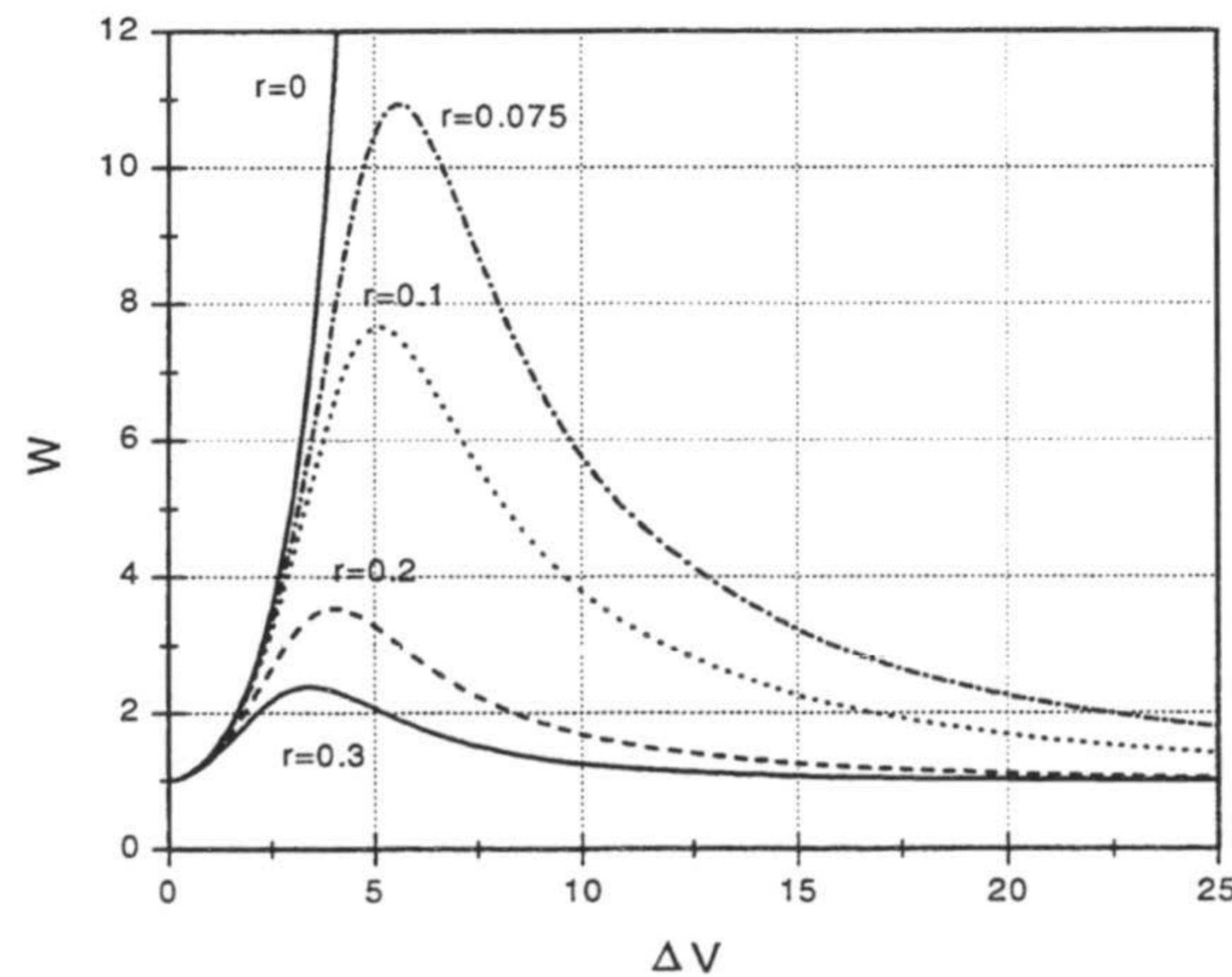
$$f_p = 1 - (1 - V_{\min}) \exp(V_{\min}) \quad (\text{II.47})$$

donde  $\Delta V = V_{\max} + V_{\min}$  (expresados en unidades de  $k_B T$ ).

De esta forma el factor de estabilidad queda definido como:

$$W = \frac{1}{f_p + f_s} \quad (\text{II.48})$$

Este autor indicó en su trabajo que una comparación entre la teoría y los datos experimentales resulta difícil. Tanto el valor de  $\Delta V$  como el de  $V_{\min}$  son proporcionales al tamaño de la partícula. De esta forma una representación del factor de estabilidad  $W$  frente a  $\Delta V$  (que es proporcional al diámetro) para un valor constante de la razón  $r = -V_{\min}/\Delta V$  nos informa sobre la dependencia de  $W$  con el tamaño de la partícula (Marmur, 1979; Wang, 1991). La figura II.41 se muestra la dependencia del factor de estabilidad cuantificado a través de la expresión II.48 en función de  $\Delta V$  para varios valores de  $r$ .



**Figura II. 41.** Influencia del tamaño de partícula sobre el factor de estabilidad manteniendo constante el parámetro  $r$ .

La curva para  $r=0$  corresponde al caso de que sólo hay coagulación siendo la profundidad del mínimo secundario insignificante. Para este caso el factor de estabilidad tiende a infinito conforme aumenta la barrera energética que dificulta la agregación en el mínimo primario ( $\Delta V$ ).

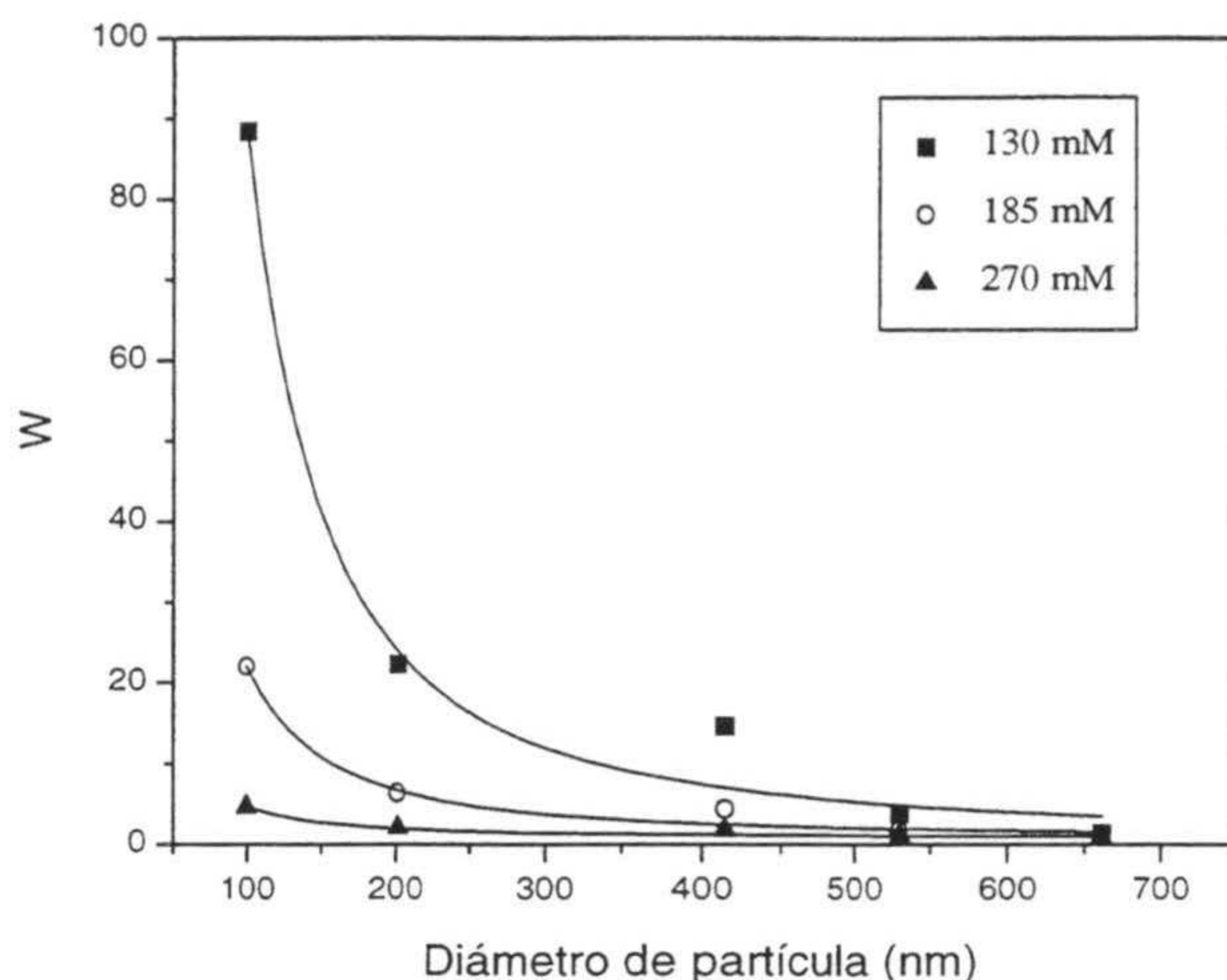
La zona de subida de las curvas corresponde al predominio de la coagulación. La estabilidad coloidal aumenta al aumentar el valor de  $\Delta V$  para un valor fijo de  $r$ . Llegado un valor concreto de  $\Delta V$  la estabilidad comienza a disminuir debido a que la profundidad del mínimo es suficiente como para haber floculación. Si se sigue aumentando  $\Delta V$  la barrera energética es tan alta que no hay coagulación pero hay floculación en mínimos secundarios que son cada vez más profundos disminuyendo con ello la estabilidad del coloide.

El valor de  $\Delta V$  es directamente proporcional al tamaño de la partícula. Teniendo esto en cuenta la figura II.41 viene a indicar que la estabilidad coloidal aumenta con el tamaño de partícula llegando a un máximo para luego comenzar a descender. La zona de subida, en la que sólo hay coagulación ó ésta predomina, concuerda con las predicciones de la teoría DLVO (ecuación II.44). Sin embargo cuando la floculación comienza a ser importante se observa una bajada de la estabilidad con el tamaño de partícula.

Tsuruta y colaboradores (*Tsuruta et al., 1995*) han estudiado la estabilidad coloidal de partículas de látex recubiertas con lípido encontrando que la *c.c.c.* aumenta con el diámetro de la partícula hasta alcanzar un máximo para 200 nm. Este máximo se mantiene hasta los 300 nm de diámetro para luego empezar a descender. Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestros estudios y concuerdan con las predicciones del modelo cinético que tiene en cuenta la existencia de coagulación y floculación.

La dependencia del factor de estabilidad experimental con el diámetro de partícula ( $d$ ) para tres concentraciones de electrolito aparece en la siguiente figura.

Los datos han sido ajustados al modelo de Wang usando como parámetros de ajuste  $r$  y  $\Delta V/d$ . Los valores de  $r$  y  $\Delta V/d$  fueron: 0.013 y 0.12  $k_B T/nm$  para 130 mM; 0.033 y 0.10  $k_B T/nm$  para 185 mM; 0.15 y 0.052  $k_B T/nm$  para 270 mM.

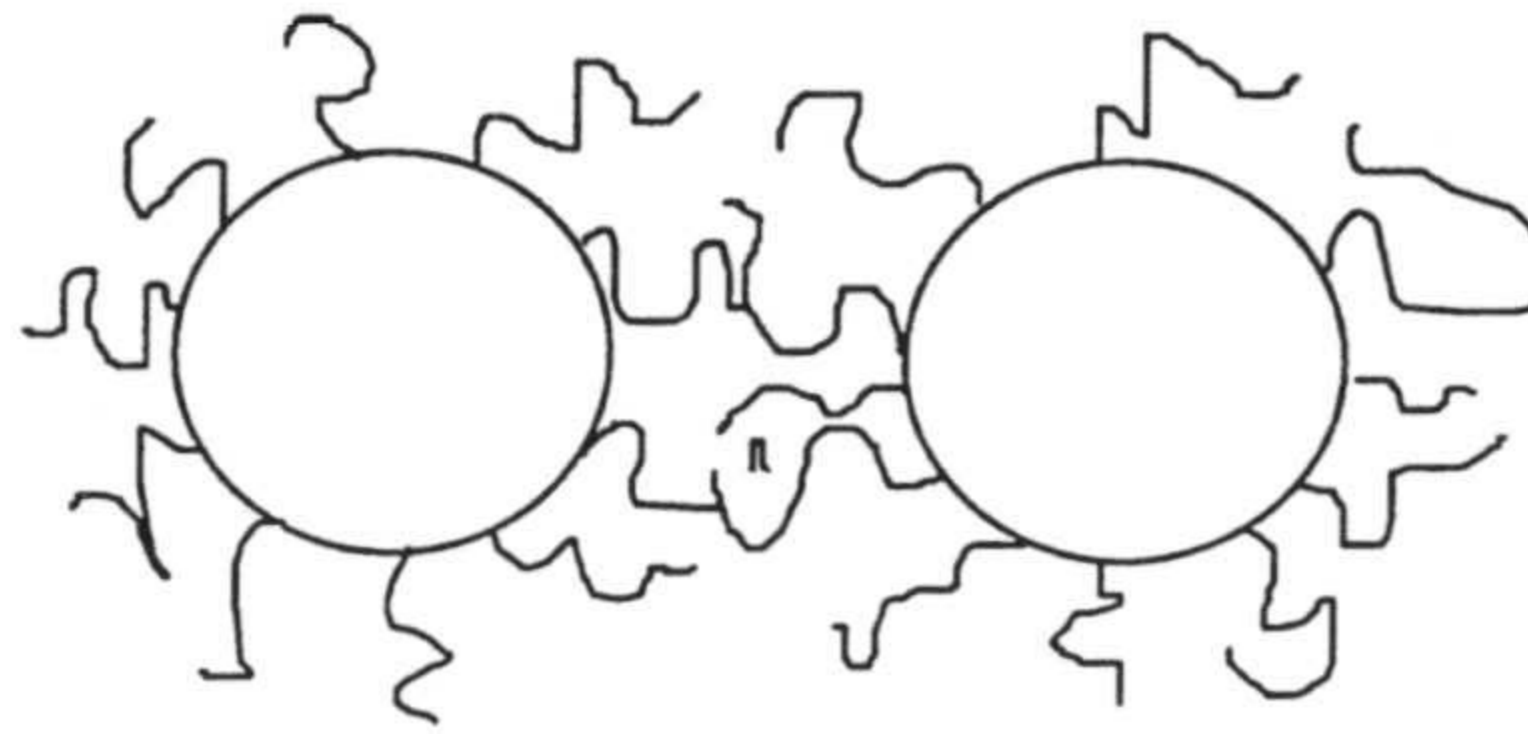


**Figura II. 42.** Factor de estabilidad experimental en función del tamaño de partícula. Los datos han sido ajustados al modelo de Wang.

Es interesante resaltar la similitud entre las curvas de la figura II.42 y las de la figura II.41. La dependencia teórica predice una bajada del factor de estabilidad para diámetros inferiores a 100 nm, no observándose experimentalmente porque el diámetro más pequeño estudiado ha sido de 100 nm. Como se puede observar el modelo concuerda de forma aceptable con los datos experimentales. Esta correlación viene a indicar que la dependencia de la estabilidad coloidal con el tamaño de partícula se puede deber a la combinación de dos modos de agregación: coagulación y floculación. Para diámetros inferiores a 100 nm existe fundamentalmente coagulación. Al aumentar el tamaño la floculación empieza a tener más importancia, presentando sólo floculación las partículas muy grandes.

## 12. Estabilización estérica

Hasta ahora se ha estudiado el mecanismo de estabilización electrostático que tiene su origen en la carga eléctrica superficial de las partículas. Sin embargo existe otro mecanismo de estabilización conocido como estérico que surge por la presencia de largas cadenas de polielectrolito hidrofílico situadas sobre la superficie de la partícula (ver figura II.43).



**Figura II. 43.** Origen de la estabilización estérica.

Estas cadenas se encuentran extendidas hacia la disolución y pueden estabilizar a través de dos mecanismos diferentes:

- Cuando dos partículas se acercan a una distancia menor que el doble del espesor de la capa de polímero se produce un solapamiento entre las capas. Este solapamiento provoca un incremento local de concentración de polielectrolito, lo que provoca, si el medio es un buen disolvente, un incremento de la energía libre. Por tanto, habrá una tendencia de las moléculas del disolvente a entrar en esa zona y separar las partículas. Este efecto se conoce como efecto *osmótico*.

- Otro segundo efecto que puede ocurrir, conocido como efecto *elástico*, aparece cuando las superficies de las partículas se aproximan a una distancia menor que el espesor de la capa estabilizadora. A estas distancias la libertad conformacional de las cadenas queda reducida enormemente. Esto se traduce en una disminución de la entropía conformacional de las cadenas que origina otro aumento de la energía libre del sistema, haciendo que este acercamiento sea energéticamente desfavorable.

Vincent y colaboradores (*Vincent et al., 1980; 1986*) fueron los primeros que hicieron una consideración cuantitativa del problema obteniendo expresiones para el efecto osmótico y elástico.

Si la contribución estérica es menor en valor absoluto que la interacción de van der Waals se habla de estabilización electroestérica. La estabilidad de un coloide estabilizado por esta vía es sensible a la concentración de electrolito. Cuando la contribución estérica sea superior a la de van der Waals se habla de estabilización estérica. Un coloide estéricamente estabilizado no puede ser floculado mediante electrolito (*Romero, 1998b*).

La estabilización estérica no es uno de los objetivos de esta tesis, sin embargo es interesante detenernos un momento en ella para explicar la estabilidad coloidal de los látex S4CS9, S5CS1, S5CS2 y S5CS3.

En la siguiente tabla se recogen los valores de la c.c.c. en función del pH para los látex S4CS9 y S5CS1.

**Tabla II.10** Estabilidad coloidal de los látex S4CS9, S5CS1, S5CS2 y S5CS3 en función del pH.

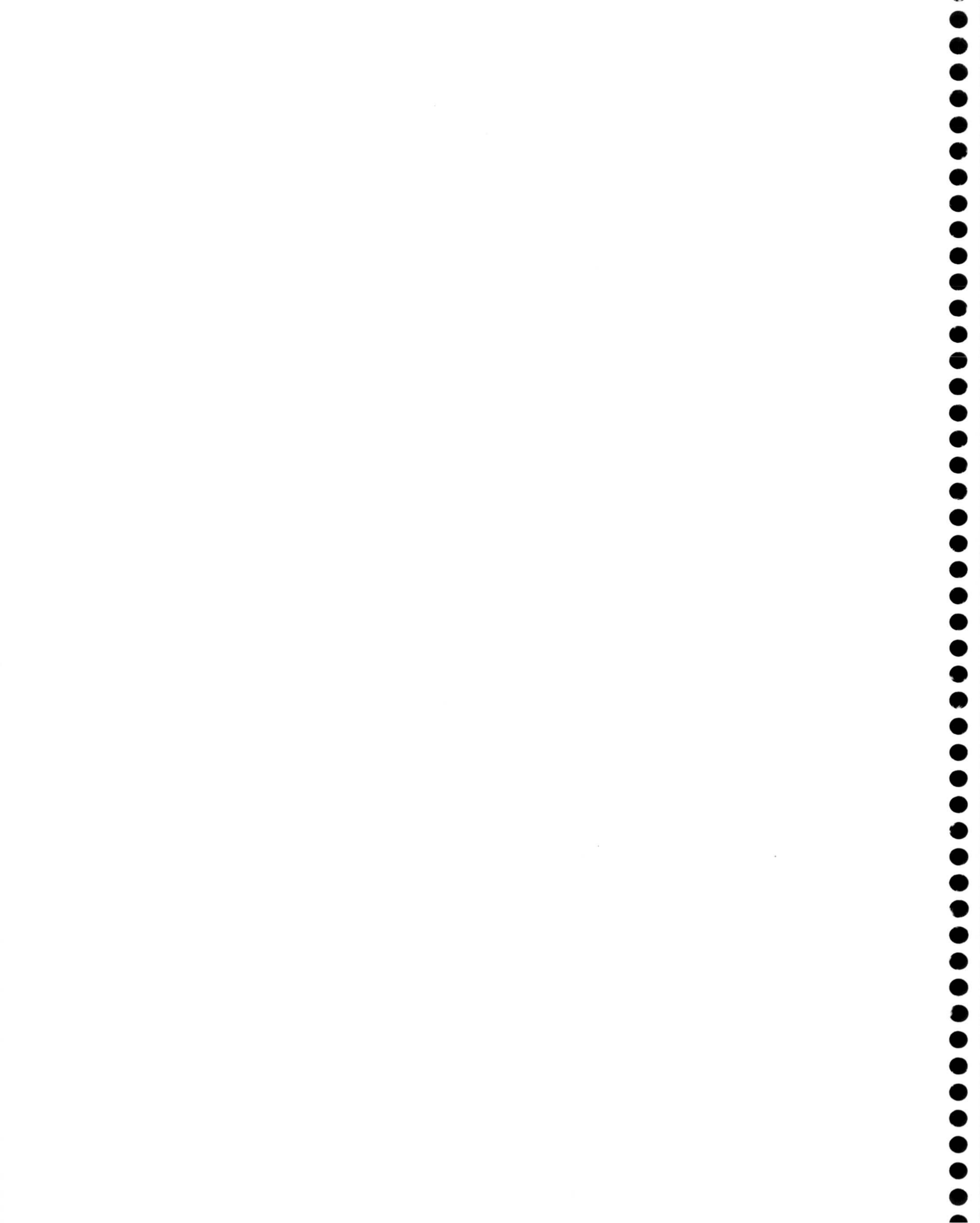
pH	S4CS9 c.c.c. (mM)	S5CS1 c.c.c. (mM)	S5CS2 c.c.c. (mM)	S5CS3 c.c.c. (mM)
4.07	280±30	350±35	>2500	---
5.14	340±35	385±40	>2500	---
6	410±40	891±50	---	---
7	407±35	>1500	---	---
8.1	403±30	>1500	---	---

Varios comentarios se han de realizar analizando estos resultados. En primer lugar el látex S4CS9 fue sintetizado sólo con estireno y clorometilestireno mientras que los demás tienen cantidades crecientes de ácido metacrílico en la receta de síntesis. Llama la atención, por tanto, que la estabilidad del S4CS9 dependa del pH. Esta dependencia viene a demostrar la hipótesis realizada en el capítulo I de que este látex presenta una cierta cantidad de grupos carboxilo superficiales debido a la reacción de Koltoff.

El látex S5CS3 (para todos los pHs) y el S5CS2 (para pHs superiores a 5) eran completamente estables a cualquier concentración de electrolito usada (superior a 3M). Este comportamiento es característico de coloides estabilizados estéricamente. Concretamente estos coloides están estabilizados por las cadenas de oligómeros flexibles existentes en su superficie, idea que fue planteada en el capítulo I cuando se consideró que estos látex presentan "hairy layer".

# capítulo III

**Estabilidad coloidal de  
sistemas liofílicos:  
fuerza de hidratación**



# 3 Estabilidad coloidal de sistemas liofílicos: fuerzas de hidratación

## 1. Introducción

Los coloides poliméricos pueden ser usados bien como sistemas modelo para estudiar la física coloidal, ó como material para numerosas aplicaciones entre las que podemos encontrar las biológicas, farmacéuticas y médicas. Estas aplicaciones biomédicas mueven alrededor de 45 millones de dólares anualmente en el mercado mundial. Este éxito se debe fundamentalmente a dos motivos: i) la facilidad de controlar el tamaño de las partículas, química de la superficie, naturaleza del polímero, etc; ii) los grandes progresos acontecidos durante las dos últimas décadas en biología molecular que han permitido disponer de anticuerpos monoclonales, fragmentos de ADN, enzimas, proteínas recombinantes, etc.

Uno de los problemas fundamentales ante el que nos podemos encontrar en cualquier aplicación biomédica de los coloides poliméricos es que, generalmente, la adsorción de la biomolécula conduce a un indeseable descenso en la estabilidad del coloide.

Al producirse la adsorción de una biomolécula, como por ejemplo una proteína, sobre una partícula de látex se pasa de un sistema liofóbico a uno liofílico. En este nuevo sistema liofílico aparecen mecanismos de estabilización/desestabilización que no caracterizaban a la partícula desnuda.

La diferencia fundamental entre una superficie liofóbica y una liofílica es la afinidad que presenta esta última por el disolvente. La estructuración del agua (que es el disolvente en nuestro caso) en torno a la superficie de la partícula es una manifestación



de la hidrofobicidad de la misma (Vogler, 1998). Esta ordenación del disolvente debe influir en las fuerzas que surgirán cuando dos partículas se aproximen.

La teoría clásica DLVO generalmente no predice la estabilidad de coloides muy hidrofóbico ó muy hidrofílicos. Por ejemplo, la estabilidad coloidal de la sílica en su punto isoeléctrico (Matijevic et al., 1969; Watillon, 1970; Grabbe et al., 1993), la ausencia de coalescencia de burbujas a alta fuerza iónica (Lessard et al., 1971), la deposición anómala de poliestireno sobre vidrio (Elimelech, 1990b) y la alta estabilidad de muchas superficies biológicas y macromoléculas en disoluciones concentradas de sal e incluso a carga neta superficial nula (LeNeveu et al., 1976; Rand et al., 1989; Broide et al., 1996).

A partir de la década de los 80 con el desarrollo del microscopio de fuerzas atómicas (AFM) se ha podido medir directamente el potencial de interacción entre superficies (Israelachvili et al., 1972; 1978; Horn et al., 1989). Este método permite medir fuerzas en torno a los  $10^{-10}$  N (Binning et al., 1986; Martin et al., 1988; Meyer et al., 1988). Muchos de los estudios realizados con AFM han permitido poner de manifiesto las limitaciones de la teoría DLVO. La medida directa de las fuerzas de interacción entre superficies de sílica (Peshel et al., 1982; Ducker et al., 1991; Meagher 1992; Chapel 1994; Vigil et al., 1994) y de mica (Pashley et al., 1981a; 1984b) en disoluciones acuosas a través de AFM, ha puesto de manifiesto la buena concordancia con la teoría DLVO para distancias de separación de unos pocos nanómetros. Sin embargo a distancias menores aparece una fuerza repulsiva de corto alcance conocida como **fuerza de hidratación**. Pashley atribuyó esta fuerza a la deshidratación que se produce cuando las dos superficies interaccionan. En torno a una partícula hidrofílica existe una capa de agua estructurada proveniente de la hidratación de los grupos iónicos superficiales y de los iones hidratados y adsorbidos sobre ella. Cuando se acercan las superficies se produce una determinada deshidratación que provoca un aumento de la energía libre del sistema. En consecuencia surge la fuerza repulsiva de hidratación o estructural. Esta fuerza aparece a distancias cortas una vez que la doble capa de las partículas está comprimida. No es de extrañar que la teoría DLVO, que considera al medio como continuo, falle a distancias cortas donde la naturaleza discreta del disolvente no se puede despreciar.

Estas fuerzas han sido también detectadas al interaccionar películas de surfactantes, atribuyéndose en este caso la aparición de la fuerza repulsiva a la hidratación de los grupos polares del tensioactivo (*LeNeveu et al., 1976*).

Uno de los grandes objetivos de esta tesis es el estudio de sistemas que podrían utilizarse como tests de inmunoanálisis basados en la aglutinación de látex. A través de esta técnica se cuantifica el antígeno o anticuerpo presente en una muestra por aglutinación de partículas de látex recubiertas con el anticuerpo ó antígeno correspondiente. Nuestro trabajo se ha centrado en el caso de la adsorción del anticuerpo IgG y de su fragmento F(ab')<sub>2</sub>. En el presente capítulo se discutirán los datos de estabilidad coloidal de sistemas liofílicos formados por partículas de látex recubiertas por proteína.

## 2. Obtención de los complejos látex-proteína

Las muestras de IgG y F(ab')<sub>2</sub> fueron generosamente cedidas por Biokit S.A. (Barcelona). Los experimentos de adsorción de proteínas sobre las partículas de látex se realizaron de modo estándar en un baño termostatzado con agitación a una temperatura de 35±1 °C durante 6 horas. Este último parámetro no es demasiado crítico una vez que se ha superado el 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 que se adsorbe para tiempos de adsorción superiores a 3 minutos (*Galisteo, 1992; Martín, 1993*).

En todos los experimentos el volumen de adsorción era de 5 ml y el área polimérica disponible de 0.4 m<sup>2</sup>. Conocidos el volumen de látex y de proteína necesarios se completa hasta los 5 ml con el tampón requerido. Los tampones usados son de baja fuerza iónica: acetato 13.5 mM para pH 4 y 3.15 mM para pH 5, fosfato 1.79 mM para pH 6 y 1.13 mM para pH 7, borato 15 mM para pH 8, 5.14 mM para pH 9 y 2.2 mM para pH 10.

Para calcular la cantidad de proteína inicial antes de añadir el látex se mide la absorbancia de la mezcla proteína-tampón a una longitud de onda de 280 nm, sabiendo que el coeficiente de extinción de la IgG y la F(ab')<sub>2</sub> es de 1.40 ml mg<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

y  $1.48 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

Una vez transcurrido el tiempo de adsorción se somete al sistema a dos procesos consecutivos para retirar las partículas poliméricas del medio antes de medir la concentración de proteína no adsorbida:

- un proceso de centrifugación (30 minutos) a 32000 g para un látex de 200 nm de diámetro. La centrífuga empleada fue de la casa Beckman (modelo J2-HC ROTOR JA17). 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 suspensión. El diámetro del filtro (Millipore) era de 100 nm. 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 los cálculos.

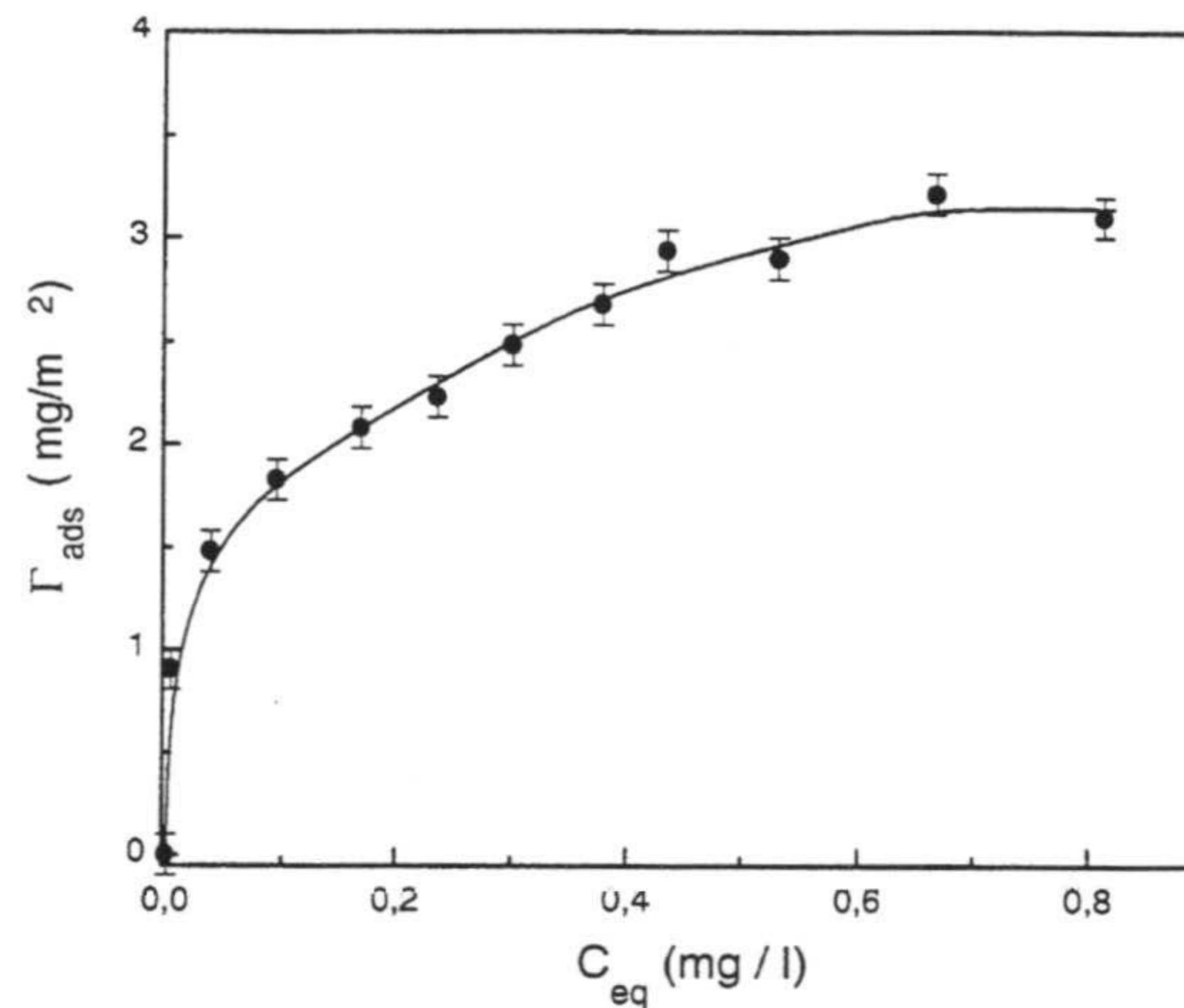
Finalmente se volvía a medir espectrofotométricamente la concentración de proteína disuelta en el sobrenadante y por diferencia con la cantidad inicial añadida se calculaba la que quedaba adsorbida sobre la superficie del látex. El látex centrifugado se redispersaba en el tampón deseado para su posterior uso en los estudios de estabilidad coloidal.

El punto isoeléctrico de la proteína  $F(ab')_2$  fue determinado por enfoque isoeléctrico en un equipo Phast-System de Pharmacia. El medio utilizado para el desplazamiento eléctrico de la proteína era un Phast Gel-1 de poliacrilamida (Pharmacia), que cubre un rango de pH entre 3 y 9. El isoelectroenfoco de la muestra de  $F(ab')_2$  fue bastante heterogéneo, presentando un rango de puntos isoeléctricos entre 4.7-6.0.

### **3. Isooterma de adsorción de $F(ab')_2$ sobre el látex S4CS9**

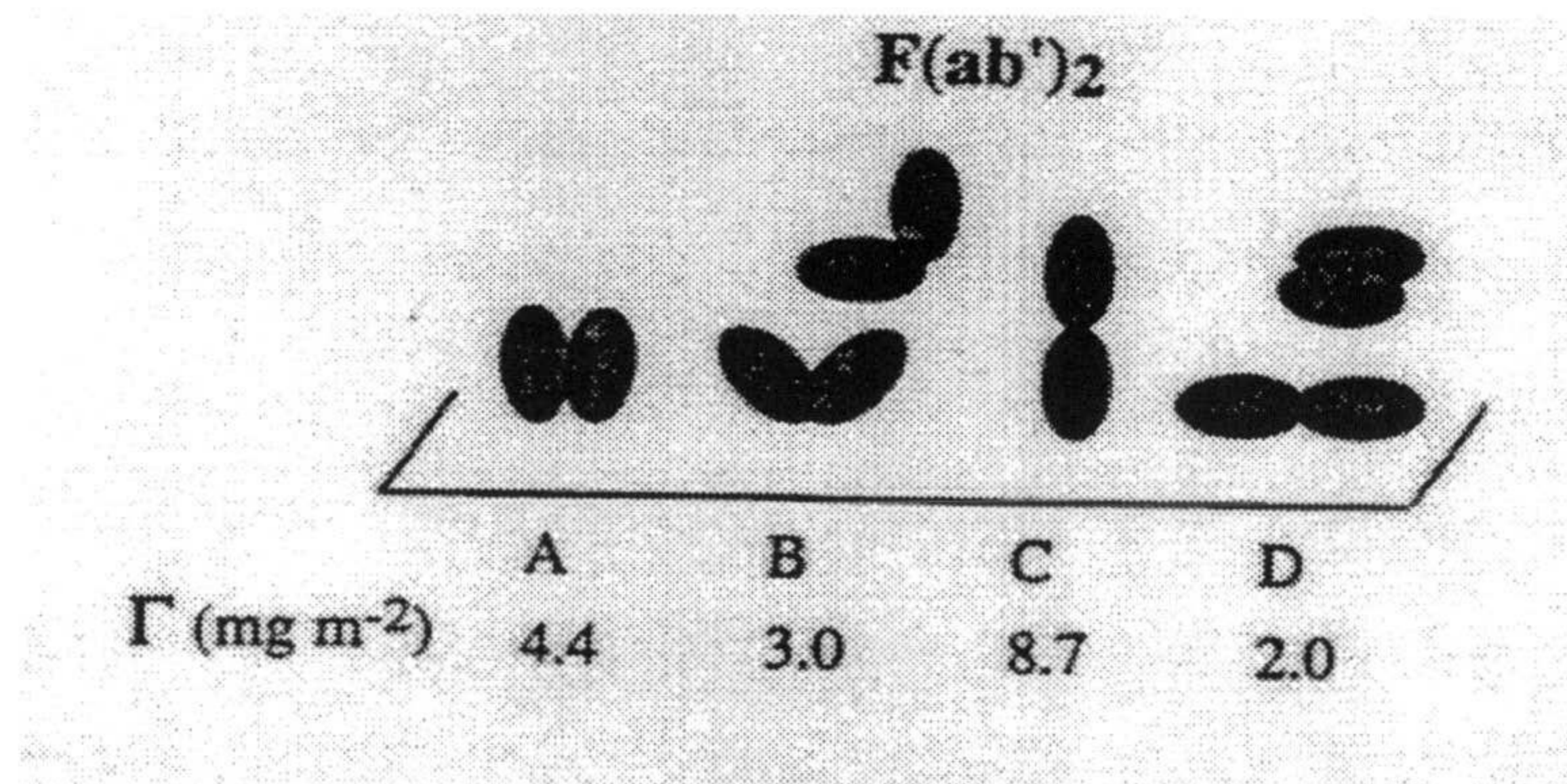
Dos de los puntos interesantes de esta tesis (como se indicará en capítulos posteriores) es el uso del fragmento  $F(ab')_2$ , en lugar de toda la proteína IgG, y un látex que presente grupos clorometilo superficiales como el S4CS9. Por estos motivos los estudios de estabilidad coloidal de sistemas liofílicos se realizaron con complejos de S4CS9- $F(ab')_2$ . Antes de abordar tales resultados es interesante presentar la

isoterma de adsorción a pH 7.2 de esta proteína sobre el S4CS9 (Figura III.1). En esta isoterma se representa la cantidad de proteína existente en equilibrio frente a la cantidad adsorbida. El término en equilibrio no implica que la adsorción proteica sea un proceso reversible, lo que se representa en realidad es la cantidad que queda en la disolución sin adsorberse.



**Figura III.1.** Isoterma de adsorción de  $F(ab')_2$  sobre S4CS9 a pH 7.2.

La cantidad adsorbida aumenta con la cantidad de proteína presente en la disolución hasta alcanzar un valor máximo que se mantiene constante. Este valor corresponde a 3.2 mg/m<sup>2</sup>. A partir de las dimensiones cristalográficas de la proteína, 8.2x5.0x3.8 nm<sup>3</sup> (Marquart et al., 1980), se puede calcular el valor de una monocapa para diferentes configuraciones:



**Figura III.2.** Conformaciones posibles de la proteína  $F(ab')_2$ .

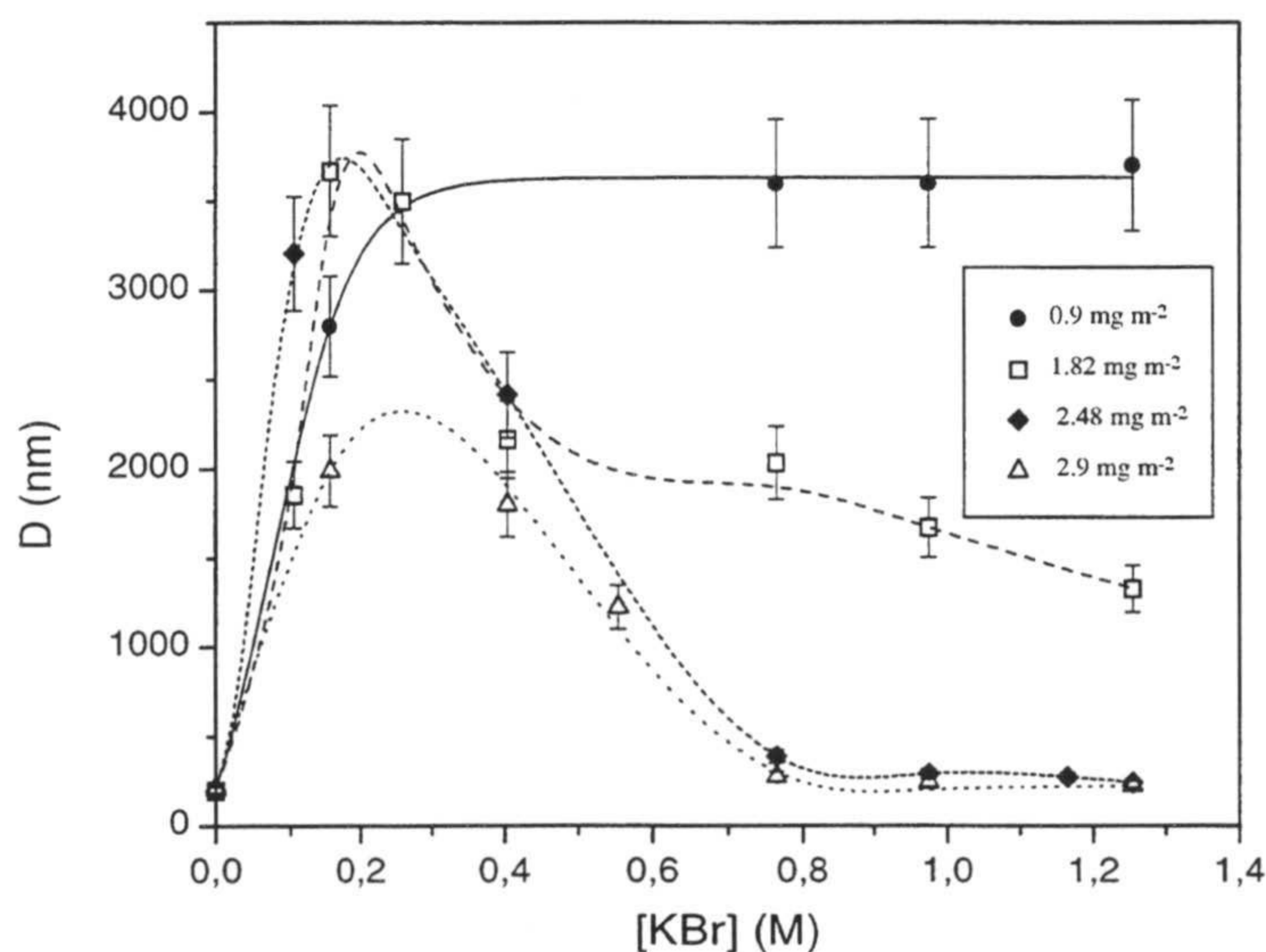
El valor obtenido experimentalmente de  $3.2 \text{ mg/m}^2$  parece indicar la existencia de una monocapa con las moléculas dispuestas con los brazos abiertos formando un ángulo de  $180^\circ$ . Evidentemente la proteína puede estar en diferentes conformaciones sin llegar a formar una monocapa y dar el mismo valor de adsorción.

#### 4. Estabilidad coloidal anómala de complejos S4CS9-F(ab')<sub>2</sub>

La estabilidad coloidal de los complejos S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> fue estudiada mediante dos procedimientos experimentales diferentes:

- Midiendo el tamaño medio de agregado por espectroscopía de fotocorrelación: volúmenes iguales de electrolito y de complejo se mezclaban y después de 24 horas se medía el tamaño. La concentración de partículas en cubeta era de  $10^9$  part/ml.
- Siguiendo la cinética de agregación con el nefelómetro y obteniendo los factores de estabilidad.

La siguiente figura muestra la dependencia del diámetro medio de agregado en función de la concentración de electrolito para complejos S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> con diferente recubrimiento a pH 7.2.



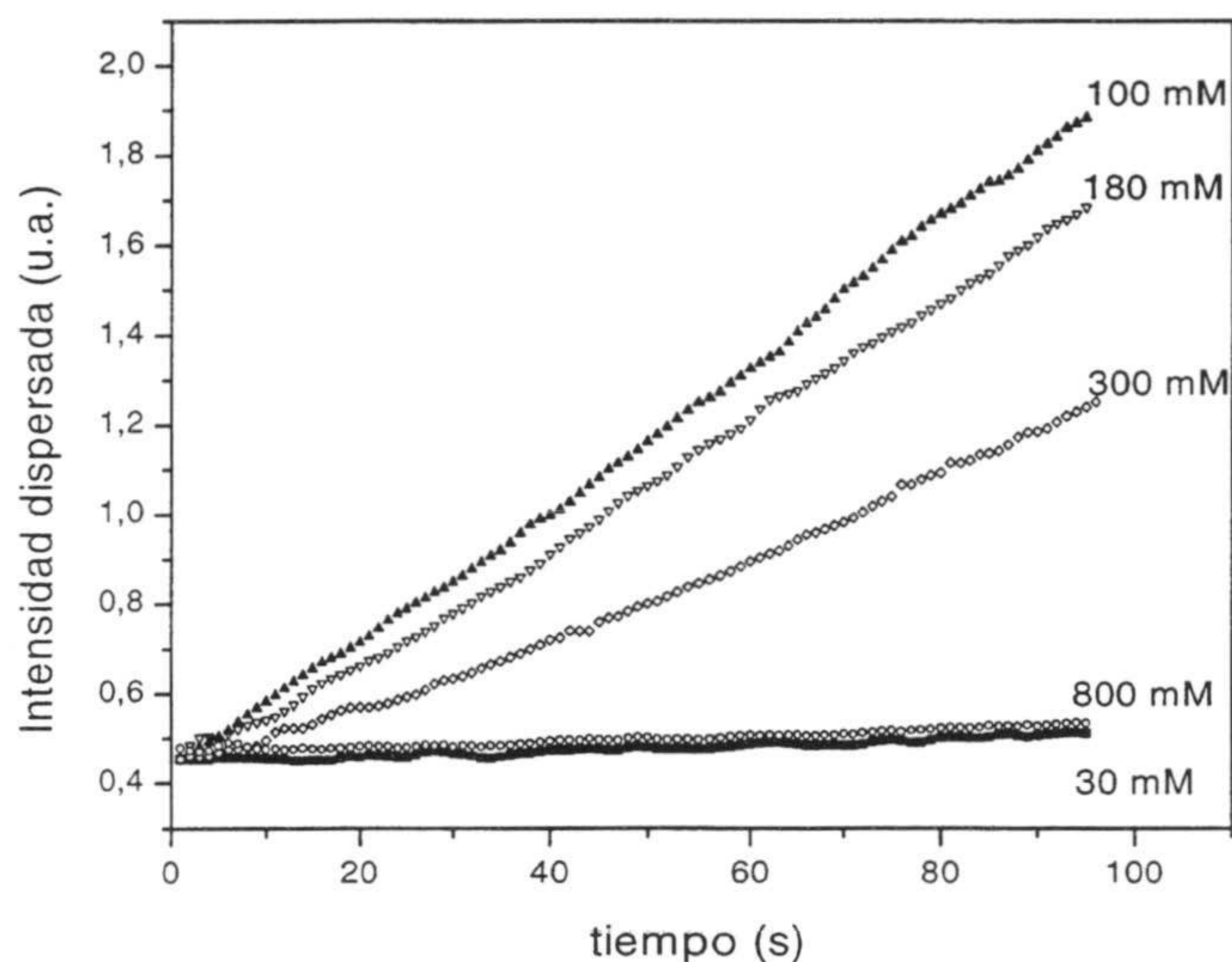
**Figura III.3.** Dependencia del diámetro medio ( $D$ ) de agregado con la concentración de sal para diferentes complejos S4CS9-F(ab')<sub>2</sub>.

El comportamiento del complejo de menor recubrimiento ( $0.9 \text{ mg/m}^2$ ) es el esperado según la teoría DLVO. Al aumentar la concentración de sal el tamaño medio de agregado aumenta como consecuencia de la disminución de la estabilidad del complejo (zona de agregación lenta). Llegado un valor determinado de concentración el tamaño permanece constante e independiente de la fuerza iónica. Esta zona corresponde a la agregación rápida donde la carga superficial está apantallada y la estabilidad coloidal es mínima. Sin embargo, al aumentar el recubrimiento proteico aparece un comportamiento anómalo. Después de alcanzar el máximo de inestabilidad el diámetro de los agregados comienza a disminuir al aumentar la cantidad de electrolito. Este comportamiento no se puede explicar con la teoría clásica DLVO que predice un descenso en la estabilidad coloidal al aumentar la concentración de sal. Esta región la hemos llamado zona no-DLVO. Esta zona no-DLVO es más acusada cuanto mayor es la cantidad de proteína adsorbida sobre la partícula. Así por ejemplo, los dos complejos de mayor recubrimiento son completamente estables para concentraciones de sal superiores a 800 mM después de haber pasado por un máximo de inestabilidad a 200 mM.

Esta dependencia con el recubrimiento proteico sugiere que el nuevo mecanismo estabilizador no-DVLO que aparece se debe a la proteína adsorbida. Mediante la adsorción de la proteína se ha pasado de un coloide con una superficie marcadamente hidrofóbica a una partícula más hidrofílica.

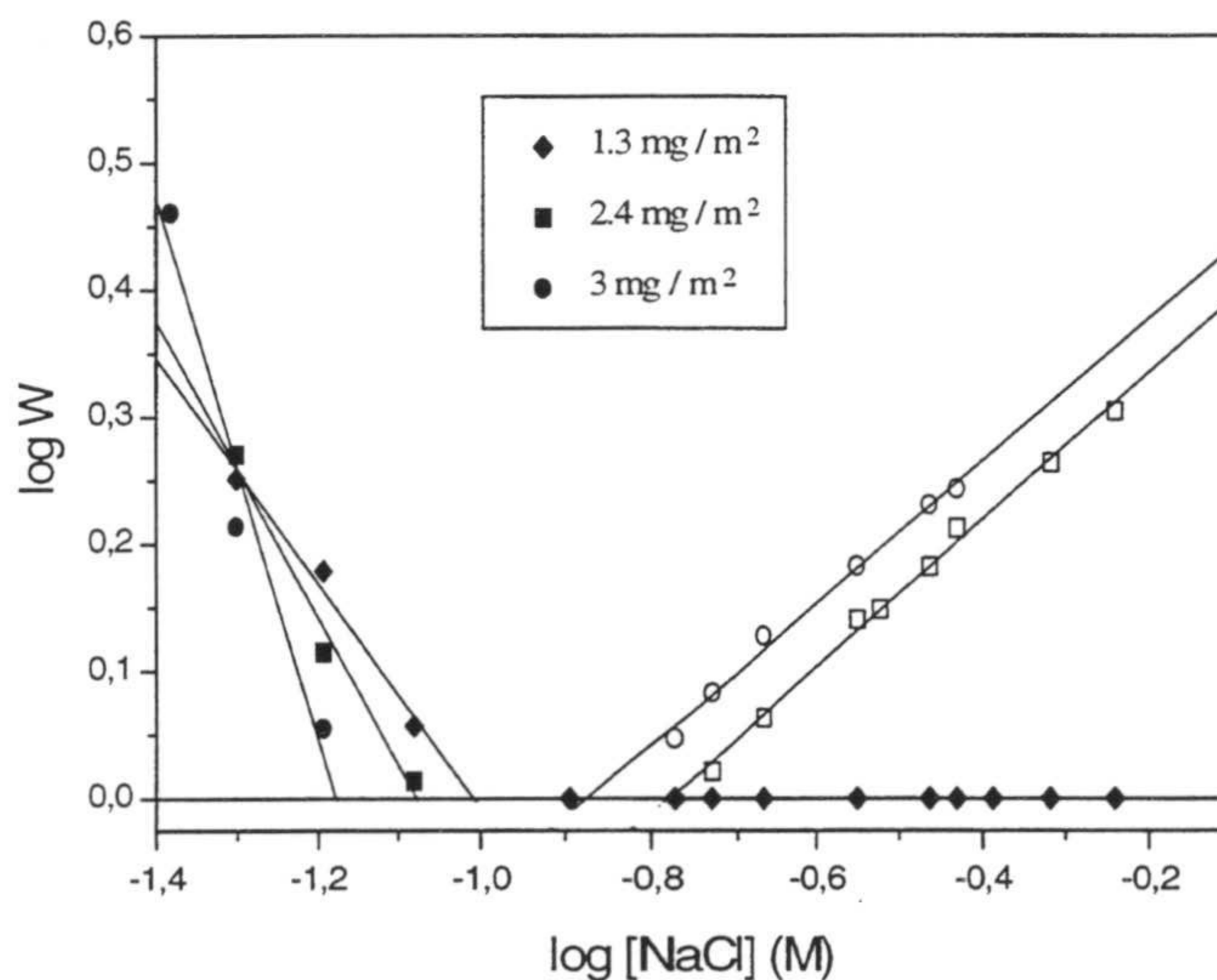
A través del factor de estabilidad obtenido a partir de la medida de las constantes de agregación con el nefelómetro se pasó a cuantificar la estabilidad coloidal de los complejos. Unos experimentos típicos sobre la cinética de agregación para estos sistemas aparecen en la figura III.4.

La constante de agregación, obtenida a partir de la pendiente de la intensidad dispersada en función del tiempo, aumenta con la concentración de sal tal y como predice la teoría DLVO. Esta alcanza un máximo para 100 mM pero al seguir aumentando la concentración de electrolito la estabilidad comienza a disminuir. El complejo estudiado en este caso tiene la misma estabilidad coloidal a 30 mM que a 800 mM.



**Figura III.4.** Intensidad dispersa en función del tiempo para la agregación de un complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> y diferentes concentraciones de electrolito.

La siguiente figura muestra los diagramas de estabilidad para tres complejos S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> a pH 7.3.



**Figura III.5.** Estabilidad coloidal de diferentes complejos S4CS9-F(ab')<sub>2</sub>.

En estas gráficas se ha realizado el ajuste lineal de la zona DLVO para obtener los valores de la c.c.c. para los diferentes recubrimientos. El complejo con un

recubrimiento de 1.3 mg/m<sup>2</sup> presenta el comportamiento predicho por la DLVO, mientras que los otros dos complejos presentan un comportamiento no-DLVO.

Estos diagramas de estabilidad obtenidos a partir de los factores de estabilidad son comparables a los de la figura III.3. La zona DLVO en la cual el factor de estabilidad disminuye con la concentración de sal se corresponde con una subida del diámetro medio de agregado. Cuando el factor de estabilidad vale 1 la estabilidad del complejo es mínima y con ello el diámetro medio de agregado es máximo. En la zona no-DLVO el diámetro disminuye mientras que aumenta el factor de estabilidad.

Es importante dejar patente que la región no-DLVO se ajusta también a una dependencia lineal. Este ajuste nos permite obtener aquella concentración de electrolito a partir de la cual comienza la estabilización anómala y que hemos llamado concentración crítica de estabilización (*c.s.c.*). El valor de la *c.s.c.* va a caracterizar el mecanismo no-DLVO que presentan los complejos látex-proteína. En la tabla III.1 se muestran los valores de *c.c.c.* y de *c.s.c.* para los tres recubrimientos. El valor de la *c.s.c.* disminuye al aumentar la cantidad de F(ab')<sub>2</sub> adsorbida sobre el látex. Claramente se observa que la existencia de la capa proteica es la responsable de la estabilidad anómala de los complejos.

**Tabla III.1** Valores de *c.c.c.* y *c.s.c.* para varios complejos de S4CS9-F(ab')<sub>2</sub>.

mg/m <sup>2</sup> adsorbidos	<i>c.c.c.</i> (mM)	<i>c.s.c.</i> (mM)
1.3	98±8	---
2.4	84±6	166±12
3.0	66±4	133±10

Por otra parte los datos de la *c.c.c.* vienen a indicar la bajada en la estabilidad coloidal en la zona DLVO conforme aumenta el recubrimiento de proteína.

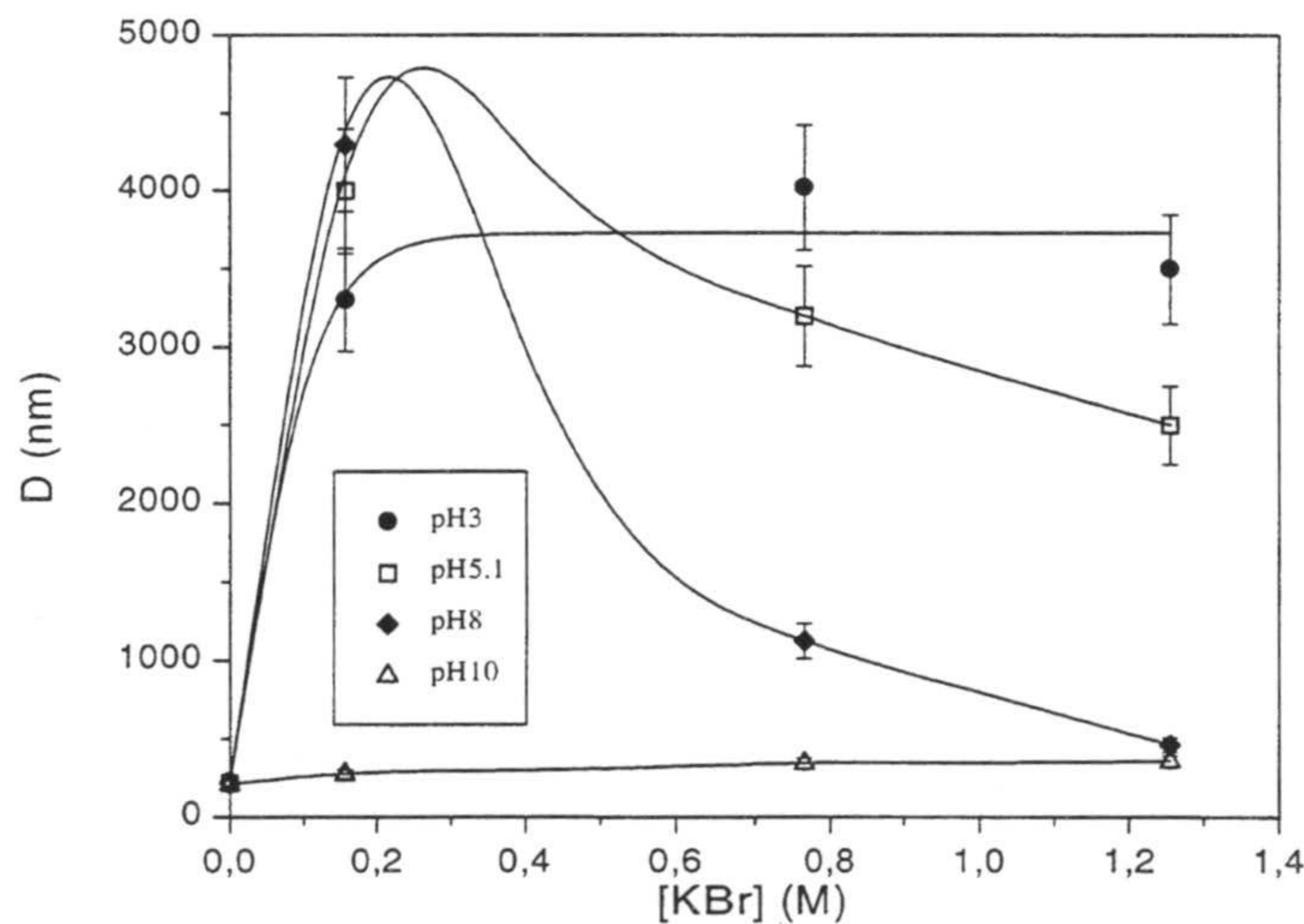
Con el fin de buscar una posible explicación al mecanismo no-DLVO que caracteriza a los complejos látex-proteína se diseñó una estrategia de trabajo basada en el estudio



de diferentes parámetros experimentales sobre la estabilidad de los complejos. A continuación se van a mostrar dichos estudios.

### 5. Influencia del pH sobre la estabilidad coloidal de los complejos látex-F(ab')<sub>2</sub>

Como hemos comprobado en el capítulo anterior uno de los factores determinantes de la estabilidad de un coloide es su carga eléctrica. En el caso de un complejo látex-proteína esta carga vendrá determinada por: i) los grupos iónicos existentes en las zonas de la partícula donde no hay proteína adsorbida, ii) la carga que puede aportar la capa proteica. Esta última aportación dependerá del pH del medio ya que la proteína es una macromolécula con grupos ácidos y básicos. Para pHs inferiores al punto isoeléctrico de la proteína (p.i.e.) la carga neta será positiva, siendo negativa para pHs superiores al p.i.e. Cambiando el pH del medio se puede estudiar la influencia de la carga neta de la proteína sobre la estabilidad del complejo. Esta influencia fue estudiada para un complejo de S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> con un recubrimiento de 2.5 mg/m<sup>2</sup> mediante la medida del tamaño medio de agregado (figura III.6)



**Figura III.6.** Dependencia del diámetro medio ( $D$ ) de agregado con la concentración de sal a diferentes pHs para un complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> con 2.5 mg/m<sup>2</sup>.

La influencia del pH del medio sobre la estabilidad del complejo es considerable. A pH 3 no aparece el comportamiento no-DLVO. A este pH la estabilidad del coloide es la esperada por la teoría DLVO disminuyendo al aumentar la fuerza iónica. Para los otros pHs la estabilidad anómala sí aparece, siendo más importante cuanto más básico es el pH.

Para una misma concentración de sal de la zona no-DLVO la estabilidad del complejo es mayor cuanto mayor es el pH del medio. A pH 10 el complejo prácticamente llega a ser estable para todas las concentraciones de sal.

Este inesperado comportamiento de los complejos fue observado por primera vez usando el látex S4CS9 que presenta grupos clorometilo en su superficie. Para comprobar si este comportamiento también lo presentan complejos formados con un látex convencional de poliestireno, se preparó un complejo de 2.5 mg/m<sup>2</sup> con el látex JM1. La estabilidad de este complejo a diferentes pHs aparece en la figura III.7. Como puede observarse existe una zona no-DLVO a pH 7.8. Así pues, el mecanismo anómalo de estabilización también aparece para complejos preparados a partir de un látex convencional de poliestireno. Por otra parte, se ha obtenido una dependencia de la estabilidad coloidal con el pH similar a la observada para el complejo de S4CS9: a pH 3.4 no aparece la estabilización anómala.

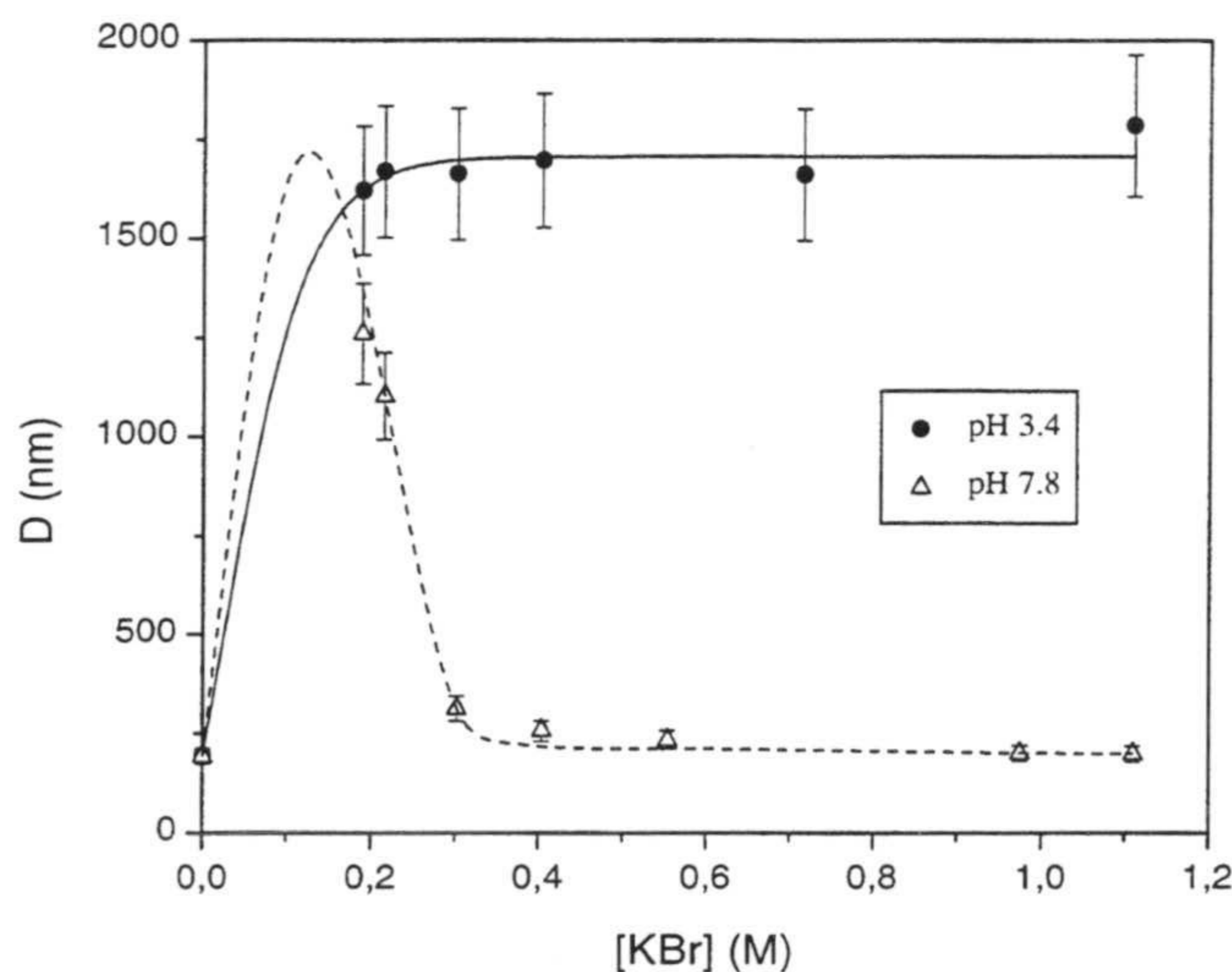
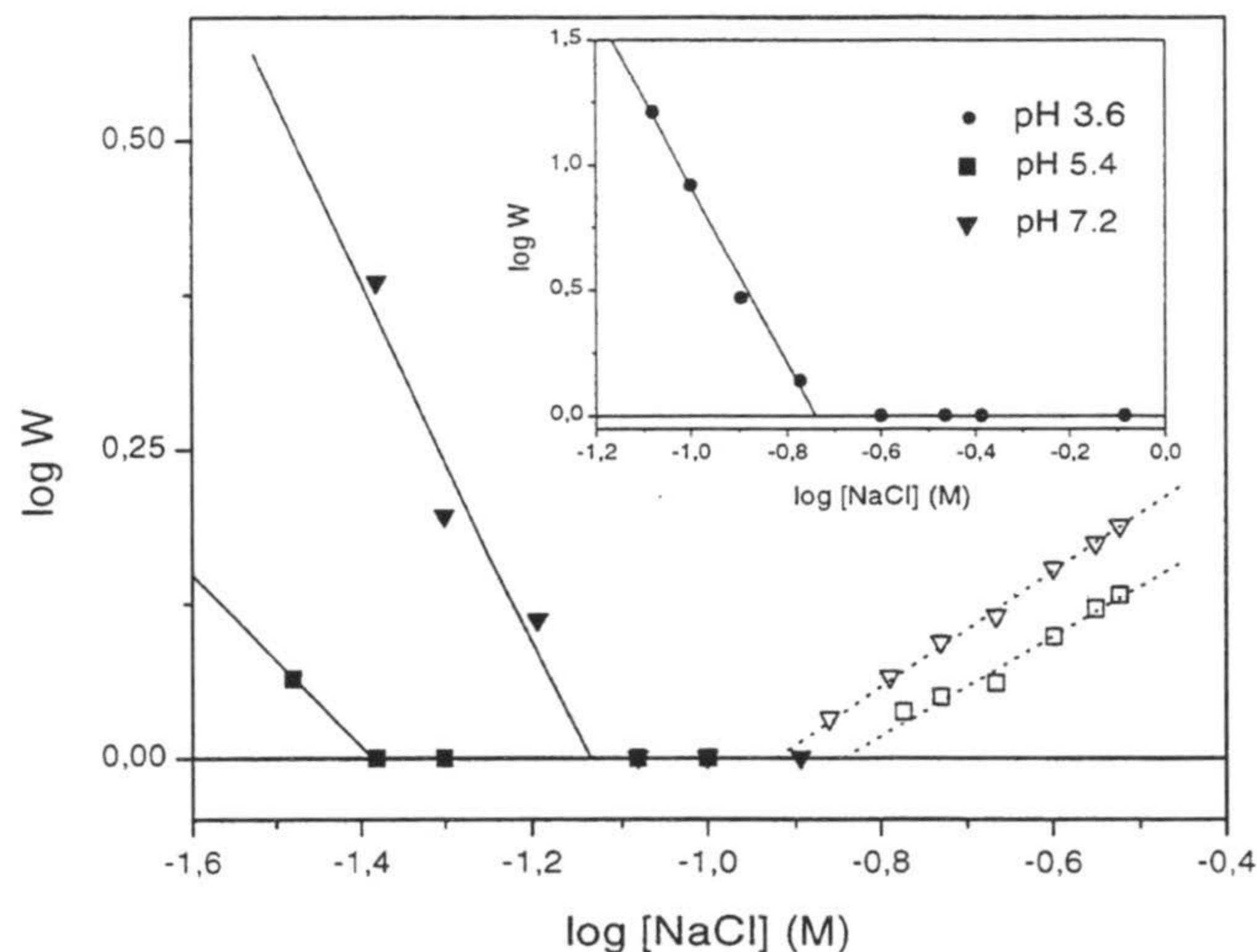


Figura III.7. Dependencia del diámetro medio ( $D$ ) de agregado con la concentración de sal a diferentes pHs para un complejo JM1-F(ab')<sub>2</sub> con 2.5 mg/m<sup>2</sup>.

Para cuantificar el efecto del pH sobre la zona no-DLVO se obtuvieron los factores de estabilidad para un complejo de S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> con 3.2 mg/m<sup>2</sup> a tres pHs diferentes: 3.6, 5.4 y 7.2 (figura III.8).

A pH 3.6 no aparece la región no-DLVO, apareciendo sin embargo para los otros dos pHs. El valor de la c.s.c. disminuye al aumentar el pH, tal y como muestra la tabla III.2.

En esta misma tabla se observa también que la estabilidad del complejo en la zona DLVO pasa por un mínimo para pHs próximos al p.i.e. de la proteína (localizado entre 4.7-6.0). Para estos pHs la carga neta de la proteína es nula con lo que la estabilización electrostática del complejo es mínima.



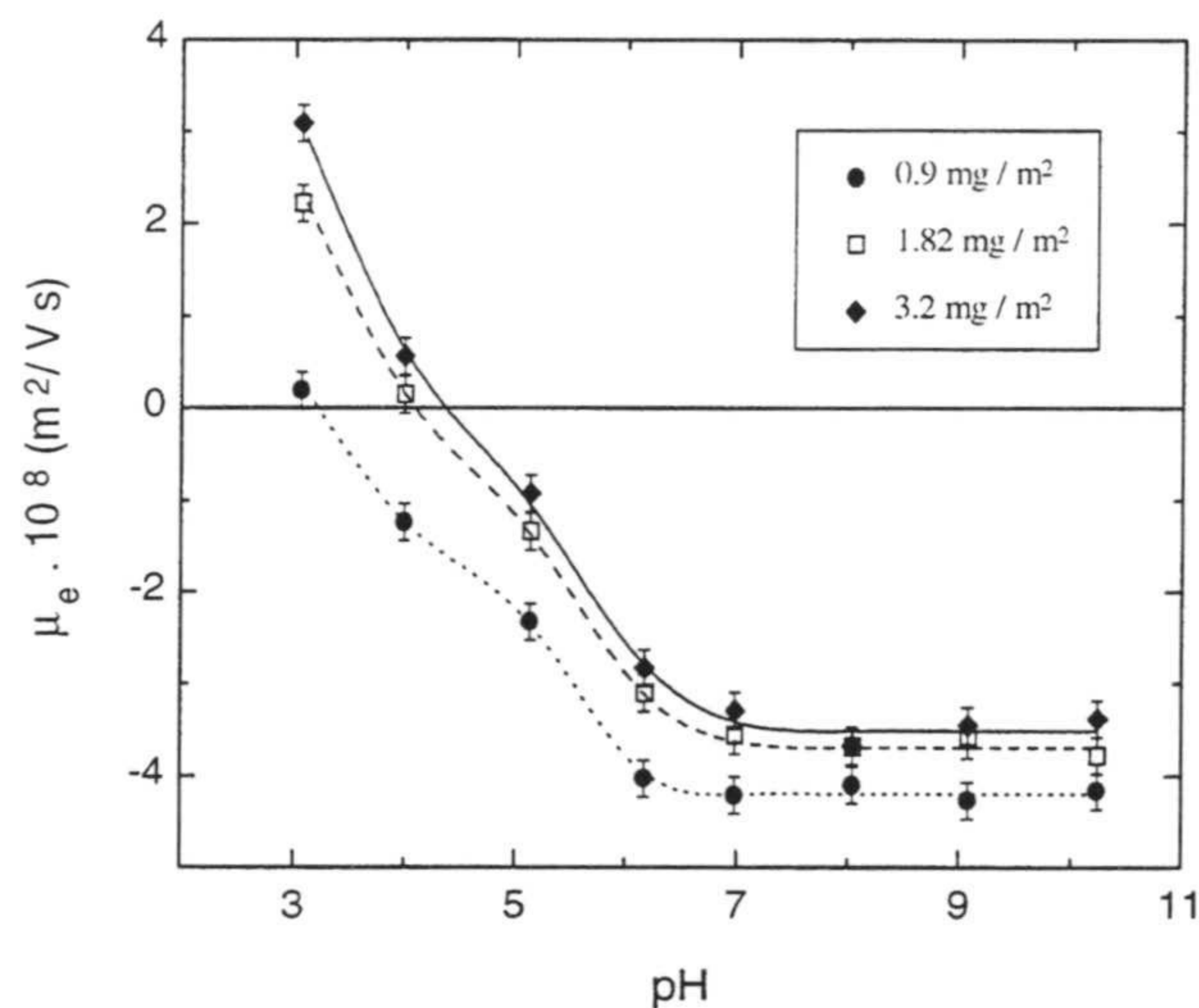
**Figura III.8.** Estabilidad coloidal de un complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> de 3.2 mg/m<sup>2</sup> a diferentes pHs.

**Tabla III.2** Valores de c.c.c. y c.s.c. para un complejo de S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> con 3.2 mg/m<sup>2</sup> en función del pH.

pH	c.c.c. (mM)	c.s.c. (mM)
3.6	180±10	---
5.4	41±4	140±10
7.2	74±7	119±9

La movilidad electroforética de un coloide depende tanto de la densidad de carga de la partícula como de su signo. La dependencia con el pH de la movilidad electroforética de una serie de complejos S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> aparece en la siguiente figura en la que se puede observar como el grado de recubrimiento influye notoriamente en el estado eléctrico final de los complejos. Debido a la naturaleza anfotérica de las proteínas la movilidad electroforética de un complejo látex-proteína depende del pH.

Los complejos presentan un punto isoeléctrico que es más ácido que el de la proteína, aunque se aproxima más a éste conforme aumenta el recubrimiento proteico.



**Figura III.9.** Comportamiento electroforético de varios complejos S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> en función del pH.

Este comportamiento nos demuestra que es la proteína la que determina principalmente la estructura eléctrica superficial del complejo, ya que incluso el de menor recubrimiento presenta una movilidad electroforética positiva a pH ácido y negativa a pH básico, lo cual es una característica propia de una macromolécula con numerosos grupos cargados con diferentes pK<sub>a</sub> como es el caso de una proteína. Pero a pesar de esta similitud entre el complejo y la proteína sin adsorber, los resultados electrocinéticos de un coloide recubierto por proteína no pueden ser interpretados como los propios del estado eléctrico superficial de la proteína en disolución. De hecho el punto isoeléctrico del complejo de 3.2 mg/m<sup>2</sup>, que se supone corresponde a una monocapa de F(ab')<sub>2</sub> adsorbida sobre la partícula, es de 4.4 mientras que el de la

proteína está comprendido entre 4.7-6.0. Es de suponer que esta disminución del punto isoeléctrico del complejo respecto a la proteína se debe a que parte de las cargas eléctricas de la proteína son neutralizadas por los grupos cargados de signo contrario de la superficie del látex, desplazando por tanto el punto isoeléctrico del complejo hacia pHs más ácidos. Las características del coloide que hace de soporte también influyen en las propiedades electrocinéticas de la partícula recubierta de proteína.

Los datos de estabilidad coloidal en la zona DLVO presentados en la tabla III.2 pueden relacionarse con el comportamiento electroforético de los complejos. A pH 5.4 la movilidad electroforética es menor (en valor absoluto) que a pH 7.2 ó 3.6. A este pH la repulsión electrostática es mínima y con ello la estabilidad coloidal.

La influencia del recubrimiento sobre la movilidad electroforética para un mismo pH ha de ser comentada detenidamente. Para pHs inferiores al punto isoeléctrico del complejo, donde la carga neta de la proteína es positiva, la movilidad para un mismo pH aumenta (en valor absoluto) con la cantidad de proteína adsorbida. Para el recubrimiento más bajo (0.9 mg/m<sup>2</sup>) las cargas positivas de la proteína están neutralizadas con las negativas de la superficie del látex siendo por ello la movilidad muy pequeña. Una vez neutralizada la carga negativa de la partícula la movilidad aumenta con el recubrimiento por haber más cargas positivas.

Para pHs superiores al punto isoeléctrico del complejo la movilidad disminuye (en valor absoluto) con el grado de recubrimiento. Este resultado es contradictorio si se tiene en cuenta que el contenido de cargas negativas de la partícula aumenta a medida que éstas se van recubriendo de proteína. Dos posibles explicaciones se pueden proponer para explicar este resultado:

a) Hay que 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 sino del potencial en el plano de cizalladura. A medida que se va adsorbiendo proteína sobre la superficie polimérica se pasa 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 aleatoria. Esto causa un alejamiento del plano de cizalladura de la

superficie y por tanto la movilidad disminuirá. Pero de esta forma no se puede explicar el comportamiento observado a pHs ácidos donde la movilidad aumenta con el recubrimiento, salvo que la conformación de la proteína adsorbida dependa del pH.

b) La tendencia que tienen los cationes por adsorberse sobre las proteínas es un hecho bien conocido (*van Holde, 1985*). Este aporte de cationes que se adsorbe en la interfase polímero-proteína juega un papel considerable en el proceso de adsorción proteica ya que facilita la adsorción espontánea de la proteína en condiciones desfavorables en las que los grupos superficiales del látex y de la proteína sean del mismo signo (*Norde et al., 1978; van Dulm et al., 1981; Norde et al., 1994*). Esta adsorción de cationes va a tener además un importante reflejo en los valores de la movilidad electroforética de los complejos látex-proteína (*Shirahama et al., 1986; Elgersma et al., 1990; 1991; Martín et al., 1994*). La adsorción de cationes conlleva un apantallamiento de la carga negativa de la proteína con el correspondiente descenso en la movilidad electroforética. Cuanto mayor es el recubrimiento proteico mayor será la cantidad de cationes adsorbidos disminuyendo más la movilidad. La adsorción de cationes se ve favorecida cuando la carga neta de la proteína es negativa por lo que este efecto aparece a pHs básicos.

Fijándonos en las figuras de estabilidad coloidal frente al pH, el mecanismo no-DLVO no aparece a pH 3 cuando la carga neta del complejo, así como la de la proteína, es positiva. Sin embargo, la estabilización anómala aparece a pHs superiores al punto isoeléctrico de la proteína, para los cuales la carga neta del complejo es negativa. Cuanto más negativa es la carga del complejo más importante es el mecanismo no-DLVO de estabilización. Puesto que la única diferencia que existe "a priori" entre un complejo cargado negativa o positivamente en un medio acuoso es que está rodeado de cationes o aniones de la disolución, puede atribuirse a la presencia de los primeros la estabilización anómala observada. Por tanto y dado que los cationes existen en medio acuoso en su forma hidratada, mientras que los aniones prácticamente no lo están (*Napper, 1970; Israelachvili, 1991; Tuin et al., 1996*), se puede suponer la existencia de una relación entre el mecanismo de estabilización no-DLVO y los cationes hidratados adsorbidos sobre la proteína. Esta hipótesis podría explicar por qué la estabilización

anómala sólo aparece a pHs para los cuales la carga de la proteína es negativa así como la dependencia de esta estabilización con el pH.

Healy y colaboradores (*Healy et al., 1978*) observaron que un látex anfotérico con una superficie que presentaba grupos carboxilo y amino (interfase similar a la de un complejo látex-proteína) no coagulaba en disoluciones concentradas que contenían un catión altamente hidratado como el litio. Este autor concluye en su trabajo que la estabilidad se debe a la existencia de una barrera energética de hidratación que surge como consecuencia de la necesidad de deshidratar los cationes adsorbidos sobre la superficie del látex cuando dos partículas se aproximan. De igual forma McTaggart (*McTaggart, 1914*) y Lessard (*Lessard et al., 1971*) observaron la no coalescencia de burbujas de gas en disoluciones salinas concentradas. La eficacia para prevenir la coalescencia estaba relacionada con el grado de hidratación del catión.

Tal y como se indicó en la introducción las fuerzas de hidratación se introdujeron como responsables de la alta estabilidad coloidal de sistemas hidrofílicos. Pashley (*Pashley 1981a; 1981b; 1984a*) detectó a través de la microscopía de fuerzas atómicas (AFM) la existencia de fuerzas repulsivas de corto alcance cuando se aproximaban dos superficies de mica. Este autor concluye en sus trabajos que esta fuerza aparece como consecuencia de la deshidratación de cationes adsorbidos sobre la mica.

Teniendo en cuenta los resultados experimentales obtenidos se ha propuesto que el mecanismo de estabilización no-DLVO observado en los complejos látex-proteína se debe a la existencia de fuerzas de hidratación. Las moléculas de agua tienden a unirse fuertemente a las proteínas (*Edsall et al., 1983*) con lo que la superficie del complejo látex-proteína estará rodeada por una capa de moléculas de agua altamente ordenadas. Por otra parte los cationes tienden a adsorberse fuertemente a las proteínas manteniendo, presumiblemente, parte de su capa de hidratación (*Pashley, 1982*). Cuando dos partículas de látex recubiertas con proteína altamente hidratadas se aproximan entre sí aparece una fuerza repulsiva como consecuencia del trabajo necesario para eliminar las moléculas de agua que rodean a las partículas. Para concentraciones pequeñas de electrolito existe una doble capa eléctrica en torno a las partículas. Al aumentar la fuerza iónica esta doble capa se va comprimiendo produciéndose la agregación del sistema. Cuando la doble capa esté totalmente

comprimida estaremos en la situación de agregación rápida. A partir de la *c.s.c.*, una vez que la doble capa está comprimida, los cationes comienzan a adsorberse fácilmente sobre la proteína. Dado que el número de cationes adsorbidos aumenta con la concentración (*van Holde, 1985*), es de suponer que las fuerzas de hidratación aumenten también de la misma forma. Las fuerzas electrostáticas tienen un mayor alcance, que las de hidratación por ello hasta que la doble capa no se comprime no se manifiestan éstas.

Existen otras posibilidades que, en principio, podrían explicar la estabilidad anómala que presentan los complejos látex-proteína:

a) A alta concentración de sal, cuando las interacciones electrostáticas son mínimas, los efectos estéricos que pueden aparecer debido a la naturaleza macromolecular de la proteína alcanzan importancia, pudiendo ser los responsables de la estabilización anómala.

b) Debido al carácter anfotérico de las proteínas no sólo va a haber repulsiones electrostáticas entre dos partículas que se aproximan sino que también habrá fuerzas atractivas de naturaleza eléctrica. Estas fuerzas atractivas que aumentan la inestabilidad del coloide decrecen con la concentración de sal.

Estas dos posibles explicaciones deberían aparecer tanto cuando la carga neta de la proteína es negativa como cuando es positiva. Sin embargo se ha obtenido experimentalmente que la estabilización no-DLVO no aparece en este último caso. Además la estabilización estérica provoca un aumento de la *c.c.c.* pero no una aparición de la estabilización anómala.

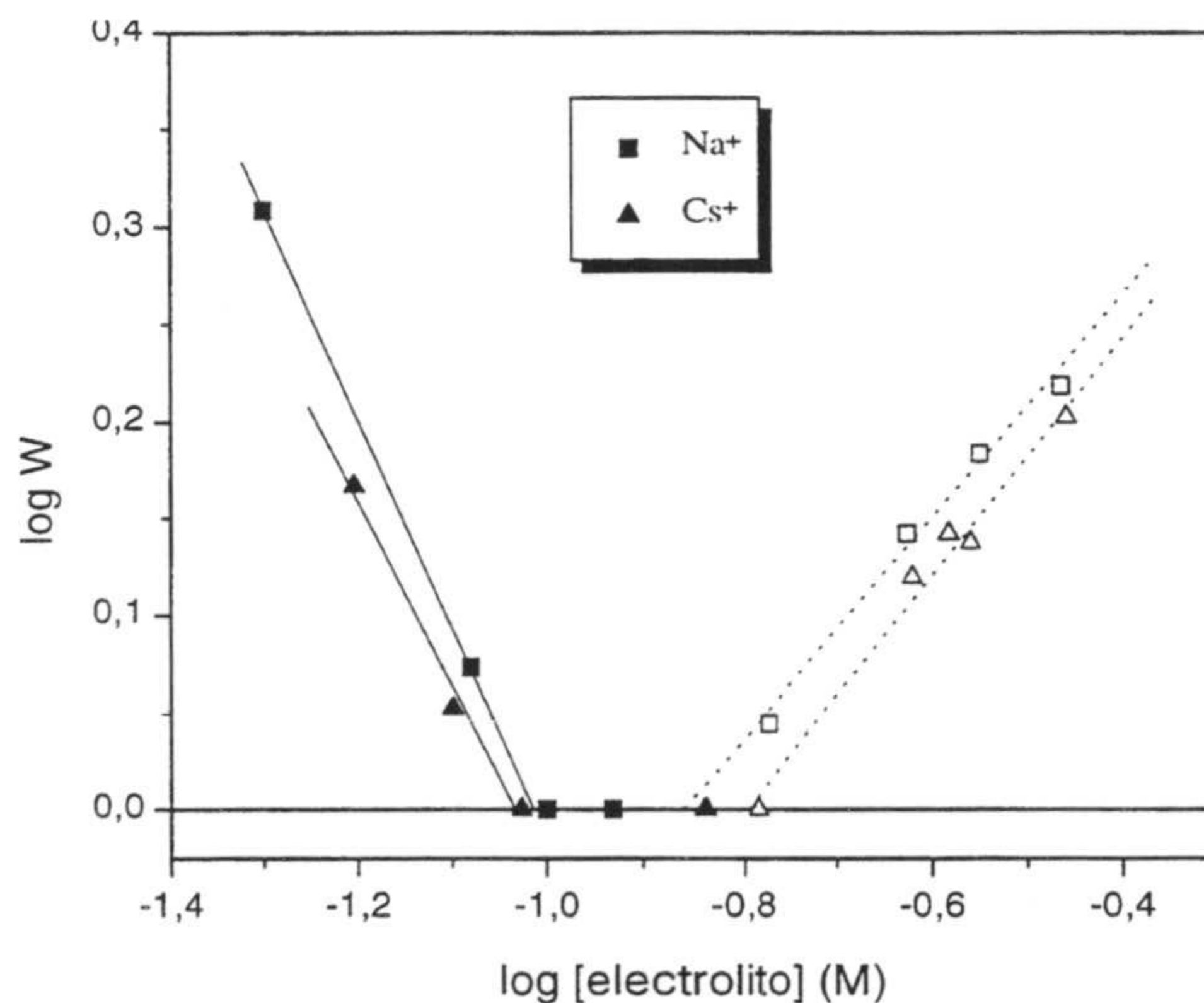
c) Otra posibilidad que se puede plantear es que la proteína se desorba al aumentar la concentración de sal. Esta explicación queda descartada por varios motivos: i) se realizaron experimentos para estudiar la desorción de  $F(ab')_2$  de un complejo con máximo recubrimiento a dos concentraciones de sal, 0.2 M y 3 M, y a pHs comprendidos entre 3 y 9 durante una semana. En ningún caso se detectó proteína desorbida. Este hecho en parte se debe a que el látex S4CS9 puede enlazar el 50% de la proteína covalentemente a su superficie (como se mostrará en próximos capítulos). ii) La agregación de los complejos se sigue con el nefelómetro durante 120 segundos que es un periodo de tiempo muy pequeño como para que la proteína se pueda desorber.



d) Ya se comentó en el capítulo anterior la disminución de la constante de Hamaker del poliestireno con la concentración de sal. Este efecto también tiene que surgir en el caso de un complejo látex-proteína pero de forma más acusada debido a la adsorción de cationes sobre la proteína. Por otra parte la hidratación que presenta la superficie de la partícula también repercute en una disminución de la constante de Hamaker. Al aumentar la concentración de sal la hidratación de la superficie aumenta debido a la adsorción de cationes disminuyendo con ello la constante de Hamaker. Al disminuir el potencial atractivo la estabilidad del coloide aumenta. Esta explicación no excluye la existencia de fuerzas de hidratación, pues ambos mecanismos estabilizadores se basan en la hidratación de la superficie de la partícula del complejo y pueden coexistir conjuntamente.

### 6. Influencia del catión sobre la estabilidad coloidal de los complejos látex- $F(ab')_2$

La siguiente figura muestra los diagramas de estabilidad coloidal de un complejo S4CS9- $F(ab')_2$  con un recubrimiento de 2.6 mg/m<sup>2</sup> a pH 7.1 usando dos electrolitos diferentes para inducir la agregación: NaCl y CsCl. A partir de los ajustes lineales se han obtenidos los valores de la c.c.c. y la c.s.c. que aparecen en la tabla III.3

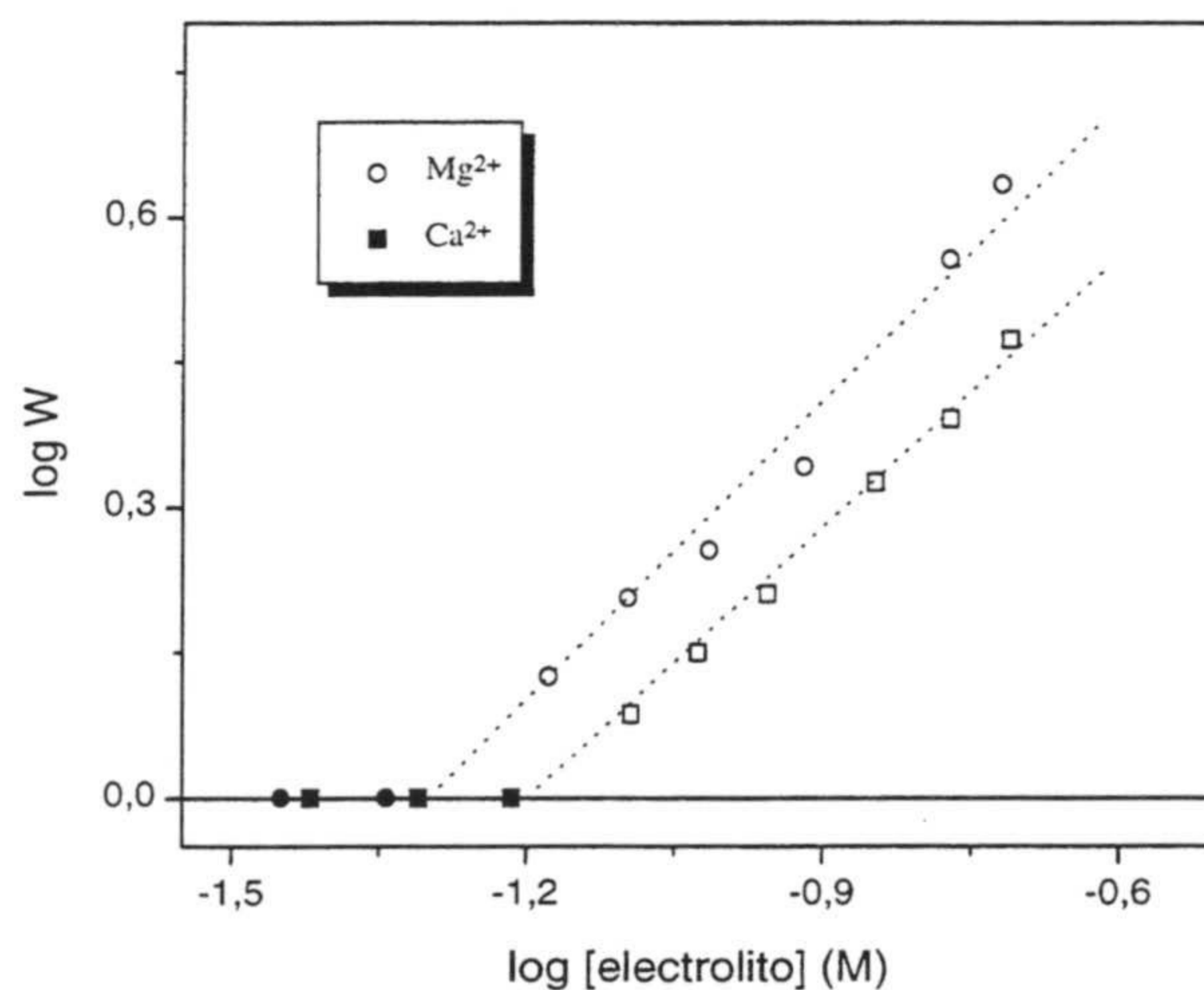


**Figura III.10.** Influencia del catión monovalente en la estabilidad coloidal de un complejo S4CS9- $F(ab')_2$  con 2.6 mg/m<sup>2</sup> a pH 7.1.

**Tabla III.3** Valores de c.c.c. y c.s.c. obtenidos del ajuste lineal.

Catión	c.c.c. (mM)	c.s.c. (mM)
Na <sup>+</sup>	97±8	138±10
Cs <sup>+</sup>	93±8	160±12

El tipo de contracción que se utiliza en la agregación está influyendo en la estabilidad coloidal del complejo tanto en la zona DLVO como en la no-DLVO. Aunque, la diferencia entre la c.c.c. del complejo con Na<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup> es pequeña (4 mM) una posible explicación la podemos encontrar si se considera el tamaño del contracción en la capa de Stern y su influencia en la interacción electrostática, tal y como se estudió en el capítulo II. En la zona no-DLVO la estabilidad del coloide es mayor cuando es el Na<sup>+</sup> el catión presente en la disolución, siendo menor el valor de la c.s.c. Esta diferencia en la c.s.c. podría ser explicadas si tenemos en cuenta que el radio del Na<sup>+</sup> hidratado es de 0.36 nm mientras que el del Cs<sup>+</sup> es de 0.33 nm (*Israelachvili, 1991*). El catión más hidratado es el que más estabiliza al complejo. Este resultado concuerda con la hipótesis realizada sobre la existencia de fuerzas de hidratación atribuidas a los cationes hidratados que están adsorbidos sobre la superficie del complejo. El efecto de la naturaleza del catión en la estabilización no-DLVO es más drástico cuando en lugar de cationes monovalentes se usan cationes divalentes, pues están más hidratados (ver figura III.11).



**Figura III.11.** Influencia del catión divalente en la estabilidad coloidal de un complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> con 2.6 mg/m<sup>2</sup> a pH 7.1.

Esta figura no incluye zonas DLVO porque la estabilidad coloidal del complejo es tan baja cuando se usa un catión divalente que con la más pequeña de las concentraciones usadas (15 mM) la agregación era rápida. Los valores de la c.s.c. han sido:  $49 \pm 3$  mM y  $64 \pm 4$  mM para el  $Mg^{2+}$  y el  $Ca^{2+}$ , respectivamente.

El complejo es mucho más estable en presencia de cationes divalentes que con monovalentes. Este resultado está en total desacuerdo con la teoría DLVO. Para una concentración de 400 mM de NaCl el complejo es muy inestable, mientras que para la misma concentración de  $CaCl_2$  el complejo es estable coloidalmente. Los valores de la c.s.c. son mucho más pequeños para cationes divalentes, altamente hidratados, que para monovalentes. Por otra parte, se vuelve a obtener que el catión con mayor radio hidratado,  $Mg^{2+}$  0.43 nm, estabiliza más que el de menor radio hidratado,  $Ca^{2+}$  0.41 nm (*Israelachvili, 1991*).

La entalpía de hidratación de los cationes divalentes (-1577 kJ/mol para  $Ca^{2+}$ ) es mucho mayor a la de los monovalentes (-406 kJ/mol para  $Na^+$ ) (*Cotton et al., 1988*). El incremento de energía que surge al deshidratar los cationes divalentes adsorbidos sobre el complejo durante la interacción de dos partículas es grande con lo que las fuerzas de hidratación serán intensas, más que si los cationes adsorbidos fueran monovalentes.

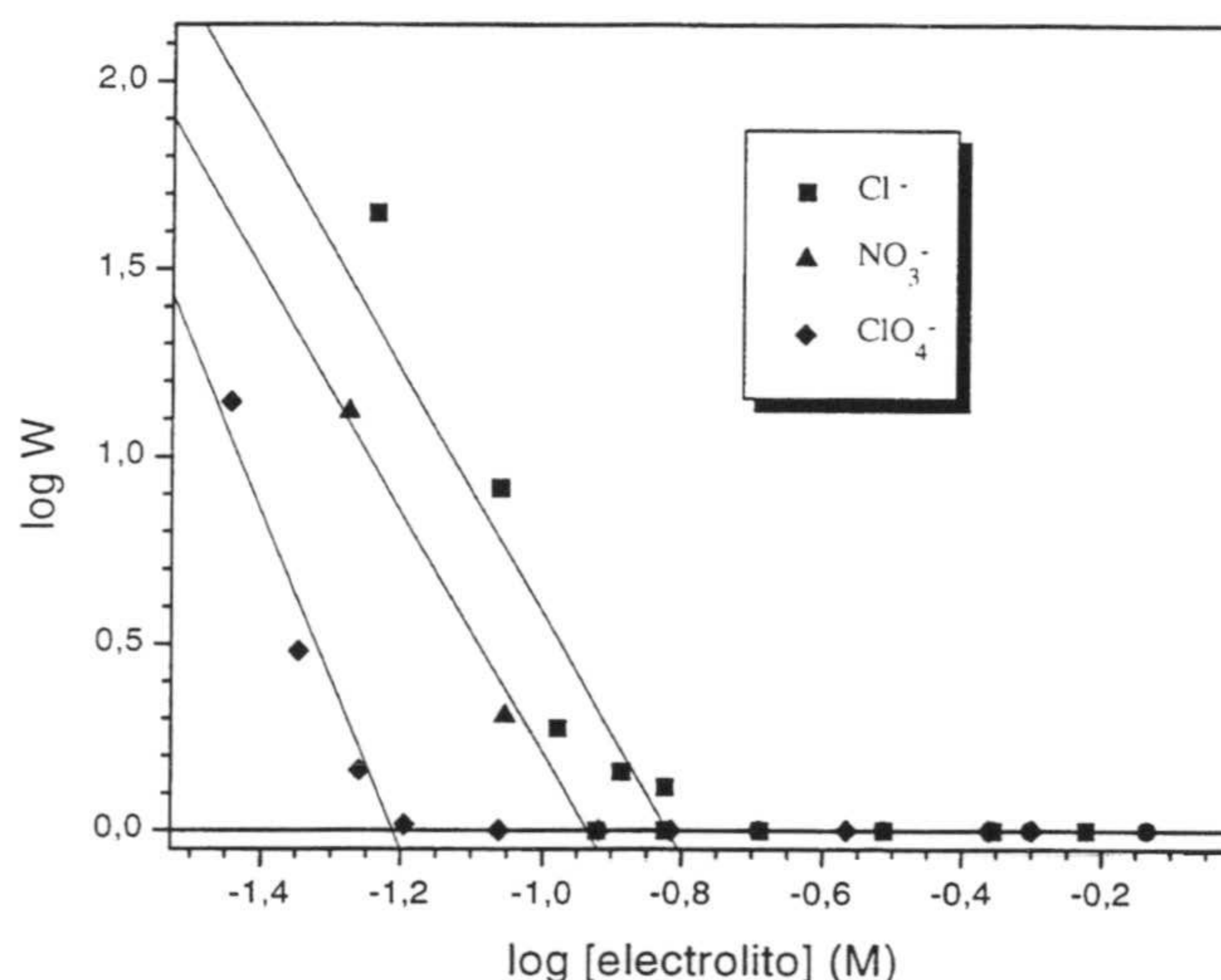
## **7. Influencia del anión sobre la estabilidad coloidal de los complejos látex-F(ab')<sub>2</sub>**

Aunque la dependencia del mecanismo de estabilización no-DLVO con el pH parece indicar que son los cationes hidratados adsorbidos sobre la proteína los responsables del mismo, se ha estudiado también la influencia del anión sobre la estabilidad de un complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> con un recubrimiento de 2.8 mg/m<sup>2</sup> a pH 3.4 y 6.2. Los resultados obtenidos para el pH ácido aparecen en la figura III. 12.

Se han utilizado tres sales diferentes para inducir la agregación con el mismo catión y anión de tamaño creciente: NaCl,  $NaNO_3$  y  $NaClO_4$ . A pH 3.4 la carga neta del complejo es positiva por lo que el anión está actuando como el contraión que apantalla la doble capa de las partículas. Para ninguna de estas sales aparece la zona no-DLVO

confirmándose los resultados anteriores que indicaban que sólo cuando la carga neta de la proteína es negativa aparece la estabilización anómala. Aunque se utilice un anión tan grande como el perclorato no aparece la zona no-DLVO.

Los valores de la c.c.c. para cada sal aparecen en la tabla III.4.

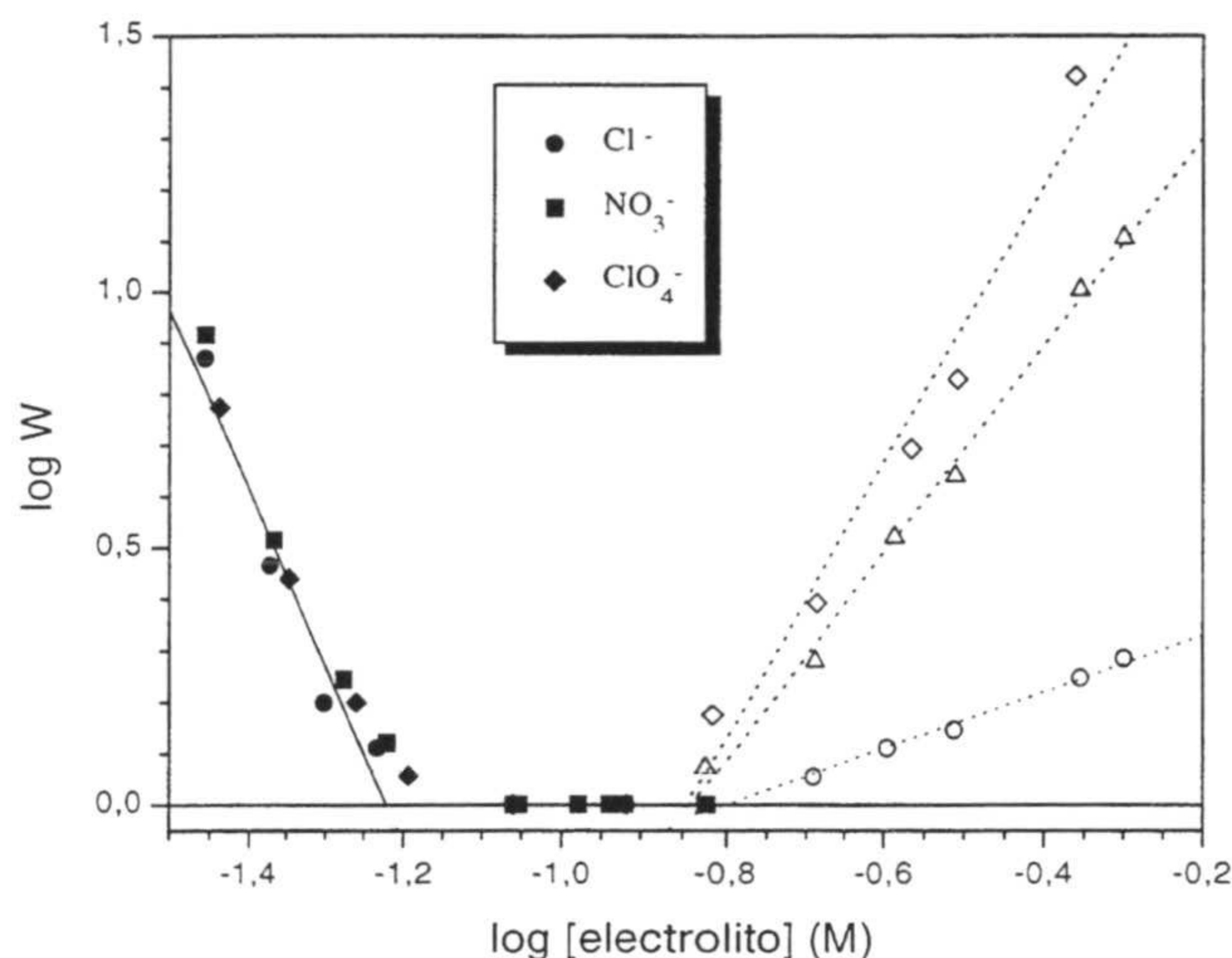


**Figura III.12.** Influencia del anión en la estabilidad coloidal de un complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> con 2.8 mg/m<sup>2</sup> a pH 3.4.

**Tabla III.4** Valores de c.c.c. y c.s.c. obtenidos del ajuste lineal a pH 3.4.

Anión	c.c.c. (mM)
Cl <sup>-</sup>	151±10
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	116±7
ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	61±6

La estabilidad del complejo disminuye conforme aumenta el tamaño del anión, esto se debe a la disminución de la interacción electrostática (al considerar el tamaño del contraión en la capa de Stern). Más adelante cuando se estudie detenidamente la estabilidad en la zona DLVO de los complejos látex-proteína volveremos a estos resultados para analizarlos más detenidamente. Sin embargo, cuando el pH del medio es de 6.2 y la carga de la proteína es negativa aparece la estabilidad anómala del complejo a alta concentración de electrolito, como era de esperar (ver figura III.13).



**Figura III.13.** Influencia del anión en la estabilidad coloidal de un complejo  $S4CS9-F(ab')_2$  con  $2.8 \text{ mg/m}^2$  a pH 6.2.

En primer lugar hay que comentar que la zona DLVO es la misma para las tres sales. Como la carga neta del complejo es negativa el catión actúa en esta ocasión como contracción y como éste es el mismo para las tres sales no existe influencia del anión sobre la zona DLVO. Pero en la zona no-DLVO el anión sí está influyendo en la estabilidad del coloide, aumentando conforme aumenta el tamaño del anión. Este resultado puede parecer contradictorio a la hipótesis de partida de que eran los cationes los responsables de la estabilización anómala. Sin embargo, si nos fijamos en los valores de la c.s.c. para cada sal (ver tabla III.5) veremos como, dentro del margen de error experimental, los tres valores son prácticamente iguales.

**Tabla III.5** Valores de c.c.c. y c.s.c. obtenidos del ajuste lineal a pH 6.2.

Anión	c.c.c. (mM)	c.s.c. (mM)
$\text{Cl}^-$	$60 \pm 5$	$158 \pm 9$
$\text{NO}_3^-$	$63 \pm 5$	$144 \pm 8$
$\text{ClO}_4^-$	$65 \pm 6$	$142 \pm 8$

La c.s.c. es la concentración de sal a partir de la cual comienza a ser efectiva la adsorción de cationes hidratados y surge el mecanismo de estabilización anómalo.

Como el catión es el mismo para las tres sales cabe esperar que el valor de la *c.s.c.* sea también semejante. Alrededor de los cationes adsorbidos ha de existir un exceso de aniones para mantener la electroneutralidad. Cuando dos partículas se aproximan aparecerá una barrera repulsiva debido a la existencia no sólo de los cationes sino también de los aniones. Esta repulsión dependerá, por tanto, también del tamaño del anión existente en la disolución.

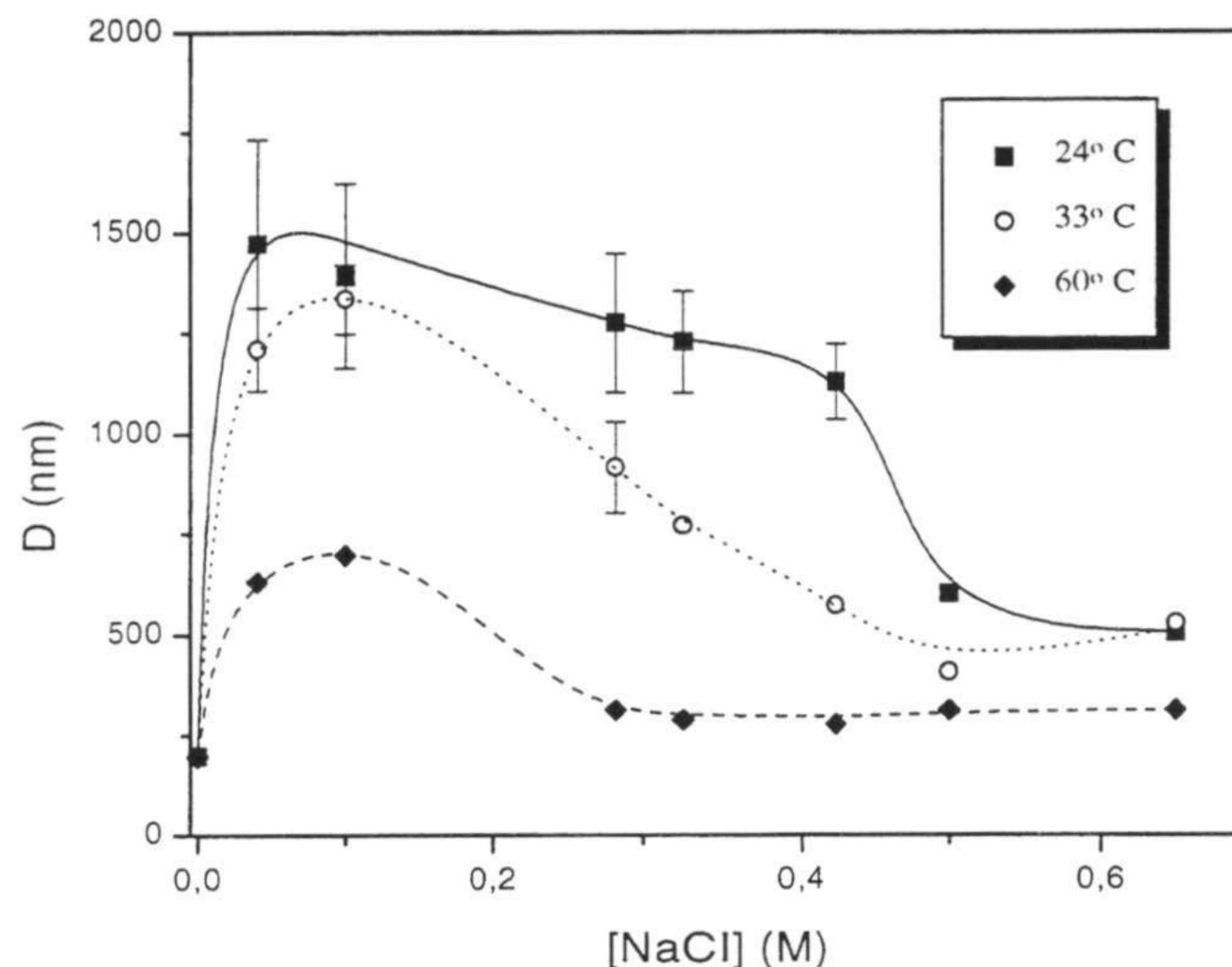
De esta forma el tamaño del anión influye en el mecanismo de estabilización basado en la existencia de fuerzas de hidratación, pero el responsable del mismo son los cationes adsorbidos sobre la partícula.

### **8. Influencia de la temperatura sobre la estabilidad coloidal de los complejos látex-F(ab')<sub>2</sub>**

Si las fuerzas de hidratación son las responsables de la estabilidad que presentan los complejos látex-proteína a alta concentración de sal, la temperatura no debe de influir dado que  $\Delta H_{\text{hidra}}$  y  $T_{\text{Shidra}}$  para los metales alcalinos prácticamente no varía para temperaturas inferiores a los 100°C (Cobble *et al.*, 1977). Pashley (Pashley, 1981b) comprobó que las fuerzas de hidratación existente entre dos superficies de mica no se veían afectadas por la temperatura.

El estudio de la influencia de la temperatura sobre la estabilidad coloidal de un complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> de 2.3 mg/m<sup>2</sup> no se realizó con el nefelómetro dado que la célula no se puede termostatar. En su lugar se midió el tamaño medio de agregado por PCS una hora después de incubar en el horno a diferentes temperaturas la mezcla del complejo con el electrolito. Los resultados obtenidos para tres temperaturas aparecen en la gráfica III.14.

El comportamiento anómalo atribuido a las fuerzas de hidratación aparece claramente para las tres temperaturas. La temperatura está afectando a la cinética de agregación tanto en la zona DLVO como en la no-DLVO. Estos resultados no prueban pero sí están de acuerdo con la existencia de fuerzas de hidratación atribuidas a los cationes adsorbidos sobre la proteína.

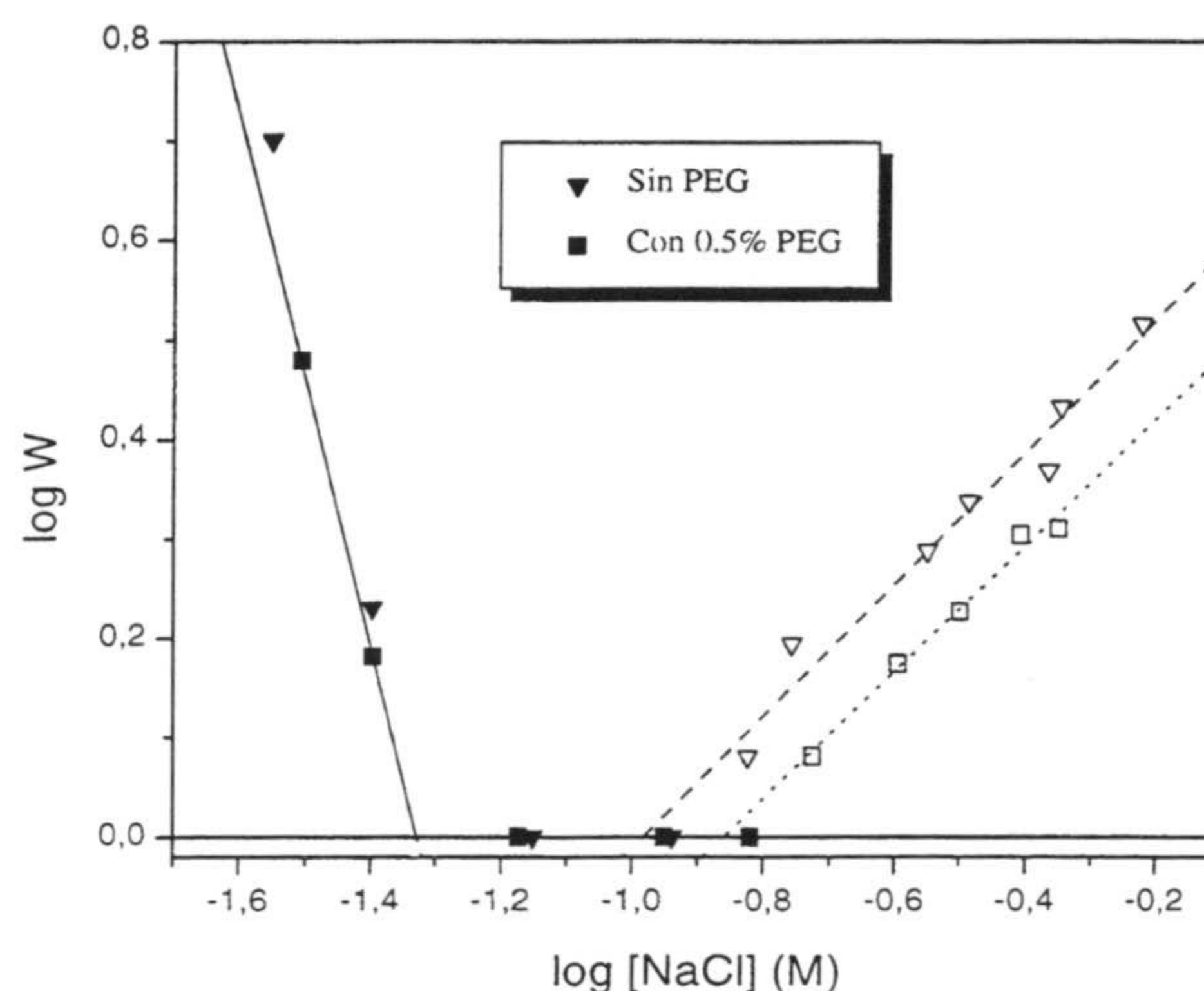


**Figura III.14.** Dependencia del diámetro medio de agregado con la concentración de sal para un complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> con 2.3 mg/m<sup>2</sup> a pH 7.2 en función de la temperatura.

### 9. Influencia de agentes deshidratantes sobre la estabilidad coloidal de los complejos látex-F(ab')<sub>2</sub>

Es bastante frecuente el uso de agentes deshidratantes en inmunoensayos con el fin de acelerar la aglutinación. El mecanismo de actuación de estos aditivos consiste en deshidratar la superficie del anticuerpo adsorbido sobre la partícula facilitándose el reconocimiento antígeno-anticuerpo (*Price et al., 1991*). Dentro de todos estos agentes deshidratantes el más usado es el polietilenglicol (PEG).

Si las fuerzas de hidratación son las responsables del comportamiento anómalo observado en los complejos látex-proteína, su estabilidad coloidal en la zona no-DLVO debe disminuir cuando hay alguna molécula deshidratante en la disolución. Para verificar esta hipótesis se obtuvieron los diagramas de estabilidad coloidal de un complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> de 3.2 mg/m<sup>2</sup> a pH 7.2 en ausencia y en presencia de un 0.5 % de PEG (se ha utilizado un polietilenglicol con una cadena de 6000 unidades de etilenglicol, Sigma).



**Figura III.15.** Diagrama de estabilidad coloidal de un complejo  $S4CS9-F(ab')_2$  con  $3.2 \text{ mg/m}^2$  a pH 7.2 en ausencia y en presencia de 0.5 de PEG.

Aunque el uso del PEG no afecte a la zona DLVO su influencia en la zona no-DLVO es clara: la estabilidad coloidal disminuye al usar el agente deshidratante. El valor de la c.s.c. es de  $104 \pm 9 \text{ mM}$  sin PEG y  $140 \pm 12 \text{ mM}$  con PEG. Este descenso en la estabilidad coloidal del complejo al usar PEG puede deberse también a la atracción entre dos partículas por el puenteo que puede causar las cadenas de PEG. Ahora bien, este puenteo debe aparecer tanto en la zona DLVO como en la no-DLVO. Se intentó emplear un agente deshidratante que no fuera de naturaleza polimérica, concretamente la urea. El efecto deshidratador de la urea empieza a manifestarse para concentraciones superiores a 1M. A estas concentraciones tan altas de urea la viscosidad de la disolución aumenta enormemente afectando a la cinética de agregación con lo que no se pudo hacer el estudio.

Otra posible explicación al descenso en la estabilidad del complejo puede ser la existencia de fuerzas de hidratación que disminuyen al usarse el agente deshidratante PEG.



### 10. ¿Aparece este mecanismo de estabilidad coloidal no-DLVO con otras proteínas?

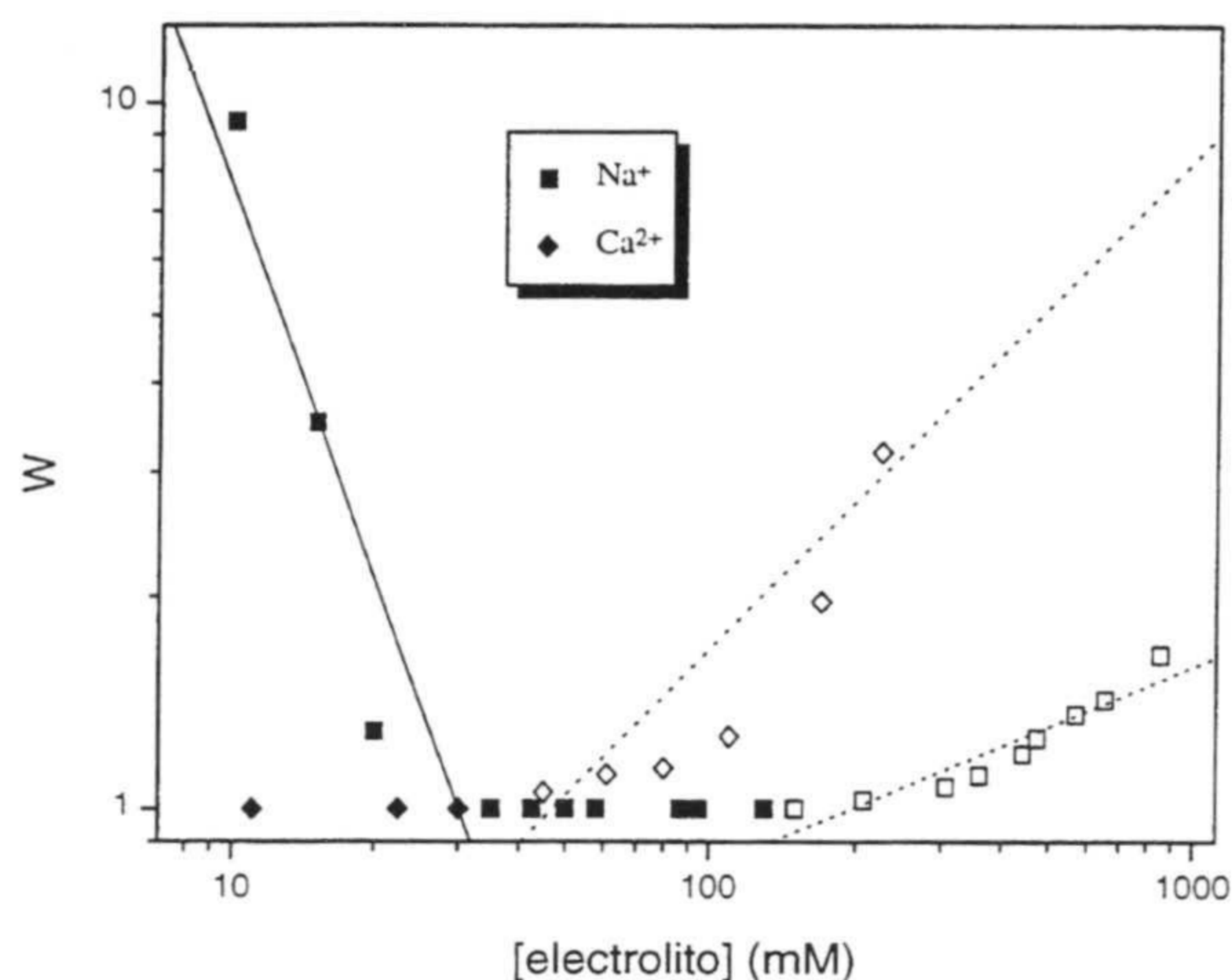
La estabilización anómala fue observada por primera vez con complejos preparados con la proteína F(ab')<sub>2</sub>. Con el fin de generalizar este mecanismo de estabilización coloidal se prepararon complejos de diferentes proteínas: inmunoglobulina G (IgG), albúmina de suero bovino (BSA), fibrinógeno (Fib) y mioglobina (Mio). Las principales características de estas cuatro proteínas aparecen resumidas en la siguiente tabla.

**Tabla III.6** Principales características de las proteínas usadas.

Proteína	Peso molecular	Punto isoeléctrico	Ángulo de contacto para el avance
IgG	150000	6.0-8.0	71°
Fibrinógeno	340000	5.8	82°
Mioglobina	17800	7.0	---
BSA	66000	4.8	56°

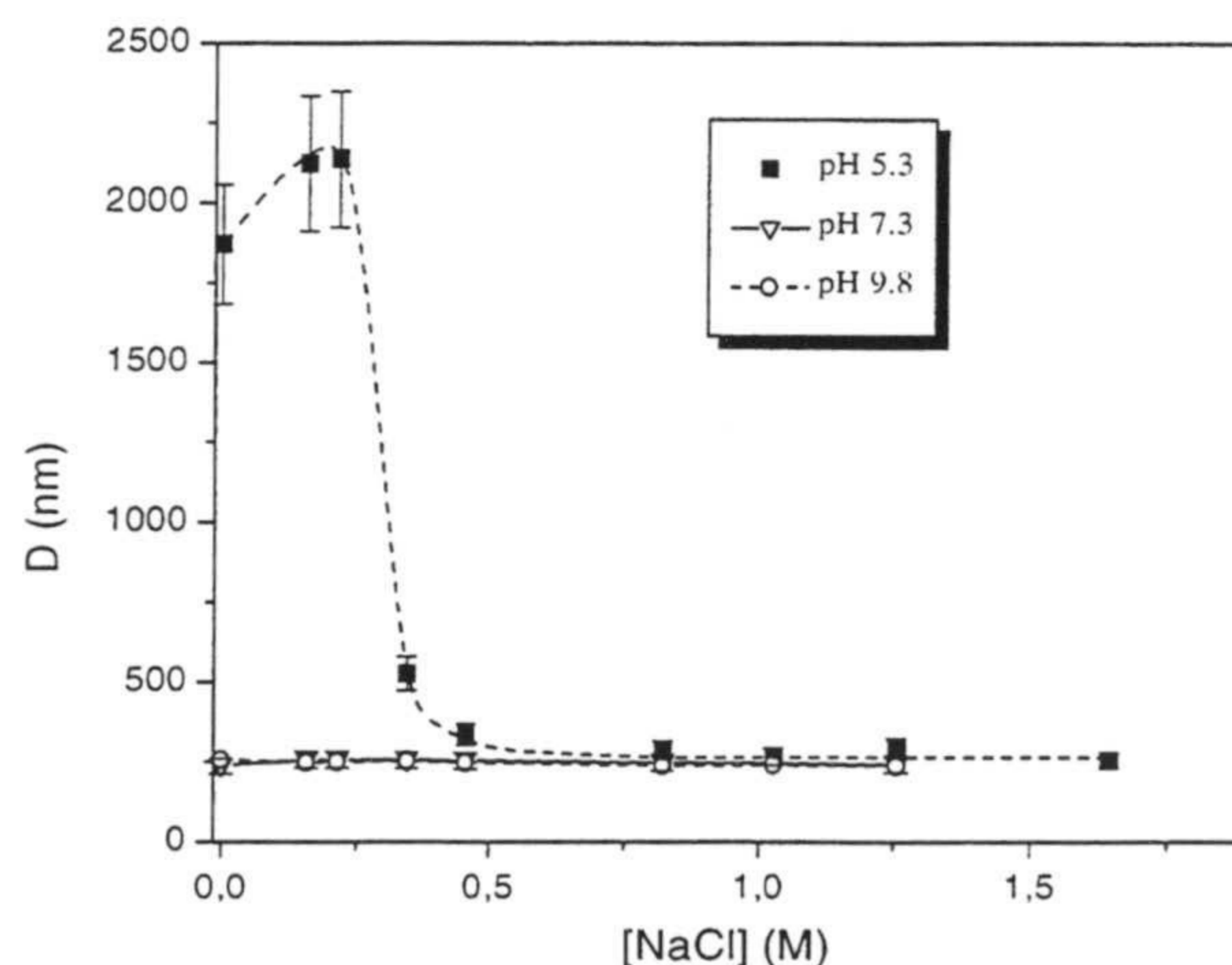
A partir de los datos del ángulo de contacto se puede tener una idea cualitativa del carácter hidrofílico de la proteína, teniendo en cuenta que cuanto menor sea el ángulo más hidrofílica es la proteína (Ortega et al., 1998a). No se han encontrado datos bibliográficos sobre el ángulo de contacto de la mioglobina. Norde indicó (Norde, 1986) que la relación entre el área y el volumen de una proteína es mayor cuanto más pequeña es la molécula y mayor su desviación de la esfericidad. Como resultado, las proteínas pequeñas tienen un menor carácter hidrofílico que las grandes. Por lo tanto es aceptable suponer que la mioglobina es la proteína menos hidrofílica de todas las estudiadas.

En primer lugar se van a mostrar los diagramas de estabilidad coloidal de un complejo con 3.5 mg/m<sup>2</sup> de IgG a pH 8 usando NaCl y CaCl<sub>2</sub> como sales coagulantes. A este pH la carga neta de la proteína es neutra o ligeramente negativa si tenemos en cuenta su punto isoeléctrico (tabla III.6)



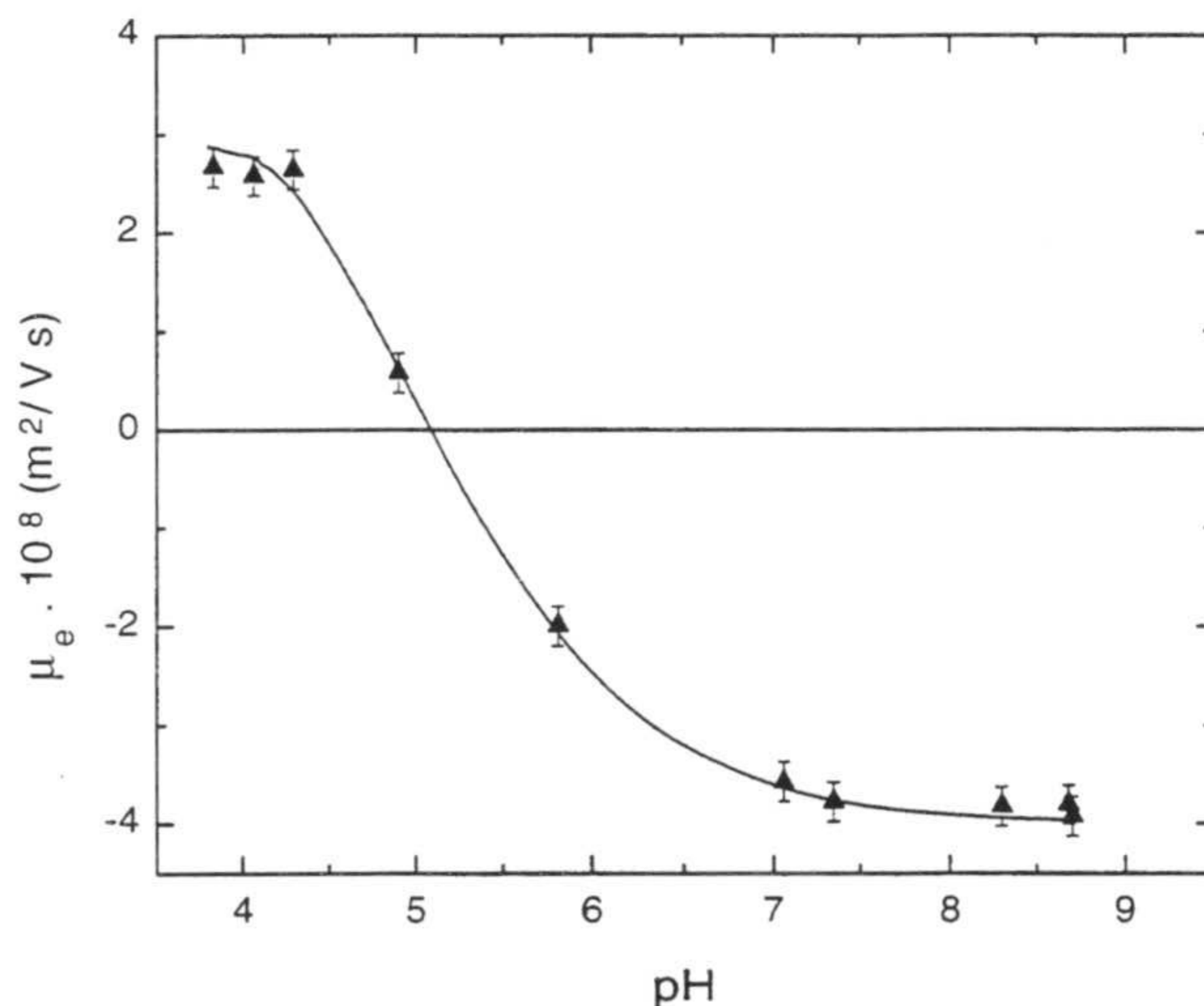
**Figura III.16.** Diagrama de estabilidad coloidal de un complejo S4CS9-IgG con 3.5 mg/m<sup>2</sup>.

La estabilización anómala también aparece cuando utilizamos la molécula de IgG entera en lugar de su fragmento F(ab')<sub>2</sub>. La dependencia de la zona no-DLVO con la naturaleza del catión es semejante a la que se obtuvo con la F(ab')<sub>2</sub>: el catión más hidratado es el que más estabiliza. Los valores de la c.s.c. son 197±20 mM y 54±10 mM para el NaCl y el CaCl<sub>2</sub>, respectivamente. En el caso de la proteína BSA se preparó un complejo con un recubrimiento de 2 mg/m<sup>2</sup> y se midió el diámetro medio de agregado en función de la concentración de electrolito a tres pH diferentes.



**Figura III.17.** Diámetro medio de agregado en función de la concentración de sal para un complejo S4CS9-BSA con 2 mg/m<sup>2</sup> para diferentes pHs.

A pH 5.3 aparece la zona DLVO en la que la estabilidad coloidal del complejo disminuye con la fuerza iónica y la zona no-DLVO donde el tamaño de los agregados disminuye al aumentar la concentración de sal. A este pH la carga neta de la proteína es nula ó ligeramente negativa, si se considera su punto isoeléctrico y según se desprende del comportamiento electroforético del complejo (ver figura III.18).

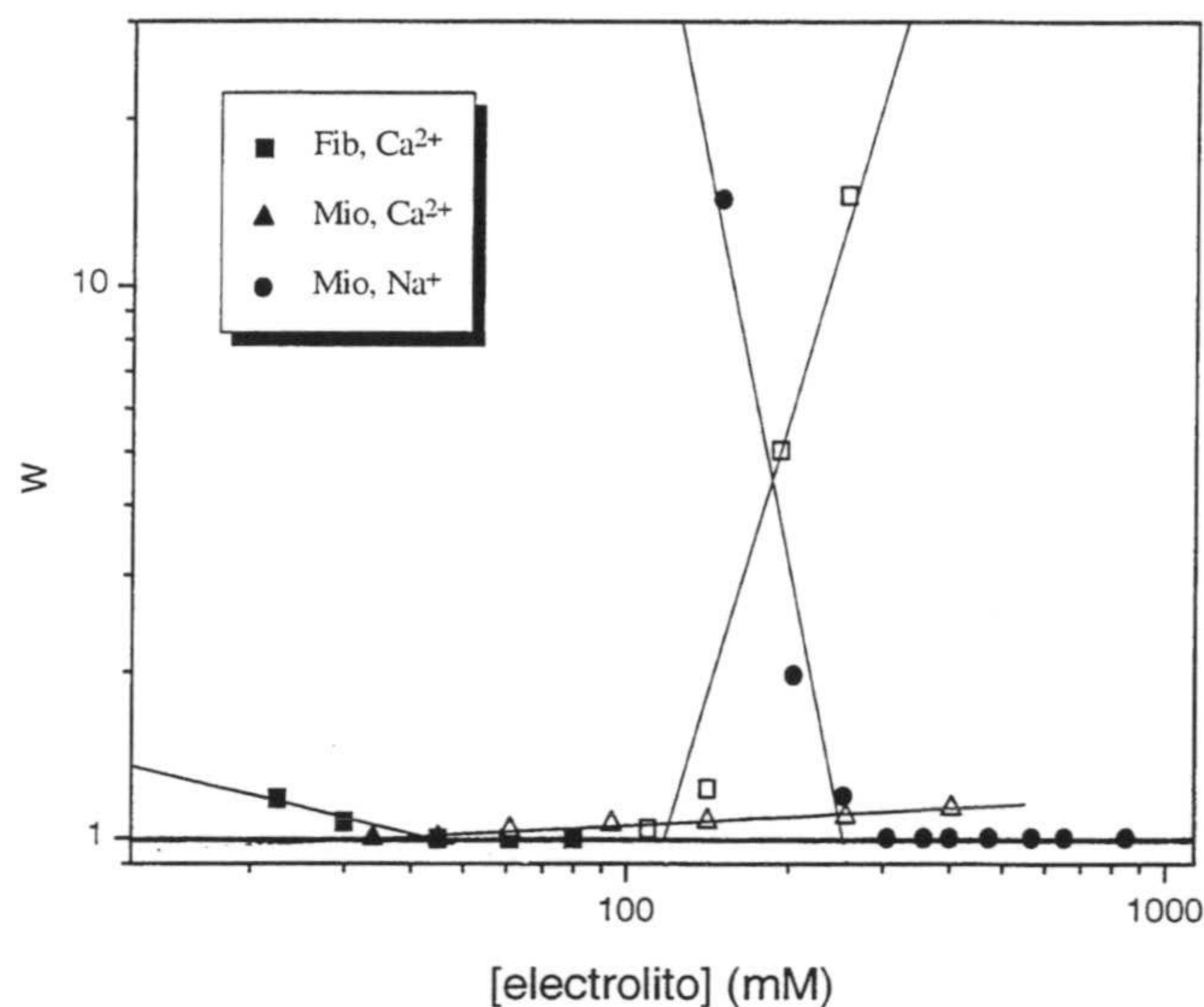


**Figura III.18.** Movilidad electroforética de un complejo S4CS9-BSA con  $2 \text{ mg/m}^2$  para diferentes pHs.

Al aumentar el pH a valores superiores a 5.3 la movilidad electroforética aumenta como reflejo del incremento de la carga negativa de la proteína. Para pH 7.3 y 9.8 el comportamiento de la estabilidad coloidal del complejo con la concentración de sal es bien diferente a la del pH 5.3. No aparece una dependencia de la estabilidad con la concentración de sal sino que el complejo es totalmente estable incluso a concentraciones de electrolito tan altas como 1.5 M donde la doble capa de la partícula está totalmente comprimida. Esta estabilidad tan alta no se puede deber a repulsiones electrostáticas sino al mecanismo no-DLVO.

La BSA es una de las proteínas más hidrofílicas que se conocen por lo que la estabilización por fuerzas de hidratación es muy fuerte siendo totalmente estable el complejo a cualquier concentración de sal.

Los diagramas de estabilidad para un complejo de fibrinógeno con  $3.92 \text{ mg/m}^2$  y otro de mioglobina con  $0.6 \text{ mg/m}^2$  a pH 8 aparecen en la siguiente gráfica. Estas dos proteínas son las menos hidrofílicas de las empleadas en este trabajo.



**Figura III.19.** Estabilidad coloidal de un complejo S4CS9-Mio con  $0.6 \text{ mg/m}^2$  y otro con Fib  $3.92 \text{ mg/m}^2$  usando NaCl y  $\text{CaCl}_2$  como sales coagulantes.

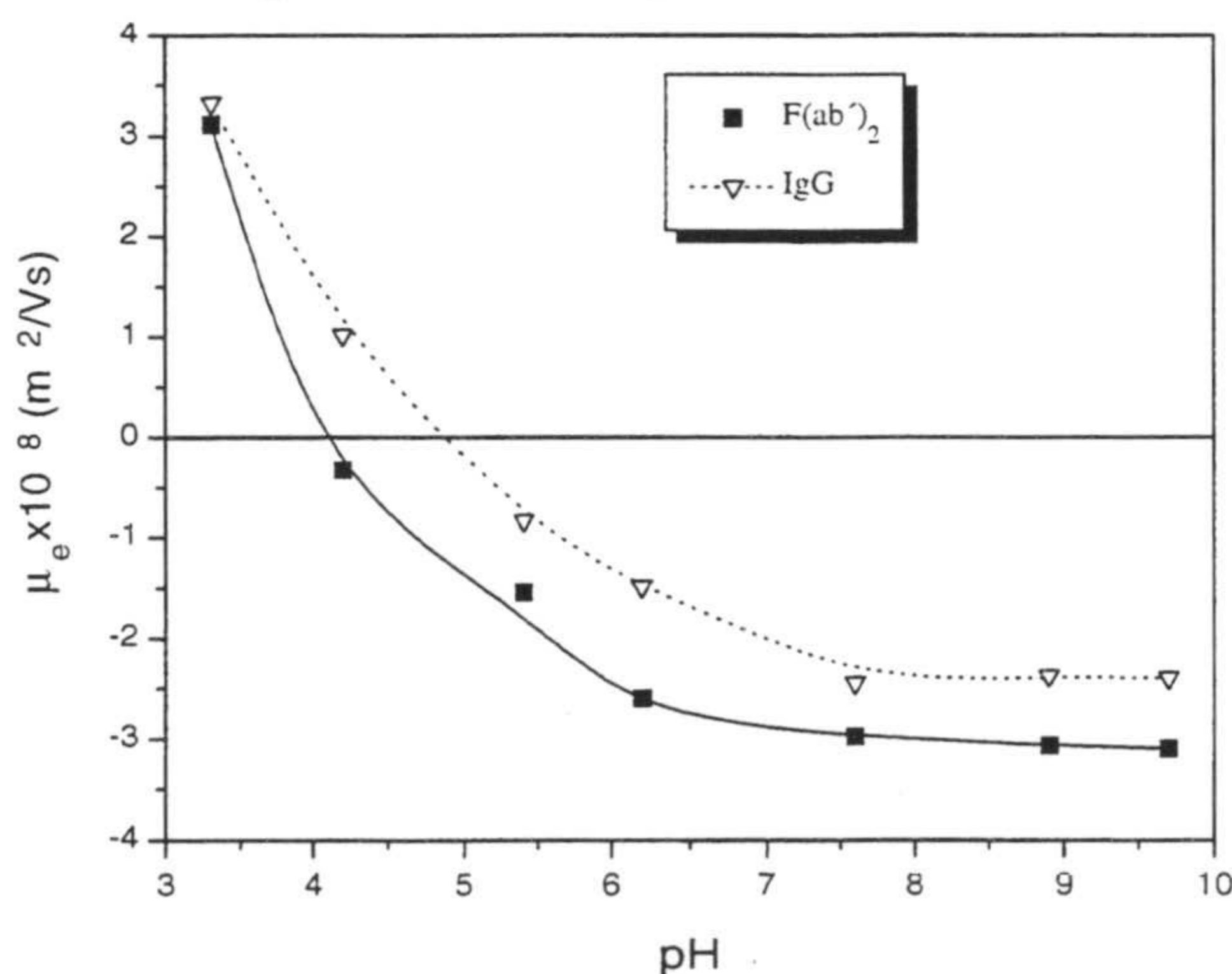
La agregación con NaCl para el complejo de fibrinógeno era muy lenta no pudiéndose determinar las constantes de agregación. Sin embargo cuando la sal empleada fue  $\text{CaCl}_2$  si se pudo estudiar su estabilidad coloidal observándose la región anómala a alta fuerza iónica.

Para el complejo de mioglobina la zona no-DLVO no aparece cuando el electrolito es NaCl. Si la sal coagulante es  $\text{CaCl}_2$  aparece una leve estabilización tras la zona de agregación lenta. Dos posibles explicaciones, no excluyentes, pueden surgir para explicar los datos del complejo de mioglobina. En primer lugar el recubrimiento es pequeño si se tiene en cuenta que la cantidad correspondiente a una monocapa oscila entre  $1.24\text{-}2 \text{ mg/m}^2$  dependiendo de la conformación de la mioglobina (Velázquez, 1998). No se pudieron obtener complejos con mayor grado de recubrimiento.

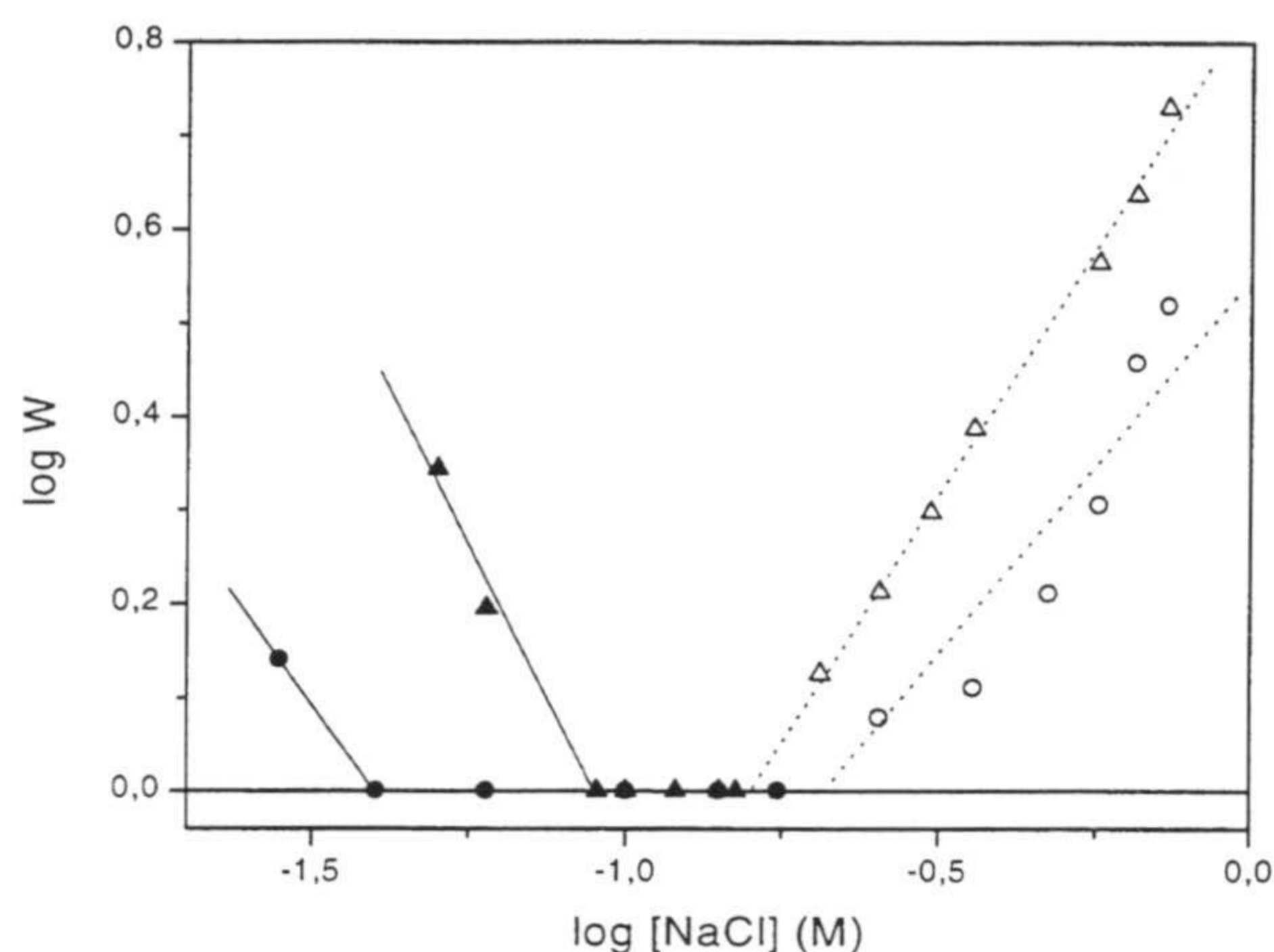
Otra explicación surge si consideramos que la mioglobina es una proteína poco hidrofílica, como se ha comentado antes, por lo que las fuerzas de hidratación para complejos de mioglobina son pequeñas.

Así pues, el mecanismo de estabilización adscrito a las fuerzas de hidratación es característico de complejos látex-proteína dependiendo del carácter hidrofílico de la proteína adsorbida. Este carácter no sólo depende de la relación entre grupos polares/apolares de la molécula proteica sino también de la densidad de carga de la misma. Este aspecto se puede estudiar comparando el comportamiento de partículas recubiertas con IgG y  $F(ab')_2$ .

Se ha preparado un complejo de IgG con  $1.85 \text{ mg/m}^2$  y otro de  $F(ab')_2$  con  $1.46 \text{ mg/m}^2$ . Ambos complejos tienen el mismo número de moléculas de proteína por partícula de látex. Dado que la proteína  $F(ab')_2$  es un fragmento de la IgG, la interfase de los dos complejos ha de ser muy parecida diferenciándose tan sólo en la densidad de carga ya que los puntos isoeléctricos de ambas proteínas son diferentes. Esta diferencia tiene su efecto en el comportamiento electroforético de ambos complejos en función del pH (ver figura III.20). Para cualquier pH la movilidad electroforética del complejo de  $F(ab')_2$  es más negativa que la del complejo de IgG, siendo su punto isoeléctrico más ácido. La estabilidad coloidal de estos complejos fue estudiada a pH 7.5 donde ambas proteínas están cargadas negativamente. Los diagramas de estabilidad aparecen en la figura III. 21.



**Figura III.20.** Movilidad electroforética en función del pH para un complejo de IgG con  $1.85 \text{ mg/m}^2$  y otro de  $F(ab')_2$  con  $1.46 \text{ mg/m}^2$ .



**Figura III.21.** Estabilidad coloidal para un complejo de IgG con  $1.85 \text{ mg/m}^2$  (círculos) y otro de  $F(ab')_2$  con  $1.46 \text{ mg/m}^2$  a pH 7.5 (triángulos).

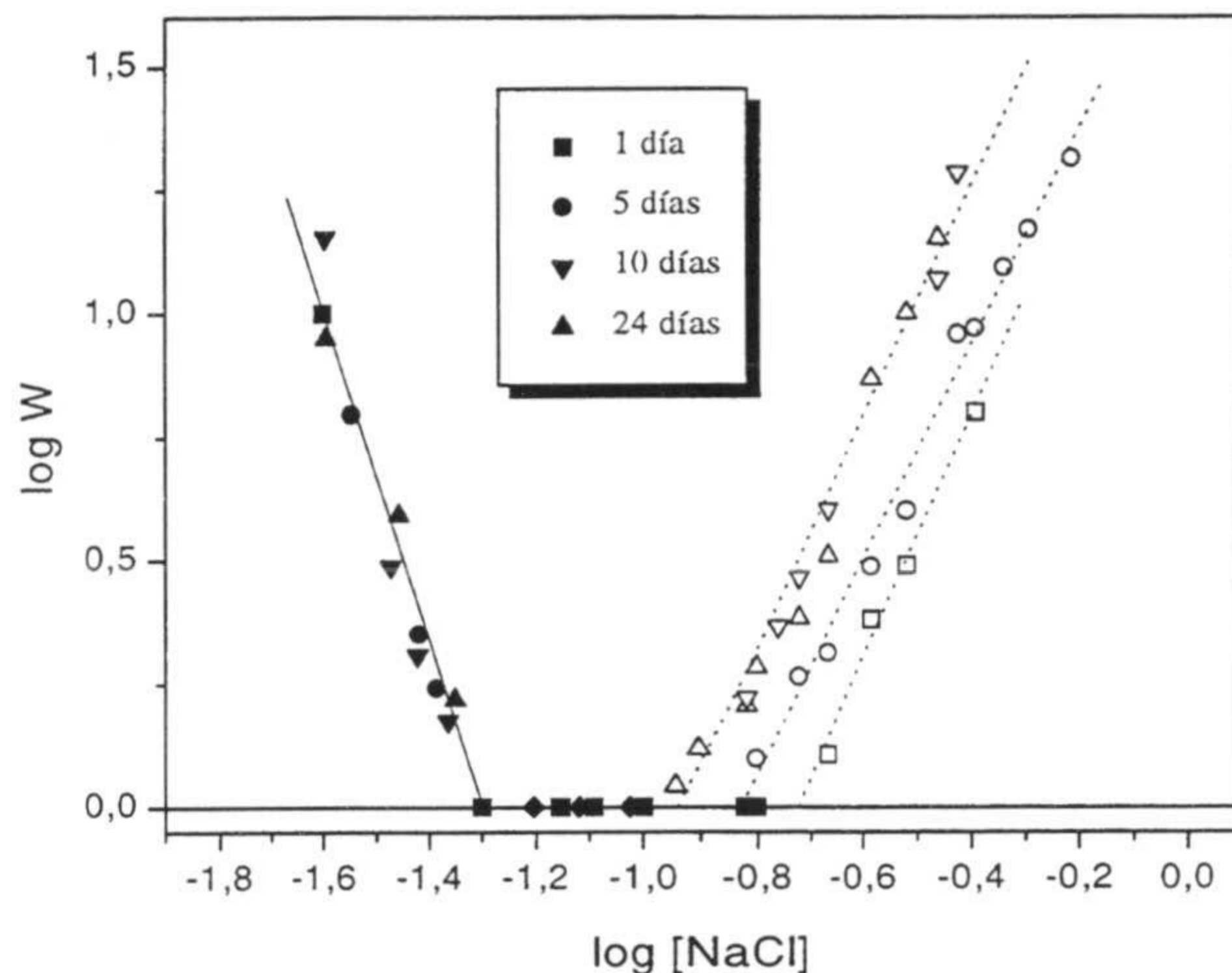
**Tabla III.7** Valores de c.c.c. y c.s.c. obtenidos del ajuste lineal.

Complejo	c.c.c. (mM)	c.s.c. (mM)
IgG	$40 \pm 6$	$208 \pm 20$
$F(ab')_2$	$88 \pm 8$	$150 \pm 10$

El hecho de que la densidad de carga de la  $F(ab')_2$  a pH 7.5 sea mayor que la de la IgG afecta tanto a la estabilidad coloidal en la zona DLVO como en la no-DLVO. En la primera la estabilidad del complejo de  $F(ab')_2$  es mayor porque las repulsiones electrostáticas entre las partículas son más acentuadas. La mayor estabilidad coloidal del complejo de  $F(ab')_2$  en la zona no-DLVO puede ser explicada si las fuerzas de hidratación son las responsables de la aparición de la zona no-DLVO, ya que cuanto mayor sea la carga negativa más hidrofílica es la superficie y una mayor cantidad de cationes rodearán a la partícula.

### 11. Influencia de la conformación de la proteína adsorbida

Cuando la estabilidad coloidal de un complejo de S4CS9- $F(ab')_2$  con  $3.2 \text{ mg/m}^2$  fue estudiada a pH 6.3 en distintos momentos después de su preparación se observó un hecho muy significativo (ver figura III.22).



**Figura III.22.** Estabilidad coloidal de un complejo  $S4CS9-F(ab')_2$  con  $3.2 \text{ mg/m}^2$  a pH 6.3.

**Tabla III.8** Valores de c.s.c. en función del tiempo.

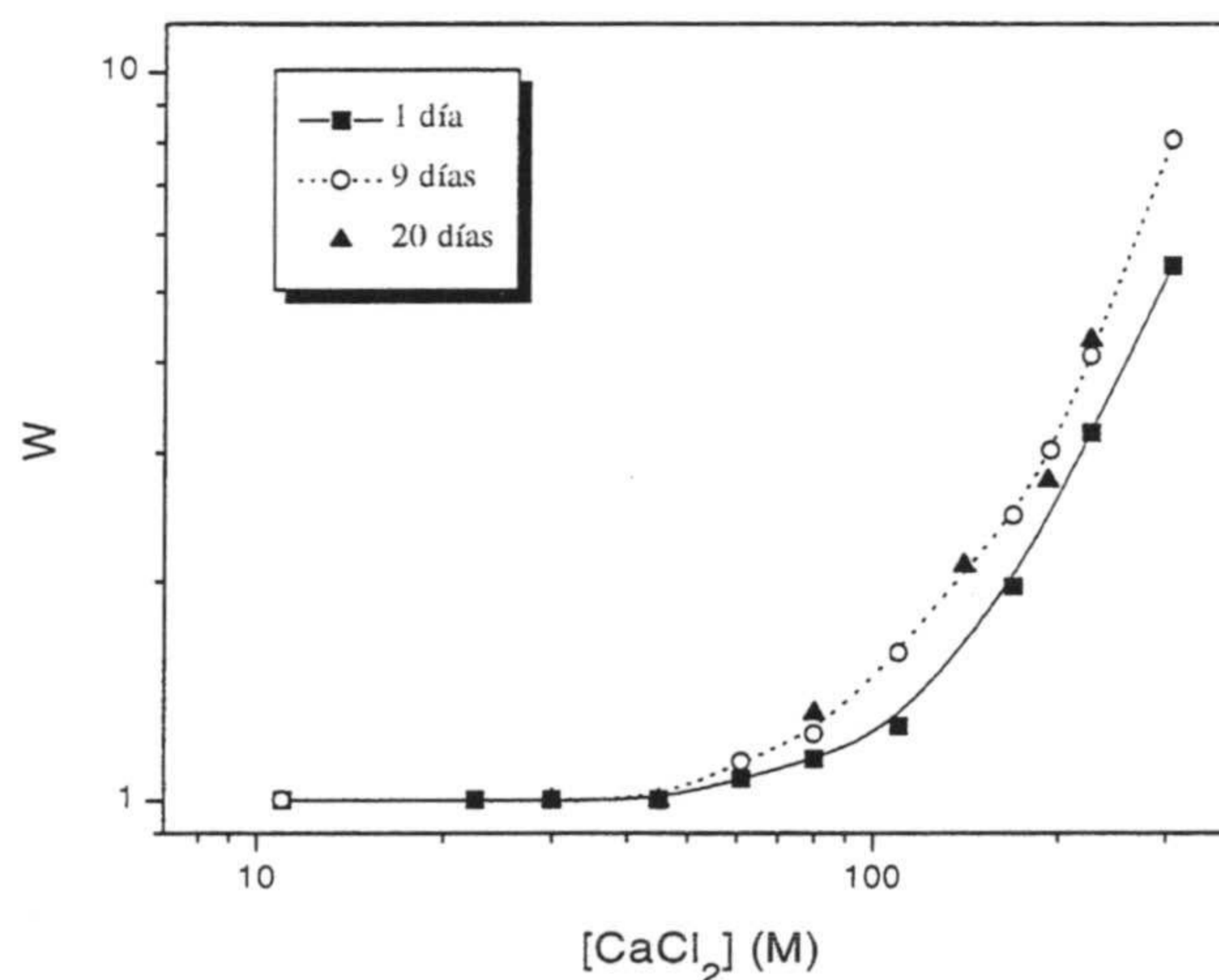
Día	c.s.c. (mM)
1	$190 \pm 12$
5	$147 \pm 10$
10	$118 \pm 8$
24	$118 \pm 10$

La zona DLVO permanece invariable durante el tiempo transcurrido desde la sensibilización del complejo hasta el día en que se midió su estabilidad. Este resultado prueba que la proteína no se ha desorbido durante el tiempo de incubación, ya que si ésta hubiera ocurrido la estabilidad debería aumentar con el tiempo. Sin embargo, existe una clara influencia del tiempo en la zona no-DLVO. En esta zona la estabilidad del complejo ha aumentado con el tiempo (ver valores de la c.s.c. en tabla III.8) hasta permanecer constante por encima de los 10 días.

La principal interacción que favorece la adsorción de proteínas sobre soportes poliméricos es la interacción hidrofóbica (Norde, 1986). La proteína al adsorberse adopta una conformación que favorezca que las zonas hidrofóbicas de la proteína interaccionan directamente con la partícula, quedando las regiones hidrofílicas

expuestas hacia la disolución (Lee et al., 1973). Una vez adsorbida, la proteína permanece en un estado dinámico en el que su conformación sufre cambios durante un tiempo determinado. En estos cambios la proteína tiende a exponer sus zonas hidrofílicas hacia la disolución para alcanzar la conformación más estable energéticamente (Andrade et al., 1987; Pitt et al., 1987; Kleijn et al., 1995). Considerando estas ideas la hipótesis sobre la existencia de fuerzas de hidratación como mecanismo responsable de la zona no-DLVO está de acuerdo con los resultados experimentales. Con el tiempo la superficie del complejo es más hidrofílica debido a los cambios conformacionales de la proteína siendo más importantes las fuerzas de hidratación. Pasado un tiempo determinado la proteína adquiere la conformación más favorable, no observándose a partir de ese momento influencia del tiempo en la estabilidad coloidal.

Esta misma explicación puede servir para justificar los resultados obtenidos sobre la estabilidad coloidal de un complejo de IgG de 3.45 mg/m<sup>2</sup> a pH 8 (ver figura III.23). En esta ocasión se ha utilizado CaCl<sub>2</sub> como sal coagulante. A partir del noveno día la influencia de la concentración de sal sobre la estabilidad coloidal del complejo es independiente del tiempo transcurrido desde la sensibilización.



**Figura III.23.** Estabilidad coloidal de un complejo S4CS9-IgG con 3.45 mg/m<sup>2</sup> a pH 8.

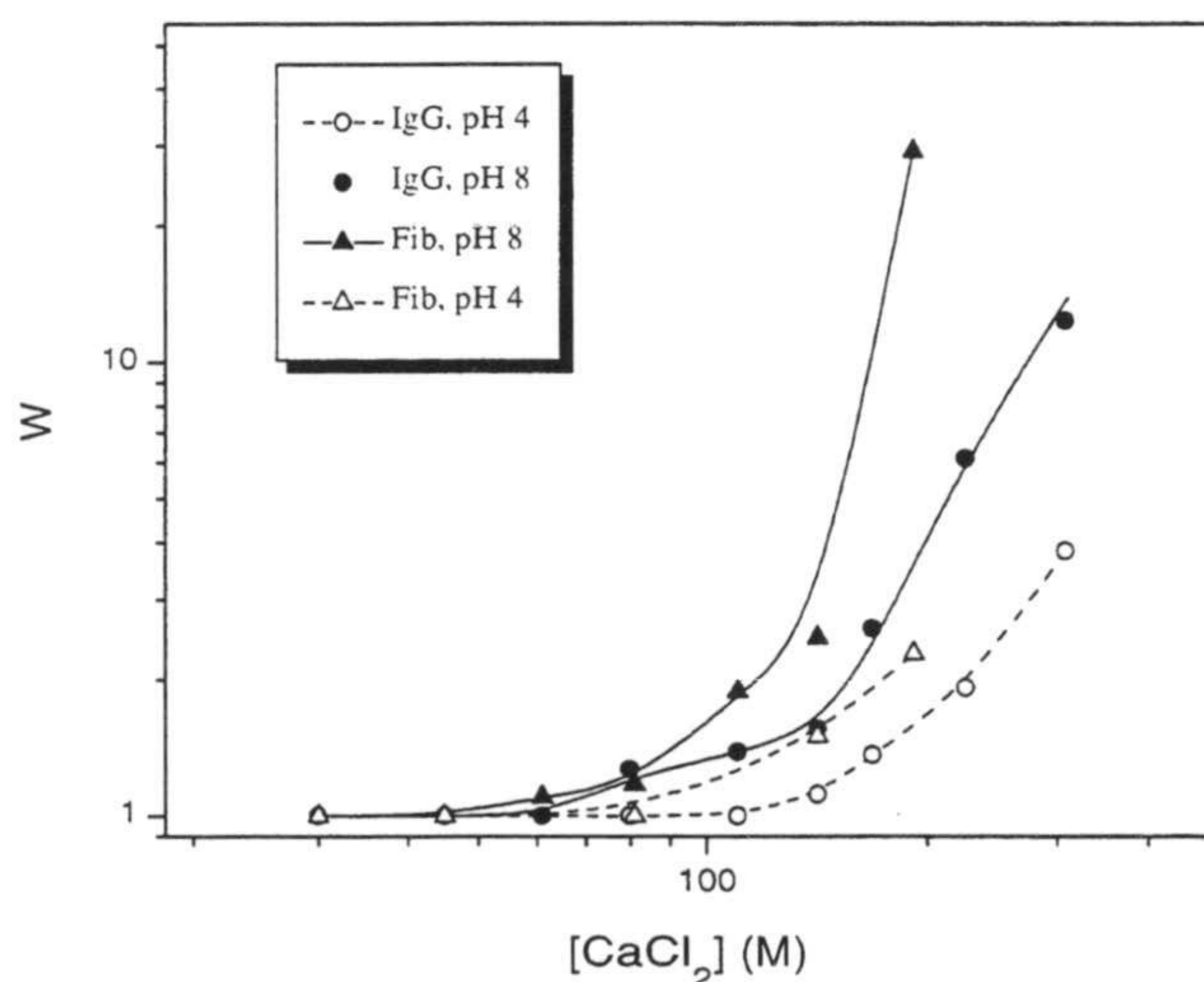
En esta ocasión los resultados experimentales no se han ajustado a una línea recta con el fin de mostrar que al igual que pasaba con los sistemas liofóbicos vistos



en el capítulo II, el factor de estabilidad en algunas ocasiones se puede ajustar mejor a una curva que a una línea recta.

El carácter hidrofílico de la superficie de un complejo no depende sólo del tipo de proteína adsorbida sobre la partícula sino también, como se acaba de ver, de la conformación y orientación de la misma. Esta conformación será diferente según el pH al que se lleva a cabo la adsorción. Para comprobar esta hipótesis se prepararon dos complejos de IgG con el mismo recubrimiento ( $2.9 \text{ mg/m}^2$ ) pero uno de ellos sensibilizado a pH 4 y otro a pH 8. De igual forma se sensibilizaron otros dos complejos de fibrinógeno con  $2.8 \text{ mg/m}^2$ . La estabilidad coloidal de los cuatro complejos fue estudiada a pH 8 con  $\text{CaCl}_2$  como sal coagulante (ver figura III.24). Previamente se comprobó que no había desorción proteica al cambiar a pH 8 los complejos preparados a pH 4.

En la figura III.24 se puede observar que el pH al que se adsorbió la proteína está influyendo en la estabilidad coloidal del complejo. Para ambas proteínas el complejo sensibilizado a pH 8 es más estable coloidalmente que el preparado a pH 4 para una concentración de sal determinada. Como la estabilidad coloidal se ha medido a un mismo pH (pH 8) y el recubrimiento es semejante, la densidad de carga de los complejos preparados a pH 8 y a pH 4 debe de ser la misma. La única diferencia radica en la conformación que debe tener la proteína adsorbida.



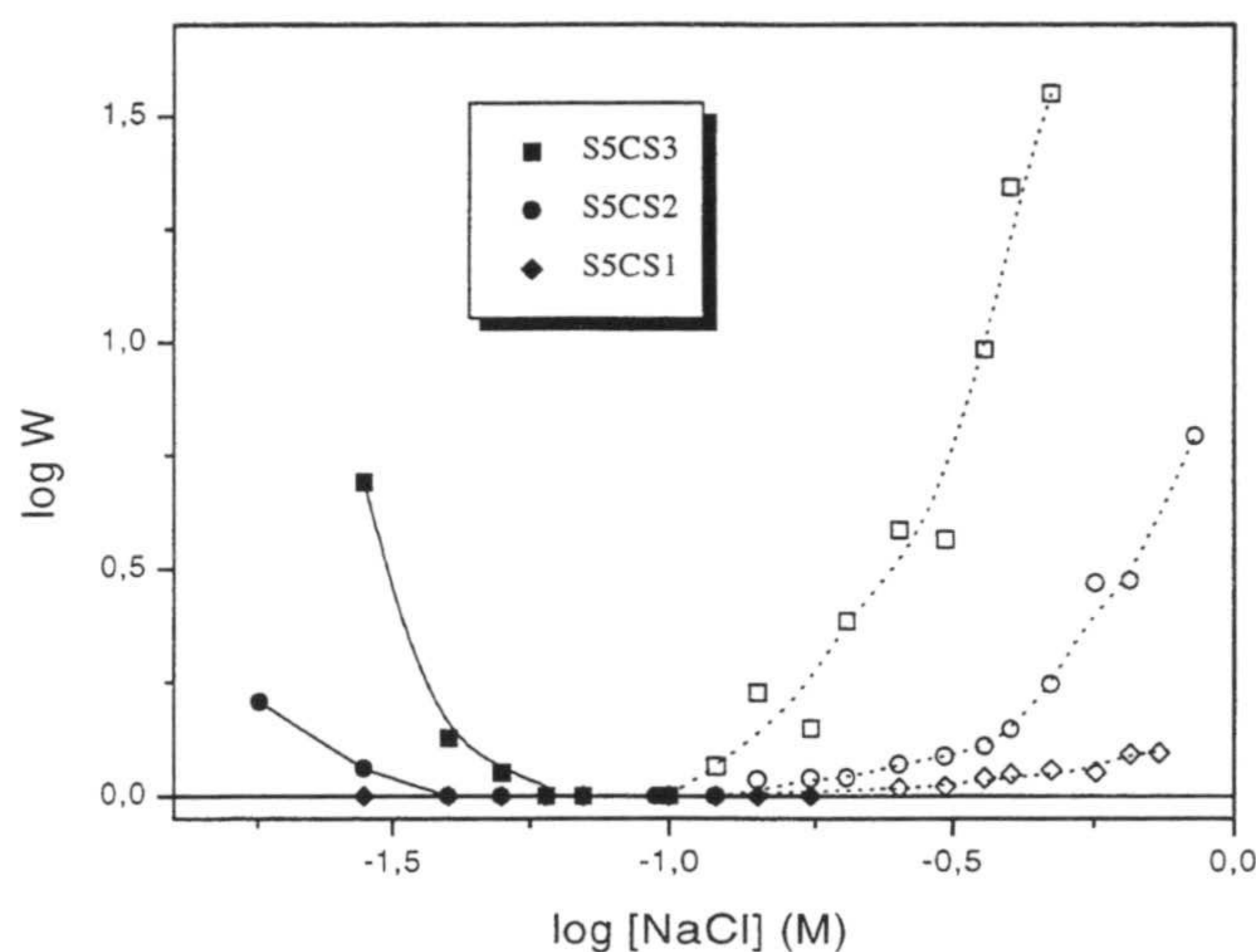
**Figura III.24.** Estabilidad coloidal de los complejos de IgG y Fib sensibilizados a pH 4 y a pH 8.

El papel que desempeñan las fuerzas electrostáticas durante el proceso de adsorción es relevante (*Bagchi et al., 1981; Elgersma et al., 1991; Johnson et al., 1992; Martín et al., 1992; Galisteo et al., 1992; Ortega et al., 1994; 1998b*). Estas interacciones van a provocar que las proteínas adquieran una orientación preferencial al adsorberse sobre la superficie. A pH 4 la carga neta de las proteínas IgG y Fib es positiva (ver sus puntos isoeléctricos en tabla III.6) mientras que la superficie del látex es negativa existiendo entre ambos una atracción electrostática. Por tanto la proteína se orientará de forma que sus cargas positivas estén próximas a la superficie. A pH 8 la superficie y la proteína se repelen por tener la misma carga con lo que la proteína se adsorberá acercando sus zonas hidrofóbicas al látex y exponiendo sus cargas a la disolución. La superficie del complejo es más hidrofílica a pH 8 que a pH 4. Si la existencia de la zona no-DLVO se debe a las fuerzas de hidratación a pH básico los complejos serán más estables coloidalmente, tal y como se ha obtenido, por ser más hidrofílicos.

## 12. Influencia del sustrato polimérico

Para acometer este estudio se sensibilizaron tres complejos de IgG sobre diferentes partículas: S5CS1-IgG 3.32 mg/m<sup>2</sup>, S5CS2-IgG 3.22 mg/m<sup>2</sup> y S5CS3-IgG 1.63 mg/m<sup>2</sup>. Si nos fijamos en la tabla I.1 (ver página 26) donde se recogen las principales características de estos látex podemos ver que la densidad de carga aumenta progresivamente desde el látex S5CS1 al S5CS3. Estos complejos no se corresponden con el máximo recubrimiento con lo que parte de la superficie de la partícula se encuentra sin proteína adsorbida. Los complejos S5CS1-IgG y S5CS2-IgG tienen un recubrimiento semejante por lo que la única diferencia que se puede esperar entre ellos es el mayor carácter hidrofílico del complejo sensibilizado sobre el látex S5CS2. Se intentó obtener un complejo con el sistema S5CS3 con un recubrimiento de 3.3 mg/m<sup>2</sup> para poder comparar los datos de estabilidad coloidal de los tres látex en las mismas condiciones, pero el máximo grado de adsorción que se consiguió fue de 1.63 mg/m<sup>2</sup>.

En la siguiente figura se muestran los diagramas de estabilidad coloidal para estos tres complejos obtenidos a pH 8 y con NaCl.



**Figura III.25.** Estabilidad coloidal de los complejos S5CS1-IgG, S5CS2-IgG y S5CS3-IgG a pH 8.

Las características del soporte polimérico está influyendo tanto en la zona DLVO como en la no-DLVO. Los complejos de S5CS1 y S5CS2 tienen el mismo grado de recubrimiento, pero este último se muestra más estable coloidalmente. La superficie libre del látex S5CS2 aporta más carga eléctrica que la del S5CS1. Por ello la estabilidad coloidal en la zona electrostática (zona DLVO) es mayor para el complejo de S5CS2. De igual forma al tener más carga el complejo es más hidrofílico, con lo que su estabilidad coloidal es también mayor en la zona no-DLVO. A partir del ajuste en la zona lineal de los factores de estabilidad se han obtenido los datos de la *c.c.c.* y la *c.s.c.* para los tres complejos (tabla III.9).

**Tabla III.9** Valores de la *c.c.c.* y *c.s.c.* para los tres complejos de IgG.

Complejo	<i>c.c.c.</i> (mM)	<i>c.s.c.</i> (mM)
S5CS1	---	223±15
S5CS2	38±6	175±15
S5CS3	50±8	121±10

Los valores de la *c.c.c.* aumentan con la densidad de carga del látex usado como soporte en la adsorción debido al incremento de la repulsión electrostática.

Sin embargo, el valor de la *c.s.c.* disminuye con la densidad de carga. El complejo es más estable en la zona no-DLVO cuanto más hidrofílico es el látex.

Es curioso observar como la estabilidad en la zona no-DVLO del complejo formado con el S5CS3, aunque tiene la mitad de proteína que los otros dos complejos, es la más grande debido a la gran hidrofiliicidad de la superficie libre de látex.

El carácter hidrofílico de un complejo no sólo viene determinado por la proteína adsorbida sino también por la superficie polimérica. De nuevo se ha obtenido que la estabilización coloidal en la zona no-DLVO está íntimamente relacionada con el carácter hidrofílico de la superficie del complejo. Este carácter viene impuesto por el tipo de proteína y soporte polimérico. Estos resultados reafirman que las fuerzas de hidratación pueden ser las responsables de la estabilidad anómala que presentan los complejos látex-proteína, apareciendo esta porque el complejo está rodeado de una estructura acuosa formada por cationes hidratados adsorbidos sobre la superficie de la proteína y por el agua de hidratación tanto de la proteína como del látex.

Estas fuerzas de hidratación pueden aparecer en partículas de látex sin recubrir con proteína siempre y cuando estén sintetizadas con monómeros hidrofílicos y tengan una elevada densidad de carga superficial.

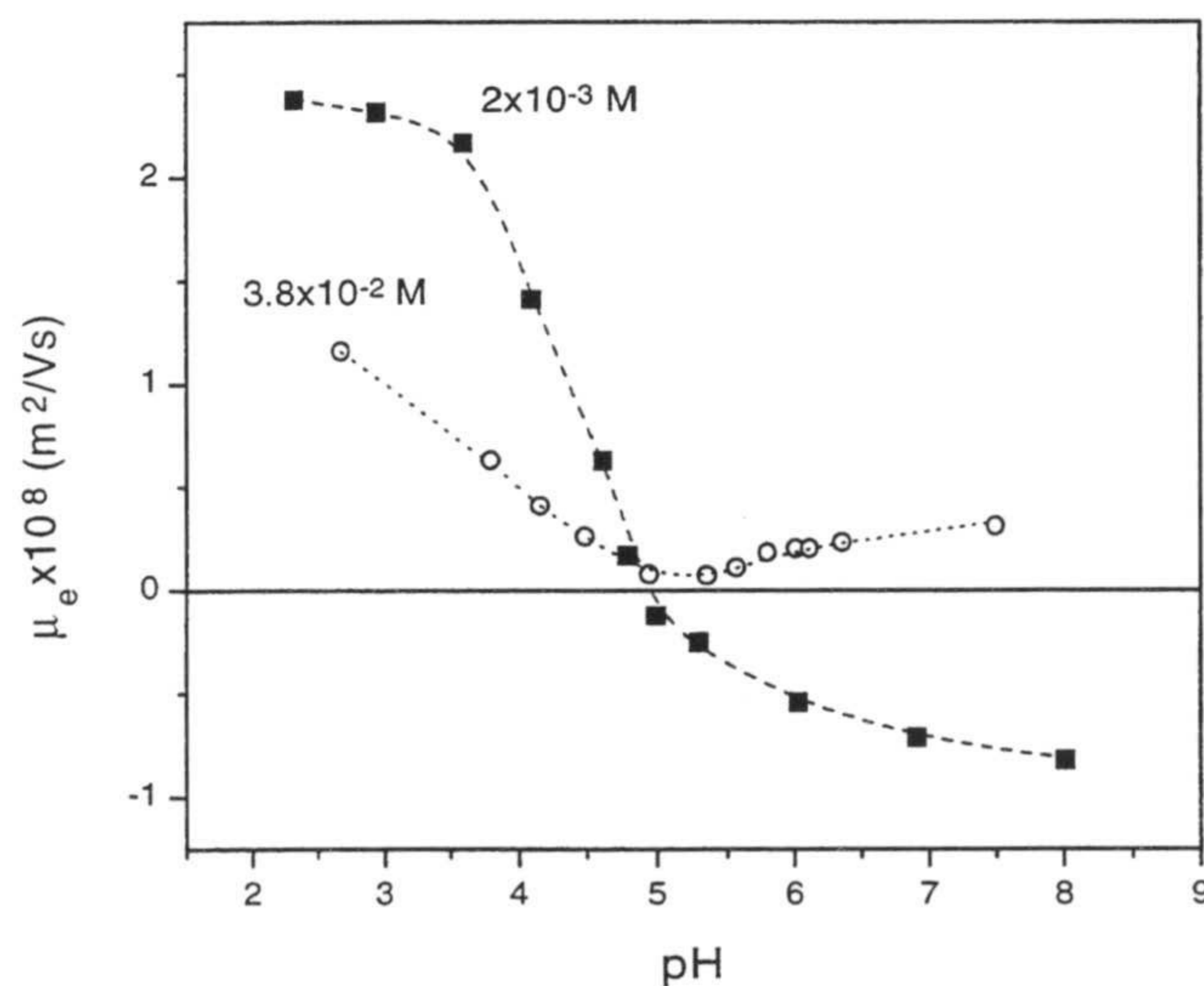
### **13. Adsorción específica de cationes sobre complejos látex-proteína**

En base a los resultados descritos en los apartados anteriores hemos propuesto la existencia de fuerzas de hidratación como el mecanismo de estabilización responsable de la zona no-DLVO en los complejos látex-proteína. Estas fuerzas de hidratación aparecen debido al carácter hidrofílico de la superficie del complejo y como consecuencia de la adsorción de cationes hidratados sobre la proteína. En este apartado se ha querido comprobar si existe o no tal adsorción de cationes y para ello se ha recurrido a la medida de la movilidad electroforética de un complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> con recubrimiento total (3.2 mg/m<sup>2</sup>) en función del pH y de la concentración de electrolito. Debido a que algunas de las condiciones en las que se ha medido la movilidad electroforética del complejo podían provocar la agregación del mismo se ha

realizado previamente un estudio para determinar aquella concentración de partículas óptima para medir la movilidad, pero lo suficientemente pequeña como para que la cinética de agregación fuera tan lenta que no aparecieran agregados durante las medidas. Este hecho se comprobaba midiendo el tamaño medio del complejo una vez finalizada la medida de su movilidad. La movilidad en estas condiciones óptimas se medía 5 veces para la misma muestra. Este proceso se repetía para tres muestras diferentes del complejo y se calculaba la media. El error de las medidas es del 3%.

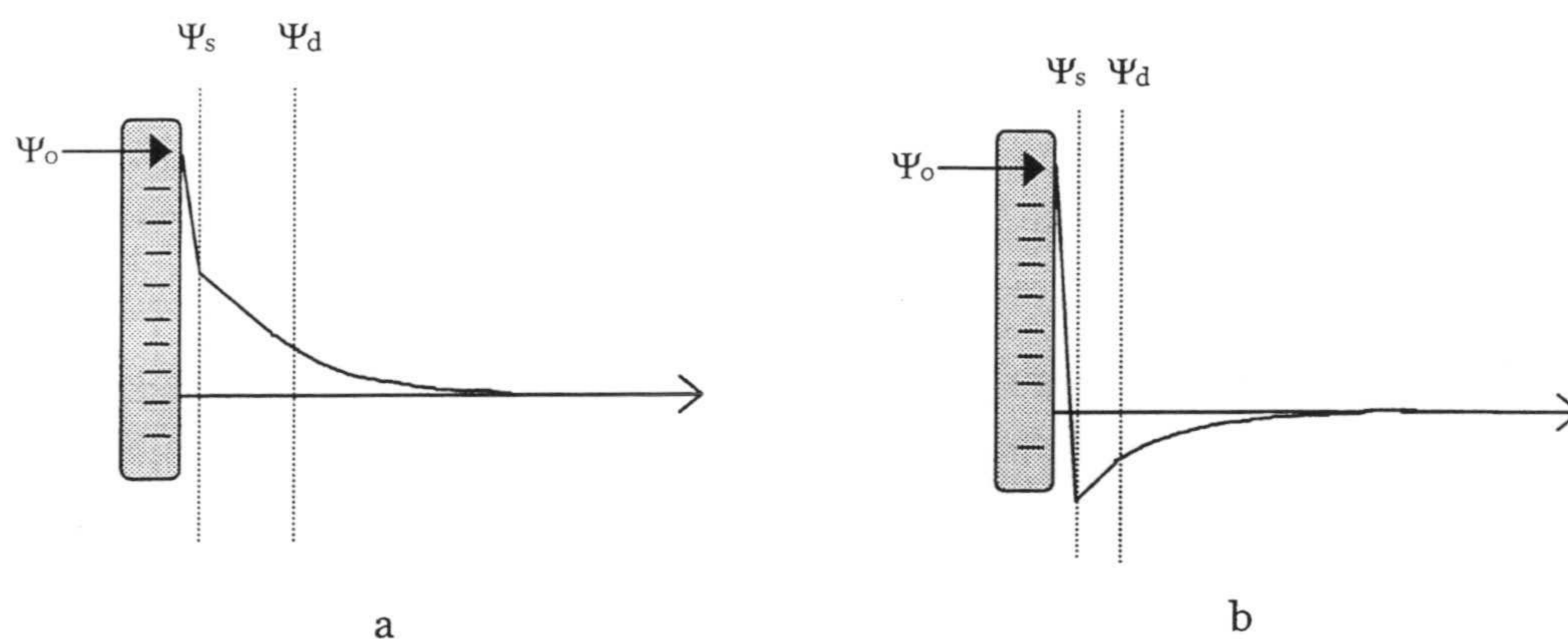
En la siguiente figura se muestra la movilidad electroforética del complejo en función del pH a dos concentraciones diferentes de  $\text{CaCl}_2$ . El pH fue ajustado en cada experimento con  $\text{NaOH}/\text{HCl}$ . Para los pHs estudiados el calcio no forma hidróxidos y el cloruro cálcico está completamente disociado.

Para la concentración de sal baja el comportamiento del complejo es el esperado apareciendo un punto isoeléctrico. Para pHs superiores a este punto la densidad de carga de la proteína es negativa y por tanto la movilidad también es negativa. Sin embargo cuando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta no aparece un punto isoeléctrico y la movilidad del complejo es positiva cuando la densidad de carga del mismo es negativa.



**Figura III.26.** Movilidad electroforética de un complejo  $\text{S4CS9-F(ab')}_2$  en función del pH para dos concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ .

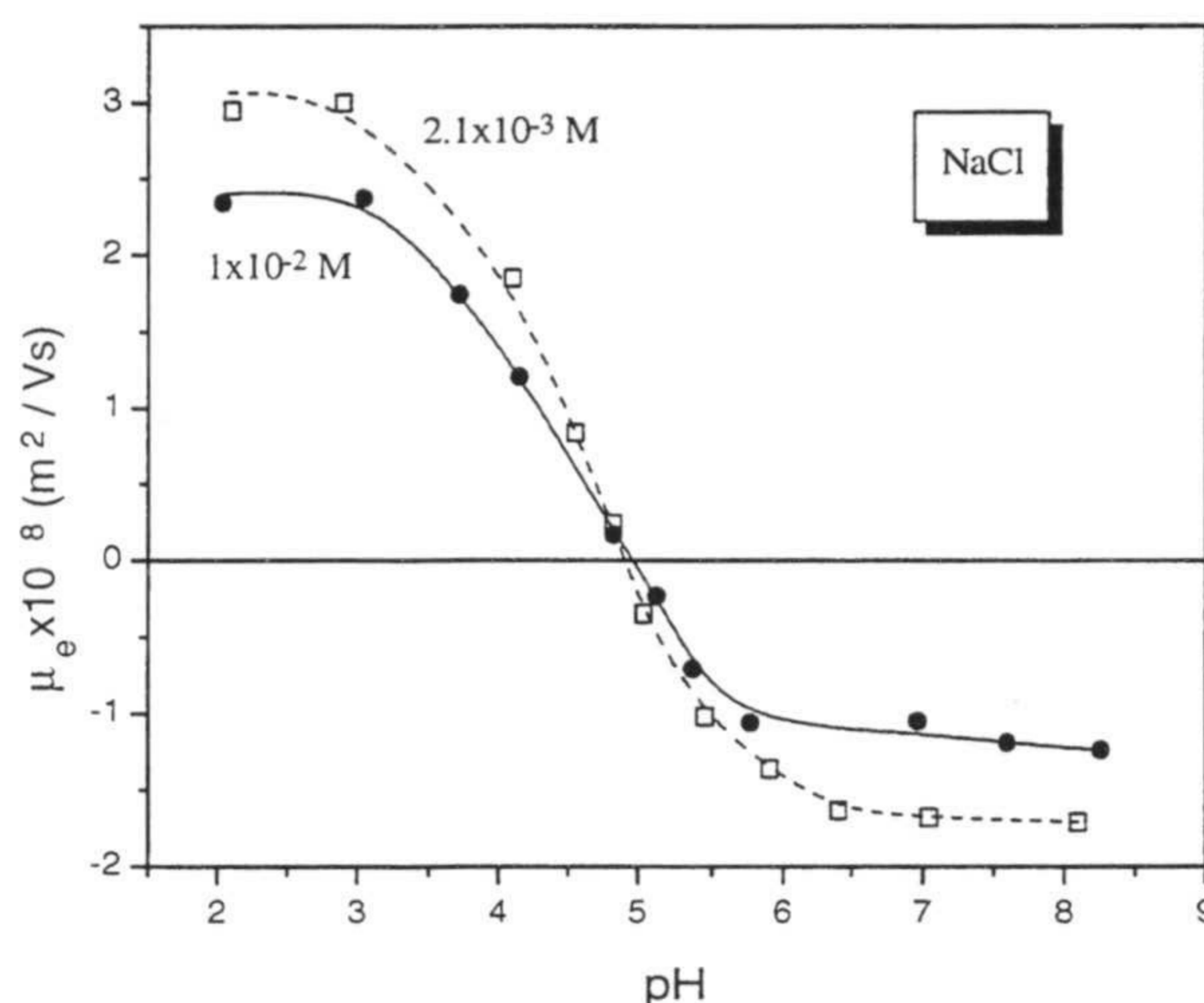
Este resultado indica que existe una adsorción muy importante (superadsorción) del catión  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la proteína (Tadros, 1987). La cantidad de cationes adsorbidos aumenta con la concentración de electrolito y hasta que ésta no alcanza un valor determinado no se produce el cambio de carga del complejo por efecto de la adsorción específica del catión. La estructura de la interfase sólido-líquido cuando existe una ligera (a) y una fuerte (b) adsorción específica de cationes queda esquematizada en la siguiente figura:



**Figura III.27.** Modelos de doble capa con adsorción específica de cationes.

En el caso b existe una adsorción de cationes tan elevada que la densidad de carga en la capa de Stern es superior a la densidad de carga negativa superficial. Como resultado, los valores de  $\psi_s$  y de  $\psi_d$  son positivos cuando el potencial superficial es negativo. Este “cambio de signo en la carga” se manifiesta experimentalmente con un cambio en el signo de la movilidad electroforética, ya que ésta depende del potencial eléctrico en el plano de cizalladura, que suele corresponder con el potencial  $\psi_d$ . Los iones que se adsorben específicamente se caracterizan porque pueden cambiar el signo de la movilidad electroforética de la partícula, mientras que los iones indiferentes sólo reducen la movilidad asintóticamente a cero (Modi et al., 1957; Hunter, 1981).

La dependencia de la movilidad electroforética del complejo con el pH en presencia de diferentes concentraciones de NaCl se muestra en la siguiente figura.

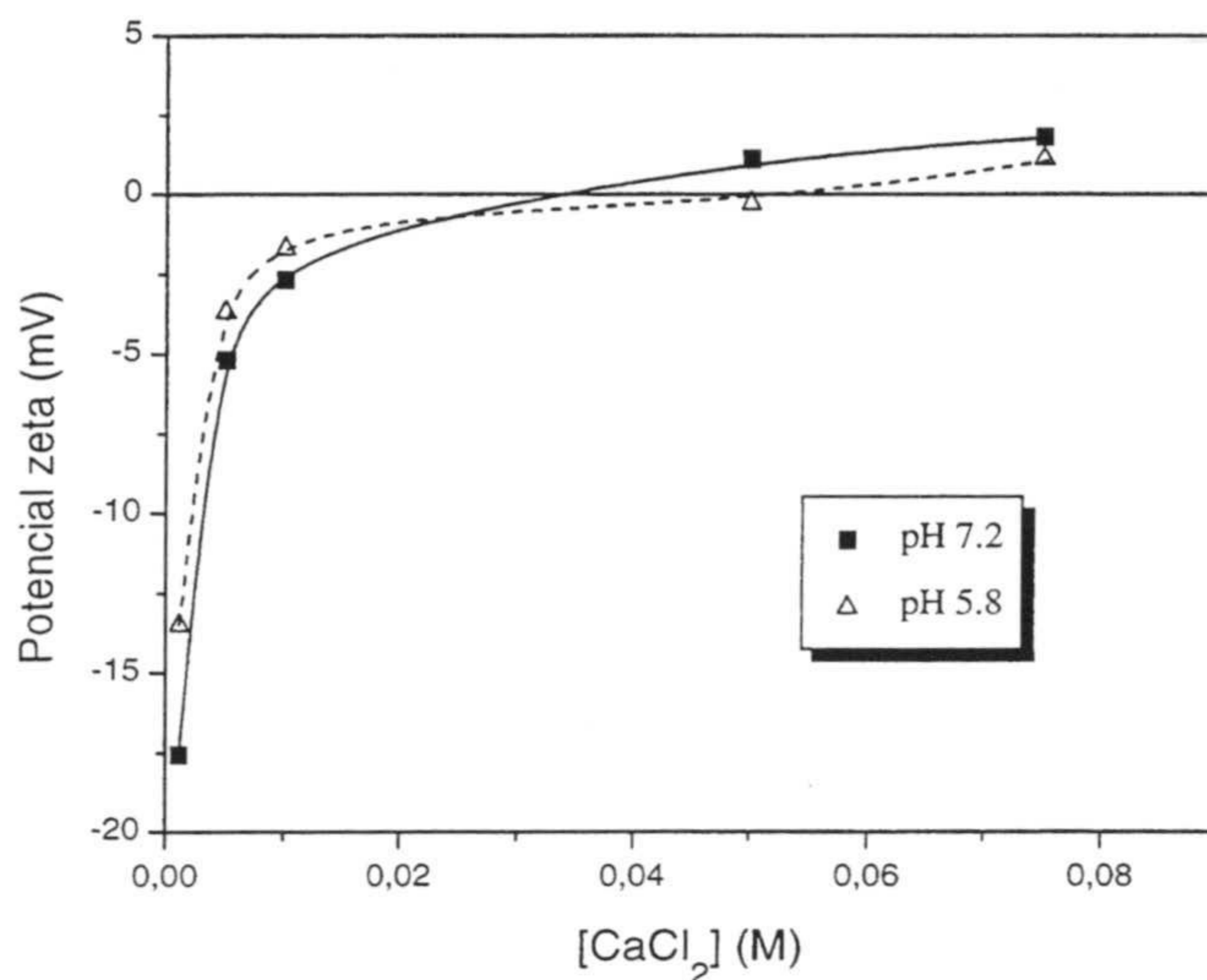


**Figura III.28.** Movilidad electroforética de un complejo  $S4CS9-F(ab')_2$  en función del pH para dos concentraciones de NaCl.

Con este electrolito no se produce el cambio en el signo de la carga del complejo para pHs básicos como ocurría con el calcio. Este resultado no indica que no haya adsorción específica de sodio sobre el complejo, ya que ésta puede estar ocurriendo pero en magnitud no lo suficientemente fuerte como para cambiar el signo de la carga. Se podría pensar en medir la movilidad para una concentración de NaCl elevada donde la adsorción de sodio cambie el signo de la carga difusa. Pero experimentalmente estamos limitados, porque la movilidad electroforética sólo se puede medir a fuerzas iónicas no muy elevadas.

La dependencia del comportamiento electroforético del complejo con la concentración de  $CaCl_2$  a pH 7.2 y pH 5.8 también parece indicar la existencia de adsorción específica de calcio sobre el complejo (figura III.29). En esta gráfica se ha representado el potencial zeta obtenido por la teoría de Smoluchowski en lugar de la movilidad electroforética, ya que más adelante se necesitarán estos datos.

A concentraciones bajas de electrolito el potencial zeta es más negativo para pH 7.2 que para pH 5.8. Este hecho era de esperar dado que la carga superficial del complejo es mayor a pH 7.2 que a 5.8 por haber más grupos carboxilos desprotonados en la proteína.



**Figura III.29.** Potencial zeta del complejo en función de la concentración de  $\text{CaCl}_2$  a dos pHs.

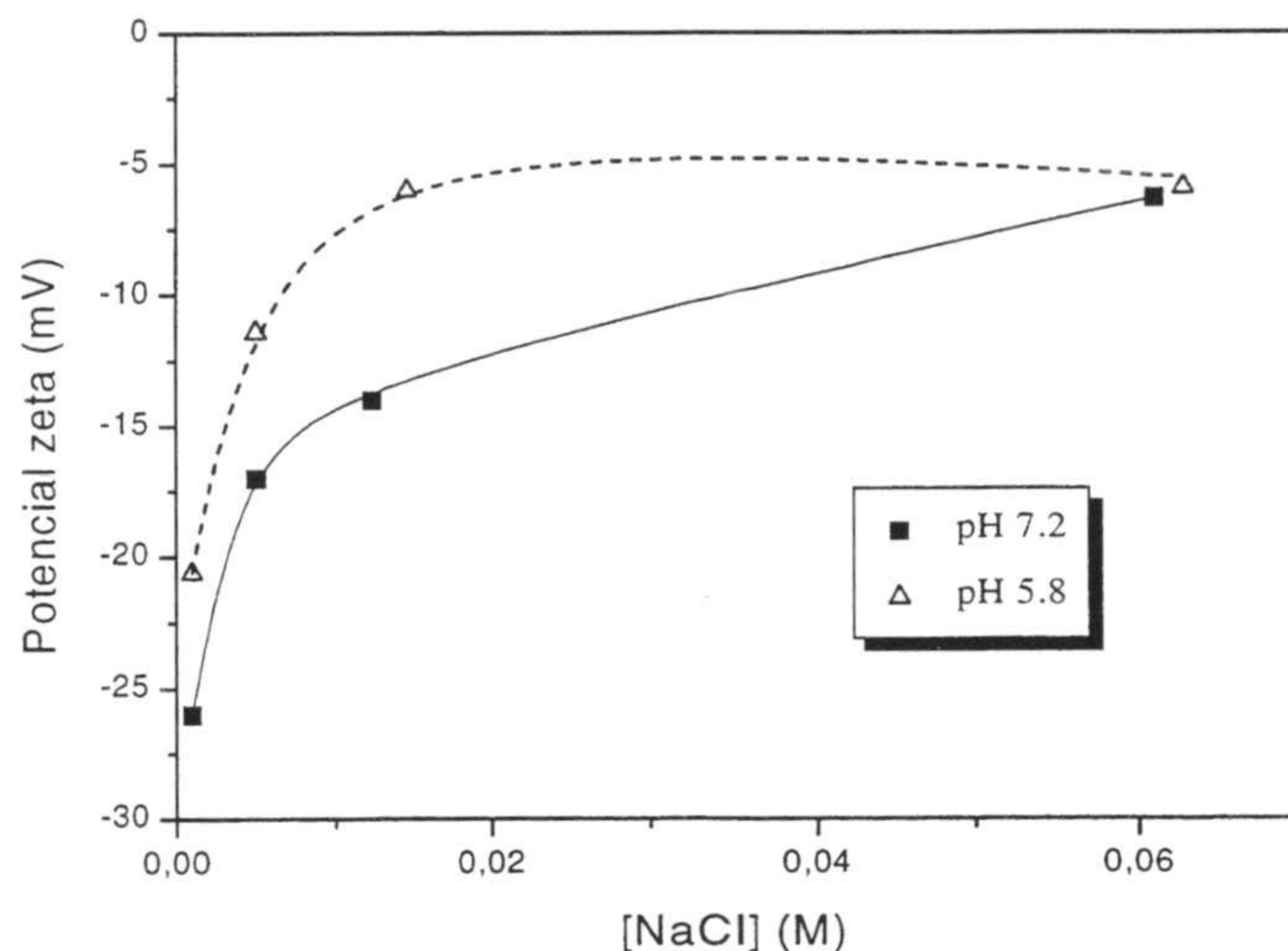
Sin embargo a partir de una concentración de sal dada, que depende del pH del medio, el potencial eléctrico en la zona difusa (equivalente al potencial zeta) es positivo cuando la densidad de carga superficial del complejo es negativa. Y además es más positivo a pH 7.2 cuando el complejo tiene una mayor carga negativa superficial. Este comportamiento puede ser atribuible, de nuevo, a la adsorción específica del calcio sobre el complejo. Esta adsorción es mayor cuanto más negativa es la superficie del complejo.

La adsorción específica de iones en una interfase sólido-líquido no sólo viene controlada por las fuerzas eléctricas sino también por una fuerza de origen químico (Horikawa *et al.*, 1988; Callejas-Fernández, *et al.*, 1992; Hunter, 1993). Este potencial químico dependerá del tipo de proteína y del catión que se va a adsorber mientras que las fuerzas eléctricas dependerán, entre otras magnitudes, de la densidad de carga superficial del sólido.

Cuando el electrolito usado es el NaCl no aparece el cambio de signo de carga con lo que no se puede concluir si existe o no adsorción específica del sodio (ver figura III.30).



No obstante, resulta interesante resaltar que aunque los valores de la movilidad son más negativos para pH 7.2, como por otra parte cabría esperar, para la concentración más alta empleada el potencial zeta prácticamente coincide a pH 7.2 y a pH 5.8.



**Figura III.30.** Potencial zeta del complejo en función de la concentración de NaCl a dos pHs diferentes.

Este comportamiento guarda una cierta similitud con el obtenido para el electrolito  $\text{CaCl}_2$  (figura III.29) donde las líneas para ambos pHs se llegaban a cruzar como consecuencia de la adsorción específica del catión.

Las teorías electrocinéticas clásicas suponen que la carga de la partícula está localizada únicamente en la superficie de la misma. Sin embargo, cuando una partícula de poliestireno está recubierta con proteína los grupos cargados no se encuentran en una superficie plana sino que están distribuidos en esta capa proteica, de un determinado espesor, en la que los iones de la disolución podrán entrar (interfase estructurada). El estudio electrocinético, a nivel teórico y experimental, de interfases estructuradas es muy reciente. Para estas interfases la movilidad electroforética no va a ser un parámetro representativo del potencial zeta, pues también influye de forma decisiva las características fisicoquímicas de la capa de proteína situada en la superficie. Ohshima y col. (Ohshima *et al.*, 1992) demostraron que 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 cizalladura 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 polímero) pierde su significado clásico. Cuando la carga superficial del 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 densidad de carga superficial del látex sobre el valor de la movilidad.

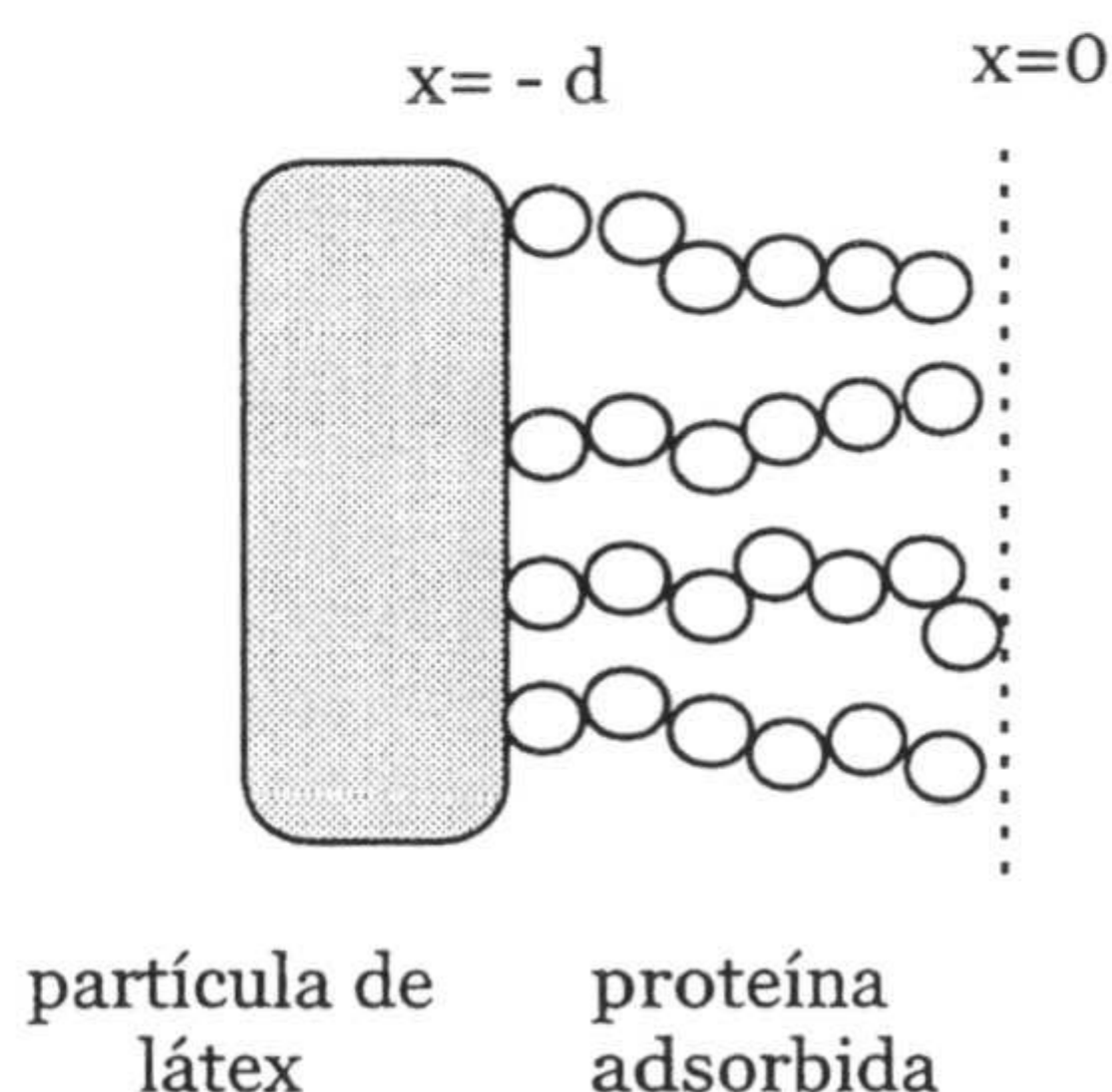
En los últimos años el objetivo de ciertos autores se ha centrado en obtener expresiones analíticas teóricas que predigan el comportamiento de la movilidad electroforética de todos estos sistemas (*Donath et al., 1979; Wunderlich, 1982; Levine et al., 1983; Sharp et al., 1985*). Estos autores proponen 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 depende sólo del potencial de la superficie más externa de la capa polimérica, sino que también es función de la distribución total 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 reciente publicación (*Ohshima et al., 1985; 1986; 1987; 1989; 1991; 1992*). Presentamos un resumen de esta teoría antes de pasar a aplicarla a nuestro sistema.

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 polímero adsorbido están distribuidas con una densidad uniforme en una capa superficial de espesor  $d$  (ver figura III.30). Sobre este modelo unifican dos conceptos diferentes: el potencial de Gouy-Chapman para dobles capas eléctricas que existirá 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 consiguiente, cuando  $d \rightarrow \infty$ , el único potencial que habrá que tener en cuenta será el de Donnan.

El problema principal con el que se encontraron estos autores al desarrollar su modelo fue obtener expresiones analíticas para la movilidad electroforética (*Ohshima et al., 1992*). Estas expresiones fueron obtenidas para tres situaciones

diferentes en función del valor de la densidad de carga superficial de la partícula ( $\sigma$ ) y de la densidad de grupos cargados en la capa de proteína adsorbida ( $N$ ):

- $\sigma=0, N \neq 0$ .
- $\sigma \neq 0, N=0$ .
- $\sigma \neq 0, N \neq 0$ .



**Figura III.31.** Representación de una superficie sólida con proteína adsorbida.

En nuestro caso nos encontramos en el tercer supuesto donde tanto la partícula de látex como la capa de proteína adsorbida tienen carga eléctrica. Para esta situación la ecuación teórica de la movilidad electroforética es (Nakamura et al., 1993):

$$\mu = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \psi_{DON} / \lambda + \psi_0 / \kappa_m}{\eta} + \frac{zeN}{\eta \lambda^2} + \frac{8 \varepsilon_r \varepsilon_0 kT}{\eta \lambda v e} \tanh \frac{ve \zeta}{4kT} \frac{e^{-\lambda d} / \lambda - e^{\kappa_m d} / \kappa_m}{1 / \lambda^2 - 1 / \kappa_m^2} \quad (\text{III.1})$$

donde  $\psi_{DON}$  y  $\psi_0$  son, respectivamente, el potencial Donnan y el potencial en la zona límite entre la región superficial y la disolución;  $\kappa_m$  es el parámetro de Debye-Hückel de la región superficial;  $\lambda$  es un parámetro cuyo inverso tiene dimensiones de longitud y su significado se relaciona con la distancia que puede penetrar el flujo hidrodinámico en el interior de la región superficial;  $v$  es la valencia del electrolito;  $z$  y  $N$  (expresado en M) son la valencia y la densidad de grupos cargados fijos en la región superficial, respectivamente;  $\zeta$  es el potencial zeta de las partículas coloidales en las mismas condiciones pero en ausencia de macromoléculas adsorbidas en su superficie;  $d$  es el

espesor de la capa de proteína adsorbida. Los demás parámetros tienen su significado habitual. El potencial de Donnan, el potencial en la zona límite y el parámetro de Debye-Hückel de la región superficial vienen dados por:

$$\psi_{DON} = \frac{kT}{ve} \ln \left[ \frac{zN}{2vn} + \left( \left( \frac{zN}{2vn} \right)^2 + 1 \right)^{1/2} \right] \quad (\text{III.2})$$

$$\psi_0 = \frac{kT}{ve} \left\{ \ln \left[ \frac{zN}{2vn} + \left( \left( \frac{zN}{2vn} \right)^2 + 1 \right)^{1/2} \right] + \frac{2kTn}{veN} \left[ 1 - \left( \left( \frac{zN}{2vn} \right)^2 + 1 \right)^{1/2} \right] \right\} \quad (\text{III.3})$$

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

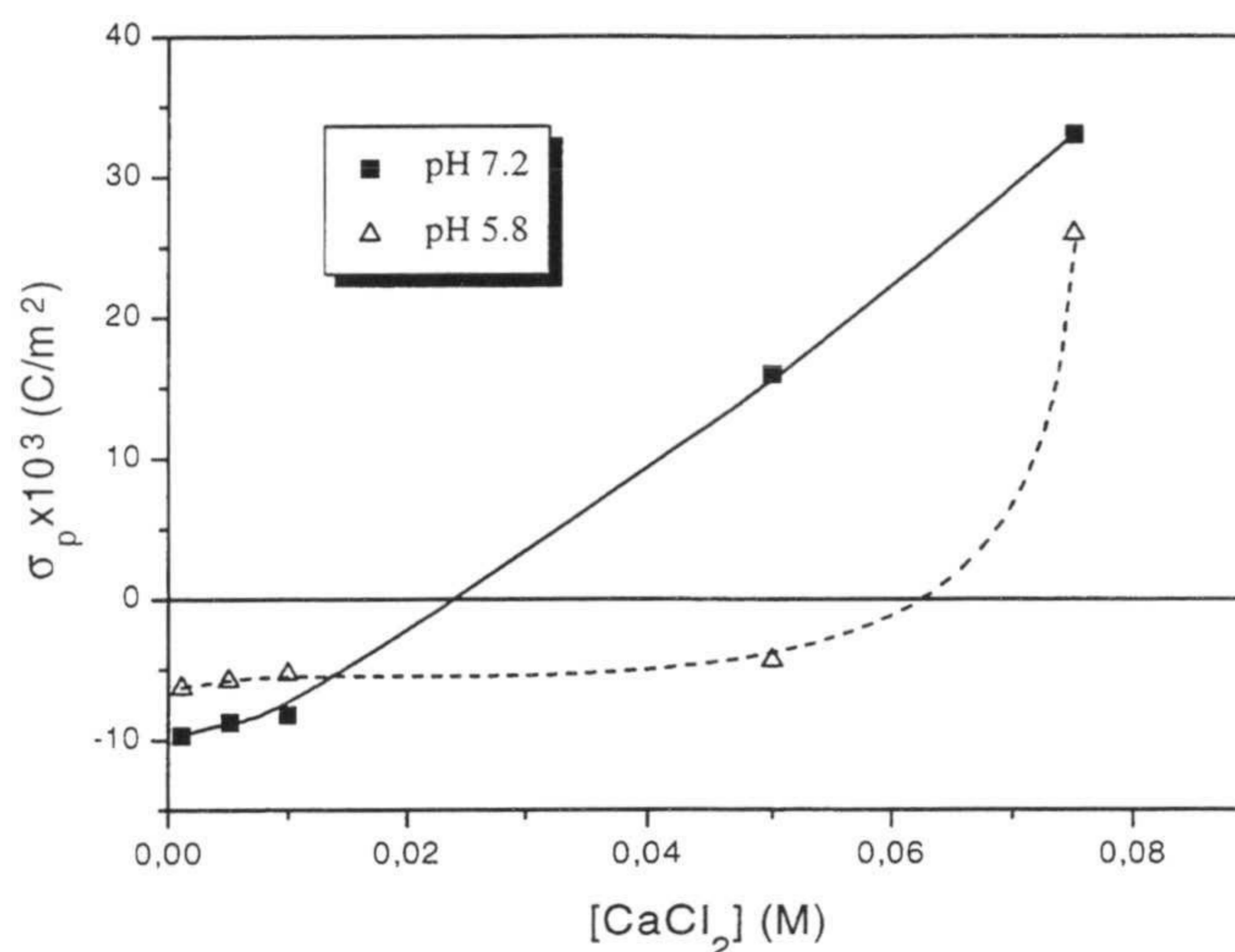
donde  $\kappa$  es la longitud de Debye clásica.

Mediante esta formulación algunos autores han ajustado los datos experimentales de la movilidad electroforética de un complejo látex-proteína en función de la concentración de electrolito utilizando tres parámetros ajustables:  $N$ ,  $\lambda$  y  $d$  (Nakamura *et al.*, 1992; Ortega-Vinuesa *et al.*, 1995a; 1995b).

Sakuma y col. (Sakuma *et al.*, 1989; 1990) han indicado que el potencial zeta para una partícula con polímero en su superficie se puede aproximar al valor del potencial en la zona límite entre la región superficial y la disolución ( $\psi_0$ ). Esta aproximación es válida cuando la densidad de carga superficial de la partícula no es mucho mayor que la densidad de carga en la capa de proteína, y se basa en que si el espesor de la capa de proteína es superior a  $1/\kappa$  (que vale 2.5 nm para  $5 \times 10^{-3}$  M de  $\text{CaCl}_2$ ) y a  $1/\lambda$  (que suele tener un valor de 2 nm) la movilidad no depende de la posición del plano de cizalladura ni del espesor de la capa de proteína (Ohshima *et al.*, 1989). El potencial zeta sólo dependerá de  $N$ , no influyendo ni el espesor de la capa de proteína ni la carga superficial del látex, según indica la ecuación III.3 para  $\psi_0$ .

Así pues, hemos ajustado cada valor del potencial zeta de la figura III.29. a la ecuación III.3 obteniendo un valor de  $N$  para cada concentración de electrolito. La densidad de carga en la capa de proteína por unidad de área ( $\sigma_p$ ) se puede calcular teniendo en cuenta su dependencia con  $N$  ( $\sigma_p = zeNd$ ). Para ello necesitamos el valor del espesor de la capa de proteína adsorbida  $d$ . Esta incógnita se ha obtenido midiendo el

tamaño hidrodinámico por PCS del complejo y del látex sin recubrir, obteniéndose un valor de  $5 \pm 1$  nm. Los resultados de este estudio aparecen en la siguiente figura.



**Figura III.32.** Densidad de carga en la capa proteica para el complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> con 3.2 mg/m<sup>2</sup> en función de la concentración de CaCl<sub>2</sub> a dos pHs.

Los valores de  $N$  obtenidos oscilan entre 9 mM (para pH 5.8 y  $5 \times 10^{-2}$  M CaCl<sub>2</sub>) y 70 mM (para pH 7.2 y  $7.5 \times 10^{-2}$  M CaCl<sub>2</sub>) los cuales concuerdan con los encontrados en la bibliografía: 10 mM-50 mM para complejos de látex-HSA y látex-IgG (Nakamura *et al.*, 1992; 1993), 10 mM-25 mM para complejos látex-F(ab')<sub>2</sub> (Ortega-Vinuesa *et al.*, 1995a; 1995c).

El valor de  $N$  sólo depende de la densidad de carga neta de la proteína adsorbida y su valor es función sólo del pH pero no de la fuerza iónica. Sin embargo, su valor experimental varía con la concentración de CaCl<sub>2</sub> como se refleja en la disminución la densidad de carga  $\sigma_p$  al aumentar la concentración de sal que incluso llega a cambiar de signo. Este hecho parece indicar que el Ca<sup>2+</sup> se está adsorbiendo en la capa de proteína haciendo menos negativo el valor de  $\sigma_p$  (Sakuma *et al.* 1989; 1990; Nakamura *et al.*, 1993). Cuando se ha adsorbido demasiado calcio la densidad de carga en la capa de proteína llega a ser positiva (por ello la movilidad también es positiva).

La carga neta por proteína adsorbida se puede calcular si consideramos que un complejo de F(ab')<sub>2</sub> con un recubrimiento de 3.2 mg/m<sup>2</sup> sobre un látex de diámetro 200 nm corresponde, aproximadamente, a 2500 moléculas de proteína por partícula

(Molina-Bolívar *et al.*, 1998). En la tabla III. 10 aparecen los valores de carga neta promedio por proteína ( $z_p$ ) para ambos pHs en función de la concentración de sal.

**Tabla III.10** Dependencia de la carga neta promedio por proteína ( $z_p$ ) con el pH y la concentración de  $\text{CaCl}_2$ .

pH 7.2		pH 5.8	
$\text{CaCl}_2$ (M)	$z_p$	$\text{CaCl}_2$ (M)	$z_p$
$5.4 \times 10^{-4}$	-3.4	$5.4 \times 10^{-4}$	-2.1
$1.16 \times 10^{-3}$	-3.0	$1.15 \times 10^{-3}$	-1.9
$5.1 \times 10^{-3}$	-2.7	$5.1 \times 10^{-3}$	-1.8
$1 \times 10^{-2}$	-2.5	$1 \times 10^{-2}$	-1.7
$5 \times 10^{-2}$	+5.1	$5 \times 10^{-2}$	-1.3
$7.5 \times 10^{-2}$	+10.5	$7.5 \times 10^{-2}$	+8.2

No hay que olvidar que el valor de  $z_p$  es la suma de la carga negativa de la proteína proveniente de la desprotonización de los grupos carboxilos, la carga positiva de los grupos amino y la carga positiva como consecuencia de la adsorción del catión. Si nos fijamos en los datos para la concentración de  $\text{CaCl}_2$  menor, donde se puede suponer que la adsorción de  $\text{Ca}^{2+}$  es mínima, la carga neta de la proteína es mayor a pH 7.2 que a pH 5.8. Este resultado era de esperar si consideramos que el punto isoeléctrico de la  $\text{F(ab}')_2$  está comprendido entre 4.7-6.0. Los valores de  $z_p$  calculados parecen ser lógicos si se tiene en cuenta que a pH 7 el número de residuos positivos y negativos de un proteína a pH 7 son prácticamente iguales, y que el número de residuos positivos y negativos totales de la  $\text{F(ab}')_2$  son muy semejantes y están comprendidos entre 15 y 20 (Lu *et al.*, 1991).

En la bibliografía se ha encontrado que la lisozima, que es una proteína más cargada que la  $\text{F(ab}')_2$  y cuyo punto isoeléctrico es 11.1, tiene una carga de +8 a pH 7.8 (Tanford *et al.*, 1972).

El valor de  $z_p$ , que debería permanecer constante, disminuye al aumentar la concentración de  $\text{CaCl}_2$  presumiblemente debido a la adsorción de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Para una concentración de sal determinada al haber más cationes adsorbidos que carga negativa tiene la proteína el valor de  $z_p$  llega a ser positivo.

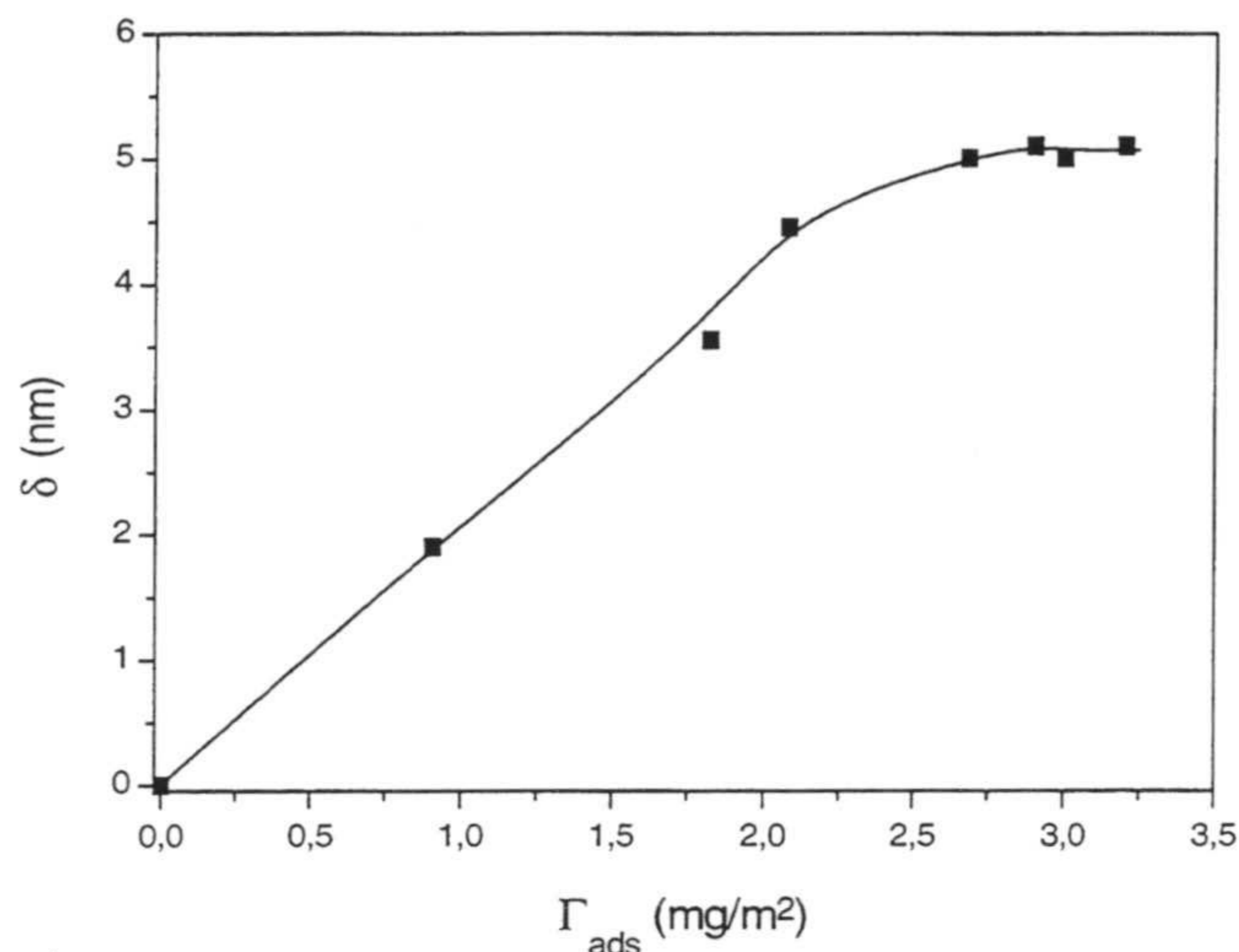
Estos estudios parecen indicar la existencia de adsorción de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el complejo látex-F(ab')<sub>2</sub> no pudiéndose obtener conclusiones definitivas para el caso de  $\text{Na}^+$ . Existen otros métodos, a parte del seguido en esta tesis, para estudiar la adsorción específica de cationes sobre complejos látex-proteína como medidas de viscosidad y densidad (Bernhardt *et al.*, 1977; 1980; Kim *et al.*, 1980), técnicas espectroscópicas (Grygiel *et al.*, 1995), etc. Actualmente estamos trabajando en el desarrollo de un sistema de microvaloración para determinar el valor de la densidad de carga de un complejo látex-proteína. Con este dato y con la densidad de carga que se puede obtener por medidas de movilidad electrocinética se podrá estudiar en investigaciones futuras si existe o no adsorción de cationes.

#### **14. Estabilidad coloidal de complejos látex-proteína en la zona DLVO**

El objetivo del presente apartado es ver si la teoría clásica DLVO, vista a lo largo del capítulo anterior, se puede utilizar para explicar la estabilidad coloidal de los complejos látex-proteína en la zona DLVO. Una dificultad con la que nos encontramos al realizar este estudio es que los valores de la *c.c.c.* de los complejos son muy pequeños, entre 60 y 150 mM de NaCl, y no se suelen obtener la cantidad de puntos deseados en el diagrama del factor de estabilidad.

Antes de realizar los ajustes de los datos experimentales a la expresión teórica del factor de estabilidad es necesario calcular el tamaño de una partícula de látex recubierta con F(ab')<sub>2</sub>, ya que este dato lo necesitamos para calcular el potencial atractivo de van der Waals y el electrostático. El diámetro de una partícula de S4CS9 sin proteína era de  $201 \pm 6$  nm. Al adsorber la proteína su tamaño debe aumentar en función del recubrimiento. Este tamaño lo hemos determinado por PCS y en la siguiente figura se muestra el espesor de proteína adsorbido ( $\delta$ ) frente al recubrimiento ( $\Gamma_{\text{ads}}$ ) a pH 6. Cada complejo fue sonicado durante 10 minutos para asegurarnos que no existía ningún tipo de agregado en la muestra. Los valores del índice de polidispersidad

medidos por el sistema PCS fueron independientes del recubrimiento y constantes valiendo 0.06.



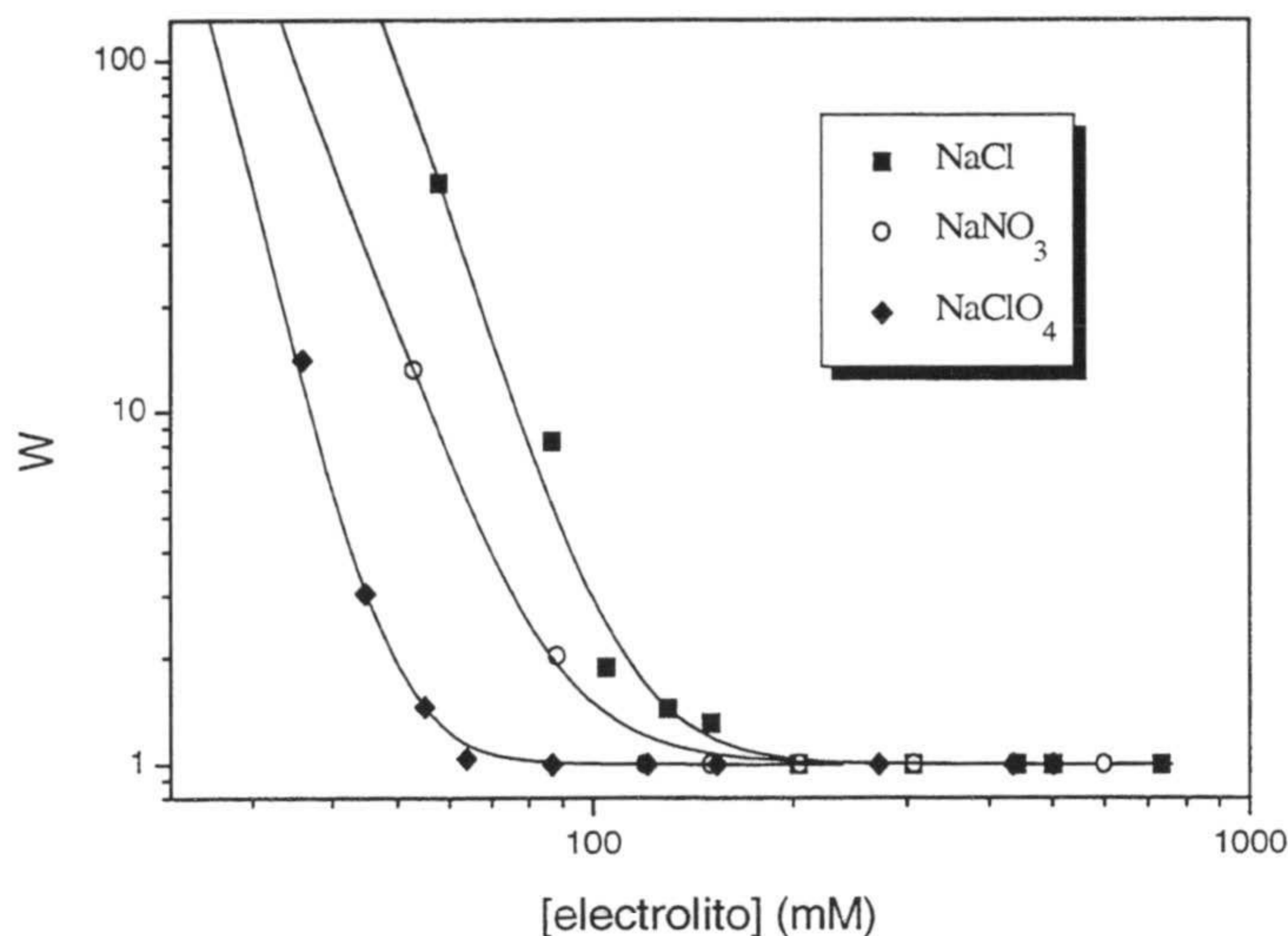
**Figura III.33.** Espesor de la capa de  $F(ab')_2$  adsorbida en función del recubrimiento.

El espesor aumenta con la cantidad de proteína adsorbida hasta alcanzar un valor constante a partir de 2.7 mg/m<sup>2</sup>. Este espesor máximo corresponde a  $5 \pm 1$  nm. Por lo tanto el radio de la partícula de látex puede aumentar hasta 5 nm como consecuencia de la capa de  $F(ab')_2$  adsorbida. Teniendo en cuenta que el tamaño del fragmento  $F(ab')_2$  cristalizado es de  $8.2 \times 5.0 \times 3.8$  nm<sup>3</sup> (Marquart et al., 1980) y suponiendo que un recubrimiento de 3.2 mg/m<sup>2</sup> corresponde a una monocapa de proteína, el ángulo de abertura de los brazos  $F(ab')$  se ha calculado en unos 40° con respecto a la vertical.

En primer lugar vamos a analizar los datos que se han obtenido sobre la estabilidad coloidal de un complejo S4CS9- $F(ab')_2$  con 2.8 mg/m<sup>2</sup> al agregar con NaCl, NaNO<sub>3</sub> y NaClO<sub>4</sub> a pH 3.4 y 6.2. Este sistema fue estudiado en el apartado 7 del presente capítulo. En la siguiente figura se muestran los diagramas de estabilidad a pH 3.4 con los correspondientes ajustes.

A pH 3.4 la densidad de carga del complejo es positiva con lo que el anión está actuando como contraión.





**Figura III.34.** Estabilidad coloidal del complejo  $S4CS9-F(ab')_2$  con  $2.8 \text{ mg/m}^2$  a pH 3.4 en función de la concentración de electrolito.

Queda claro en esta figura la fuerte influencia del tamaño del contraión en la estabilidad coloidal del complejo. Esta influencia es considerada por la teoría DLVO a través de la inclusión del espesor de la capa de Stern en el potencial de interacción electrostático. Los datos experimentales del factor de estabilidad han sido ajustados a la expresión teórica. Como potencial eléctrico se ha utilizado la expresión que tiene en cuenta el tamaño del contraión en la capa de Stern, suponiendo que el ión está sin hidratar y tomando los siguientes valores para los radios: 0.181 nm, 0.264 nm y 0.152 nm para el  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{ClO}_4^-$ , respectivamente (*Franks, 1973; Israelachvili, 1991*). Como se puede comprobar los ajustes son más que aceptables.

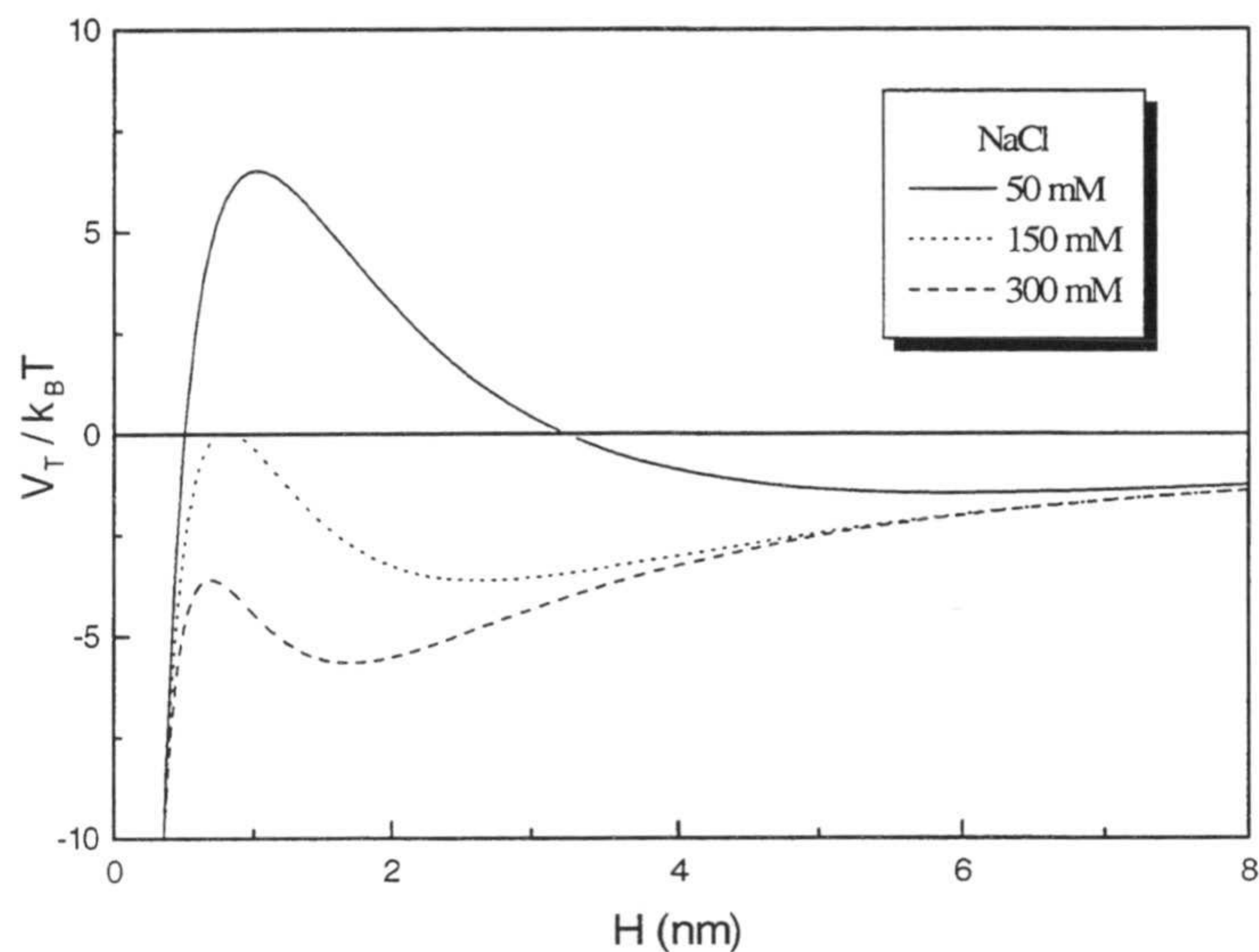
En la tabla III.11 se han recogido los valores de la constante de Hamaker y del potencial difuso obtenidos con los ajustes así como el valor experimental de la c.c.c. para cada electrolito. Es interesante observar como los valores de  $A$  y de  $\psi_d$  son prácticamente similares para el  $\text{Cl}^-$  y el  $\text{NO}_3^-$ . Este resultado era de esperar pues ambas magnitudes sólo deben depender de las características del complejo (tipo de material y estado eléctrico) pudiéndose explicar el descenso en la estabilidad coloidal por el mayor tamaño del anión  $\text{NO}_3^-$ .

**Tabla III.11** Potencial eléctrico y constante de Hamaker obtenidos utilizando la teoría DLVO para el complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> con 2.8 mg/m<sup>2</sup> a pH 3.4.

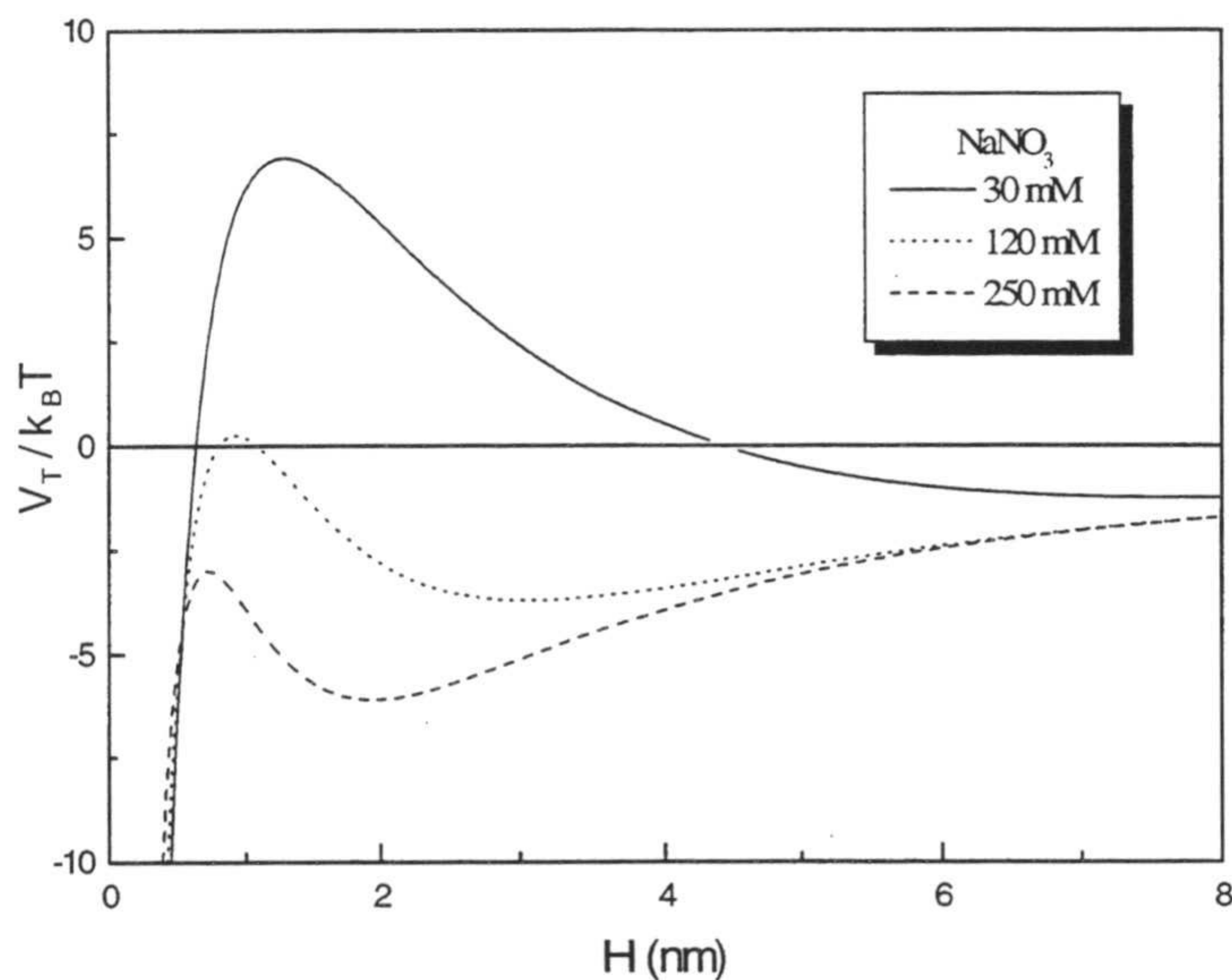
Electrolito	c.c.c. (mM)	$\psi_d$ (mV)	$A \times 10^{20}$ (J)
NaCl	151±10	18.0	0.81
NaNO <sub>3</sub>	116±7	17.4	0.98
NaClO <sub>4</sub>	61±6	20.2	1.20

Sin embargo el ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, que es el menor de los aniones utilizados, es el que inestabiliza más al complejo. Por otra parte, los parámetros del ajuste para este ión son claramente superiores a los obtenidos por los otros aniones. En la estabilidad coloidal del complejo en presencia del perclorato está influyendo otro parámetro diferente al espesor de la capa de Stern. Posiblemente este parámetro sea la adsorción específica de ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> sobre la proteína. En la bibliografía podemos encontrar que los macroaniones como el perclorato, fosfato, borato, etc. tienen una fuerte tendencia a adsorberse específicamente sobre las proteínas (Galisteo, 1992). El potencial eléctrico en la zona más externa del complejo, que es el que controla la estabilidad coloidal, es menor cuando hay adsorción específica de ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> que en ausencia de la misma. Como resultado la estabilidad decrece y un potencial eléctrico de 18 mV (como el obtenido para Cl<sup>-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) no puede ajustar los datos experimentales. El potencial que ajusta (20 mV) debe ser superior para compensar ese descenso que provoca la adsorción específica del ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>.

A partir de los valores de la constante de Hamaker y del potencial difuso de la tabla III.11 se han construido los diagramas de potencial de interacción para comprobar si éstos explican la estabilidad coloidal del complejo observada experimentalmente.

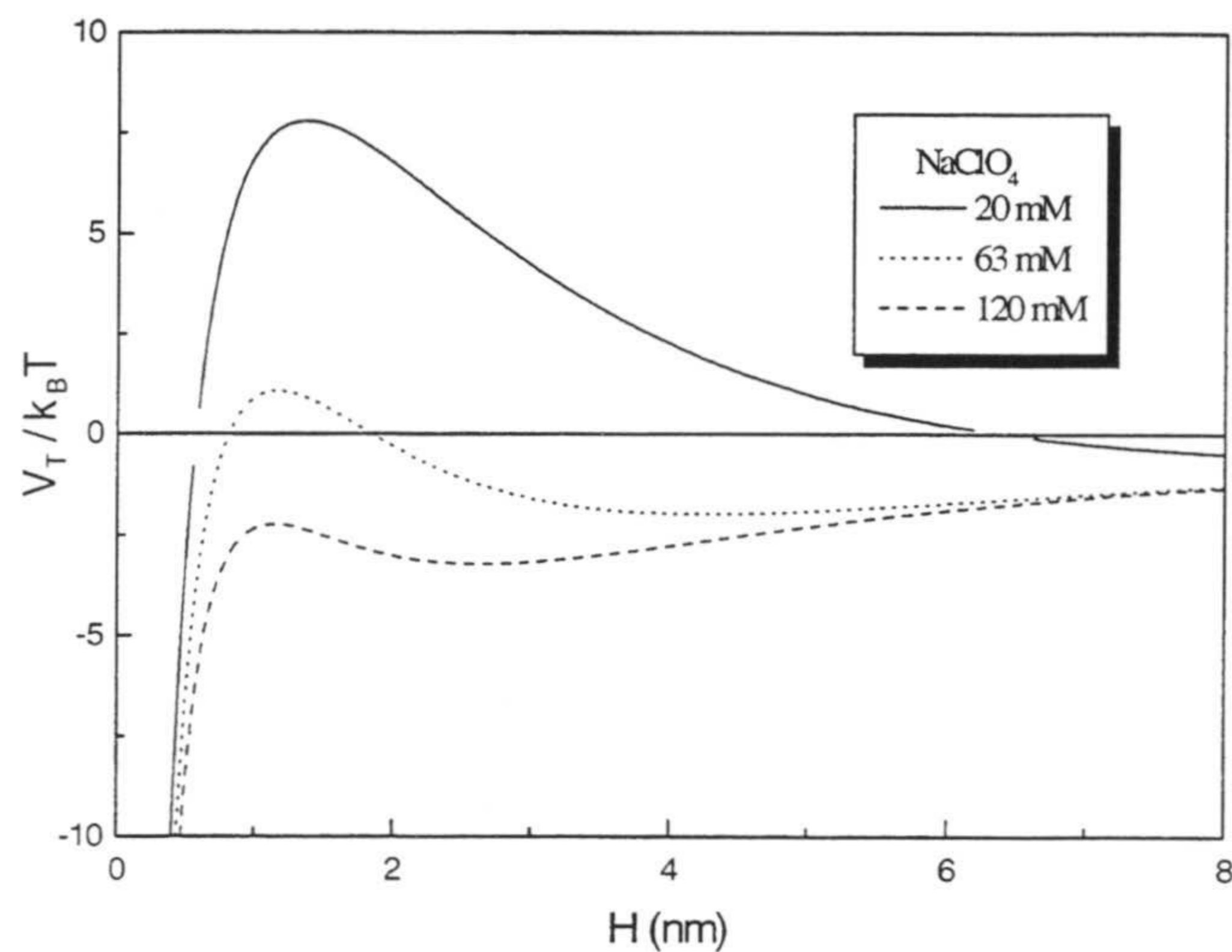


**Figura III.35.** Potencial total de interacción para el complejo en presencia de NaCl a pH 3.4.



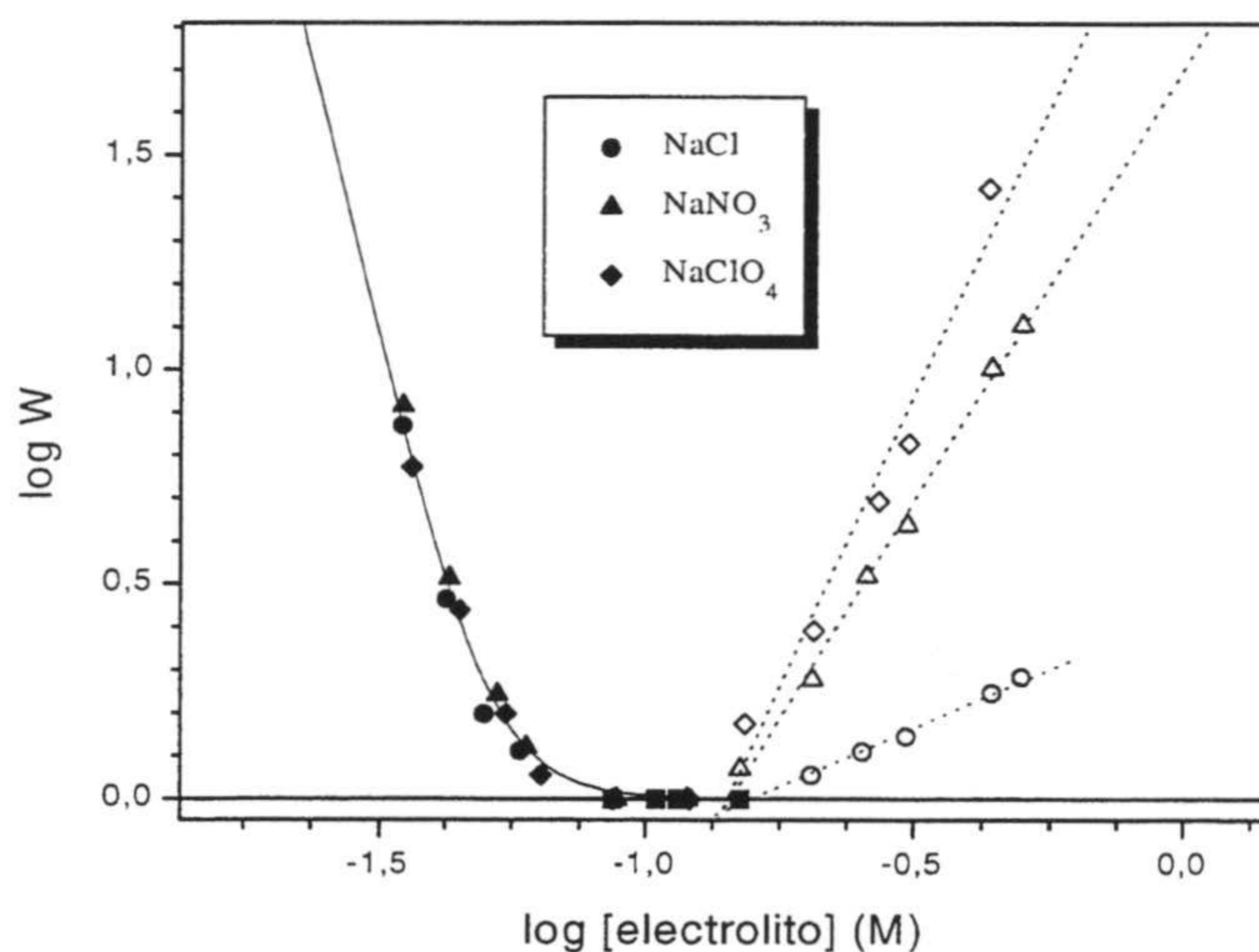
**Figura III.36.** Potencial total de interacción para el complejo en presencia de NaNO<sub>3</sub> a pH 3.4.

En los tres casos se puede comprobar que la barrera de potencial es inferior a  $1 \text{ k}_B T$  para una concentración de electrolito semejante al valor de la c.c.c. experimental. Así pues, estos diagramas explican los resultados experimentales de forma satisfactoria.



**Figura III.37.** Potencial total de interacción para el complejo en presencia de  $\text{NaClO}_4$  a pH 3.4.

Cuando la estabilidad coloidal de este complejo se estudió a pH 6.2 se obtuvieron los siguientes resultados.



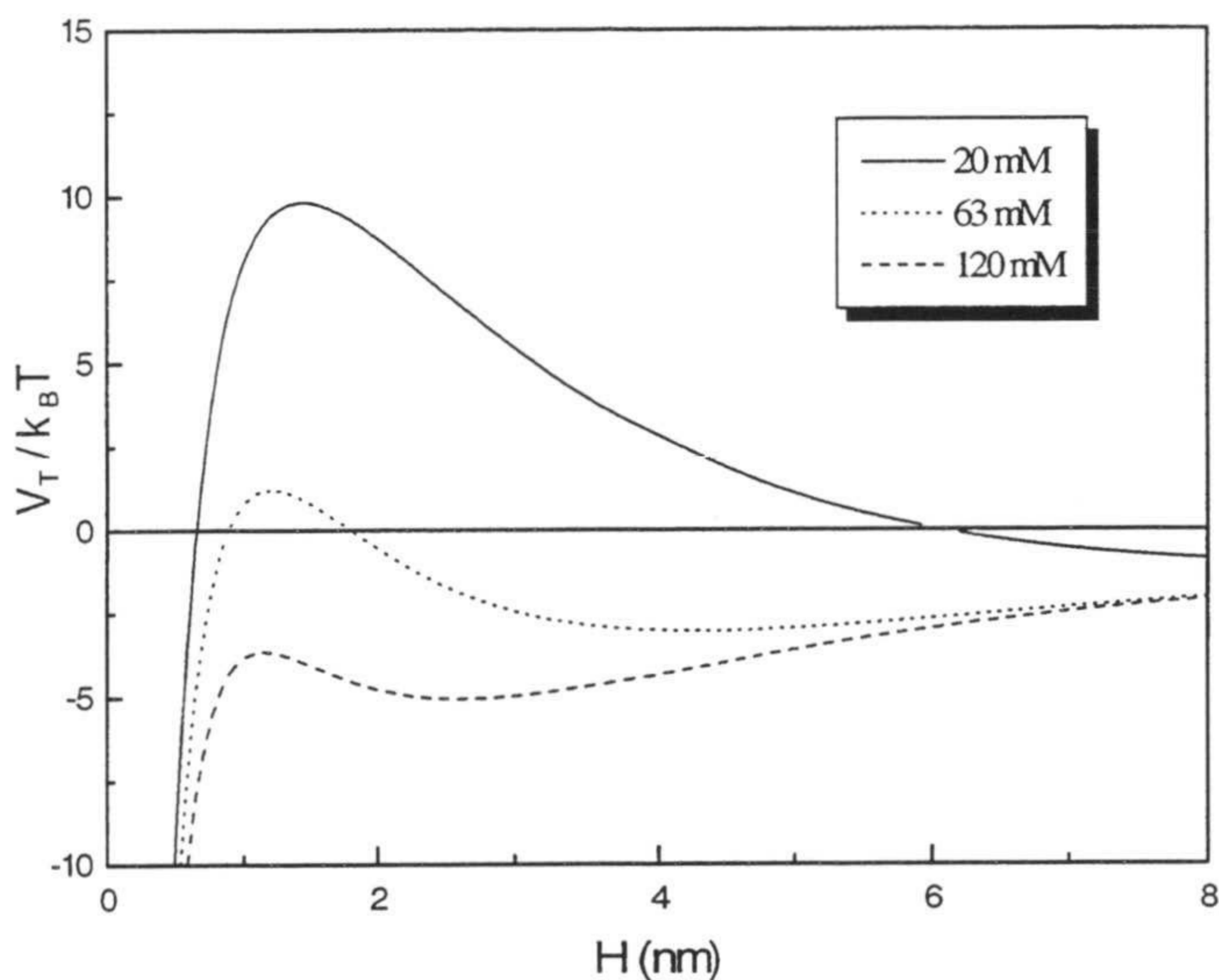
**Figura III.38.** Estabilidad coloidal del complejo  $\text{S4CS9-F(ab')}_2$  con  $2.8 \text{ mg/m}^2$  a pH 6.2 en función de la concentración de electrolito.

Los comentarios pertinentes relativos a la zona no-DLVO ya se han incluido en el apartado 7. Centrándonos en la zona DLVO hay que tener en cuenta que a este pH la

densidad de carga del complejo es negativa por lo que el sodio es el contraión. La estabilidad en la zona DLVO coincide para las tres sales al ser el contraión el mismo.

El ajuste realizado considerando el tamaño del sodio sin hidratar es más que razonable habiéndose obtenido un valor de  $A=0.75 \times 10^{-20}$  J y  $\psi_d = -17.3$  mV. Este valor de la constante de Hamaker es similar a los obtenidos a pH 3.4 para los dos aniones que supuestamente no se adsorbían específicamente sobre la proteína ( $\text{Cl}^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ).

El diagrama de potenciales (ver figura III.39) correspondiente a este ajuste presenta para una concentración de electrolito semejante a la c.c.c. experimental de  $63 \pm 5$  mM una barrera de potencial de  $1k_B T$ . Así pues la estabilidad coloidal para este pH queda también explicada por medio de la teoría DLVO.



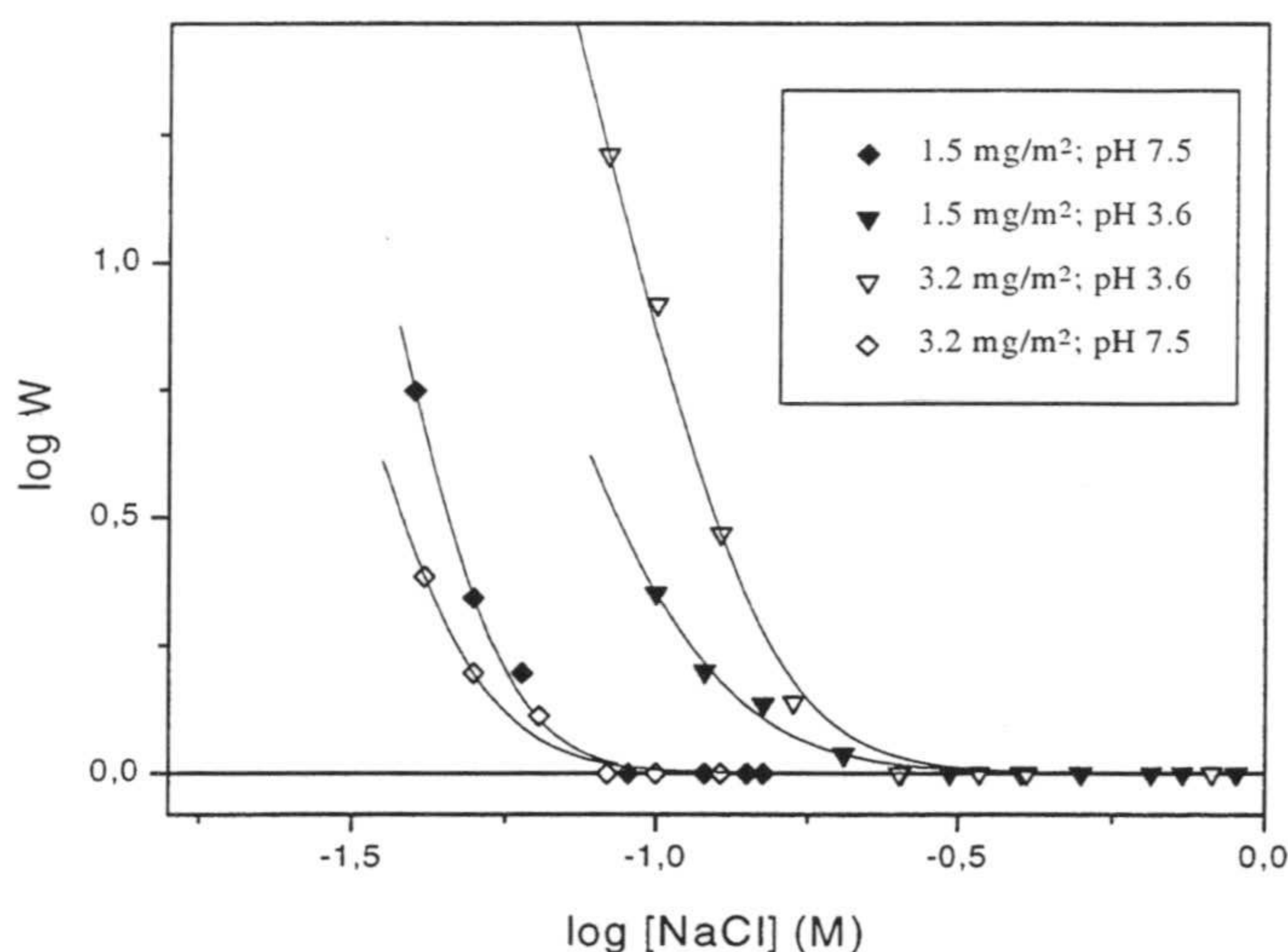
**Figura III.39.** Potencial total de interacción para el complejo a pH 6.2.

Esta teoría ha permitido explicar de forma satisfactoria los resultados obtenidos para la estabilidad del complejo látex- $\text{F(ab}')_2$ , incluyendo la influencia del tamaño del contraión para aniones pequeños que no se adsorben específicamente sobre la proteína.

Si nos fijamos en los valores de la constante de Hamaker obtenida en estos ajustes para el complejo S4CS9- $\text{F(ab}')_2$  ( $0.7-1.2 \times 10^{-20}$  J) podemos concluir que su valor es

superior a la constante de Hamaker de la partícula sin proteína adsorbida ( $0.3 \times 10^{-20}$  J, ver tabla II.6).

En la figura III.8 se representaron los diagramas de estabilidad coloidal de un complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> con 3.2 mg/m<sup>2</sup> (total recubrimiento) en función del pH. Los datos para el pH 3.6 y pH 7.2 han sido comparados en la siguiente figura con los obtenidos para un complejo con 1.5 mg/m<sup>2</sup> (aproximadamente la mitad del recubrimiento total). Como en este apartado estamos interesados en la estabilidad coloidal de los complejos látex-proteína en la zona DLVO, no se han representado en la figura III.40 los factores de estabilidad para la zona no-DLVO.



**Figura III.40.** Estabilidad coloidal de un complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> de 3.2 mg/m<sup>2</sup> y otro de 1.5 mg/m<sup>2</sup> a diferentes pHs.

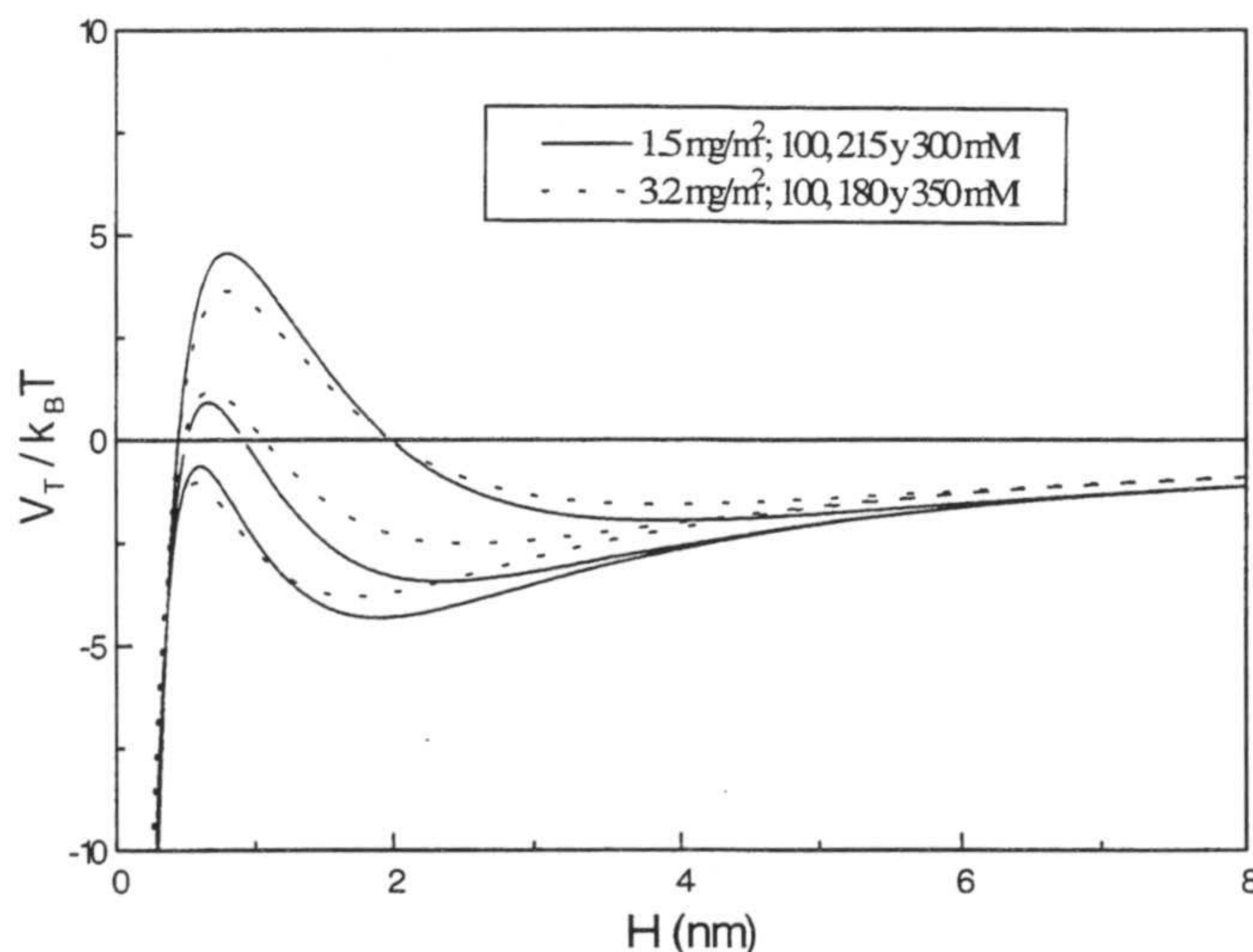
Estos resultados han sido ajustados a la expresión teórica del factor de estabilidad apareciendo, en la siguiente tabla los valores de la constante de Hamaker y del potencial eléctrico difuso obtenidos. En todos los casos los ajustes fueron aceptables y en ellos se empleó el radio sin hidratar del Cl<sup>-</sup> para los datos de pH 3.4 y del Na<sup>+</sup> para pH 7.5. Los datos correspondientes al pH 5.4 no han podido ser ajustados debido a la imposibilidad de obtener suficientes puntos experimentales, por ello no se muestran en la figura.

Analizando los valores de potencial difuso y de la constante de Hamaker obtenidos no se puede extraer una conclusión definitiva sobre la influencia ni del pH ni del recubrimiento.

**Tabla III.12** Potencial eléctrico y constante de Hamaker obtenidos utilizando la teoría DLVO para dos complejos a distintos pHs.

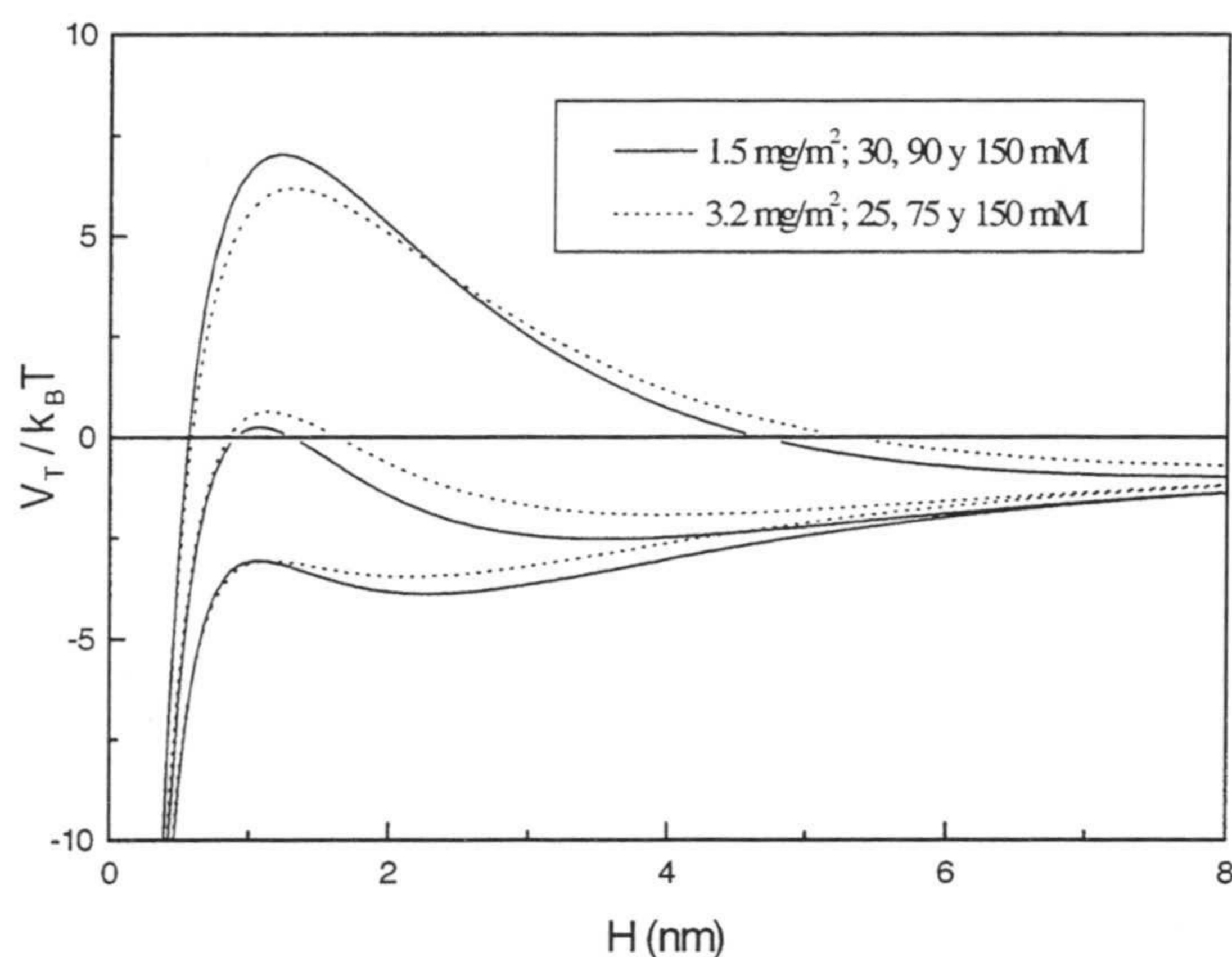
pH	1.5 mg/m <sup>2</sup>			3.2 mg/m <sup>2</sup>		
	c.c.c. (mM)	Ax10 <sup>20</sup> (J)	ψ <sub>d</sub> (mV)	c.c.c. (mM)	Ax10 <sup>20</sup> (J)	ψ <sub>d</sub> (mV)
3.6	213±12	0.67	17.5	180±10	0.65	17.6
5.4	40±4	---	---	41±4	---	---
7.2	88±8	0.82	-18.2	74±7	0.69	-16.3

Lo que si parecé claro es que la constante de Hamaker es mayor cuando la partícula presenta proteína adsorbida en su superficie que cuando no hay adsorción. Un valor medio de constante de Hamaker de  $0.77 \times 10^{-20}$  J para un complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> puede proponerse a partir de estos datos así como de los presentados en la tabla III.11. A partir de los datos de la tabla III.12 se han obtenido los siguientes diagramas de potencial.



**Figura III.41.** Potencial total de interacción para los dos complejos a pH 3.4.

La estabilidad coloidal de ambos complejos, tanto para el pH ácido como para el neutro, queda explicada con estos diagramas de potencial de interacción ya que la *c.c.c.* teórica coincide con la experimental.



**Figura III.42.** Potencial total de interacción para los dos complejos a pH 7.2.

La teoría DLVO ha permitido explicar de forma aceptable la estabilidad de todos los complejos S4CS9- $F(ab')_2$  estudiados hasta ahora. Sin embargo nos surge en este momento la siguiente cuestión: ¿tienen validez los valores de constante de Hamaker y potencial difuso que se obtienen de los ajustes?.

En el capítulo II se obtuvo que la *c.c.c.* del látex S4CS9 es constante para pHs superiores a 6, valiendo 400 mM, y bajando hasta 280 mM a pH 4. Teniendo esto en cuenta y fijándonos en la gráfica III.40 se puede observar un hecho ya comentado al comienzo de este capítulo: *al adsorberse la proteína  $F(ab')_2$  la estabilidad del coloide descende bruscamente*, tal y como muestran los valores de la *c.c.c.* para total y medio recubrimiento. Este descenso en la estabilidad depende tanto del recubrimiento como del pH. La *c.c.c.* decrece un 80% a pH 7.2 y tan sólo un 30% a pH 3.6.

Para encontrar posibles explicaciones a este descenso de la estabilidad de un coloide al adsorber proteína así como su dependencia con el pH es necesario abordar el problema desde el principio. Partiendo de la expresión del potencial atractivo de van



der Waals empleado hasta ahora, éste fue desarrollado para partículas sin polímero en su superficie y por tanto dependiente tan sólo de la constante de Hamaker del material que constituye el coloide. Cuando se adsorbe un polímero sobre la partícula la interacción atractiva de van der Waals debe depender de la constante de Hamaker del polímero y de la cantidad adsorbida.

La búsqueda de un potencial más adecuado para nuestro sistema comienza por utilizar como constante efectiva de Hamaker la de la proteína, ya que ésta constituye la capa superficial de la partícula. El valor de esta constante para la interacción proteína-agua-proteína ( $A_{pap}$ ) viene dado por la ecuación II.39. El problema es que para ello se necesitan los datos espectroscópicos de la proteína que no se pueden obtener fácilmente de forma experimental. No obstante existe otra forma de calcular un valor aproximado de  $A_{pap}$  si se conoce la constante de Hamaker en el vacío para la interacción agua-agua ( $A_{aa}$ ) y proteína-proteína ( $A_{pp}$ ) (*Vincent, 1973; Israelachvili, 1991*):

$$A_{pap} \approx A_{pp} + A_{aa} - 2A_{pa} \approx (\sqrt{A_{pp}} - \sqrt{A_{aa}})^2 \quad (\text{III.5})$$

El valor de  $A_{aa}$  que aparece en la bibliografía es  $3.7 \times 10^{-20}$  J (*van Oss, 1994*) no habiéndose encontrado valor alguno para la proteína F(ab')<sub>2</sub>. Aplicando el formalismo termodinámico propuesto por van Oss (*van Oss et al., 1988a; 1989a; 1993; Wu et al., 1994*), y empleado por numerosos autores (*Lloyd, 1994; Butkus et al., 1998*), se ha podido obtener un valor de  $A_{pp}$  para la F(ab')<sub>2</sub>.

Según este formalismo la tensión superficial se puede expresar como suma de una componente apolar (LW) y otra polar (AB) independientes (*Fowkes, 1983; van Oss et al., 1987*):

$$\gamma_i = \gamma_i^{LW} + \gamma_i^{AB} \quad (\text{III.6})$$

Lo que implica que la energía de interacción entre dos materiales 1 y 2 vale:

$$\Delta G_{12} = \Delta G_{12}^{LW} + \Delta G_{12}^{AB} \quad (\text{III.7})$$

La relación entre cada energía de interacción y su correspondiente tensión superficial es:

$$\Delta G_{12}^{LW} = -2\sqrt{\gamma_1^{LW} \gamma_2^{LW}} \quad (\text{III.8})$$

$$\Delta G_{12}^{AB} = -2\left(\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} + \sqrt{\gamma_2^- \gamma_1^+}\right) \quad (\text{III.9})$$

Donde el signo positivo indica el parámetro electrón-aceptor de la componente polar y el signo menos corresponde al parámetro electrón-donor.

Si esta consideración la incluimos en la conocida ecuación de Young-Dupré (Dupré, 1869) que nos relaciona la energía de interacción entre un sólido (S) y un líquido (L) con el ángulo de contacto ( $\theta$ ) y la tensión superficial del líquido ( $\gamma_L$ ), se obtiene:

$$-\Delta G_{SL} = (1 + \cos \theta) \gamma_L = -\Delta G_{SL}^{LW} - \Delta G_{SL}^{AB} \quad (\text{III.10})$$

Combinando las ecuaciones III.7, III.8, III.9 y III.10 se obtiene:

$$(1 + \cos \theta) \gamma_L = 2(\gamma_L^{LW} \gamma_S^{LW})^{1/2} + 2(\gamma_L^+ \gamma_S^-)^{1/2} + 2(\gamma_L^- \gamma_S^+)^{1/2} \quad (\text{III.11})$$

Si el líquido es apolar, su tensión superficial sólo tiene componente de van der Waals ( $\gamma_L = \gamma_L^{LW}$ ) con lo que la ecuación III.11 queda:

$$(1 + \cos \theta) = 2(\gamma_S^{LW} / \gamma_L^{LW})^{1/2} \quad (\text{III.12})$$

Este método ha sido ampliamente utilizado para calcular la componente apolar de numerosas sustancias entre las cuales podemos encontrar proteínas (van Oss et al., 1985a; 1986a; 1988b; 1989b), polisacáridos, DNA y RNA (van Oss, 1994), partículas de mica (Yoon et al., 1996), minerales (Skvarla, 1992).

Por otra parte existe una relación entre la componente apolar de la tensión superficial de un material y su constante de Hamaker:

$$\gamma_i^{LW} = \frac{A_{ii}}{24\pi l_0^2} \quad (\text{III.13})$$

donde  $l_0 = 0.157 \pm 0.009$  nm (Hough et al., 1980; van Oss, 1994).

Así pues midiendo el ángulo de contacto de un líquido apolar sobre una película de F(ab')<sub>2</sub> se puede obtener un valor aproximado para  $A_{pp}$ . El líquido que hemos empleado ha sido el  $\alpha$ -bromonaftaleno cuyo valor de  $\gamma_L^{LW}$  es 44.4 mJ/m<sup>2</sup>. La película de proteína se ha preparado añadiendo una disolución concentrada de F(ab')<sub>2</sub> sobre un portaobjetos y dejando secar a temperatura ambiente (van Oss et al., 1986b). De esta forma se prepararon tres películas diferentes. La superficie del portaobjetos era limpiada previamente según el siguiente protocolo (Ortega-Vinuesa et al., 1998b):

i) se introducían en una mezcla de 15 ml de H<sub>2</sub>O, 3 ml de NH<sub>3</sub> y 3 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 minutos a 80°C; ii) se lavaban con agua desionizada y iii) se volvían a introducir en una mezcla de 18 ml de H<sub>2</sub>O, 3 ml de HCl y 3 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 minutos a 80°C. Estas disoluciones se prepararon justo antes de utilizarlas. Se depositaron 20 gotas de  $\alpha$ -bromonaftaleno sobre las tres películas obteniéndose un valor medio para el ángulo de contacto de 13.8°. Aplicando la ecuación III.12 se obtuvo un valor para  $\gamma_s^{LW}$  de 43.4 mJ/m<sup>2</sup>. Este valor es comparable con el encontrado en la bibliografía para otras proteínas (*van Oss, 1994*): HSA 44 mJ/m<sup>2</sup>, lisozima 41.2 mJ/m<sup>2</sup> ó IgG 42 mJ/m<sup>2</sup>. Introduciendo el valor de la tensión superficial de la F(ab')<sub>2</sub> en la ecuación III.13 se obtiene que la constante de Hamaker para la interacción proteína-proteína en el vacío ( $A_{pp}$ ) es  $8 \times 10^{-20}$  J.

Con este dato se ha obtenido un valor de  $A_{pap}$  según la ecuación III.5 de  $0.82 \times 10^{-20}$  J. Este valor de la constante de Hamaker está próxima, sobre todo teniendo en cuenta la multitud de aproximaciones empleadas, al valor medio de  $0.77 \times 10^{-20}$  J obtenido por los ajustes de la estabilidad coloidal de los complejos con la teoría clásica DLVO. Este incremento en la constante de Hamaker de la interacción atractiva (recordemos que la del poliestireno era de  $0.3 \times 10^{-20}$  J, según capítulo II) podría explicar, en parte, el descenso en la estabilidad de las partículas de poliestireno al adsorberse la proteína en su superficie.

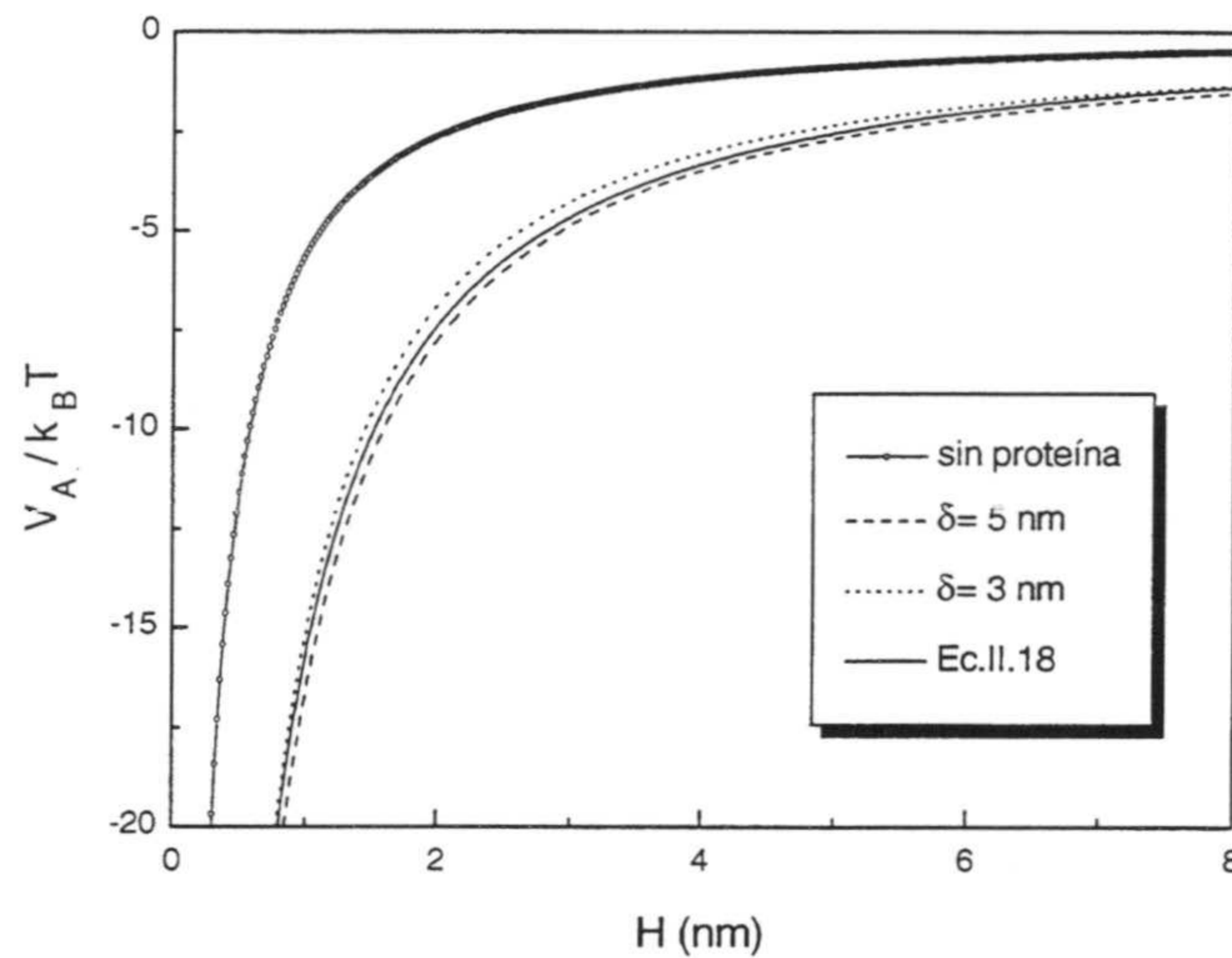
Ahora bien, este planteamiento es correcto para el caso de un complejo con recubrimiento total. Si existen zonas superficiales en la partícula sin proteína, tanto la constante de Hamaker del poliestireno como la de la F(ab')<sub>2</sub>, así como el grado de recubrimiento, deben influir en  $V_A$ .

La siguiente expresión para el potencial atractivo de van der Waals entre dos partículas esféricas recubiertas con una capa de polímero fue propuesta por Mathai y Ottewill (*Mathai et al., 1966*), siguiendo los trabajos de Vold (*Vold, 1961*):

$$V_A = -\frac{1}{12} \left[ \begin{aligned} & \left( \sqrt{A_{aa}} - \sqrt{A_{pp}} \right)^2 \frac{a + \delta}{H} + \left( \sqrt{A_{pp}} - \sqrt{A_{ll}} \right)^2 \frac{a}{H + 2\delta} + \\ & + 4 \left( \sqrt{A_{aa}} - \sqrt{A_{pp}} \right) \left( \sqrt{A_{pp}} - \sqrt{A_{ll}} \right) \frac{a + \delta}{(H + \delta) \left( 2 + \frac{\delta}{a} \right)} \end{aligned} \right] \quad \text{(III.14)}$$

donde  $A_H$  es la constante de Hamaker para la interacción poliestireno-poliestireno en el vacío y  $\delta$  es el espesor de la capa de polímero que se supone no-iónico.

En la siguiente figura se han representado todos los posibles potenciales atractivos vistos hasta ahora: i) utilizar la expresión clásica (II.18) suponiendo que no hay proteína sobre la partícula ( $A=0.3 \times 10^{-20}$  J); ii) utilizar la expresión clásica (II.18) para un complejo con  $A=0.8 \times 10^{-20}$  J; iii) emplear la expresión III.14 para diferentes espesores de la capa de proteína y con los valores de las constantes de Hamaker indicados con anterioridad.

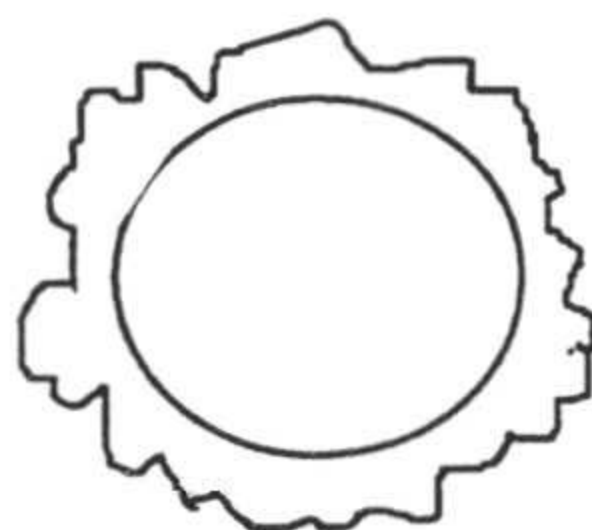


**Figura III.43.** Potencial atractivo con proteína a diferentes espesores y sin proteína.

En primer lugar indicar que el potencial atractivo para la partícula sin proteína es inferior (en valor absoluto) al del complejo para cualquier espesor de la capa de proteína. En consecuencia la estabilidad coloidal del coloide disminuye al adsorber la proteína. Por otra parte, las diferencias son mínimas al emplear la ecuación III.14 ó la clásica II.18 con una constante de Hamaker igual a la de la proteína ( $0.8 \times 10^{-20}$ ). Tal y como era de esperar estas diferencias son despreciables cuando el espesor  $\delta$  es de 5 nm, que recordemos correspondía al completo recubrimiento. De igual forma la influencia del espesor de la capa de proteína adsorbida, que está relacionada con el recubrimiento, sobre  $V_A$  no es determinante decreciendo ligeramente el potencial atractivo al disminuir el espesor.

Este resultado permite explicar los valores de las *c.c.c.* obtenidas para los complejos de 3.23 mg/m<sup>2</sup> y 1.5 mg/m<sup>2</sup> (tabla III.12) si se tiene en cuenta que el valor del potencial difuso  $\psi_a$  está relacionado con la pendiente de la curva  $\log W$  frente al  $\log$  concentración de electrolito mientras que la constante de Hamaker está conectada directamente con el valor de la *c.c.c.* (Fernández *et al.*, 1994). En la tabla III.12 se puede observar que la *c.c.c.* es prácticamente independiente del recubrimiento, y en todo caso aumentando ligeramente al disminuir el recubrimiento.

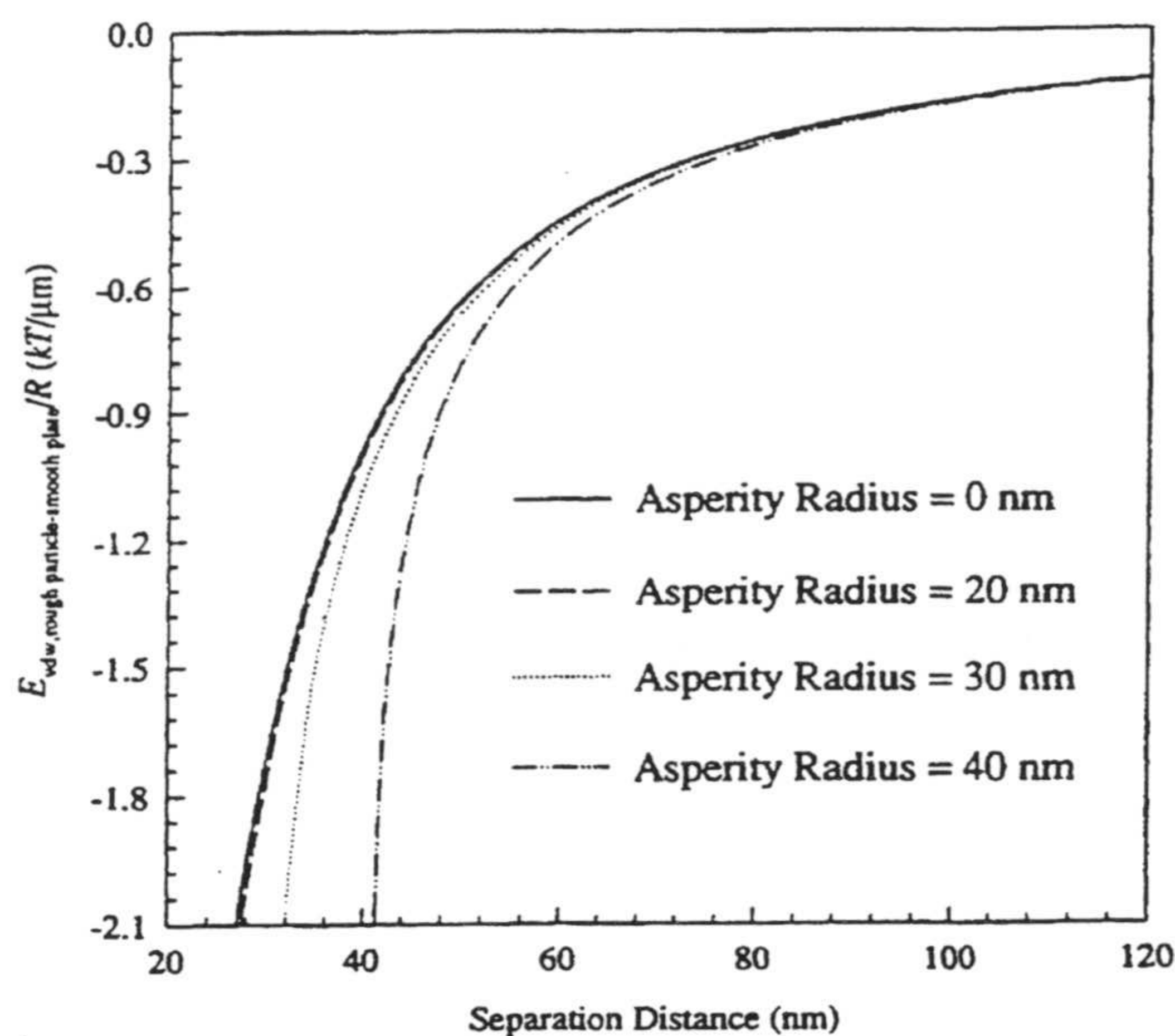
Otro aspecto a considerar es que la superficie del complejo es heterogénea especialmente a recubrimientos bajos. Existen “valles” (ausencia de proteína) y “picos” (proteína adsorbida) que originan rugosidad y cuya influencia sobre la estabilidad coloidal hay que examinar. Este tema es muy actual, habiendo sido abordado por la física de los coloides durante la presente década de los 90. El siguiente dibujo nos da una idea esquemática de estas rugosidades superficiales.



**Figura II.44.** Esquematización de las rugosidades superficiales.

Herman y Papadopoulos (Herman *et al.*, 1990; 1991) calcularon la energía de interacción electrostática y de van der Waals entre dos superficies planas paralelas donde una de ellas presentaba “asperezas”, distinguiendo entre asperezas positivas (cavidades o huecos) y asperezas negativas (salientes). En estos trabajos, después de numerosas aproximaciones, se concluye que tanto las fuerzas atractivas de van der Waals como las repulsivas electrostáticas aumentan con el tamaño de las asperezas positivas y disminuyen con el tamaño de las asperezas negativas. Por su parte, Suresh y Walz (Suresh *et al.*, 1996; 1998) han desarrollado expresiones analíticas para el potencial atractivo de interacción entre una esfera rugosa y una superficie plana sin rugosidad. Para ello han modelado las rugosidades como asperezas semiesféricas distribuidas de forma uniforme por la partícula. En la figura III.45 se muestra la influencia del tamaño de las rugosidades sobre el potencial atractivo.

La existencia de rugosidad provoca un aumento del potencial atractivo en función del tamaño de dicha rugosidad. Además, este efecto es insignificante cuando la distancia de separación entre las superficies es mayor al tamaño de la aspereza. Estos autores también estudiaron el potencial total de interacción en función del tamaño de las asperezas obteniendo que las rugosidades provocan un descenso en la profundidad del mínimo secundario así como un aumento de la distancia donde este mínimo aparece. El mayor efecto de las rugosidades se produce sin embargo en la altura de la barrera de potencial que se reduce bruscamente (dos órdenes de magnitud) aún considerando asperezas pequeñas.

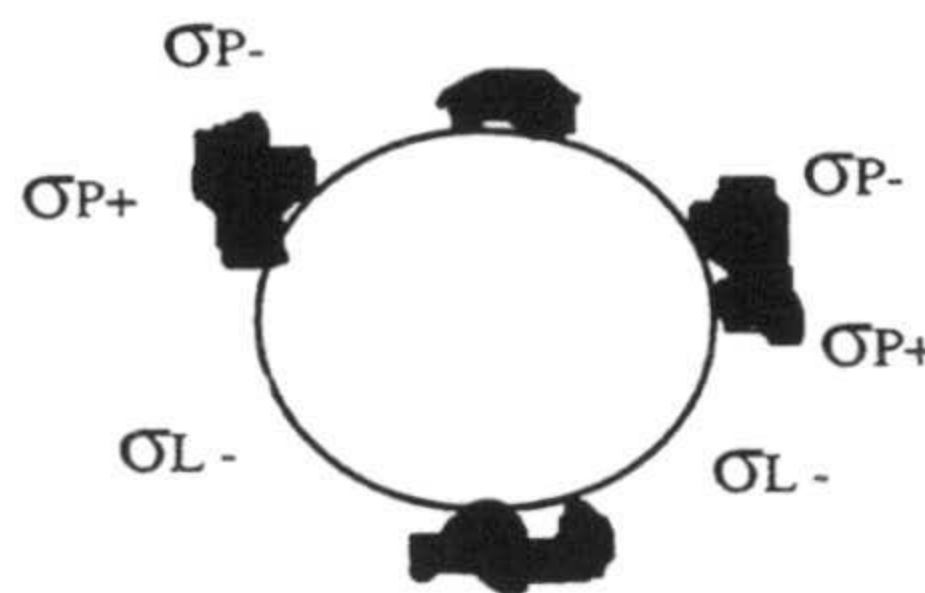


**Figura III.45.** Efecto de la altura de las asperezas superficiales sobre la interacción de van der Waals entre una esfera rugosa y una superficie plana lisa (Suresh et al., 1996).

Kihira et al. (Kihira et al., 1992) observaron que la estabilidad de partículas de óxido de cerio, sílica y poliestireno presentaban una estabilidad coloidal inferior a la predicha si la superficie de las mismas no era uniforme. Después de considerar varias posibilidades propusieron que las heterogeneidades en el potencial superficial y las rugosidades superficiales podrían ser las responsables.

Hasta ahora se ha analizado el papel desempeñado por el potencial atractivo de van der Waals en el descenso de la estabilidad coloidal cuando se adsorben proteínas sobre un coloide liofóbico. Pasemos a continuación a ver la influencia del potencial eléctrico.

Una diferencia fundamental que existe entre una partícula sin proteína y otra con proteína adsorbida es que en este último caso el potencial eléctrico (densidad de carga) no es homogéneo. En las zonas donde no hay proteína adsorbida la densidad de carga será negativa ( $\sigma_{L-}$ ) y tendrá un valor diferente a la de las zonas recubiertas con proteína. Ésta última densidad de carga, que puede ser negativa o positiva en función del pH, vendrá dada por la suma de las cargas positivas ( $\sigma_{P+}$ ) y las negativas ( $\sigma_{P-}$ ) que tiene la proteína. Esta distribución de carga en el complejo dependerá del pH y del recubrimiento. El siguiente esquema representa la situación descrita.



**Figura III.46.** Distribución de densidad de carga en un complejo látex-proteína.

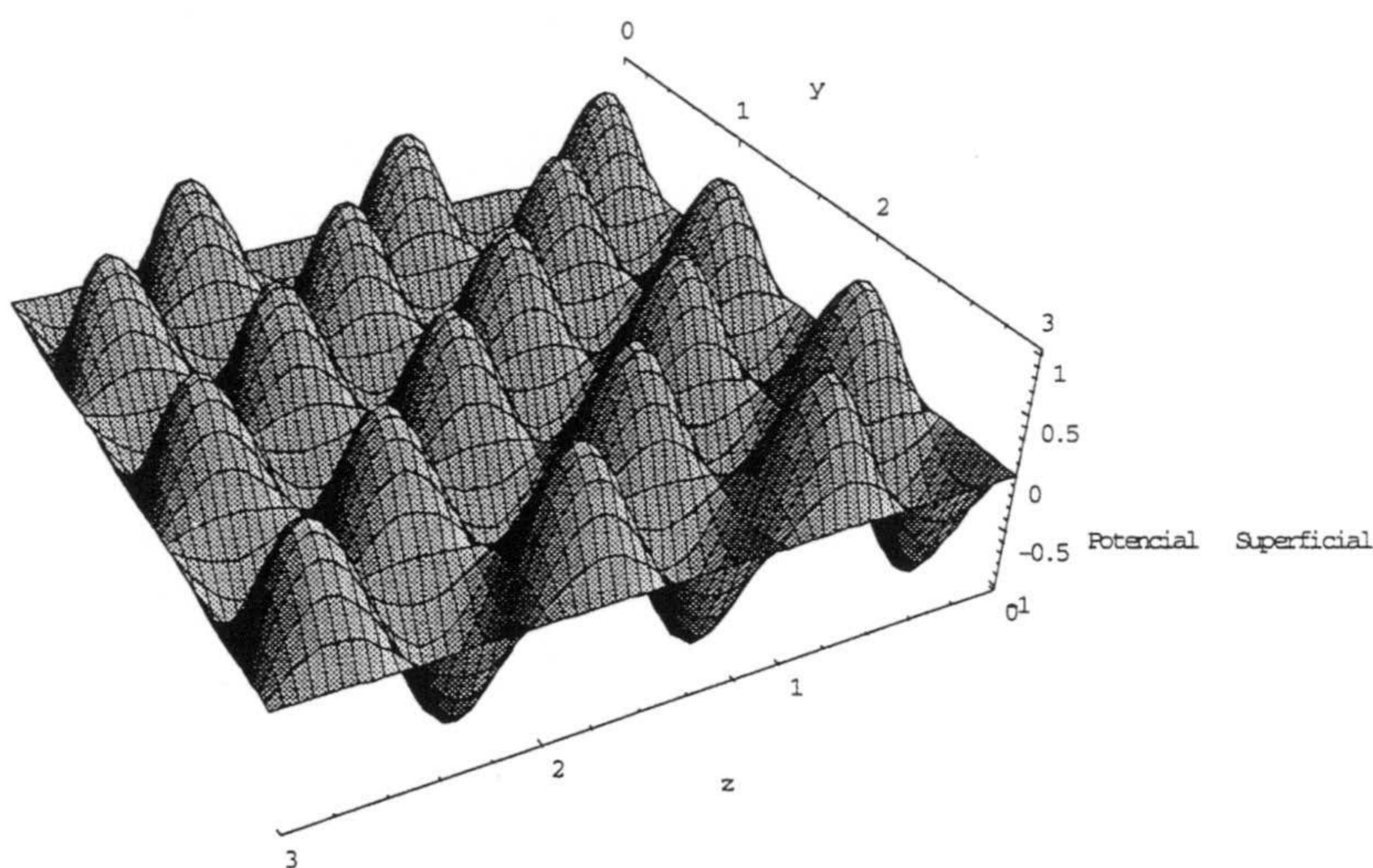
Algunas de las explicaciones empleadas en la bibliografía para explicar las desviaciones entre los experimentos y las predicciones de la teoría DLVO se fundamentan en la existencia de un potencial superficial heterogéneo (*Schuhmann et al., 1987; Kuin, 1990*). Precisamente uno de los trabajos más interesantes que aborda la influencia de la distribución del potencial eléctrico sobre el potencial de interacción es el de Kuin (*Kuin, 1990*) quien supuso que el potencial superficial viene descrito por series de Fourier en dos dimensiones. El potencial eléctrico de interacción que obtuvo es válido para potenciales eléctricos bajos y bajo la condición de potencial eléctrico constante durante la interacción. Como resultado Kuin encontró que dependiendo de las características de la distribución del potencial superficial, la interacción cuando cada superficie tenía cargas positivas y negativas era siempre positiva. Este hecho se

atribuye a la existencia de fuerzas atractivas de origen electrostático entre las regiones de carga positiva y las de carga negativa.

Vreeker (*Vreeker et al., 1992*) ha intentado explicar la estabilidad coloidal de partículas de carbonato de níquel en función de la concentración de electrolito ( $\text{NaNO}_3$ ). La estabilidad de sus partículas era mucho menor a la predicha por la teoría clásica DLVO que supone la existencia de una densidad de carga uniforme. Para ello, basándose en el modelo de Kuin, se ha propuesto un potencial superficial eléctrico que es la suma de un potencial constante más una distribución sinoidal:

$$\Phi(0, y, z) = \Phi_0 + \Phi_1 \operatorname{sen}\left(\frac{2\pi y}{p}\right) \operatorname{sen}\left(\frac{2\pi z}{p}\right) \quad (\text{III.15})$$

siendo  $\Phi_0$  la contribución constante al potencial superficial y  $\Phi_1$  la amplitud de la contribución heterogénea que varía sinusoidalmente en las direcciones  $y$  y  $z$  con un periodo  $p$  (ver figura III.46).



**Figura III.47.** Dependencia del potencial superficial con la posición.

A partir de la expresión III.15 se puede obtener la expresión del potencial eléctrico en la doble capa a una distancia  $x$  de la superficie de la partícula:



$$\Phi(x, y, z) = \Phi_0 \exp(-\kappa x) + \Phi_1 \operatorname{sen}\left(\frac{2\pi y}{p}\right) \operatorname{sen}\left(\frac{2\pi z}{p}\right) \exp(-\Gamma x) \quad (\text{III.16})$$

donde  $\kappa$  es el parámetro de Debye-Hückel y  $\Gamma$  viene dado por la siguiente ecuación:

$$\Gamma = \left( \kappa^2 + \frac{8\pi^2}{p^2} \right)^{1/2} \quad (\text{III.17})$$

Según la ecuación III.16 el potencial eléctrico es la suma de dos términos. El primero describe el potencial eléctrico para una superficie con carga homogénea según el modelo de Gouy-Chapman. La contribución de la heterogeneidad se cuantifica por el segundo término que decae más rápidamente que el primero ( $\Gamma \geq \kappa$ ).

Vreeker (*Vreeker et al., 1992*) obtuvo la expresión del potencial de interacción electrostático a partir de la ecuación III.16. Este potencial depende de las características de la distribución del potencial eléctrico superficial ( $p$  y  $\Phi_1$ ) así como de la orientación relativa de las partículas cuando van a interactuar. El potencial de interacción para la orientación en la que la energía es mínima es:

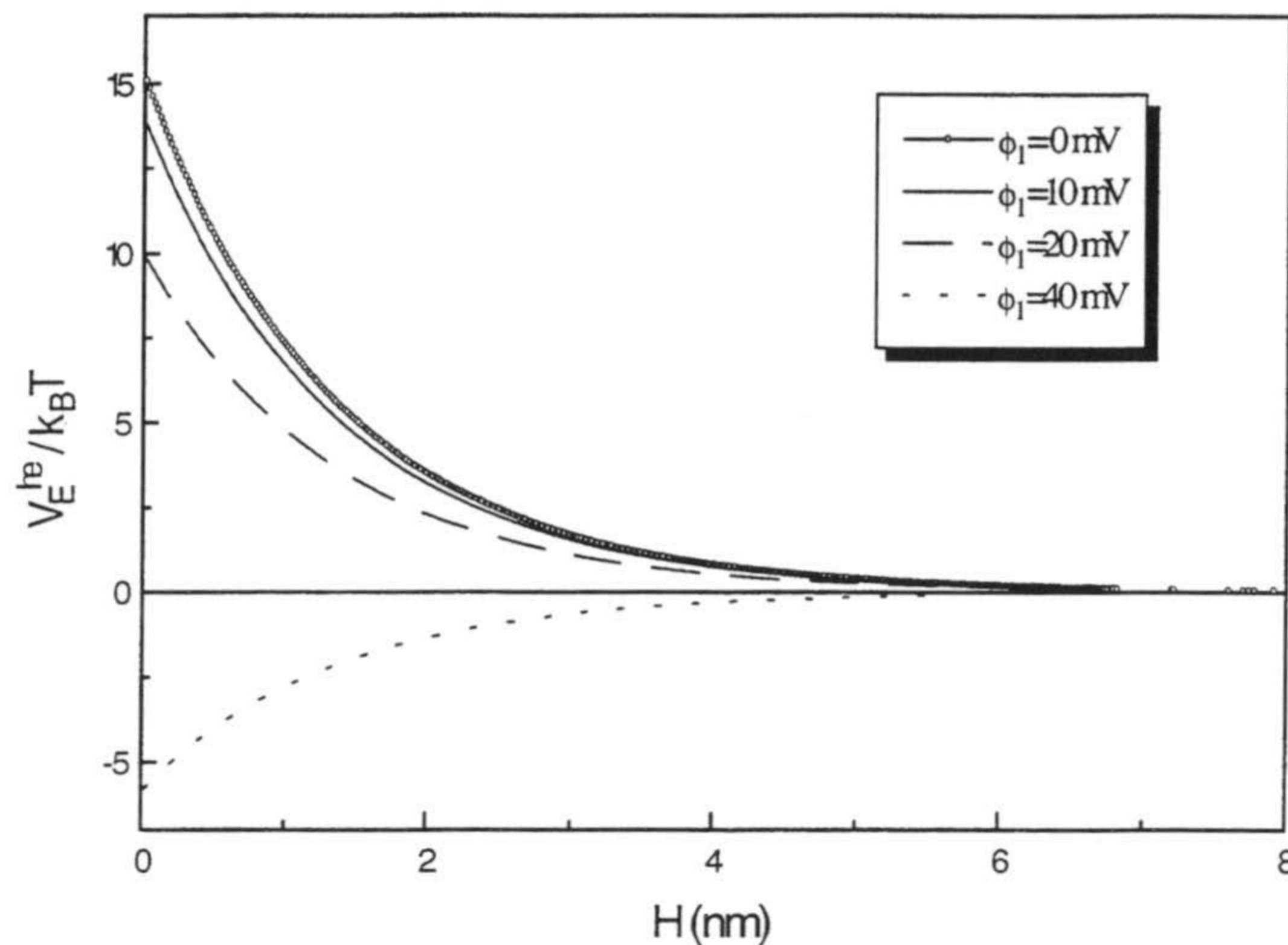
$$V_E^{he} = \pi a \epsilon_0 \epsilon_r \left( \Phi_0^2 \exp(-\kappa H) - 0.25 \Phi_1^2 \exp(-\Gamma H) \right) \quad (\text{III.18})$$

donde  $a$  es el radio de la partícula y  $H$  la distancia entre la superficie de las partículas. Esta orientación se caracteriza porque las zonas de la partícula con  $\Phi < \Phi_0$  están enfrentadas con las de  $\Phi > \Phi_0$ . Evidentemente existen muchas orientaciones posibles para dos partículas que se aproximan entre sí durante el proceso de agregación. Kuin (*Kuin, 1990*) obtuvo un potencial de interacción electrostático promedio considerando todas las orientaciones posibles:

$$\langle V \rangle = V_E^{he} + \frac{3}{2} k_B T \quad (\text{III.19})$$

En la siguiente figura se ha representado el valor de  $V_E^{he}$  para una partícula con un radio de 100 nm, 50 mM NaCl,  $p=50$  nm,  $\Phi_0=17$  mV y diferentes valores de  $\Phi_1$ .

Como se puede comprobar la existencia de una distribución de potencial eléctrico en la partícula provoca un descenso del potencial de interacción electrostático. Este descenso es mayor cuanto mayor es el valor de  $\Phi_1$ .



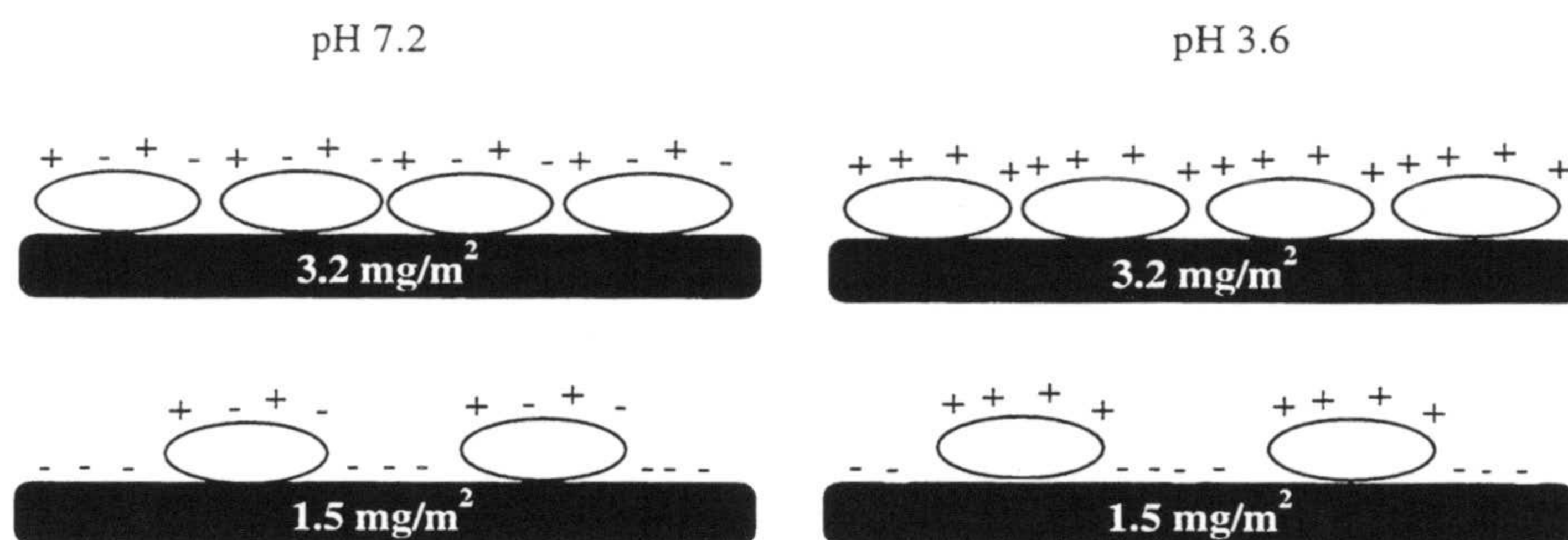
**Figura III.48.** Efecto de la amplitud ( $\Phi_1$ ) de la distribución sinusoidal del potencial eléctrico sobre la interacción electrostática.

Se ha comprobado que el parámetro  $p$  (con valores entre 5 nm y 100 nm) prácticamente no afecta al potencial de interacción electrostático para nuestras partículas coloidales con un diámetro de 200 nm.

Aparte del modelo presentado en esta memoria se pueden encontrar otros en la literatura (Richmond, 1974; 1975; Schuhmann, 1984; Koopal et al., 1989; Grant et al., 1994), presentando todos ellos como punto común el considerar que la distribución de potenciales superficiales es periódica. La conclusión final en todos los casos es la disminución del potencial de repulsión electrostático incluso cuando la densidad de carga neta de las partículas es nula (Walz, 1998).

Fijándonos en la figura III.40 observamos que para pH 7.5, aunque la *c.c.c.* sea prácticamente la misma, la estabilidad coloidal del complejo de 3.2 mg/m<sup>2</sup> es mayor que la del complejo de 1.5 mg/m<sup>2</sup>. Sin embargo, a pH 3.6 el comportamiento es el contrario. La posible explicación a estos resultados puede estar conectada con la energía electrostática de interacción, ya que la pendiente del factor de estabilidad depende fundamentalmente del potencial eléctrico.

Para comprender la explicación que proponemos para estos resultados es interesante esquematizar la situación de la superficie de ambos complejos para los dos pHs.



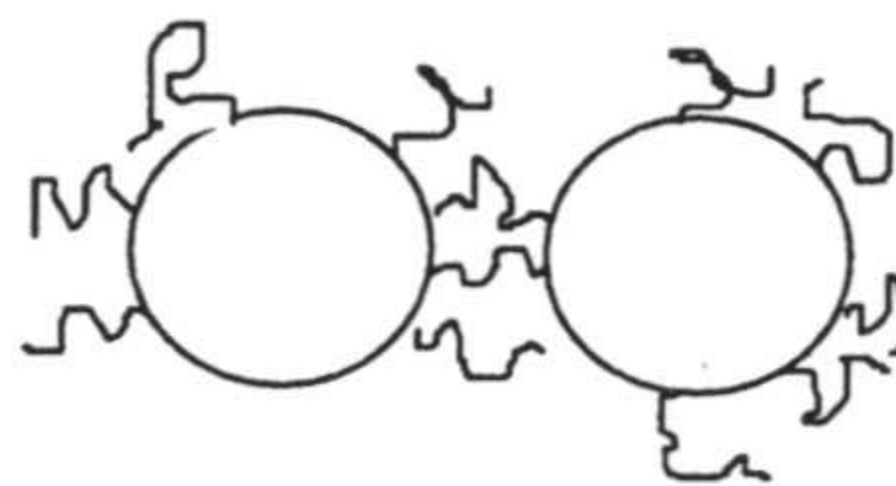
**Figura III.49.** Distribución de cargas eléctricas para un complejo en función del pH y del recubrimiento.

A pH 7.2 la carga neta de la proteína es prácticamente nula ó ligeramente negativa mientras que a pH 3.6 los grupos carboxilo de la proteína están completamente desprotonados con lo que su carga neta es positiva y elevada. Teniendo esto en consideración y según la figura III.49, a pH 7.2 el potencial eléctrico superficial es menor para el complejo de 3.2 mg/m<sup>2</sup> con lo que su estabilidad coloidal también lo será. Experimentalmente se ha obtenido que el potencial zeta a pH 7.2 es de -36 mV para el complejo de 3.2 mg/m<sup>2</sup> y de -39 mV para el de 1.5 mg/m<sup>2</sup>. Por otra parte el potencial repulsivo eléctrico para este complejo de total recubrimiento debe de disminuir debido a que su distribución de potencial eléctrico superficial es importante.

A pH 3.6, sin embargo, la carga neta del complejo de mayor recubrimiento es más grande que el de 1.5 mg/m<sup>2</sup>, suposición comprobada experimentalmente al obtener un potencial zeta de 44 mV para el complejo de 3.2 mg/m<sup>2</sup> y 40 mV para el de 1.5 mg/m<sup>2</sup>. Así pues la estabilidad ahora es mayor para el complejo que tiene más proteína en su superficie. El potencial de repulsión del complejo de 1.5 mg/m<sup>2</sup> se

verá además reducido como consecuencia de la distribución de su potencial eléctrico superficial.

Finalmente indicar que ha de existir otro factor que puede tener un mayor o menor grado de responsabilidad en la baja estabilidad coloidal de los complejos látex-proteína: la floculación por puenteo. Esta floculación se produce cuando interacciona una zona con polímero de una partícula con una región sin polímero de otra partícula. Este polímero se adsorbe sobre la segunda partícula produciéndose un “puenteo” entre ambas partículas (*Lafuma et al., 1991; Berlin et al., 1995*):



**Figura III.50.** Floculación por puenteo.

Este factor favorece la agregación entre partículas de un complejo látex-proteína. Los trabajos pioneros sobre la floculación por puenteo se deben a La Mer et al. (*Smellie et al., 1958; Healy et al., 1962*). Este autor propuso que la velocidad de floculación debe de ser igual al producto de la frecuencia de colisiones entre partículas por un factor de eficacia de la colisión. Este factor ( $E$ ) describe la fracción de colisiones que conduce a la floculación debido al puenteo entre dos partículas, y su valor depende de la fracción de superficie recubierta por el polímero adsorbido ( $\theta$ ):

$$E = \theta (1 - \theta) \quad (\text{III.20})$$

$\theta$  representa la probabilidad de que, en la región de contacto, la superficie de una de las partículas esté recubierta por polímero, mientras que  $(1-\theta)$  describe la probabilidad de que la superficie de la partícula no presente polímero adsorbido. Esta ecuación predice que la máxima eficacia de la floculación por puenteo aparece cuando el recubrimiento es  $1/2$ . Este modelo ha sido posteriormente mejorado al considerar las posibles conformaciones y reorientaciones del polímero, habiéndose predicho la existencia de floculación por puenteo para un amplio intervalo de

recubrimientos,  $0.1 < \theta < 0.9$  (Hogg, 1984; Moudgil et al., 1987; Csempesz et al., 1988; Stoll et al., 1996). Van der Scheer et al. (Van der Scheer et al., 1978) investigó la agregación por puenteo de partículas de poliestireno recubiertas con albúmina de suero humano (HSA) y con fibrinógeno (Fib). En las condiciones óptimas de puenteo encontró que la constante rápida de agregación para el complejo de HSA y para el de Fib eran 1.3 y 1.6 veces superiores a la del látex desnudo.

La contribución de la floculación por puenteo al descenso en la estabilidad coloidal de una partícula de látex recubierta por proteína dependerá del recubrimiento, siendo máxima para valores intermedios.

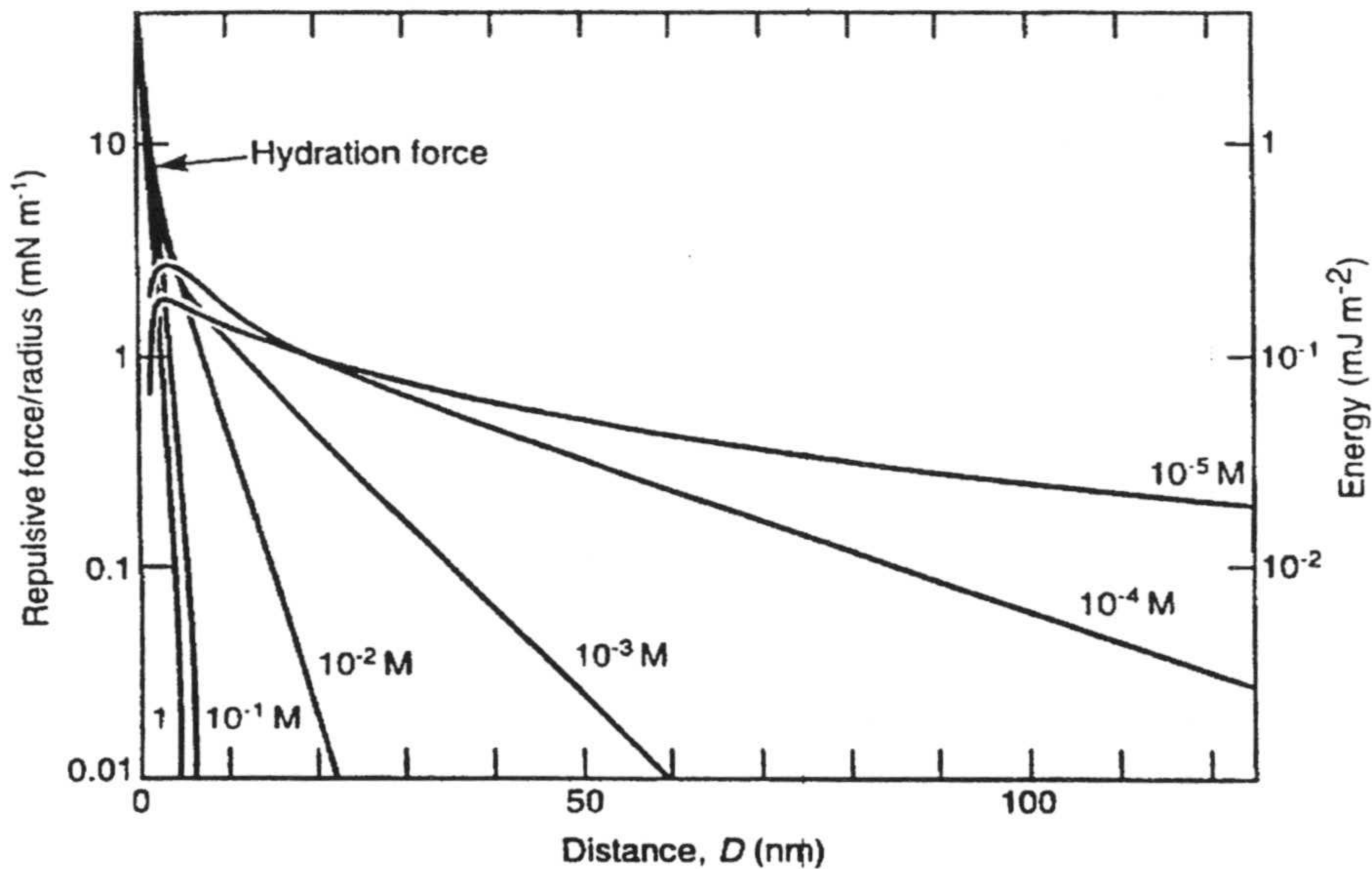
El conjunto formado por todos estos factores estudiados, que guardan una cierta dependencia entre sí, va a determinar la baja estabilidad coloidal de los complejos.

## **15. Descripción teórica de las fuerzas de hidratación: teoría DLVO extendida**

En la bibliografía podemos encontrar numerosos ejemplos de sistemas muy hidrofílicos o muy hidrofóbicos cuya estabilidad coloidal no puede ser explicada por la teoría clásica DLVO (Israelachvili, 1982; Christenson et al., 1988; Xu et al., 1990). En estos sistemas el medio de dispersión no se puede considerar como un continuo, sino que presenta una estructura característica a distancias próximas a la superficie de la partícula (Israelachvili et al., 1984; Derjaguin et al., 1989). Cuando dos partículas que presentan capas estructuradas de agua a su alrededor interaccionan aparece una fuerza. Esta fuerza, llamada estructural o no-DLVO, va a ser repulsiva (fuerzas de hidratación) cuando las dos superficies son hidrofílicas o atractiva cuando son hidrofóbicas. Como se ha ido indicando a lo largo de este capítulo, las fuerzas de hidratación aparecen en coloides cargados en disoluciones salinas por la interacción de las esferas de hidratación de los contraiones adsorbidos sobre las dos superficies que interaccionan (Pashley, 1981b; Thompson et al., 1994).

Las fuerzas estructurales son de corto alcance y su existencia era supuesta desde hace tiempo aunque las dudas no desaparecieron hasta que no se midieron

directamente con los microscopios de fuerzas atómicas (AFM) (Craig, 1997). Pashley, en una serie de trabajos (Pashley, 1981a; 1981b; 1982; 1984a), midió las fuerzas de hidratación entre dos superficies de mica en diferentes condiciones experimentales. La siguiente figura muestra uno de los estudios que realizó este autor en el que se representa la fuerza repulsiva medida a diferentes concentraciones de  $\text{KNO}_3$ . La interacción entre las dos superficies de mica satisface la teoría DLVO a bajas concentraciones de electrolito. Sin embargo a altas concentraciones de sal, según el electrolito presente en la disolución, los cationes hidratados se adsorben a la superficie negativa de la mica y aparece una fuerza repulsiva de corto alcance que aumenta con la concentración de sal. Según este autor, esta fuerza aparece debido a la energía necesaria para deshidratar al catión adsorbido que presumiblemente mantiene parte de su capa de hidratación.



**Figura III.51.** Fuerza de hidratación medida entre dos superficies de mica en presencia de varias concentraciones de  $\text{KNO}_3$ .

Los datos experimentales publicados sobre las fuerzas de hidratación presentan, por lo general, una dependencia exponencial con la distancia de separación entre dos superficies planas ( $H$ ) según la siguiente expresión (Marcelja et al., 1976; Israelachvili

*et al.*, 1978; *Pashley*, 1982; *Derjaguin et al.*, 1982; *Parsegian*, 1982; *Leikin et al.*, 1993):

$$P(H) = P_0 \exp(-H / \lambda) \quad (\text{III.21})$$

En el caso de fuerzas hidrofóbicas el valor de  $P_0$  es negativo, siendo positivo para las fuerzas de hidratación. La atracción hidrofóbica es importante cuando el ángulo de contacto de avance es superior o igual a  $64^\circ$  (*Israelachvili et al.*, 1984) mientras que la repulsión hidrofílica hay que considerarla para ángulos inferiores a  $15^\circ$  (*Churaev*, 1987). La existencia de estas fuerzas estructurales provoca desviaciones del comportamiento predicho por la teoría DLVO con lo que la región de aplicabilidad de esta teoría es la comprendida entre  $15^\circ$  y  $64^\circ$ .

Para las fuerzas de hidratación el valor de la constante de decaimiento  $\lambda$  oscila entre 0.2 nm y 1.1 nm para electrolito 1:1 y no varía de forma significativa con la fuerza iónica (*van Oss*, 1993). El valor de  $\lambda$  depende de la hidratación del catión (*Salou et al.*, 1998). La constante de hidratación  $P_0$  depende de la hidratación de la superficie (*Israelachvili*, 1991) y ha sido determinada experimentalmente para diferentes materiales teniendo un valor entre  $10^6$ - $5 \times 10^8$  N/m<sup>2</sup> (*Thompson et al.*, 1994).

Algunas investigaciones han mostrado que las fuerzas de hidratación aumentan con la concentración de electrolito para rutilo (*Yotsumoto et al.*, 1993a) y para mica (*Pashley et al.*, 1984b) mientras que disminuyen para la sílica (*Yotsumoto et al.*, 1993b; *Chapel*, 1994). Dependiendo de cómo los iones presentes en la dispersión afecten a la estructura del agua que rodea a las partículas (destruyéndola o bien aumentándola), un incremento en la concentración iónica provocará una disminución o un aumento de las fuerzas de hidratación (*Derjaguin et al.*, 1989). En cualquier caso estas fuerzas dependen fuertemente del tipo de electrolito presente en la disolución siendo más fuertes cuanto mayor es la energía de hidratación del catión.

Lejos de este desarrollo tan rápido en el conocimiento de las fuerzas de hidratación acontecido tras el uso del microscopio de fuerzas atómicas, la teoría sobre estas fuerzas está en sus comienzos.

Los primeros trabajos teóricos sobre las fuerzas de hidratación fueron desarrollados por *Marcelja* y *Radic* quienes propusieron una teoría mesoscópica (*Marcelja et al.*, 1976; *Gruen et al.*, 1981; 1982; 1983) en la que se relaciona  $P_0$  con el estado de orden

de los dipolos del agua y  $\lambda$  con el decaimiento de la polarización. Después de esta teoría han aparecido otras fundamentadas en mecanismos moleculares en los que se considera la polarización del disolvente y la carga imagen (*Belaya et al., 1986; Leikin et al., 1990; Besseling, 1997*).

Recientemente Basu y col. (*Basu et al., 1994*) han encontrado que las fuerzas de hidratación pueden ser explicadas en parte si se considera en la ecuación de Poisson-Boltzmann el descenso en la constante dieléctrica de la doble capa al aumentar la concentración de electrolito. Este descenso en la constante dieléctrica provoca un aumento de la energía libre de hidratación de los iones de la doble capa los cuales se repelen surgiendo una fuerza repulsiva. Esta fuerza varía exponencialmente con la distancia de separación entre las superficies. Su valor aumenta rápidamente a partir de una concentración dada de electrolito y depende de la energía de hidratación del catión. Este trabajo ha sido posteriormente mejorado por Paunov y col. (*Paunov et al., 1996*) al considerar el tamaño de los iones.

En un intento de justificar teóricamente la estabilidad anómala que presentan los complejos látex-proteína hemos incluido las fuerzas de hidratación en la teoría clásica DLVO. A partir de la ecuación III.20, que corresponde a las fuerzas de hidratación para dos superficies planas, y usando la aproximación de Derjaguin (*Derjaguin, 1934*) se puede obtener la siguiente expresión para el potencial de interacción debido a las fuerzas de hidratación entre dos esferas de radio  $a$ :

$$V_h(H) = \pi a \int_H^\infty \int_H^\infty P_0 \exp(-H/\lambda) d^2H = \pi a P_0 \lambda^2 \exp(-H/\lambda) \quad (\text{III.22})$$

Para considerar la influencia de la concentración de electrolito sobre la estabilidad de los complejos en la zona no-DLVO hemos supuesto, como aproximación inicial, que las fuerzas de hidratación dependen linealmente con la concentración de electrolito:

$$V_h(H) = \pi a (N_A C_h c_e) \lambda^2 \exp(-H/\lambda) \quad (\text{III.23})$$

donde  $c_e$  es la concentración de electrolito en mM,  $N_A$  el número de Avogadro y  $C_h$  una constante de proporcionalidad llamada constante de hidratación.

Para concentraciones de electrolito inferiores a la c.s.c. la contribución de las fuerzas de hidratación al potencial total de interacción se puede suponer que es despreciable ya que estas fuerzas tienen un alcance más corto que las electrostáticas.

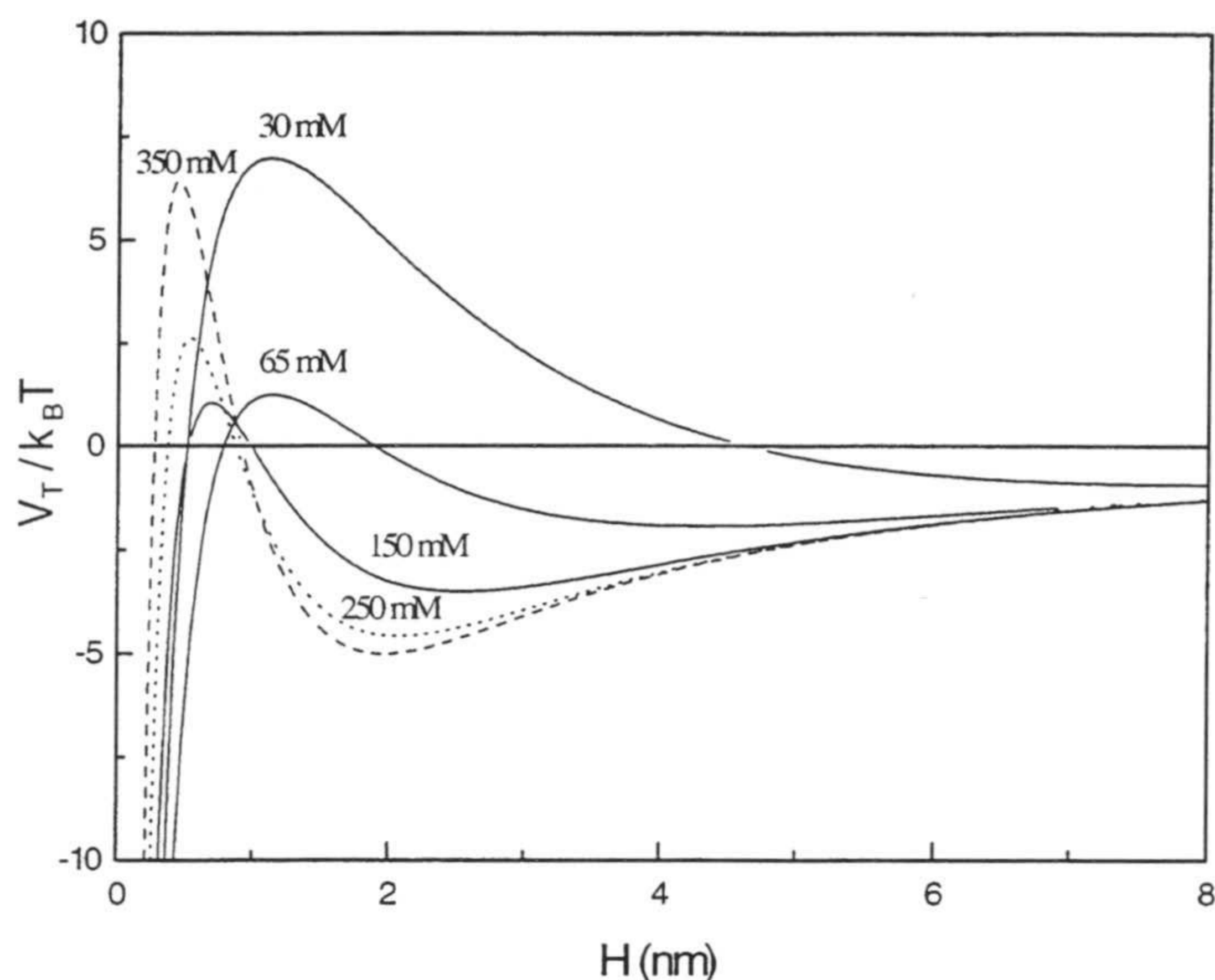


Las fuerzas de hidratación comienzan a ser efectivas a distancias inferiores a 0.5-0.7 nm (*Basu et al., 1994*). En los estudios experimentales sobre la estabilidad coloidal de los complejos látex-proteína descritos a lo largo de este capítulo se puede observar que los valores de *c.s.c.* suelen ser de unos 120 mM de NaCl. Para esta concentración la estabilización atribuida a las fuerzas de hidratación comienza a ser efectiva. La extensión de la doble capa eléctrica (longitud de Debye) para 140 mM de NaCl es de 0.8 nm, que es mayor que la distancia de efectividad de las fuerzas de hidratación. Por lo tanto se puede suponer que la estabilidad del complejo para concentraciones de electrolito inferiores a la *c.s.c.* viene dada por la teoría clásica DLVO, en la que el potencial total de interacción es la suma del potencial atractivo de van der Waals ( $V_A$ ) y el repulsivo electrostático ( $V_E$ ). Para concentraciones superiores a la *c.s.c.* vamos a usar la teoría DLVO extendida con el potencial de hidratación:

$$V_T = V_A + V_E + V_h \quad (\text{III.24})$$

En la figura III.38 se representaron los diagramas de estabilidad de un complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> con 2.8 mg/m<sup>2</sup> a pH 6.2 usando tres electrolitos diferentes para provocar la agregación. Para los tres casos se obtuvo un valor de 63±5 mM para la *c.c.c.* y de 150±10 mM para la *c.s.c.* Estos datos, que se pueden considerar como representativos de la estabilidad de los complejos látex-F(ab')<sub>2</sub>, fueron ajustados en su zona DLVO obteniendo  $A=0.75 \times 10^{-20}$  J y  $\psi_d=-17.3$  mV. Usando estos valores de constante de Hamaker y de potencial difuso, y mediante la ecuación III.23 se han construido los diagramas de potencial de interacción de este complejo en la zona DLVO y la no-DLVO (ver figura III.52). Para esta última región los valores de  $\lambda$  y  $C_h$  empleados han sido 0.5 nm y  $1.2 \times 10^{-20}$  J, respectivamente.

Para bajas concentraciones de electrolito la altura de la barrera disminuye conforme aumenta la fuerza iónica. Esta barrera tiene una altura de aproximadamente 1 k<sub>B</sub>T para 65 mM, coincidiendo la *c.c.c.* teórica con la experimental. Para concentraciones de electrolito comprendidas entre 65 mM y 150 mM la altura de la barrera es despreciable y la estabilidad del coloide es mínima, encontrándonos en el régimen de agregación rápida.



**Figura III.52.** Inclusión de las fuerzas de hidratación en la teoría DLVO.

A concentraciones superiores a la c.s.c. aparece de nuevo una barrera energética que dificulta la agregación. La altura de esta barrera aumenta con la fuerza iónica. Este diagrama de potenciales permite explicar semicuantitativamente los datos experimentales sobre estabilidad coloidal del complejo látex-proteína.

El valor de  $\lambda=0.5$  nm que permite obtener estos diagramas se encuentra dentro del intervalo de valores medidos experimentalmente por diferentes autores. El valor de  $C_h=1.2 \times 10^{-20}$  J corresponde a  $P_0=1.1 \times 10^{-6}$  para 150 mM y  $P_0=2.5 \times 10^{-6}$  para 350 mM. Estos valores de  $P_0$  se encuentran dentro de los márgenes encontrados experimentalmente de  $10^6$ - $5 \times 10^8$  N/m<sup>2</sup>, situándose además próximos al límite inferior como cabría esperar de una superficie poco hidrofílica, en comparación con la sílica ó la mica, como es la de un complejo látex-proteína.

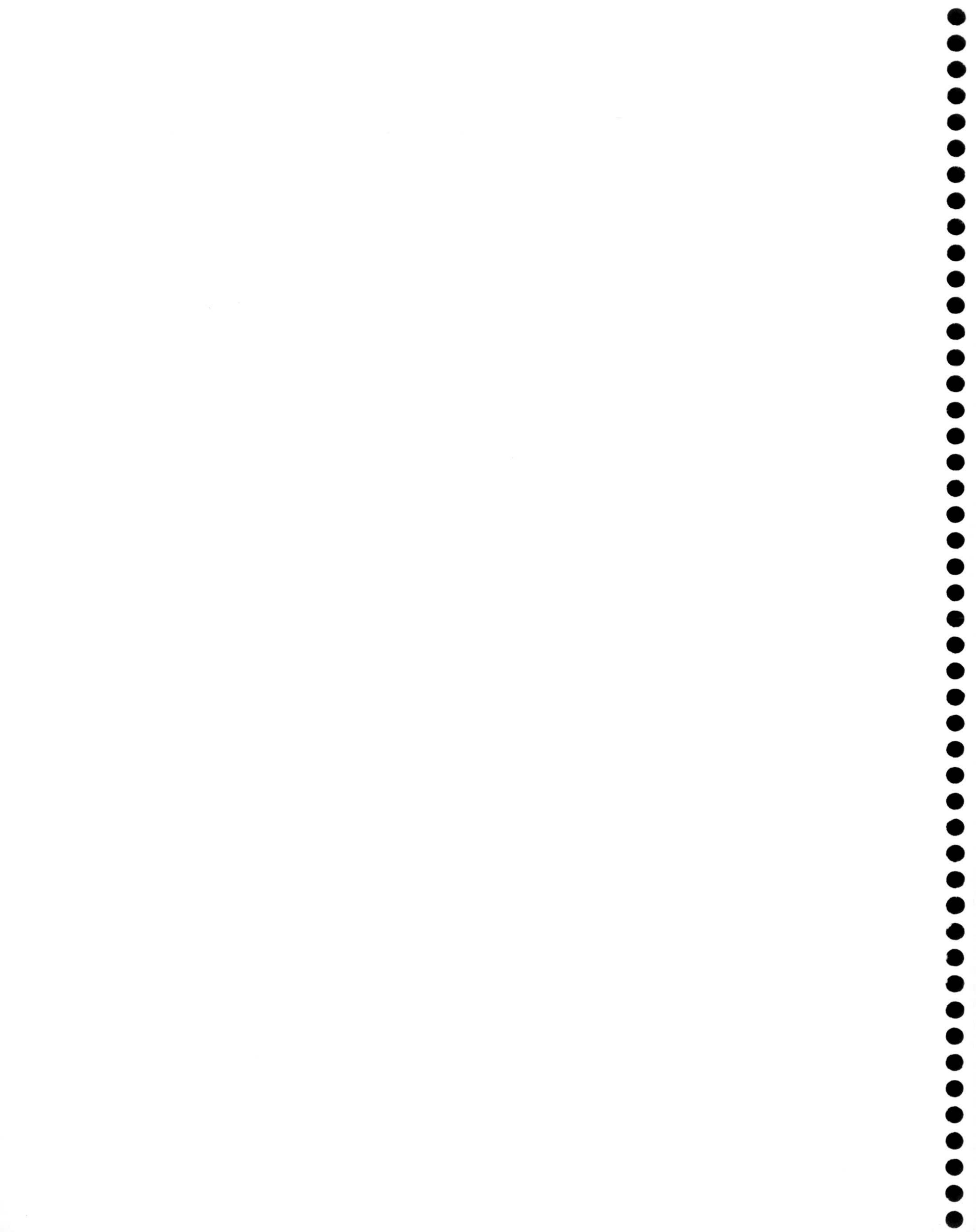
De la figura III.52 es de resaltar la existencia de mínimos secundarios en la zona no-DLVO al introducir el potencial de hidratación. Su existencia puede provocar reversibilidad en la agregación coloidal. En la bibliografía podemos encontrar trabajos que ponen de manifiesto la reversibilidad en la coagulación de sílica (Allen et al., 1970; Depasse et al., 1970; Frolov et al., 1985) y de otros coloides hidrofílicos (Rabinovich et al., 1982; Skvarla, 1992; Thompson et al., 1994).

Se podría pensar en comprobar en el laboratorio la existencia de los mínimos secundarios para complejos látex-proteína por medio de experimentos de reptización, tal y como se hizo para partículas de látex sin proteína en la superficie (Capítulo II). En aquel caso al diluir, la profundidad del mínimo secundario disminuía a la vez que la altura de la barrera aumentaba y los agregados formados en este mínimo se rompían. En el caso de un complejo látex-proteína al diluir tanto la profundidad del mínimo secundario como la altura de la barrera también disminuyen, y por tanto los agregados no tienen por qué romperse ya que fácilmente puede haber coagulación en el mínimo primario. Experimentalmente hemos comprobado esta hipótesis midiendo el tamaño medio de los agregados después de diluir en procesos de agregación del complejo látex-proteína para concentraciones tanto de la zona DLVO como la no-DLVO obteniendo ausencia de reptización.

La estabilización anómala observada para coloides poliméricos recubiertos con proteína es muy interesante y merece la atención en trabajos futuros junto a estudios que profundicen en la modelización de las fuerzas de hidratación.

# Capítulo IV

**Carácter fractal de la  
agregación coloidal: relación  
entre cinética y morfología de  
los agregados**



## **4** Carácter fractal de la agregación coloidal: relación entre cinética y morfología de los agregados

### **1. Introducción**

En general la agregación coloidal, desde el punto de vista cinético, se clasifica en lenta y rápida. En el primer régimen existe una barrera de potencial que dificulta la agregación, siendo tan sólo una fracción de los encuentros entre partículas los que conducen a la formación de agregados. Cuando la eficacia de las colisiones es máxima (así como la constante cinética de agregación) se habla de agregación rápida. Como acabamos de ver en los dos capítulos anteriores, el régimen de agregación rápida aparece tanto para coloides liofóbicos como liofílicos y se caracteriza porque la constante cinética es independiente de la concentración de sal.

Numerosos estudios sobre la constante de agregación rápida han aparecido durante las últimas décadas, habiéndose empleado diferentes técnicas experimentales: contadores de partículas (*Smith et al., 1970; Bowen et al., 1985; Barany et al., 1996.*), turbidimetría (*Matthews et al., 1970; Melik et al., 1983; Gregory et al., 1986; Penners et al., 1987; Puertas et al., 1997*) y dispersión de luz (*Feke et al., 1985; Sonntag et al., 1986a; van Zanten et al., 1992; Lichtenfeld et al., 1995*). De todas estas técnicas la turbidimetría ha sido la más empleada por ser la más simple tanto en su manejo como en el análisis de los datos. Sin embargo, cuando las partículas coloidales tienen un tamaño superior a 100 nm, la dispersión de luz a ángulos grandes no aumenta necesariamente con el tamaño de partícula, pudiendo ser las medidas de turbidez durante la agregación ambiguas (*Kerker, 1969*). Un método mejor para determinar la constante de agregación en sus momentos iniciales para partículas con tamaño entre 100-500 nm es la dispersión de luz a ángulos

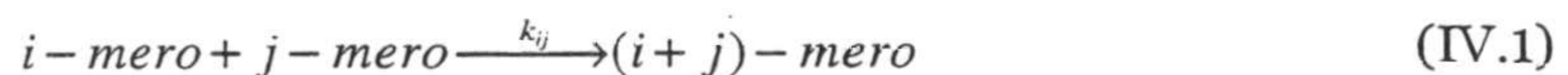
pequeños (*Young et al., 1991*), ya que como se comprobó en el capítulo II, a ángulos pequeños la intensidad dispersada sólo depende del volumen de la partícula dispersora, no de su morfología.

En una primera parte de este capítulo nos vamos a centrar en el estudio de la influencia de diferentes parámetros sobre la constante de agregación rápida tanto para un látex desnudo como para complejos látex-F(ab')<sub>2</sub>. El nefelómetro será la técnica empleada para medir estas constantes cinéticas.

Los agregados formados durante un proceso de coagulación de partículas individuales de látex se pueden considerar como objetos fractales (*Feder et al., 1984; Onoda, 1985; Weitz et al., 1987; Carpineti et al., 1990*) pudiéndose caracterizar su morfología a través del concepto de dimensión fractal. La estructura de los agregados depende fuertemente del mecanismo por el que se forman, que a su vez tendrá una cinética característica (*Jullien et al., 1987; Lin et al., 1989*). Esta relación entre cinética de agregación y estructura de los agregados será estudiada en una segunda parte del presente capítulo para sistemas liofóbicos y liofílicos.

## 2. Constante de agregación rápida para partículas de látex

La agregación rápida de un coloide ocurre cuando la concentración de electrolito del medio es lo suficientemente elevada como para que la repulsión electrostática entre las partículas sea despreciable. En estas condiciones la cinética de agregación está controlada por la difusión de las partículas debido a su movimiento Browniano, y viene descrita por la teoría de Smoluchowski (*Smoluchowski, 1917*). De acuerdo con esta teoría, la agregación coloidal es un proceso de segundo orden en el que un agregado formado por  $i$  partículas primarias va a colisionar con otro agregado de  $j$  partículas primarias:



donde  $k_{ij}$  es la constante de velocidad y su valor puede depender del tamaño de los agregados,  $i$  y  $j$ , que están colisionando.

La velocidad con la que está apareciendo un agregado formado por  $k$  partículas primarias, donde  $k=i+j$ , vale:

$$\frac{dn_k}{dt} = \frac{1}{2} \sum_{i+j=k}^{i=k-1} k_{ij} n_i n_j - n_k \sum_{k=1}^{\infty} k_{ik} n_i \quad (\text{IV.2})$$

donde  $n_k$  es la concentración de agregados de tamaño  $k$ .

En esta ecuación se considera que todos los pares de colisiones pueden generar un agregado. El primer término de la ecuación corresponde a la formación de un agregado de tamaño  $k$  partículas, a partir de la unión de dos más pequeños. El factor  $1/2$ , se debe a que se tiene en cuenta en la suma dos veces el mismo término (unión de  $i$  con  $j$  y de  $j$  con  $i$ ). El segundo término, corresponde a la pérdida de un agregado formado por  $k$  partículas por colisión con otro de  $i$  partículas. No hay que olvidar que esta ecuación corresponde a una agregación irreversible, donde no se considera la ruptura de agregados.

También hay que considerar que la ecuación IV.2 es válida para suspensiones muy diluidas. De esta forma nos aseguramos que la formación de agregados se debe a colisiones binarias y no terciarias ó cuaternarias. Las concentraciones de partículas utilizadas en nuestros experimentos son lo suficientemente bajas como para satisfacer la condición de colisiones binarias.

La ecuación IV.2 es un sistema acoplado de ecuaciones diferenciales no lineales que no se puede resolver exactamente para cualquier  $k_j$ . En el caso de partículas coloidales monodispersas que agregan bajo condiciones de agregación limitada por difusión,  $k_{ij}$  se puede suponer constante, pudiéndose resolver analíticamente la ecuación IV.2. Esta constancia implica físicamente que todos los pares de agregados  $i$  y  $j$  tienen la misma probabilidad de reaccionar independientemente de su tamaño. La ecuación IV.2 para los momentos iniciales de la agregación en los que los monómeros están formando dímeros se puede expresar como:

$$\left( \frac{dn_T}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} = -\frac{1}{2} k_{11} n_1^2 \quad (\text{IV.3})$$

siendo  $n_T$  la concentración total de partículas donde el valor de  $k_{11}/2$  es  $K_s$ . Debemos recordar que  $K_s$  es la constante de agregación de Smoluchowski analizada en el capítulo II y cuyo valor a 20°C es  $5.4 \times 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$  (Fitch, 1997). Esta ha de ser la constante de agregación rápida para los primeros instantes de la agregación en la que



sólo hay monómeros y dímeros. Conforme vaya avanzando el proceso aparecerán nuevas especies, trímeros, tetrameros, etc.

Para cualquier instante la ecuación IV.2 permite obtener la velocidad con la que está apareciendo o desapareciendo cualquier tipo de agregado, que dependerá de una serie de constantes de velocidad ( $k_{11}$ ,  $k_{13}$ ,  $k_{21}$ , etc). Por simplicidad, en la bibliografía se suele suponer que todas estas constantes cinéticas son iguales a  $K_s$  (Lichtenfeld et al., 1995; Schudel et al., 1997). Esta suposición es razonablemente buena para agregados de tamaño no muy diferente. Teniendo en cuenta esta consideración la ecuación IV.3 para cualquier instante de la agregación valdrá:

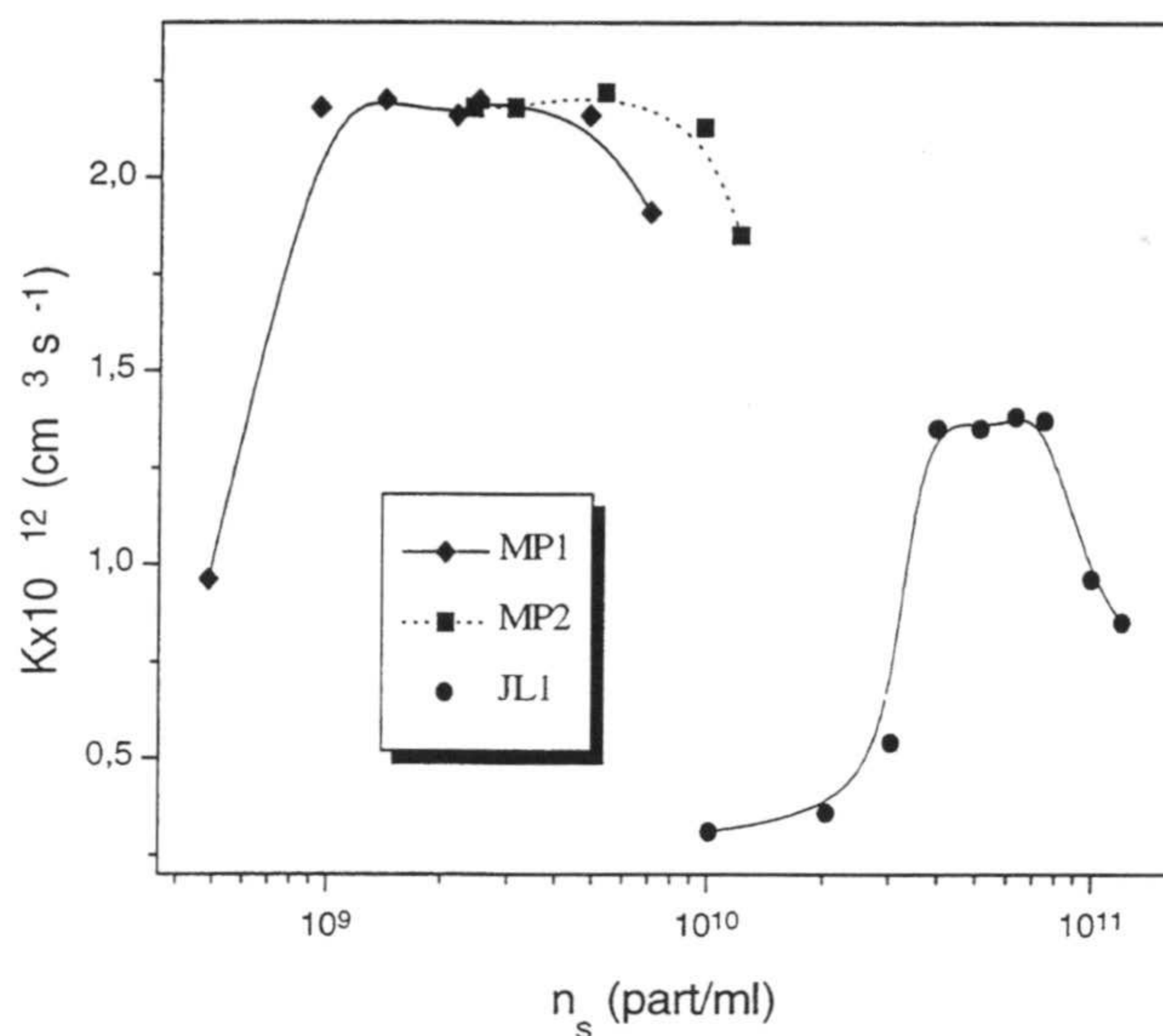
$$\frac{dn_T}{dt} = -K_s n_T^2 \quad (\text{IV.4})$$

No obstante, para obtener experimentalmente una constante de agregación, nos interesa trabajar con concentraciones de partículas bajas y cortos periodos de tiempo de modo que sólo ocurra la formación de dímeros o como mucho algunos trímeros.

La constante de agregación rápida de cada látex estudiado ha sido obtenida para concentraciones de electrolito superiores a su *c.c.c.* Para ello se sigue el proceso de agregación con el nefelómetro y aplicando la ecuación II.14 para la señal correspondiente al ángulo menor ( $4.5^\circ$ ) se obtiene la constante cinética.

Previamente se ha determinado para cada látex la concentración óptima de partículas en cubeta. En la gráfica IV.4 se ha representado la constante de agregación rápida ( $K$ ) en función de la concentración de partículas ( $n_s$ ) para los látex MP1, MP2 y JL1.

Como se puede comprobar en esta figura, existe un intervalo de concentraciones para las cuales la constante de agregación es la misma. Para concentraciones inferiores o superiores a este intervalo la constante disminuye y depende de la cantidad de partículas.



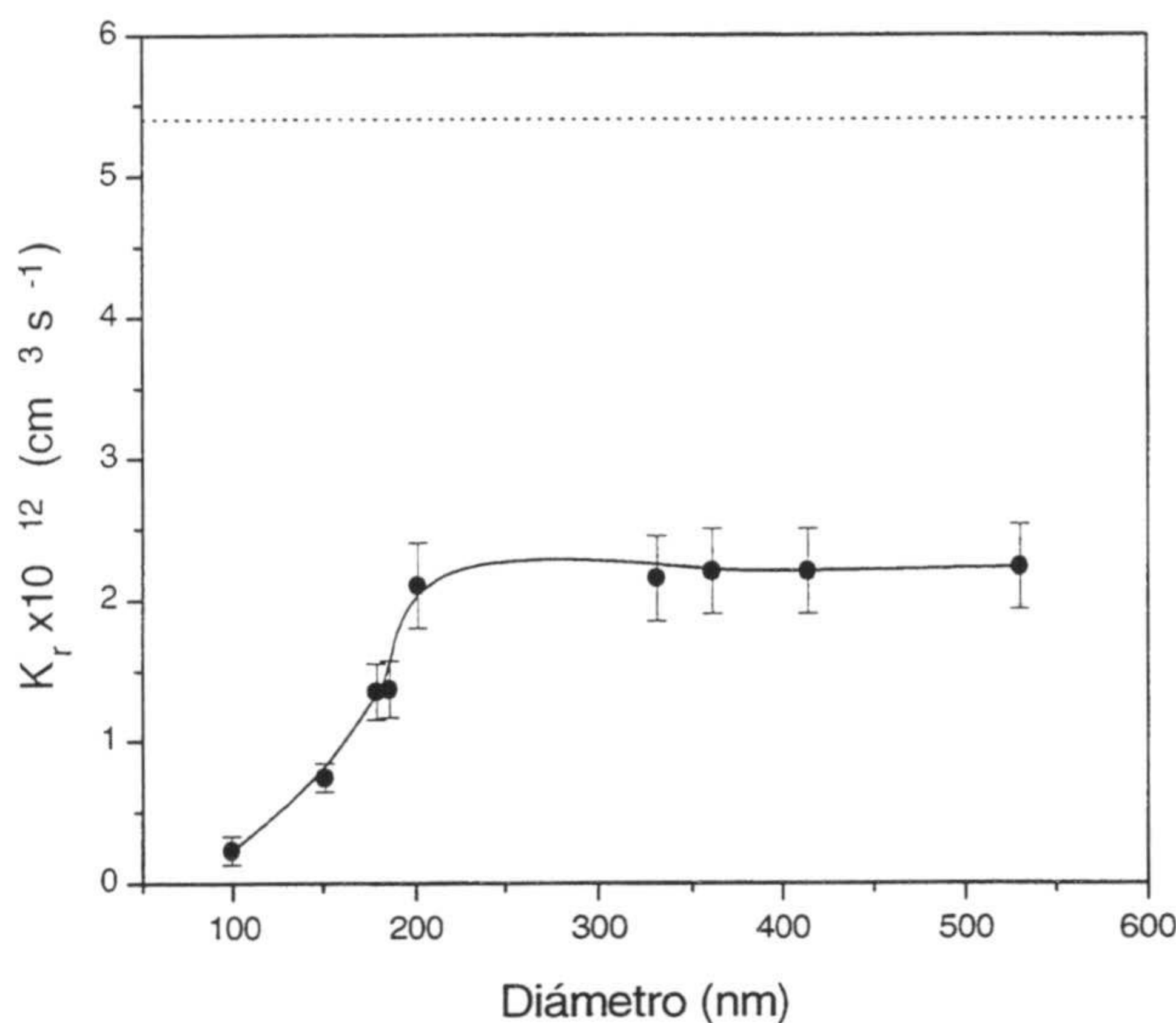
**Figura IV.1.** Influencia de la concentración de partículas ( $n_s$ ) sobre la determinación de la constante de agregación.

A bajas concentraciones de partícula la luz dispersada es muy baja, siendo la relación señal-ruido inadecuada para obtener la constante de agregación. Por otra parte a altas concentraciones de partícula la dispersión múltiple provoca un descenso de la constante de agregación. Así pues, la constante obtenida en la zona intermedia (es la correcta, habiéndose empleado siempre la concentración de partículas más baja de esta región).

En la mayoría de los trabajos publicados se puede encontrar que la constante de agregación rápida es independiente de la concentración de partículas (*Sonntag et al., 1987*). Tan sólo un trabajo de Matthews et al. (*Matthews et al., 1967*) y otro de Hatton et al. (*Hatton et al., 1974*) ponen de manifiesto el aumento de la constante cinética con la cantidad de monómeros iniciales.

Una vez conocida la concentración óptima de partículas para cada tamaño de látex se ha estudiado la influencia del tamaño de partícula sobre la constante de agregación rápida ( $K_r$ ). Para ello hemos utilizado 9 látex distintos con diámetros comprendidos entre los 99 nm (PS3Ma) a los 530 nm (IDC). Los resultados obtenidos aparecen en la gráfica IV.2.

El látex AS11, que tiene un diámetro de 661 nm, no se ha utilizado en este estudio debido a que su tamaño es demasiado grande y no se cumple la condición II.16 necesaria para obtener constantes de agregación a partir de la dispersión a ángulos pequeños.



**Figura IV.2.** Influencia del tamaño de partícula sobre la constante de agregación rápida ( $K_r$ ).

La constante de agregación permanece independiente para diámetros superiores a los 200 nm en un valor de  $(2.2 \pm 0.3) \times 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ . Para partículas más pequeñas la constante disminuye conforme lo hace el diámetro del coloide.

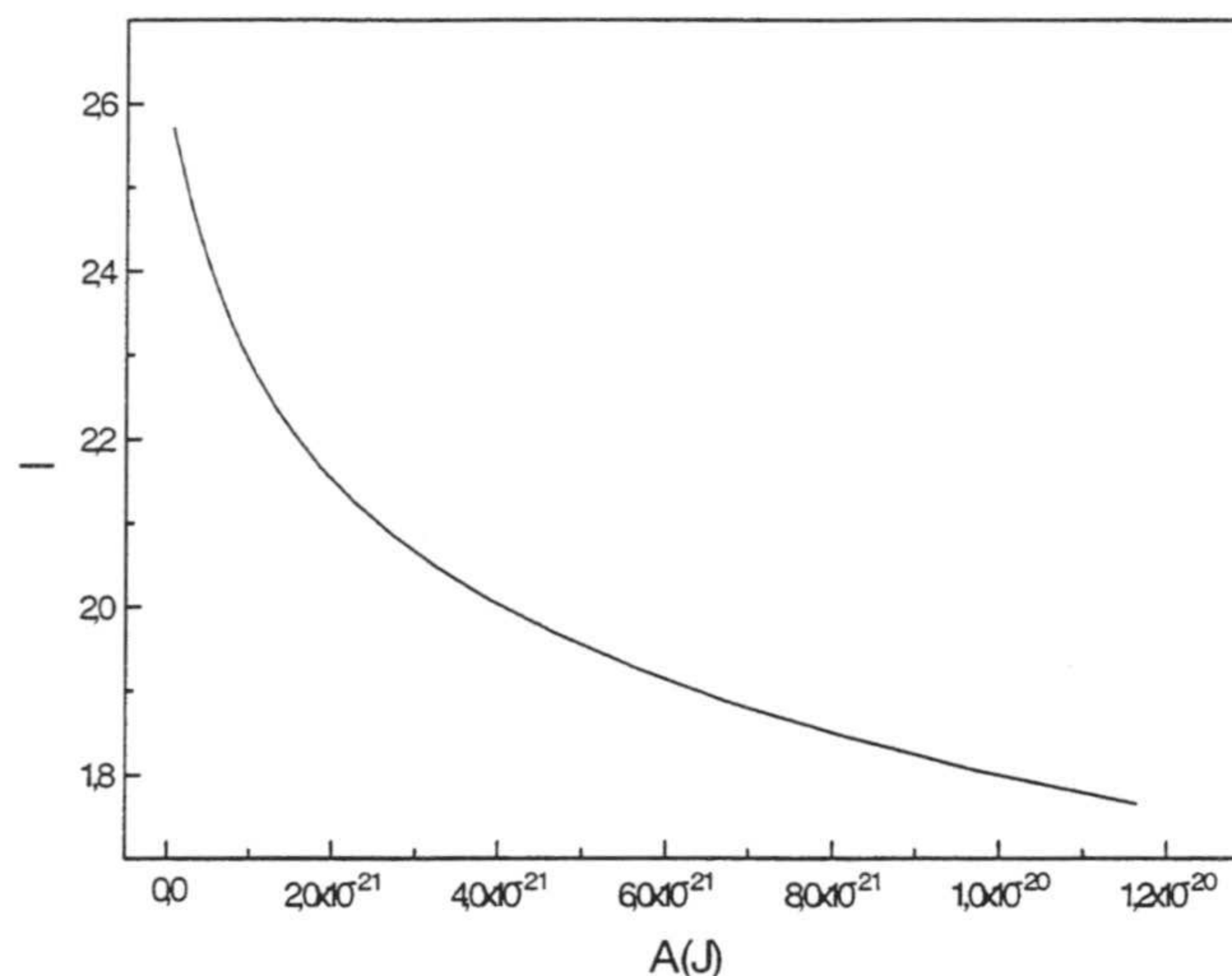
A pesar de los procesos de limpieza a los que se someten los látex, nunca estamos en condiciones de asegurar la total eliminación del surfactante. En este sentido es interesante resaltar que la constante de agregación rápida para el único látex empleado que fue sintetizado en presencia de surfactante (S4CS9 de 200 nm) es la misma que para los látex sintetizados en ausencia de tensioactivo.

Los experimentos se realizaron a una temperatura de 20°C. Para esta temperatura el valor de la constante de Smoluchowski ( $K_s$ ) es de  $5.4 \times 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$  (línea punteada de la gráfica IV.2). Este valor teórico se ve reducido si se tiene en cuenta la corrección hidrodinámica y la existencia del potencial atractivo de van der Waals, como se

planteó en el capítulo II, a través de la ecuación II.37 que volvemos a escribir en esta ocasión:

$$K = \frac{K_s}{2 \int_0^{\infty} \frac{\beta(H)}{(H+2a)^2} \exp \frac{V_A(H)}{k_B T} dH} \quad (\text{IV.5})$$

Esta constante para la agregación rápida depende del potencial atractivo que a su vez es función de la constante de Hamaker del coloide en cuestión. En la gráfica IV.3 se ha representado el valor del denominador (que llamamos I) de la ecuación IV.5 en función de la constante de Hamaker. En este cálculo se ha empleado la expresión II.18 para el potencial atractivo de van der Waals.



**Figura IV.3.** Dependencia entre el valor de I y la constante de Hamaker A.

La existencia del potencial atractivo producirá un aumento de la constante teórica de Smoluchowski mientras que la interacción hidrodinámica tiende a disminuirla. Según la figura IV.3 al disminuir la constante de Hamaker el valor de I aumenta, disminuyendo por tanto la constante cinética de agregación  $K$ . En ausencia de un potencial atractivo de van der Waals la agregación coloidal no se produciría debido a la interacción hidrodinámica.

Como se apuntó en el capítulo II no existe un valor definitivo en la bibliografía para la constante de Hamaker de la interacción poliestireno-poliestireno en agua. En

la bibliografía se pueden encontrar valores desde los  $0.2 \times 10^{-20}$  J a  $1.1 \times 10^{-20}$  J. A partir de la figura IV.3 se puede observar que los valores de la constante de agregación rápida para estas constantes de Hamaker son  $2.5 \times 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$  y  $3.1 \times 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ , respectivamente. En los estudios sobre estabilidad coloidal realizados en el capítulo II se ha obtenido un valor medio de  $A=0.3 \times 10^{-20}$  J para nuestros coloides. Para esta constante el valor de la I es de 2.06 con lo que la constante de agregación rápida debería de ser  $2.6 \times 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$  cuando el valor que hemos obtenido experimentalmente ha sido  $(2.2 \pm 0.3) \times 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ . Este valor es algo inferior aunque razonablemente aceptable.

Si se recurre a la bibliografía se puede encontrar una gran variedad de valores para la constante de agregación rápida de partículas de poliestireno (en unidades de  $\text{cm}^3 \text{ s}^{-1}$ ):  $3.5 \times 10^{-12}$  (Higuchi et al., 1963),  $2.5 \times 10^{-12}$  (Matthews et al., 1967),  $2.65 \times 10^{-12}$  (Hatton et al., 1974),  $3.25 \times 10^{-12}$  (Lips et al., 1971; 1973),  $2.4 \times 10^{-12}$  (Sonntag et al., 1986b),  $2.1-2.2 \times 10^{-12}$  (Romero, 1998),  $3 \times 10^{-12}$  (Holthoff et al., 1997; Fernández et al., 1997)  $2.6-2.1 \times 10^{-12}$  (Puertas, 1997). Sonntag y Strenge en su libro "Coagulation kinetics and structure formation" (Sonntag et al., 1987) indican que la media de 40 valores para la constante de agregación rápida encontrados en la bibliografía es de  $(3.21 \pm 1.36) \times 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ . Todos estos valores para la constante de agregación rápida están próximos a las constantes de Smoluchowski que se han calculado considerando la interacción hidrodinámica y el potencial atractivo de van der Waals.

Al observar la figura IV.2 podemos ver que la constante de agregación rápida disminuye con el diámetro de partícula para valores inferiores a los 200 nm. Este resultado es contrario a la predicción teórica que indica la independencia de la constante con el tamaño de partícula (Ec.II.32). Se pueden proponer diferentes explicaciones para esta reducción.

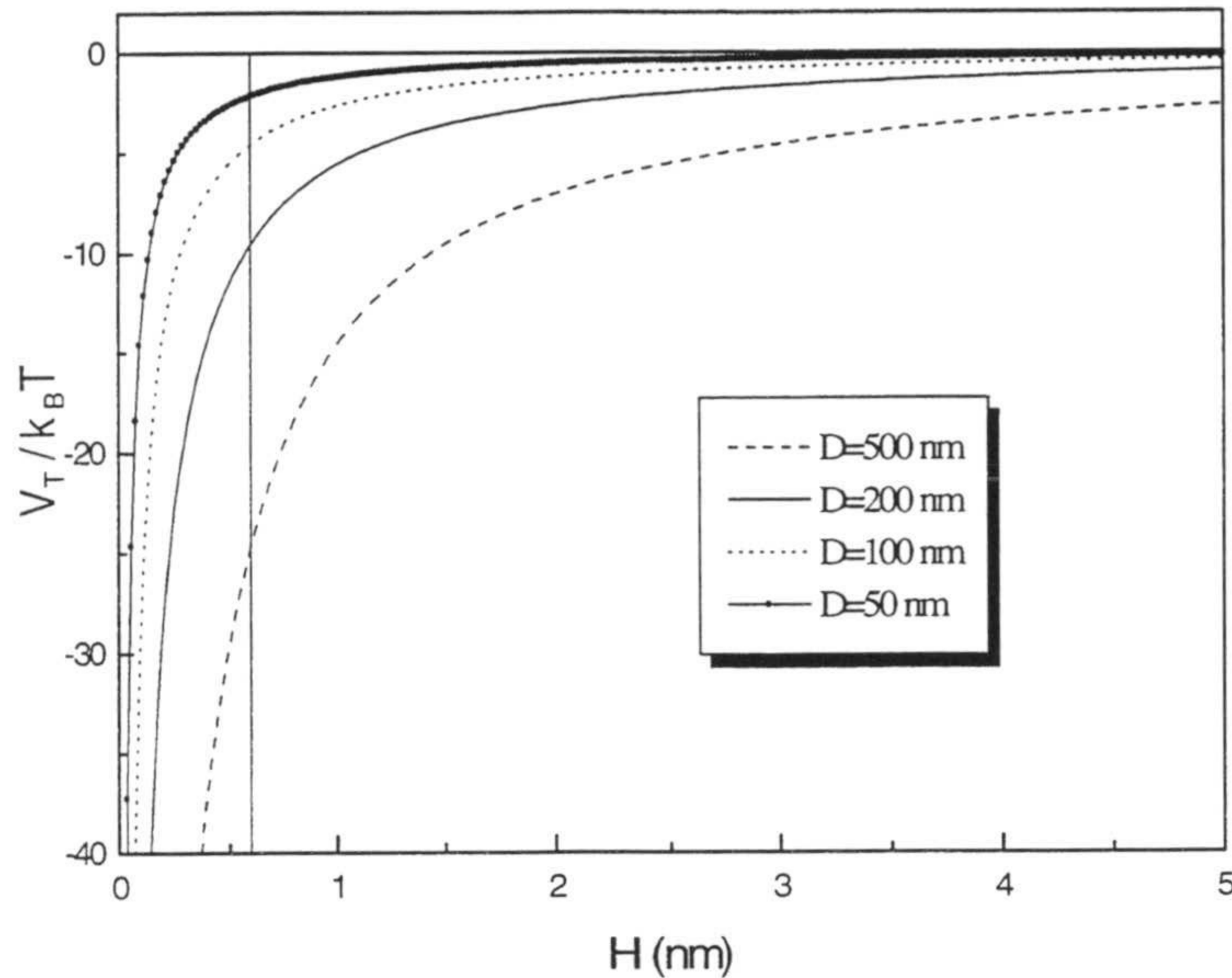
La teoría DLVO predice la existencia de un mínimo primario en el diagrama de interacción a distancias cortas. En este mínimo se produce la coagulación de las partículas y su profundidad, teóricamente, es infinita. Sin embargo, es importante considerar que esta situación no tiene significado físico, ya que a distancias tan cortas existen efectos que no se han considerado, como la existencia de una repulsión

de corto alcance de Born (*Feke et al., 1984*). Otro efecto es la existencia de contraiones (hidratados o deshidratados) en la capa de Stern y moléculas de agua que van a impedir que las dos partículas lleguen a tocarse superficialmente, existiendo una distancia mínima de aproximación. Este hecho provoca que la profundidad del mínimo primario sea finita (*Sonntag et al., 1987; Elimelech et al., 1995*). El valor del potencial de interacción en este mínimo va a ser muy importante ya que determinará la reversibilidad o irreversibilidad de la agregación (*Frens, 1978; Muller, 1978; Edwards et al., 1984; Cahill et al., 1987*). Si el mínimo donde se produce la coagulación no es lo suficientemente profundo, las partículas agregadas pueden salir del mismo reduciéndose la constante de agregación. Las constantes de Smoluchowski calculadas anteriormente se han obtenido suponiendo que la agregación era irreversible, si existe reversibilidad estos valores se verán reducidos en función de la profundidad del mínimo primario (*Thompson, 1984*).

El espesor de la capa de moléculas que rodean a las partículas depende de las propiedades de la superficie del coloide, especialmente de su hidrofiliidad. Como se ha comprobado en el capítulo anterior al estudiar la estabilidad coloidal de los complejos látex-proteína, esta capa de moléculas puede ser tan importante como para evitar la agregación a altas concentraciones de electrolito.

Como una buena aproximación, en el régimen de agregación rápida la contribución del potencial eléctrico al potencial total de interacción se puede suponer despreciable, debido a que la doble capa se encuentra totalmente apantallada (*Zeichner et al., 1979; Higashitani et al., 1991*). Teniendo esto en cuenta, en la figura IV.4 se ha representado el potencial de interacción en la situación de agregación rápida ( $V_T = V_A$ ) para diferentes tamaños de partícula.

Se ha utilizado para los cálculos una constante de Hamaker de  $0.3 \times 10^{-20}$  J y la expresión II.18 del potencial atractivo de van der Waals. Hemos supuesto la existencia de una distancia mínima de aproximación de 0.6 nm, que es un valor razonablemente aceptable (*Sonntag et al., 1987*), y que corresponde a la línea vertical de la gráfica.



**Figura IV.4.** Potencial de interacción para la agregación rápida a diferentes tamaños de partícula.

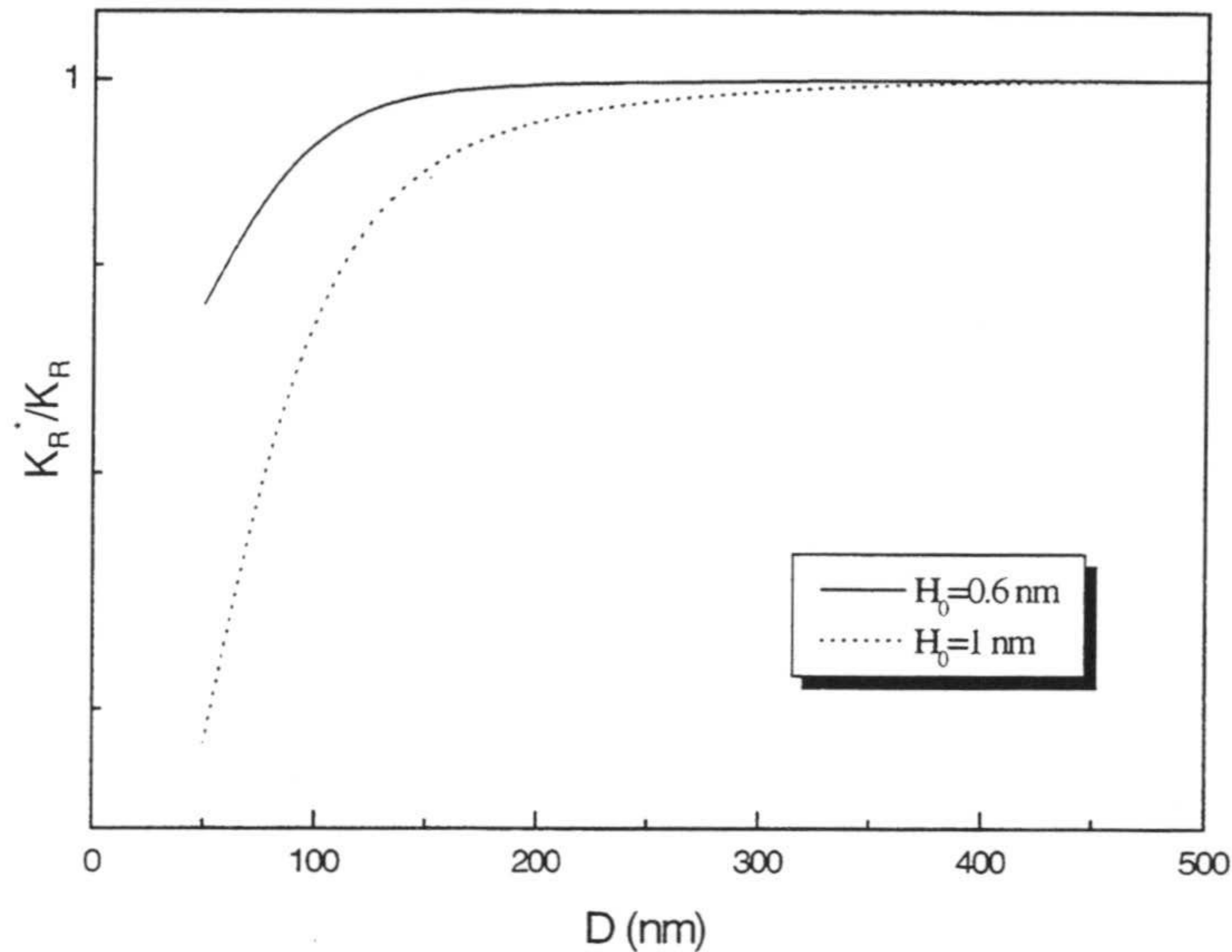
La profundidad del mínimo primario donde se producirá la agregación de las partículas en el régimen rápido disminuye conforme lo hace el tamaño de la partícula. Si este mínimo no es lo suficientemente profundo se puede producir una cierta desfloculación que conllevaría una disminución de la constante de agregación rápida.

Richmond et al. (Richmond et al., 1975a) obtuvieron la siguiente expresión de la constante neta ( $K_R^*$ ) para la agregación reversible en un mínimo secundario:

$$K_R^* = K_R [1 - \exp(V_{min} / k_B T)] \quad (IV.6)$$

donde  $K_R$  es la constante de agregación irreversible y  $V_{min}$  la profundidad del mínimo donde ocurre la agregación. Este modelo también es aplicable al caso de un mínimo primario de profundidad limitada. A partir de esta ecuación hemos calculado el cociente  $K_R^*/K_R$  para dos distancias mínimas de aproximación y se han representado en función del diámetro de partícula en la figura IV.5. Los valores de  $V_{min}$  se han calculado a partir de la figura IV.4.

Según la figura IV.5 cuanto mayor es la distancia mínima de aproximación menor es la constante de agregación para un mismo tamaño de partícula.



**Figura IV.5.** Efecto de la desfloculación según la ecuación IV.2 en función del tamaño de partícula.

Por otra parte el tamaño a partir del cual ya no hay desfloculación aumenta. El cociente  $K_R^*/K_R$  es una medida del grado de desfloculación. Cuando su valor es 1 la agregación es irreversible mientras que cuanto menor sea su valor menor es la constante de agregación debido a la reversibilidad. De acuerdo con esta gráfica, para una distancia de aproximadamente 0.6 nm este tamaño crítico es de 200 nm.

Higashitani y col. (Higashitani et al., 1991) han estudiado la agregación rápida de partículas de sílica obteniendo un resultado similar al nuestro. En su caso la constante comienza a bajar a partir de un diámetro de 100 nm. Estos autores realizaron unos experimentos de desfloculación por ultrasonidos y observaron que las partículas con un diámetro inferior a 100 nm sufrían desfloculación, aumentando el grado de desfloculación al disminuir el tamaño. Para partículas con diámetro superior a 100 nm no observaron desfloculación. Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que la profundidad del mínimo primario disminuye con el tamaño de la partícula.

Otra posible explicación se puede proponer para explicar la bajada de la constante de agregación lenta con el tamaño de partícula. La viscosidad del agua se ve afectada por la presencia de un campo eléctrico, conociéndose a este fenómeno por efecto



electroviscoso. Esta influencia del potencial eléctrico ( $\psi$ ) sobre la viscosidad ( $\mu$ ) viene dada por la siguiente expresión (Andrade et al., 1951):

$$\mu = \mu_0 [1 + A(d\psi / dh)^2] \quad (\text{IV.7})$$

donde  $\psi$  es el potencial eléctrico,  $\mu_0$  la viscosidad en el seno de la disolución donde  $d\psi/dh$  vale 0 y  $A$  es una constante cuyo valor es  $10^{-15} \text{ m}^2/\text{V}^2$  (Lyklema et al., 1961). El efecto electroviscoso viene a indicar que la viscosidad del agua en torno a las partículas coloidales cargadas es mayor a la del seno de la dispersión. Así por ejemplo, para un potencial superficial de 100 mV y un espesor de la doble capa ( $1/\kappa$ ) de 1 nm, la viscosidad cerca de la partícula es 10 veces superior a la del medio. Esta elevada viscosidad entorno a la partícula debe producir un retardo en la cinética de agregación (Muller, 1990).

Las ecuaciones vistas en el capítulo II para la interacción hidrodinámica correspondían a partículas sin carga. Evidentemente el efecto electroviscoso y la interacción hidrodinámica han de estar íntimamente relacionadas, aumentando ésta por la existencia de la primera.

Higashitani y col. (Higashitani et al., 1991) han comprobado que la influencia del efecto electroviscoso sobre la cinética de agregación rápida es baja para partículas con diámetro inferior a 50 nm, y despreciable para partículas mayores. Esta última afirmación puede ser comprobada si nos fijamos en la tabla IV.I donde se recogen las constantes de agregación rápida obtenidas para el látex carboxilo JL4 ( $D=331 \text{ nm}$ ) en función del pH.

**Tabla IV.1** Constantes de agregación rápida en función del pH para el látex JL4.

pH	c.c.c. (mM)	$K_r \times 10^{12} (\text{cm}^3\text{s}^{-1})$
4.4	150±20	2.18±0.30
5.5	350±50	2.16±0.31
6.8	520±30	2.21±0.29
8.3	510±30	2.20±0.30

El potencial superficial de este látex aumenta con el pH debido a la desprotonación de los grupos carboxilo. Este hecho queda reflejado en el aumento de la estabilidad del látex con el pH (ver valores de c.c.c). Si el efecto electroviscoso fuera importante, su efecto aumentaría con el pH por aumentar el potencial eléctrico de la doble capa con lo que la constante de agregación debería disminuir. Sin embargo la constante de agregación rápida es la misma para todos los pHs.

La misma conclusión se puede obtener analizando los datos (tabla IV.2) obtenidos para otro látex carboxilo pero de menor tamaño, el S5CS1. La constante de agregación rápida es independiente del pH aunque la estabilidad del coloide aumente considerablemente.

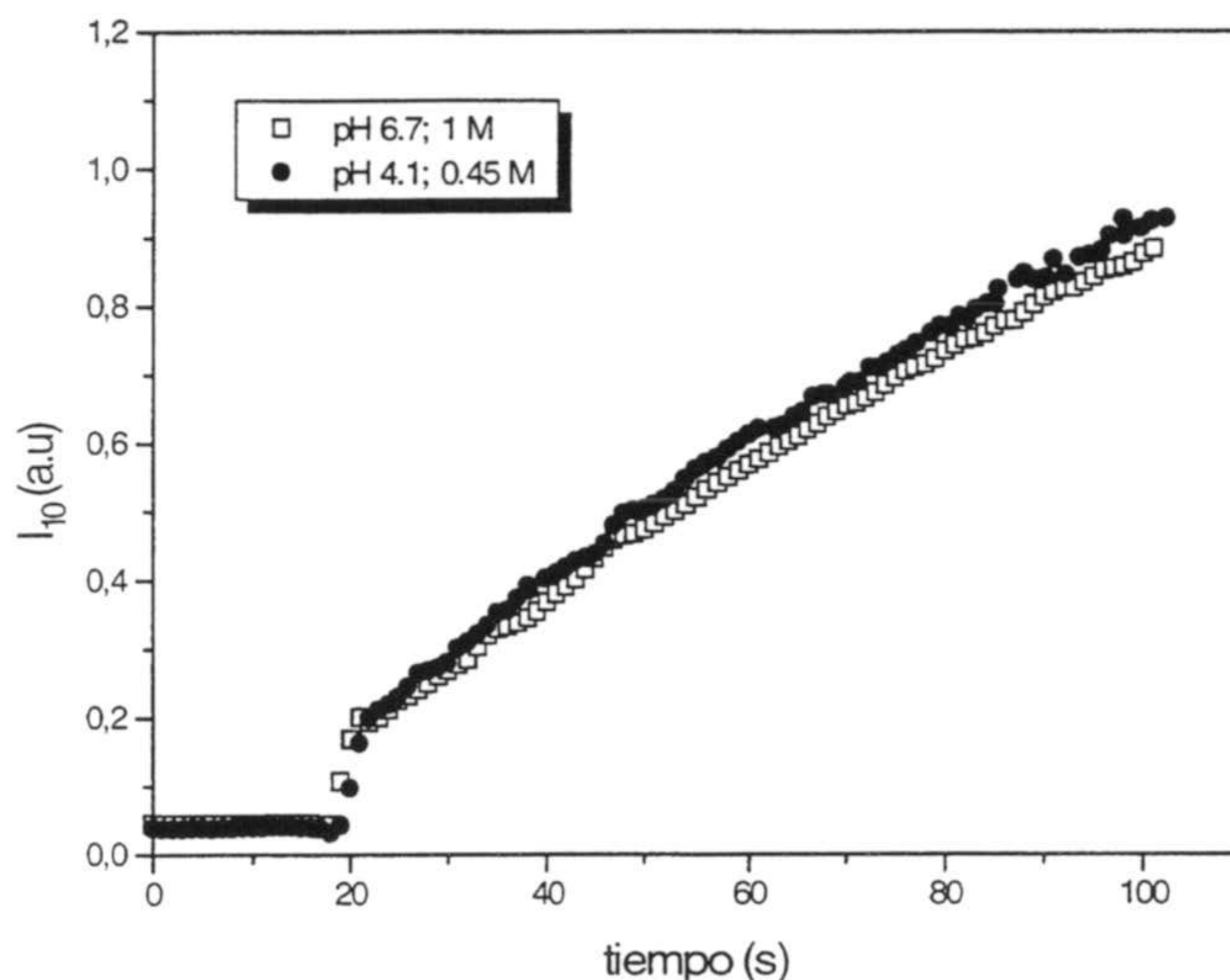
Resaltar de nuevo que aunque este látex fue sintetizado en presencia de surfactante, el valor de la constante de agregación es similar al de los látex sintetizados en ausencia de surfactante.

**Tabla IV.2** Constantes de agregación rápida en función del pH para el látex S5CS1.

pH	c.c.c. (mM)	$K_r \times 10^{12}$ (cm <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> )
4.1	350 ± 20	2.20 ± 0.3
5.3	385 ± 20	2.17 ± 0.3
6.7	891 ± 60	2.18 ± 0.3

En la siguiente gráfica se han representado los datos de la luz dispersada a lo largo de la agregación de este látex a pH 6.7 y una concentración de electrolito de 1M junto con los correspondientes a pH 4.1 y 0.45 M. Ambas concentraciones de electrolito corresponden a la agregación rápida. La concentración de partículas en los dos experimentos es la misma. Queda comprobada la igualdad entre ambas cinéticas.

Algunos autores defienden que aunque la repulsión electrostática puede ser reducida al añadir electrolito hasta comprimir la doble capa eléctrica en el régimen de agregación rápida, una cierta repulsión de corto alcance residual debe permanecer (Stankiewicz et al., 1993; Fernández et al., 1996).



**Figura IV.6.** Intensidad dispersada a un ángulo de  $4.5^\circ$  para dos agregaciones del látex S5CS1: pH 6.7, 1 M y pH 4.1, 0.45 M NaCl.

Si esta repulsión residual existiera su valor dependería del potencial superficial de la partícula y provocaría una disminución de la constante de agregación rápida al aumentar éste. Nuestros resultados parecen indicar que la constante de agregación rápida es independiente del potencial superficial. Si existe la repulsión residual su influencia sobre la constante cinética es despreciable.

Por último mostrar los resultados obtenidos para la constante de agregación rápida de varios látex habiendo utilizado NaCl ó  $MgCl_2$  como electrolitos para provocar la agregación.

**Tabla IV.3** Constantes de agregación rápida para diferentes látex usando NaCl ó  $MgCl_2$  como electrolitos.

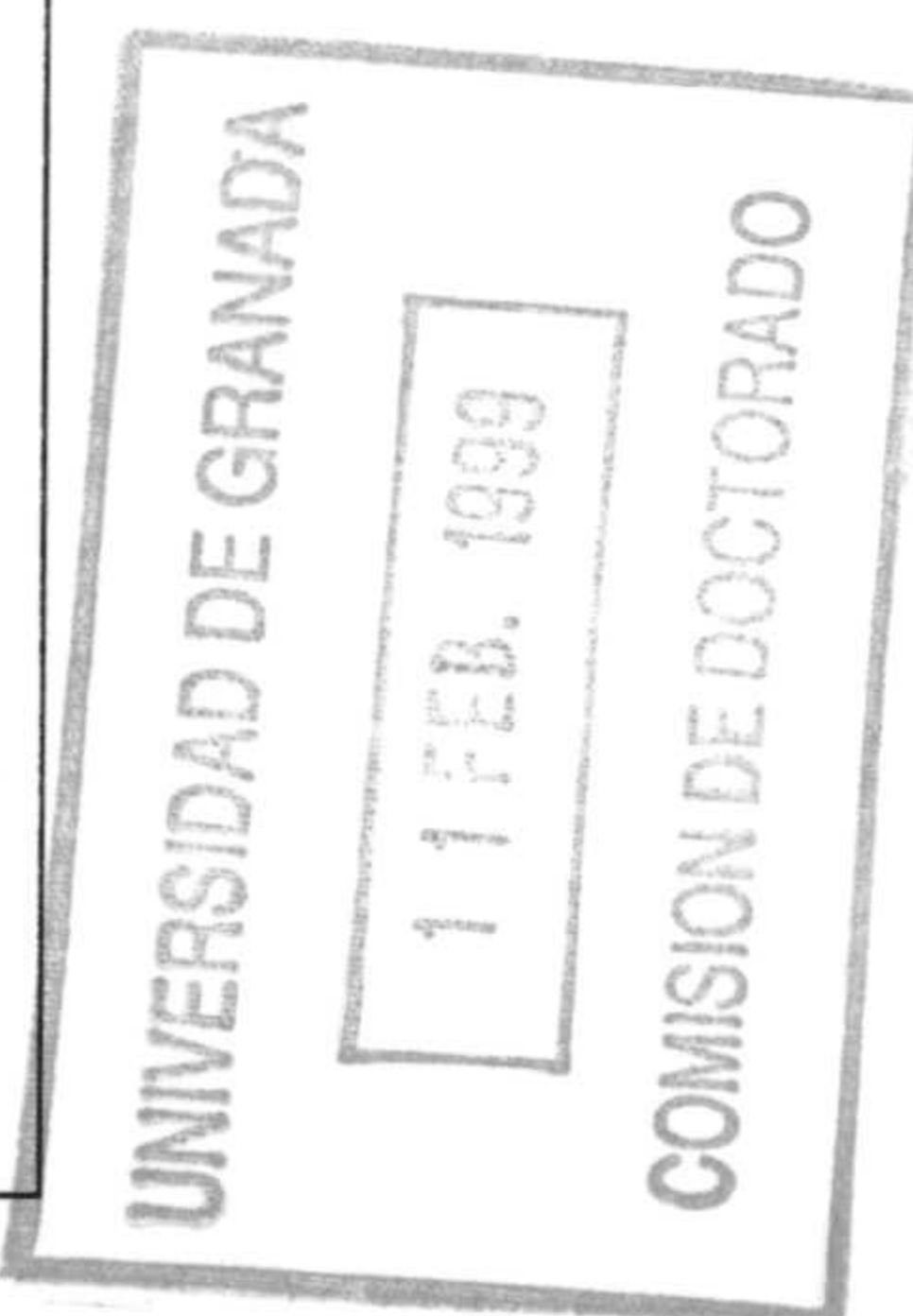
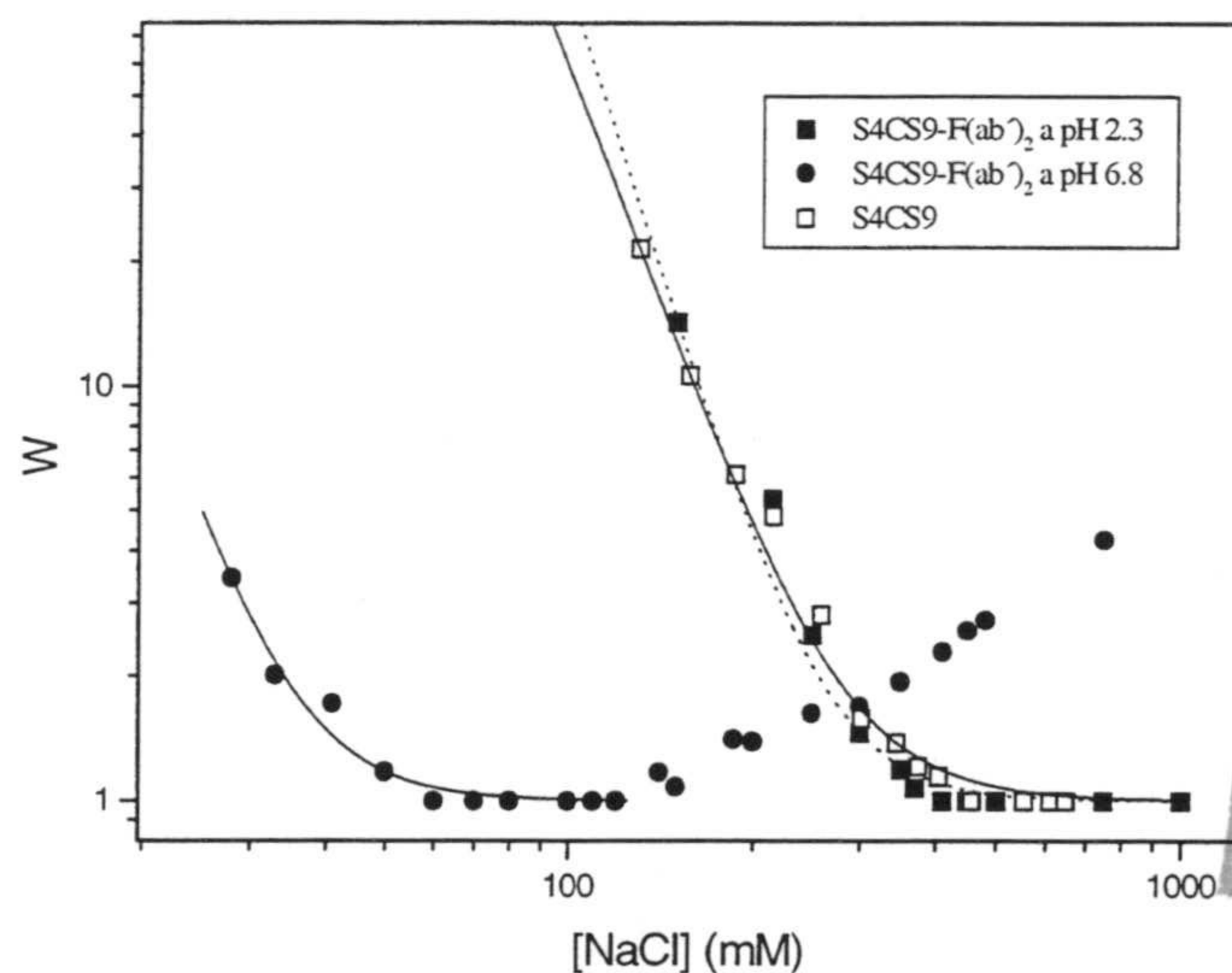
Latex	$K_r \times 10^{12} \text{ (cm}^3 \text{ s}^{-1})$ para $Na^+$	$K_r \times 10^{12} \text{ (cm}^3 \text{ s}^{-1})$ para $Mg^{2+}$
JL1	$1.37 \pm 0.2$	$1.36 \pm 0.2$
MP2	$2.20 \pm 0.3$	$2.23 \pm 0.3$
MP1	$2.21 \pm 0.3$	$2.21 \pm 0.3$
IDC	$2.23 \pm 0.3$	$2.22 \pm 0.3$
JL4 (pH 7)	$2.15 \pm 0.3$	$2.21 \pm 0.3$

Como se puede observar la constante cinética es independiente del tipo de catión utilizado para la agregación.

### 3. Constante de agregación rápida para complejos látex- $F(ab')_2$

En la figura IV.7 se muestran los diagramas de estabilidad para el látex S4CS9 a pH 7 y para un complejo S4CS9- $F(ab')_2$  con 3 mg/m<sup>2</sup> a pH 6.8 y 2.3.

Como era de esperar, a pH 6.8 el complejo S4CS9- $F(ab')_2$  presenta una zona no-DLVO de estabilidad coloidal mientras que a pH 2.3 no aparece. La estabilidad coloidal del látex sin proteína es prácticamente igual a la del complejo a pH 2.3, teniendo ambos aproximadamente la misma c.c.c. (400 mM). Este resultado es muy interesante. Nos encontramos con un sistema liofóbico y otro liofílico que tienen la misma estabilidad coloidal, con lo que sus diagramas de potencial total de interacción han de ser semejantes. No obstante existen diferencias claves entre los dos sistemas.



**Figura IV.7.** Diagramas de estabilidad coloidal para el látex S4CS9 y un complejo S4CS9- $F(ab')_2$ .

La primera la podemos encontrar en los valores correspondientes a la constante de agregación rápida que aparecen en la tabla IV.4. El valor de la constante para el complejo, a ambos pHs, es inferior a la del látex sin proteína.

Una hipótesis, anteriormente planteada, puede ser invocada para explicar estos resultados. El descenso en la constante puede deberse a la existencia de una cierta desfloculación como consecuencia de la agregación del complejo en un mínimo primario de poca profundidad.

**Tabla IV.4** Constantes de agregación rápida para el látex S4CS9 y el complejo a pH 2.3 y 6.8.

Sistema	$K_r \times 10^{12} \text{ (cm}^3\text{s}^{-1}\text{)}$
Látex	$2.20 \pm 0.3$
Complejo a pH 2.3	$1.96 \pm 0.3$
Complejo a pH 6.8	$1.60 \pm 0.2$

La naturaleza de la superficie del complejo es bien diferente a la del látex desnudo. La primera tiene un marcado carácter hidrofílico, presentando las moléculas de agua que rodean a su superficie un cierto orden (estará hidratada). Así pues, es lógico pensar que la distancia mínima de aproximación de las partículas del complejo pueda ser mayor que en el caso del látex desnudo. En consecuencia la profundidad del mínimo donde se produciría la coagulación del complejo sería menor, pudiendo haber desfloculación y disminuyendo la constante de agregación rápida.

Lichtenfeld y col. (*Lichtenfeld et al., 1998*) han encontrado que la distancia mínima de aproximación para partículas hidrofílicas de hematites agregadas es el doble de la correspondiente a un látex de poliestireno.

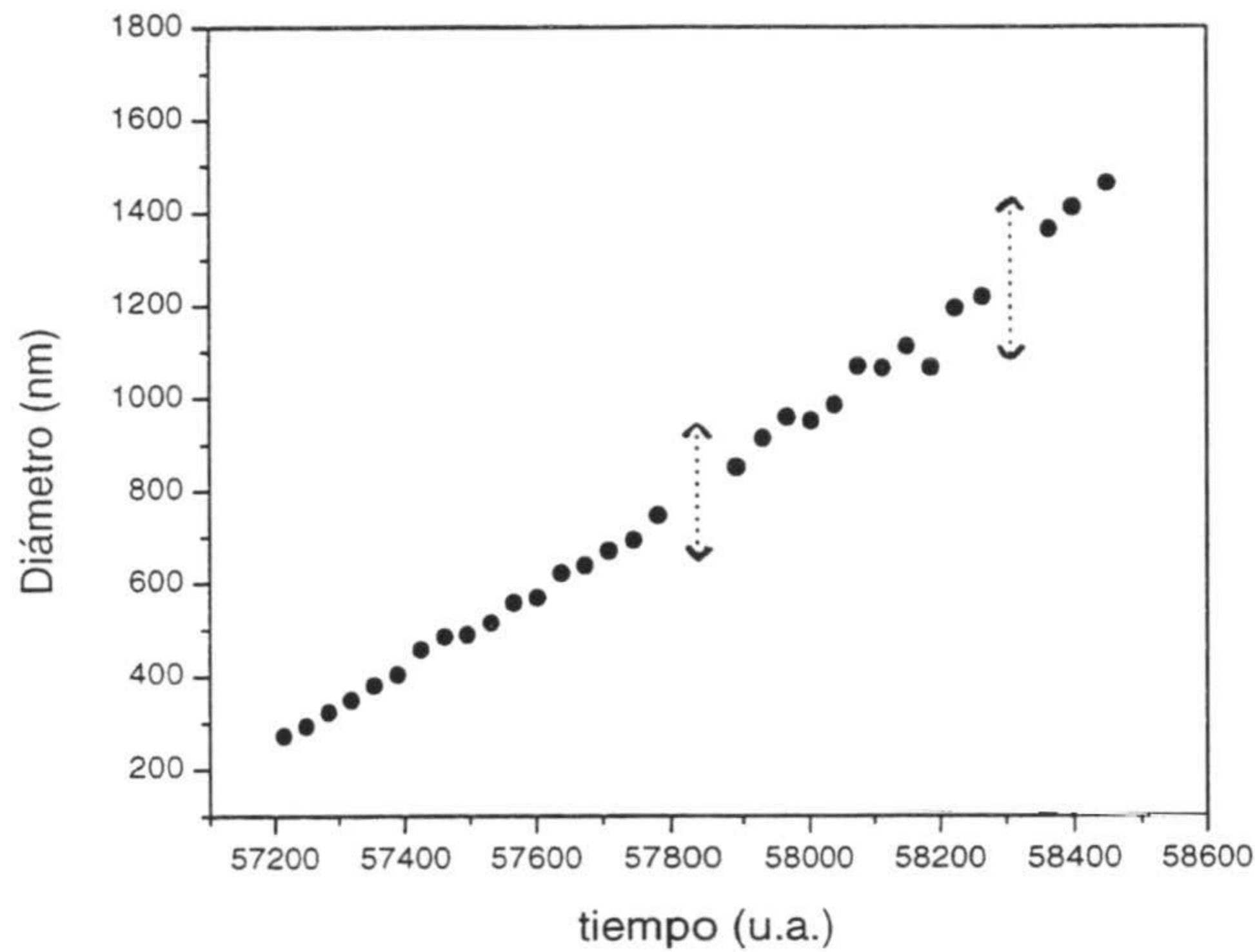
Por otra parte, según la tabla IV.4, la constante de agregación es menor a pH 6.8 que a pH 2.3 para el complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub>. Este resultado concuerda con la hipótesis planteada. A pH 6.8 el complejo presenta la zona no-DLVO que hemos atribuido a las fuerzas de hidratación, que surgen debido a la existencia de cationes hidratados adsorbidos sobre la proteína. A pH 2.3 no aparece el mecanismo anómalo de estabilización porque la carga neta del complejo es positiva y no hay adsorción de cationes. Estos cationes adsorbidos a pH 6.8 harán que la distancia mínima de aproximación sea mayor que a pH 2.3, y que la constante de agregación rápida sea aún menor por ser mayor el grado de desfloculación.

Diferentes autores han estudiado la influencia de la temperatura sobre la constante de agregación rápida de partículas de poliestireno recubiertas con polietilenglicol (Cowell *et al.*, 1978; 1982; 1983; Thompson, 1984). En estos trabajos la constante aumentaba con la temperatura. Así por ejemplo, Thompson ha obtenido que la constante aumenta desde  $2.0 \times 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ \text{C}$  hasta  $2.760 \times 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$  a  $40^\circ \text{C}$ . Estos autores atribuyen este aumento a la deshidratación que sufren las cadenas de óxido de etileno con la temperatura. Esta deshidratación provoca un aumento en la profundidad del mínimo primario disminuyendo la probabilidad de desagregación.

No sólo el agua y los iones hidratados existentes en torno al complejo van a ser los responsables de la disminución en la profundidad del mínimo primario, sino que existen otros factores. Por ejemplo, la rugosidad que presenta la superficie de un complejo en comparación con la del látex sin proteína adsorbida. La distancia mínima de aproximación se ve afectada cuando el área de contacto entre dos partículas que están coagulando se reduce (Sonntag *et al.*, 1987). Por otra parte, como se ha indicado en el capítulo anterior, la atracción de van der Waals se ve reducida cuando la partícula es rugosa. La disminución de esta interacción, que es la predominante a distancias cortas, conducirá a la existencia de un mínimo primario poco profundo (Czarnecki *et al.*, 1980). El valor del potencial en el mínimo primario va a determinar la fortaleza con la que las partículas se encuentran unidas entre sí en el agregado. Cuanto menor sea esta profundidad más fácil será la ruptura del agregado por agitación o por efecto térmico. En este contexto se han realizado unos experimentos de fragmentación. En ellos volúmenes iguales de coloide y de electrolito se mezclan en la cubeta del dispositivo de PCS y se sigue el proceso de agregación mediante la medida del tamaño medio de agregado. Pasado un tiempo determinado se agitaba la cubeta de forma controlada y reproducible, y se volvía a medir el tamaño de los agregados. Estos experimentos se realizaron para el látex S4CS9 y para el complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> a pH 2.3 y 6.8. La figura IV.8 muestra los resultados para el látex desnudo a una concentración de NaCl de 300 mM (inferior a la c.c.c. del látex). En esta figura los instantes en los que se realizaba la agitación se han indicado con líneas punteadas.

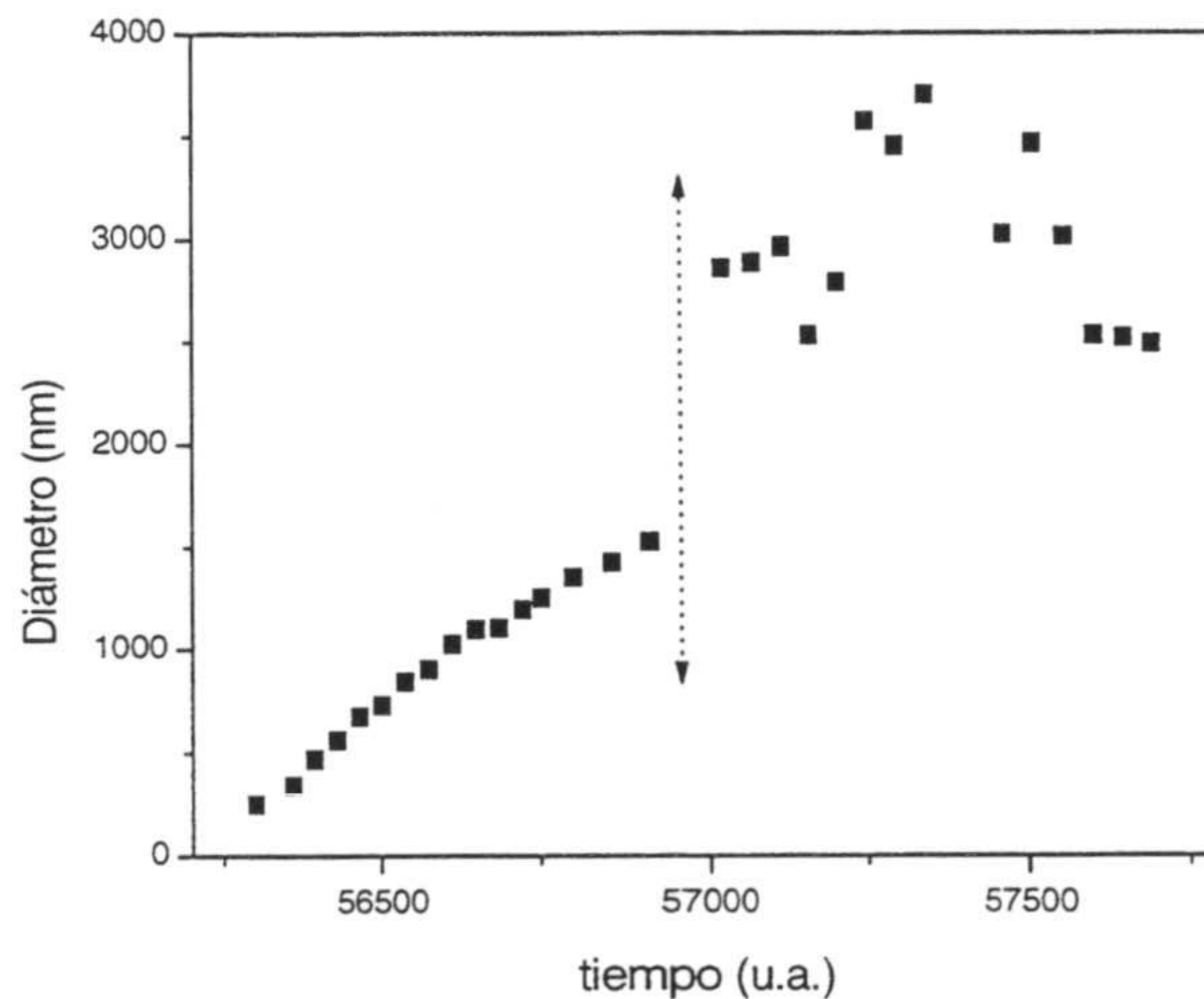
Se puede observar que no existe ruptura de agregados por la agitación que sufren. Las uniones entre las partículas que forman los agregados han de ser relativamente

fuertes, pudiendo indicar este resultado que la agregación se produce en un mínimo profundo. El mismo resultado se obtuvo para una concentración de 186 mM y 251 mM.



**Figura IV.8.** Influencia de la agitación sobre la agregación del látex a 300 mM.

Pero lo interesante es realizar este experimento para una concentración de electrolito correspondiente a la agregación rápida, que es el caso que nos ocupa. La siguiente figura corresponde al experimento realizado a una concentración de 430 mM.



**Figura IV.9.** Influencia de la agitación sobre la agregación del látex a 430 mM.

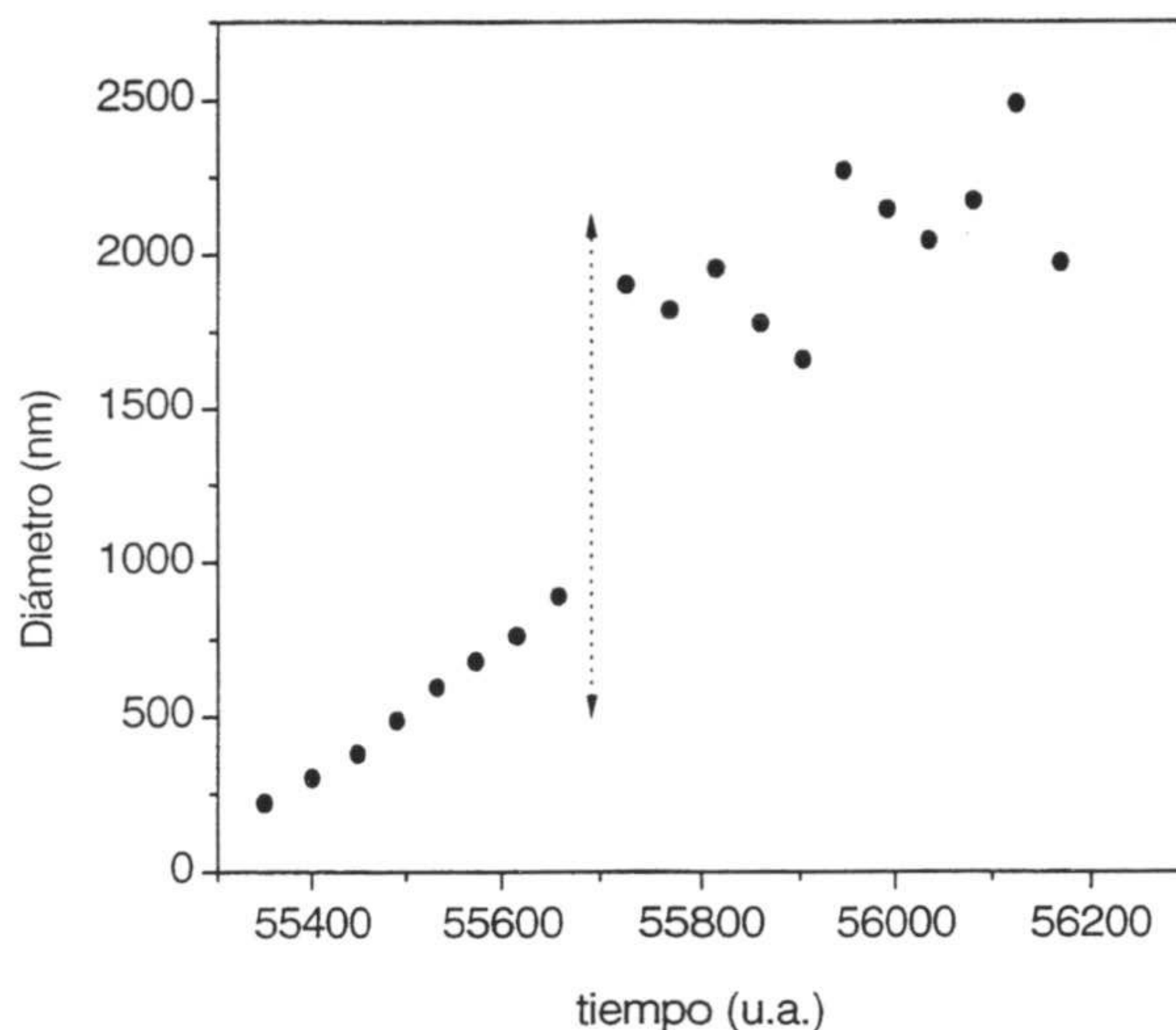
Para esta concentración de electrolito superior a la *c.c.c.* la agitación realizada sí ha afectado a la cinética de agregación. Al agitar (línea punteada), el tamaño medio de agregado aumenta considerablemente. Este resultado es de esperar si suponemos que la agregación está ocurriendo en un mínimo primario profundo y que el proceso está controlado por la difusión de las partículas. Para esta concentración de electrolito no debe existir barrera energética por corresponder al régimen de agregación rápida. Al agitar se incrementan las colisiones entre partículas facilitando la agregación (*Russel et al., 1989; Hoekstra et al., 1992*). Así por ejemplo, *Zollars (Zollars et al., 1986)* encontró que un látex estable frente a la agregación Browniana durante 4 años, coagulaba en unos minutos al someterlo a fuertes agitaciones.

Todos estos resultados están de acuerdo con la idea de que las partículas del látex desnudo están agregando en un mínimo primario profundo, no existiendo reversibilidad en la agregación ni ruptura de agregados.

La constante cinética de agregación bajo agitación (suponiendo flujo laminar) vale  $4G(a_i+a_j)^2/3$ , siendo  $G$  el gradiente de velocidad, y  $a_i$  el radio del agregado  $i$  (*Elimelech et al., 1995*). El grado de intensificación de la agregación depende tanto de la intensidad de la agitación como del radio de los agregados que van a colisionar. Así pues el comportamiento de la cinética de agregación después de la agitación va a depender del momento en el que se realice ésta (diferentes valores de  $a_i$ ). Análisis teóricos sobre agregación bajo condiciones de agitación han puesto de manifiesto que el efecto de la perturbación depende fuertemente de la naturaleza de las interacciones entre partículas (*van de Ven, 1977; 1982*). Si la agregación está ocurriendo en un mínimo profundo, al agitar no se le comunica a las partículas la energía suficiente como para escapar del mínimo, no ocurriendo la fragmentación de agregados.

Resultados semejantes se han obtenido para las concentraciones de electrolito de 409, 480, 556 e incluso para 370 mM (figura IV.10), una concentración algo inferior a la *c.c.c.* del látex. La barrera energética correspondiente a esta concentración ha de ser muy pequeña por estar próxima a la *c.c.c.* Al agitar las partículas pueden superar esta pequeña barrera, disparándose el tamaño medio de los agregado.





**Figura IV.10.** Influencia de la agitación sobre la agregación del látex a 370 mM NaCl.

Sin embargo, cuando estos experimentos se realizaron para el complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> los resultados fueron bien distintos.

En primer lugar comencemos viendo los datos para el complejo a pH 6.8 y para una concentración de NaCl inferior a la *c.c.c.* (30 mM, figura IV.11), intermedia a la *c.c.c.* y *c.s.c.* (100 mM, figura IV.12) y superior a la *c.s.c.* (186 mM, figura IV.13).

La agitación provoca la fragmentación de los agregados, disminuyendo su tamaño medio medido por PCS. La fragmentación existe para todas las concentraciones de electrolito, sean de la zona DLVO o de la no-DLVO, en régimen de agregación lenta ó rápida. Es interesante observar en las figuras IV.11, IV.12 y IV.13 como la cinética de la agregación es la misma antes y después de la agitación.

Posiblemente las partículas están agregando en un mínimo poco profundo, tanto en régimen de coagulación lenta como rápida. Al agitar la muestra se le comunica energía a las partículas, que pueden escapar del mínimo rompiéndose los agregados. Finalizada la agitación las partículas vuelven a agregar en el mismo mínimo con idéntica cinética.

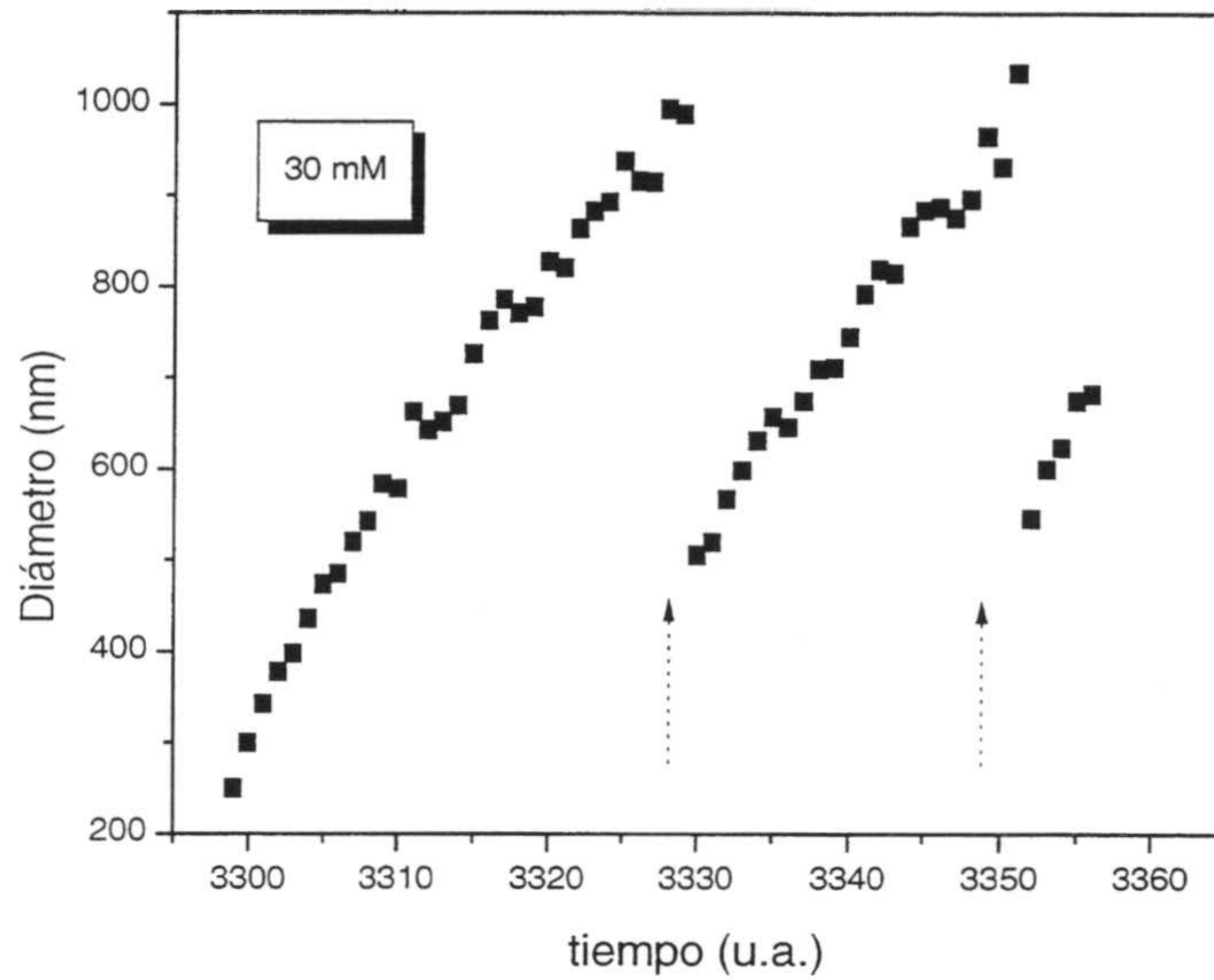


Figura IV.11. Influencia de la agitación sobre el complejo a pH 6.8 y 30 mM NaCl.

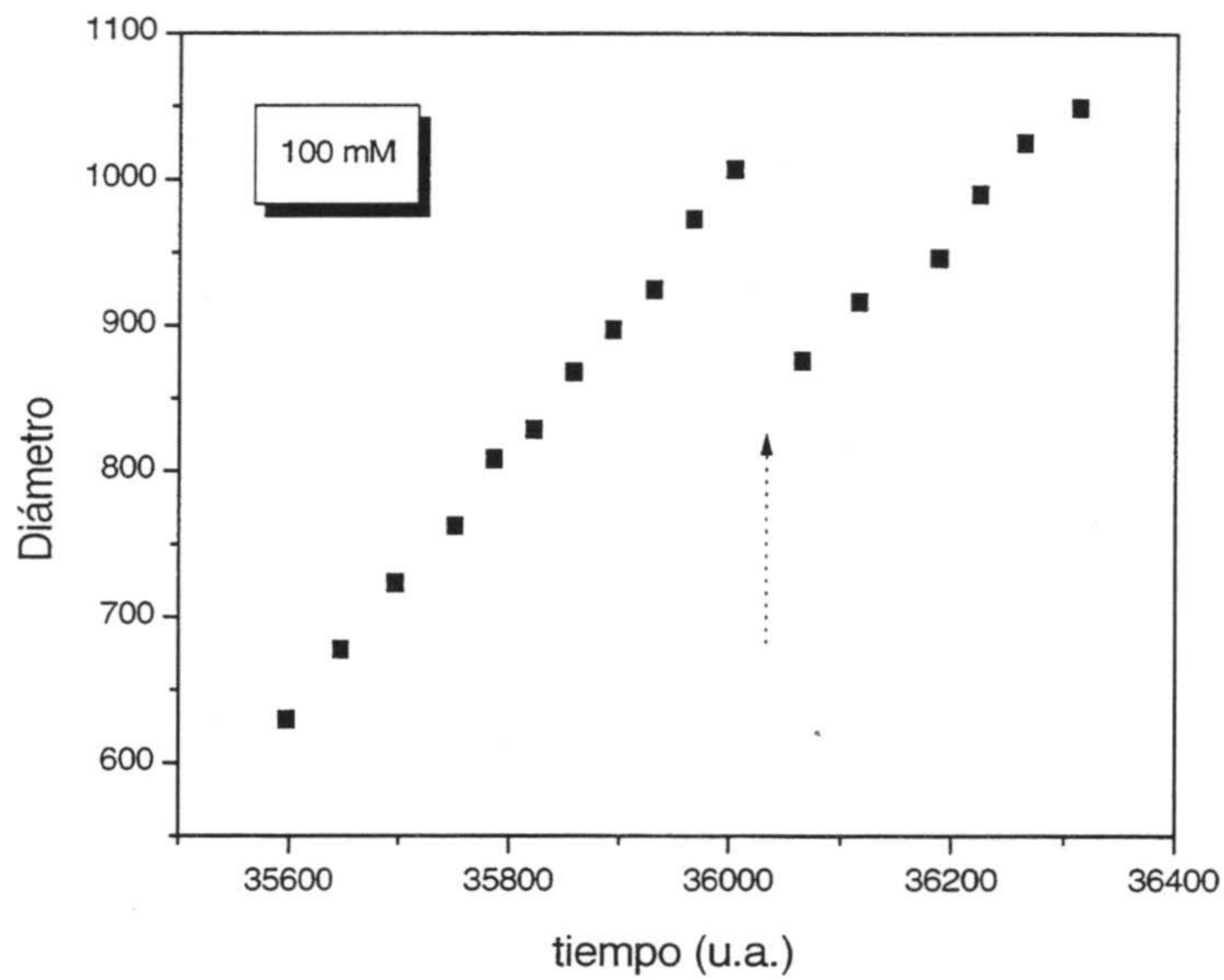
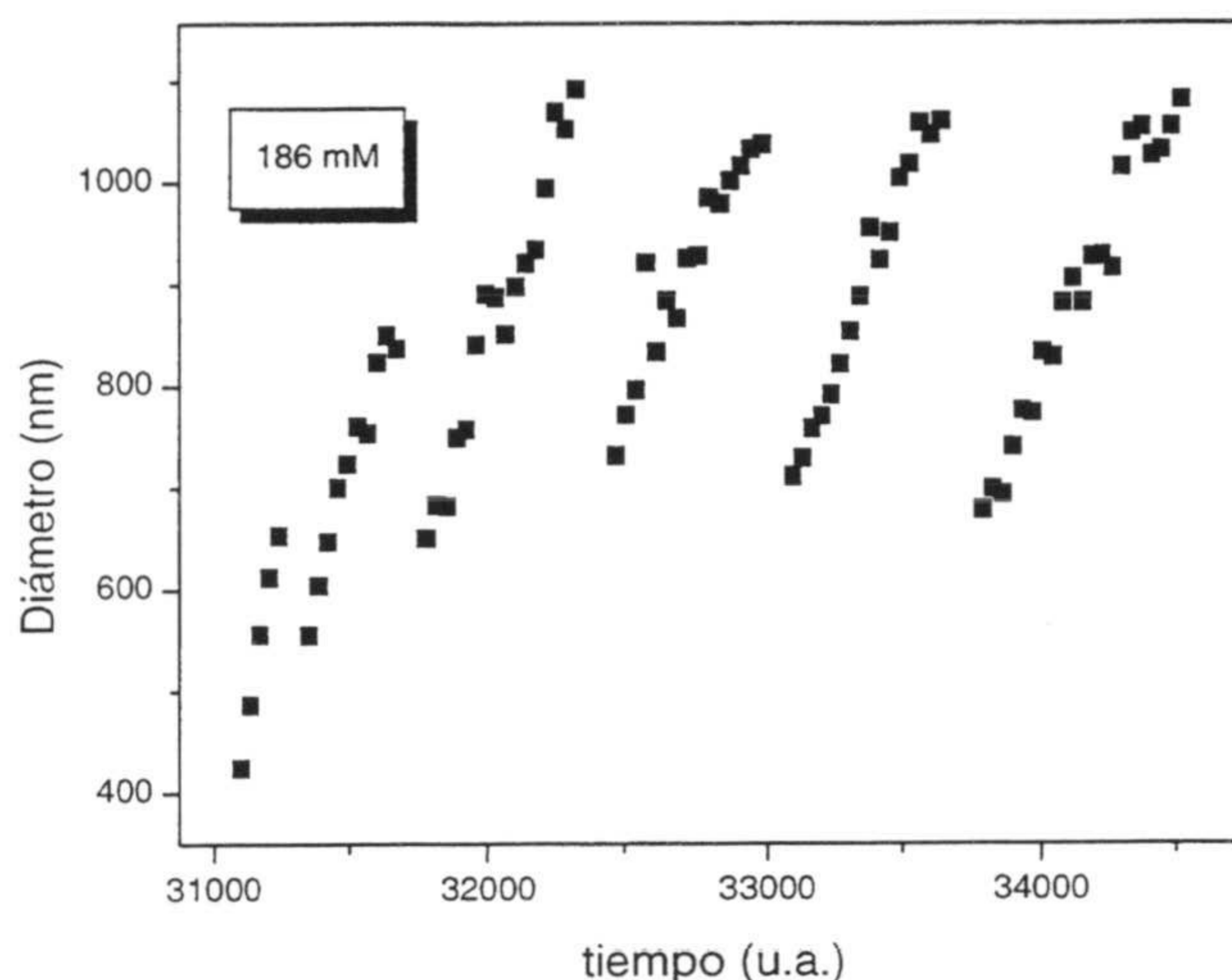


Figura IV.12. Influencia de la agitación sobre el complejo a pH 6.8 y 100 mM NaCl.



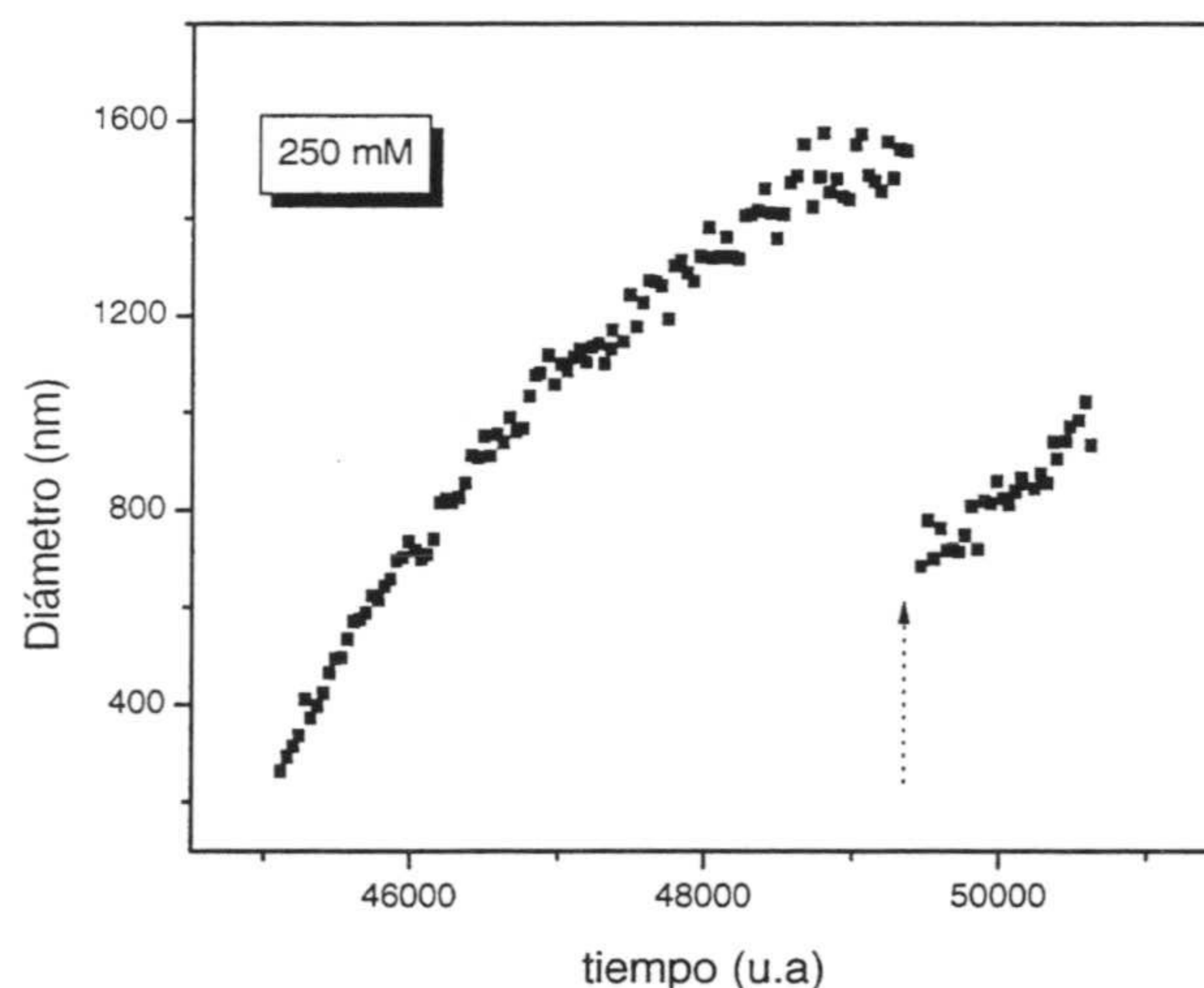
**Figura IV.13.** Influencia de la agitación sobre el complejo a pH 6.8 y 186 mM NaCl.

Ésto nos está indicando que el proceso que está ocurriendo es reversible: las partículas entran y salen del mismo mínimo energético.

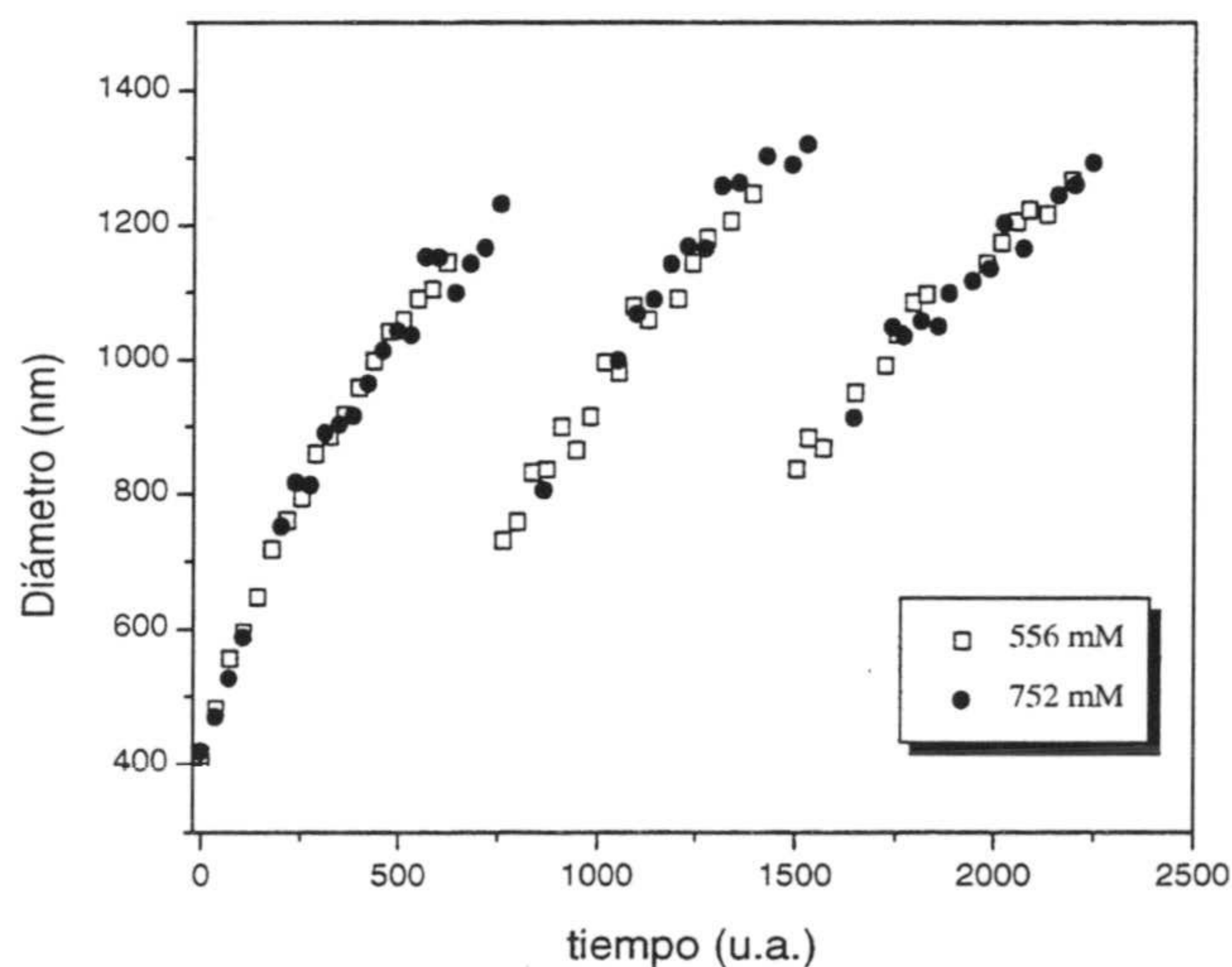
Para las demás concentraciones estudiadas (64 mM, 215 mM y 300 mM) se obtuvieron los mismos resultados.

Como se puede observar en la figura IV.13 el tamaño medio de agregado después de la agitación va a depender del valor de dicho tamaño antes de agitar. La fragmentación de los agregados dependerá de la intensidad de la agitación y de la “fortaleza” de los agregados (*Mühle et al., 1991; 1993*). Los resultados experimentales existentes sobre la ruptura de agregados por aplicación de fuerzas externas confirman que el fenómeno de fragmentación es muy complejo (*Glasgow et al., 1991*). Incluso el término “fortaleza de un agregado” no tiene una definición aceptada en la bibliografía. Intuitivamente esta fortaleza debe depender de las fuerzas atractivas y del número de contactos partícula-partícula en el agregado. Torres y col. (*Torres et al., 1991*), por ejemplo, proponen una expresión para modelar la ruptura de agregados grandes que depende de la constante de Hamaker y de la distancia de separación de las partículas en el mínimo primario.

A pH 2.3 el comportamiento del complejo ante la fragmentación es similar al de pH 6.8, tanto para concentraciones inferiores como superiores a la *c.c.c.* La figura IV.14 muestra los datos para una concentración de 250 mM, mientras que la figura IV.15 corresponde a 556 mM y 752 mM. Se observa en esta última que la cinética de agregación es igual para ambas concentraciones de sal, como debería ser si se considera que ambas corresponden al régimen de agregación rápida donde no hay barrera energética que dificulte la coagulación.



*Figura IV.14.* Influencia de la agitación sobre el complejo a pH 2.3 y 250 mM NaCl.



*Figura IV.15.* Influencia de la agitación sobre el complejo a pH 2.3 para 556 mM y 752 mM NaCl.

Puede ser interesante acometer trabajos futuros concernientes a la fragmentación de agregados por efecto de la temperatura, agitación ó agregación bajo condiciones de turbulencia... Como uno de los padres de la teoría DLVO apuntó hace unos años, “es necesario mejorar las teorías y realizar más experimentos sobre la floculación y desfloculación en condiciones de flujo para aprender más sobre las interacciones que tienen lugar entre las partículas coloidales” (*Overbeek, 1977b; 1982*).

Hemos supuesto que la distancia mínima de aproximación entre dos partículas que agregan es mayor para el caso del complejo látex-proteína que para el látex desnudo, debido a que en el primer caso las partículas están rodeadas de una capa de agua e iones hidratados que dificultan la aproximación. Si esto es así, cualquier parámetro que afecte a esta capa de moléculas debería influir en la constante de agregación rápida (pH, naturaleza del contraión...).

En el caso de partículas de látex sin proteína en su superficie ya vimos en el apartado anterior que el pH no influía en la constante de agregación rápida (ver tablas IV.1 y IV.2). Sin embargo, en el caso de un complejo látex-F(ab')<sub>2</sub> con 3 mg/m<sup>2</sup> de recubrimiento la constante cinética disminuye al aumentar el pH (ver tabla IV.4).

La misma conclusión se puede extraer de la siguiente tabla donde se muestran los valores de la constante de agregación rápida para dos complejos en función del pH. A pHs básicos, para los cuales aparecía la estabilización anómala por fuerzas de hidratación, existe adsorción específica de cationes hidratados que incrementa la distancia mínima de aproximación respecto a pH ácidos.

**Tabla IV.5** Constantes de agregación rápida para dos complejos S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> en función del pH.

Recubrimiento (mg/m <sup>2</sup> )	pH	K <sub>R</sub> x 10 <sup>12</sup> (cm <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> )
2.8	6.2	1.66
2.8	3.4	2.00
1.5	7.5	0.96
1.5	5.3	1.12
1.5	3.4	1.73

Hay que resaltar que la constante de agregación rápida, para un mismo pH, disminuye con el recubrimiento proteico. Este hecho puede ser debido al aumento de la rugosidad superficial del complejo al disminuir la cantidad de proteína adsorbida. Como ya se ha apuntado, esta rugosidad disminuye el área efectiva de contacto, afectando a la distancia mínima de aproximación (*Elimelech et al., 1995*).

No parece que la floculación por puenteo sea importante en estos complejos, ya que, en caso contrario, la constante de agregación debería ser máxima a recubrimientos intermedios (1.5 mg/m<sup>2</sup>, ya que el máximo recubrimiento era 3.2 mg/m<sup>2</sup>).

Otro parámetro estudiado ha sido la naturaleza del contraión que rodea a las partículas y forma parte de la doble capa eléctrica. Cuando la densidad de carga neta de los complejos es negativa, pHs básicos, el catión presente en la disolución actúa como contraión. En el caso de coloides liofóbicos, la constante de agregación rápida era la misma para cationes monovalentes y divalentes (ver tabla IV.3). Sin embargo, cuando se han obtenido las constantes de agregación para un complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> con 2.6 mg/m<sup>2</sup> a pH 7.1 se ha observado una cierta dependencia con el tipo de contraión. Los datos aparecen en la tabla IV.6, donde queda claro la influencia del catión empleado en la constante rápida de agregación de los complejos.

Dentro de cada valencia, la constante aumenta al disminuir el tamaño del catión. Aunque pueda parecer contradictorio el hecho de que para los cationes divalentes la constante sea mayor, la posible explicación la podemos encontrar en que los diagramas de potencial de interacción son diferentes para cationes monovalentes y divalentes.

**Tabla IV.6** Constantes de agregación rápida para un complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> con 2.6 mg/m<sup>2</sup> a pH 7.1 en función del tipo de contraión.

Catión	$K_r \times 10^{12} \text{ (cm}^3 \text{ s}^{-1}\text{)}$
Na <sup>+</sup>	1.17
Cs <sup>+</sup>	1.41
Mg <sup>2+</sup>	1.84
Ca <sup>2+</sup>	1.90

En la siguiente tabla se muestran los valores de la constante de agregación rápida para un complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> con 2.8 mg/m<sup>2</sup> a pH 3.4 y 6.2 en función del tipo de sal empleada en la coagulación.

**Tabla IV.7** Constantes de agregación rápida para un complejo S4CS9-F(ab')<sub>2</sub> con 2.8 mg/m<sup>2</sup> a pH 3.4 y pH 3.2 en función del tipo de sal utilizada.

Anión	pH 3.4	pH 6.2
	K <sub>r</sub> x 10 <sup>12</sup> (cm <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> )	K <sub>r</sub> x 10 <sup>12</sup> (cm <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> )
Cl <sup>-</sup>	2.00	1.66
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.97	1.03
ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1.90	0.48

A pH 3.4 la carga del complejo es positiva con lo que los aniones están actuando como contraiones. A este pH la constante disminuye muy ligeramente al aumentar el tamaño del anión. Llama la atención que a pH 6.2, donde los cationes son los contraiones, el tamaño del anión llegue a influir más en la constante cinética que a pH 3.4. Zhu y col. (Zhu et al., 1995) han observado que la constante de agregación para partículas de látex recubiertas por óxido de polietileno y por N-poliisopropilacrilamida también disminuye con el tamaño del anión presente en la sal (NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaI y NaSCN). La explicación de estos autores radica en que el electrolito más hidratado, aquel cuyo anión es pequeño (NaCl), provoca una mayor deshidratación de las cadenas del surfactante adsorbido sobre las partículas.

En definitiva, todos aquellos parámetros que pueden influir en la estructura de la doble capa de una partícula coloidal están afectando a la constante de agregación rápida de complejos látex-proteína, y no a la del látex desnudo.

#### 4. Morfología de los agregados: dimensión fractal

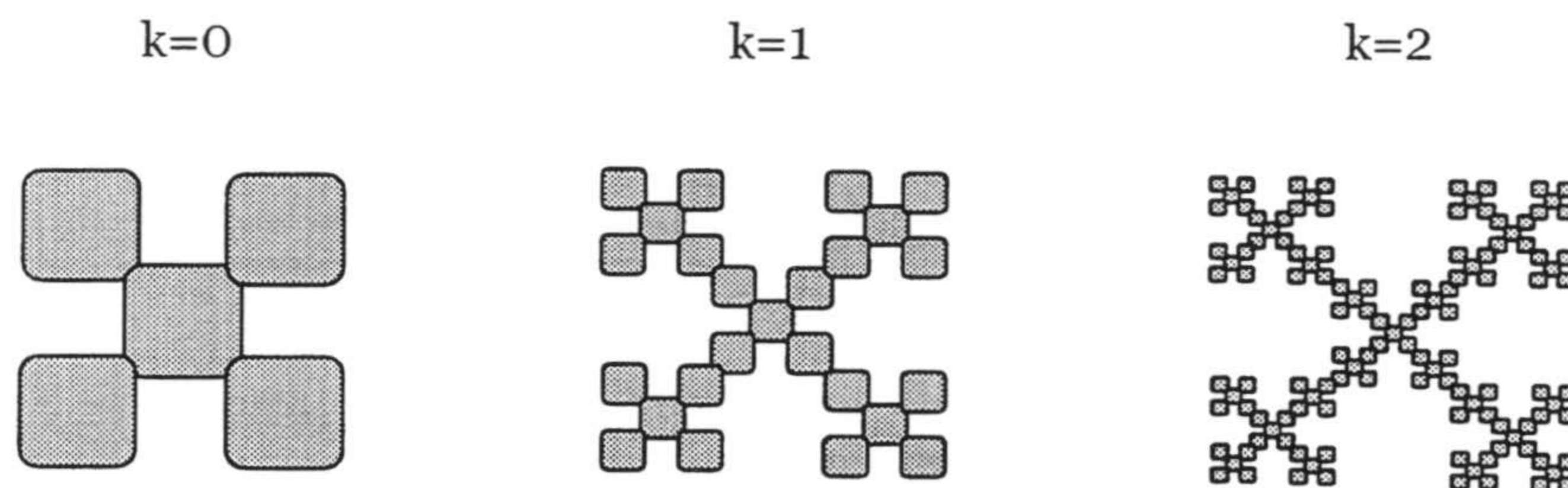
En la última década numerosos físicos y matemáticos han trabajado en problemas relacionados con el “orden dentro del caos”. En numerosas áreas de la ciencia se pueden encontrar estructuras comunes que se caracterizan por tener un tipo especial de geometría. Estas estructuras son consideradas como objetos **fractales**.

El concepto de fractal fue introducido por Benoit Mandelbrot (*Mandelbrot, 1974; 1980; 1982; 1986*) en los años setenta. Su aproximación se basa esencialmente en la teoría geométrica de la medida, y se aplica a problemas de diversas áreas de la ciencia en los que la geometría diferencial no aporta solución.

Un importante campo donde el concepto de objeto fractal se aplica es en los fenómenos de crecimiento alejados del equilibrio. Estos fenómenos son muy comunes en numerosas ramas de la ciencia, lo que ha impulsado fuertemente el desarrollo de la teoría fractal (*Vicsek, 1992*).

Los fractales son objetos matemáticos que se originan a través de la iteración infinita de un proceso matemático, generalmente, de naturaleza muy simple. Por ejemplo la figura IV.16 corresponde a un fractal obtenido por repetir dos veces una misma imagen ( $k=2$ ) a diferentes escalas. Este fractal puede ser utilizado como modelo de un agregado de partículas coloidales que está creciendo, donde cada cuadrado puede corresponder a una partícula coloidal.

Estos fractales matemáticos son fáciles de construir aunque tengan una apariencia compleja.



**Figura IV.16.** Ejemplo de fractales matemáticos en dos dimensiones con diferentes tamaños y escalas.

Supongamos una circunferencia que rodea a la primera imagen de esta figura. Su diámetro, en unidades de cuadrado, será 3, mientras que el número de cuadrados existentes dentro de la circunferencia es 5. Rodeemos la segunda imagen con otra circunferencia. En este caso el diámetro es 9 y el número de cuadrados es 25. Realizando la misma operación en la tercera imagen se obtiene un diámetro de 27 y 125 cuadrados.



Si nos fijamos se obtiene la misma relación (1.46) entre el log del número de cuadrados inscritos en la circunferencia y del diámetro de la misma:

$$\frac{\log 5}{\log 3} = \frac{\log 25}{\log 9} = \frac{\log 125}{\log 27} = 1.46$$

O lo que es igual, el número de cuadrados de tamaño  $a$  inscritos en una circunferencia de radio  $R$  vale (*Bremer et al., 1989*):

$$N_p = \left(\frac{R}{a}\right)^{d_f} \quad (\text{IV.8})$$

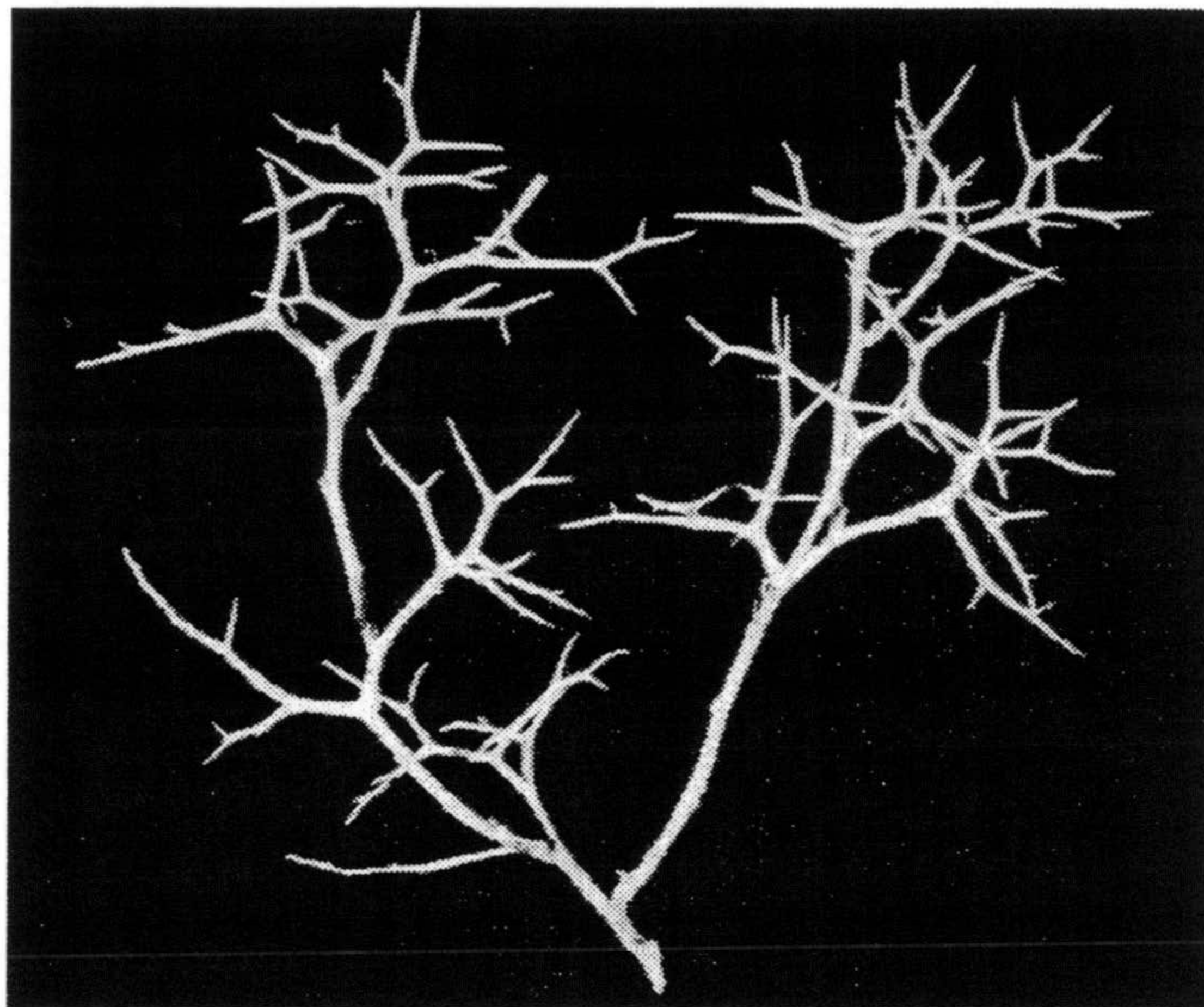
donde  $d_f$ , es la dimensión fractal que permite caracterizar la geometría del objeto. En nuestro caso  $d_f$  vale 1.46, que como vemos es una fracción de la dimensión euclídea correspondiente (un plano 2). Así pues, la dimensión fractal nos está dando idea del espacio que ocupa el objeto.

Por otra parte, si cortamos una parte de la imagen tercera de la figura IV.16 y aumentamos la escala se obtiene la segunda imagen. Esta importante propiedad de autosimilaridad es característica de los fractales (*Weitz et al., 1984a*) e implica que el sistema es invariante al cambiar la escala espacial de observación (escalado espacial).

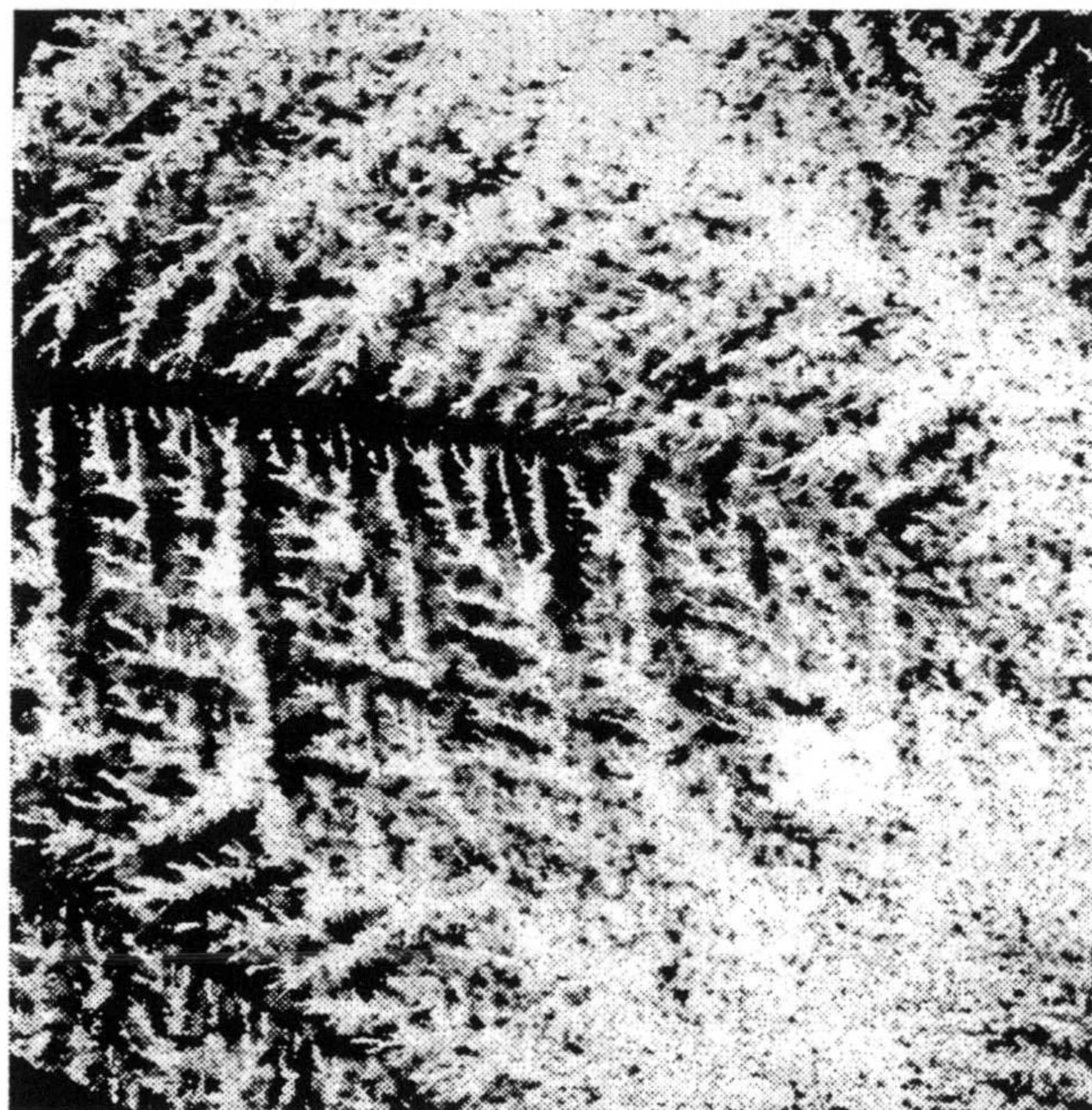
La importancia del concepto de fractal radica en que numerosas estructuras, que podemos encontrar en la naturaleza, pueden ser consideradas como fractales. Por ejemplo, la distribución de las galaxias, la superficie de las nubes, el relieve de las montañas ó incluso las ramas de los árboles.

Las siguientes fotos corresponden a fractales naturales, uno macroscópico y otro microscópico, en las que se pueden observar la existencia de la propiedad de autosimilaridad. La figura IV.17 corresponde a una rama de arbusto y la IV.18 a la cristalización de la proteína reactiva C (PCR) obtenida por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Como se puede observar en estas imágenes, los fractales físicos presentan un carácter más aleatorio que los matemáticos y carecen de un alto nivel de simetría debido a las siempre presentes fluctuaciones. La aleatoriedad, ramificación y baja densidad son propiedades significativas de los fractales físicos.



*Figura IV.17. Rama de un arbusto.*



*Figura IV.18. Cristalización de la proteína reactiva C (PCR) observada por TEM.*

Los procesos de agregación se han estudiado durante mucho tiempo en base a su cinética de agregación (factor de estabilidad, constantes de agregación, potenciales de interacción...). En los últimos años el estudio del fenómeno de la agregación ha experimentado un especial auge gracias a los avances producidos en dos áreas diferentes: i) la teoría fractal y la noción de leyes de escalado; ii) las simulaciones numéricas empleando leyes simples de crecimiento para generar agregados.

Cuando las partículas coloidales están agregando se forman agregados ó clúster que pueden adoptar infinidad de formas posibles. En el caso más simple de dos partículas iguales que colisionan no existe duda de la estructura del dímero formado. Sin embargo, una tercera partícula se podrá unir al dímero en diferentes direcciones, complicándose considerablemente las estructuras posibles al ir aumentando el tamaño del clúster. En un caso real de agregación, un clúster puede contener cientos o incluso miles de partículas primarias siendo imposible predecir su estructura. No obstante, gracias al concepto matemático de fractal se ha podido obtener información sobre la estructura interna de estos clúster considerados durante muchos años como formas complicadas (*Pynn et al., 1986*).

Desde los primeros estudios de Forrest y Witten (*Forrest et al., 1979*) sobre los clúster formados por partículas de humo, y posteriormente a raíz de las simulaciones por ordenador (*Witten et al., 1981; 1983; Meakin, 1983a; 1983b; 1983c*), los agregados coloidales son considerados como objetos fractales. Forrest y Witten fueron los primeros en interpretar la agregación en términos de leyes de escalado, utilizando para ello la función de correlación de densidad:

$$g(r) = \left\langle \rho \left( \vec{r}_0 + \vec{r} \right) \rho \left( \vec{r}_0 \right) \right\rangle - \left\langle \rho \left( \vec{r} \right) \right\rangle^2, \quad r = \left| \vec{r} \right| \quad (\text{IV.9})$$

que corresponde al valor esperado de que dos puntos separados una distancia  $\vec{r}$  pertenezcan a la estructura. Esta expresión da la probabilidad de encontrar una partícula en posición  $\vec{r}_0 + \vec{r}$ , si hay otra en  $\vec{r}_0$ . En esta expresión  $\rho$  es la densidad local. La función de correlación de la densidad decrece según una ley de potencias en  $r$ :

$$g(r) \propto r^{-A} \quad (\text{IV.10})$$

siendo  $A \approx 0.3$ .

En el caso de fractales que crecen, la masa del agregado presente en un radio  $R$  en una dimensión euclídea  $D$  vale:

$$M(R) \propto \int_0^{\infty} g(r)r^{D-1} dr \propto R^{d_f} \quad (\text{IV.11})$$

O sea, la masa del agregado escala con su tamaño, pudiéndose caracterizar de esta forma la morfología de los agregados a través la dimensión fractal,  $d_f$ . Así, una representación logarítmica de la masa frente al tamaño de los agregados ha de ser una línea recta cuya pendiente es la dimensión fractal. El valor de  $d_f$  será menor a 3, disminuyendo el valor cuanto más abierta sea la estructura que adopta el agregado.

Así por ejemplo, suponiendo que la figura IV.16 se puede utilizar como modelo de agregado coloidal, el número de partículas promedio ( $n$ ) contenidas en una esfera de radio  $r$  centrada en el agregado, dependerá del radio de las partículas primarias ( $R_0$ ) y de la dimensión fractal del clúster ( $d_f$ ) según la ecuación IV.8. El valor de  $r$  se suele suponer que coincide con el radio de giro del agregado  $R_g$ , definido como el segundo momento de la distribución de masas. El valor de  $n$  valdrá por lo tanto (Schaefer et al., 1984; Feder et al., 1984; Carpineti et al., 1990; Bremer et al., 1995):

$$n = \left( \frac{R_g}{R_0} \right)^{d_f} \quad (\text{IV.12})$$

Cuanto más compacto sea el agregado mayor será su dimensión fractal.

La ley de escalado dada por la ecuación IV.11 es válida a partir de un tamaño mínimo de clúster que contenga el suficiente número de partículas primarias como para que el agregado sea grande, pero finito.

La descripción fractal de los clúster asume implícitamente el uso de promedios por lo que los agregados coloidales son ejemplos de fractales estadísticos.

Diferentes propiedades, conectadas entre sí, van a caracterizar un proceso de agregación. Primero la dimensión fractal de sus agregados, que es reflejo de su geometría. Segundo la distribución de masa,  $N(M(t))$ , del clúster que nos da el número de clúster con masa  $M$  para un tiempo  $t$  si la agregación a comenzado para  $t=0$ . Un tercer parámetro importante es la evolución temporal del tamaño medio de agregado. Estas tres características están íntimamente relacionadas y permiten distinguir dos procesos límites de agregación coloidal llamados tradicionalmente como agregación

lenta y agregación rápida. Estos regímenes son conocidos actualmente como agregación controlada por reacción (RLCA) y agregación controlada por difusión (DLCA), respectivamente.

Los agregados formados a partir de partículas coloidales suelen ser muy ramificados y con baja densidad, dependiendo cuantitativamente su estructura de las condiciones experimentales bajo las que se generan y por lo tanto de la cinética de la agregación.

La estructura de los agregados depende fuertemente del mecanismo por el que se forman. La mayoría de los conocimientos que actualmente se tienen sobre la relación entre el mecanismo de agregación y la estructura resultante de los clúster están basados en resultados de simulaciones por ordenador de modelos de crecimiento.

Los primeros trabajos en este campo se deben a Vold (*Vold, 1959; 1963*) y Sutherland (*Sutherland, 1966*) quienes investigaron la agregación partícula-clúster por trayectorias lineales. A raíz de estos trabajos Witten y col. (*Witten et al., 1981*) propusieron un modelo simple que permitía describir procesos aleatorios irreversibles y generar fractales. Este modelo de agregación limitada por difusión es conocido como partícula-agregado (DLA) y consiste en: i) situar una partícula estacionaria en un punto de una red; lejos de ésta, se genera otra partícula que se acerca a la anterior con un movimiento aleatorio y se pega a ella de manera irreversible; iii) se genera otra nueva partícula en una posición aleatoria que se acerca a la inicial, cuyo tamaño va aumentando; iv) se repiten los pasos anteriores cientos de veces.

Este modelo explicaba un gran número de procesos interesantes (electrodeposición, ruptura eléctrica, etc), pero no describía la agregación coloidal de forma satisfactoria. El valor de la dimensión fractal obtenido por este modelo siempre era superior al experimental.

Posteriormente, Kolb y col. (*Kolb et al., 1983*) desarrollaron el modelo conocido como agregado-agregado (DLCA). Basándose en el modelo anterior, estos autores eliminaron la limitación de considerar la formación de agregados sólo por la unión de una partícula primaria con un agregado. De esta forma, las dimensiones fractales obtenidas teóricamente llegaron a coincidir con las experimentales. La simulación se inicia con un conjunto de partículas Brownianas, que se unen unas a otras cuando

entran en contacto, para formar estructuras mayores. Los nuevos agregados difunden junto con las partículas y continúan creciendo cuando se unen a otros agregados o partículas primarias.

Este último modelo es aplicable a la agregación rápida, donde la cinética está controlada por la difusión de las partículas y las partículas coagulan en un mínimo de potencial profundo. A partir del modelo DLCA también se puede describir la agregación lenta sin más que introducir un factor de probabilidad de agregación (RLCA). En este régimen no todas las colisiones son eficaces ya que existe una barrera energética que dificulta la aproximación entre las partículas.

Estos dos regímenes límites de agregación coloidal irreversible originan fractales con dimensiones bien diferentes. Los estudios teóricos arrojan un valor de  $d_f=1.78$  para el régimen DLCA y  $d_f=2.0-2.1$  para el régimen RLCA (Meakin, 1983d; Kolb et al., 1983; Weitz et al., 1984b; 1985; Ball et al., 1987; Wilcoxon et al., 1989; Lin et al., 1990a). Estos valores de la dimensión fractal vienen a indicar que los clúster formados durante un proceso controlado por difusión (DLCA) son más ramificados que los correspondientes a una agregación lenta ó controlada por reacción (RLCA). Cuando la eficacia de las colisiones es baja, las partículas o agregados necesitan colisionar más veces antes de unirse. Esto da la oportunidad de buscar diferentes configuraciones y de interpenetrar en la estructura.

Otro resultado interesante extraídos de los estudios teóricos es que la cinética de un proceso DLCA viene caracterizada por una ley de potencias para el crecimiento del radio medio de giro del agregado:

$$R_g \propto t^{1/d_f} \quad (\text{IV.13})$$

mientras que para un proceso RLCA el crecimiento es exponencial:

$$R_g \propto e^{\alpha t} \quad (\text{IV.14})$$

siendo  $t$  el tiempo y  $\alpha$  una constante que depende de la eficacia de la colisión y, por lo tanto, de las condiciones experimentales en las que se produce la agregación.

## 5. Obtención experimental de la dimensión fractal

Se pueden utilizar diferentes técnicas para obtener la dimensión fractal de un agregado, tales como el tratamiento de imágenes digitales en dos dimensiones. Pero sin lugar a dudas, los experimentos basados en la dispersión de luz por las estructuras fractales son los más empleados e interesantes por la gran variedad de posibilidades que permite esta propiedad de la luz. Se puede investigar i) el factor de estructura de un fractal concreto, ii) la dispersión producida por una serie de clúster que están creciendo con el tiempo, iii) la dispersión de una superficie fractal, etc.

En un experimento de dispersión estática de luz se obtiene la dependencia de la intensidad dispersada por la muestra  $I(q)$  con el vector de onda  $q$ , definido como:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin(\theta / 2) \quad (\text{IV.15})$$

siendo  $\lambda$  la longitud de onda del haz incidente en el vacío,  $n$  el índice de refracción del disolvente y  $\theta$  el ángulo de dispersión.

Si llamamos  $I_M(q)$  a la intensidad de luz dispersada por un clúster de masa  $M$ , la intensidad total dispersada por una distribución  $N(M)$  de agregados será:

$$I(q) = \sum_M N(M) I_M(q) \quad (\text{IV.16})$$

El valor de  $I_M(q)$  dependerá del producto entre el vector de onda  $q$  y el radio de giro del agregado  $R_g$  a través del conocido factor de estructura entre partículas,  $S(qR_g)$ . Así la ecuación IV.16 queda como (*Bezot et al., 1995*):

$$I(q) = \sum_M N(M) M^2 S(qR_g) \quad (\text{IV.17})$$

$S(q)$  se define como la transformada de Fourier de la función de correlación de densidad,  $g(r)$ , y su forma es complicada, dependiendo de la cinética de la agregación (*Teixeira, 1986; Schmidt, 1989*).

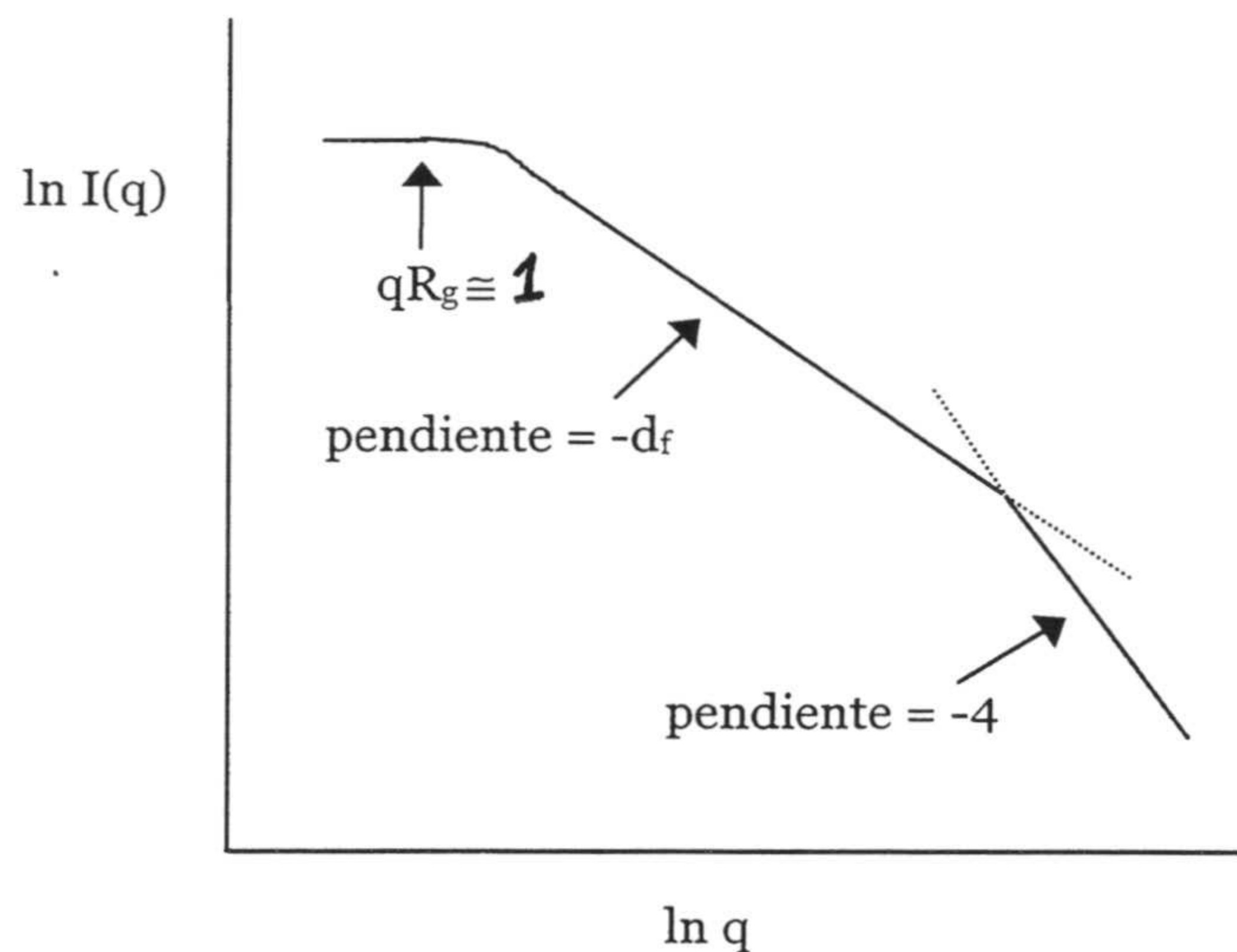
En un experimento de dispersión por una muestra con agregados fractales se pueden distinguir tres regímenes diferentes (*Vicsek, 1992*), tal y como muestra la figura IV.19.

- Zona 1 para  $qR_0 \gg 1 \gg qb$ : donde  $b$  una constante y  $R_0$  el radio de una partícula primaria. En esta región se cumple que  $I(q) \sim q^{-4}$  (ley de Porod).

- Zona 2 para  $qR_g \gg 1 \gg qR_0$ . En esta región se cumple que  $S(qR_g) = (qR_g)^{-d_f}$  (Martin et al., 1985) con lo que la ecuación IV.17 viene a indicar que:

$$I(q) \propto S(q) \propto q^{-d_f} \quad (\text{IV.18})$$

- Zona 3 para  $1 \geq qR_g$ . En esta región conocida como régimen de Guinier el agregado se comporta como una partícula simple cuando se ve desde un ángulo de dispersión pequeño.



**Figura IV.19.** Curva esquemática para los tres regímenes de dispersión de luz por un conjunto de agregados fractales.

La zona 2 es la que tiene un enorme interés práctico ya que la dimensión fractal se puede obtener de la pendiente de una representación logarítmica de  $I(q)$  frente a  $q$ .

Recientes estudios han mostrado que los agregados coloidales mantienen su carácter fractal hasta un cierto tamaño a partir del cual se vuelven inestables debido a las fluctuaciones térmicas o gravitacionales (Lin et al., 1990b).



## 6. Seguimiento de la cinética de agregación por dispersión dinámica de luz

Como se ha mencionado en varias ocasiones a lo largo de este trabajo, el radio hidrodinámico medio de los agregados durante un proceso de coagulación se puede obtener mediante espectroscopía de fotocorrelación (PCS) ó dispersión dinámica de luz. Esta técnica nos va a permitir obtener información dinámica del proceso de agregación coloidal.

Las ecuaciones IV.13 y IV.14 nos describen la evolución temporal del radio de giro de los agregados tanto para el régimen de agregación lento como para el rápido. Generalmente se suele aproximar el valor del radio de giro de un agregado con su radio hidrodinámico obtenido por PCS (*Bollet et al., 1987; Starchev et al., 1993; Zhu et al., 1995; Zhang et al., 1996*). Sin embargo esta aproximación es sólo válida cuando  $qR_g \ll 1$ . En caso contrario, el movimiento rotacional del agregado puede contribuir al decaimiento de la función de autocorrelación que permite calcular el radio hidrodinámico (*Lindsay et al., 1989; Hoekstra et al., 1992; Schurtenberger, et al., 1993*) con lo que se obtendría un coeficiente de difusión translacional mayor y la consecuente sobreestimación del diámetro hidrodinámico del agregado. Klein y col. (*Klein et al., 1990*) mediante simulación por ordenador han calculado el cociente entre el radio hidrodinámico de un agregado sin contribución de su rotación y el radio hidrodinámico influido por la rotación ( $R_h/R_z$ ) en función de  $qR_h$ . Como resultado de este estudio se obtuvo que  $R_h/R_z = 1$  para valores de  $qR_h \ll 1$ , aumentando rápidamente en el intervalo  $1 < qR_h < 5$  hasta alcanzar un valor constante de 2 para  $qR_h > 5$ .

Siguiendo un proceso de agregación mediante la medida del diámetro hidrodinámico medio de los agregados por PCS también se puede obtener un valor de la constante cinética de agregación rápida para los primeros estadíos (*Berg et al., 1992*):

$$k_R = \frac{1}{R_0 \beta n_0} \left[ \frac{dR_h}{dt} \right]_{t \rightarrow 0} \quad (\text{IV.19})$$

donde  $R_0$  y  $n_0$  son el radio y la concentración de partículas primarias, respectivamente y  $\beta$  un factor óptico que depende de  $R_0$ , del ángulo de dispersión y de la longitud de onda en el medio.

## 7. Morfología de agregados formados por partículas liofóbicas: látex MBO

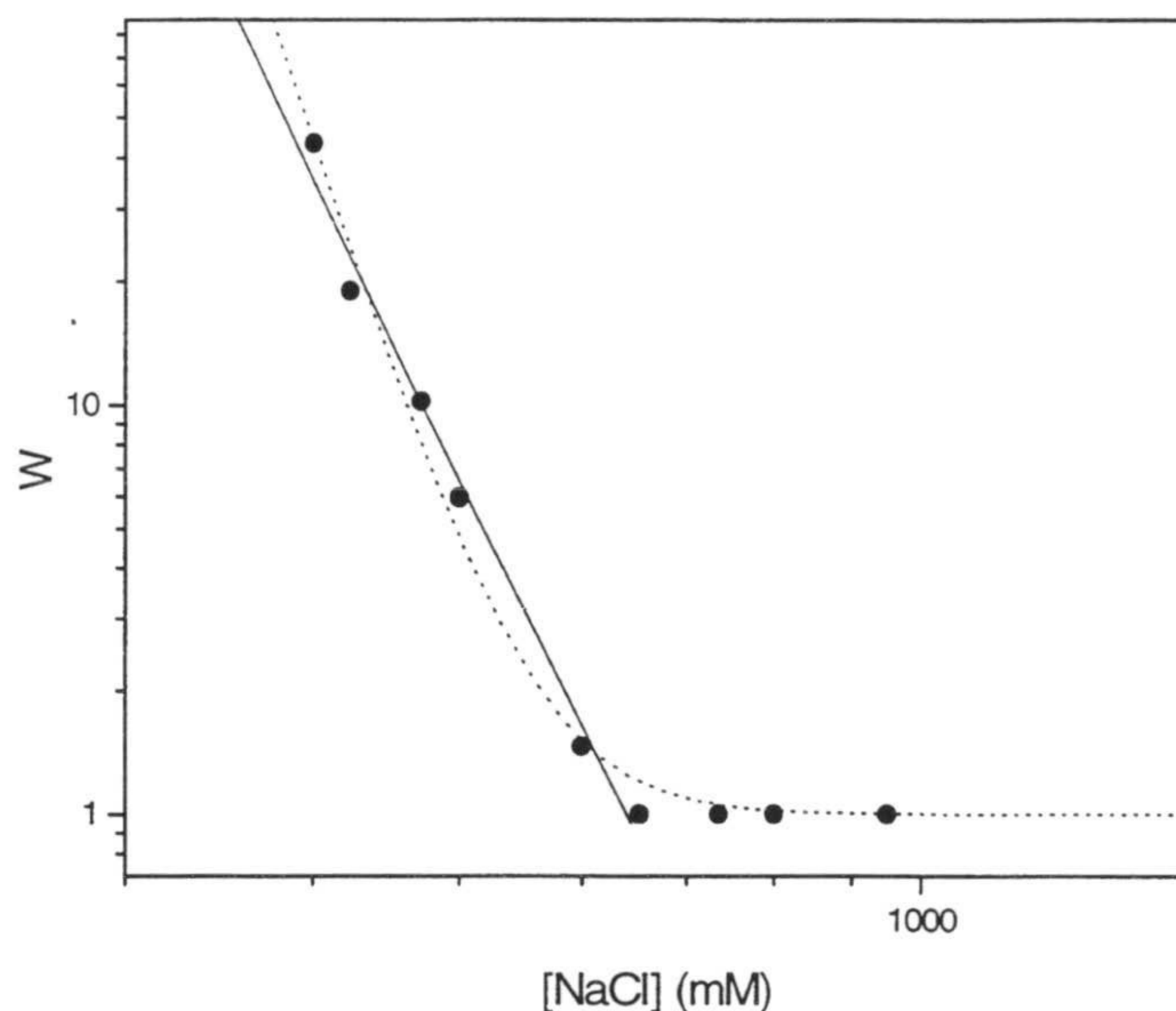
Para estudiar la morfología de agregados formados por partículas liofóbicas de poliestireno se ha empleado el látex más pequeño de que disponíamos y que hubiera sido sintetizado sin surfactante, el MBO con  $151 \pm 4$  nm de diámetro. Este último requerimiento se impone ya que algunos trabajos recientes muestran que la existencia de surfactante en la superficie de un látex puede afectar a la estructura de los agregados (*Zhu et al., 1994; Tirado, 1997*). Por otra parte, el intervalo de validez de la ecuación IV.18 ( $R_g^{-1} < q < R_0^{-1}$ ) que nos va a permitir obtener la dimensión fractal de los agregados, requiere el empleo de un látex pequeño. En nuestro caso el barrido angular que satisface la ecuación IV.18 cubre ángulos inferiores a  $50^\circ$ . El ángulo más pequeño empleado fue de  $15^\circ$ , así pues los datos experimentales corresponden al intervalo angular  $15^\circ$ - $50^\circ$ . A ángulos inferiores a  $15^\circ$  se produce la saturación del fotomultiplicador.

Los experimentos sobre la luz dispersada en función del ángulo de medida se han realizado con el sistema 4700c de Malvern Instruments, descrito en el capítulo I, a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Cada barrido angular se compone a su vez de dos subbarridos intercalados. El primero se realiza desde ángulos pequeños a ángulos mayores, con un determinado intervalo angular. A continuación se lleva a cabo el recorrido contrario pero a diferentes ángulos. El siguiente paso es intercalar ambos barridos y representar en escala logarítmica la intensidad dispersada en función del vector de onda. De esta forma se obtiene la dimensión fractal mediante el ajuste de la pendiente.

Pero antes de realizar los experimentos es necesario conocer el diagrama de estabilidad coloidal del látex para establecer las concentraciones de electrolito correspondientes al régimen de agregación lenta y rápida, delimitados ambos por la

concentración crítica de coagulación (*c.c.c.*). La estabilidad coloidal del látex MB0 se ha cuantificado mediante el factor de estabilidad obtenido midiendo las constantes de agregación en presencia de NaCl a pH 7 con el empleo del nefelómetro (figura IV.20).

Mediante el ajuste lineal de los datos de la región de agregación lenta se ha obtenido un valor de la *c.c.c.* de  $660 \pm 50$  mM. La línea punteada de la figura IV.20 corresponde al ajuste del factor de estabilidad a la expresión teórica, sin tener en cuenta el espesor de la capa de Stern en la expresión del potencial electrostático. Los valores del ajuste han sido  $A=0.58 \times 10^{-20}$  J y  $\psi_a = -28.4$  mV.

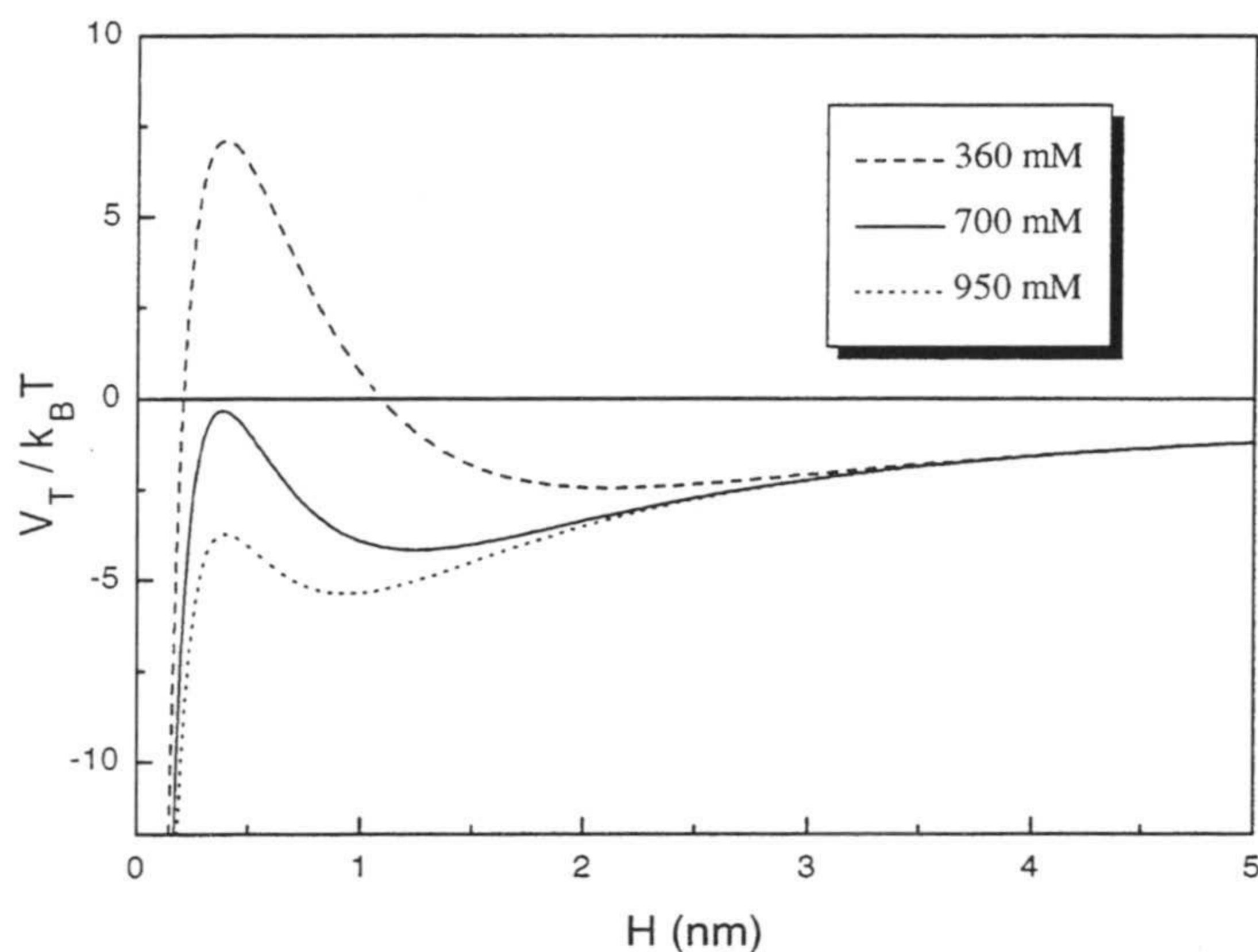


**Figura IV.20.** Estabilidad coloidal del látex MB0 a pH 7.

El diagrama de potenciales de interacción según la teoría DLVO (figura IV.20) para este látex, permite explicar los resultados experimentales sobre su estabilidad ya que la *c.c.c.* teórica coincide con la experimental.

El paso siguiente es buscar las condiciones óptimas para realizar los experimentos de dispersión estática de luz. En primer lugar la alineación del instrumento es crucial para garantizar las medidas experimentales. Es fundamental que el haz incidente cruce exactamente por el centro de la célula que contiene la muestra, y que el

fotomultiplicador esté enfocado también al centro del volumen de dispersión desde cualquier posición angular.

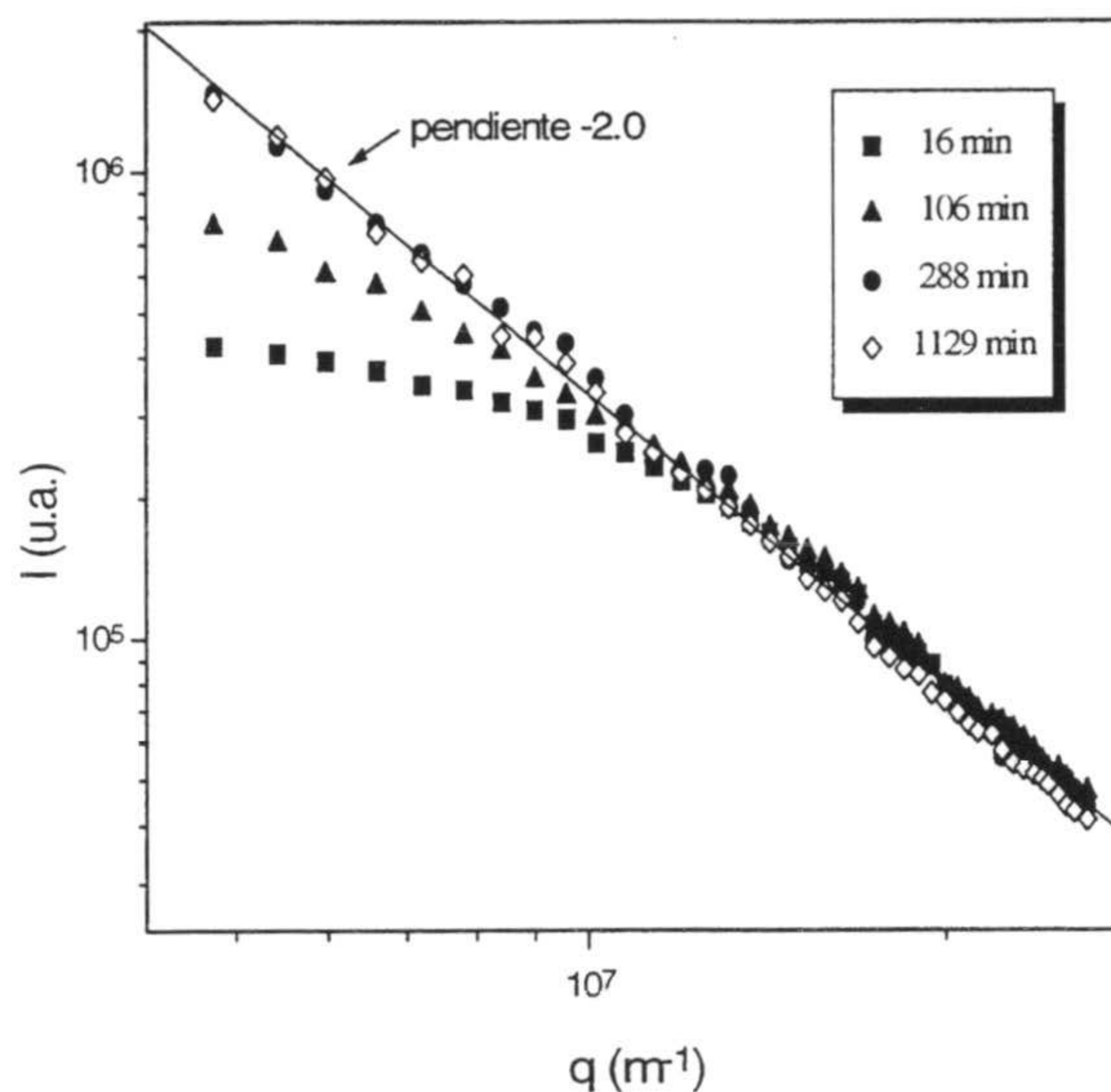


**Figura IV.21.** Potencial total de interacción para el látex MBO.

Otro aspecto importante es la minimización de efectos tales como la existencia de polvo, burbujas de aire, reflexiones, suciedad en las paredes de la célula...

La concentración óptima de partículas para realizar los experimentos es aquella en la que no existe dispersión múltiple, siendo la intensidad dispersada proporcional a la concentración. Para el látex MBO el intervalo óptimo de concentraciones es  $9 \times 10^8$ - $5 \times 10^{10}$  partículas/ml.

Como muestra la figura IV.22 (agregación del látex a 360 mM NaCl), durante el proceso de agregación la intensidad dispersada por los clúster va aumentando a lo largo del tiempo. A medida que transcurre la agregación los dispersores presentes en la muestra son cada vez más grandes, aumentando la luz dispersada. Pasado un tiempo determinado, la dependencia angular de la luz dispersada alcanza un comportamiento asintótico (Martin et al., 1990). En este momento se puede obtener información sobre la estructura de los agregados a partir de la pendiente.



**Figura IV.22.** Intensidad dispersada en función del vector de onda para la agregación del látex MB0 a diferentes tiempos en presencia de 360 mM NaCl.

En todos los experimentos que se van a mostrar en este trabajo la dimensión fractal era independiente del tiempo, una vez alcanzado el comportamiento asintótico, por lo menos hasta que la sedimentación de los clúster ocurría.

El experimento de la figura IV.22 corresponde a una concentración de electrolito inferior a la *c.c.c.* del látex. Para una concentración del régimen DLCA el tiempo necesario para observar el comportamiento asintótico de la luz dispersada es menor.

En la siguiente tabla aparece la dimensión fractal obtenida para este látex a una concentración de electrolito perteneciente al régimen RLCA, 360 mM NaCl, y otra del régimen DLCA, 950 mM. Los datos corresponden a la media de 5 experimentos diferentes para cada concentración de electrolito.

**Tabla IV.8** Dimensiones fractales para el látex MB0

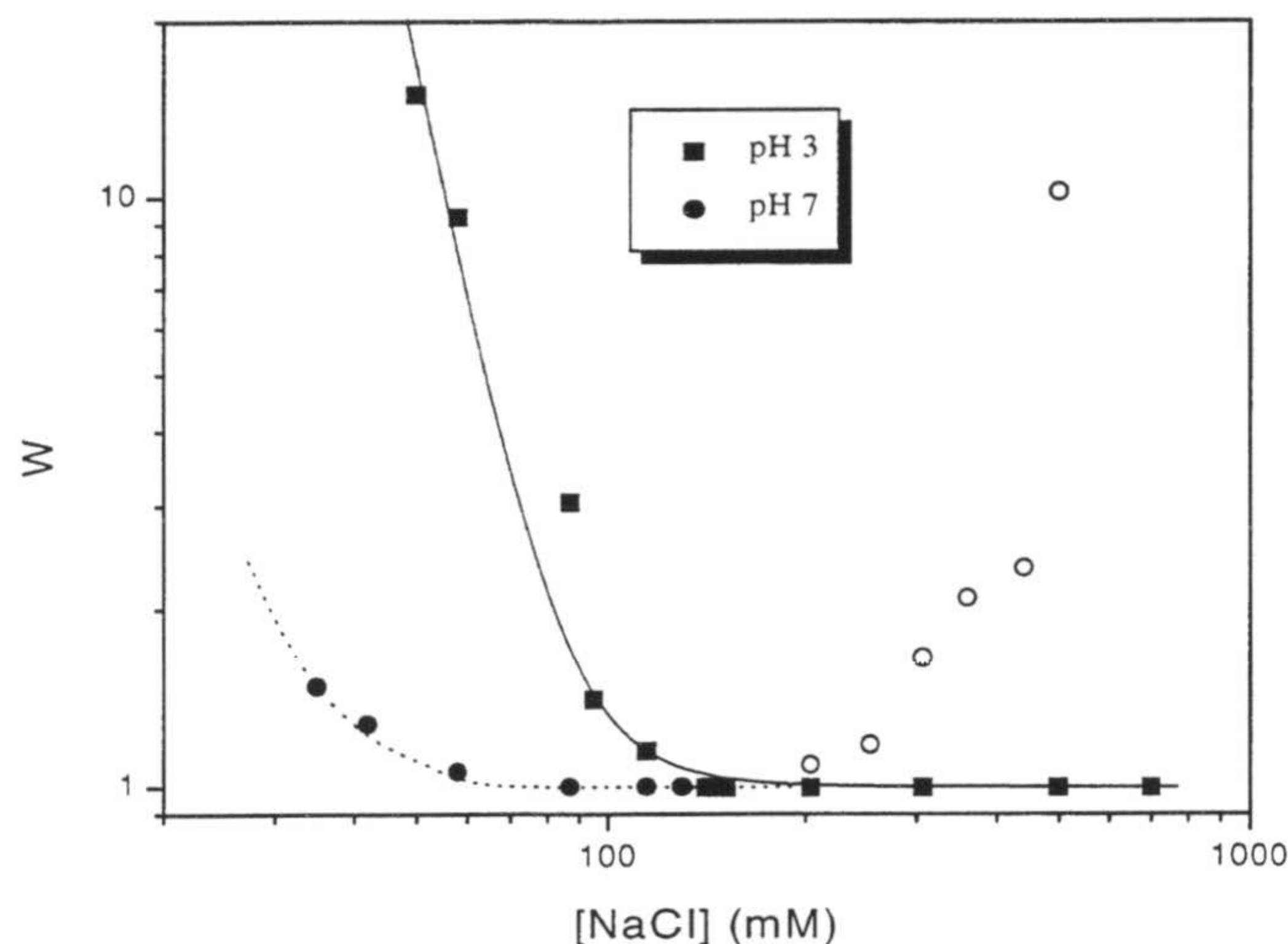
NaCl (mM)	$d_f$
360	$1.99 \pm 0.06$
950	$1.75 \pm 0.07$

Para la concentración de 360 mM, inferior a la c.c.c., la curva de potencial de interacción presenta una barrera energética (ver figura IV.21), la cual es responsable de que la probabilidad de que la colisión entre partículas conduzca a la formación de un agregado sea inferior a 1. En consecuencia, los agregados formados bajo estas condiciones de agregación lenta son compactos, obteniéndose además una dimensión fractal que coincide con la obtenida teóricamente por simulaciones para el régimen RLCA (2.0-2.1). Cuando la concentración de NaCl es de 950 mM no existe barrera energética en la curva de potencial (ver figura IV.21). La agregación está controlada por la difusión siendo todos los choques eficaces. Los agregados formados bajo estas condiciones son menos compactos que en RLCA como muestra la dimensión fractal obtenida que, por otra parte, está razonablemente próxima a la calculada teóricamente para DLCA (1.78).

### **8. Morfología de agregados formados por partículas liofílicas: complejo látex MBO-F(ab')<sub>2</sub>**

La mayoría de los estudios experimentales existentes en la bibliografía sobre estructura de agregados corresponden a partículas liofóbicas (*Sonntag et al., 1986a; Bollet et al., 1987; Cametti et al., 1989; Majolino et al., 1989*). En este apartado vamos a estudiar la morfología de agregados formados por partículas del látex MBO sensibilizadas con F(ab')<sub>2</sub>, y para ello se ha preparado un complejo con un recubrimiento de 2.6 mg/m<sup>2</sup>. Como electrolito para provocar la agregación del complejo se ha utilizado el NaCl. Dado que la estructura de los clúster va a depender del mecanismo de agregación, ésta se ha estudiado a pH 3 y a pH 7, con el fin de investigar el efecto de las fuerzas de hidratación.

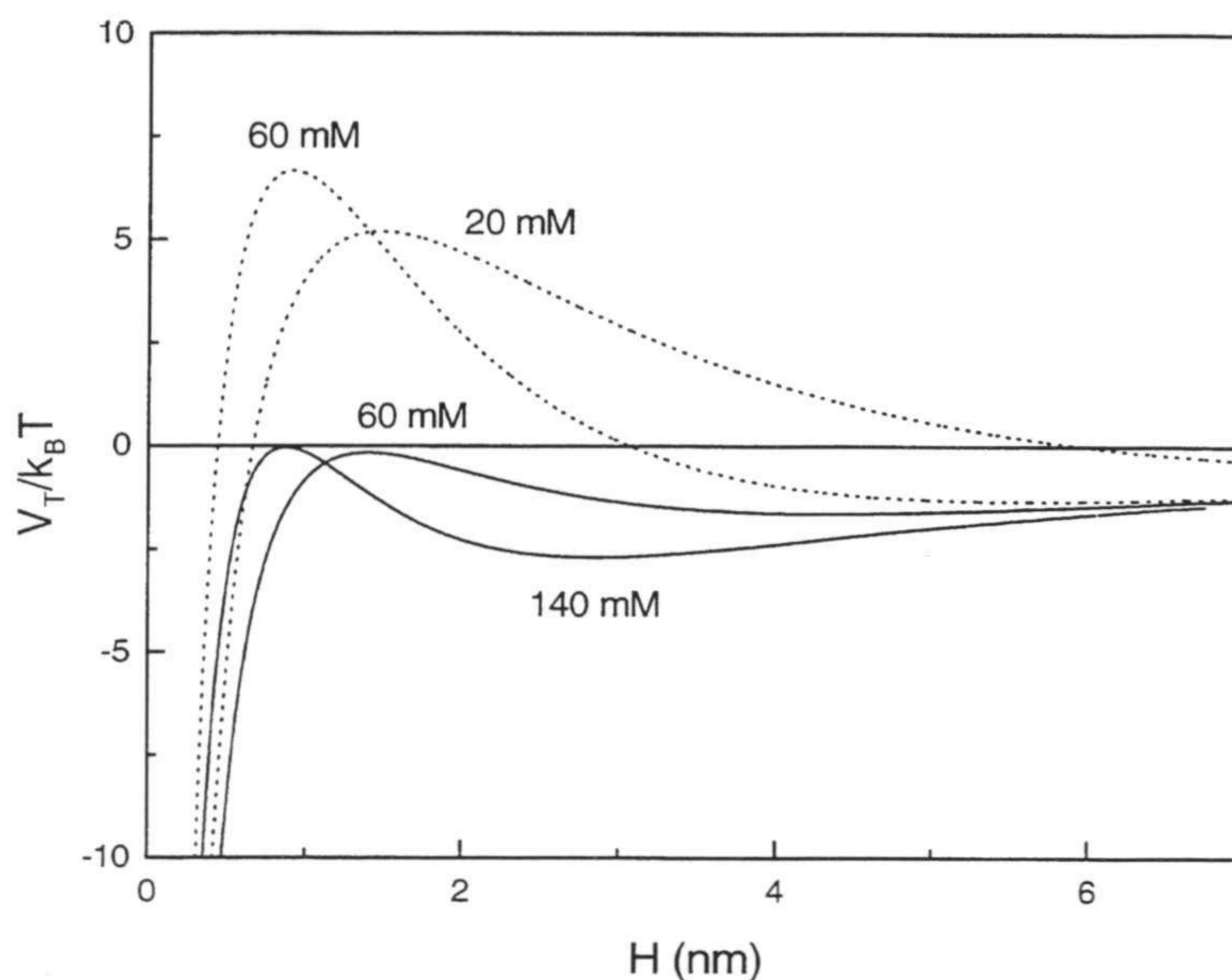
Como en el caso del látex desnudo es necesario estudiar previamente la estabilidad coloidal del complejo para establecer los diferentes regímenes de agregación desde el punto de vista cinético. En la figura IV.23 se muestran los diagramas de estabilidad del complejo MBO-F(ab')<sub>2</sub> para ambos pHs.



**Figura IV.23.** Estabilidad coloidal del complejo MBO- $F(ab')_2$  a pH 3 y pH 7 en presencia de NaCl.

De acuerdo con los resultados expuestos en el capítulo anterior, cuando el pH es superior al punto isoeléctrico de la proteína  $F(ab')_2$ , siendo la carga neta del complejo negativa, aparece la zona de estabilidad coloidal anómala no-DLVO atribuida a la existencia de fuerzas de hidratación. Sin embargo a pH 3 la estabilidad del complejo es la predicha por la teoría clásica DLVO, disminuyendo al aumentar la concentración de sal hasta alcanzar un máximo de inestabilidad que es constante con el contenido salino. A partir de los diagramas de la figura IV.23 se ha obtenido que la c.c.c. del complejo es de  $130 \pm 17$  mM a pH 3 y  $65 \pm 6$  mM a pH 7. Por otra parte el valor de la c.s.c. es  $175 \pm 20$  mM.

Las curvas que aparecen en la gráfica IV.23 corresponden al ajuste realizado utilizando la expresión teórica del factor de estabilidad (ecuación II.38). La expresión III.14, con  $A_{pp}$  de  $0.8 \times 10^{-20}$  J, se ha empleado para el potencial atractivo y la expresión II. 23 para el electrostático. Los valores del potencial difuso ajustado han sido -18 mV a pH 7 y 23 mV a pH 3. Los diagramas de potencial de interacción correspondientes permiten explicar la estabilidad del complejo a ambos pHs en la zona DLVO (ver Figura IV.24) ya que la barrera energética desaparece para aquellas concentraciones de electrolito correspondientes a la agregación rápida.



**Figura IV.24.** Potencial total de interacción para el complejo MBO- $F(ab')_2$  a pH 3 (líneas discontinuas) y a pH 7 (líneas continuas).

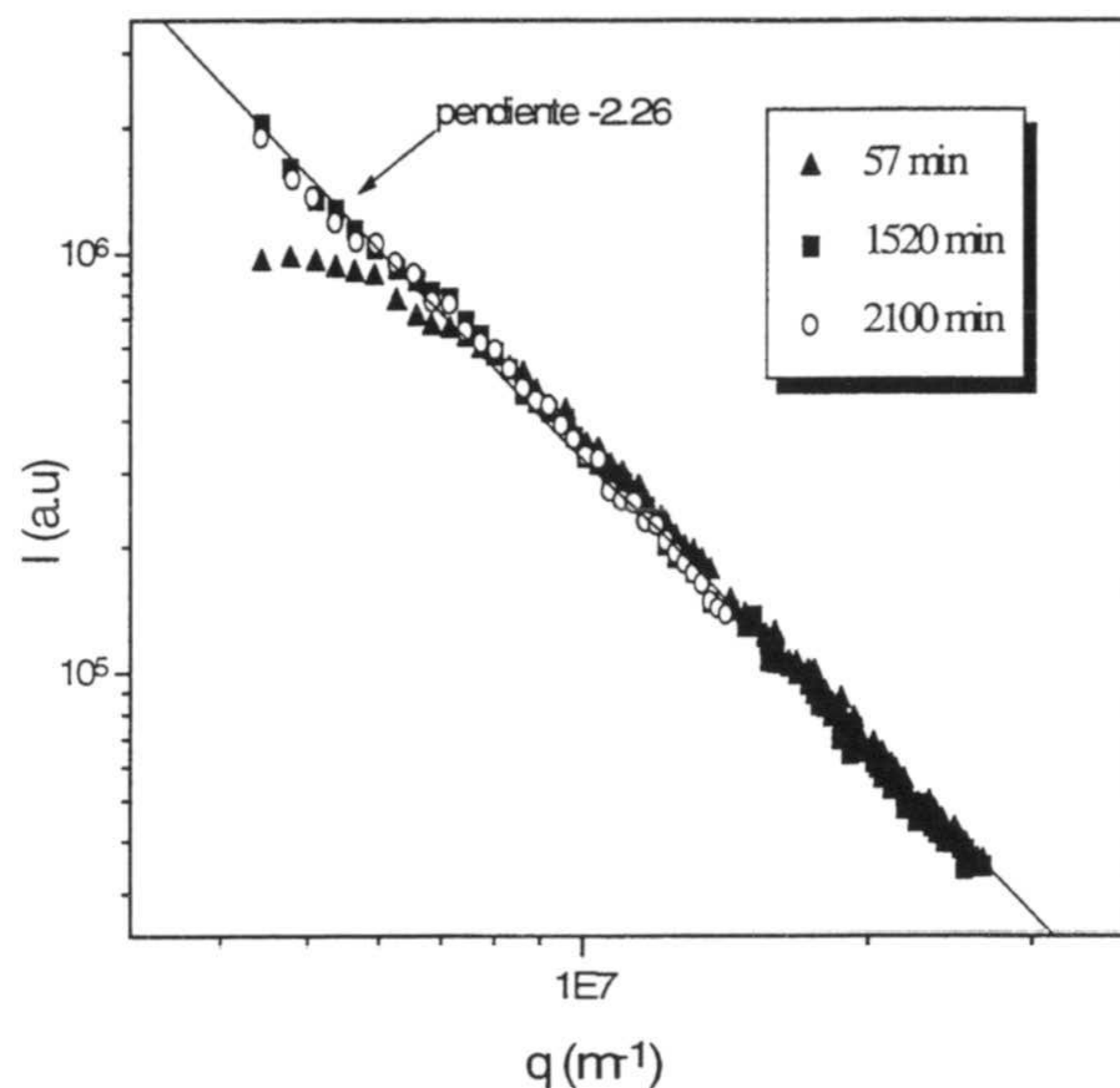
La concentración de partículas de complejo empleada en los experimentos de dispersión estática de luz para determinar la dimensión fractal fue similar a la utilizada para el caso del látex desnudo.

La figura IV.25 corresponde a la dependencia de la intensidad dispersada con el vector de onda para diferentes momentos de la agregación del complejo a pH 7 y 141 mM de NaCl.

El comportamiento asintótico se alcanza transcurrido cierto tiempo, indicando el carácter fractal de la estructura que tienen los agregados que se están formando.

La morfología de los agregados fue estudiada a pH 7 para las concentraciones de electrolito siguientes: 42 mM, 141 mM y 282 mM NaCl. La primera corresponde al régimen de agregación lenta DLVO, la segunda a la agregación rápida controlada por difusión, y la tercera al régimen lento no-DLVO. Para pH 3 se estudiaron dos concentraciones de NaCl, una inferior a la c.c.c. del complejo (150 mM) y otra superior (500 mM).





**Figura IV.25.** Intensidad dispersada en función del vector de onda para la agregación del complejo MB0- $F(ab')_2$  a diferentes tiempos en presencia de 141 mM NaCl a pH 7.

Los correspondientes valores de las dimensiones fractales obtenidas como resultado de la media de 5 experimentos diferentes aparecen en la siguiente tabla.

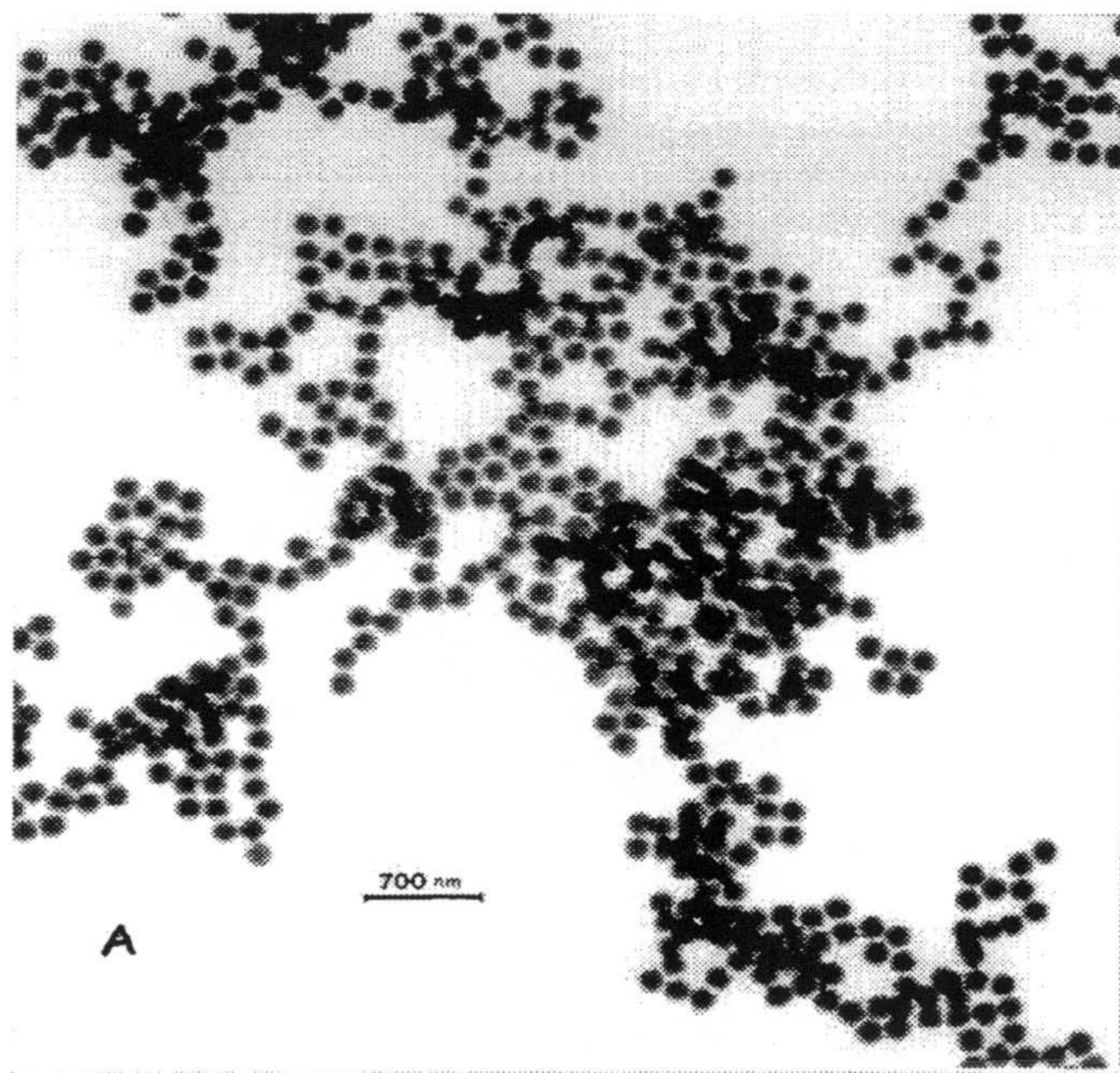
**Tabla IV.9** Dimensiones fractales para el complejo MB0- $F(ab')_2$ .

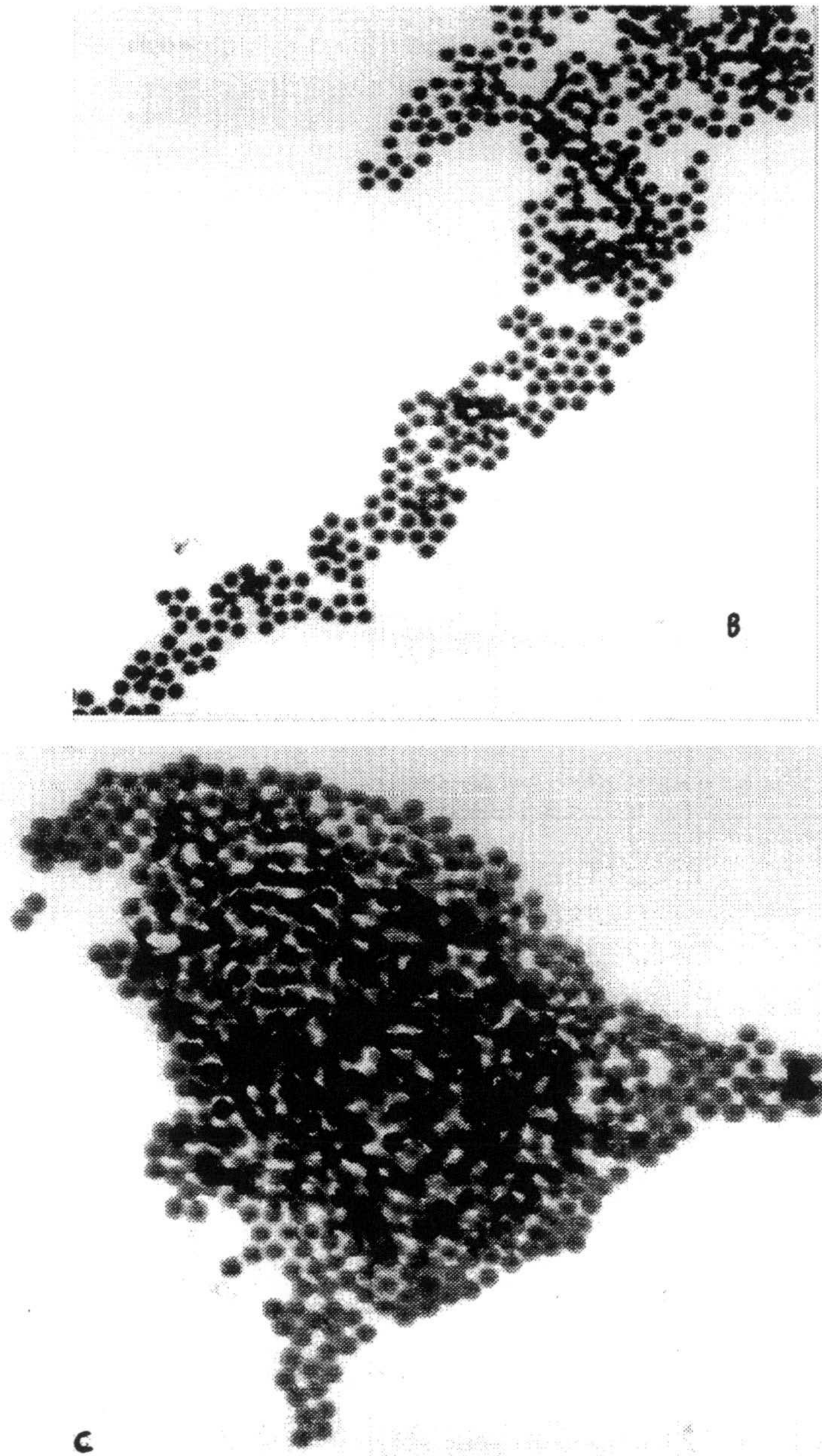
	NaCl (mM)	$d_f$
pH 3	150	$2.45 \pm 0.07$
pH 3	500	$1.82 \pm 0.07$
pH 7	42	$2.37 \pm 0.05$
pH 7	141	$2.26 \pm 0.04$
pH 7	282	$2.60 \pm 0.06$

Analizando detenidamente los datos de esta tabla llama la atención en primer lugar que todos los valores de dimensiones fractales obtenidos son superiores a los calculados teóricamente a partir de las simulaciones para DLCA y RLCA. Por otra parte, como era de esperar, la dimensión fractal es mayor en régimen de agregación

lenta que en rápida. La dimensión fractal obtenida para el látex desnudo en régimen de agregación rápida fue de 1.75 (ver tabla IV.8), valor próximo al teórico para DLCA de 1.78. Sin embargo, para el complejo en condiciones de agregación rápida se ha obtenido 1.82 y 2.26 para pH 3 y pH 7, respectivamente. Estos valores nos indican que los agregados formados por partículas de complejo látex-proteína son más compactos que los del látex desnudo, aumentando al pasar de pH 3 a pH 7.

Esta conclusión puede ser también extraída cualitativamente a partir de las siguientes fotografías obtenidas por TEM. La figura IV.26A corresponde a un agregado de MBO a 950 mM NaCl, la figura IV.26B es para un agregado formado por difusión a 500 mM y pH 3 para el complejo MBO-F(ab')<sub>2</sub>, mientras que la figura IV.26C corresponde a un agregado formado por el complejo a pH 7 y 141 mM NaCl.





*Figura IV.26. Fotografía obtenidas por TEM para agregados formados en condiciones de agregación rápida.*

Como se puede observar la estructura de estos agregados varía desde ramificada a compacta, en acuerdo con los datos que aparecen en la tabla IV.9.

Algunos autores han calculado valores para la dimensión fractal de agregados a partir de sus imágenes obtenidas por TEM (*Forrest et al., 1979; Weitz et al., 1984b; Tence et al., 1986*). Esta metodología presenta serias limitaciones impuestas por el hecho de que las imágenes de TEM corresponden a proyecciones bidimensionales de objetos tridimensionales (*Botet et al., 1987*).

Hórvölgyi y col. (*Hórvölgyi et al., 1991; 1993; 1994*) en una serie de trabajos han estudiado la estructura de los agregados formados en dos dimensiones por partículas de vidrio cuya superficie ha sufrido diferentes modificaciones encaminadas a variar el carácter hidrofílico de la misma. Como resultado de sus investigaciones obtuvieron que la morfología de los clúster dependía del carácter más o menos hidrofílico de la partícula, aumentando la dimensión fractal con la hidrofiliidad.

Feder et al. (*Feder et al., 1984*) encontraron que la proteína IgG formaba agregados bajo condiciones de agregación rápida con una dimensión fractal de 2.56. Mientras, otros autores han obtenido que en agregación rápida los agregados que inicialmente tienen una dimensión fractal de 1.75 cambian de estructura con el tiempo, haciéndose más compactos y dando dimensiones fractales de 2.1 (*Auber et al., 1986; Martin et al., 1990*) ó 2.4 (*Dimon et al., 1986*). En estos casos los contactos entre las partículas en los agregados se consideran reversibles y éstos pueden reformar sus estructuras. También podemos encontrar trabajos en los que se ha estudiado la estructura fractal de los agregados formados por partículas recubiertas por surfactante en condiciones de agregación rápida, obteniendo que la dimensión fractal variaba desde 1.75 a 2.7 en función del grado de recubrimiento de surfactante (*Wan et al., 1990; Zhu et al., 1994*).

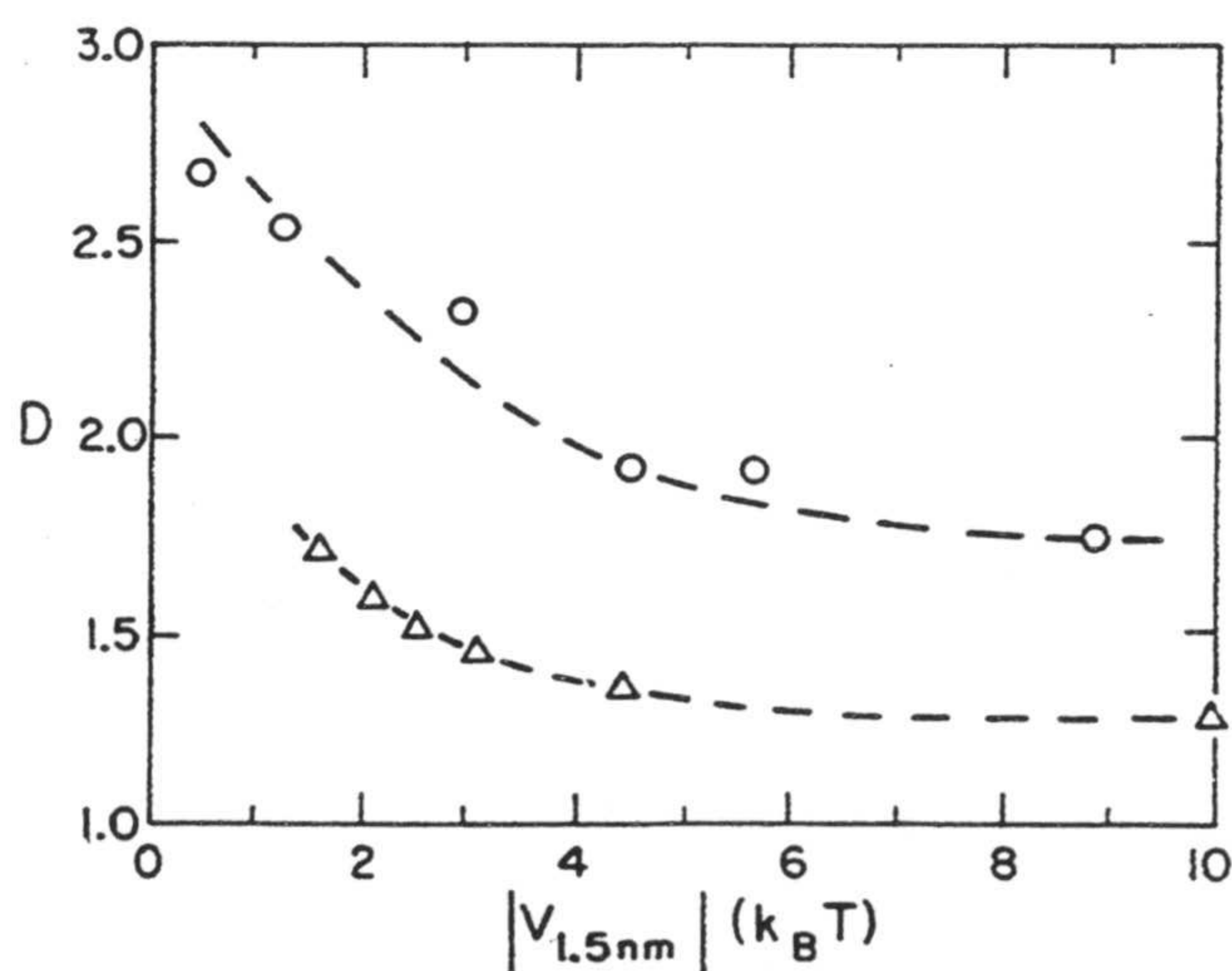
Todos estos estudios evidencian que la dimensión fractal de los agregados no tiene porque ser universal sino que puede depender de la interacción entre partículas. Para explicar todas estas desviaciones de las predicciones del modelo DLCA se habla de **reestructuración**.

La reestructuración de un agregado se debe a que los contactos entre las partículas que lo forman no son permanentes sino que pueden romperse o simplemente deformarse. Los modelos DLCA y RLCA corresponden a agregaciones irreversibles

donde se supone que las partículas permanecen rígidas en la posición de unión en la estructura fractal.

Los trabajos de simulación teniendo en cuenta la reestructuración son escasos debido a la dificultad de simular este fenómeno sin perder la simplicidad de los modelos.

El modelo de crecimiento reversible más aceptado, conocido como SAK, fue propuesto por Shih, Aksay y Kikuchi (*Shih et al., 1987*). Este modelo parte del DLCA y en él se introduce una energía finita de unión entre partículas. Estos autores concluyen que en un sistema coloidal con una energía finita atractiva entre partículas, la estructura ramificada de los agregados se hace más compacta con el tiempo. La dimensión fractal aumenta con el tiempo sin perderse el carácter fractal de los agregados. Para comprobar las predicciones de su modelo, estos autores estudiaron la agregación de partículas de oro recubiertas por surfactante (*Wan et al., 1990*) y observaron que la dimensión fractal de los agregados aumentaba conforme disminuía la profundidad del mínimo donde se producía la agregación, tal y como muestra la figura IV.27.



**Figura IV.27.** Dimensión fractal ( $D$ ) en función de la profundidad del mínimo primario ( $V_{1.5nm}$ ) para agregados de partículas de oro recubiertas con surfactante (círculos). Los triángulos corresponden a las predicciones teóricas del modelo SAK (*Wan et al., 1990*).

Esta figura indica que la dimensión fractal aumenta conforme disminuye la profundidad del mínimo para valores inferiores a  $4k_B T$ , no existiendo reestructuración para profundidades mayores a este valor.

En los apartados 2 y 3 del presente capítulo se estudiaron las constantes de agregación rápida para látex desnudos y para complejos látex-proteína, obteniéndose que para estos últimos sistemas la constante era inferior. Una posible explicación es que la agregación de un complejo se puede estar produciendo en un mínimo poco profundo, existiendo reversibilidad. Esta explicación concuerda con los resultados que se acaban de exponer sobre la morfología de los agregados. Los mismos razonamientos que se realizaron en el apartado 3 sobre la influencia del pH en la constante de agregación rápida de un complejo pueden explicar los datos de dimensión fractal que aparecen en la tabla IV.9.

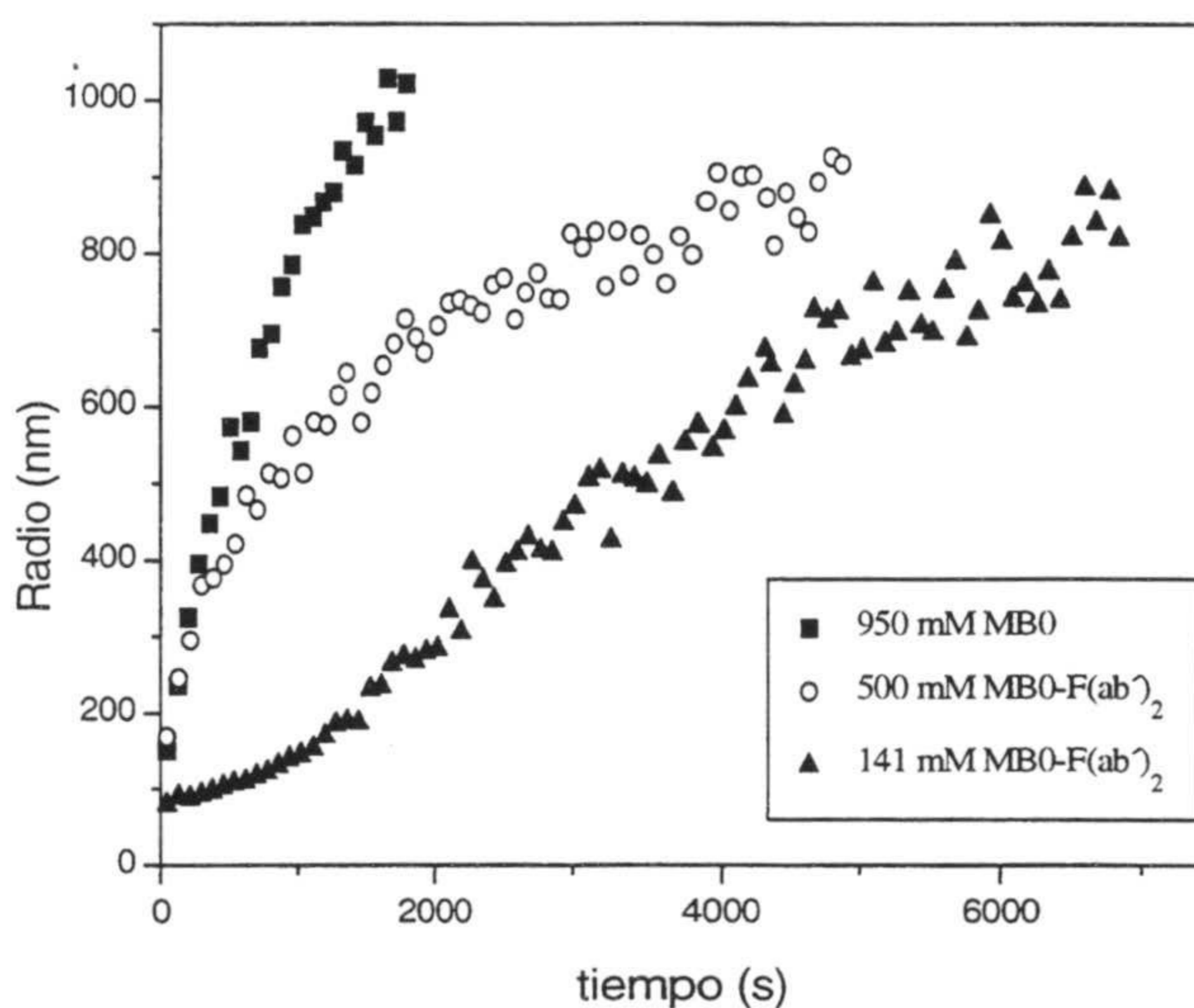
En el caso de un complejo látex-proteína habíamos comprobado que la constante de agregación rápida dependía del tipo de catión y anión empleado en la agregación. Como la cinética y la morfología de los agregados están íntimamente relacionados cabe esperar que la dimensión fractal dependa del tipo de contraión que provoca la coagulación. Este aspecto puede ser interesante abordarlo en trabajos futuros. De hecho, un trabajo reciente de Zhu y col. (*Zhu et al., 1995*) ha puesto de manifiesto que el tipo de electrolito utilizado en la agregación de partículas recubiertas con surfactante influye en la dimensión fractal de los clúster.

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento no existen estudios sobre la estructura de agregados formados por partículas recubiertas por proteína. Estos sistemas tiene un gran interés a nivel tecnológico, inmunológico y clínico, por lo que consideramos importante profundizar más en este campo. En los procesos de tratamiento de aguas es interesante que la estructura de los agregados sea lo más compacta posible para facilitar la sedimentación y adsorción de los agentes contaminantes (*Rogak et al., 1992*) con lo que son necesarios estudios acerca de la influencia de la agitación sobre la morfología de los agregados.

Actualmente una compañera de nuestro grupo de investigación (María Tirado) está realizando una tesis doctoral en la que se abordan aspectos importantes sobre estos temas.

### 9. Cinética de agregación seguida por PCS para el látex MB0 y el complejo MB0-F(ab')<sub>2</sub>

Mediante el empleo del sistema 4700 de Malvern Instruments también se ha seguido la cinética de agregación de aquellos sistemas cuya dimensión fractal fue obtenida en el apartado anterior. Basándose en los principios de la dispersión dinámica de luz este dispositivo permite obtener el diámetro medio de los agregados. En la gráfica IV.28 se muestra la dependencia temporal del radio medio de agregado para el régimen de agregación rápida del látex desnudo y del complejo a pH 7 y pH 3. Los experimentos se realizaron a un ángulo de 60° y con la misma concentración de partículas,  $2.1 \times 10^{10}$  part/ml.

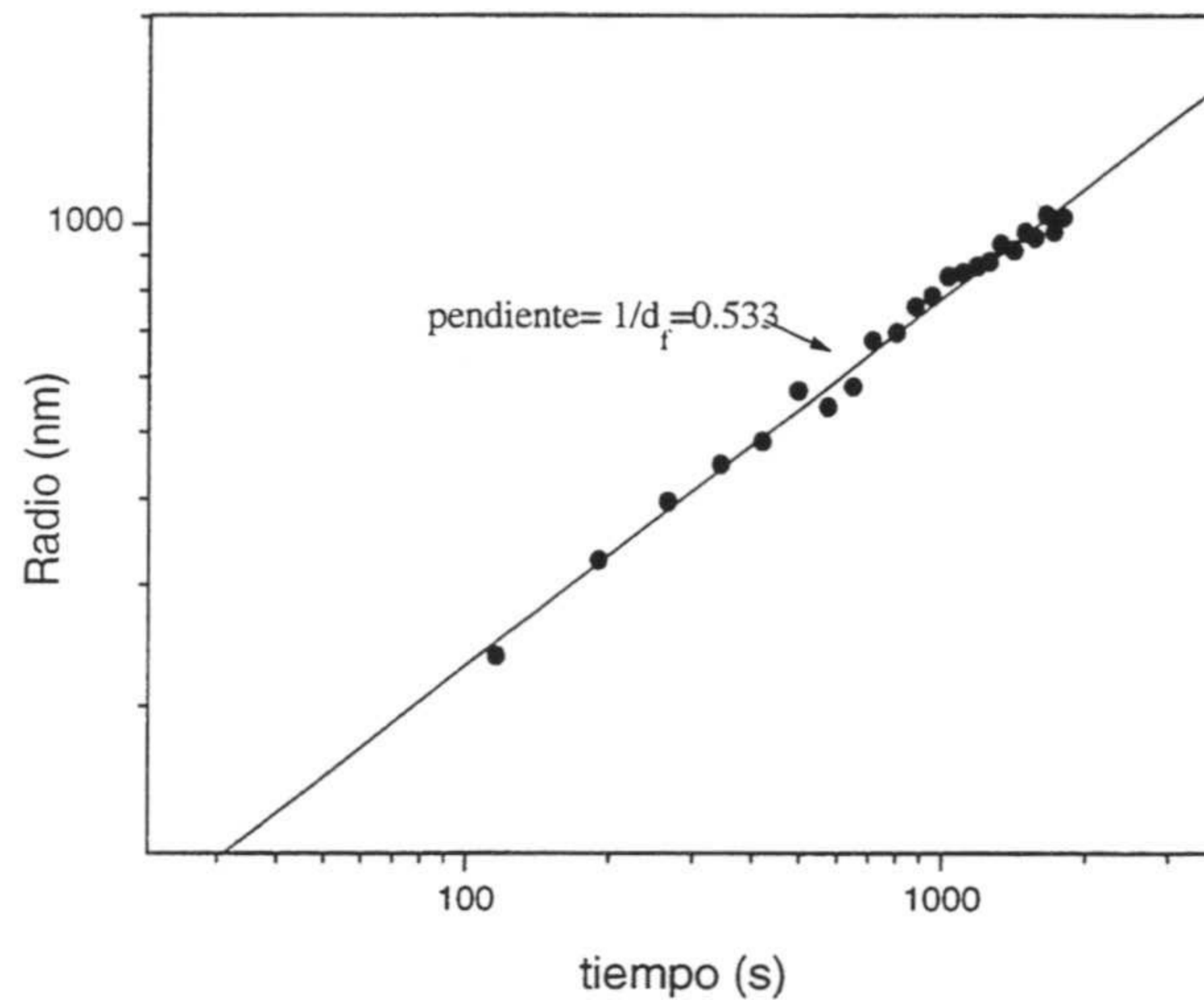


**Figura IV.28.** Cinética de agregación rápida para el látex MB0 y el complejo MB0-F(ab')<sub>2</sub> a pH 3 y pH 7.

Aunque los tres procesos correspondan a la agregación rápida (no existe barrera energética que dificulte la agregación) la cinética es más lenta para el complejo que para el látex sin proteína, disminuyendo además al aumentar el pH.

Recordando las dimensiones fractales obtenidas para estos tres experimentos, sólo la correspondiente al látex desnudo es similar a la obtenida teóricamente para el régimen DLCA. Por lo tanto, según la expresión IV.13 el radio de giro medio de los

agregados aumenta según una ley potencial con el tiempo. Si aproximamos el radio de giro con el radio hidrodinámico obtenido por PCS podemos comprobar que este comportamiento lo satisface la agregación del látex MBO a 950 mM NaCl (ver Figura IV.29).



**Figura IV.29.** Evolución temporal del radio hidrodinámico medio para el látex MBO a 950 mM de NaCl en escala logarítmica.

De la pendiente de esta representación se ha obtenido un valor de la dimensión fractal de 1.87, que es superior al valor obtenido por dispersión estática de luz que fue de 1.75. Esta sobreestimación de la dimensión fractal por medidas de PCS se debe a que el radio hidrodinámico y el radio de giro dejan de ser iguales conforme los agregados se hacen más grandes debido a la influencia de la rotación y de la polidispersidad (*Zhang et al., 1995*).

Utilizando la expresión IV.19 se ha calculado la constante de agregación para estos tres experimentos en sus momentos iniciales. En estos cálculos se ha empleado la siguiente expresión para  $\beta$  (*Berg et al., 1992*):

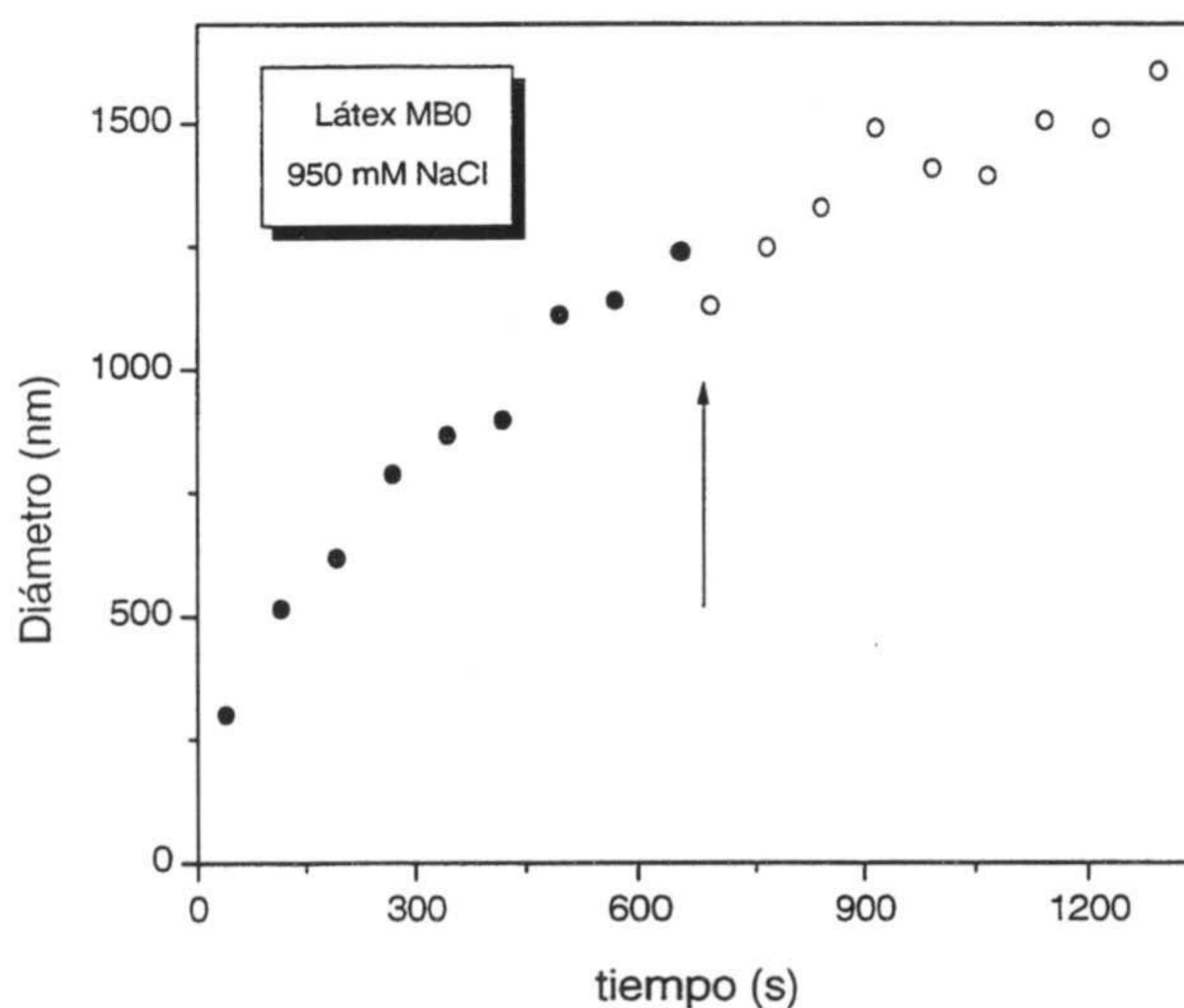
$$\beta = 0.699 + 0.255(R_0 / \lambda) - 13.849(R_0 / \lambda)^2 + 29.757(R_0 / \lambda)^3 + 6.526(R_0 / \lambda)^4 - 36.501(R_0 / \lambda)^5 \quad (\text{IV.20})$$



Como resultado se ha obtenido que la constante de agregación rápida vale  $2.13 \times 10^{-12} \text{ cm}^3/\text{s}$  para el látex desnudo,  $1.48 \times 10^{-12} \text{ cm}^3/\text{s}$  y  $0.28 \times 10^{-12} \text{ cm}^3/\text{s}$  para el complejo a pH 3 y pH 7, respectivamente.

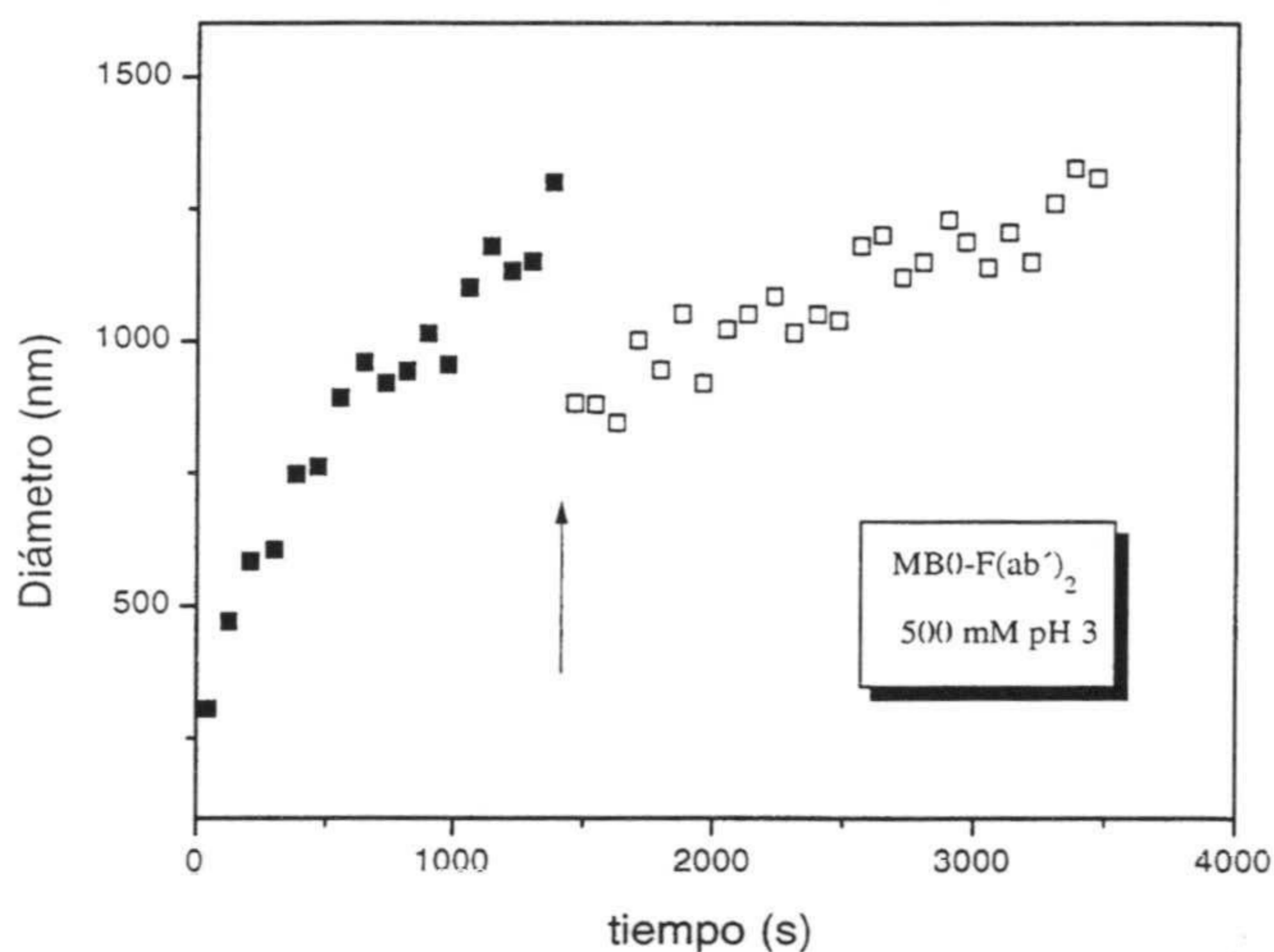
El valor obtenido para el caso del látex desnudo es similar a los valores obtenidos en el apartado 2 de este capítulo mediante el nefelómetro. Por otra parte, Herrington et al. (Herrington et al., 1989) han desarrollado un método para obtener la constante de agregación a partir del exponente de la función de autocorrelación. Con este método han obtenido para la cinética de agregación irreversible de Smoluchoski un valor de la constante de  $2.0 \times 10^{12} \text{ cm}^3/\text{s}$ .

Si nos fijamos en las dimensiones fractales correspondientes a los experimentos de la figura IV.28 (ver tabla IV.9) se observa que conforme la dimensión fractal aumenta la constante de agregación disminuye. Si las partículas agregan en un mínimo poco profundo, la posibilidad de reversibilidad en la agregación conduce a una disminución de la constante de agregación y un aumento de la dimensión fractal. Además, al ser débiles las fuerzas que atraen a las partículas en el agregado, éstos pueden fragmentarse por agitación. Los experimentos que se muestran a continuación sobre fragmentación por agitación están en concordancia con los datos de dimensiones fractales y constantes de agregación obtenidas para el látex desnudo y el complejo a ambos pHs.

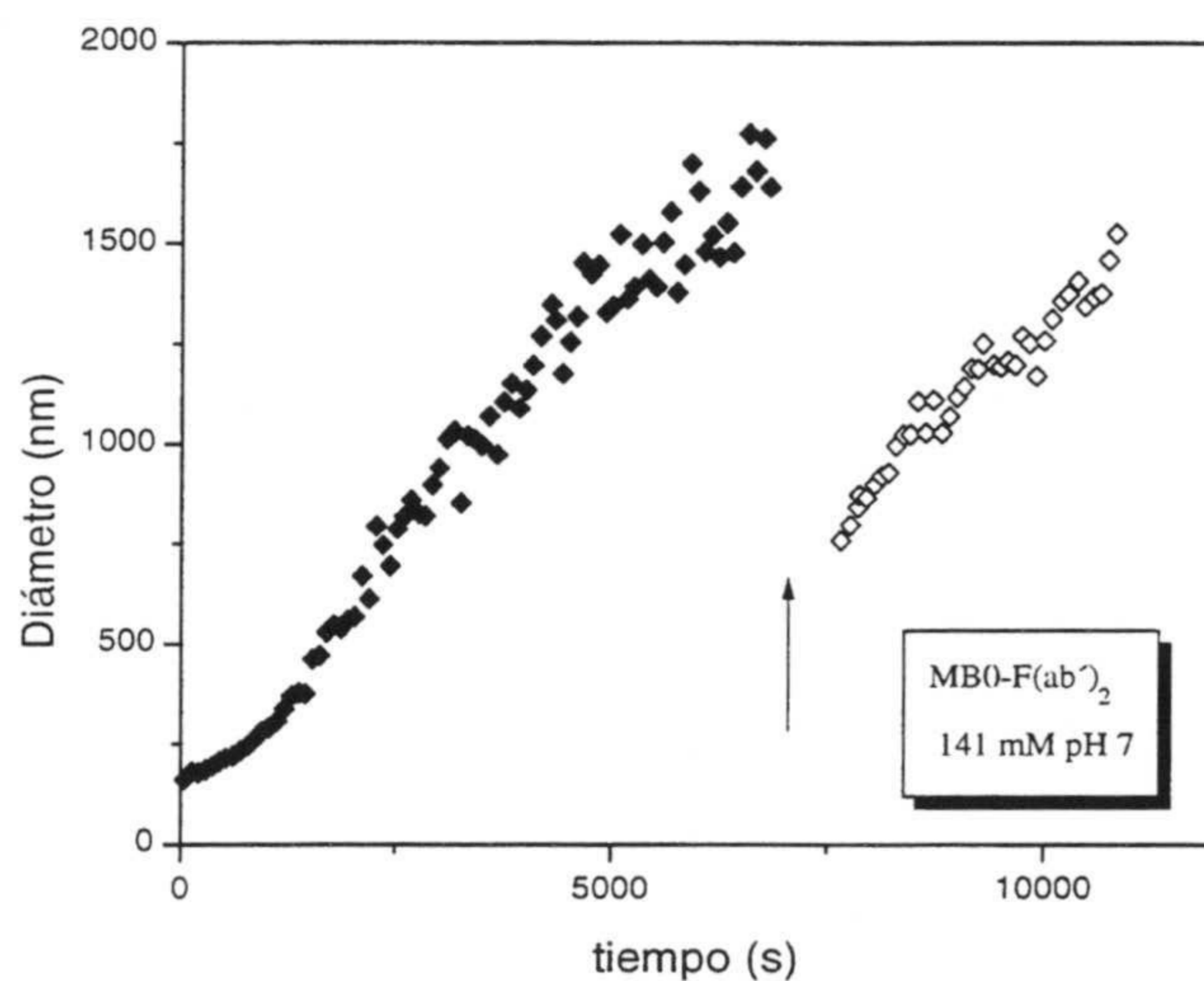


**Figura IV.30.** Influencia de la agitación sobre el látex MB0 a 950 mM de NaCl.

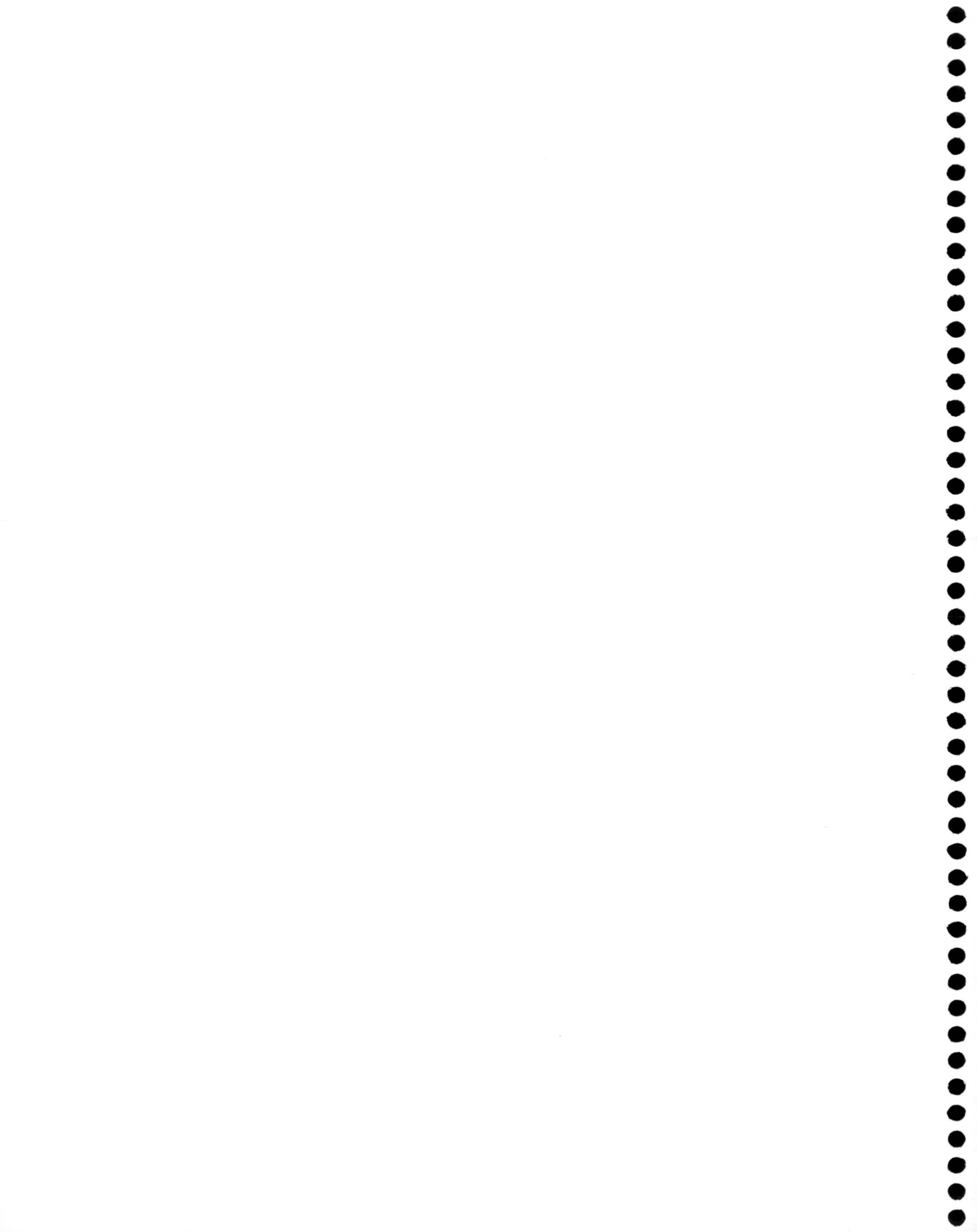
En estas gráficas la línea indica el momento en el que se produce la agitación de los agregados. Al agitar los agregados formados con el látex desnudo no hay fragmentación. Sin embargo, como muestran las dos siguientes figuras, en el caso de agregados formados con partículas de complejo si hay ruptura.



*Figura IV.31. Influencia de la agitación sobre el complejo MB0-F(ab')<sub>2</sub> a 500 mM de NaCl y pH 3.*



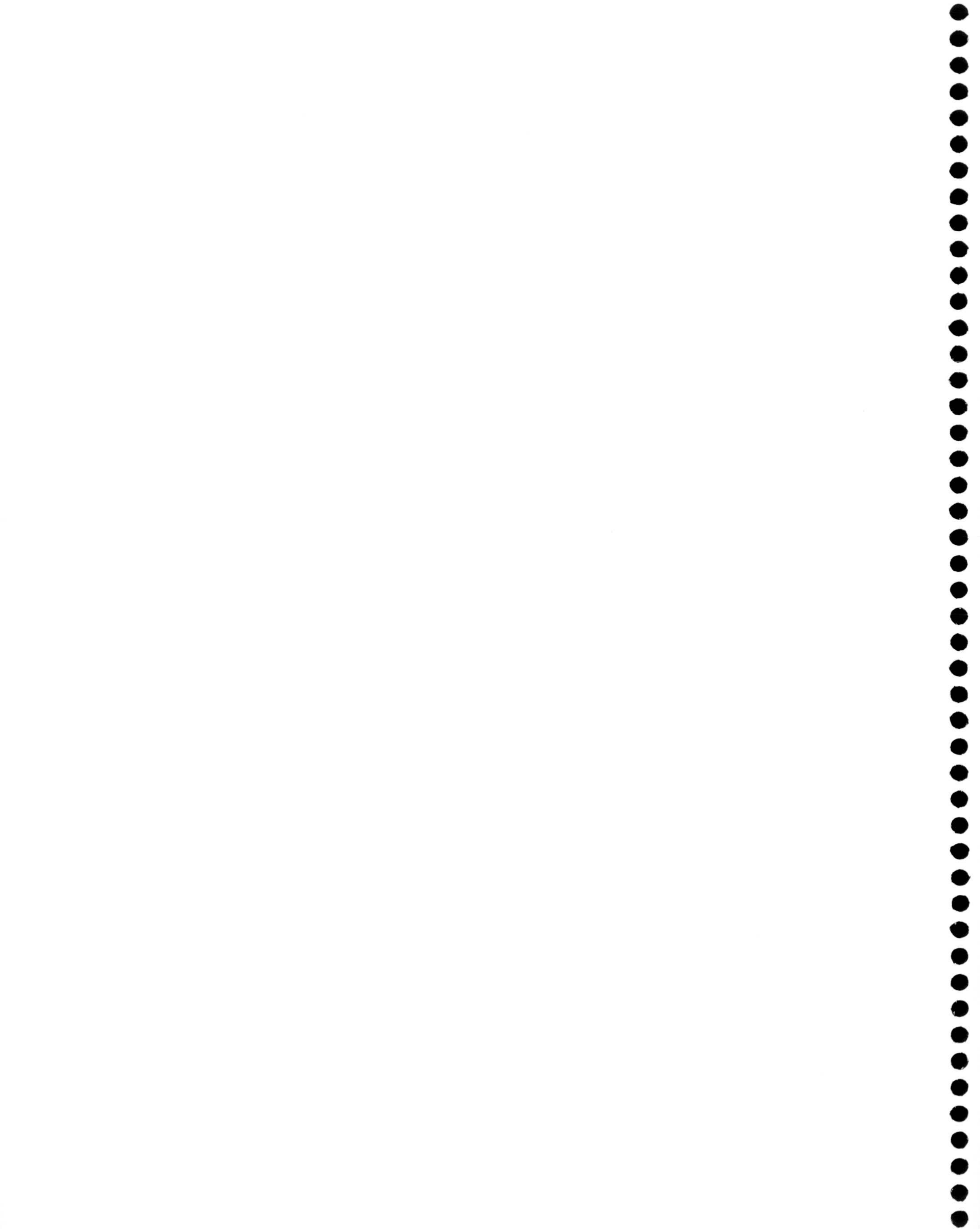
*Figura IV.32. Influencia de la agitación sobre el complejo MB0-F(ab')<sub>2</sub> a 141 mM de NaCl y pH 7.*





# capítulo v

**Aplicación de partículas  
coloidales sensibilizadas con  
proteína para test de  
inmunoaglutinación**



# 5

## Aplicación de partículas coloidales sensibilizadas con proteína para tests de inmunoaglutinación

### 1. Introducción

Las moléculas de proteína en disolución se adsorben prácticamente en cualquier interfase, debido sobre todo, a su marcado carácter anfifílico. 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 inmisible con ella, las proteínas tienden a acumularse en la interfase. El estudio de la adsorción proteica tiene un interés básico siendo un problema teórico y experimental atractivo y difícil, donde tienen lugar diversos fenómenos simultáneamente cuyos efectos individuales pueden llegar a ser contrapuestos. Las razones que justifican la afinidad de las proteínas por las interfaces debemos buscarlas en los diferentes tipos de interacciones que existen entre los componentes que hay en la muestra: la naturaleza del adsorbente, las moléculas de proteína, el disolvente (agua) y otros solutos que pueden estar presentes (como iones de bajo peso molecular).

En la naturaleza el comportamiento de una proteína en una interfase es de una enorme importancia. En el proceso de depósito de materia orgánica sobre una superficie, la adsorción de proteínas es quizás el más rápido y condiciona la subsiguiente deposición o adsorción de otros constituyentes. Como ejemplo típico se puede mencionar que la adsorción de proteínas sanguíneas es la primera etapa en el proceso global de la formación de un trombo en un vaso sanguíneo ya que facilitan la adhesión posterior de plaquetas (*Stoner et al., 1970; Salzman, 1971*). También la adsorción de proteínas en una interfase es crucial en procesos bioquímicos y fisiológicos en los organismos. Por ejemplo, la actuación de enzimas sobre

determinados sustratos o el acoplamiento de hormonas sobre sus receptores van precedidas de un proceso de adsorción de tales biomoléculas en una interfase concreta (ej. las lipasas se adsorben sobre la superficie de partículas constituidas por grasas en suspensión) (*Desnuelle, 1972*). También es conocido el hecho de que la posibilidad de vida bacteriana en una interfase está condicionada por el proceso de adsorción previo de enzimas extracelulares.

Por otra parte es innegable el interés aplicado de los procesos de adsorción de macromoléculas en el campo industrial y biotecnológico. Podemos enumerar algunos ejemplos:

- Emulsiones y dispersiones coloidales estabilizadas mediante macromoléculas adsorbidas en la superficie de las partículas en la industria alimentaria, petrolífera, farmacéutica y cosmética.
- Separación y purificación de constituyentes en una suspensión (ej: columnas de cromatografía).
- Biocompatibilidad de implantes, prótesis y material quirúrgico, que depende directamente de la capacidad de tales materiales de prevenir o favorecer la adsorción de determinadas proteínas.
- Inmovilización de enzimas en procesos industriales y clínicos, lo que supone una gran ventaja, sobre todo por la posibilidad de una reutilización cómoda.
- Biosensores y kits de inmunodiagnóstico.

En estas dos últimas aplicaciones se suelen utilizar mayoritariamente coloides de matriz polimérica como los empleados a lo largo de esta tesis doctoral. La elevada proporción área/volumen que caracteriza a las disoluciones de látex, efecto causado por el pequeño tamaño que poseen las partículas que lo constituyen, las hace ideales para desarrollar estudios y aplicaciones basadas en adsorción de proteínas. El uso de complejos látex-proteína en el campo del diagnóstico médico tiene un enorme interés por cuanto que el sistema látex-anticuerpo (ó látex-antígeno) se puede considerar como un amplificador de la reacción antígeno-anticuerpo. Se trata de un eficaz instrumento en la detección de ciertas enfermedades que pueden ponerse de manifiesto gracias a esta reacción antigénica. Las principales ventajas de este método de inmunodiagnóstico son la rapidez de ejecución, el bajo precio de los reactivos y la comodidad de observar el

resultado por visualización directa o por análisis con un sistema óptico de lectura (espectrofotómetro, nefelómetro, etc). En el presente capítulo se va a realizar una comparación de las prestaciones de los diferentes dispositivos que se pueden emplear para seguir y cuantificar la inmunoaglutinación de látex, centrándonos en aspectos como la sensibilidad, límite de detección, etc.

El primer trabajo publicado sobre la aplicación en sistemas de inmunodiagnóstico clínico de adsorción de moléculas de anticuerpo sobre la superficie de partículas poliméricas se debe a Singer y Plotz en 1956 (*Singer et al., 1956*). Los reactivos de látex se fundamentan básicamente en la adsorción sobre la superficie del látex de anticuerpos específicos contra el antígeno buscado, la estabilización coloidal del complejo látex-proteína formado, la mezcla de éste con el suero sanguíneo del paciente al que se desea determinar la prueba, y la comprobación de si se ha producido la aglutinación de dicho látex (ver figura V.1a). Si el resultado es positivo, es decir, si el suero del paciente contiene el antígeno en cuestión, éste se unirá de modo muy específico a las moléculas de anticuerpo unidas a la superficie de las partículas, formando puentes entre ellas y provocando la aglutinación. El aspecto uniforme del látex, antes estable coloidalmente, se convierte ahora en una solución acuosa transparente con flóculos de látex que denotan la presencia del antígeno buscado en el suero del paciente.

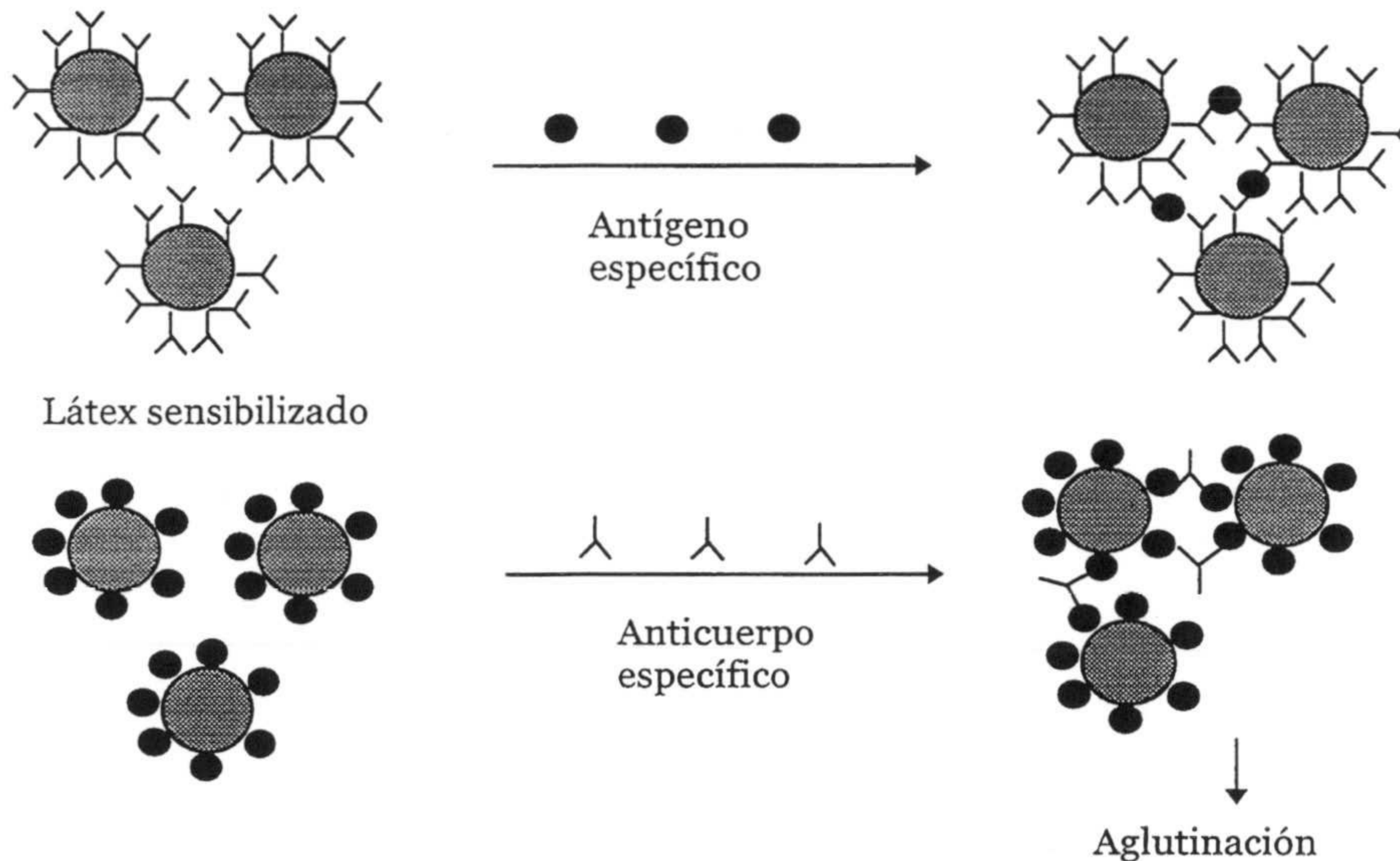
De igual modo se puede realizar el procedimiento inverso, es decir, se une el antígeno a la superficie del látex y se evalúa entonces la presencia o no en el suero del paciente de un anticuerpo específico contra dicho antígeno (ver figura V.Ib). La agregación del complejo látex-antígeno quiere decir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

Nosotros hemos trabajado con el sistema directo adsorbiendo la inmunoglobulina G (IgG) y su fragmento  $F(ab')_2$ , ambos anticuerpos han sido inmunizados frente a la proteína reactiva C (PCR) que actuará como antígeno.

Los principales problemas que se encuentran en este tipo de sistemas de inmunodiagnóstico es la sensibilidad, que está íntimamente ligada a la cantidad



mínima de antígeno que son capaces de detectar (límite de detección), y la falta de estabilidad coloidal.



**Figura V.1.** Ensayos de inmunoaglutinación con anticuerpos o antígenos unidos al látex.

Este último aspecto es un factor determinante pues la agregación del complejo por la acción del antígeno es la que nos permite detectar su presencia. Los dos factores que pueden provocar la agregación del sistema son un aumento de la fuerza iónica del medio ó la reacción inmunológica. Como se ha comprobado en el capítulo III los complejos látex-IgG y látex-F(ab')<sub>2</sub> son muy inestables coloidalmente, especialmente en las condiciones fisiológicas que caracterizan al suero sanguíneo bajo las cuales se va a realizar el ensayo (170 mM de fuerza iónica y pH aproximado a 7). Si la agregación se produce debido a esta baja estabilidad coloidal y no por la presencia del antígeno específico, tendremos un falso positivo. Por este motivo, otro aspecto que se abordará en este capítulo es la búsqueda de un protocolo que permita estabilizar los complejos coloidalmente, pudiéndose emplear para kits de inmunoaglutinación.

## 2. Generalidades sobre la adsorción de proteínas

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

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

siendo H, S y T, la entalpía, la entropía y la temperatura absoluta del sistema, respectivamente.

La adsorción proteica es un proceso complejo constituido por varios subprocesos que determinarán la cinética y la espontaneidad de la adsorción: i) transporte de la proteína desde la disolución a la superficie del polímero; ii) unión a la misma; iii) adsorción de nuevas moléculas que interaccionarán con las ya adsorbidas; iv) cambios estructurales y conformacionales de las moléculas durante y después de la adsorción; v) desorción y movimiento a lo largo de la superficie del adsorbente (Norde, 1992a).

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 H, S 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 produzca 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; d) se sabe con certeza que durante la adsorción se produce cambios conformacionales en la proteína (McRitchie, 1978; Tan et al., 1990), 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. (Norde et al., 1986a; 1986b) 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 col. (Chan et al., 1981) encontraron reducciones de hasta el 50% trabajando con fibrinógeno. Por último, Soderquist y col. (Soderquist et al., 1980)

comprobaron que las proteínas desorbidas mostraban una menor tendencia a readsorberse tras el cambio de configuración estructural.

Por tanto, durante la adsorción proteica se produce un cambio estructural irreversible en la molécula de proteína, con lo que el proceso global de adsorción se considera también irreversible (*Serra et al., 1992; Ortega-Vinuesa et al., 1993; Galisteo et al., 1995; Norde, 1995; Kleijn et al., 1995; Bentaleb et al., 1997*). 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.

Cuando la proteína se adsorbe se establecen múltiples contactos con la superficie del polímero. Si la energía de adsorción por segmento de proteína adsorbido es pequeña, la dilución puede provocar la desorción de algunos de estos segmentos. Sin embargo, se requiere una gran fuerza para desorber todos los fragmentos de la proteína adsorbida.

Como la molécula de proteína tiene un tamaño mucho mayor que el de la molécula de agua, en principio es lógico suponer que el proceso de adsorción consiste en la desaparición local de las interfases sólido-agua y proteína-agua originales y la creación de una interfase nueva sólido-proteína. En este proceso de adsorción no sólo la naturaleza de la proteína y la superficie polimérica van a ser influyentes sino que también desempeña un papel importante los solutos iónicos de bajo peso molecular presentes en el medio. En primer lugar, los contraiones que integran la doble capa eléctrica asociada a la superficie adsorbente y a la proteína apantallan la carga eléctrica de dicha superficie y de la proteína. De este modo pueden favorecer o dificultar la adsorción, ya que modifican la interacción culombiana. En segundo lugar, al crearse una capa proteica de baja constante eléctrica sobre la superficie del látex, la consiguiente acumulación de carga eléctrica no se ve favorecida termodinámicamente, ya que se crean potenciales electrostáticos muy elevados asociados a fuerzas repulsivas importantes. Para eliminar este fenómeno hay dos posibilidades: adsorción de iones que contrarrestan la carga eléctrica acumulada (fenómeno denominado efecto del medio iónico) (*Norde et al., 1979; 1992b*) o desnaturalización de la proteína de modo

que penetra agua en la capa adsorbida y se incrementa el valor de la constante dieléctrica. En el primer caso se produce una disminución de entropía que determina que la energía de Gibbs de transferencia sea positiva y en el segundo hay un aumento de entropía conformacional de la proteína por desnaturalización, pero hay una disminución de entropía configuracional de las moléculas de agua que penetran en la capa de proteína adsorbida.

Vamos a analizar a continuación las diferentes interacciones que contribuyen al valor de  $\Delta_{\text{ads}}G$  (Shirahama et al., 1990; Arai et al., 1990):

- *Redistribución de grupos cargados.* Es un proceso electroquímico en el que se produce una transferencia de iones (protones y otros iones de bajo peso molecular) y una superposición de los potenciales electrostáticos de las dobles capas asociadas con la superficie adsorbente y la superficie proteica. Antes del proceso de adsorción la situación es la siguiente: tanto la superficie adsorbente como en la superficie de la proteína se localizan cargas electrostáticas. En el primer caso, si consideramos que la superficie adsorbente es el área superficial total de una suspensión de partículas poliméricas, las cargas electrostáticas proceden de la existencia de grupos cargados protonables en la superficie de tales partículas. El monómero y el tipo de iniciador empleados en la reacción de polimerización del látex determinarán qué grupos funcionales son los que se localizan en la superficie de las partículas y definen las características físico-químicas (hidrofobicidad y densidad de carga, principalmente) de la interfase látex-disolución. En una proteína, los residuos con grupos funcionales ionizables de la superficie molecular son los responsables de la existencia de cargas electrostáticas. Tanto la partícula como la proteína formarán una doble capa eléctrica que se superpondrán durante el proceso de adsorción, produciéndose una transferencia de protones y otros iones entre la disolución y la capa adsorbida, siendo este fenómeno de transferencia reversible (efecto del medio iónico). Mediante hipótesis y modelos apropiados es posible estimar la energía de Gibbs molar electroquímica de transferencia de iones del tipo  $i$  entre la disolución y la capa adsorbida. Se debe destacar que la variación de energía de Gibbs de transferencia de iones pequeños muy polarizables desde la disolución hacia la capa

proteica adsorbida es positiva; no obstante, se produce una disminución de entalpía que se ve compensada por el término entrópico. Esto indica que la contribución química de la transferencia de tales iones se opone al proceso de adsorción. Sin embargo, esta transferencia se ve favorecida electrostáticamente bajo ciertas condiciones. Por tanto, podrá existir una competencia entre las contribuciones química y electrostática al proceso global de adsorción.

- *Cambios en el estado de hidratación.* Deshidratación de la superficie adsorbente y de la superficie de la proteína y formación de contactos entre proteína y superficie adsorbente. Este subproceso implica cambios de hidratación de la superficie adsorbente y de la proteína, con un establecimiento simultáneo de interacciones entre proteína y superficie. Si la superficie (adsorbente y proteica) considerada es hidrofílica, el valor de la energía de Gibbs molar para este proceso deber ser positiva; si la superficie es hidrofóbica, tendrá un valor negativo. La principal contribución es de naturaleza entrópica (interacción hidrofóbica). Es tan determinante este subproceso que prácticamente todas las proteínas se adsorben sobre superficies hidrofóbicas aunque el proceso sea desfavorable desde el punto de vista de las demás interacciones. Está claro que también influirá el carácter hidrófobo o hidrófilo de la superficie proteica. Se ha calculado (Lu et al., 1992) la energía de solvatación implicada en la adsorción de proteínas sobre superficie poliméricas, obteniéndose valores de hasta -220 kJ/mol para diferentes proteínas adsorbidas sobre poliestireno.
- *Cambios conformaciones de la molécula proteica adsorbida.* La conformación de la proteína adsorbida es el resultado de la competencia de interacciones intramoleculares e interacciones entre la proteína y su entorno. Las características del ambiente que rodea a la proteína condicionan la importancia relativa y el efecto de dichas interacciones. Un cambio en el medio puede conducir, por tanto, a un cambio conformacional: cuando las moléculas de proteína se encuentran con una discontinuidad tal como un interfase sólido-líquido, podrán aparecer cambios conformacionales debidos a que la conformación favorable termodinámicamente para las moléculas adsorbidas en la interfase puede ser distinta a aquella que corresponde a un mínimo energético para las moléculas localizadas en el seno de la

disolución. Estos cambios conformacionales consistirán, en general, en una pérdida de estructuración y del orden moléculas en los niveles cuaternarios, terciario y secundario. Este hecho explica la existencia de una fuerza conductora entrópicamente dirigida que favorece la adsorción en aquellas proteínas cuya conformación globular compacta posee una estabilidad marginal en disolución determinada principalmente por interacciones hidrofóbica. En este caso, la molécula puede desplegarse sobre la superficie adsorbente de modo que el interior apolar de la molécula es expuesto a la superficie adsorbente manteniendo la ausencia de hidratación para la región apolar. Aún generándose una pequeña disminución en la estructura molecular, el aumento de entropía provocado es notable y se puede considerar que la desnaturalización parcial de la proteína puede ser uno de los mecanismo motores del proceso de adsorción. Claramente se puede deducir que la hidrofobicidad del látex será determinante para la existencia de cambios conformacionales en la adsorción. En general, cuanto más hidrofóbica sea la superficie, estas alteraciones tendrán mayor intensidad.

La estabilidad conformacional de la proteína en disolución es un parámetro indicativo de su tendencia a adsorberse en una interfase, de forma que proteínas con baja coherencia interna pueden llegar a adsorberse sobre superficies hidrofílicas bajo repulsión electrostática. A través de diversos estudios se ha establecido que la estabilidad conformacional de la proteína en disolución tiene una importancia decisiva en el proceso de adsorción de ésta en una interfase (*Haynes et al., 1995; Arai et al., 1990; Koutsoukos et al., 1982*).

Si se considera que los cambios conformacionales en el proceso de adsorción son dependientes del tiempo (*Jönsson et al., 1987; Lee et al., 1987; Sadana, 1992*), es decir, se producen una vez que la molécula se ha adsorbido sobre la superficie y trata de alcanzar la conformación energéticamente más favorable, podría explicarse la irreversibilidad frente a dilución.

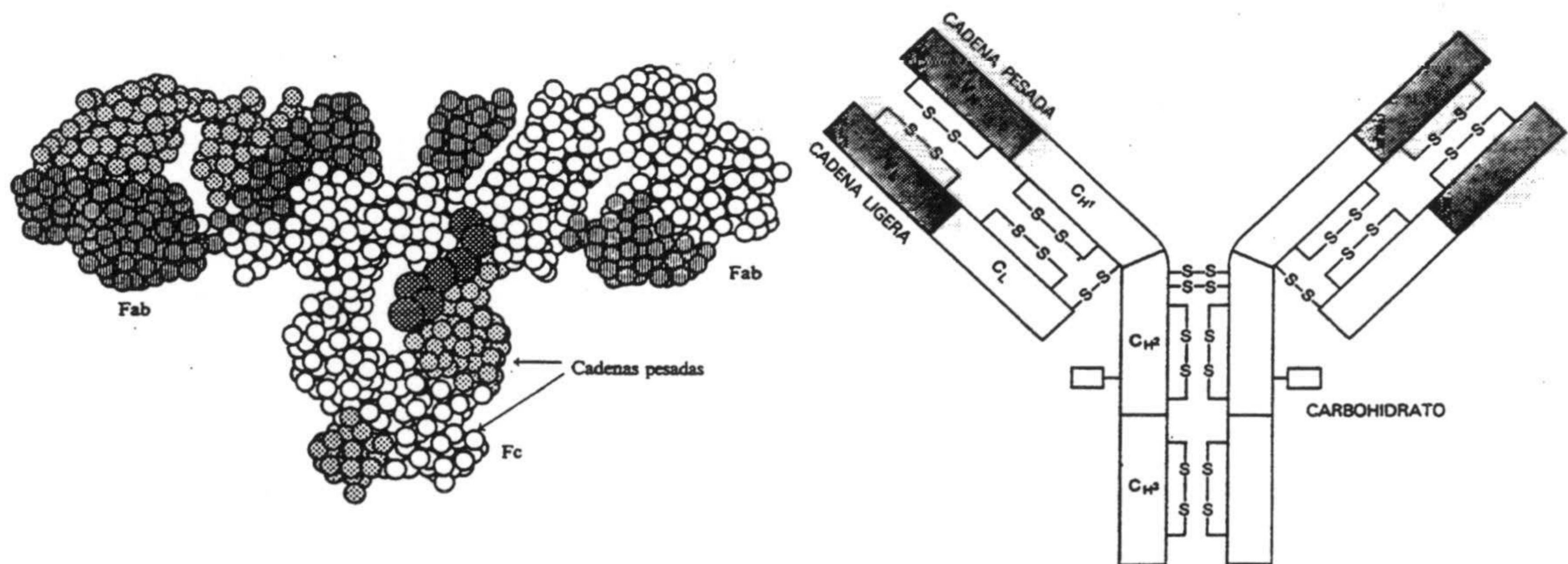
Existe una clasificación de las proteínas en cuanto a su comportamiento en el proceso de adsorción y la posibilidad de que éstas sufran cambios conformacionales en tal proceso (*Norde, 1992a; Lyklema et al., 1996*): i) proteína rígida, que es aquella que

no sufre cambios conformacionales; ii) proteína blanda, cuya adsorción está dirigida fundamentalmente por los cambios conformacionales que sufre.

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

### 3. Características de los anticuerpos IgG y $F(ab')_2$ , y del antígeno PCR

El anticuerpo empleado en el presente estudio ha sido la inmunoglobulina G (IgG). De las cinco inmunoglobulinas existentes en el plasma sanguíneo de los mamíferos (IgG, IgA, IgM, IgE e IgD) la IgG es la más abundante y la mejor conocida. Se trata de una proteína globular de un peso molecular aproximado de 150000 g/mol que contiene cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas (H), con unos 430 restos aminoácidos, y dos cadenas ligeras (L), también idénticas entre sí y con unos 230 restos. Estas cadenas están unidas por enlaces disulfuro, constituyendo una estructura en forma de Y flexible, esquematizadas en la figura V.2.



*Figura V.2. Representación esquemática de la estructura de la molécula de IgG.*

Las cadenas pesadas poseen además un componente oligosacárido unido covalentemente. Cada una de las cadenas tiene una región de secuencia aminoácida constante, y otra cuya secuencia varía. La molécula del anticuerpo completa dispone de dos sitios de unión para el antígeno, uno en cada brazo de la Y. Las porciones variables de las cadenas L y H contribuyen a estos centro de unión, que además se distinguen por poseer regiones hipervariables en las cuales se observa una elevada frecuencia de sustitución aminoácida.

Los brazos de la Y pueden escindirse por acción de la papaína, enzima proteolítico que divide la molécula del anticuerpo en tres fragmentos: dos de ellos idénticos y capaces de combinarse con el antígeno. Éstos son, por tanto, fragmentos de anticuerpo monovalentes y se les denomina Fab ("fragment antigen binding"). El tercer fragmento no tiene capacidad para combinarse con el antígeno y se denomina Fc (fragmento cristalizable). Otra enzima proteolítica, la pepsina, separa la parte Fc del resto de la molécula de anticuerpo, dejando un fragmento grande que puede reaccionar con el antígeno y que se representa como  $F(ab')_2$  pues permanece claramente divalente.

La disposición del fragmento Fc y de los dos Fab en la molécula de IgG 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.

La elección de este anticuerpo para este trabajo se debe a que numerosos tests de inmunodiagnóstico clínico se hacen hoy en día mediante la adsorción de inmunoglobulinas G del suero de un animal previamente infectado con el antígeno que se desea reconocer en la prueba clínica. De esta forma, aunque habrá moléculas de IgG que no reconocerán al antígeno, habrá muchas que lo reconozcan por diferentes epítomos (zona del anticuerpo que reconoce al antígeno específico), y se gana así en sensibilidad del reactivo. Este método es mucho más barato que la obtención de anticuerpos monoclonales, lo que redundará en un menor coste de cada prueba clínica. Tanto la IgG policlonal de conejo como la  $F(ab')_2$  empleadas en esta tesis fueron donadas por la empresa Biokit S.A. (Barcelona). Esta última fue obtenida por digestión con pepsina y posteriores tratamientos cromatográficos para eliminar los



fragmentos de Fc y retirar aquellas moléculas de IgG que hubiesen escapado de la acción proteolítica. El peso molecular del fragmento  $F(ab')_2$  es de 102000 g/mol. Los puntos isoeléctricos de ambos anticuerpos fueron determinados por isoelectroenfoque, obteniéndose 6.0-8.0 para la IgG y 4.7-6.0 para el fragmento  $F(ab')_2$ . El origen policlonal de la muestra de IgG empleada es la responsable del amplio intervalo de puntos isoeléctricos obtenidos para ambas proteínas.

La proteína empleada como antígeno es la proteína reactiva C (PCR) cuyo peso molecular es de 120000 g/mol. Este antígeno es polivalente y está considerado como uno de los indicadores más fiables que existen para poder diagnosticar procesos inflamatorios causados por infecciones, pues en estos casos su concentración sanguínea aumenta enormemente (hasta 1000 veces su valor normal) (*Kushner, 1982; Whicher, 1984*). La medida de la concentración de PCR se hace especialmente útil para poder distinguir procesos virales de los bacterianos (*Pepys, 1981*). Asimismo, su concentración sanguínea también se eleva en algunos procesos inflamatorios no infecciosos, como la artritis reumatoide, o en neucrosis celulares, tal y como ocurre en el infarto de miocardio.

El protocolo seguido para realizar la adsorción de ambas proteínas sobre los látex ha sido descrito con anterioridad en el capítulo III por lo que no volveremos a describirlo de nuevo.

#### **4. Adsorción covalente a látex cloroactivado**

La funcionalidad de una proteína está íntimamente relacionada con su estructura. Como se acaba de ver una de las principales fuerzas motoras de la adsorción proteica son los cambios estructurales y conformacionales que sufre la proteína. Esta desnaturalización parcial puede afectar a la capacidad del anticuerpo para reconocer el antígeno presente en la disolución (*Bahadur et al., 1985*).

La naturaleza y características del soporte polimérico empleado para la adsorción van a afectar de forma importante a los cambios estructurales de la proteína. El adsorbente ideal, para la preparación de kits de inmunoaglutinación, es aquel que

permite unir a las proteínas de forma controlada manteniendo éstas su actividad biológica. Además el complejo formado debe de ser coloidalmente estable (*Miraballes et al., 1996*).

Los surfactantes permiten desplazar a las moléculas de proteína adsorbidas sobre soportes poliméricos (*Poot et al., 1990; Breenhaar, et al., 1984; Rapoza et al., 1990; Elgersma et al., 1992; Feng et al., 1995*). Este hecho presenta una serie de inconvenientes a la hora de preparar kits de inmunoaglutinación:

- Por una parte no se pueden usar surfactantes para estabilizar las partículas, ya que las moléculas de anticuerpo pueden ser desplazadas por el surfactantes.
- La automatización de la técnica de inmunoaglutinación de látex ha necesitado de una robotización de los sistemas de reacción y medida (*Duncan et al., 1991*). Por razones técnicas, El funcionamiento de estos dispositivos requiere la presencia de surfactantes para evitar la aparición de burbujas de aire en las conducciones y tubos de estos autoanalizadores (*Haeckel, 1991*). En estas condiciones los reactivos de látex convencionales no pueden funcionar, ya que el surfactante es capaz de desorber parte de los anticuerpos que forman el complejo empleado para el análisis (*Lehtonen et al., 1980; Ruzgas et al., 1992*).
- Por la misma razón no se pueden usar estos reactivos para detectar ciertos antígenos en disoluciones que tienen 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.

La vida media de los complejos látex-anticuerpo suele estar limitada por la posibilidad de que las moléculas de anticuerpo se desorban con el tiempo de almacenamiento.

Si bien la adsorción física o pasiva de proteínas a partículas de látex es un proceso fácil, rápido y que requiere un bajo coste, la existencia de los inconvenientes previamente enumerados, han obligado a buscar otras estrategias de adsorción durante los últimos años. Concretamente se está investigando en el desarrollo de partículas que presentan en su superficie grupos químicos que permiten unir covalentemente a los anticuerpos, siendo este procedimiento inicialmente descrito

por Grange y col. (*Grange et al., 1977*). Esta adsorción covalente o quimisorción evita la desorción de las moléculas proteicas por efecto de surfactantes así como la gradual desorción del anticuerpo con el tiempo (*Ortega et al., 1996a*). Además reduce la posibilidad de desnaturalización al estar anclada la proteína a la superficie por los puntos en los que se ha producido la unión covalente (*Koning et al., 1993; Newman et al., 1992; Ortega et al., 1995c*). La actividad biológica de las proteínas unidas covalentemente se puede mejorar mediante el empleo de “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 nativa (*Limet et al., 1979; Sundoró, 1987*).

Gracias a los avances recientes en biotecnología se están sintetizando péptidos que simulan a la región del anticuerpo que reconocen al antígeno. Estos pequeños péptidos se pueden unir covalentemente a las partículas obteniéndose kits altamente específicos (*Craine, 1987; Gella et al., 1991*).

Otra ventaja de la unión covalente es que permite el control de la carga eléctrica de los complejos látex-proteína y por tanto permite asegurar una mayor estabilidad coloidal del reactivo.

Los látex que permiten unir covalentemente a la proteína se pueden clasificar en dos grandes grupos en función de la necesidad o no de una etapa de activación previa a la adsorción. En el primer grupo podemos encontrar funcionalidades como los grupos hidroxilo, tiol, ciano o los carboxilo (*Marumoto et al., 1978; Reckel, et al., 1979; Goers, 1993; Niveleau et al., 1993; Ortega et al., 1995c; 1998c*). Así por ejemplo los grupos carboxilo deben de ser activados mediante el uso de carbodiimidas para poder formar enlaces amida entre los grupos carboxilo superficiales de la partícula y los grupos amino de la proteína a través de un intermedio que es un o-acilurea compuesto (*De tar et al., 1966*).

Entre las funcionalidad que no necesitan la etapa de activación podemos encontrar los grupos aldehido (*Oenick et al., 1991; Peula et al., 1995; 1998a*), aminas (*Yoshida et al., 1990; Basinska et al., 1995*) ó cloro vinilbenceno (*Sarobe et al., 1996a; 1996b*). El inconveniente de los grupos aldehido es su baja inestabilidad

química, responsable de su fácil oxidación con el tiempo incluso en presencia de oxígeno atmosférico. No obstante se pueden emplear grupos acetales, más estables químicamente, que se pueden transformar en grupos aldehído sin más que poner un medio ácido (*Kapmeyer et al., 1988; 1991*). Aunque se podría pensar en que es más interesante usar grupos que no necesitan de una etapa de preactivación, el inconveniente de los mismo es que requieren una condiciones especiales de almacenamiento y manejo para asegurar una adecuada reproducibilidad en el proceso de recubrimiento (*Huang et al., 1985; Marchand et al., 1992*) y además son inestables sin unión (tal y como se ha comprobado con los grupos clorometilo), recomendando los fabricantes su utilización en un período de unos 6 meses desde el momento de su fabricación (*Borque et al., 1996*).

Como inconvenientes de la unión covalente hay que destacar el incremento de los costos de producción así como la mayor complejidad de los procedimientos de sensibilización.

En todo caso, la unión covalente requiere la proximidad previa de las proteínas a la superficie de las micropartículas de forma que las distancias entre grupos funcionales permitan la formación de enlaces químicos. Por ello, en principio, las condiciones que favorezcan la adsorción física favorecerán también la unión covalente y viceversa.

Existen otras estrategias de unión interesantes que consisten en unir sobre la partícula una macromolécula que se adsorba fuertemente como: albúmina, lactoferritina, polilisina, etc. A ella, posteriormente se pueden unir covalentemente distintos anticuerpos, haptenos ó drogas (*Litchfield et al., 1984; Schramm et al., 1987*). Así por ejemplo, para unir diferentes inmunoglobulinas se pueden emplear partículas recubiertas con proteínas A ó G, las cuales se unen específicamente por la fracción Fc de las inmunoglobulinas. También las micropartículas con avidina o estreptovidina adsorbida o unida covalentemente en su superficie han sido propuestos como posibles reactivos universales capaces de unir distintos ligandos, antígenos o anticuerpos marcados con biotina (*Kohen et al., 1988*).

Como se vió en el capítulo I cuando se caracterizaron los látex cloroactivados empleados en este trabajo, el grupo clorometilo puede unirse covalentemente a aminas simples como la glicina. Esta propiedad puede ser empleada para quimisorber anticuerpos a la superficie de estas partículas para posteriormente emplearlas en el desarrollo de kits de inmunoaglutinación. Sin embargo, no se puede comparar la reacción de una molécula simple como la glicina con el grupo  $\text{CH}_2\text{Cl}$  con la correspondiente a una macromolécula como es una proteína. Una proteína como la IgG o la  $\text{F}(\text{ab}')_2$  pueden tener menos de 10 grupos amino libres de unirse con los grupos clorometilo, con lo que la conformación que tenga la proteína en el momento de acercarse a la superficie así como la que adopte una vez adsorbida determinarán la eficacia de la covalencia. De igual forma el contenido superficial de grupos clorometilo de la partícula influirá en esta eficacia.

Para comprobar si existe adsorción química sobre las partículas cloroactivadas se han empleado dos estrategias diferentes:

- La reacción entre el grupo clorometilo y el amino conduce a la liberación de iones cloruro. Si al mezclar la proteína con el látex se detectan iones cloruro, éstos deben provenir de la reacción de covalencia.
- El empleo de un método de desorción mediante tratamiento con un surfactante capaz de desorber toda la proteína unida físicamente. Si queda proteína adsorbida, ésta debe de estarlo covalentemente.

Para realizar estas comprobaciones sobre la existencia de covalencia se empleó la lisozima como proteína. Los motivos de esta elección, que puede ser contradictoria si se tiene en cuenta que los estudios de inmunoreactividad se van a realizar con IgG y  $\text{F}(\text{ab}')_2$ , son:

1. La cantidad de iones cloruro que se liberan al quimisorber proteínas sobre el látex es muy pequeña debido al número reducido de grupos amino por proteína, al gran tamaño de las proteínas y a la baja cantidad de látex que se puede utilizar. Empleando una proteína tan pequeña como la lisozima (su peso molecular es de 14600 g/mol cuando el de la IgG era de 150000 g/mol) (*Privalov, 1979*) se puede

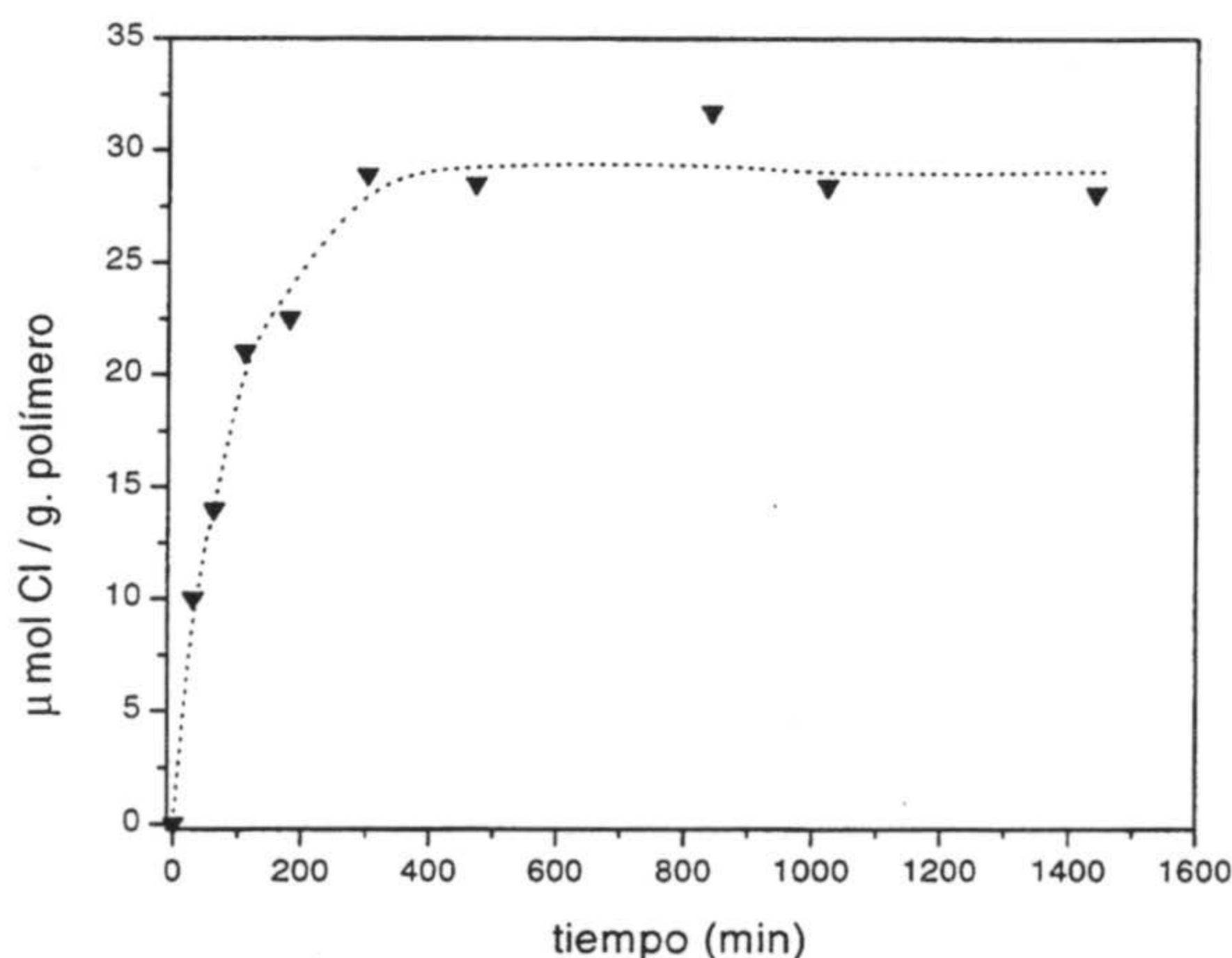
adsorber una mayor cantidad de moléculas por partícula con el consecuente aumento en el número de iones cloruro liberados.

2. La elevada cantidad de proteína que se ha de utilizar tanto para la determinación de iones cloruro como para la desorción con surfactante de la fracción fisisorbida impone el uso de una proteína más barata que la IgG o la F(ab')<sub>2</sub>.

El punto isoeléctrico de la lisozima es 11.1 (*Galisteo et al., 1995*) y su coeficiente de extinción a una longitud de onda de 280 nm fue determinado experimentalmente obteniendo 2.41 ml mg<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

Como sustratos poliméricos se han empleado los látex S3CS2, S4CS9 y JX2. Se han utilizado estos látex porque tienen una cantidad creciente de grupos clorometilo superficiales y de esta forma se ha podido estudiar el efecto de este parámetro en la covalencia.

Los experimentos de adsorción de lisozima a los látex se realizaron a una temperatura de 35°C. Esta temperatura fue elegida como óptima para la covalencia siguiendo un trabajo de Suen y col. (*Suen et al., 1985*) en el que se estudiaba el efecto de la temperatura sobre la adsorción de la proteína BSA sobre un látex cloroactivado. La figura V.3 muestra la cantidad de iones cloruro que se liberaron por gramo de látex en función del tiempo de incubación del látex S4CS9 con la proteína lisozima a pH 11.



**Figura V.3.** Cantidad de iones cloruro liberados en función del tiempo en la adsorción de lisozima sobre el sistema S4CS9 a pH 11.

Cada uno de los puntos de esta gráfica corresponde a un ensayo de adsorción S4CS9-lisozima, con la misma cantidad de proteína y de látex. A su vez para tener en cuenta los iones cloruro liberados del látex por efecto térmico se incubó un blanco para cada experimento de adsorción. La cantidad final adsorbida fue de 3.3 mg/m<sup>2</sup>.

En primer lugar hay que indicar de la figura V.3 la liberación de iones cloruro al incubar el látex con la proteína. Estos iones cloruro, una vez corregidos por los iones liberados por la hidrólisis térmica de los grupos clorometilo, sólo pueden corresponder al enlace covalente entre los grupos amino de la lisozima y los grupos clorometilo superficiales del látex. En segundo lugar, se puede observar la cinética lenta que caracteriza a esta reacción. La adsorción física de proteínas tiene lugar después de tan sólo unos minutos (*Galisteo, 1992*) mientras que la unión covalente, tal y como muestra la figura V.3, no se completa hasta transcurridas 5 ó 6 horas desde la incubación. Este resultado viene a indicar una idea que se podía intuir: primero se produce la adsorción física de la proteína y después la unión covalente. Una vez que la proteína llega a la superficie de la partícula ésta sufre unos cambios estructurales que hacen que la molécula se adapte en cierta medida a la superficie polimérica, estableciendo más contactos con la subfase a través de nuevos fragmentos proteicos que quedan expuestos hacia ella. Al aumentar estos puntos de contacto aumenta la posibilidad de que un grupo amino de la proteína esté próximo a un grupo clorometilo de la partícula, produciéndose la covalencia.

Conocida la cantidad de proteína adsorbida por partícula de látex y la cantidad de iones cloruro liberados por partícula se ha calculado que el número medio de puntos de unión por molécula de lisozima es de 4.5. Esta cantidad en realidad ha de ser superior ya que se ha considerado en el cálculo que todas las moléculas de lisozima se han unido covalentemente, algo que como a continuación veremos no es verdad.

La adsorción de proteínas y de surfactantes está favorecida tanto por su deshidratación como la del soporte adsorbente (*Martín, 1993; Lichtenbelt et al., 1993*). La capacidad que tienen los surfactantes por desplazar las moléculas de proteína adsorbidas radica en que su energía de hidratación es mayor que la de las proteínas. Aprovechando esta propiedad y encontrando un método, basado en el

lavado con surfactante, que sea capaz de desorber toda la proteína adsorbida físicamente sobre un látex convencional de poliestireno, podremos comprobar la existencia de covalencia en los látex cloroactivados.

En la bibliografía podemos encontrar ejemplos en los que se utilizan diferentes surfactantes para desorber proteína de látex: el SDS (Dodecil Sulfato de sodio) (*Bale et al., 1989*), el Tween 20 (*Kapmeyer et al., 1991; Ortega, 1995a; Feng et al., 1995; Peula, 1998a*), etc.

Por nuestra parte, con el fin de buscar un método de desorción eficaz, se prepararon una serie de complejos de lisozima utilizando como soporte polimérico el látex JM1, un látex de poliestireno que no presenta en su superficie grupos capaces de unirse covalentemente con la proteína. Estos complejos se trataron con numerosas disoluciones de surfactantes (SDS, Tween 20, Brij-35, Brij-78, Triton-100) variando las concentraciones, el tiempo de tratamiento y el número de lavados del complejo. La siguiente tabla muestra como resumen el tanto por ciento de proteína desorbida en los diferentes tratamientos realizados.

**Tabla V.1.** Cantidad de proteína desorbida en los diferentes tratamientos de desorción.

Disolución empleada	1 <sup>er</sup> lavado	2 <sup>o</sup> lavado	% proteína desorbida 3 <sup>er</sup> lavado	4 <sup>o</sup> lavado	5 <sup>o</sup> lavado
0.05 % Tween20	13 horas 30 %	1 día 35 %	2 días 37 %		
0.5 % Tween 20	13 horas 42 %	1 día 48 %	1 día 50 %	2 días 52 %	
1% Brij-35	14 horas 49 %	1 día 59 %	1 día 66 %	2 días 68%	
1% SDS, 0.2 M Tris a pH 11	40 min. 15 %	15 horas 34 %	1 día 80 %	1 día 82 %	2 días 95 %
1% SDS, 0.2 M Tris a pH 11	12 días 98 %				
1% Brij-78	1 día 52 %	1 día 55 %	1 día 60 %		



Como se puede observar los dos tratamientos con SDS han permitido desorber toda la proteína unida a la superficie del látex. Puede ser que los demás surfactantes empleados también lleguen a desorber toda la proteína alargando el tiempo de tratamiento. Se ha optado por emplear el tratamiento durante 12 días de los complejos con 1% SDS, 0.2 M Tris a pH 11 para desorber la proteína unida físicamente.

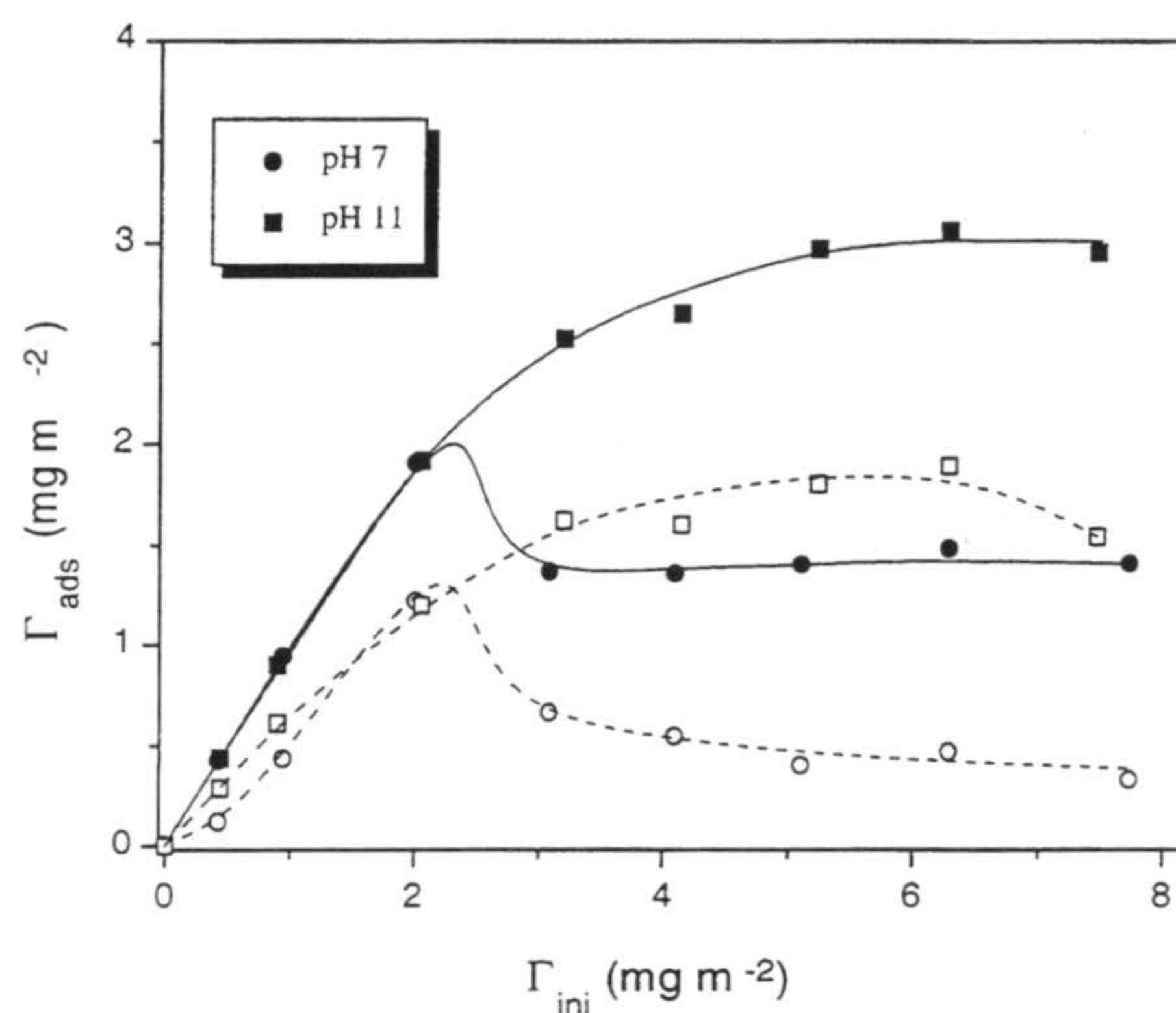
Para comprobar si este método tenía la misma eficacia para desorber otras proteínas, se prepararon unos complejos de JM1 con BSA monomérica, IgG y F(ab')<sub>2</sub> y se trataron con SDS durante 12 días. Los resultados fueron 94 %, 96 % y 97 % para las tres proteínas, respectivamente.

Para determinar la cantidad de proteína desorbida en los diferentes experimentos de desorción se ha tenido que utilizar un método alternativo a la medida de la absorbancia a 280 nm para cuantificar la proteína disuelta en el medio. Esto se debe a que algunos de los surfactantes empleados también absorben a esta longitud de onda. Este método se basa en la reacción de la proteína con una sal cúprica y la sal sódica soluble del ácido bicinonínico (BCA). Este método está patentado por la casa Pierce y se basa en la capacidad que tienen los enlaces peptídicos de la proteína y los aminoácidos cisteína, triptófano y tirosina en reducir el ión Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup> en medio alcalino. Este ión cuproso forma un complejo de color violáceo con el ácido bicinonínico que tiene un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 562 nm.

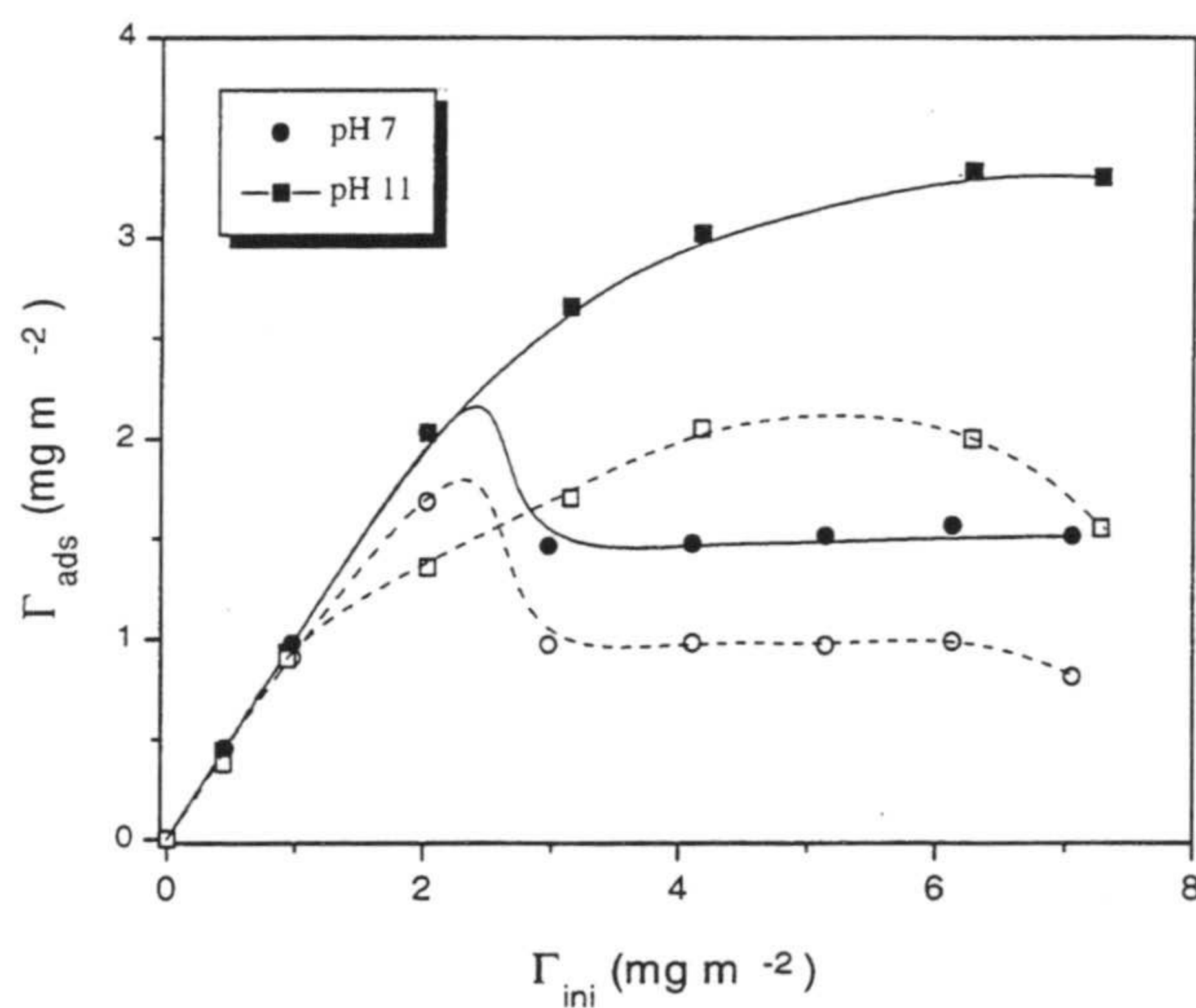
Una vez encontrado un método para desorber la proteína físicamente adsorbida se pasó a comprobar la existencia de covalencia en los látex S3CS2, S4CS9 y JX2. Para ello se obtuvieron las isotermas de adsorción de la lisozima sobre los tres látex (figura V.4, figura V.5 y figura V.6, respectivamente) a pH 11 y a pH 7, y después se trató cada uno de los puntos de la isoterma con SDS para calcular la fracción de proteína unida covalentemente. En estas isotermas se ha representado la cantidad de proteína adsorbida en función la cantidad añadida al medio.

Al observar los resultados experimentales hay que indicar en primer lugar la existencia de covalencia para los tres látex cloroactivados empleados ya que después

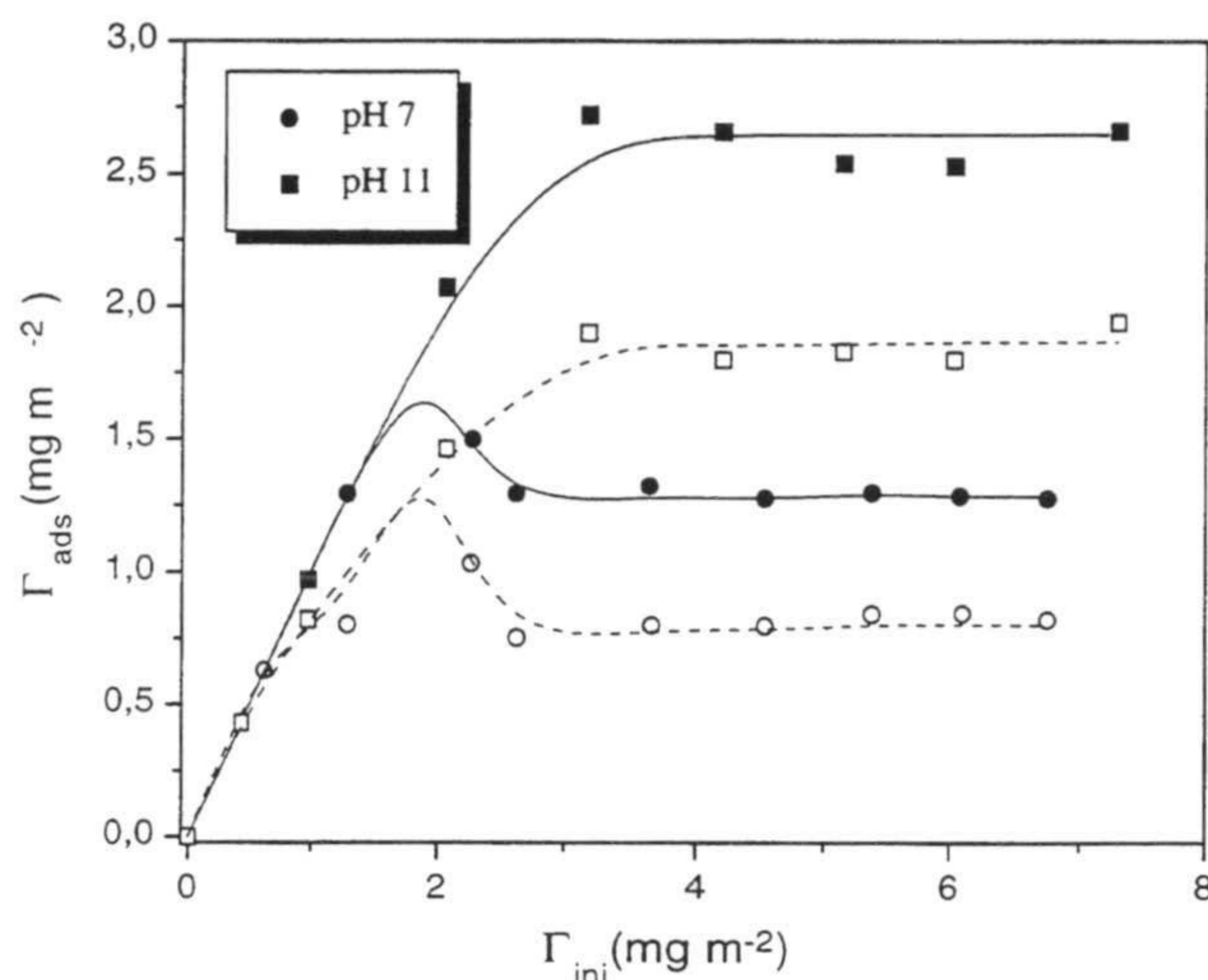
del tratamiento con SDS, que debe eliminar toda la proteína físicamente adsorbida, aún quedan moléculas sobre la superficie de las partículas.



**Figura V.4.** Isoterma de adsorción de lisozima sobre el látex S3CS2 a pH 11 y pH 7. Los símbolos cerrados corresponden a la cantidad total adsorbida y los abiertos a la cantidad unida covalentemente.



**Figura V.5.** Isoterma de adsorción de lisozima sobre el látex S4CS9 a pH 11 y pH 7. Los símbolos cerrados corresponden a la cantidad total adsorbida y los abiertos a la cantidad unida covalentemente.



**Figura V.6.** Isoterma de adsorción de lisozima sobre el látex JX2 a pH 11 y pH 7. Los símbolos cerrados corresponden a la cantidad total adsorbida y los abiertos a la cantidad unida covalentemente.

Por otra parte, merece la pena resaltar al observar estas tres figuras es que la diferente forma que tienen las isotermas de adsorción a pH 11 y a pH 7. En el primer caso la forma se asemeja a las isotermas de tipo Langmuir, siendo por otra parte el comportamiento clásico de la adsorción proteica. En estas isotermas la cantidad adsorbida va aumentando progresivamente con la cantidad de proteína con la cantidad añadida. Una vez que la superficie polimérica se satura de moléculas de proteína, se alcanza una cantidad máxima de adsorción. Sin embargo a pH 7 la cantidad adsorbida alcanza un máximo para luego disminuir y mantener un valor constante. Este máximo se alcanza para los tres látex cuando la cantidad de proteína añadida es de 2 mg/m<sup>2</sup>. Para explicar este comportamiento se pensó en la posible adsorción del ión fosfato, empleado como tampón, sobre la proteína que tiene carga positiva a pH 7. En este sentido la isoterma a pH 7 para el látex S4CS9 se repitió pero sin usar un tampón en el medio de adsorción y ajustando el pH con HCl/NaOH. Como resultado se obtuvo la misma isoterma de adsorción que cuando se empleó tampón. No hemos encontrado una explicación final para este máximo "anormal" que presentan las isotermas de adsorción de la lisozima a pH 7. En la bibliografía se recoge que la lisozima Es una proteína que forma fácilmente multicapas cuando se adsorbe debido a formación de

dímeros o oligómeros mayores (*Malmsten, 1995*). Así pues, puede ser que esté ocurriendo la agregación de las moléculas de lisozima en la superficie de la partícula por lo que aparece el máximo, ó que se produzcan cambios conformacionales en la proteína adsorbida que hacen que bajo esas condiciones experimentales concretas se pueda adsorber más proteína.

A partir de la forma de la isoterma de adsorción se puede conocer, cualitativamente, la afinidad de la proteína por la superficie. Si al representar la cantidad adsorbida frente a la cantidad añadida inicialmente la pendiente del tramo inicial es 1, 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. Teniendo esta idea presente se puede comprobar a partir de las isotermas que la lisozima tiene alta afinidad por las tres superficies empleadas.

Un hecho sorprendente que se desprende de los experimentos de adsorción es que para los tres látex empleados la cantidad adsorbida es mayor a pH 11, cuando no existen interacciones electrostáticas entre la partícula y la molécula de proteína, que a pH 7 cuando existe una atracción electrostática entre la superficie polimérica negativa y la proteína cargada positivamente. La adsorción se ve favorecida cuando las interacciones electrostáticas entre la proteína y la partícula son débiles. Una posible explicación se puede encontrar si se considera que según *Elgersma y col. (Elgersma et al., 1990; 1991)* es la variación de las propias fuerzas intramoleculares las que provocan una disminución en la estabilidad conformacional de la proteína conforme aumenta la carga neta en las moléculas como consecuencia de que el pH del medio se aleja de su punto isoeléctrico. Esta disminución de estabilidad interna implicaría una mayor tendencia de la molécula a sufrir variaciones estructurales en el proceso de adsorción, y daría como resultado una mayor área superficial ocupada por molécula. El resultado sería por tanto una menor cantidad de proteína adsorbida. Además se puede producir un aumento del tamaño de la proteína como consecuencia de las repulsiones electrostáticas entre grupos cargados de la propia estructura de la proteína, lo que implicaría un aumento de la sección eficaz ocupada por molécula, pudiéndose acomodar menos moléculas en la misma superficie (*Bagchi et al., 1981*).

Aunque estos mecanismos pueden considerarse para explicar los hechos experimentales, su importancia se ve reducida si se tiene en cuenta que la lisozima es una de las proteínas consideradas como “duras”. Esta consideración implica que la lisozima se caracteriza por poseer una compresibilidad adiabática pequeña y una alta tendencia a mantener su configuración original o nativa bajo diferentes condiciones externas por ser una proteína globular pequeña (Gekko *et al.*, 1986; Kondo *et al.*, 1991). Estos resultados están en acuerdo con la idea de que es la interacción hidrofóbica la que controla el proceso de adsorción proteica (Norde *et al.*, 1978; Tilton, *et al.*, 1991; Sadana, 1992; Ortega *et al.*, 1994).

Además si nos fijamos en los valores de la cantidad de proteína adsorbida en la zona de “plateau” para ambos pHs, se puede comprobar que ésta depende de la hidrofobicidad de la superficie del látex empleado, siendo mayor para el látex S4CS9, a continuación el S3CS2 y finalmente el JX2. Debido a la polarización del enlace C-Cl del clorometilostireno, éste ha de ser más hidrofílico que el estireno. En consecuencia se puede suponer que el látex JX2 es el más hidrofílico de los tres ya que su corteza fue sintetizada sólo con clorometilostireno.

Los látex S3CS2 y S4CS9 fueron sintetizados con la misma cantidad de estireno y de clorometilostireno, sin embargo el S3CS2 presenta una cantidad de grupos clorometilo superficiales de 21  $\mu\text{mol Cl/g. pol.}$ , mientras que el S4CS9 tiene 59  $\mu\text{mol/g. pol.}$ . Esta diferencia fue explicada en el Capítulo I por la hidrólisis térmica de los grupos clorometilo a hidroximetilo, al considerar que la temperatura de síntesis de S3CS2 fue de 80°C y la del S4CS9 de 60°C. Al ser el grupo hidroximetilo más hidrofílico que el clorometilo se puede considerar al látex S4CS9 como menos hidrofílico que el S3CS2.

Fijándonos en la cantidad de proteína que queda unida covalentemente a los látex después del tratamiento con SDS (símbolos abiertos de las isotermas) se puede comprobar que la covalencia tan sólo es del 100% cuando la cantidad total adsorbida es pequeña (primeros momentos de la isoterma de adsorción). En el caso del látex S4CS9 la covalencia es del 100% para cantidades de proteína adsorbida de hasta 1  $\text{mg/m}^2$  siendo el límite de 0.6  $\text{mg/m}^2$  para el látex JX2. Sin embargo, el látex que contenía la menor cantidad de grupos clorometilo superficiales, el S3CS2, en ningún momento presenta una covalencia del 100%. Como se indicó anteriormente, primero ha de

ocurrir el contacto físico entre la proteína y la partícula para que haya covalencia. Si el número de grupos clorometilo superficiales es limitado se reduce la posibilidad de anclajes covalentes. A partir de los datos del contenido superficial de grupos clorometilo y del tamaño de los látex se ha calculado por cada cuantos  $\text{nm}^2$  de superficie existe un grupo clorometilo, obteniéndose  $0.37 \text{ nm}^2$ ,  $0.78 \text{ nm}^2$  y  $1.94 \text{ nm}^2$  para los látex JX2, S4CS9 y S3CS2, respectivamente. Si se considera que las dimensiones de la lisozima son  $4.5 \times 3 \times 3 \text{ (nm}^3)$  (Norde et al., 1991), en el caso del látex S3CS2 existen de entre 4 a 7 grupos clorometilo por molécula de lisozima, en función de la orientación de la proteína. Si a pesar de estos posibles puntos de unión la covalencia nunca es del 100% para este látex puede ser que los grupos clorometilo estén distribuidos de forma heterogénea por la superficie de la partícula ó que al ser la lisozima una proteína dura ésta no adopte conformaciones óptimas para la reacción de covalencia.

Considerando que para una cantidad total de lisozima de  $3.3 \text{ mg/m}^2$  adsorbida sobre el látex S4CS9 a pH 11 la cantidad unida covalentemente es aproximadamente de  $1.8 \text{ mg/m}^2$  (ver figura V.5) y teniendo en cuenta los datos de la figura V.3 correspondientes a la cantidad de iones cloruro liberados durante la adsorción de esta cantidad de proteína se ha calculado que el número de puntos de unión por molécula de lisozima es de aproximadamente 7. En la siguiente tabla se muestran los datos de covalencia correspondientes a la zona de plateau de las isotermas para los tres látex a ambos pHs.

**Tabla V.2.** Cantidad total y covalente de lisozima adsorbida sobre los látex S3CS2, S4CS9 y JX2 a pH 7 y 11. (\* : proteína física y covalentemente adsorbida).

	pH 7		
	Total* ( $\text{mg/m}^2$ )	Covalente ( $\text{mg/m}^2$ )	% Covalencia ( $\text{mg/m}^2$ )
JX1 (pH 7)	1.4	0.47-0.66	35-50
JX2 (pH 7)	1.51	0.97	64
JX3 (pH 7)	1.27	0.84	66
JX1 (pH 11)	3	1.8	60
JX2 (pH 11)	3.3	2	61
JX3 (pH 11)	2.66	1.84	70

Se puede observar que el porcentaje de covalencia en la zona de máxima cantidad adsorbida es muy similar para los tres látex rondando entre 60 y 70%, no siendo tan determinante en esta región la cantidad de grupos clorometilo superficiales que tenga el látex.

Una vez que un complejo ha sido tratado con SDS para desorber la fracción de proteína unida físicamente, su aplicación a test de inmunodiagnóstico está limitada debido a la existencia de moléculas de SDS adsorbidas tanto a la superficie del látex como a las moléculas de proteína que quedan sobre el mismo. Además las condiciones del tratamiento, pH 11, conducen a la desnaturalización del anticuerpo con la correspondiente pérdida de la capacidad para reconocer al antígeno. Esto unido al elevado coste de los anticuerpo IgG y F(ab')<sub>2</sub> no obligaron a no realizar un estudio exhaustivo de la covalencia con estas proteína. No obstante se realizaron dos experimentos puntuales de desorción de la fracción de F(ab')<sub>2</sub> físicamente adsorbida sobre S4CS9. Para un complejo con 3.2 mg/m<sup>2</sup> se obtuvo un 50% de covalencia mientras que para otro de 2 mg/m<sup>2</sup> se obtuvo 56 %.

## 5. Seguimiento óptico de la inmunoaglutinación

Una vez que se tiene preparado un complejo látex-anticuerpo para detectar el antígeno complementario es necesario elegir un método para “observar” la aglutinación de las partículas. Esta aglutinación de partículas de látex recubiertas con anticuerpo por la existencia de reacciones de puenteo con moléculas del antígeno presentes en el medio (ver figura V.1.) es un proceso similar a la agregación de coloides por efecto de un aumento de la fuerza iónica del medio. Ambas agregaciones pueden ser visualizadas macroscópicamente cuando transcurrido un tiempo apropiado se forman agregados lo suficientemente grandes (*Singer, 1961; Eisen, 1974; Haer, 1974*).

Ahora bien, esta detección visual de la inmunoaglutinación, que se puede realizar en placa o en tubo, presenta una serie de inconvenientes: i) es un método cualitativo que permite indicar si hay o no hay presencia del antígeno buscado en la muestra, aunque en algunas ocasiones se puede semicuantificar dicho antígeno; ii) la detección de la reacción de aglutinación sólo es posible si se usan concentraciones elevadas de

partículas y de agente aglutinante, de forma que se puedan originar agregados de dimensión macroscópica. Estos requerimientos conducen a un encarecimiento del reactivo de análisis y a la detección de enfermedades en su fase aguda; iii) 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; iii) no existe automatización pudiéndose realizar pocos análisis en un amplio intervalo temporal.

No obstante, en algunos casos puntuales, así como en algunos países subdesarrollados, se utilizan los inmunoensayos en placa.

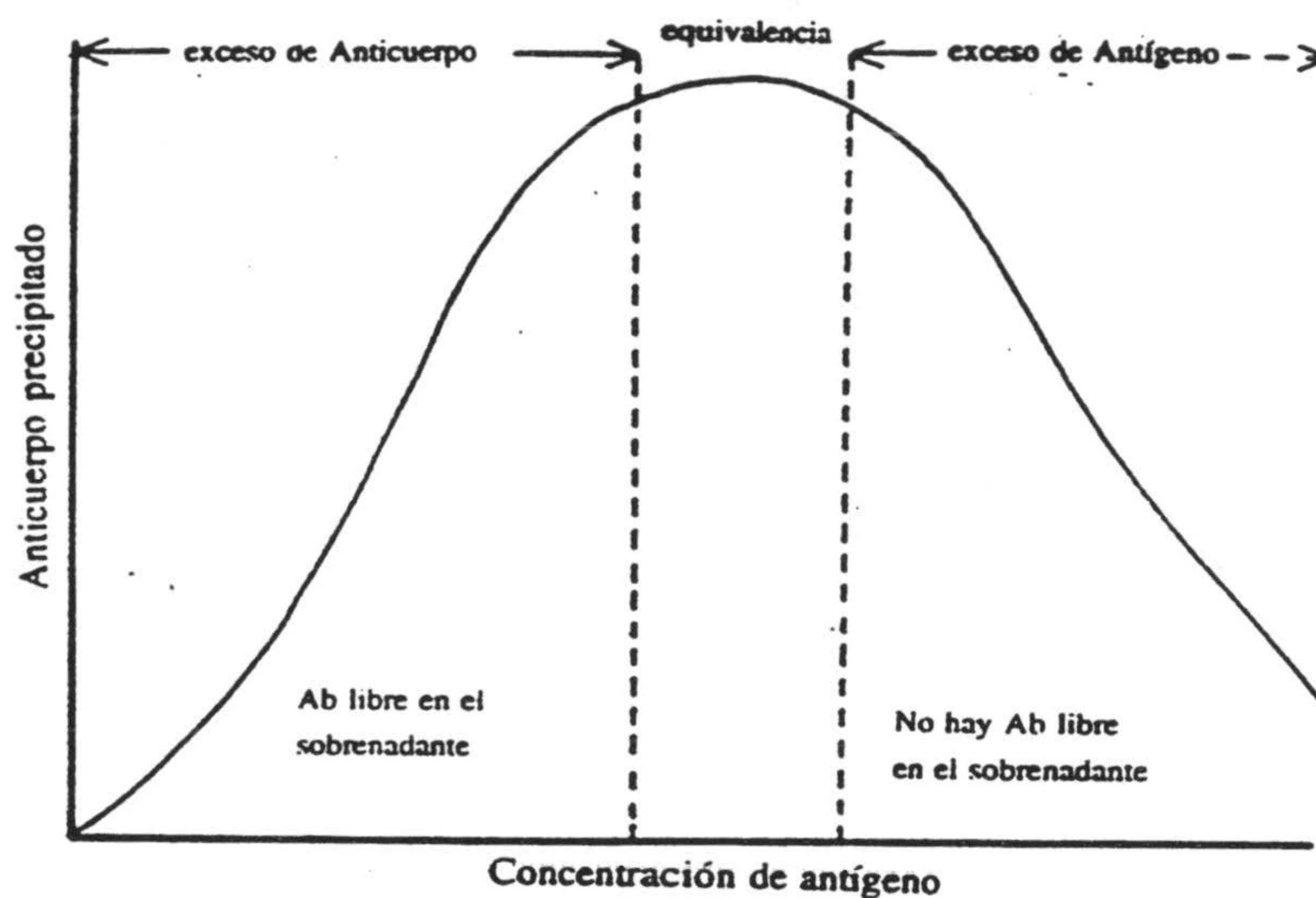
Para poder eliminar la subjetividad, para aumentar la sensibilidad y disminuir el límite de detección en la determinación de analitos mediante reacciones de aglutinación de partículas de coloidales, se puede recurrir al uso de instrumentos ópticos capaces de cuantificar la variación de la intensidad de luz dispersada por un sistema, inicialmente monodisperso, a medida que éste comienza a agregar (*Price et al., 1983; Bernard et al., 1984*). En este sentido se pueden emplear espectrofotómetros o nefelómetros. También se puede medir mediante espectroscopía de fotocorrelación el tamaño medio de los agregados.

En la actualidad un campo de trabajo muy interesante radica en la optimización de las diferentes técnicas experimentales que se pueden emplear en los hospitales y laboratorios de análisis clínicos para realizar los inmunoensayos basados en la aglutinación de partículas de látex. Por este motivo se ha querido comparar en este apartado del capítulo las diferentes técnicas ópticas basadas en la dispersión de luz que se pueden emplear para seguir un proceso de inmunoaglutinación. Concretamente se han estudiado: i) la turbidimetría que está basada en la medida de la turbidez de la dispersión coloidal; ii) la nefelometría por la que se registra la luz dispersada a un ángulo determinado; iii) la anisotropía angular que consiste en medir la luz dispersada a dos ángulos diferentes, generalmente complementarios; iv) la espectroscopía de fotocorrelación (PCS) basada en la dispersión dinámica de luz y que permite obtener el diámetro medio de los agregados.

En cualquier caso, sea cual sea la técnica empleada, la reacción teórica de aglutinación de las partículas recubiertas es similar a la producida en la



inmunoprecipitación en fase líquida entre un antígeno multivalente y su anticuerpo respectivo, y puede ser representada gráficamente mediante la siguiente curva de Heiderberger-Kendall conocida como curva de la precipitina (*Heidelberger et al., 1935*).



**Figura V.7.** Curva de Heiderberger-Kendall para una concentración constante de anticuerpo.

En el eje Y de la curva de Heiderberger-Kendall aparecerá el incremento de señal registrada durante el proceso de aglutinación. Así por ejemplo, en el caso de una medida turbidimétrica será el incremento en turbidez ó el incremento de intensidad dispersada en el caso nefelométrico. En esta curva se distinguen tres zonas bien diferenciadas: i) zona de exceso de anticuerpo; ii) zona de equivalencia; iii) zona de exceso de antígeno. En la primera zona existe poco antígeno en la disolución el cual se unirá a las moléculas de anticuerpo que están adsorbidas sobre las partículas de látex. Se producirán reacciones de puenteo entre partículas se el sistema aglutinará. Conforme aumenta la concentración de antígeno del medio la posibilidad de reacciones antígeno-anticuerpo entre diferentes partículas aumenta con lo que la extensión de la aglutinación también aumenta (crecimiento de la turbidez, de la dispersión de luz, del

tamaño medio de agregados, etc). Llegada una concentración óptima de antígeno la probabilidad de aglutinación es máxima. A partir de ese momento, al aumentar la cantidad de antígeno del medio, el anticuerpo adsorbido sobre las partículas comienza a limitar la reacción de aglutinación que decrece conforme más antígeno se añade.

La situación de equivalencia teórica corresponde con una igualdad de moléculas de antígeno y anticuerpo, por lo que dependerá de la cantidad de anticuerpo adsorbido sobre el látex así como la concentración de partículas presentes. Sin embargo, como se verá más adelante, la región de equivalencia depende de muchos otros factores.

El látex utilizado para preparar el reactivo de inmunodiagnóstico empleado en el presente trabajo fue sintetizado por nuestro compañero Juan Luis Ortega, y se trata de un látex catiónico con un diámetro de  $191 \pm 5$  nm. El anticuerpo empleado ha sido la  $F(ab')_2$  inmunizada frente al PCR que actúa como antígeno en los experimentos. El recubrimiento del complejo empleado es de  $3 \text{ mg/m}^2$ .

Los inmunoensayos se realizaron utilizando como tampón de reacción una disolución de borato a pH 8 (13 mM), 150 mM NaCl, 1 mg/ml de  $\text{NaN}_3$  utilizada como conservante que evita la destrucción del complejo por la acción bacteriana y 1 mg/ml de BSA. Más adelante comentaremos por qué se emplea este tampón de reacción.

Vamos a pasar a analizar la respuesta obtenida de la inmunoaglutinación por las diferentes técnicas empleadas.

1. *Turbidimetría*. Cuando un haz de luz atraviesa una suspensión coloidal se produce una atenuación en su intensidad debido a la dispersión, reflexión y absorción de luz (en el caso de coloides no coloreados no existe absorción). Así pues, la intensidad del haz transmitido será menor a la del haz incidente y su relación viene definida por la turbidez ( $\tau$ ):

$$\tau = 2.303 \text{Absorbancia} = \ln \frac{I_0}{I_l} \quad (\text{V.2})$$

donde  $I_0$  es la intensidad incidente y  $I_l$  la intensidad del haz tras atravesar una distancia  $l$  de suspensión.

A lo largo de un proceso de agregación el tamaño de las partículas dispersoras aumenta con lo que aumenta la cantidad de luz dispersada. En consecuencia la intensidad transmitida va disminuyendo a la vez que la turbidez va aumentando.

Una medida turbimétrica no es más que una medida de la luz dispersada realizada al colocar el detector de luz enfrente de la fuente luminosa.

La sensibilidad de la turbidimetría depende principalmente de la exactitud fotométrica y de la sensibilidad del instrumento. En nuestro caso se ha utilizado el espectrofotómetro Spectronic 601 de Milton Roy.

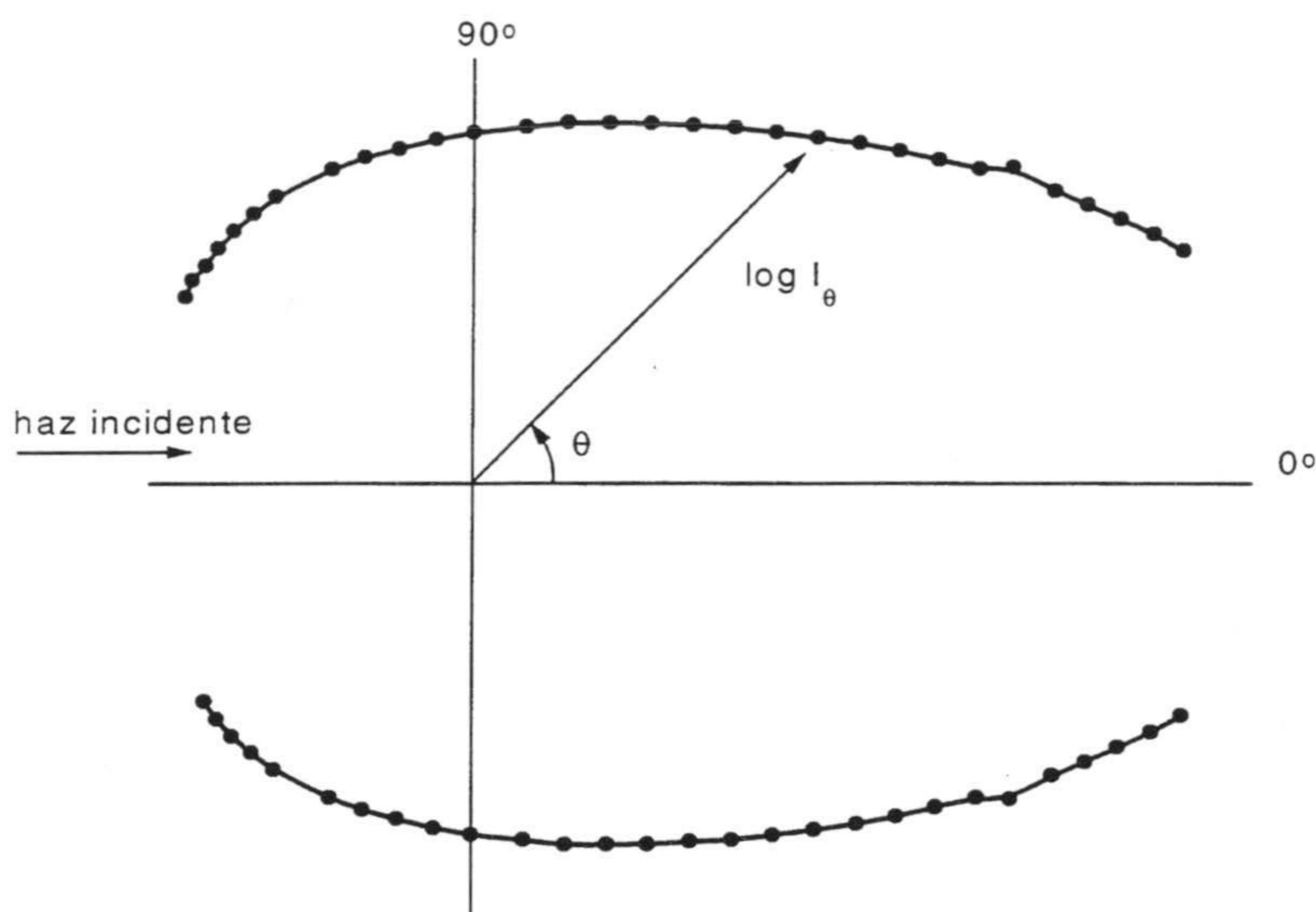
La elección de una longitud de onda adecuada es el primer paso a la hora de realizar las medidas de turbidez ya que para partículas pequeñas la intensidad dispersada es inversamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda. Por otra parte hay que considerar que los sueros con los que se suele trabajar en los hospitales y laboratorios clínicos no sólo contienen el antígeno que se quiere determinar sino también muchas otras proteínas y componentes que absorben luz a determinadas longitudes de onda. Las proteínas tienen un pico de absorción por debajo de los 300 nm, y los cromógenos del suero tienen otro pico de absorción entre 400 y 425 nm. Por lo tanto la longitud de onda de la medida de turbidez o absorbancia debe de estar comprendida entre los 320-380 nm o bien entre 500-600 nm.

De estas dos posibilidades, en el caso de proceso de aglutinación de partículas de látex, interesa utilizar una longitud de onda que sea lo más grande posible en comparación con las partículas del látex con el fin de aumentar la sensibilidad de las medidas. La mayoría de los investigadores usan como longitud de onda para medir la turbidez 585 nm (*Ikewa et al., 1983; Kitano et al., 1987; Ortega et al., 1996*), en nuestro caso se ha utilizado 570 nm. Vamos a justificar a continuación esta elección.

La teoría de Rayleigh (*Rayleigh, 1899*) predice que para partículas pequeñas (radio inferior a  $\lambda/20$ ) y una haz de luz incidente con polarización perpendicular la intensidad dispersada no depende del ángulo. Para partículas con radio igual o inferior a la longitud de onda de haz incidente aparecen interferencias destructivas entre los haces de luz dispersada. Este hecho provoca que la dispersión de luz se produzca mayoritariamente hacia delante, hacia ángulos pequeños. Esta dependencia angular de

la luz dispersada que es más atenuada cuanto mayor es el tamaño de la partícula, de tal forma que para partículas grandes la teoría de Mie predice la existencia de máximos y mínimos (Mie, 1908).

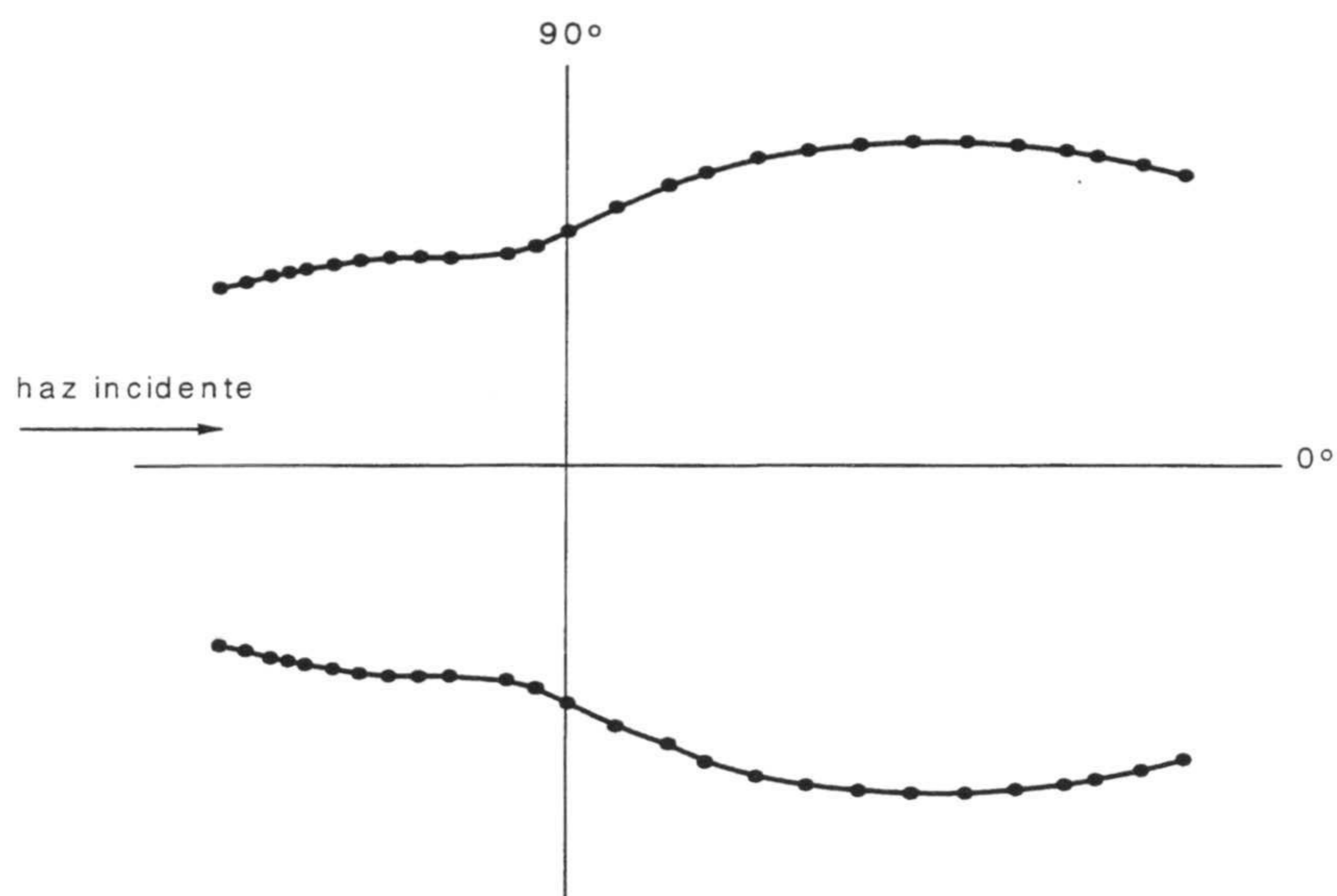
Para comprobar la dependencia de la luz dispersada con el ángulo y el tamaño de partícula basta con observar las siguientes figuras que corresponden a los diagramas de distribución angular de la luz dispersada en coordenadas polares por tres partículas coloidales con diferentes diámetros: 186 nm, 337 nm y 665 nm. Estos diagramas han sido obtenidos midiendo la luz dispersada con el sistema 4700c que se emplea para las medidas de PCS y en ellos cada punto viene caracterizado por un vector cuyo módulo es el logaritmo de la intensidad dispersada y cuyo ángulo definido respecto al eje X es el ángulo de dispersión.



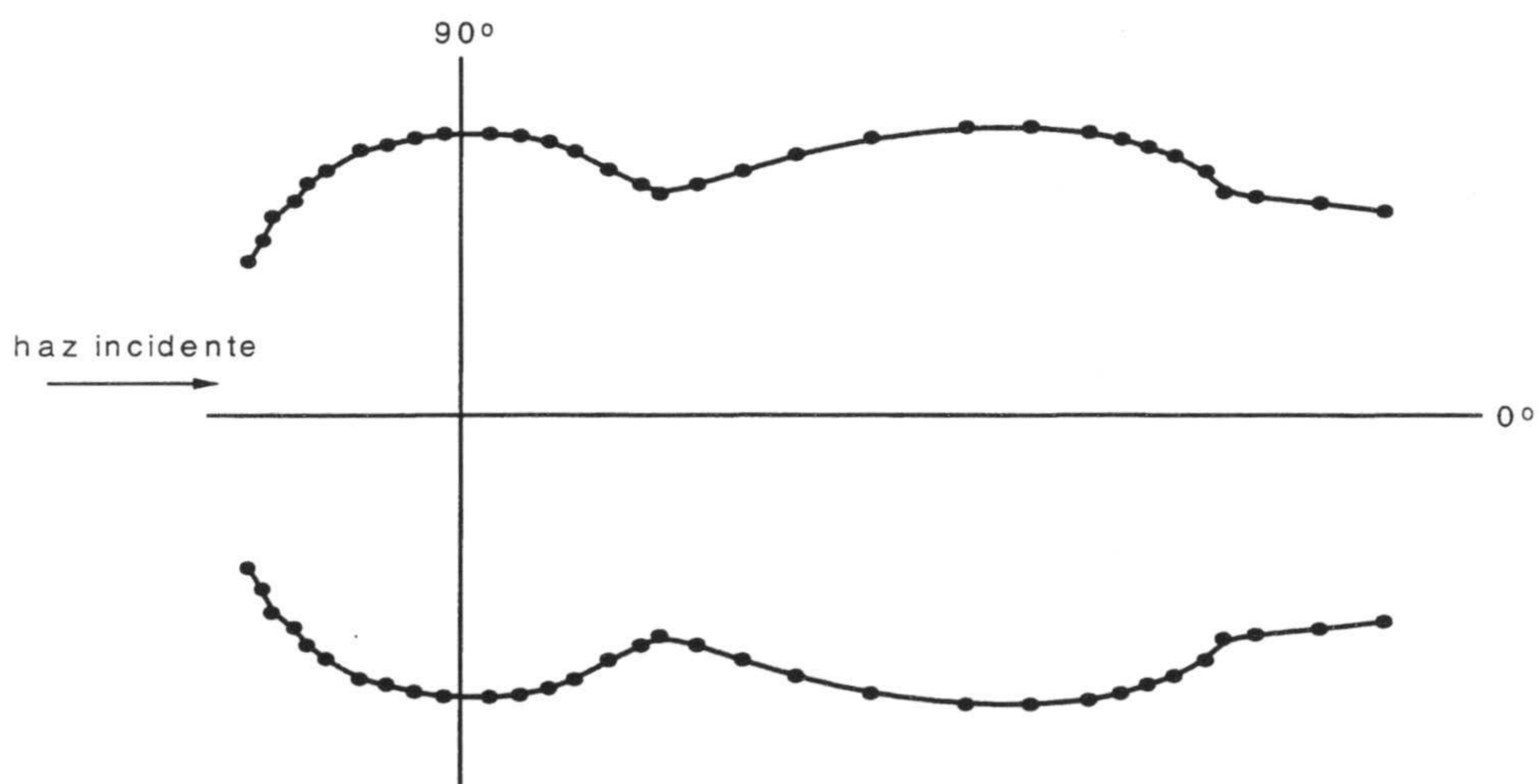
**Figura V.8.** Distribución angular de la luz dispersada (en unidades arbitrarias) por una partícula con diámetro 186 nm.

El ángulo de dispersión cero corresponde a la situación en la que el fotodetector está colocado enfrente del láser.

Como se puede observar en estas figuras conforme mayor es el tamaño de la partícula más luz se dispersa hacia ángulos pequeños en comparación con ángulos grandes.



**Figura V.9.** Distribución angular de la luz dispersada (en unidades arbitrarias) por una partícula con diámetro 337 nm.



**Figura V.10.** Distribución angular de la luz dispersada (en unidades arbitrarias) por una partícula con diámetro 665 nm.

En el caso de la partícula de 337 nm aparece un mínimo mientras que para la partícula de 665 nm aparecen dos máximos y dos mínimos. La posición de estos máximos y mínimos dependen del índice de refracción relativo y del factor de forma

definido como  $\alpha=2\pi a/\lambda$  donde  $a$  es el radio de la partícula. Así pues la existencia de estos puntos son característicos de cada tamaño de partícula y supone una vía alternativa para el cálculo de diámetros de partículas esféricas (*Dandliker 1950; Maron et al., 1963*).

La dependencia angular de la luz dispersada con el tamaño de partícula es la responsable de que la turbidez de un sistema inicialmente aumenta con el diámetro de partícula, pasando por un máximo cuando el valor de  $\alpha$  es 8 para posteriormente empezar a disminuir para valores de  $\alpha$  mayores de 8 (*Heller et al., 1957*). Para seguir un proceso de agregación mediante un espectrofotómetro es necesario que la turbidez aumente conforme las partículas están agregando. Para ello interesa que el radio de la partícula original sea lo más pequeño posible en comparación con la longitud de onda (valor pequeño de  $\alpha$ ) para que la zona de incremento de turbidez abarque tamaños de agregado lo más grande posible. En esta consideración se basa la turbidimetría infrarroja donde se mide la turbidez a una longitud de onda de 940 nm. Por esta vía se han conseguido límites de detección de 15-20 ng/ml para ciertos sistemas (*Sudo et al., 1980*). En nuestro caso el valor de  $\alpha$  es de 1.5.

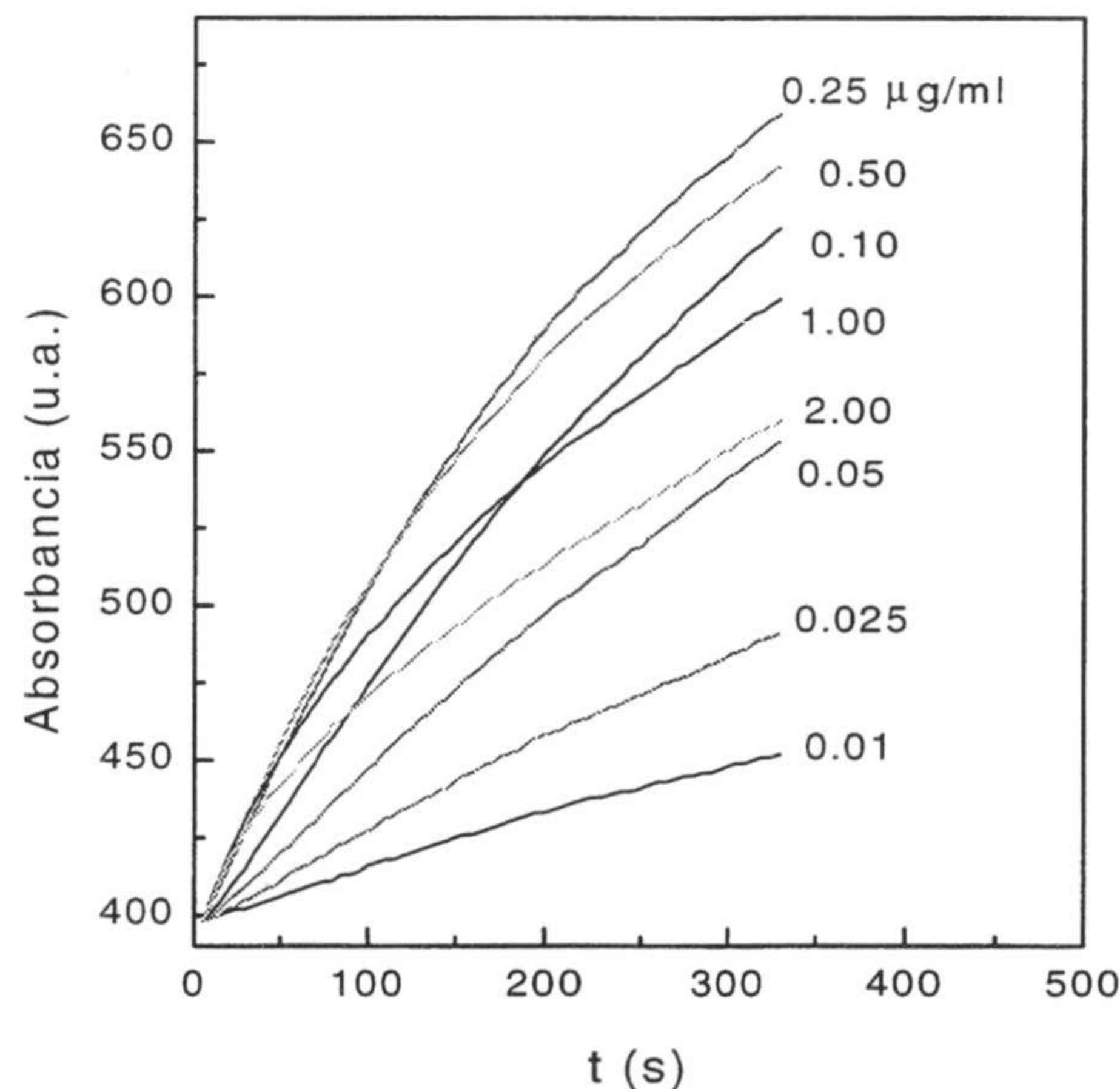
Entre las ventajas que tiene la turbidimetría podemos destacar la sencillez instrumental (un espectrofotómetro), lo que permite una gran aplicabilidad de los tests de látex en numerosos laboratorios clínicos, manteniendo una alta reproducibilidad y buena sensibilidad. Teóricamente la turbidimetría debe de ser menos sensible que otras técnicas ya que el fotomultiplicador siempre detecta una luz de fondo de notable intensidad (tomada como referencia), ya que éste y la lámpara se encuentran situados en la misma dirección (*Preece et al., 1991; Kimura, 1980*). Según concluyen Spencer y Price (*Spencer et al., 1981*) la calidad de los resultados depende en gran medida del ruido óptico del instrumento y del intervalo de medida del mismo.

La metodología seguida para medir la absorbancia durante el proceso de inmunoaglutinación consiste en mezclar rápidamente en la cubeta del espectrofotómetro 950  $\mu$ l del complejo látex-F(ab')<sub>2</sub> con 50  $\mu$ l de una disolución de PCR. Ambas disoluciones están preparadas en el tampón de reacción previamente

descrito. La concentración de partículas en cubeta óptima para las medidas ha sido determinada previamente (Ortega, 1995) siendo de  $4.8 \times 10^{10}$  part/ml.

En la siguiente figura se muestra la absorbancia medida en función del tiempo para diferentes concentraciones de PCR en cubeta. Se puede ver como la absorbancia ( $0.434\tau$ ) aumenta con el tiempo de reacción debido a la agregación de las partículas del complejo por la existencia de reacciones antígeno-anticuerpo cruzadas. La respuesta depende de la concentración de PCR presente en la disolución, lo que permite cuantificar la cantidad de PCR presente en una muestra problema.

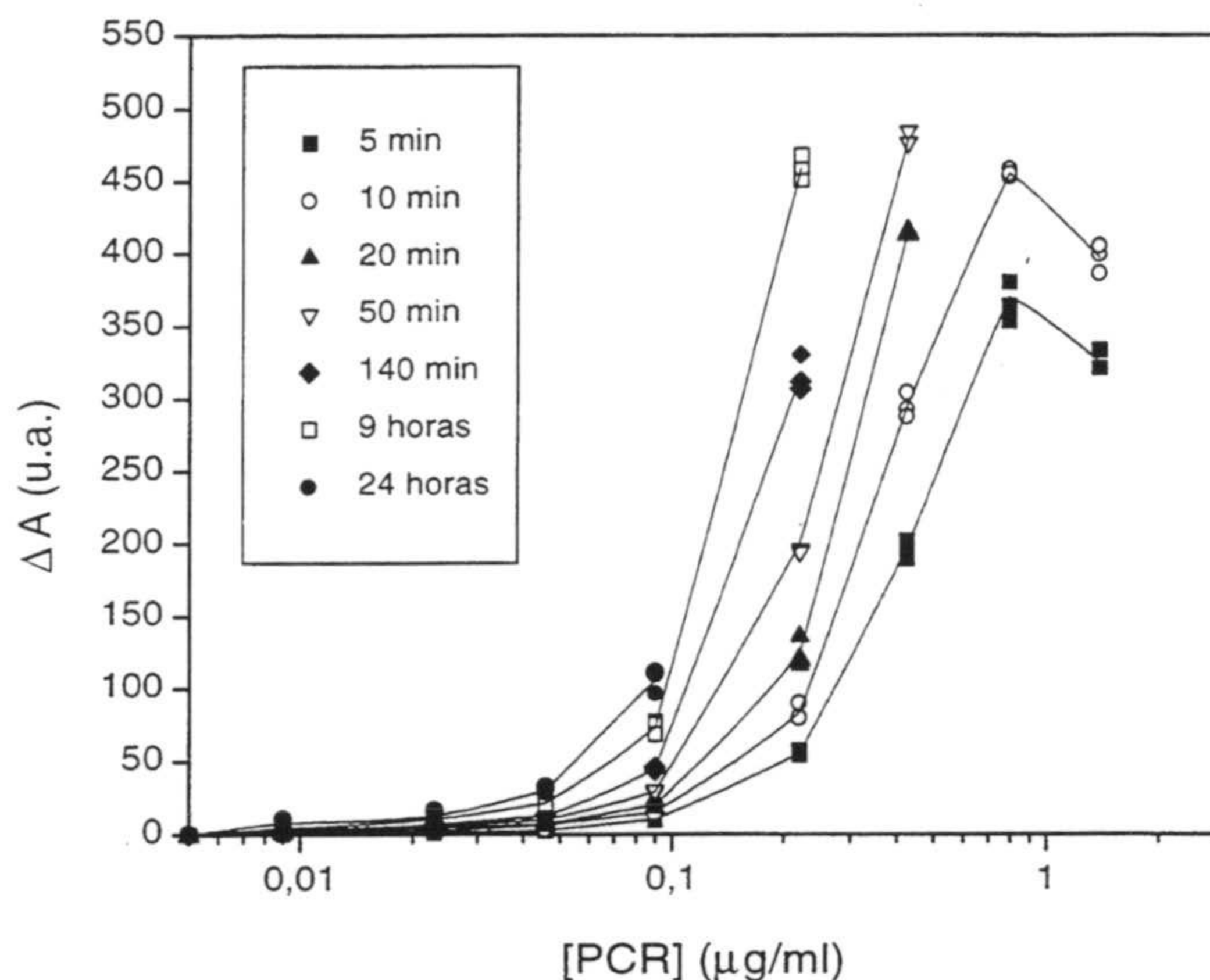
Previamente a la realización de los experimentos se comprueba la estabilidad coloidal del complejo en el medio de reacción (blanco) de forma que nos aseguremos que el incremento de absorbancia en presencia de PCR se deba sólo a las reacciones antígeno-anticuerpo y no a la agregación del complejo por baja estabilidad coloidal.



**Figura V.11.** Dependencia temporal de la absorbancia en la inmunoaglutinación del complejo a diferentes concentraciones de PCR.

A partir de los datos experimentales se calcula el incremento de absorbancia para cada muestra como diferencia entre la absorbancia máxima y la absorbancia de un blanco.

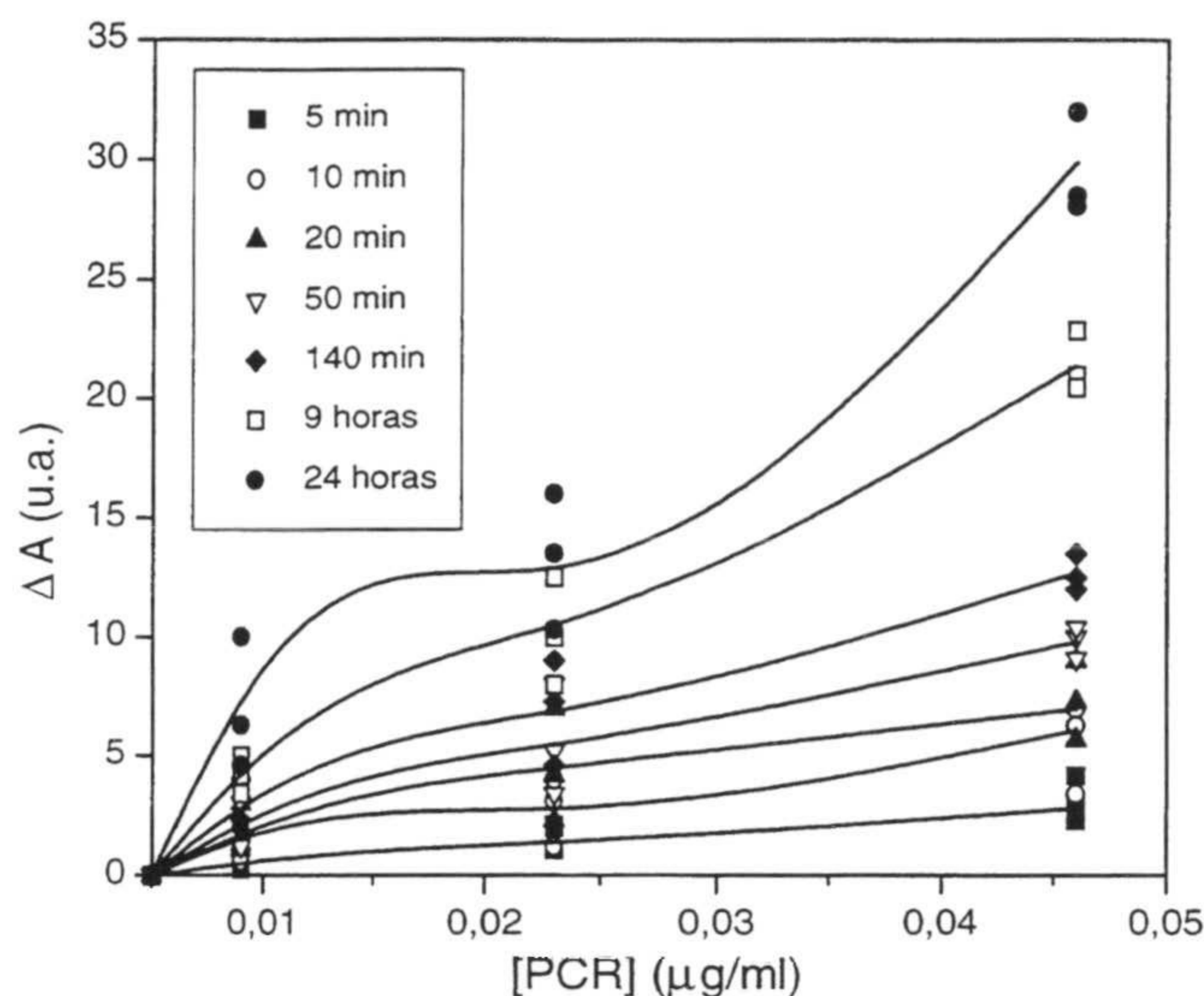
Con el fin de comprobar la reproducibilidad de esta técnica los experimentos se realizaron por triplicado en tres días diferentes. Además la reacción fue seguida en diferentes momentos desde su inicio. La figura V.12 muestra los datos obtenidos.



*Figura V.12. Respuesta turbidimétrica de la inmunoaglutinación a diferentes tiempos.*

Se puede comprobar que la reproducibilidad de las medidas es aceptablemente buena, no siendo en ningún momento la dispersión de los puntos experimentales superior al 5% del valor medio. Por otra parte, la respuesta obtenida turbidimétricamente aumenta con el tiempo transcurrido desde la mezcla de los reactivo y el momento en que se mide la absorbancia. Por lo tanto la sensibilidad como el límite de detección, defino como la cantidad mínima de CPR que se puede determinar, deben de depender del tiempo de reacción. Esta afirmación se puede comprobar en la siguiente figura que corresponde a la zona de bajas concentraciones de PCR de la figura V.12.





**Figura V.13.** Ampliación de los datos de la figura V.10 en la zona de bajas concentraciones de PCR.

Si se considera como resultado positivo que indica la presencia de antígeno un incremento de absorbancia de 10 u.a., para 50 minutos de reacción el límite de detección es de 46 ng/ml de PCR mientras que para 24 horas es de 9 ng/ml.

Con el fin de hacer el mayor número de análisis por unidad de tiempo, 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.

2. *Nefelometría.* Cuando el detector se coloca formando un ángulo diferente de  $0^\circ$  respecto a la dirección incidente, estaremos realizando una medida nefelométrica en lugar de turbidimétrica. Esta técnica gana cada día más terreno en la detección de analitos por inmunoaglutinación de látex desde que en 1971 Killingsworth y Savory (*Killingsworth et al., 1971*) publicaran sus resultados obtenidos con un nefelómetro comercial. Teóricamente la sensibilidad nefelométrica debe ser bastante alta en comparación con la turbidimetría, ya que en este último caso es difícil medir pequeñas variaciones en la turbidez con precisión si se tiene en cuenta que la intensidad del haz transmitido suele ser el 95 % de la incidente que a su vez es usada como fondo de la

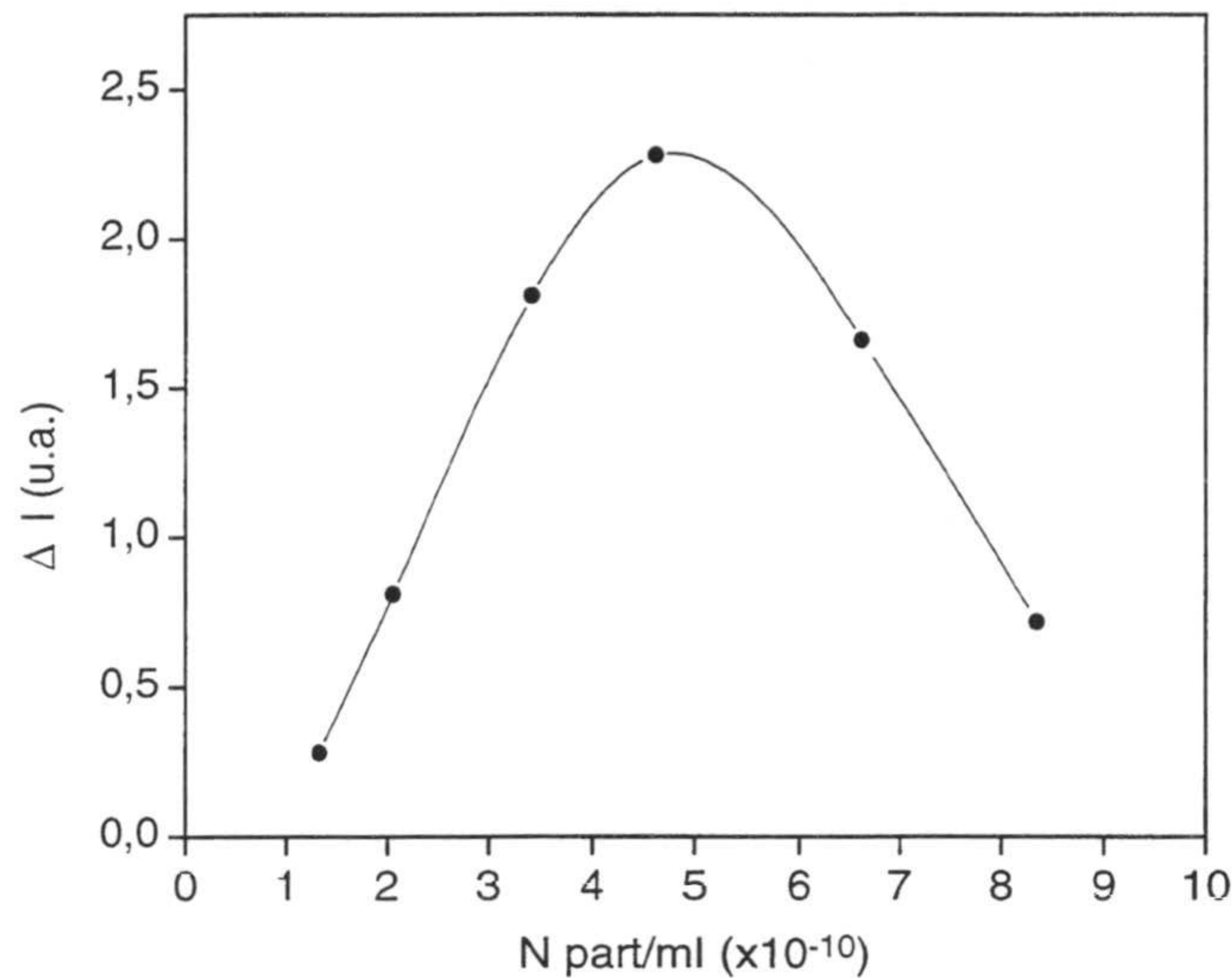
medida. Sin embargo en una medida nefelométrica se registra directamente la luz dispersada a un ángulo determinado sin compararla con ningún fondo. Por lo tanto, la sensibilidad dependerá de la dispersión basal que se produce en ausencia de partículas y cuyo valor debería ser cero (*Grange et al., 1977; Whicher et al., 1980; Montagne et al., 1992*). No obstante los reflejos internos y la dispersión causada por ciertos componentes ópticos contribuyen a dar una señal de fondo.

Actualmente, y gracias a la perfección alcanzada por los espectrofotómetros, la técnica turbidimétrica está ganando terreno. Además con un espectrofotómetro de química clínica se pueden realizar gran cantidad de determinaciones además de las turbidimétricas. La elección entre turbidimetría y nefelometría van a depender de la aplicación que se dé a la técnica y del instrumental de que se disponga.

El nefelómetro empleado para los estudios de estabilidad coloidal de los capítulos anteriores se ha utilizado en esta ocasión para cuantificar la inmunoaglutinación del complejo látex-F(ab')<sub>2</sub> en presencia de PCR. El método consiste en introducir mediante el dispositivo de inyección 1 ml de disolución de PCR y 1 ml de complejo (ambas preparadas en el tampón de reacción) en la célula de medida. Al igual que en los ensayos turbidimétricos se ha comprobado que el blanco es estable en el tampón de reacción.

Para calcular la concentración óptima de partículas para realizar las medidas se hicieron una serie de inmunoensayos empleando una cantidad fija de PCR de 1 µg/ml. Los resultados obtenidos aparecen en la figura V.14, donde se ha representado el incremento en la intensidad dispersada para un ángulo de 20° después de 5 minutos de reacción.

En esta figura se puede comprobar que la concentración de partículas óptima es de  $4.8 \times 10^{10}$  part/ml, coincidiendo con la turbidimétrica.

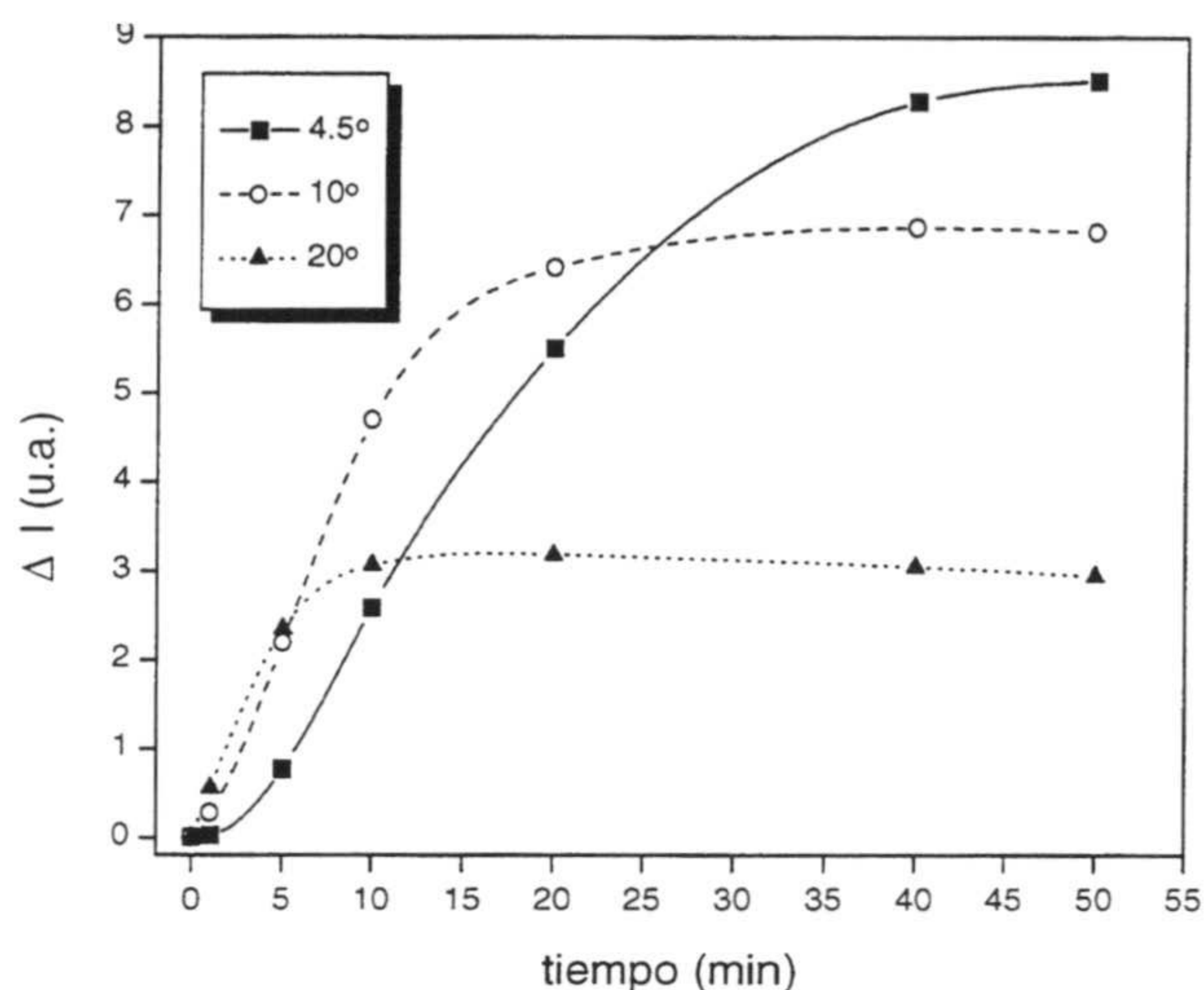


**Figura V.14.** Incremento de intensidad dispersada a  $20^\circ$  en función de la concentración de partículas ( $N$ ) después de la inmunoaglutinación del complejo látex- $F(ab')_2$  con  $1 \mu\text{g/ml}$  de PCR.

Uno de los parámetros más importantes en las medidas nefelométricas es el ángulo de medida. Como la sensibilidad nefelométrica depende de la diferencia entre la luz dispersada y la luz basal, interesa que la primera sea lo más grande posible. Así pues, teniendo en cuenta las partículas grandes dispersan más luz a ángulos pequeños que a grandes (ver figuras V.8, V.9 y V.10) el uso de nefelómetros a ángulo pequeño son deseables.

Tal y como se puede comprobar en la figura V.15, donde se ha representado el incremento en la intensidad dispersada para una concentración de PCR de  $1 \mu\text{g/ml}$ , la respuesta nefelométrica depende del ángulo y del tiempo de reacción.

Para tiempos cortos de reacción el ángulo de  $20^\circ$  es el que proporciona un mayor incremento en la intensidad dispersada. Sin embargo, conforme transcurre el tiempo las señales de  $10^\circ$  y  $20^\circ$  se saturan y sus incrementos permanecen constantes mientras que para el ángulo de  $5^\circ$  la señal continua aumentando. Por lo tanto, dependiendo del tiempo requerido para realizar el análisis utilizaremos el ángulo de  $20^\circ$ , para periodos cortos, ó el de  $4.5^\circ$  si no hay limitación temporal.

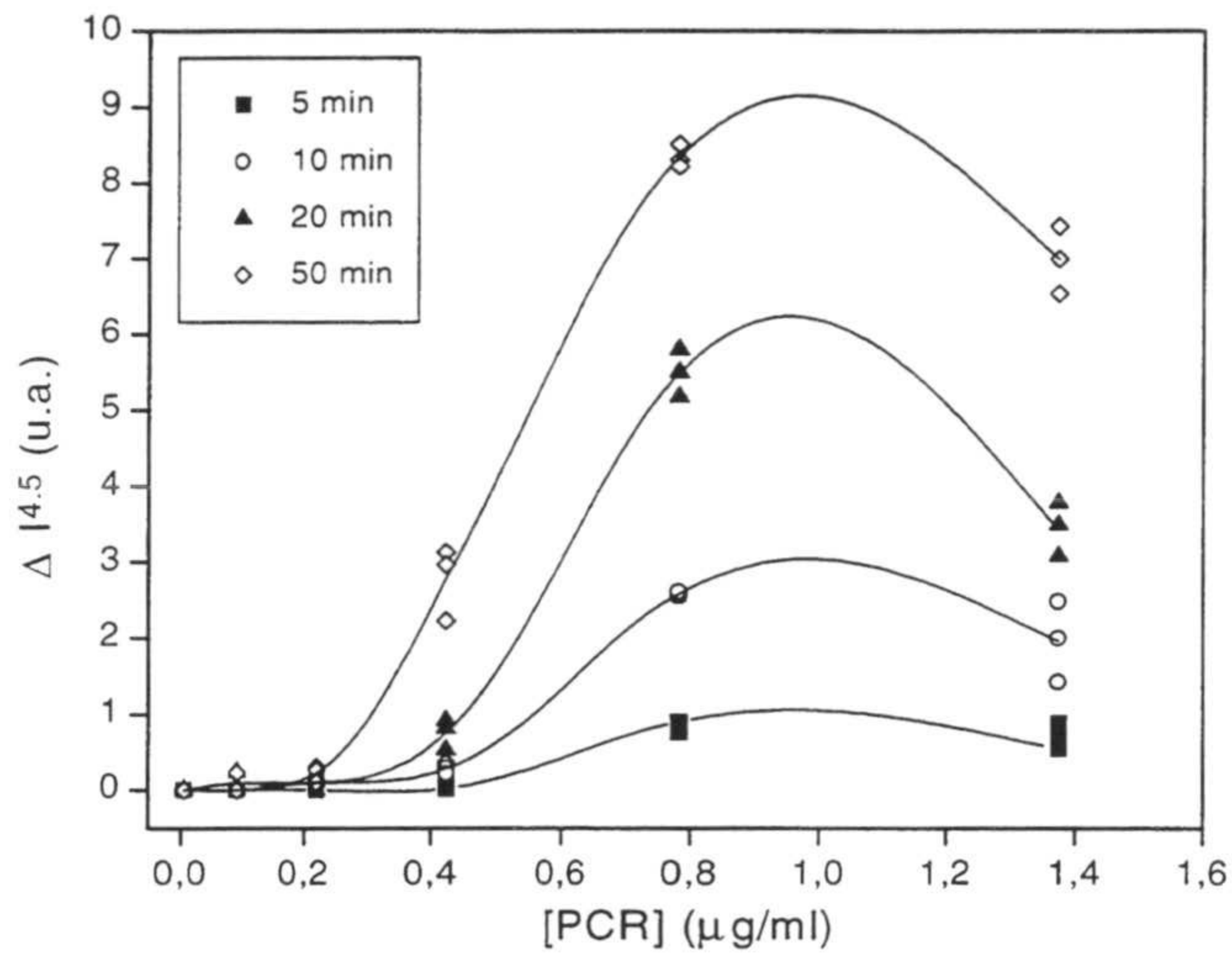


**Figura V.15.** Dependencia de la respuesta nefelométrica con el ángulo para la reacción del complejo látex- $F(ab')_2$  con  $1 \mu\text{g/ml}$ .

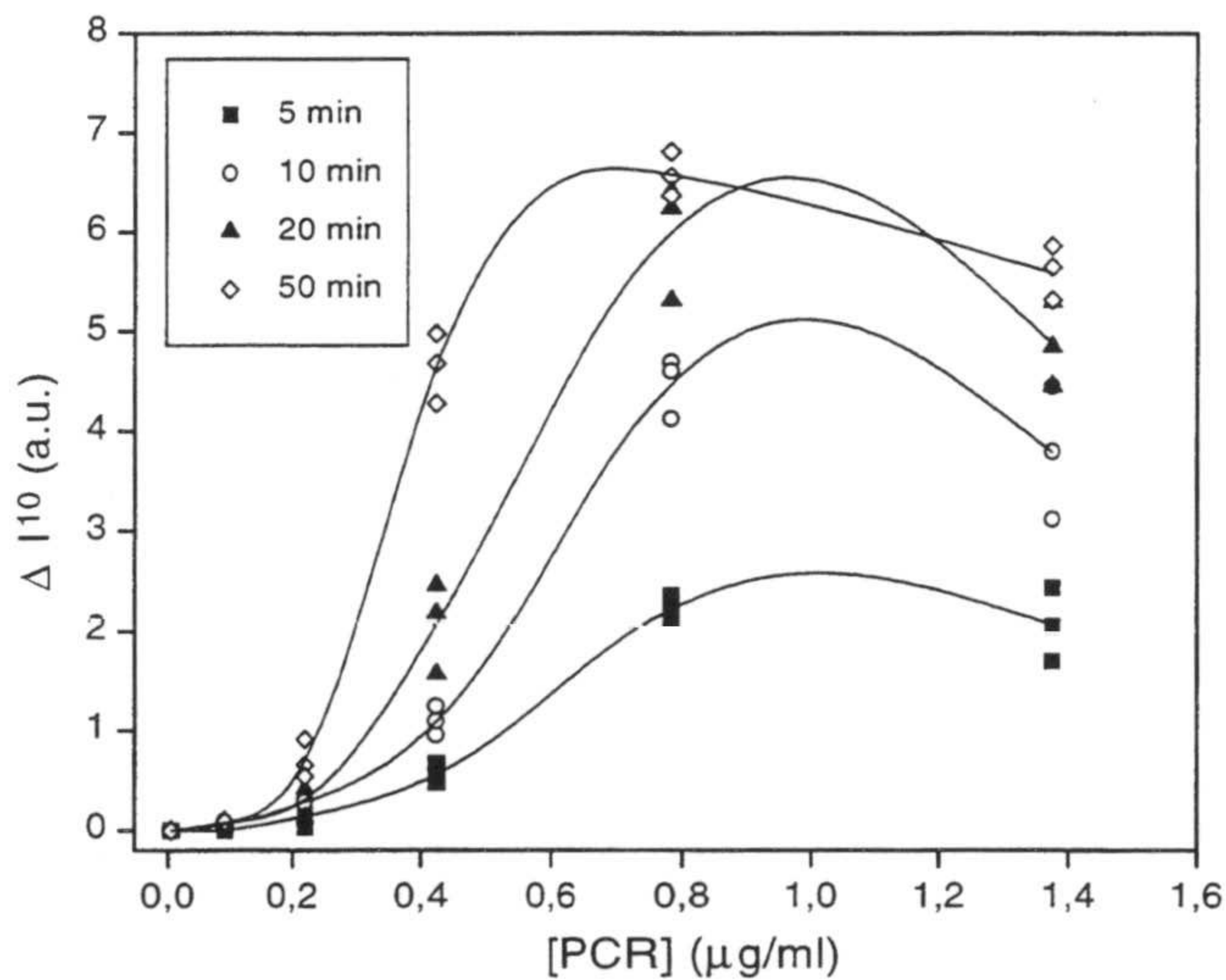
La saturación de las señales de  $10^\circ$  y  $20^\circ$  ocurre cuando el tamaño de los agregados llega a un valor límite a partir del cual un aumento en el tamaño del agregado produce interferencias destructivas que no conduce a un aumento en la intensidad dispersada (Buffone et al., 1975). De hecho Deverill y col. (Deverill et al., 1983) mediante espectroscopía de fotocorrelación han comprobado que el tamaño medio de los inmunoagregados continúa aumentando con el tiempo aunque aparezca un plateau en la señal de intensidad medida por nefelometría. Estas consideraciones imponen un límite a la hora de usar ángulos grandes de medida, donde consideraciones ópticas pueden influir en la cinética aparente de la inmunoaglutinación.

Las interferencias destructivas dependen del tamaño de la partícula dispersora y del ángulo de medida. Para un mismo tamaño se dispersa menos a un ángulo grande (más interferencias) que a uno pequeño. Por este motivo, como se puede comprobar en la figura V.15, la saturación de la señal ocurrirá más tarde cuanto menor sea el ángulo.  $4.5^\circ$ .

Con el fin de estudiar la reproducibilidad de las medidas hechas con el nefelómetro, éstas se repitieron por triplicado al igual que se hizo con los experimentos de turbidimetría. En las siguientes figuras se muestran los resultados obtenidos para los tres ángulos y para diferentes tiempos.

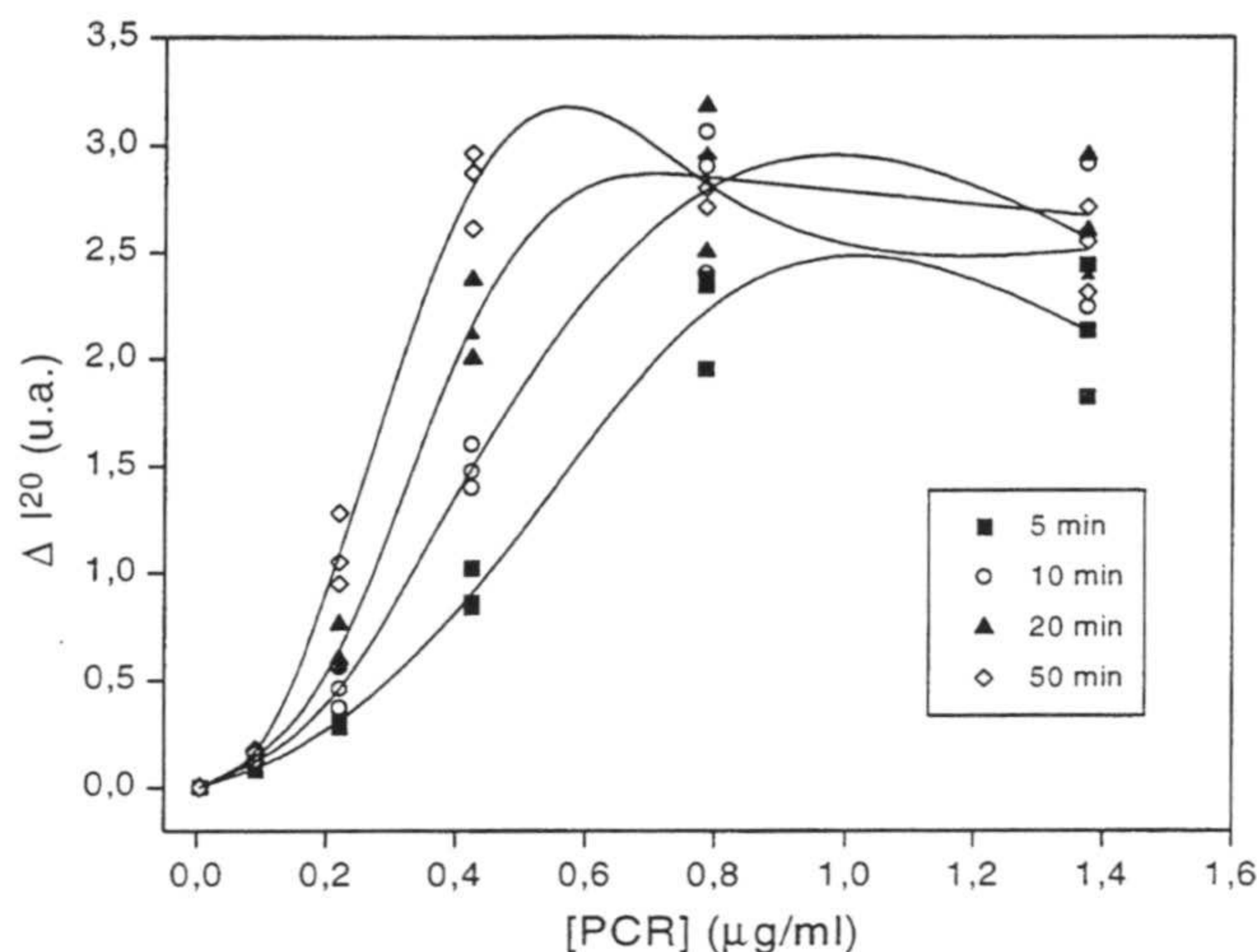


**Figura V.16.** Incremento en la luz dispersada a  $4.5^\circ$  en función de la concentración de PCR durante la inmunoaglutinación del complejo látex- $F(ab')_2$  a diferentes tiempos de reacción.



**Figura V.17.** Incremento en la luz dispersada a  $10^\circ$  en función de la concentración de PCR durante la inmunoaglutinación del complejo látex- $F(ab')_2$  a diferentes tiempos de reacción.

Se puede comprobar que la reproducibilidad de los resultados es inferior a la obtenida en la turbidimetría, llegando a ser la dispersión máxima de los puntos experimentales de 20% del valor medio.



**Figura V.18.** Incremento en la luz dispersada a  $20^\circ$  en función de la concentración de PCR durante la inmunoaglutinación del complejo látex- $F(ab')_2$  a diferentes tiempos de reacción.

Este resultado es superior a los que podemos encontrar en la bibliografía referente a reproducibilidad de las medidas nefelométrica. Así por ejemplo, Kapmeyer (*Kapmeyer et al., 1991*) y Montagne (*Montagne et al., 1992a*) han obtenido medidas altamente reproducibles con diferencias de 8% y 7.5%, respectivamente, respecto al valor medio obtenido.

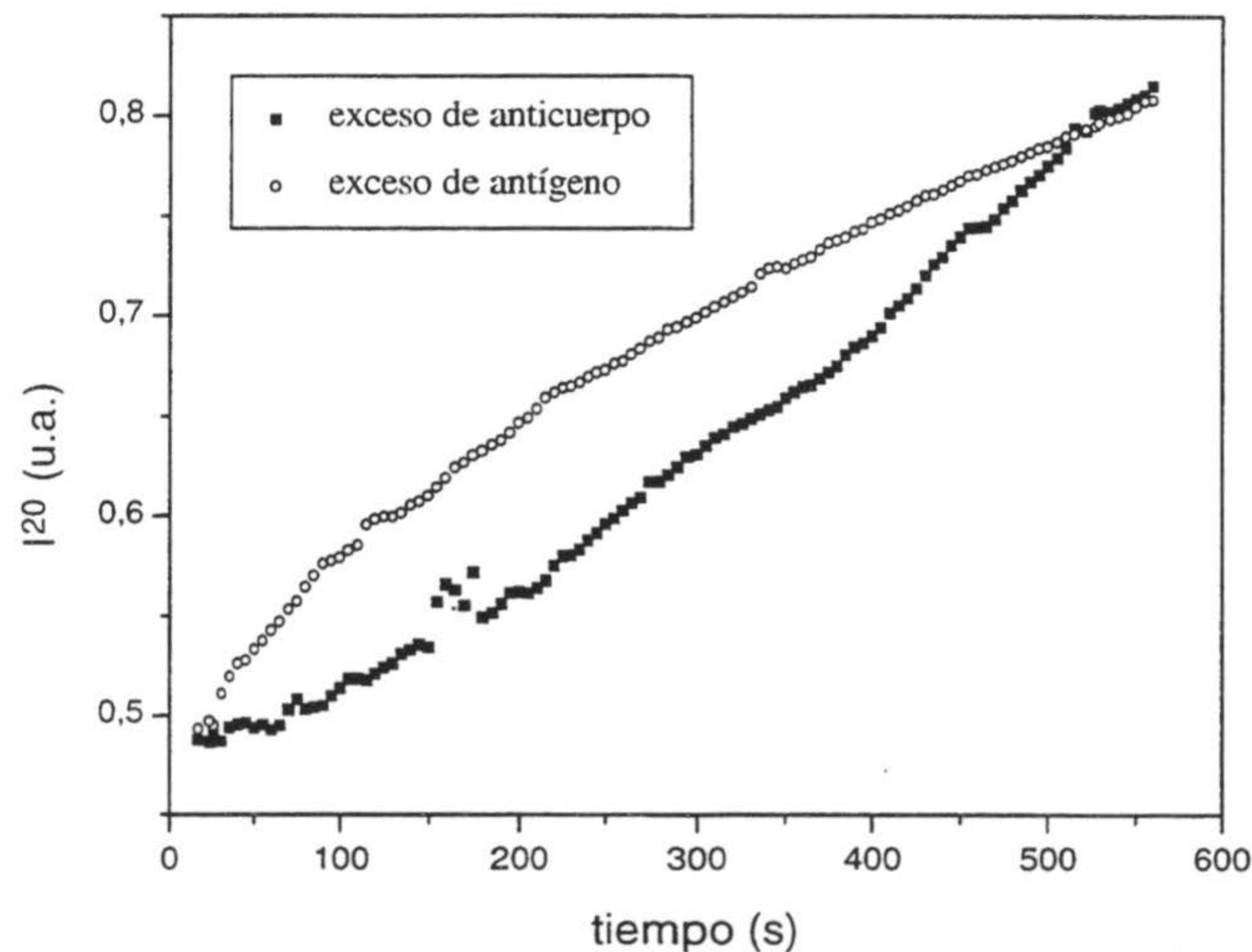
De las tres figuras anteriores se puede comprobar que la forma de las curvas se asemeja más a la teórica propuesta por Heiderberger-Kendall ó curva de la precipitina (ver figura V.17) conforme disminuye el tiempo de reacción y el ángulo de medida. La respuesta obtenida para el ángulo de  $20^\circ$  (figura V.18) no presenta la región de exceso de antígeno.

Para concentraciones pequeñas de antígeno y cortos periodos de tiempo es interesante seguir la inmunoaglutinación midiendo la luz dispersada a  $20^\circ$ , pues es la señal que ofrece mayores incrementos. Ahora bien, si el tamaño de los agregados formados es grande (tiempos grandes de reacción ó partículas iniciales grandes) el ángulo de  $4.5^\circ$  es aconsejable.

Los mejores resultados (ángulo de  $20^\circ$  y 50 minutos de reacción) muestran que el límite de detección obtenido por esta técnica es de 82 ng/ml. Este valor es algo superior

al obtenido por turbidimetría. En vista a estos resultados se puede indicar que la turbidimetría ofrece límites de detección algo inferiores a la nefelometría y además proporciona datos más reproducibles.

Como se ha podido comprobar, en la respuesta óptica de un proceso de inmunoaglutinación de látex existen dos concentraciones de antígeno, una en la región de exceso de anticuerpo y otra en la de exceso de antígeno, para las cuales se obtiene el mismo incremento de absorbancia o de intensidad de luz dispersada. Para poder determinar en qué zona nos encontramos se puede hacer dos cosas: i) por un lado, seguir la cinética de la variación de la magnitud física medida con el tiempo. La velocidad con que varía la señal es prácticamente lineal y pequeña en la región de exceso de anticuerpo, siendo más elevada en la región contraria, tal y como puede comprobarse en las figura V.19. ii) El otro método consiste en diluir un poco la muestra problema y volver a realizar el inmunoensayo. Si la respuesta óptica 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 que nos encontraríamos sería la del exceso de antígeno. Este segundo método es el que se suele seguir en los laboratorios clínicos.



**Figura V.19.** Intensidad dispersada a  $20^\circ$  durante dos procesos de inmunoaglutinación de un complejo látex- $F(ab')_2$  con una concentración de PCR correspondiente a la región de exceso de anticuerpo y otra a la región de exceso de antígeno.

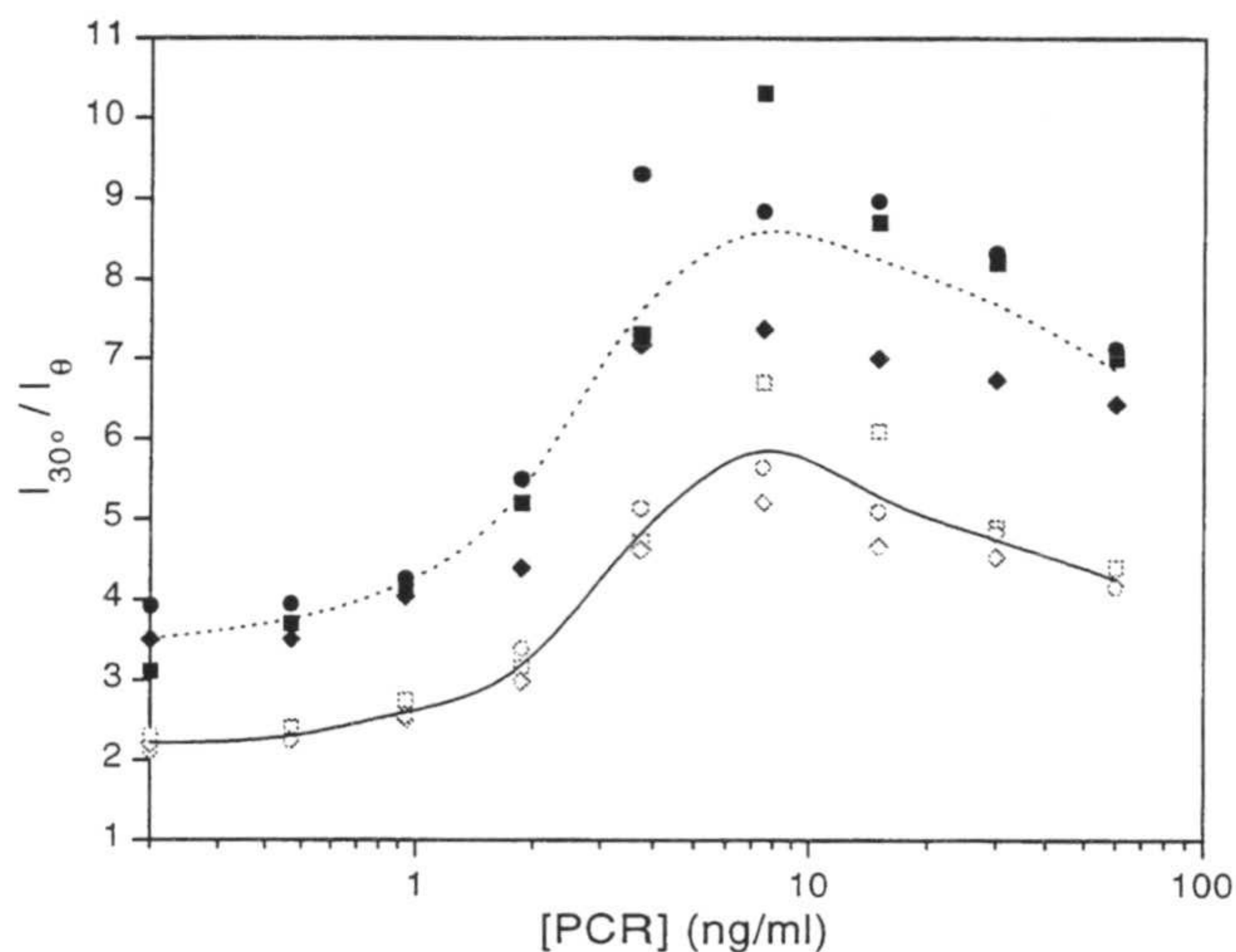
3. *Anisotropía angular*. Este método para seguir un proceso de inmunoaglutinación de látex fue propuesto por Von Schultness y col. (*Von Schultness et al., 1980*) y en él se hace uso de la nefelometría pero se intenta aumentar la sensibilidad comparando las intensidades dispersadas a dos ángulos diferentes. Como se ha visto anteriormente, a medida que aumenta el tamaño del dispersor se incrementa la dispersión hacia ángulos pequeños disminuyendo la dispersión a ángulos grandes. Por lo tanto el cociente entre la luz dispersada a dos ángulos diferentes permite detectar cambios en el tamaño de los agregados. Teóricamente este método es aplicable siempre y cuando la relación entre el radio de las partículas originarias ( $a$ ) y la longitud de onda en el medio ( $\lambda_m$ ) sea  $\lambda_m/4 < a < \lambda_m$ , alcanzándose la máxima sensibilidad cuando un ángulo es igual o inferior a  $15^\circ$  y el otro ángulo esté comprendido entre  $60^\circ$  y  $100^\circ$  (*Von Schultness et al., 1980*).

Para realizar los experimentos de anisotropía angular se ha utilizado el sistema 4700 que está principalmente diseñado para realizar estudios de dispersión dinámica de luz. La realización de medidas de luz dispersada estáticamente mediante este dispositivo está limitada para ángulos menores a  $20^\circ$  debido a la alta sensibilidad del fotomultiplicador. Por este motivo se han realizado los experimentos utilizando como ángulo más pequeño el de  $30^\circ$  y como ángulos grandes  $70^\circ$  y  $90^\circ$ .

Esta alta sensibilidad del fotomultiplicador también impone el empleo de bajas concentraciones de partículas para evitar la saturación del mismo, de tal forma que la concentración empleada para los experimentos ha sido de  $2.8 \times 10^8$  part/ml. Esta concentración es 100 veces inferior a la empleada en turbidimetría y nefelometría, lo que representa una ventaja ya que se ahorra en reactivo. Pero por otra parte, al tener que emplear una concentración tan baja de partículas, la cinética es extremadamente lenta por lo que hasta que no transcurrieron 24 horas no se pudieron hacer las medidas de anisotropía angular. Los experimentos se realizaron por triplicado.

En la figura V.20 mostramos la dependencia de la razón  $I_{30^\circ}/I_{70^\circ}$  e  $I_{30^\circ}/I_{90^\circ}$ , siendo  $I$  la intensidad dispersada para el ángulo indicado, con la concentración de PCR presente en el medio. Es importante indicar que dichas concentraciones vienen ahora indicadas en ng/ml, con lo que esta técnica permite obtener límites de detección tan bajos como 1 ng/ml, siendo 10 veces inferior a los límites de detección obtenidos por nefelometría y turbidimetría.



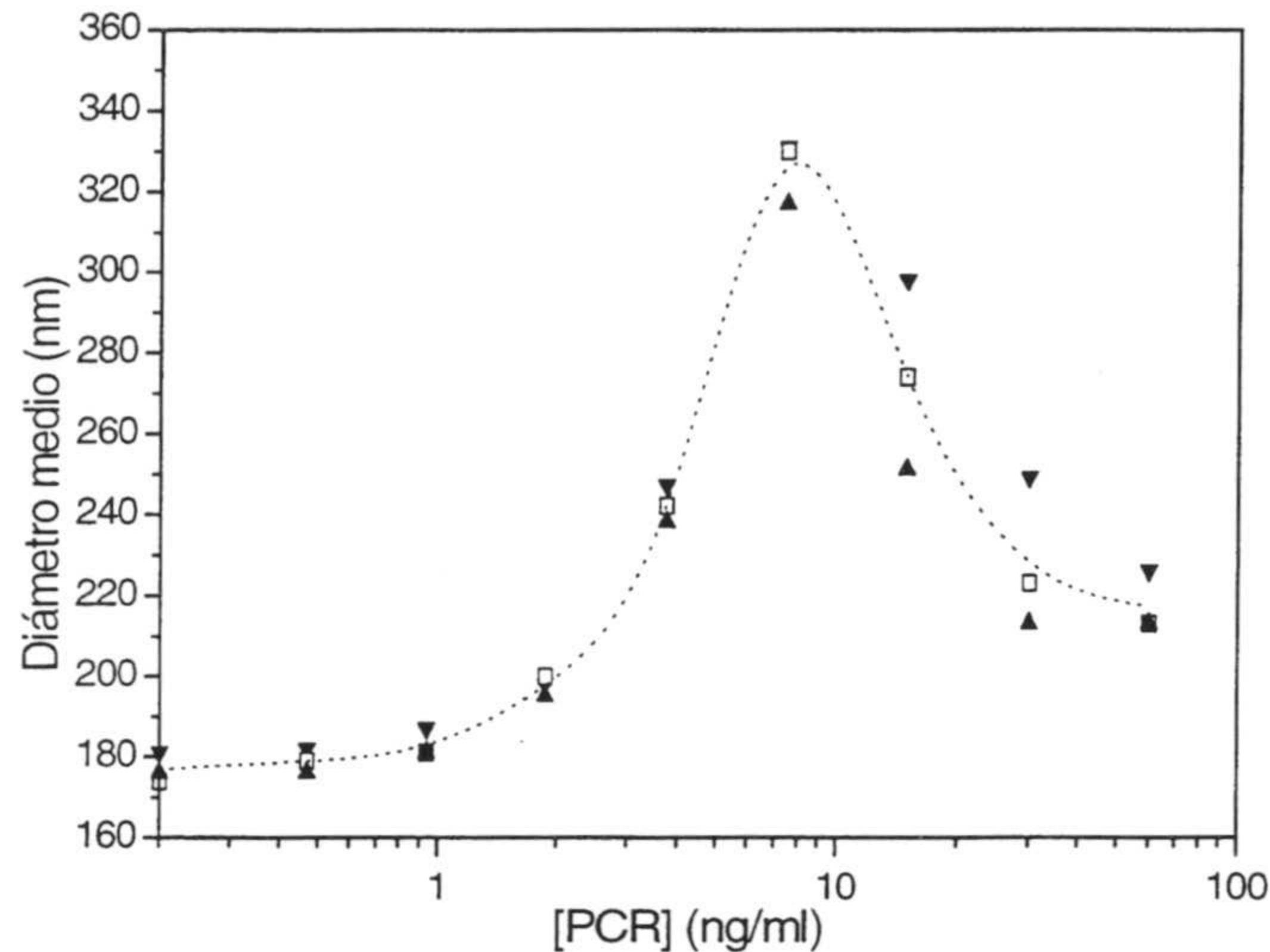


**Figura V.20.** Dependencia de la razón de anisotropía con la concentración de antígeno. Los símbolos abiertos corresponden a  $70^\circ$  y los cerrados a  $90^\circ$ .

Como se puede apreciar en la figura V.20 la reproducibilidad de las medidas es baja, especialmente para la razón  $I_{30^\circ}/I_{90^\circ}$ . Esta baja reproducibilidad también ha sido obtenida por Ortega (Ortega, 1995a) quien midió  $I_{20^\circ}/I_{50^\circ}$  e  $I_{20^\circ}/I_{70^\circ}$ . Teóricamente se podría pensar que la anisotropía angular sería una técnica muy reproducible, pues el 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 dispersada 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 a ángulos inferiores o iguales a  $15^\circ$ . También la utilización de un dispositivo especialmente diseñado para medidas de anisotropía angular podría mejorar la reproducibilidad.

4. *Espectroscopía de fotocorrelación.* Mediante esta técnica se puede medir el tamaño medio de los agregados, por lo que en principio puede ser empleada para seguir la inmunoaglutinación de microesferas de látex. Las condiciones experimentales en las que se realizaron las medidas de tamaño coinciden con las de anisotropía angular.

En la siguiente figura se muestran los resultados obtenidos para un ángulo de  $90^\circ$  y tras 24 horas de reacción.



*Figura V.21. Diámetro medio de agregado en función de la concentración de PCR.*

La forma de la respuesta óptica obtenida para la inmunoaglutinación es comparable con la curva teórica de la precipitina.

La reproducibilidad en la zona de exceso de anticuerpo es muy buena y además la alta sensibilidad de esta técnica permite detectar cantidades muy pequeñas de PCR (cerca de 1 ng/ml). En este sentido, posiblemente esta técnica sea, de entre las cuatro estudiadas, la más aconsejable. Como desventajas de esta técnica podemos encontrar el tiempo que hay que esperar para obtener un resultado definitivo así como su actual elevado costo limita su uso en laboratorios clínicos. No obstante existen algunas patentes sobre el empleo de la espectroscopía de fotocorrelación para seguir la inmunoaglutinación (Bangs, 1990).

Stoll y col. (Stoll *et al.*, 1993) indicaron que para altas concentraciones de antígeno la cinética de la inmunoaglutinación tiende a estar controlada por difusión (DLCA). Como se vió en el capítulo anterior, esta cinética conduce a la formación de agregados con estructuras abiertas y de muy diferentes tamaños y formas. En consecuencia existe una ancha distribución de coeficientes de difusión que se traduce una baja

reproducibilidad en la determinación del tamaño medio de agregado. Para la zona de exceso de anticuerpo, los agregados existentes son más pequeños y similares en forma.

## 6. Estabilidad coloidal de reactivos para test de inmunoaglutinación

La fuerza iónica del suero sanguíneo y de los otros fluidos corporales sobre los cuales se practican los inmunoensayos suele ser de 150 mM. Bajo estas condiciones de salinidad es imprescindible que el complejo látex-anticuerpo, que se va a emplear para detectar la presencia del antígeno correspondiente, sea coloidalmente estable. De esta forma no aseguramos que la agregación del complejo sólo se debe a las reacciones antígeno-anticuerpo y no a la baja estabilidad coloidal. La dilución del suero para bajar la fuerza iónica no es aconsejable, ya que la concentración del analito a encontrar también disminuirá dificultándose por tanto su determinación.

A lo largo de los tres capítulos anteriores hemos comprobado la tendencia natural que tienen las micropartículas a la autoagregación, especialmente para complejos látex-proteína. Como resultado se ha observado que la estabilidad coloidal de estos sistemas es muy baja especialmente en el intervalo de concentraciones de NaCl de 50-200 mM. Por lo tanto estos reactivos no se podrían usar para inmunodiagnóstico.

Esta bajada de la estabilidad coloidal de un látex tras adsorber un anticuerpo sobre su superficie está ampliamente generalizada y es uno de los principales inconvenientes a los que se enfrenta un investigador a la hora de obtener un reactivo de inmunoaglutinación de látex. Para solventar este grave problema se han planteado diferentes estrategias que pasaremos a examinar a continuación.

1. Los surfactantes son los agentes estabilizadores de sistemas coloidales más importantes (*Romero et al., 1998a; 1998b; 1998c*). El empleo de surfactantes para estabilizar complejos látex-proteína conlleva su adsorción, a través de interacciones hidrofóbicas, sobre las zonas de la superficie de la partícula en las que no hay proteína anclada. Estas moléculas de surfactante adsorbidas aportan estabilidad estérica a la partícula además de estabilidad electrostática en el caso de ser surfactantes iónicos. El resultado es una mejora en la estabilidad de las suspensiones de los reactivos de micropartículas (*Newman et al., 1992; van Oss et al., 1966; Poncelet et al., 1990*). Los

surfactantes catiónicos han de ser evitados ya que provocan la coagulación de las partículas negativamente cargadas.

No obstante, el empleo de surfactantes para estabilizar reactivos de látex presenta serios inconvenientes: i) como se ha comprobado previamente pueden desorber las proteínas previamente adsorbidas físicamente, ya que éstas están unidas básicamente por interacción hidrofóbica. ii) Los surfactantes pueden desnaturalizar las proteínas, hecho que sucede con surfactantes de bajo peso molecular como el SDS.

2. Se pueden adsorber agentes bloqueantes como la albúmina, gelatina, glicerol, etc., sobre los espacios vacíos que persistan entre las moléculas de anticuerpo adsorbidas sobre las partículas (*Bernard et al., 1983; Okubo et al., 1987; Peula et al., 1995; 1997a; 1998b; Ortega et al., 1995*). Estos agentes contribuyen a la estabilización del complejo al aportar carga eléctrica y/o aumentar el carácter hidrofílico de la superficie. De entre todos ellos la albúmina es el agente bloqueante más ampliamente utilizado debido a la alta densidad de carga que presenta lejos de su punto isoelectrico y por su obtención poco costosa a partir de sueros de animales. En nuestro trabajo hemos empleado un tampón de reacción que contiene 1 mg/ml de BSA (albúmina de suero bovino) para estabilizar los complejos.

El inconveniente de esta estrategia de estabilización es que sólo se pueden estabilizar complejos con bajo y medio recubrimiento (ya que son éstos los que presentan zonas libre en su superficie) cuando en la práctica suele interesar trabajar con complejos con alto recubrimiento ya que son los que mejor reaccionan proporcionando bajos límites de detección.

También se pueden adsorber lípidos que no tienen tendencia a desorber las proteínas (*Ortega, 1995a; 1995d*), de hecho las membranas biológicas son macroestructuras de lípidos y proteínas.

3. Algunos autores emplean látex hidrofílicos de poliacrilamida o poliacrílico (en vez de los hidrofóbicos de poliestireno) para obtener inmunocomplejos látex-proteína estables en condiciones fisiológicas (*Kitano et al., 1987; Montagne et al., 1991; 1992a; Marchand et al., 1992*). No obstante, la unión de las proteínas a las superficies poliméricas ha de hacerse a través de enlaces químicos, pues la adsorción espontánea de proteínas sobre partículas hidrofílicas no está favorecida energéticamente.

4. El empleo de anticuerpos monoclonales ya que éstos tienen puntos isoeléctricos más ácidos que los policlonales y por lo tanto presentan una mayor carga eléctrica a pH 7 que suele ser el pH del medio donde se realizan los test (*Galisteo, 1992; Davey et al., 1993*). Su utilización presenta además otras ventajas como que todas las moléculas del anticuerpo son activas, existe una elevada reproducibilidad lote a lote, tienen una mayor avidéz y especificidad. La desventaja de esta estrategia estabilizadora radica en el elevado precio de los anticuerpos monoclonales.

5. En el caso concreto del anticuerpo IgG se ha propuesto el empleo de su fragmento  $F(ab')_2$  en lugar de toda la molécula proteica (*Muratsugu et al., 1991; Buijs et al., 1997; Ortega et al., 1993; 1994; 1995e; 1995f*). Como se comprobó en el capítulo III, los complejos con  $F(ab')_2$  son más estables coloidalmente que los complejos con IgG debido a que el punto isoeléctrico de la  $F(ab')_2$  es más ácido.

Todas estas estrategias para estabilizar complejos látex-proteína presentan una serie de ventajas y de inconvenientes, pero todas ellas tienen en común como desventaja el encarecimiento del reactivo de látex al tener que usar aditivos adicionales, anticuerpos monoclonales, fragmentar la IgG para obtener la  $F(ab')_2$ , etc. En el presente apartado vamos a proponer una nueva estrategia de estabilización, muy barata y eficaz, basada en las fuerzas de hidratación. Esta investigación nos ha permitido obtener una patente.

En todas las estrategias planteadas siempre se intenta que el complejo látex-anticuerpo sea estable coloidalmente, por lo menor durante el tiempo que dura el ensayo clínico, en condiciones fisiológicas, caracterizadas por una fuerza iónica de 150-170 mM NaCl y pH 7-8. Si el complejo en estas condiciones no es estable coloidalmente su aplicación como reactivo de inmunoaglutinación es nula (*Nakamura et al., 1992*).

La idea que nosotros planteamos para estabilizar estos complejos se fundamenta en el empleo de un tampón de reacción a alta fuerza iónica, ya que como se ha observado, los complejos látex-proteína presentan una zona de estabilidad coloidal anómala o no-DLVO a altas concentraciones de electrolito atribuida a las fuerzas de hidratación. En esta zona los complejos son más estables coloidalmente conforme aumenta la concentración de sal.

Para realizar los experimentos se prepararon una serie de complejos de IgG y de  $F(ab')_2$  con diferentes recubrimientos (bajo, medio y alto) utilizando como soporte polimérico el látex JM1, cuyo diámetro de partícula es  $196 \pm 10$  nm. La estabilidad coloidal de estos complejos fue estudiada mediante la medida del tamaño medio de agregado por PCS pasadas 24 horas de la mezcla de volúmenes iguales de electrolito y de complejo. Como electrolitos se utilizaron el NaCl y el  $Mg(NO_3)_2$ . El pH de las disoluciones empleadas era de 8, conteniendo además 1 mg/ml de BSA y 1 mg/ml de  $NaN_3$ . La concentración de partículas coloidales en la cubeta de medida del sistema 4700 era del orden de  $10^9$  part/ml. En la tabla V.3 aparecen los resultados obtenidos para los complejos de JM1-IgG en presencia de NaCl, mientras que los datos de la tabla V.4 corresponden al estado de agregación de los mismos complejos en presencia de 170 mM NaCl y diferentes concentraciones de  $Mg(NO_3)_2$ .

**Tabla V.3.** *Tamaño medio de agregado de varios complejos JM1-IgG a pH 8 en distintas disoluciones de NaCl tras 24 horas de reacción.*

NaCl (M)	2.07 mg/m <sup>2</sup>	3.33 mg/m <sup>2</sup>	4.01 mg/m <sup>2</sup>
0	201	201	200
0.052	sedimentos	sedimentos	sedimentos
0.152	sedimentos	sedimentos	sedimentos
0.260	sedimentos	sedimentos	sedimentos
0.350	sedimentos	sedimentos	sedimentos
0.565	sedimentos	sedimentos	sedimentos
0.848	sedimentos	sedimentos	sedimentos
1	sedimentos	sedimentos	sedimentos
1.3	sedimentos	sedimentos	sedimentos

**Tabla V.4.** *Tamaño medio de agregado de varios complejos JM1-IgG a pH 8 en distintas disoluciones de  $Mg(NO_3)_2$  con 170 mM de NaCl tras 24 horas de reacción.*

$Mg(NO_3)_2$ (M) + 0.17 M NaCl	2.07 mg/m <sup>2</sup>	3.33 mg/m <sup>2</sup>	4.01 mg/m <sup>2</sup>
0.205	sedimentos	sedimentos	sedimentos
0.3	sedimentos	sedimentos	sedimentos
0.410	298	730	809
0.6	255	295	270



En el caso de las disoluciones que sólo presentan NaCl (tabla V.3) todos los complejos JM1-IgG son inestables coloidalmente, apareciendo sedimentos en los tubos de ensayos tras 24 horas de reacción. En el caso de disoluciones que contienen  $Mg(NO_3)_2$ , cuando su concentración es inferior a 300 mM los complejos también son estables. Sin embargo, para concentraciones superiores los complejos adquieren una importante estabilidad que aumenta al aumentar la cantidad de  $Mg(NO_3)_2$  presente en el medio. Estos resultados pueden ser explicados si suponemos la existencia de fuerzas de hidratación como mecanismo estabilizador.

Los resultados obtenidos para los complejos de JM1-F(ab')<sub>2</sub> aparecen en la tabla V.5 para el caso de disoluciones que sólo contienen NaCl, y en la tabla V.6 cuando se añadió  $Mg(NO_3)_2$  a las disoluciones.

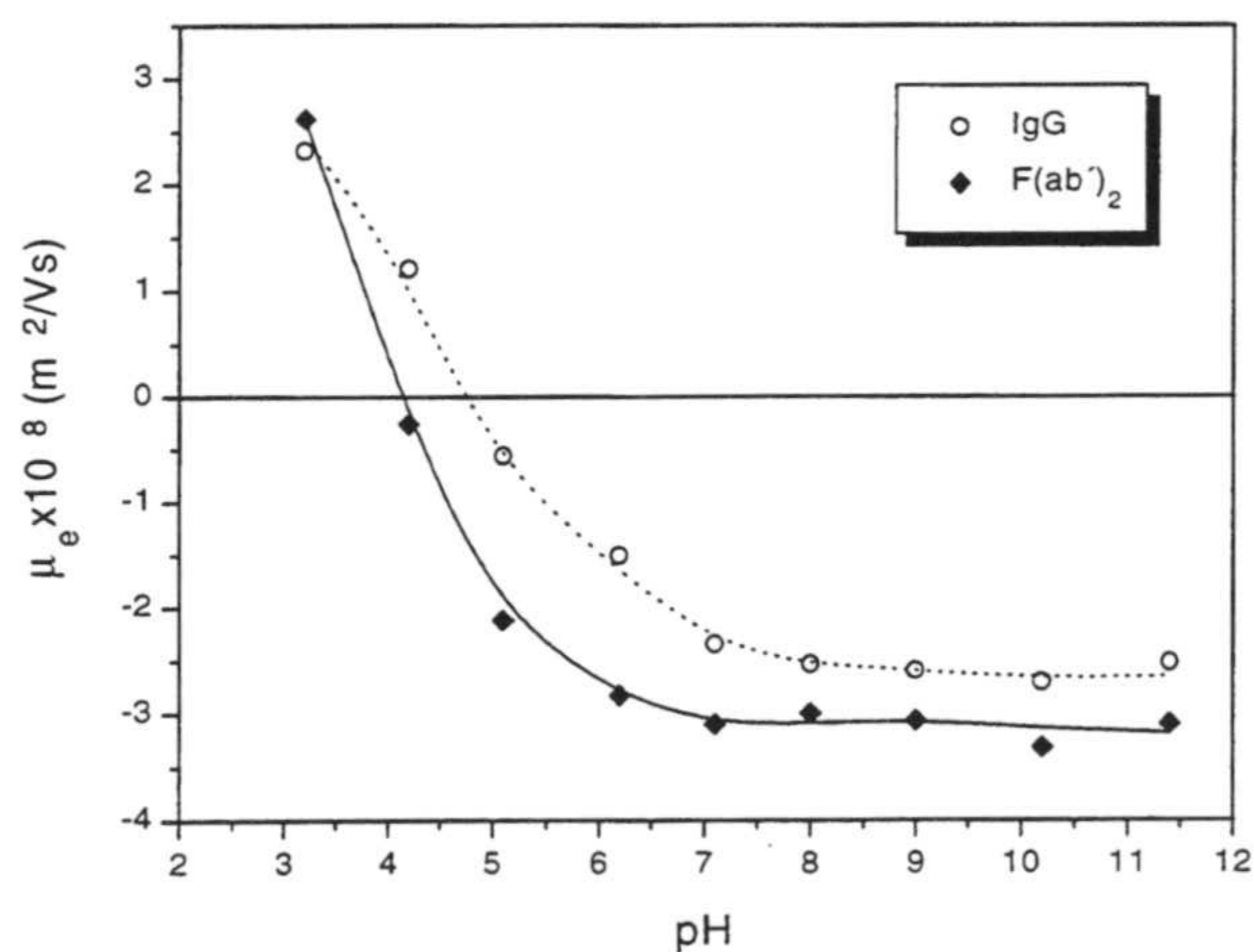
**Tabla V.5.** *Tamaño medio de agregado de varios complejos JM1-F(ab')<sub>2</sub> a pH 8 en distintas disoluciones de NaCl tras 24 horas de reacción.*

NaCl (M)	1.78 mg/m <sup>2</sup>	2.63 mg/m <sup>2</sup>	3.3 mg/m <sup>2</sup>
0	205 ± 2	201 ± 4	202 ± 3
0.52	286 ± 4	sedimentos	sedimentos
0.152	sedimentos	sedimentos	sedimentos
0.260	sedimentos	sedimentos	sedimentos
0.350	sedimentos	sedimentos	sedimentos
0.456	274 ± 4	417 ± 9	408 ± 5
0.565	299 ± 3	389 ± 9	423 ± 9
0.652	290 ± 1	353 ± 7	358 ± 6
0.848	294 ± 4	352 ± 2	339 ± 5

**Tabla V.6.** Tamaño medio de agregado de varios complejos JM1-F(ab')<sub>2</sub> a pH 8 en distintas disoluciones de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> con 170 mM de NaCl tras 24 horas de reacción.

Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (M) + 0.17 M NaCl	1.78 mg/m <sup>2</sup>	2.63 mg/m <sup>2</sup>	3.3 mg/m <sup>2</sup>
0.205	253 ± 4	247 ± 3	245 ± 4
0.300	253 ± 5	243 ± 2	239 ± 2
0.410	267 ± 7	253 ± 3	248 ± 5
0.600	338 ± 5	278 ± 6	265 ± 4

Comparando los resultados de estabilidad coloidal entre los complejos de IgG y de F(ab')<sub>2</sub> queda demostrada la mayor estabilidad de estos últimos. Al ser el punto isoeléctrico de la F(ab')<sub>2</sub> más ácido que el de la IgG a pH 8 los complejos de F(ab')<sub>2</sub> deben de tener una mayor carga neta negativa que los complejos de IgG (a igualdad de moléculas de proteína por partícula) por lo que estarán más estabilizados electrostáticamente. La siguiente figura, en la que se ha representado la movilidad electroforética de un complejo JM1-IgG con 3.25 mg/m<sup>2</sup> y la de un complejo JM1-F(ab')<sub>2</sub> con 2.12 mg/m<sup>2</sup> en función del pH, demuestra que éste último complejo tiene más carga neta a prácticamente todos los pHs estudiados. Indicar que ambos complejos tienen la misma cantidad de moléculas de anticuerpo por partícula de látex.



**Figura V.22.** Movilidad electroforética en función del pH para un complejo JM1-IgG con 3.25 mg/m<sup>2</sup> y otro de JM1-F(ab')<sub>2</sub> con 2.12 mg/m<sup>2</sup>



Volviendo a la tabla V.6 se puede observar que los complejos de JM1-F(ab')<sub>2</sub> son poco inestables coloidalmente en las disoluciones que contienen Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. En el caso de disoluciones que sólo contienen NaCl (tabla V.5), tras un intervalo de concentraciones en las que aparecen sedimentos y que corresponden a la región de agregación rápida, los complejos se estabilizan conforme más sal hay en el medio llegando a ser ligeramente inestables para 800 mM NaCl.

Sobre la base de estos resultados de estabilidad coloidal se prepararon una serie de tampones de reacción para medir la inmunoreactividad de un complejo JM1-IgG con 3.25 mg/m<sup>2</sup> y otro de JM1-F(ab')<sub>2</sub> con 2.12 mg/m<sup>2</sup> (ambos obtenidos por adsorción a pH 7.2). Estos dos complejos tienen la misma cantidad de moléculas de anticuerpo por partícula, por lo que en principio, la inmunoreactividad de ambos complejos debe de ser la misma.

La inmunoreactividad se ha medido usando el nefelómetro, obteniendo el incremento en la intensidad dispersada a un ángulo de 20° tras 5 minutos de reacción. En un experimento de inmunoreactividad se mezclaba 950 µl de tampón de reacción con 50 µl de diferentes disoluciones de PCR. Por otra parte se mezclaba 960 µl de tampón de reacción con 40 µl del complejo látex-anticuerpo. Ambas disoluciones se introducían rápidamente en la célula de medida a través del sistema de inyección del nefelómetro. La concentración final de partículas era de 1.8x10<sup>10</sup> part/ml para ambos complejos (IgG y F(ab')<sub>2</sub>).

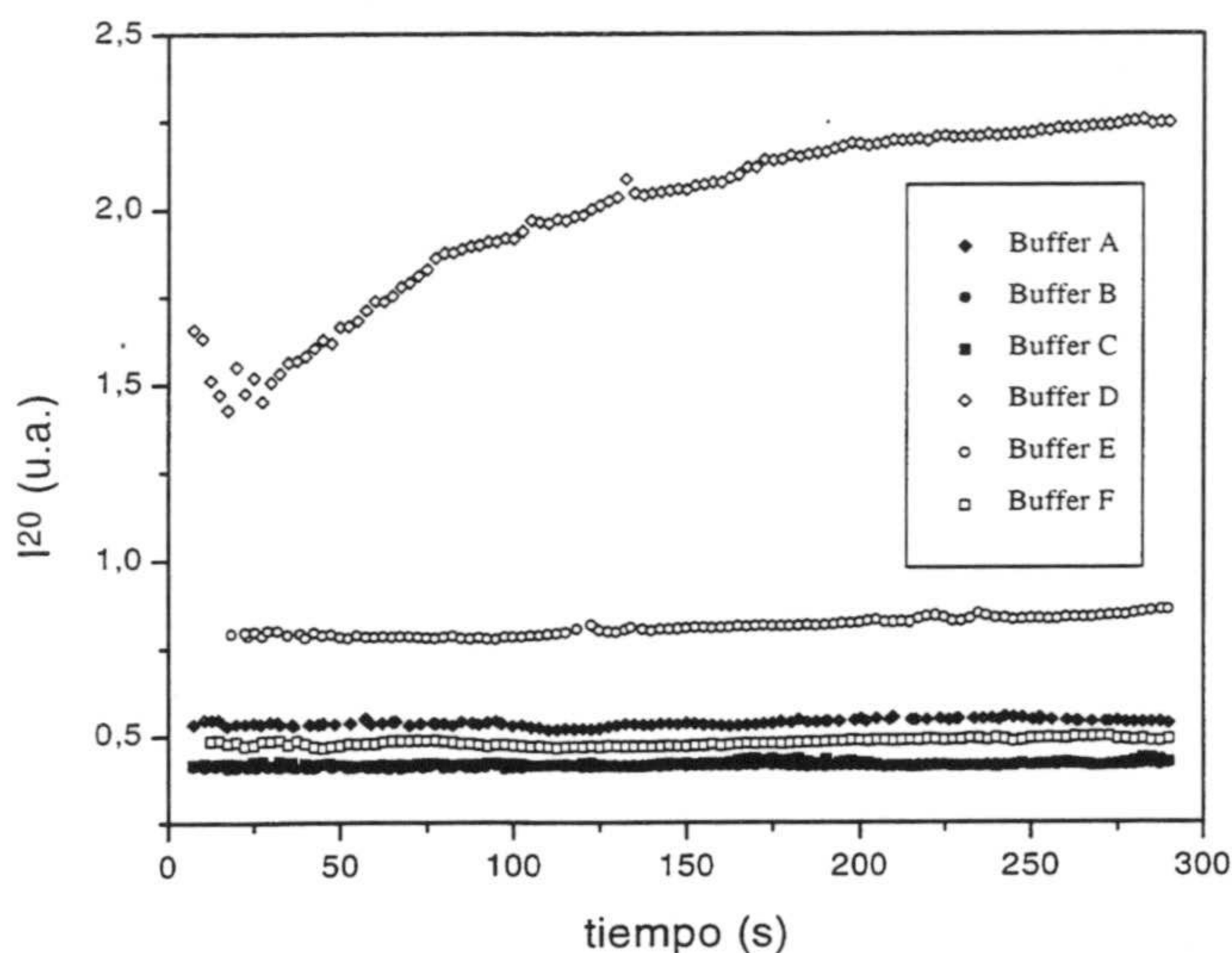
En la tabla V.7 aparecen las características de los tampones de reacción utilizados.

Evidentemente antes de medir la inmunoreactividad de los complejos en estos tampones hay que comprobar que son coloidalmente estables en estos medios. Aquel tampón de reacción en el que la intensidad dispersada por el complejo, en ausencia de antígeno, sea constante durante el tiempo que se ha predeterminado como tiempo del ensayo, será útil.

En la figura V.22 se muestra la intensidad dispersada a 20° durante 5 minutos por el complejo JM1-F(ab')<sub>2</sub> en los seis tampones de reacción propuestos en la tabla V.7 en ausencia de PCR.

**Tabla V.7.** Composición de los diferentes tampones de reacción usados en la inmunoreactividad. Todos ellos contienen además 1 mg/ml BSA y 1 mg/ml de  $\text{NaN}_3$ .

Tampón de reacción	pH	Concentración de electrolito
A	8	170 mM NaCl
B	8	800 mM NaCl
C	8	170 mM NaCl + 300 mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$
D	5.5	170 mM NaCl
E	5.5	800 mM NaCl
F	5.5	170 mM NaCl + 300 mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$



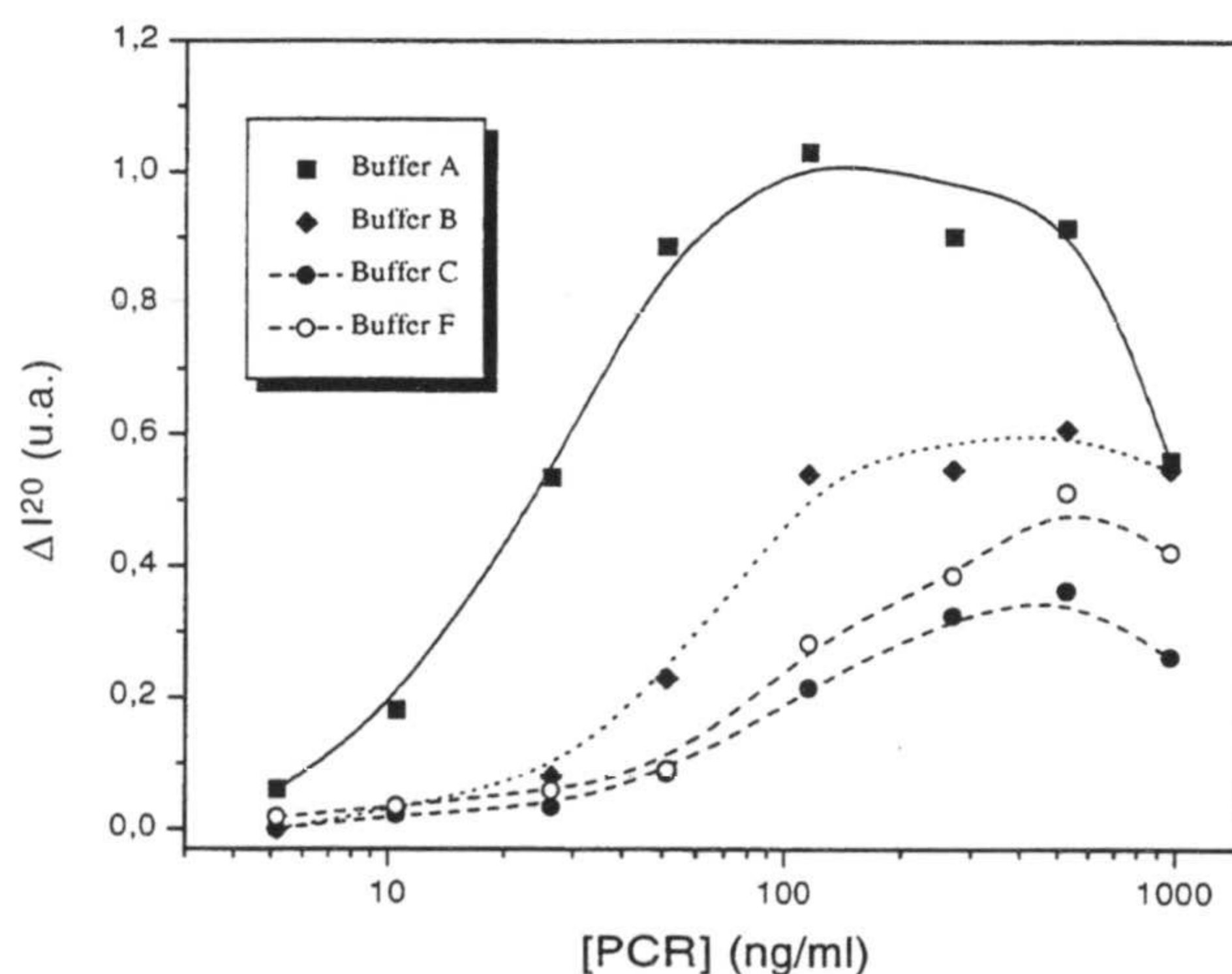
**Figura V.23.** Intensidad dispersada en función del tiempo para el complejo  $\text{JM1-F}(\text{ab}')_2$  con  $2.12 \text{ mg/m}^2$  en los tampones de reacción que aparecen en la tabla V.7.

De acuerdo con el criterio previamente expuesto, sólo los tampones de reacción A, B, C y F pueden ser empleados como tales para preparar reactivos de inmunoaglutinación. El complejo es coloidalmente inestable en el tampón D y E. Este

último tampón muestra un ligero incremento en la intensidad dispersada, 0.1 u.a., que es suficiente como para excluirlo. Puede parecer contradictorio que la tabla V.5 muestre que el complejo JM1-F(ab')<sub>2</sub> sea inestable coloidalmente en el tampón de reacción A mientras que la figura V.23 muestre lo contrario. Pero hay que tener en cuenta que los datos de la tabla V.5 corresponden a un periodo de reacción de 24 horas mientras que los datos de la figura V.23 corresponden a 5 minutos. La inestabilidad del complejo en el tampón A es lo suficientemente baja como para no detectar incremento en la luz dispersada a 20° durante 5 minutos, por lo que se puede emplear como tampón de reacción siempre y cuando el tiempo del ensayo clínico no supere este tiempo.

La explicación de que el complejo de F(ab')<sub>2</sub> es estable en los tampones B y C mientras que es inestable en los tampones D y E, cuando tienen igual concentración de sal respectivamente, radica en que el pH de estos dos últimos es 5.5. A este pH, próximo al punto isoeléctrico de la F(ab')<sub>2</sub>, la carga neta del complejo es prácticamente nula por lo que la estabilización tanto electrostática como por fuerza de hidratación es pequeña.

Elegidos los tampones útiles para el complejo JM1-F(ab')<sub>2</sub> de 2.12 mg/m<sup>2</sup> se pasó a medir su inmunoreactividad (figura V.24).

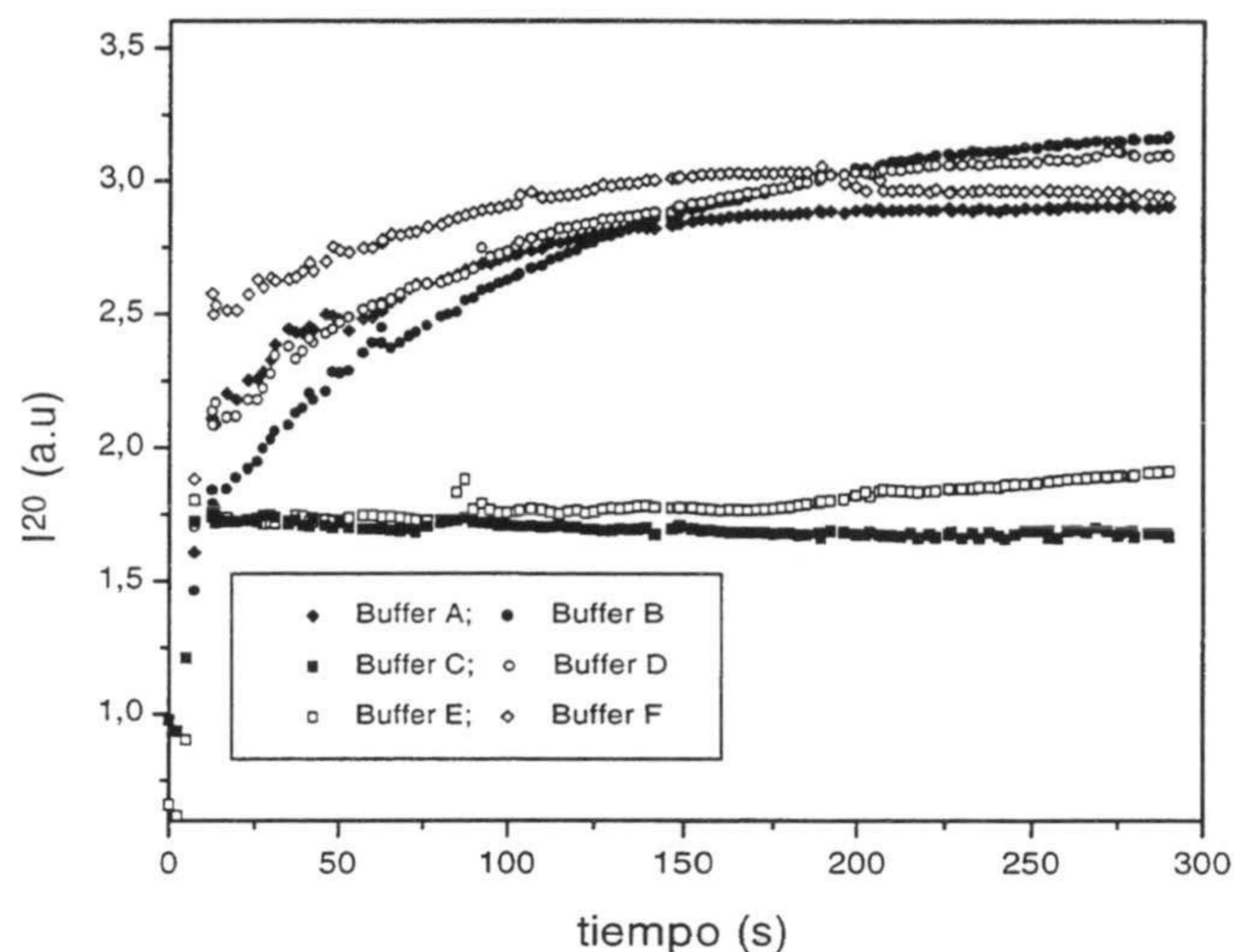


**Figura V.24.** Inmunoreactividad del complejo JM1-F(ab')<sub>2</sub> con 2.12 mg/m<sup>2</sup> en diferentes tampones de reacción.

En todos los tampones estudiados el complejo es reactivo, ahora bien la reactividad depende del medio en el que se produce la reacción. Es en el tampón A donde el complejo presenta mayor reactividad. Hay que destacar que para un mismo pH la inmunoreactividad aumenta conforme disminuye la fuerza iónica del medio (tampones A, B y C) mientras que para una misma fuerza iónica la inmunoreactividad aumenta al disminuir el pH. Todo esto nos está indicando que la inmunoreactividad depende de la interacción total existente entre las partículas de complejo que se aproximan para aglutinar. Cuanto mayor sea esta interacción, bien sea electrostática o por fuerzas de hidratación, menor es la inmunoreactividad. Este resultado es lógico si se tiene en cuenta que para que existan reacciones cruzadas antígeno-anticuerpo entre partículas éstas se han de aproximar. La eficacia de las colisiones entre partículas, que depende del potencial total de interacción, influirá en la eficacia de la inmunoaglutinación y por lo tanto en la inmunoreactividad. Más adelante analizaremos más detalladamente este interesante resultado.

A partir de estos resultados se podría pensar que no interesa utilizar tampones de reacción a alta fuerza iónica ya que la inmunoreactividad disminuye. Pero por otra parte, no tiene sentido buscar nuevas estrategias de estabilización coloidal de complejos cuando estos son estables en condiciones fisiológicas. El empleo de tampones de reacción a alta fuerza iónica se requiere cuando el complejo látex-anticuerpo no es estable en condiciones fisiológicas, y por lo tanto su aplicabilidad como reactivo es nula.

Veamos a continuación los resultados sobre estabilidad coloidal del complejo JM1-IgG con 3.25 mg/m<sup>2</sup> en los diferentes tampones de reacción (figura V.25).

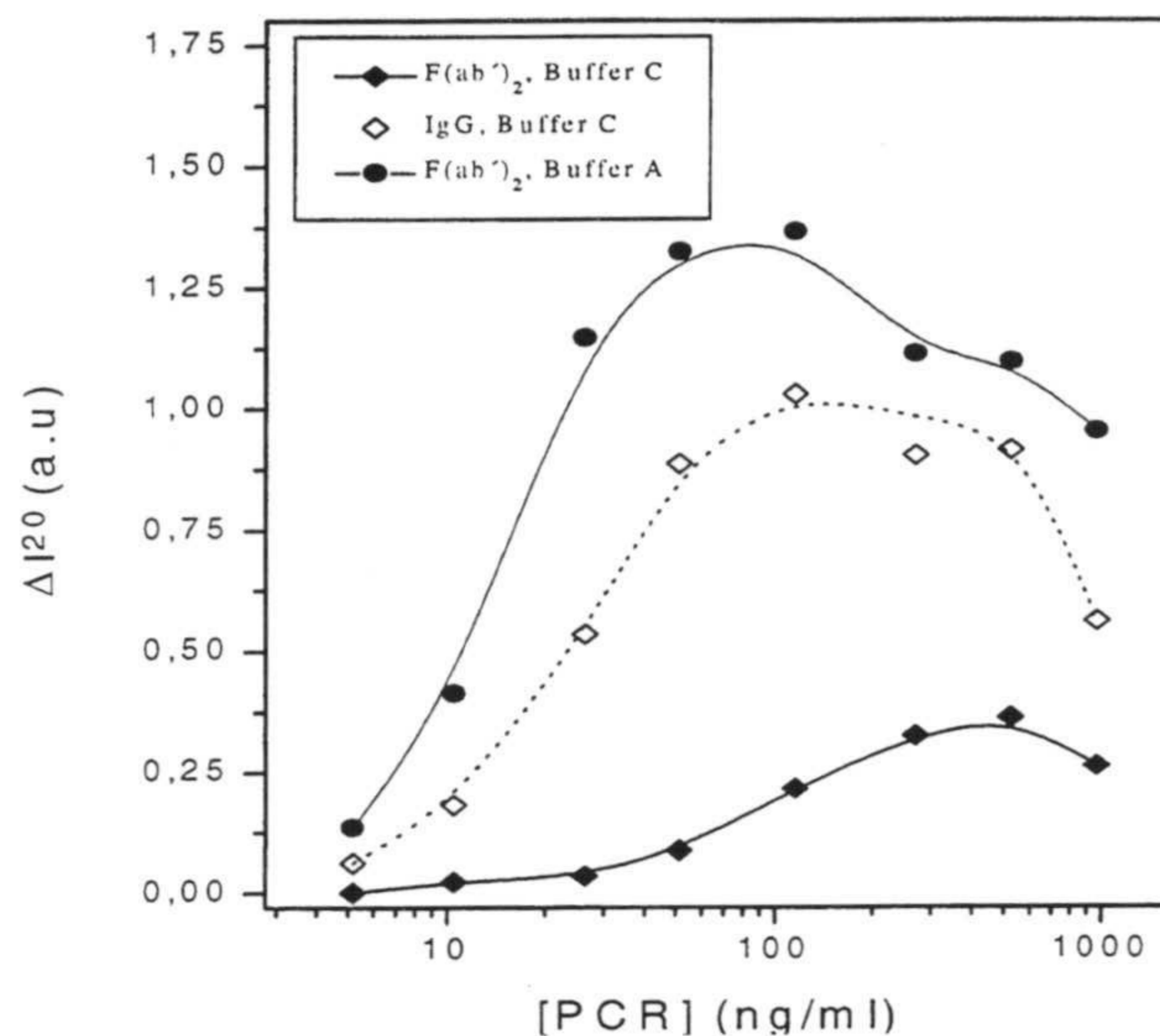


**Figura V.25.** Intensidad dispersada en función del tiempo para el complejo JM1-IgG con  $3.25 \text{ mg/m}^2$  en los tampones de reacción que aparecen en la tabla V.7.

El reactivo JM1-IgG sólo es estable en el tampón C. Aquí se puede comprobar claramente la utilidad del uso de un tampón a alta fuerza iónica como estrategia estabilizadora. Mediante el empleo del tampón de reacción C se ha podido recuperar un complejo látex-anticuerpo que de otra forma nos hubiera sido inútil por ser coloidalmente inestable.

Por otra parte, el empleo del tampón de alta fuerza iónica C no sólo ha permitido estabilizar el complejo sino que también, y lo que es más importante, éste es reactivo en dicho medio. Este hecho nos ha permitido comparar la inmunoreactividad de la IgG y de su fragmento  $F(ab')_2$  adsorbidos sobre látex en igualdad de condiciones experimentales, como se puede ver en la siguiente figura donde aparece la reactividad del complejo JM1-IgG en el tampón C junto con la del complejo JM1- $F(ab')_2$  en los tampones A y C.

Es muy importante indicar que la inmunoreactividad del complejo de IgG es bastante mayor a la del complejo de  $F(ab')_2$ , ambos con igual cantidad de moléculas de anticuerpo adsorbidas por partícula, incluso en las mejores condiciones de reacción para el complejo JM1- $F(ab')_2$ .



**Figura V.26.** Comparación entre la inmunoreactividad del complejo JM1-F(ab')<sub>2</sub> con 2.12 mg/m<sup>2</sup> y el complejo JM1-IgG con 3.25 mg/m<sup>2</sup> en diferentes tampones de reacción.

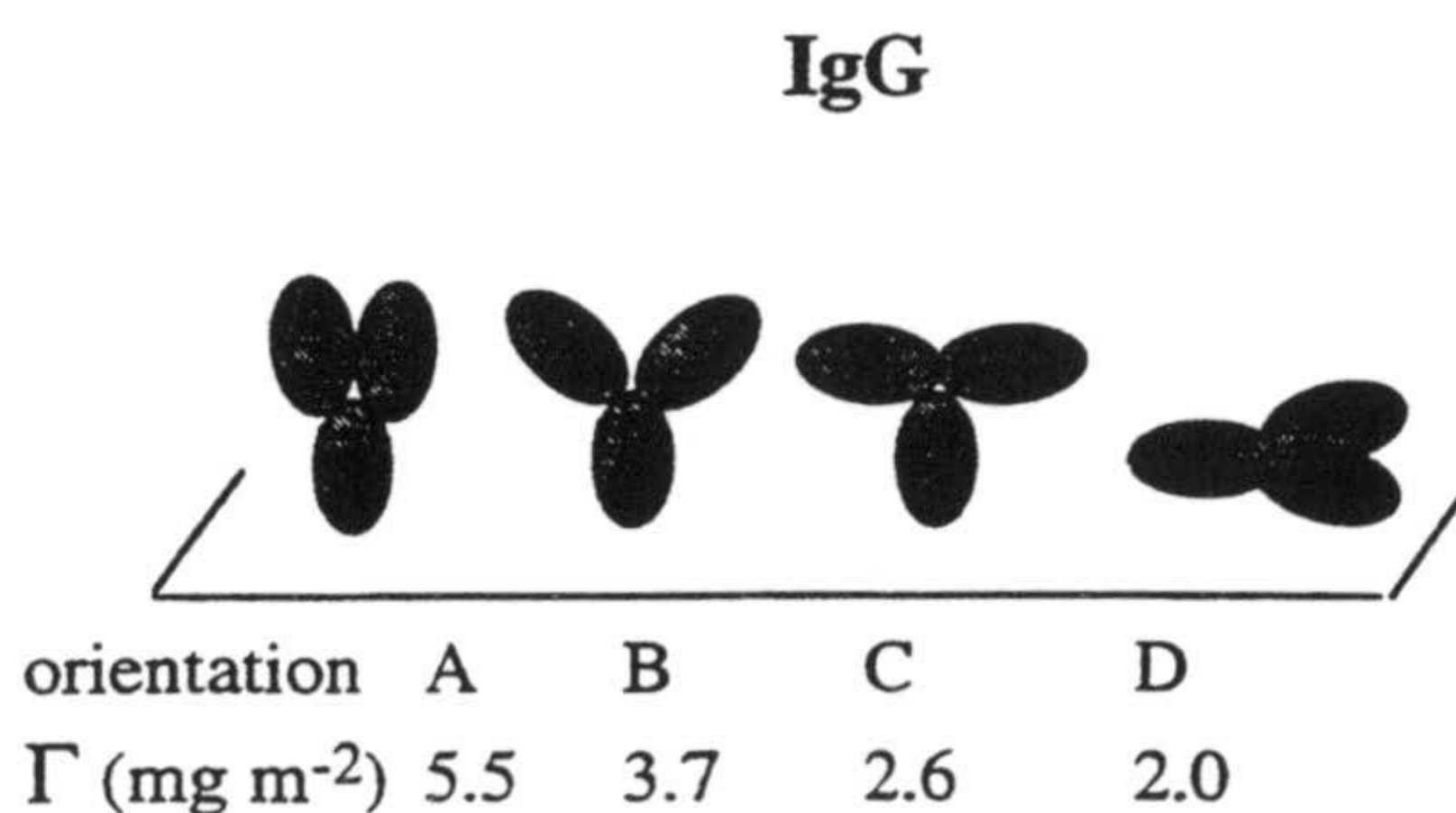
Una molécula de anticuerpo que se adsorbe sobre un soporte polimérico sufre una serie de cambios conformacionales con el fin de optimizar su interacción con la superficie. Dependiendo del grado de estos cambios estructurales, la proteína puede llegar a desnaturalizarse llegando a no ser capaz de reconocer a su antígeno correspondiente. Por otra parte, la conformación que adopte el anticuerpo una vez adsorbido ha de ser la adecuada para que las zonas capaces de reaccionar con el antígeno (epítomos) estén accesibles a las moléculas de antígeno presentes en la disolución. Ambos factores van a determinar la funcionalidad de un reactivo de inmunoaglutinación de látex ya que esta depende de la capacidad que tiene el anticuerpo inmovilizado para unirse al antígeno.

Como tanto el complejo de IgG como el de F(ab')<sub>2</sub> empleados en este estudio tienen el mismo número de moléculas de anticuerpo unidas por partícula, la diferencia en sus reactividades hay que interpretarla en términos de orientación y/o desnaturalización de las proteínas. De acuerdo con Buijs y col. (Buijs *et al.*, 1996) la proteína IgG sufre más cambios conformacionales que el fragmento F(ab')<sub>2</sub> cuando se adsorbe, debido a su menor estabilidad estructural. Estos mismos autores (Buijs

*et al.*, 1995; 1996; 1997) han sugerido que la IgG tiende a adsorberse interaccionando su parte Fc con la superficie adsorbente y con los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> expuestos hacia la disolución. Esta orientación es la más favorable energéticamente para que se produzca la adsorción ya que el fragmento Fc es más hidrofóbico que el Fab'.

La isoterma de adsorción a pH 7.2 para la proteína IgG sobre el látex JM1 alcanza un valor en la región de plateau de 4.2 mg/m<sup>2</sup> (tal y como se mostrará en el próximo apartado). Si se tiene en cuenta que las dimensiones cristalográficas de la IgG son 15.2x6.3x3.8 nm<sup>3</sup> y suponiendo que la cantidad máxima adsorbida en el plateau de una isoterma de adsorción puede ser interpretada en términos de orientación de la proteína, se puede calcular el valor de una monocapa para diferentes configuraciones (ver figura V.27). Evidentemente estos valores son aproximados ya que, entre otras cosas, las dimensiones de las proteínas adsorbidas no tienen que coincidir con sus dimensiones cristalográficas.

Teniendo en cuenta estos datos, la cantidad de 4.2 mg/m<sup>2</sup> puede corresponder a una monocapa de IgG adsorbida por su fragmento Fc al látex y con los brazos Fab' extendidos hacia la disolución, en acuerdo con los resultados de Buijs y colaboradores.

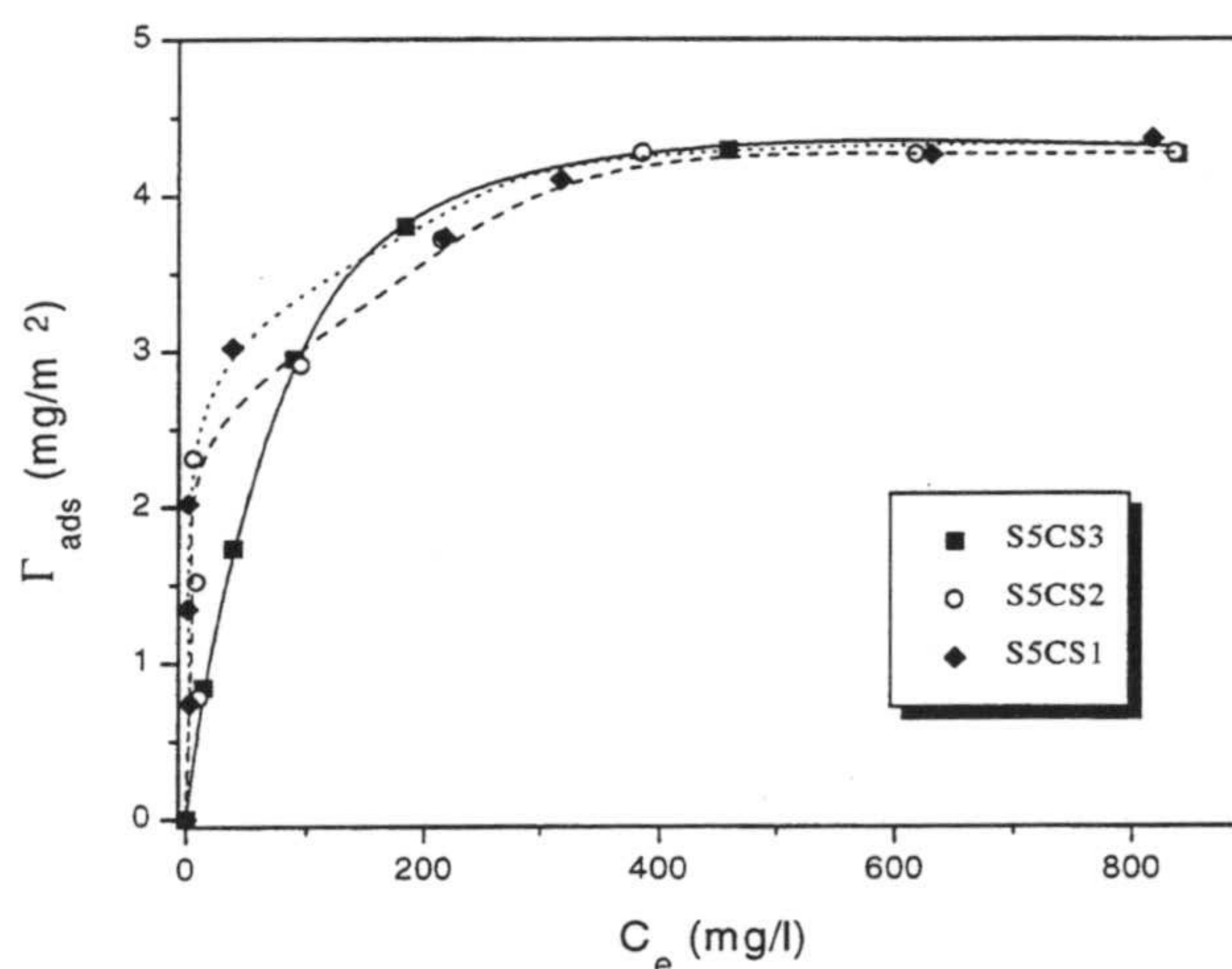


**Figura V.27.** Conformaciones posibles de la proteína IgG.

Así pues, parece más adecuado explicar la mayor reactividad del complejo de IgG a través de una más adecuada orientación de este anticuerpo para interactuar con el antígeno.

También hay que considerar que al ser mayor el tamaño de la molécula de IgG, la distancia mínima de aproximación entre partículas necesaria para que ocurra la reacción antígeno-anticuerpo es menor que en el caso del fragmento  $F(ab')_2$ , por lo que la barrera que representan las repulsiones electrostáticas o las fuerzas de hidratación es menor influyente.

Quizás la primera estrategia en la que se podría pensar para estabilizar complejos látex-proteína para la producción de reactivos sería la utilización de partículas poliméricas con elevada carga superficial, si bien este mecanismo sólo sería interesante para complejos con recubrimiento bajo o medio. En estos complejos, las zonas libres de anticuerpo aportarían carga eléctrica al coloide estabilizándolo electrostáticamente. Bajo este marco de referencia se ha considerado interesante preparar y estudiar la inmunoreactividad de complejos preparados con IgG sobre látex con densidad de carga creciente. Concretamente se han utilizado los látex S5CS1, S5CS2 y S5CS3 cuya densidad de carga es  $-31\pm 3$ ,  $-70\pm 6$ ,  $-150\pm 11$ , respectivamente (las demás características de estos sistemas aparecen en la tabla I.1 en la página 26). En primer lugar se han obtenido las isotermas de adsorción de la IgG sobre los látex a pH 7.2 (figura V.28).



**Figura V.28.** Isotermas de adsorción de IgG sobre los látex S5CS1, S5CS2 y S5CS3 a pH 7.2.



Como se ha indicado en varias ocasiones anteriores la pendiente de la zona inicial de una isoterma de adsorción es un reflejo de la afinidad de la proteína por la superficie adsorbente. Según esto, la afinidad de la IgG por el látex S5CS3 es baja, siendo parecida y alta para los látex S5CS2 y S5CS1. Este resultado era de esperar ya que la adsorción de proteínas se produce principalmente a través de interacciones hidrofóbicas por lo que la superficie más hidrofílica (S5CS3) será menos atractiva para las moléculas de IgG. A pesar de estas diferencias en la zona inicial de las isotermas, para los tres látex se alcanza la misma región plateau con una cantidad máxima adsorbida de 4.2 mg/m<sup>2</sup>. Esta cantidad de proteína adsorbida puede corresponder a una monocapa de moléculas de IgG adsorbidas de forma que su fragmento Fc interacciona directamente con la superficie del látex.

En el capítulo I se realizó un estudio con estos tres látex en el que se obtuvo como resultado que su superficie no era lisa sino que presenta cadenas oligoméricas, pudiéndose considerar a estos látex como partículas “hairy layer” ó partículas “peluda”. Es lógico pensar que al no ser la superficie adsorbente lisa las interacciones entre la proteína y la partícula no han de ser demasiado fuertes. Para comprobar esta hipótesis se redispersaron algunos de los complejos de IgG en un tampón a pH 8 y tras 24 horas de conservación se cuantificó la posible desorción de proteína. Los resultados obtenidos aparecen en la siguiente tabla.

**Tabla V.8.** Desorción de IgG tras 24 horas de incubación en un tampón a pH 8.

Sistema	mg/m <sup>2</sup> iniciales	mg/m <sup>2</sup> adsorbidos después de la resuspensión	% desorbido
S5CS1	1.96	1.94	1
	3.84	3.32	9
	4.08	3.15	21
S5CS2	1.89	1.89	0
	3.72	3.22	13
	4.09	2.83	31
S5CS3	2.16	1	54
	3.75	1.63	56
	4.1	1.32	68

La cantidad de proteína desorbida aumenta conforme lo hace el recubrimiento inicial y la densidad de carga del látex empleado. Estos resultados vienen a indicar que existen zonas en la superficie de las partículas con diferente energía de adsorción de forma que inicialmente las moléculas de proteína ocupan las zonas más favorables. Las moléculas que se adsorben con posterioridad lo hacen sobre las zonas menos favorables energéticamente de forma que su desorción por dilución es posible. Por otra parte cuando mayor es la densidad de carga del látex más peluda es su superficie siendo débiles las uniones adsorbente-proteína.

El hecho de que la cantidad que queda adsorbida después de resuspender para complejos de recubrimiento intermedio sea superior al caso de alto recubrimiento puede ser interpretado como que el mecanismo de adsorción no sólo depende de las características de la superficie adsorbente sino también de la concentración de proteína en la disolución.

Los látex S5CS1, S5CS2 y S5CS3 han sido sintetizados con clorometilestireno como comonomero por lo que, en principio, pueden unir covalentemente proteínas a su superficie. Para comprobar si ha existido adsorción covalente los complejos de IgG fueron tratados con el método anteriormente descrito basado en la desorción por SDS. Los resultados aparecen en la siguiente tabla.

**Tabla V.9.** Cantidad de IgG unida covalentemente sobre varios complejos.

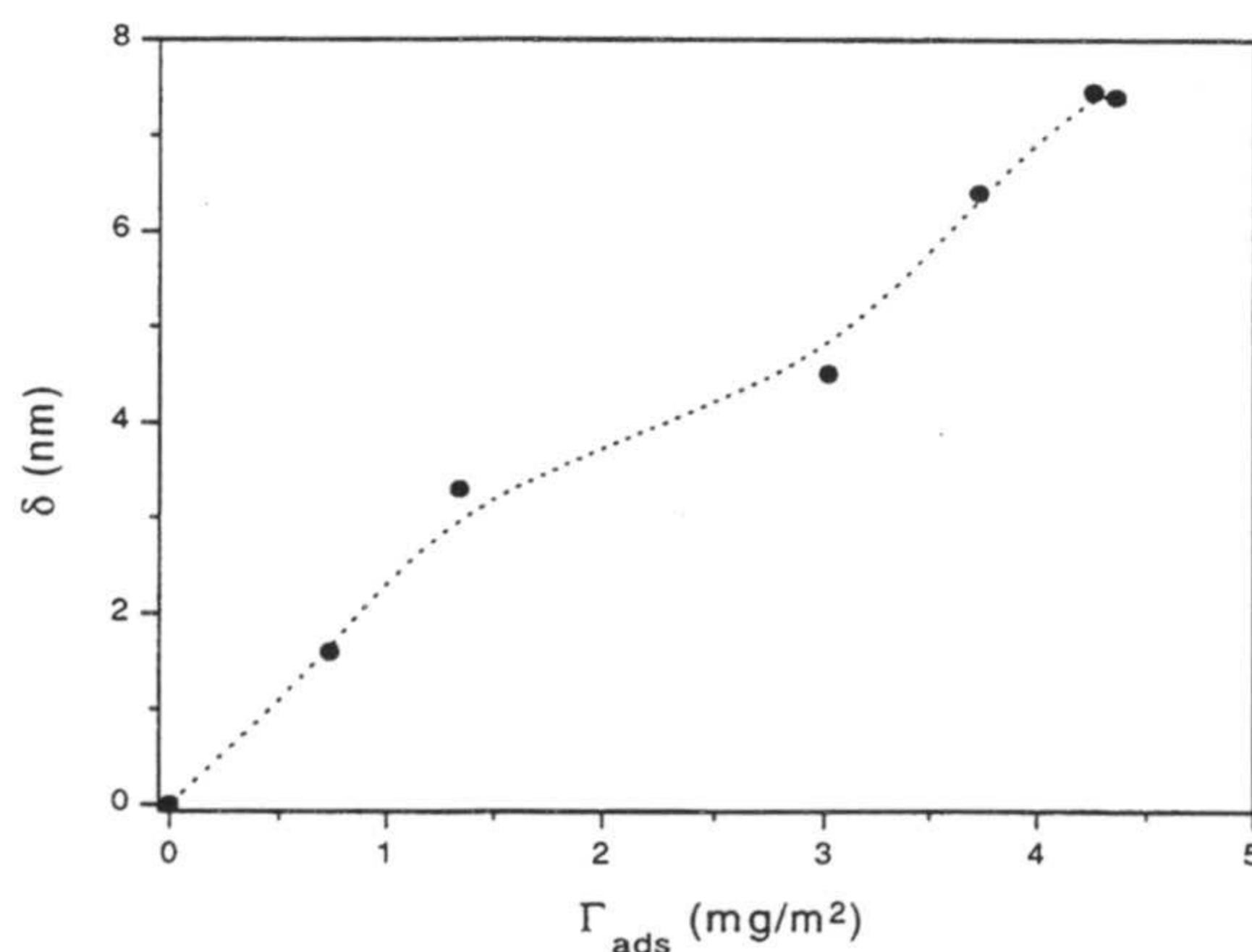
Sistema	mg/m <sup>2</sup> iniciales	mg/m <sup>2</sup> covalentemente adsorbidos	% covalencia
S5CS1	1.94	0.87	45
	3.15	1.29	41
S5CS2	1.89	0.7	37
	2.83	0.71	25
S5CS3	1	0.14	14
	1.32	0.12	9

Al igual que se obtuvo con los látex S3CS2, S4CS9 y JX2 la covalencia disminuye conforme aumenta el recubrimiento. De la tabla V.9 también se puede obtener que la

covalencia decrece drásticamente al pasar del látex menos cargado (S5CS1) al más cargado (S5CS3). Estos tres látex fueron sintetizados empleando la misma cantidad de clorometilestireno en la receta con lo que era de esperar en principio que la covalencia fuera semejante. Sin embargo, se ha obtenido que cuanto menos lisa es la superficie de la partícula menor es la covalencia. Antes de que se produzca la covalencia es necesario que la proteína se adsorba físicamente depositándose sobre la superficie del látex, si ésta adsorción ya es difícil al aumentar la densidad de carga y la cantidad de oligómeros existentes en la superficie de la partícula más complicada será su posterior unión covalente.

Desde el punto de vista de la adsorción de proteínas no es acertada la elección de un látex con elevada densidad de carga superficial para preparar reactivos de inmunoaglutinación, pues las moléculas de anticuerpo se pueden desorber fácilmente.

Mediante espectroscopía de fotocorrelación se ha medido el espesor hidrodinámico de la capa de IgG adsorbida sobre el látex S5CS1 en función del recubrimiento (ve figura V. Para ello, los complejos se resuspendieron en agua desionizada e inmediatamente se midió su tamaño. Por diferencia entre el valor obtenido y el diámetro del látex desnudo se ha calculado el espesor de la capa de proteína adsorbida. No queda descartado que durante los dos minutos que duran las medidas se haya podido desorber algo de proteína. En todas las medidas realizadas el índice de polidispersidad era constante y bajo.



**Figura V.29.** Espesor hidrodinámico de la capa de IgG adsorbida sobre el látex S5CS1 en función del recubrimiento proteico a pH 5.5.

Como era de esperar el espesor aumenta con la cantidad de IgG adsorbida alcanzando un valor máximo de  $7.2 \pm 2$  nm para el recubrimiento total de  $4.2 \text{ mg/m}^2$ . Este espesor está en concordancia con la conformación propuesta para la IgG en la región de plateau de la isoterma de adsorción, si bien la técnica de PCS no es una de las más adecuadas para obtener información sobre la estructura de proteínas adsorbidas, pudiéndose emplear otras técnicas como la elipsometría o la medida de viscosidades.

Finalmente vamos a pasar a estudiar la inmunoreactividad de los siguiente complejos: S5CS1-IgG con  $3.32 \text{ mg/m}^2$ , S5CS2-IgG con  $3.22 \text{ mg/m}^2$  y S5CS3-IgG con  $1.63 \text{ mg/m}^2$ . La estabilidad coloidal de estos tres complejos fue estudiada en el capítulo III (apartado 12, página 186) donde se obtuvo que la c.c.c. y la c.s.c. aumentaba y disminuía, respectivamente, al pasar del complejo de S5CS1-IgG al S5CS3-IgG.

Antes de mostrar los resultados experimentales vamos a resumir brevemente las cuatro principales interacciones que van a surgir cuando dos partículas de complejo se aproximan entre sí en una inmunoaglutinación. En primer lugar existirá una potencial atractivo de van der Waals que va a depender de la constante de Hamaker del complejo. Para un mismo pH y una misma concentración de electrolito esta interacción atractiva será muy parecida para los tres complejos que se han estudiado. En segundo lugar existe una repulsión electrostática que dependerá básicamente de la proporción de superficie de látex que no está recubierta con proteína así como de la densidad de carga superficial del látex. Un aumento de la concentración de sal conducirá a la disminución de esta repulsión de origen eléctrico hasta que alcanzada una concentración salina dada la doble capa estará completamente comprimida y a partir de entonces la repulsión electrostática será despreciable. A partir de entonces aparece una tercera interacción repulsiva que aumenta con la fuerza iónica y que ha sido atribuida a las fuerzas de hidratación. Finalmente, existe la interacción específica anticuerpo-antígeno que debe de ser la responsable de la aglutinación del complejo. Para que esta interacción aparezca es necesario que las partículas estén lo suficientemente próximas entre sí.

Considerando todas estas interacciones, es necesario llegar a una situación de compromiso en la que las fuerzas repulsivas sean lo suficientemente fuertes como para que el complejo sea coloidalmente estable pero lo suficientemente débiles como para permitir la aproximación entre las partículas de forma que se produzca la reacción antígeno-anticuerpo.

Para investigar el efecto individualizado de las interacciones electrostáticas y las interacciones debido a las fuerzas de hidratación se han preparado cinco tampones de reacción que se van a utilizar para estudiar la inmunoreactividad de los complejos previamente citados. Las características de estos tampones aparecen en la tabla V.10.

**Tabla V.10.** Composición de los diferentes tampones de reacción usados en la inmunoreactividad.

Tampón de reacción	pH	Concentración de electrolito
A	8.4	sin electrolito
B	8.4	12 mM NaCl
C	8.4	18 mM NaCl
D	8.4	32 mM NaCl
E	8.4	170 mM NaCl + 300 mM Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

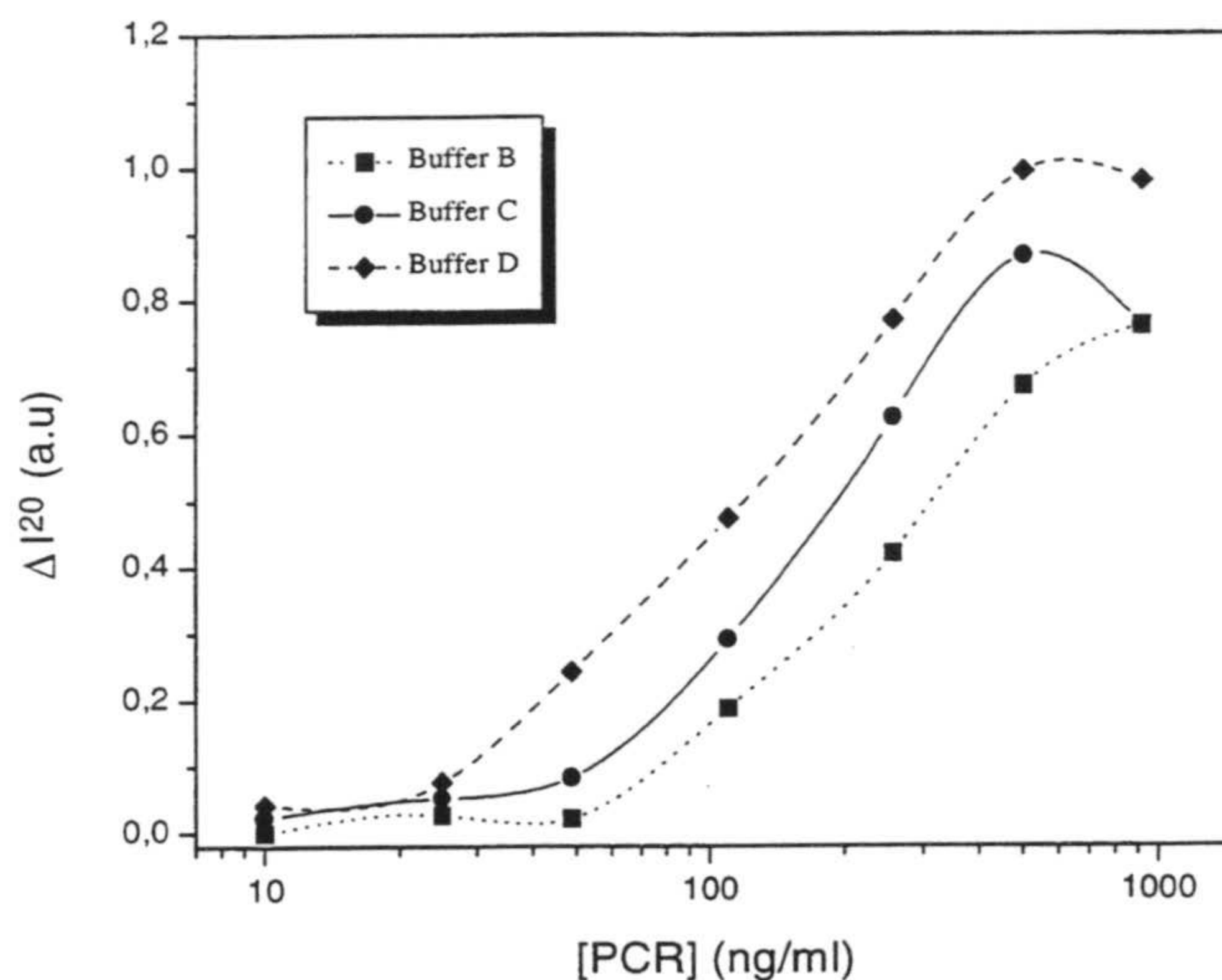
En los cuatro primeros tampones, baja fuerza iónica, existirán repulsiones electrostáticas entre las partículas mientras que en el tampón E, alta fuerza iónica, aparecen repulsiones por fuerzas de hidratación.

Los experimentos de inmunoreactividad se realizaron en el nefelómetro cuantificando la aglutinación mediante la medida de la luz dispersada a 20° durante 5 minutos de reacción. En un experimento de inmunoreactividad se mezclaba 1100 µl de tampón de reacción con 50 µl de diferentes disoluciones de PCR. Por otra parte se mezclaba 1100 µl de tampón de reacción con 80 µl del complejo látex-anticuerpo. Ambas disoluciones se introducían rápidamente en la célula de medida a través del

sistema de inyección del nefelómetro. La concentración final de partículas era de  $1.8 \times 10^{10}$  part/ml para todos los ensayos realizados.

Ninguno de los tres complejos reaccionó en presencia de PCR utilizando el tampón de reacción A. En este tampón, la doble capa eléctrica de los complejos está completamente extendida y la repulsión electrostática es tan grande que la distancia mínima a la que se pueden aproximar las partículas no puede ocurrir ninguna reacción antígeno-anticuerpo.

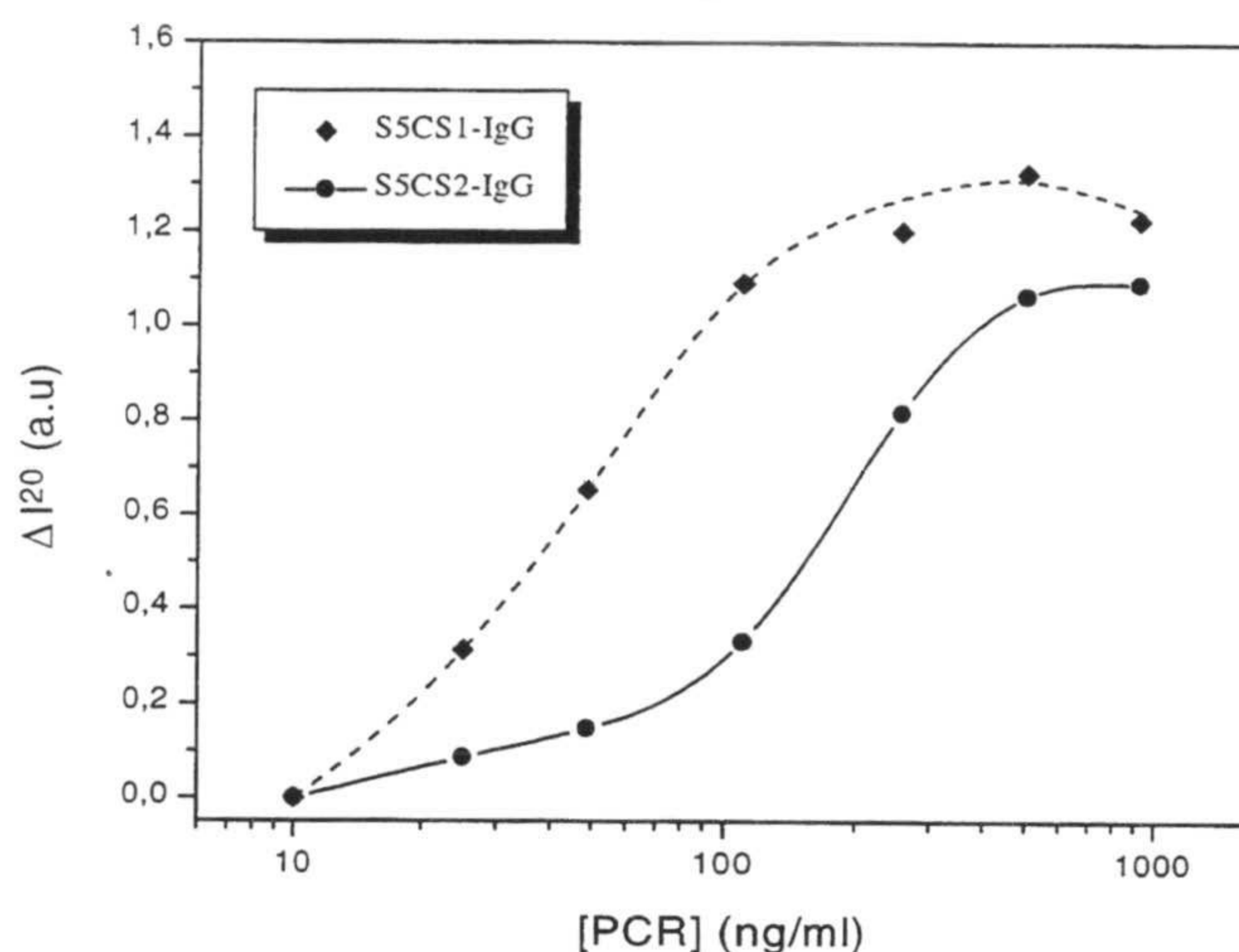
Cuando la concentración de electrolito del medio es de 12 mM (buffer B) la estabilidad coloidal de los complejos S5CS1-IgG y S5CS2-IgG es tan baja que se observó incremento en la intensidad dispersada a  $20^\circ$  durante los 5 minutos en los que duraron los experimentos. Sin embargo, el complejo S5CS3-IgG era coloidalmente estable en los tampones B, C y D por lo que se pudo estudiar su inmunoreactividad, la cual aparece en la siguiente figura.



**Figura V.30.** Inmunoreactividad del complejo S5CS3-IgG con  $1.63 \text{ mg/m}^2$  en diferentes tampones de reacción.

Al aumentar la concentración de NaCl del medio la inmunoreactividad aumenta debido a que las repulsiones electrostáticas disminuyen, favoreciéndose la aproximación de las partículas. Así pues cuanto más inestable coloidalmente es el complejo mayor es su inmunoreactividad.

Los tres complejos mostraron estabilidad coloidal en el tampón de reacción E posibilitando de esta forma el estudio de la influencia de las fuerzas de hidratación sobre su inmunoreactividad. La figura V.31 muestra los datos para los complejos S5CS1-IgG y S5CS2-IgG, ambos con igual recubrimiento. No se han mostrado los datos para el complejo de S5CS3-IgG por que su recubrimiento es aproximadamente la mitad del de estos dos por lo que su comparación no tiene sentido.



**Figura V.31.** Inmunoreactividad de los complejos S5CS1-IgG con  $3.32 \text{ mg/m}^2$  y S5CS2-IgG con  $3.22 \text{ mg/m}^2$  en el tampón E.

En este tampón las fuerzas electrostáticas son despreciables y los complejos están estabilizados a través de las fuerzas de hidratación. El resultado de inmunoreactividad es semejante al obtenido para los tampones de baja fuerza iónica en el sentido de que el complejo más estable coloidalmente es el que proporciona una menor inmunoreactividad.

Así pues la inmunoreactividad de un complejo aumenta conforme aumenta la fuerza iónica del medio hasta alcanzar un máximo a partir del cual comienza a disminuir con la concentración de sal.

El empleo de partículas de látex con elevada carga no es aconsejable ya que además de adsorber débilmente y poca proteína, su reactividad es baja por la fortaleza de las repulsiones electrostáticas o de las fuerzas de hidratación.

## 7. Comparación entre reactivos obtenidos por fisisorción y por quimisorción

En el apartado 4 de este capítulo se enumeraron las ventajas y desventajas de la unión covalente de proteínas a partículas de látex frente a la adsorción física, concluyéndose que, teóricamente, la covalencia es aconsejable. Hay muchos autores que presentan la covalencia de proteínas como un método que permite la obtención de reactivos látex-proteína que pueden tener ventajas respecto de la adsorción tradicional (*Kapmeyer, 1991; Dele et al., 1991; Betton et al., 1993; Koning et al., 1993*).

Una vez que hemos comprobado que los látex cloroactivado con capaces de unir covalentemente proteínas a su superficie se va a comparar en este apartado la inmunoreactividad de complejos con moléculas de IgG ó F(ab')<sub>2</sub> física y covalentemente adsorbidos. Para que esta comparación se realice en las condiciones más adecuadas se van a emplear como superficies adsorbentes dos látex con similares tamaños y densidades de carga: el JM1 para la adsorción física (diámetro 196±10 nm, densidad de carga -4.2±0.6 µC/cm<sup>2</sup>) y el látex JX2 para la adsorción covalente (diámetro 204±8 nm, densidad de carga -3.1±0.4 µC/cm<sup>2</sup>, contenido en grupos clorometilo 121±10 µmol/g. pol.).

El seguimiento de la reacción antígeno-anticuerpo/látex se realizará mediante nefelometría siguiendo el procedimiento ya descrito en los apartados anteriores. El tiempo de los ensayos fue de 10 minutos y se registró la intensidad dispersada a los tres ángulos 4.5°, 10° y 20°.

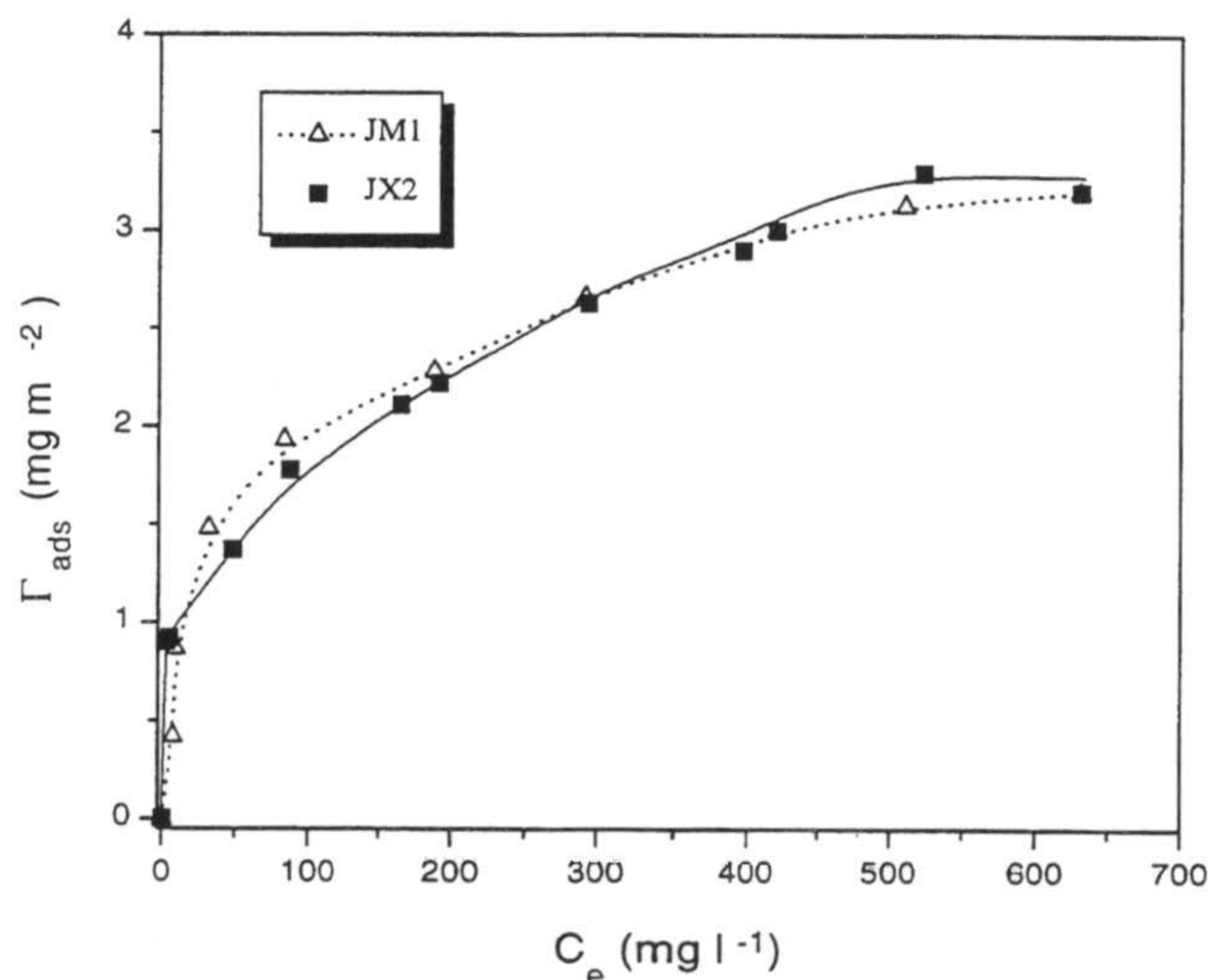
El tampón de reacción que se emplea está formado por 0.1 M glicina a pH 8, 170 mM de NaCl, 1 mg/ml de NaN<sub>3</sub> y 1 mg/ml de BSA. La azida (NaN<sub>3</sub>) se emplea como conservante del reactivo y la BSA se usa para bloquear las zonas superficiales libres del complejo con el fin de aumentar su estabilidad coloidal y para evitar la adsorción del antígeno en dichas zonas. La glicina del tampón reacciona con los grupos clorometilo superficiales del látex que no han reaccionado con el anticuerpo evitando así su posible interacción con las moléculas de antígeno presentes en la disolución. El uso de este



tampón en test de inmunoaglutinación está ampliamente generalizado, no limitándose su empleo para látex cloroactivados (*Medcalt et al., 1990; de Steenwinkel et al., 1981*). Este tampón de reacción se ha empleado para estudiar la inmunoreactividad de los complejos de  $F(ab')_2$ . En el caso de los complejos de IgG se empleó el mismo tampón pero añadiéndole 300 mM de  $Mg(NO_3)_2$ .

Los complejos preparados sobre el látex JX2 no han sido tratados con SDS para desorber la proteína físicamente adsorbida, por lo tanto, la cantidad de proteína que se indicará como recubrimiento proteico es la suma de la fracción quimiadsorbida y fisiadsorbida. Esto es así porque los complejos tratados con SDS no pueden ser utilizados para medir inmunoreactividades pues este surfactante suele desnaturizar a las moléculas proteicas. Además la superficie del complejo presentaría moléculas de SDS adsorbidas por lo que su comparación con los complejos de JM1 no se realizaría en igualdad de condiciones.

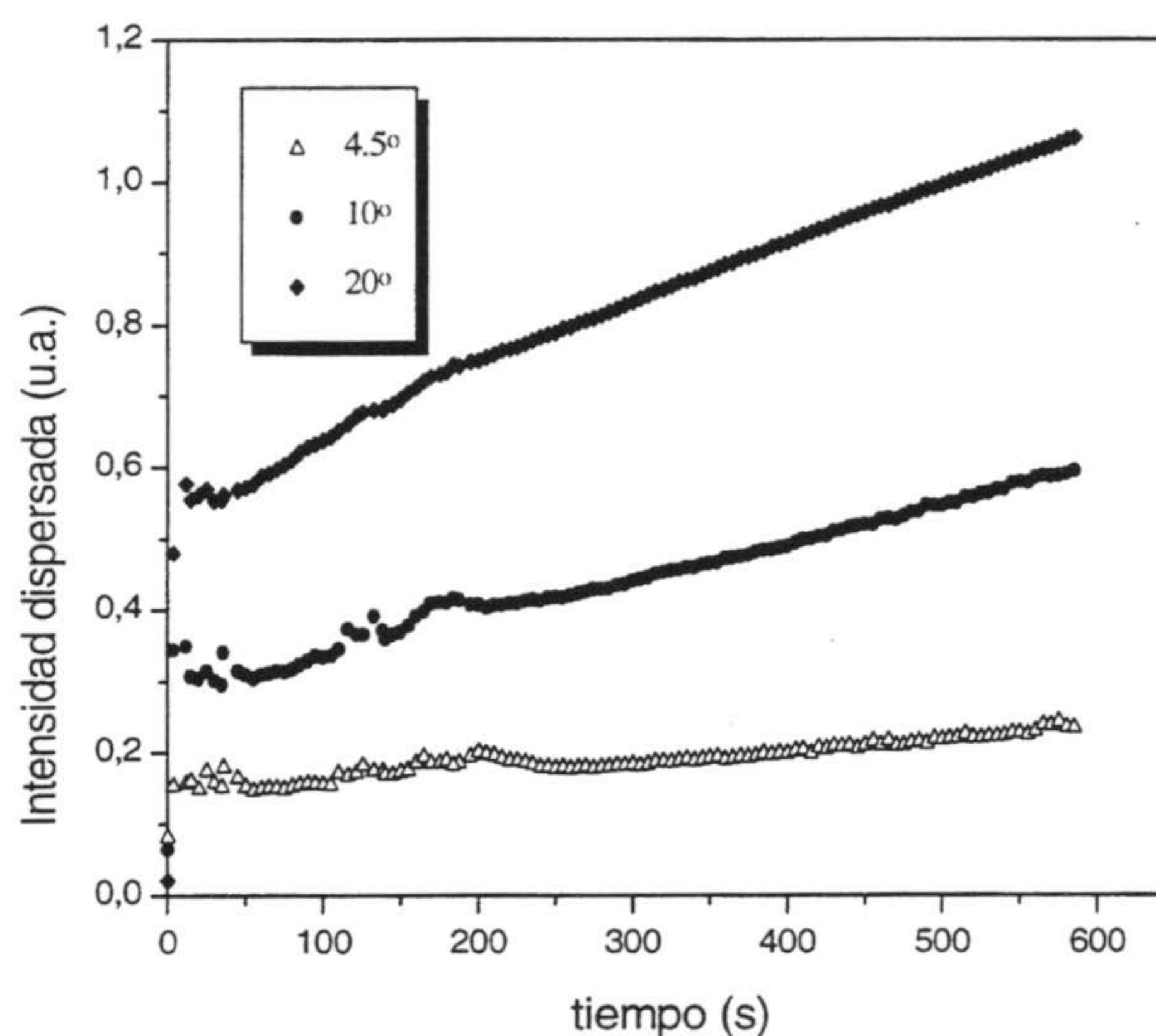
Vamos a comenzar por la comparación realizada en el caso del anticuerpo  $F(ab')_2$ , y concretamente analizando la isoterma de adsorción de este anticuerpo sobre los látex JM1 y JX2 a pH 7.2 (figura V.32).



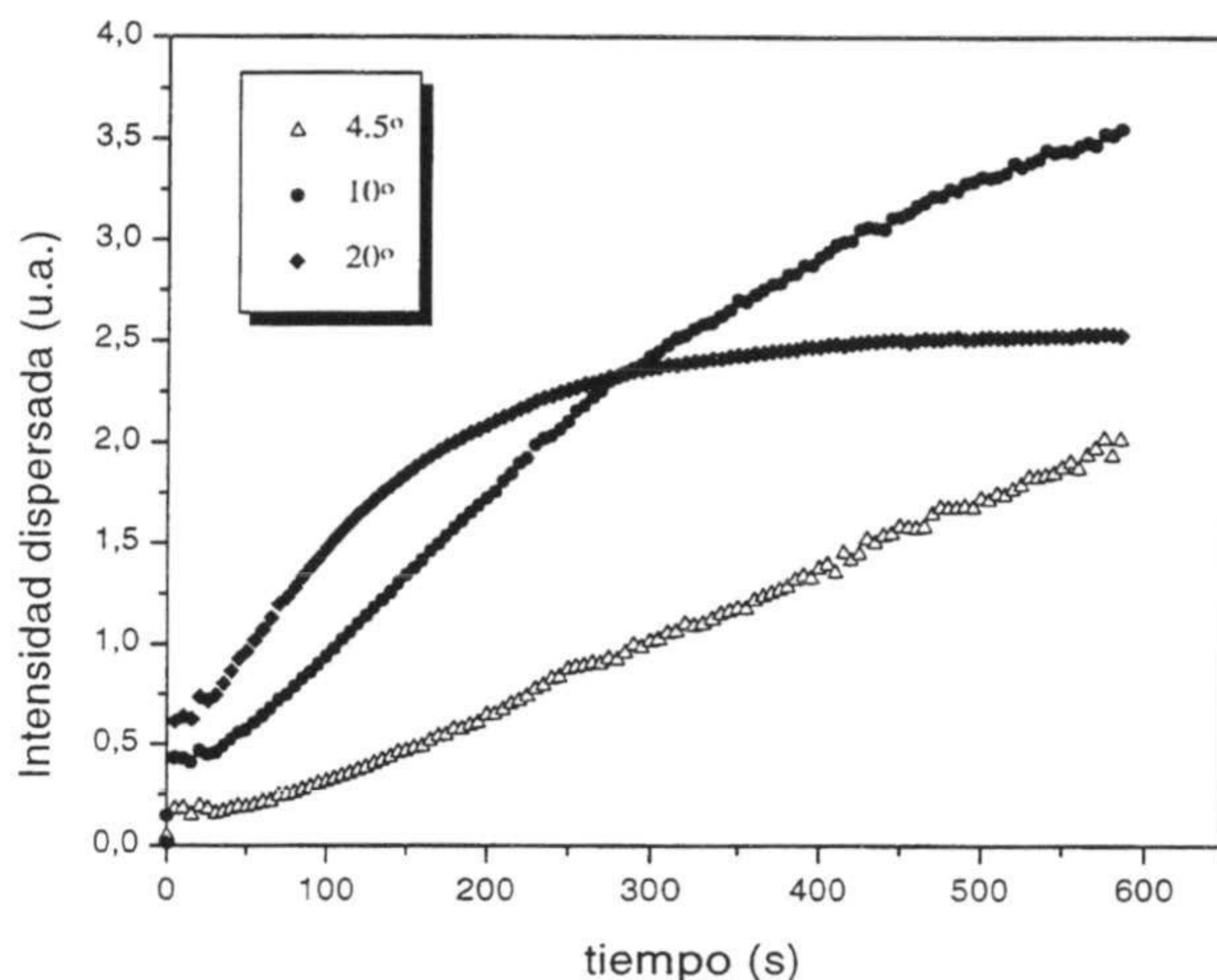
**Figura V.32.** Isotermas de adsorción de  $F(ab')_2$  sobre los látex JM1 y JX2 a pH 7.2.

Ambas isotermas son muy similares presentando la  $F(ab')_2$  prácticamente la misma afinidad por ambas superficies, alcanzándose un mismo plateau para una cantidad máxima adsorbida de  $3.2 \text{ mg/m}^2$ , que equivale a 2467 moléculas de  $F(ab')_2$  por partícula. Parece ser que el mayor carácter hidrofílico de la superficie del látex JX2 así como la posibilidad de unión covalente en este látex no está afectando a la cantidad de proteína  $F(ab')_2$  que se adsorbe. Aunque las cantidades adsorbidas sean parecidas, la interacción proteína-superficie podría ser algo superior para el caso del látex JM1 por ser más hidrofóbico. En este sentido los complejos se resuspendieron en tampón a pH 8 no detectándose ninguna desorción.

Para conocer la influencia del ángulo de medida de la luz dispersada sobre la respuesta óptica frente a la inmunoaglutinación se ha representado en las figuras V.33 y V.34 la intensidad dispersada para la reacción de un complejo JX2- $F(ab')_2$  con  $0.9 \text{ mg/m}^2$  y otro con  $2.1 \text{ mg/m}^2$  en presencia de  $256 \text{ mg/ml}$  de PCR. Ambos complejos eran estables coloidalmente en el tampón de reacción.



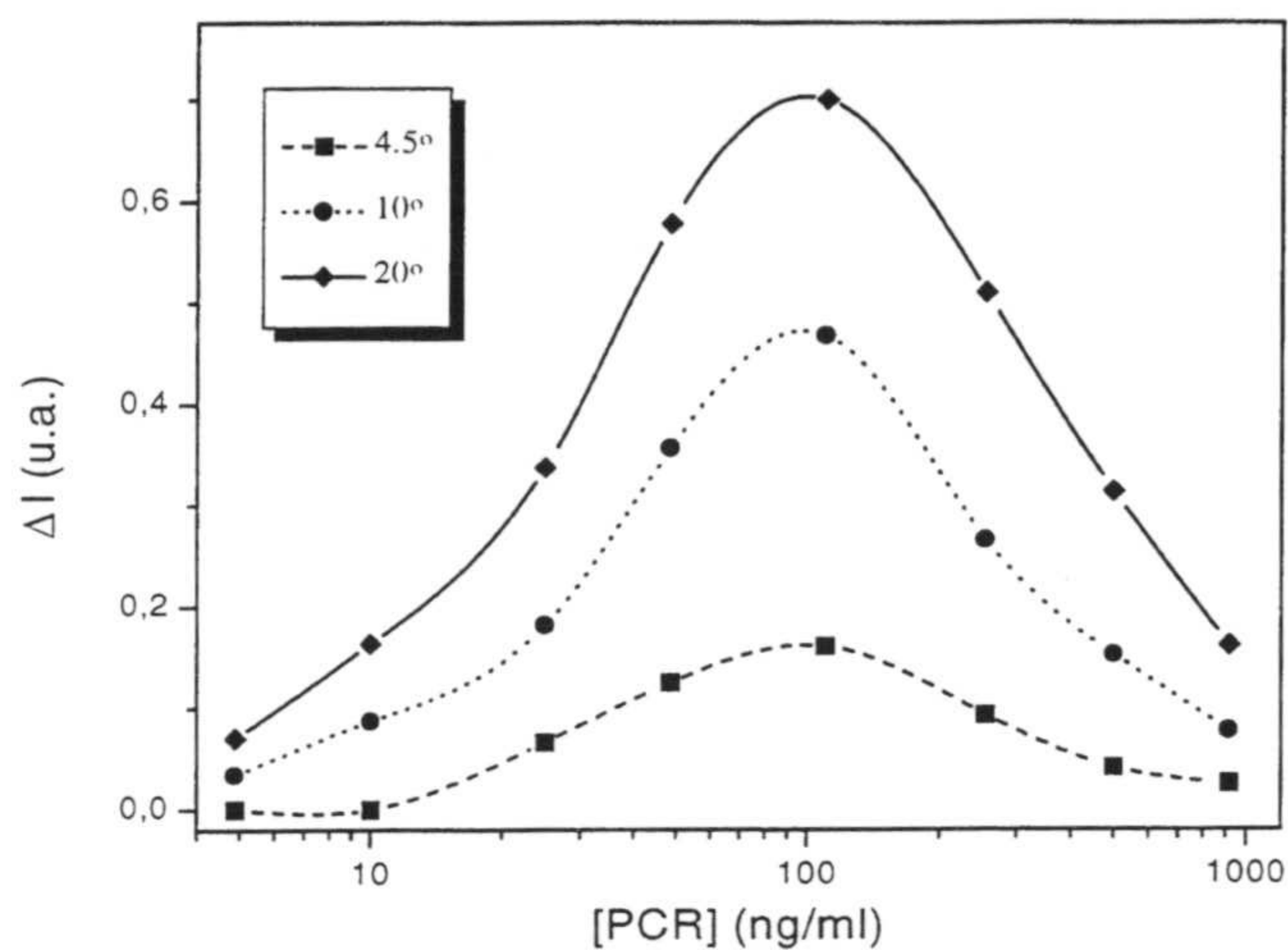
**Figura V.33.** Intensidad dispersada en la inmunoaglutinación de un complejo JX2- $F(ab')_2$  con  $0.9 \text{ mg/m}^2$  en presencia de  $256 \text{ nm/ml}$  de PCR.



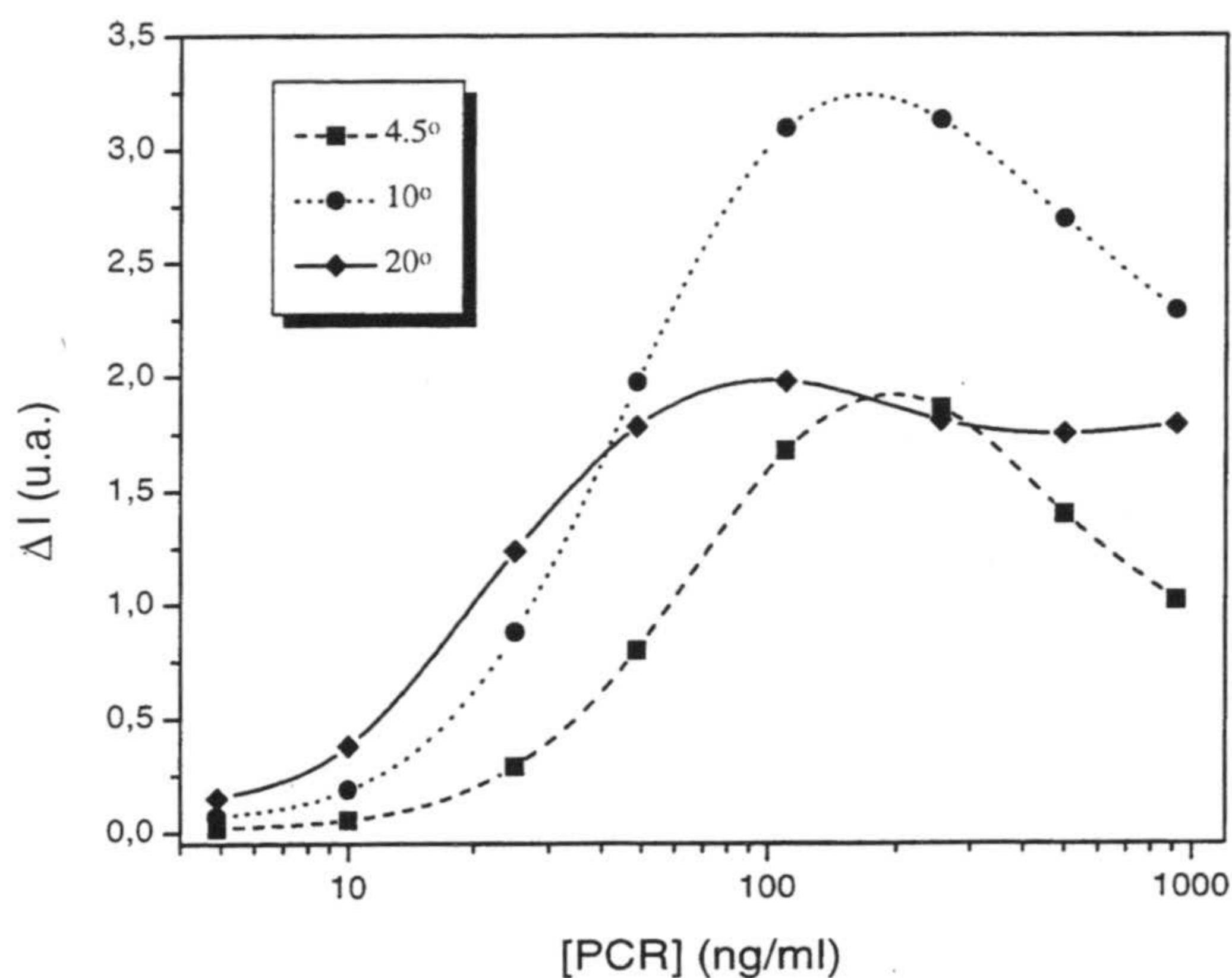
**Figura V.34.** Intensidad dispersada en la inmunoaglutinación de un complejo JX2-F(ab')<sub>2</sub> con 2.1 mg/m<sup>2</sup> en presencia de 256 nm/ml de PCR.

Hay que tener presente que el hecho de que la intensidad dispersada sea mayor cuanto mayor es el ángulo se debe a que tal y como está construido el nefelómetro, el ángulo sólido es mayor para el ángulo de 20°, luego para el de 10° y por último el de 4.5°.

La respuesta óptica a la agregación depende del ángulo de medida y del recubrimiento proteico del complejo. Como ya se justificó anteriormente, cuando el recubrimiento es pequeño los agregados que se están formando no son demasiado grandes con lo que el incremento en la luz dispersada aumenta conforme lo hace el ángulo de medida. Para recubrimientos mayores el tamaño de los agregados llega a un valor crítico que provoca la existencia de interferencias que hacen que la luz dispersada para 20° sea constante. Cuanto menor es el ángulo de medida mayor es el tamaño crítico del agregado que produce interferencias destructivas. Este comportamiento se ve reflejado a la hora de cuantificar la inmunoreactividad en términos de incremento de luz dispersada, tal y como muestran las figuras V.35 y V.36 en las que se recogen las inmunoreactividades de los dos complejos JX2-F(ab')<sub>2</sub> para un amplio intervalo de concentraciones de PCR en función del ángulo de medida.



**Figura V.35.** Inmunoreactividad de un complejo JX2-F(ab')<sub>2</sub> con 0.9 mg/m<sup>2</sup>.



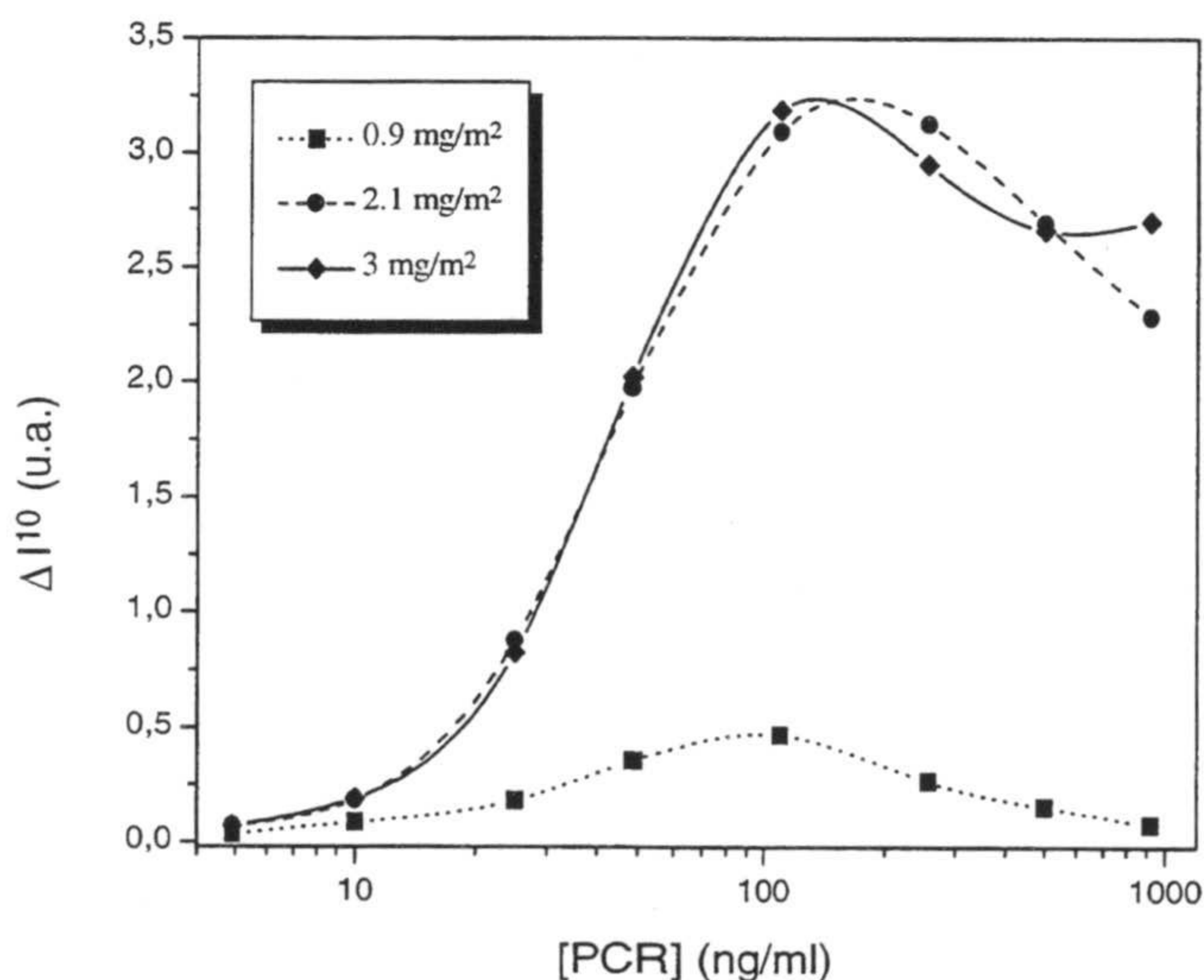
**Figura V.36.** Inmunoreactividad de un complejo JX2-F(ab')<sub>2</sub> con 2.1 mg/m<sup>2</sup>.

El límite de detección, sensibilidad e incremento de intensidad está dependiendo del ángulo de medida. Todas las curvas se asemejan a la curva teórica de la inmunoprecipitina salvo la correspondiente al recubrimiento de 2.1 mg/m<sup>2</sup> y 20°.

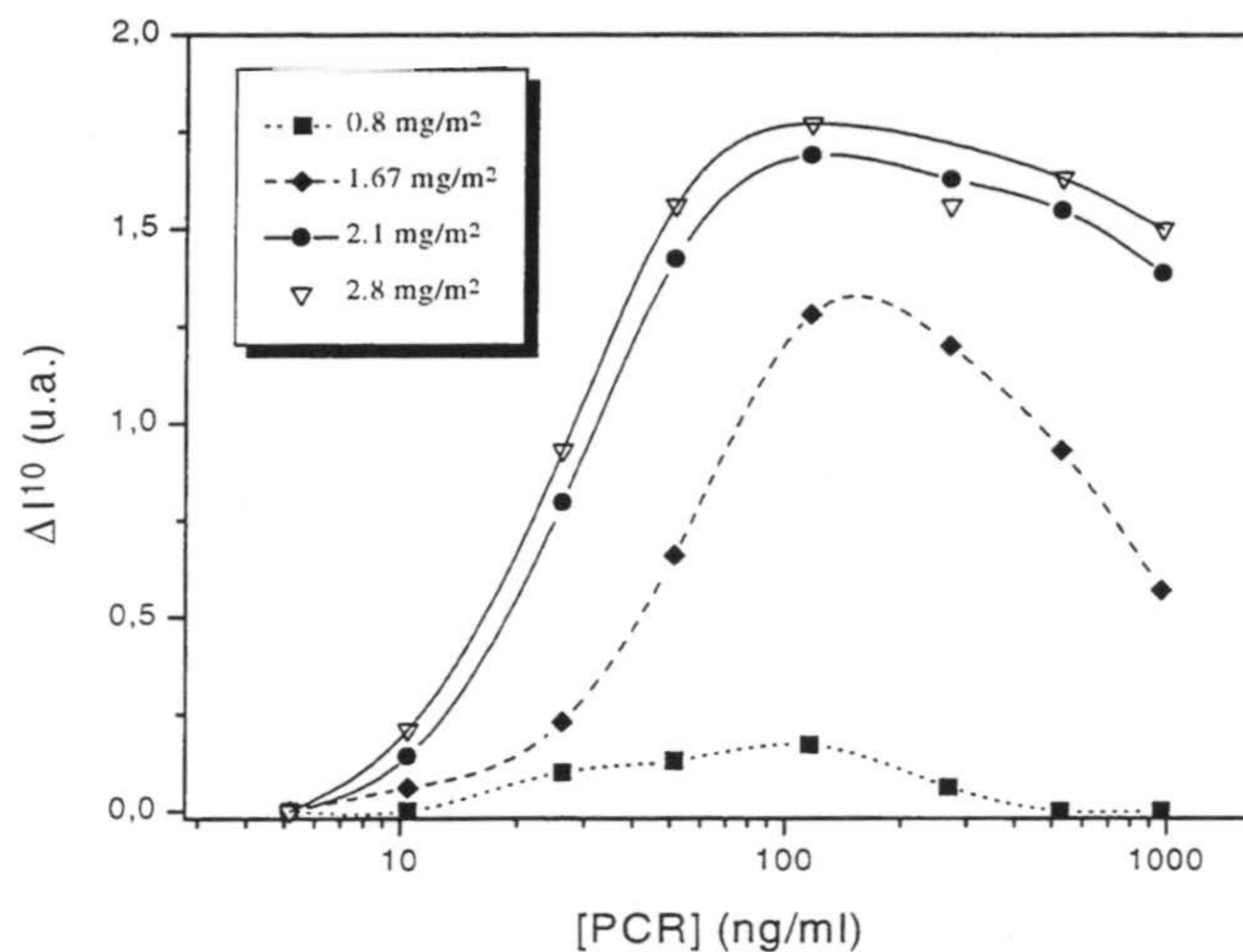
El ángulo de  $20^\circ$  es aconsejable para tiempos cortos de duración del ensayo, para bajas concentraciones de antígeno y recubrimiento bajos. En estos casos la medida a  $20^\circ$  es más sensible que a  $10^\circ$  ó  $4.5^\circ$  porque el tamaño de lo agregados no es suficientemente grande.

El resto de los datos sobre inmunoreactividad que se van a mostrar a partir de este momento corresponden al ángulo de  $10^\circ$ . Esta elección se ha realizado en base a que para  $5^\circ$  la señal aumenta poco para 10 minutos de reacción y para  $20^\circ$  la señal llega a saturarse para altas concentraciones de PCR.

Uno de los factores más importantes en la reacción inmunológica entre un anticuerpo y su antígeno correspondiente es su relación molar (*Tendery, 1967*). Este factor junto con la afinidad del anticuerpo por el antígeno, la cantidad de moléculas de anticuerpo adsorbidas por partícula, el origen de las moléculas de anticuerpo y las técnica empleada para cuantificar la reacción a determinar la forma de la curva de la inmunoaglutinación. Las figuras V.37 y V.38 muestran la variación en la intensidad dispersada en función de la concentración de PCR para varios complejos de JX2-F(ab')<sub>2</sub> y JM1-F(ab')<sub>2</sub>, respectivamente.



**Figura V.37.** Inmunoreactividad a  $10^\circ$  para varios complejos JX2-F(ab')<sub>2</sub> en función de la concentración de PCR.



**Figura V.38.** Inmunoreactividad a  $10^0$  para varios complejos JM1-F(ab')<sub>2</sub> en función de la concentración de PCR.

En estos estudios se ha cubierto un amplio margen de recubrimientos desde bajo hasta alto pasando por uno intermedio.

Independientemente del sustrato empleado para adsorber la F(ab')<sub>2</sub> el menor de los recubrimientos presenta una respuesta bastante pequeña estando por tanto muy limitado su empleo como reactivo. Al aumentar el recubrimiento aumenta considerablemente la inmunoreactividad llegando a ser constante para recubrimiento intermedio y alto. Este resultado no era de esperar ya que se supone que cuantas más moléculas de anticuerpo hay por partícula la probabilidad de encuentros eficaces que conducen a la inmunoaglutinación es mayor. La respuesta a esta constancia en la inmunoreactividad hay que buscarla en términos de empaquetamiento. Al aumentar el recubrimiento el empaquetamiento de las proteínas sobre la superficie del látex es grande dificultándose la accesibilidad de los sitios activos de unión por parte del antígeno. Kitano y col. (*Kitano et al., 1987*) opinan que en superficies saturadas por inmunoproteínas la eficacia de la reacción antigénica está desfavorecida debido a impedimentos estéricos entre las moléculas, reduciéndose la afinidad de los sitios de unión hasta un 99% de su valor efectivo con respecto a disoluciones libres de partículas de látex.

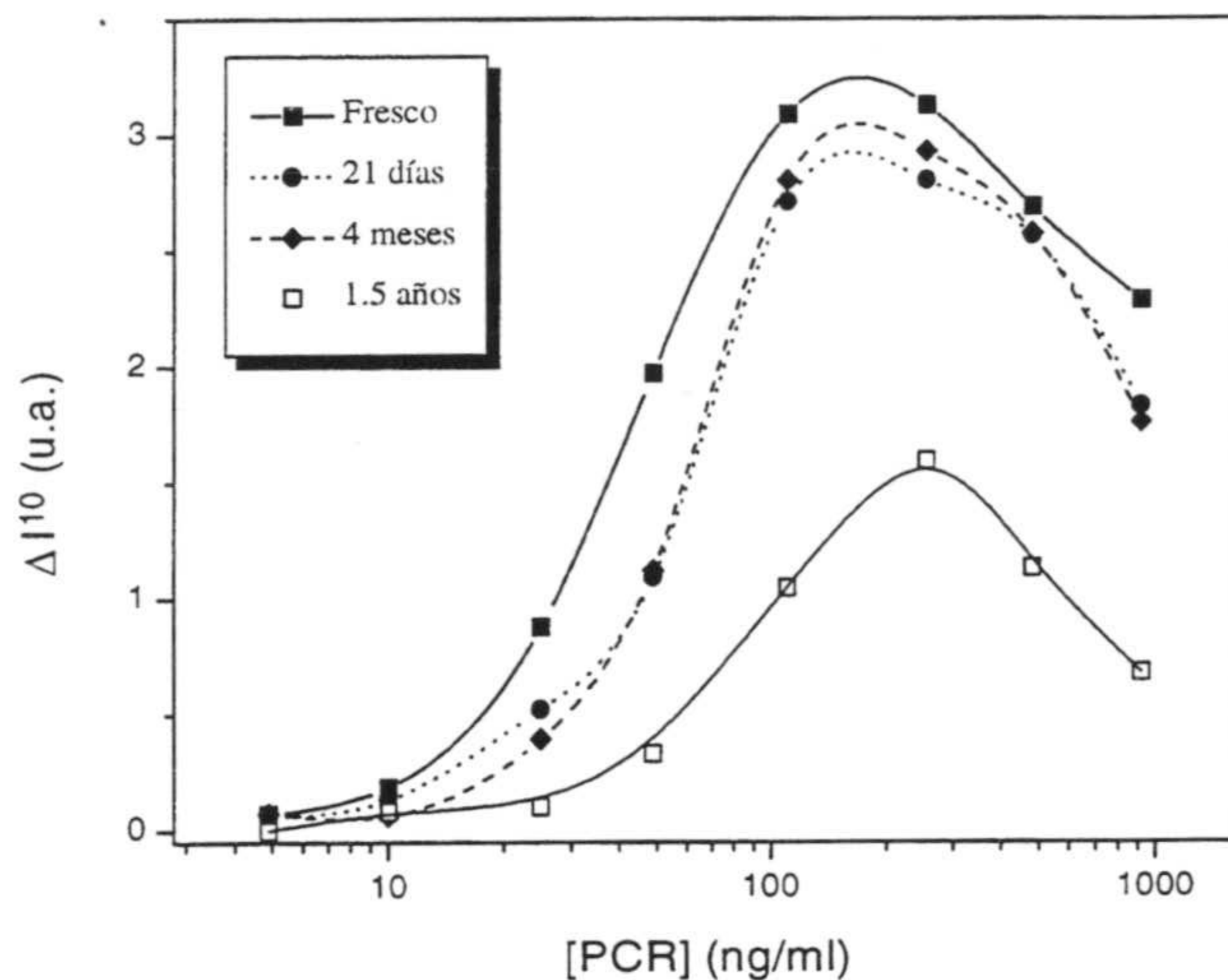
Los cambios conformacionales que sufren las proteínas cuando se adsorben son más acusados cuanto menor es el recubrimiento pues al no existir impedimentos estéricos las proteínas pueden aumentar su superficie de contacto con el látex con el fin de conseguir la mayor interacción posible (*Galisteo et al., 1995; Norde et al., 1992b; Ortega, 1995a*). De hecho, Platsoucas y col. (*Platsoucas et al., 1987*) afirman que las moléculas de IgG que saturan sólo parcialmente una superficie polimérica, poseen características inmunológicas similares a las mismas moléculas cuando se desnaturalizan térmicamente. Los resultados experimentales obtenidos no pueden ser por tanto explicados en términos de cambios conformacionales que conduzcan a la desnaturalización del anticuerpo.

A nivel práctico estos resultados son muy interesantes pues nos indican que hay que preparar complejos con suficiente carga de anticuerpo como para obtener el máximo de respuesta inmunológica pero sin mucha proteína pues a partir de un valor dado de recubrimiento no se obtiene mejora, teniendo como desventaja el correspondiente aumento en el coste de preparación del reactivo.

La inmunoreactividad del anticuerpo  $F(ab')_2$  físicamente adsorbido sobre el látex JM1 y covalentemente adsorbido sobre el látex JX2 para dos complejos con igual recubrimiento,  $2.1 \text{ mg/m}^2$ , puede ser comparada a partir de las figuras V.37 y V.38. El incremento en la intensidad dispersada, para todas las concentraciones de PCR, es considerablemente mayor cuando la proteína está adsorbida sobre el látex JX2. Además para este mismo caso la forma de la curva se asemeja más a la teórica de la inmunoprecipitina posiblemente debido a una mayor especificidad en la reacción  $F(ab')_2$ -PCR. La funcionalidad de la técnica de inmunoaglutinación de látex depende de la capacidad que tienen las moléculas inmovilizadas de  $F(ab')_2$  por reaccionar con el antígeno presente en la disolución. La adsorción del anticuerpo conduce a una reducción de su actividad inmunológica como consecuencia de los cambios conformacionales (*Norde, 1986a; Tan et al., 1990*). Estos cambios estructurales son menores cuando las moléculas de anticuerpo están adsorbidas covalentemente obteniéndose una mejor inmunoreactividad (*Seradyn, 1988; Ortega et al., 1995c*).

También la orientación de las moléculas proteicas en la superficie puede ser más favorable en este mecanismo de adsorción.

Los reactivos de inmunoaglutinación de látex suelen perder reactividad con el tiempo de conservación debido a la desorción de la proteína (*Borque et al., 1996; Ortega et al., 1996a; Peula et al., 1995*). Si el anticuerpo está adsorbido covalentemente esta desorción no debe de existir al estar éste anclado químicamente a la superficie del látex, siempre y cuando el enlace sea lo suficientemente estable. Para comprobar esta posible ventaja de la covalencia se ha medido la reactividad de los dos complejos de JM1-F(ab')<sub>2</sub> y JX2-F(ab')<sub>2</sub> que tenían igual recubrimiento (2.1 mg/m<sup>2</sup>) después de diferentes periodos de conservación a 5°C y en un medio de iguales características que el tampón de reacción pero sin NaCl. Las siguientes figuras muestran los resultados obtenidos.

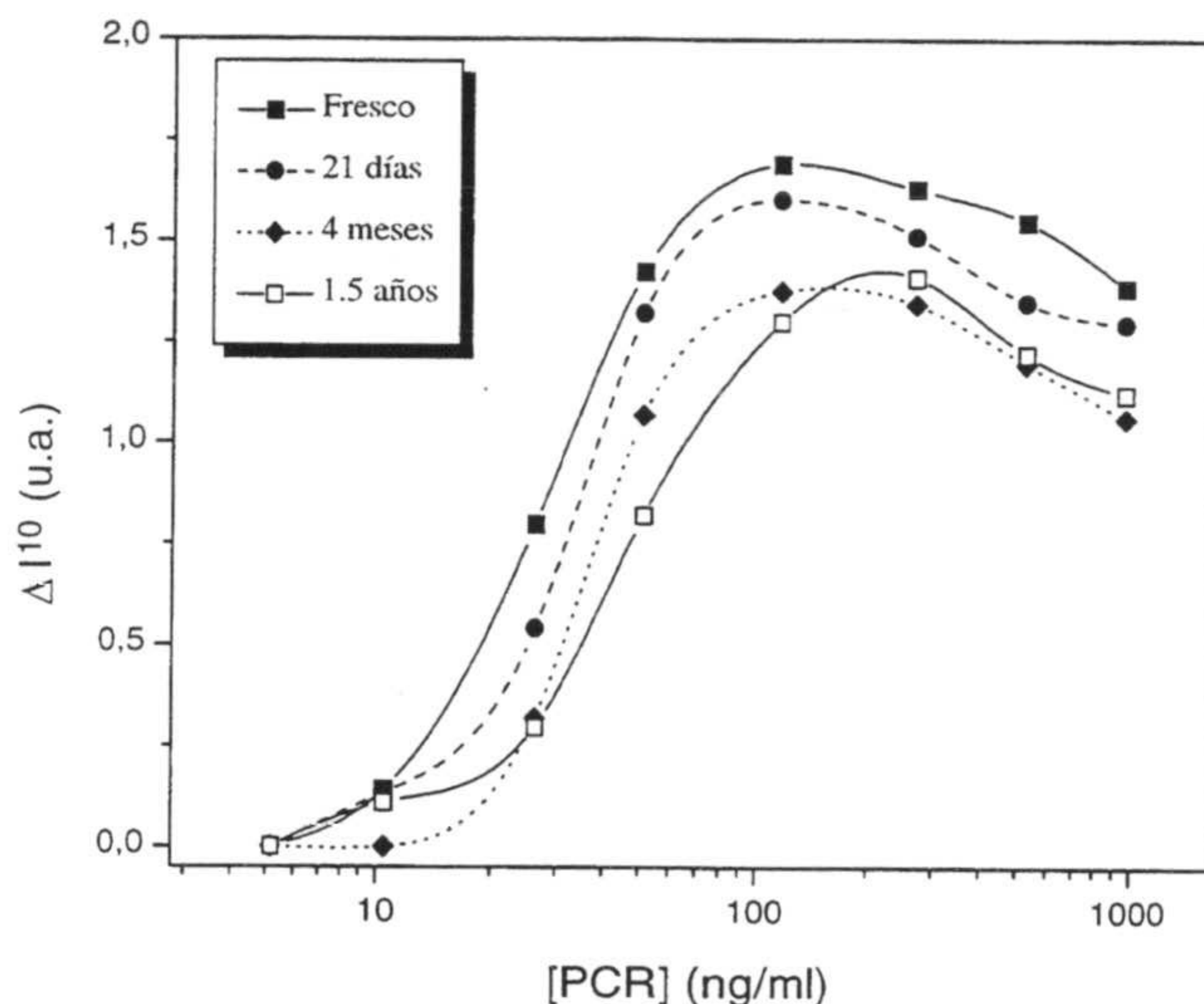


**Figura V.39.** Inmunoreactividad del complejo JX2-F(ab')<sub>2</sub> con 2.1 mg/m<sup>2</sup> para varios periodos de conservación del reactivo.

Con el término fresco nos referimos a la inmunoreactividad del complejo medida en el mismo día en se realizó la sensibilización. Como se puede observar se produce un descenso en la inmunoreactividad una vez transcurridos 21 días desde la síntesis del complejo. Entre 21 días y 4 meses la inmunoreactividad se conserva la misma pero se produce una descenso brusco tras un año y medio de conservación. Sin embargo, si observamos los resultados obtenidos para el complejo donde toda la proteína estaba



físicamente adsorbida (figura V.40) después de un año y medio el reactivo conserva buena parte de su inmunoreactividad.



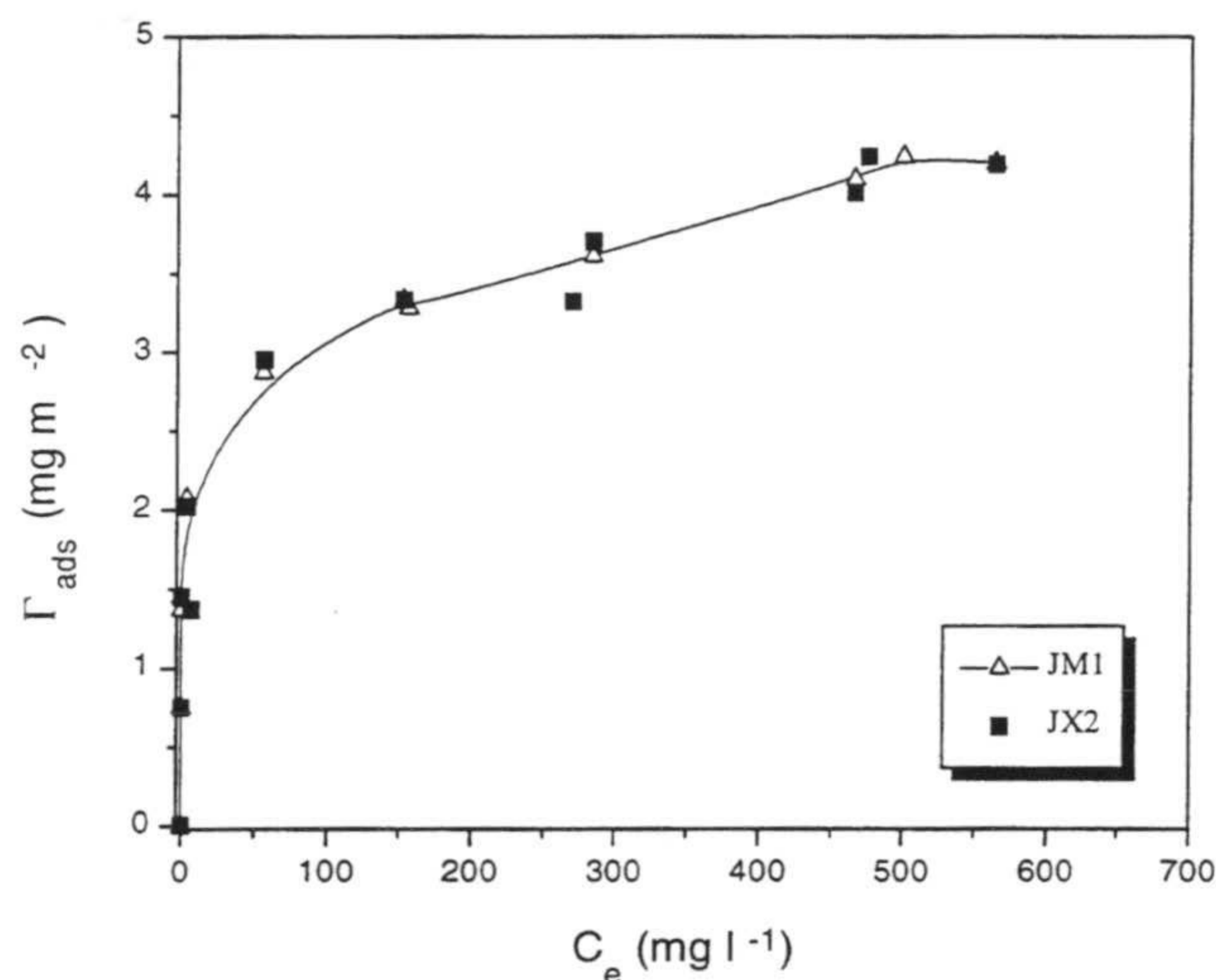
**Figura V.40.** Inmunoreactividad del complejo JM1-F(ab')<sub>2</sub> con 2.1 mg/m<sup>2</sup> para varios periodos de conservación del reactivo.

Este resultado es completamente contrario a lo que se esperaba, que ha sido el complejo donde había proteína unida covalentemente el que ha perdido más reactividad. La explicación que se ha propuesto para este resultado se basa en que el hecho de que el complejo preparado sobre el látex JX2 tiene una fracción de F(ab')<sub>2</sub> físicamente unida y otra covalentemente anclada. Al ser este látex algo más hidrofílico que el látex JM1, la fracción de proteína físicamente adsorbida lo está más débilmente que en el complejo JM1 por lo que es más posible su desorción. También es posible que el enlace covalente F(ab')<sub>2</sub>-látex sea lábil pudiéndose destruir con el tiempo.

No obstante, para tiempos de conservación iguales o inferiores a 4 meses el complejo JX2-F(ab')<sub>2</sub> presenta bastante más reactividad que el complejo JM1-F(ab')<sub>2</sub>, e incluso esta reactividad es semejante después de 1.5 años. Estos resultados no son tan malos si se considera que el periodo de caducidad de los reactivos de látex oscila entre varios 6 meses y el año (Borque et al., 1996).

A continuación vamos a pasar a describir los estudios realizados sobre estos mismos aspectos pero con el anticuerpo IgG.

Comenzando por la isoterma de adsorción de la IgG sobre los látex JM1 y JX2 se puede observar que, al igual que pasaba con la  $F(ab')_2$ , la afinidad de la proteína por ambos látex es muy similar (ver figura V.41).

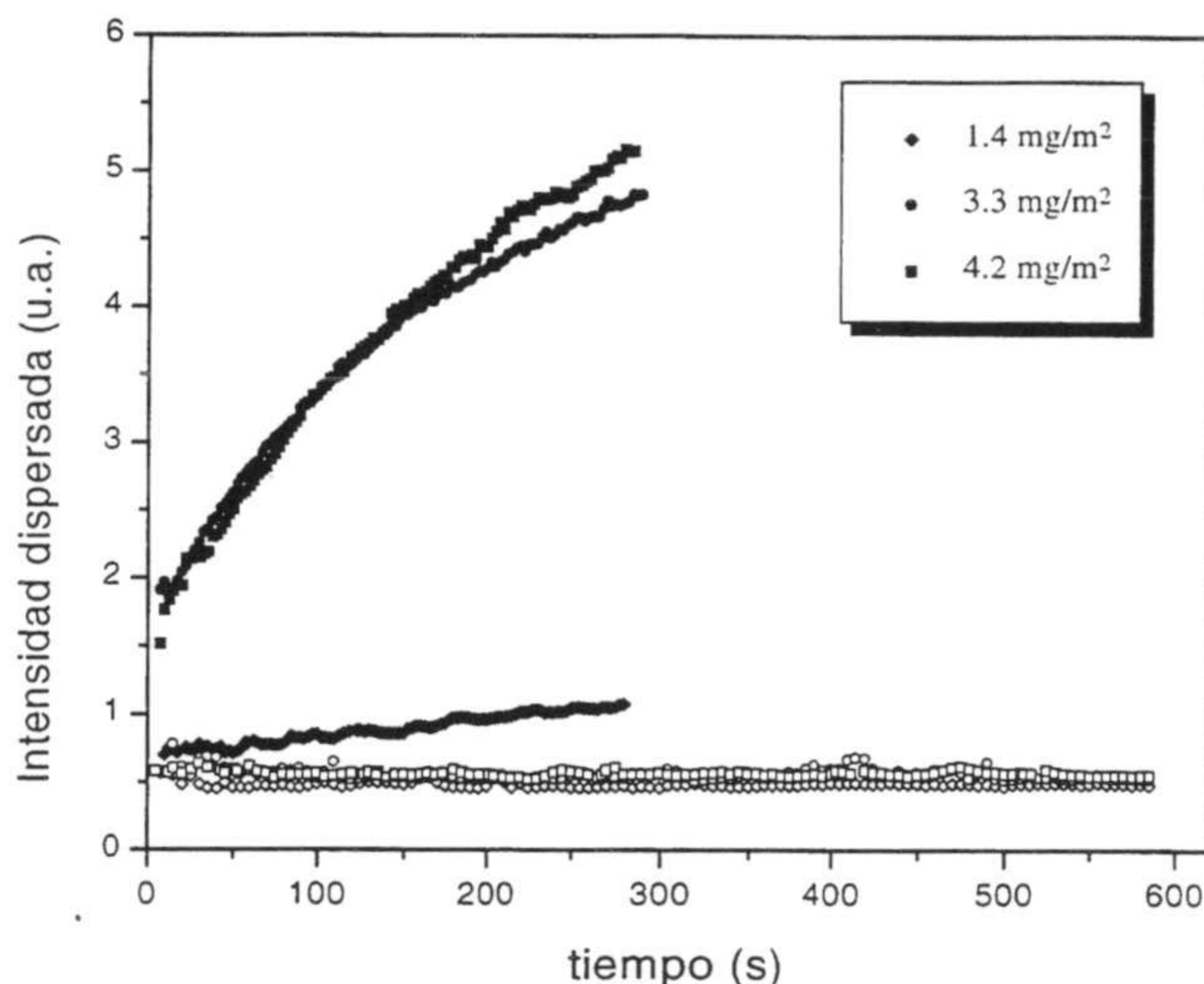


**Figura V.41.** Isotermas de adsorción de IgG sobre los látex JM1 y JX2 a pH 7.2.

La cantidad de IgG máxima adsorbida en el plateau es de 4.2 mg/m<sup>2</sup> que equivale a 2203 moléculas de IgG por partícula.

El gran problema con el que nos hemos encontrados al intentar estudiar la inmunoreactividad de complejos de IgG con JM1 y JX2 es que las partículas sensibilizadas con IgG tienen una estabilidad coloidal muy baja (*Serra et al., 1992; Hidalgo et al., 1995*) con lo que no se ha podido estudiar su inmunoreactividad en el mismo tampón en el que se hicieron los experimentos con  $F(ab')_2$ . Sin embargo, gracias a la estrategia planteada anteriormente sobre el empleo de un tampón a alta fuerza iónica, estos complejos de IgG van a poder empleados como reactivos de inmunoaglutinación al conseguir estabilizarlos coloidalmente. Prueba de todo esto es la figura V.42, en la que se muestra la intensidad dispersada a 10° para tres complejos JX2-IgG en el tampón de reacción empleado en los estudios que se realizaron con los complejos de  $F(ab')_2$  y en otro tampón a alta fuerza iónica con las

mismos reactivos pero al que se le ha añadido 300 mM de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ . Los recubrimientos de los complejos son  $1.4 \text{ mg/m}^2$ ,  $3.3 \text{ mg/m}^2$  y  $4.2 \text{ mg/m}^2$ .



**Figura V.42.** Intensidad dispersada a  $10^0$  para varios complejos JX2-IgG en dos tampones de reacción: 170 mM NaCl (símbolos cerrados) y 170 mM más 300 mM  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  (símbolos cerrados).

Los complejos de IgG sólo son estables coloidalmente en el tampón de alta fuerza iónica. Por otra parte, se puede observar que en el tampón “clásico” (con 170 mM NaCl) la estabilidad del complejo aumenta al aumentar el recubrimiento.

Con el fin de conocer la influencia de la carga proteica del complejo sobre la inmunoreactividad para el caso del anticuerpo IgG, se muestran a continuación los resultados obtenidos para tres complejos JM1-IgG con  $1.56 \text{ mg/m}^2$ ,  $3.3 \text{ mg/m}^2$  y  $4.1 \text{ mg/m}^2$  (figura V.43) y de otros tres complejos JX2-IgG con  $1.4 \text{ mg/m}^2$ ,  $3.3 \text{ mg/m}^2$  y  $4.2 \text{ mg/m}^2$  (figura V.44). Se ha empleado el tampón de alta fuerza iónica y la reactividad se ha cuantificado representando el incremento en la intensidad dispersada a  $10^0$  durante 10 minutos de reacción.

Como en el caso de la  $\text{F}(\text{ab}')_2$  la inmunoreactividad aumenta con el recubrimiento hasta alcanzar un valor concreto a partir del cual permanece constante. Por lo que los costes en anticuerpos se pueden reducir manteniendo una máxima reactividad.

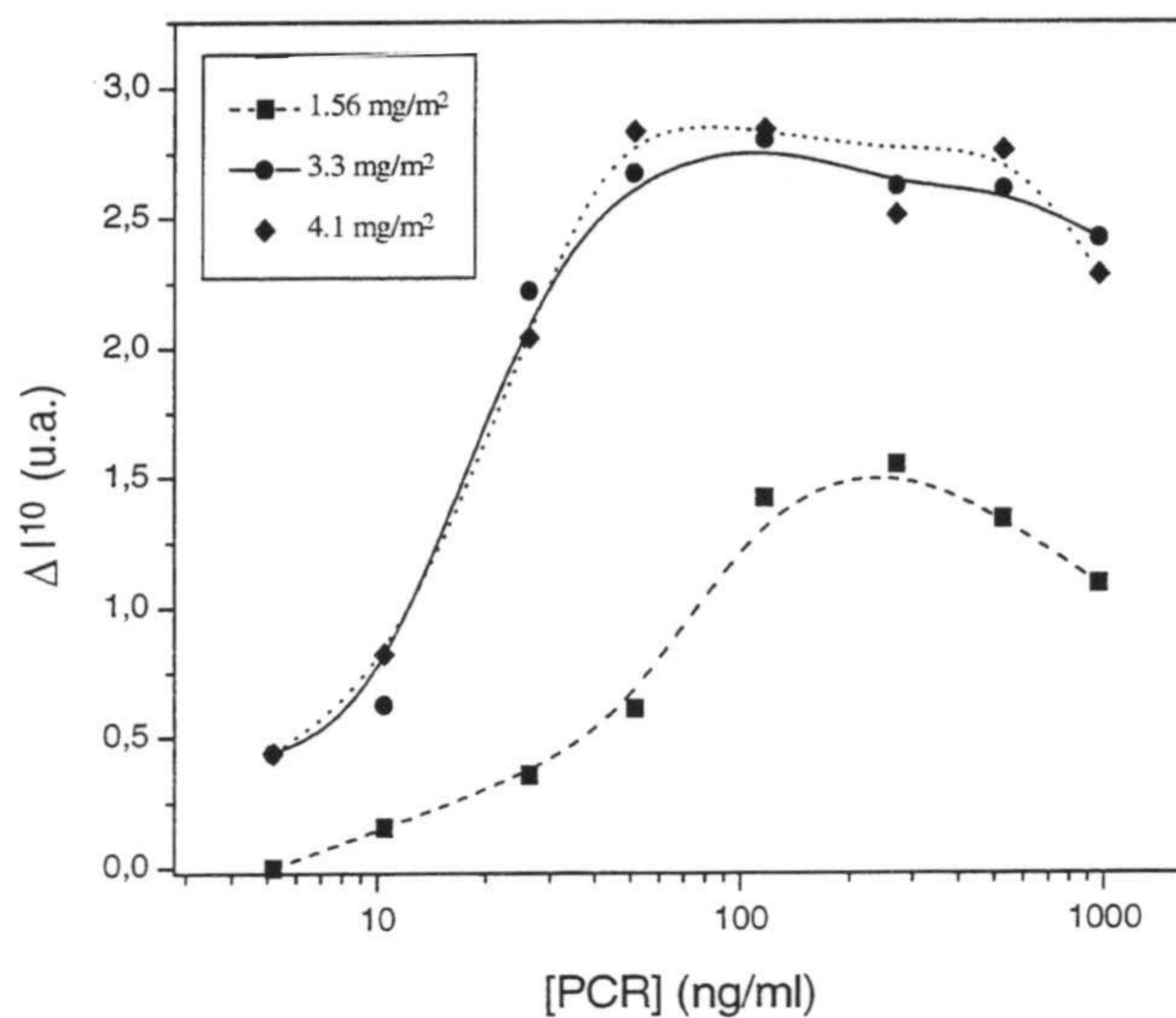


Figura V.43. Inmunoreactividad a  $10^0$  para varios complejos JM1-IgG en función de la concentración de PCR.

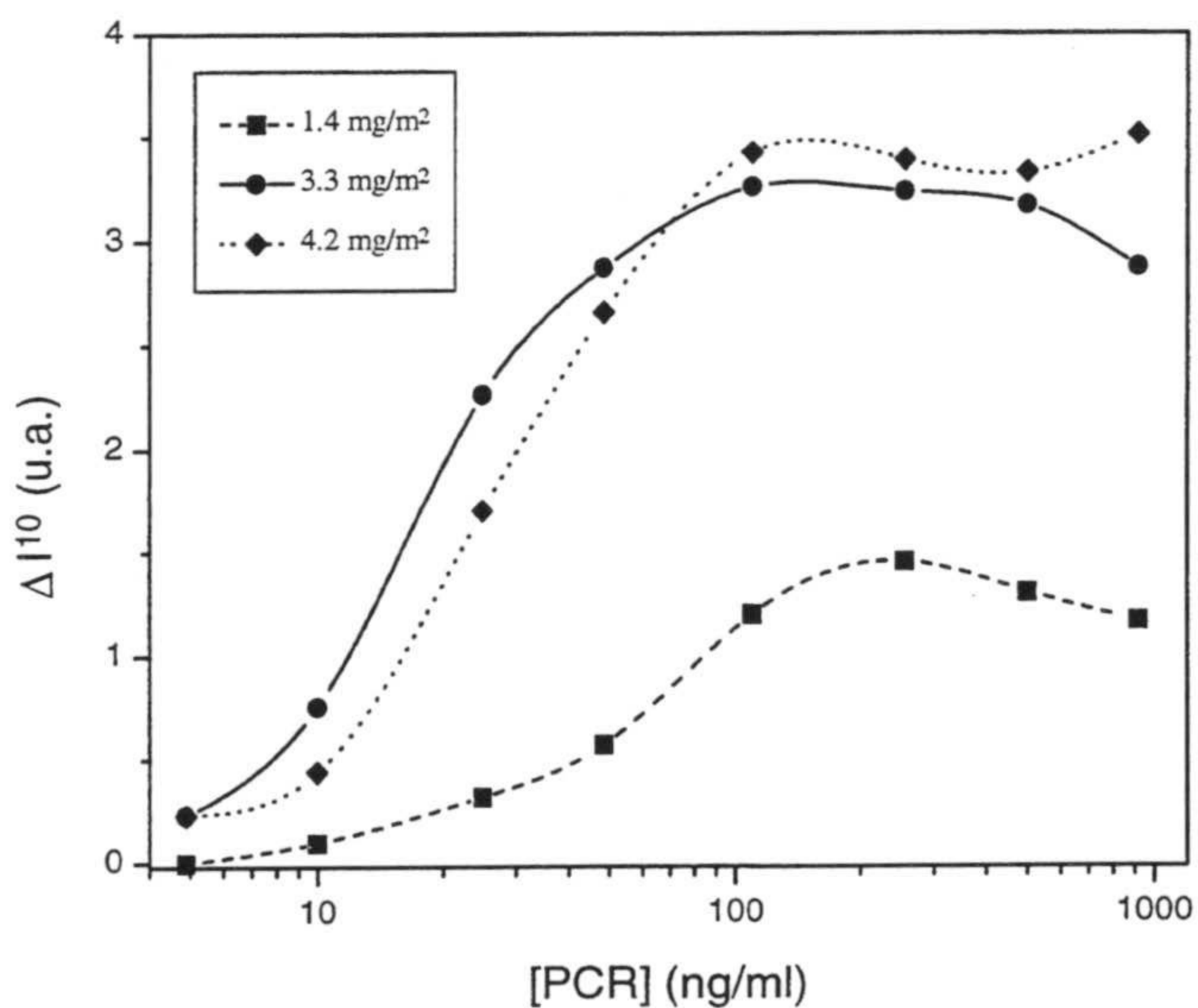
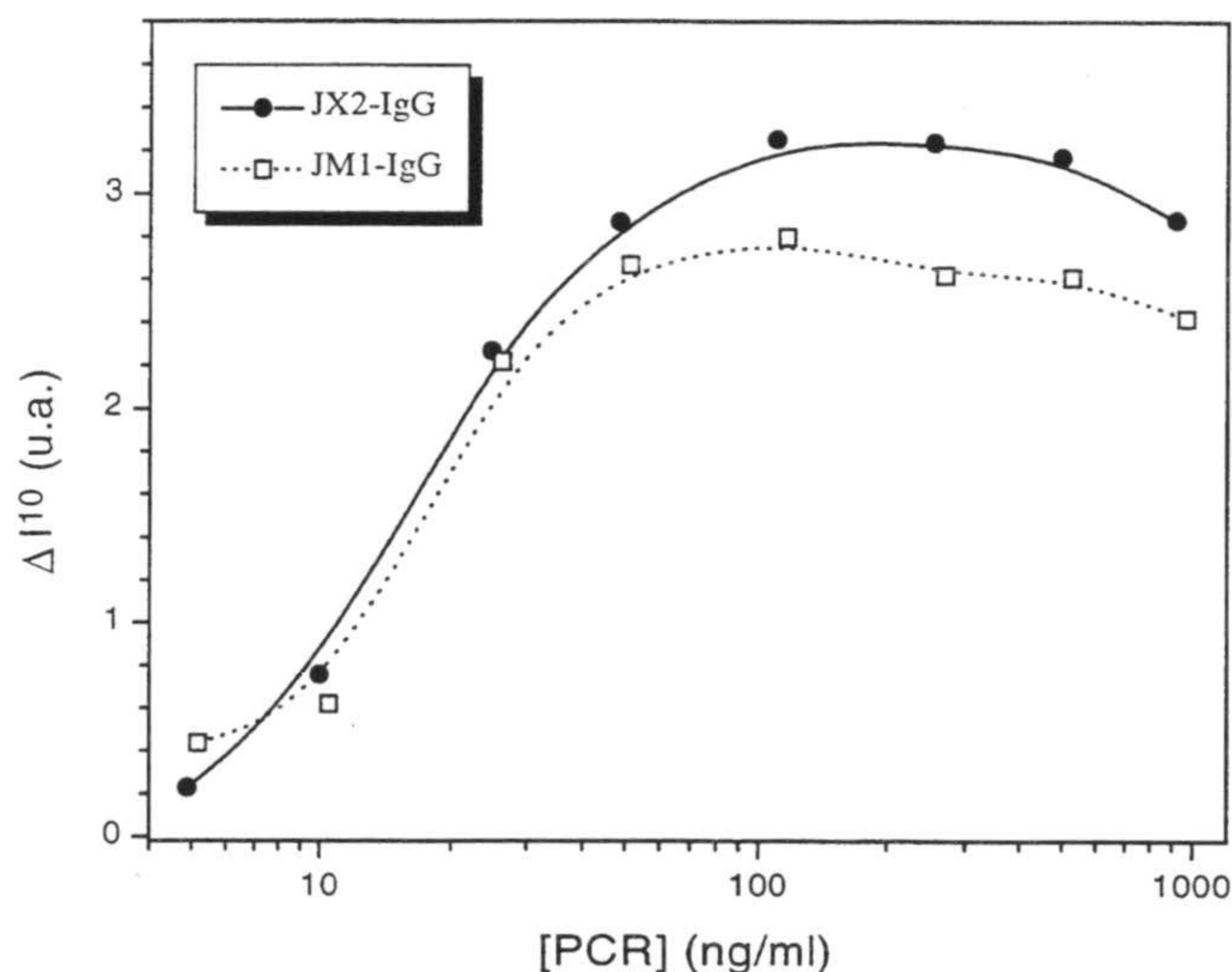


Figura V.44. Inmunoreactividad a  $10^0$  para varios complejos JX2-IgG en función de la concentración de PCR.

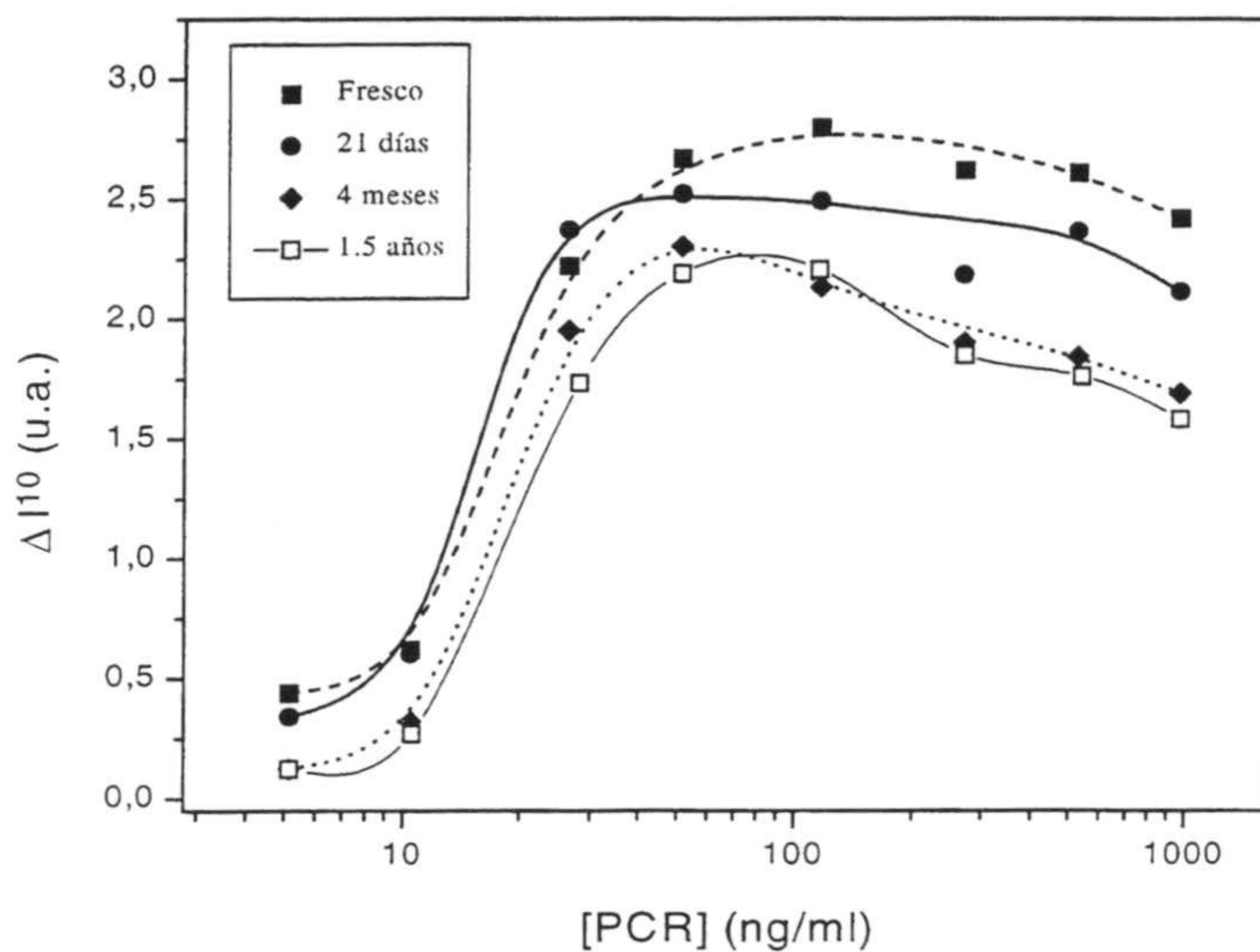
Para poder comparar la inmureactividad cuando la IgG se encuentra covalente ó físicamente adsorbida se ha representado en la siguiente gráfica los datos para los dos complejos de JM1 y JX2 que tienen igual recubrimiento ( $3.3 \text{ mg/m}^2$ ).



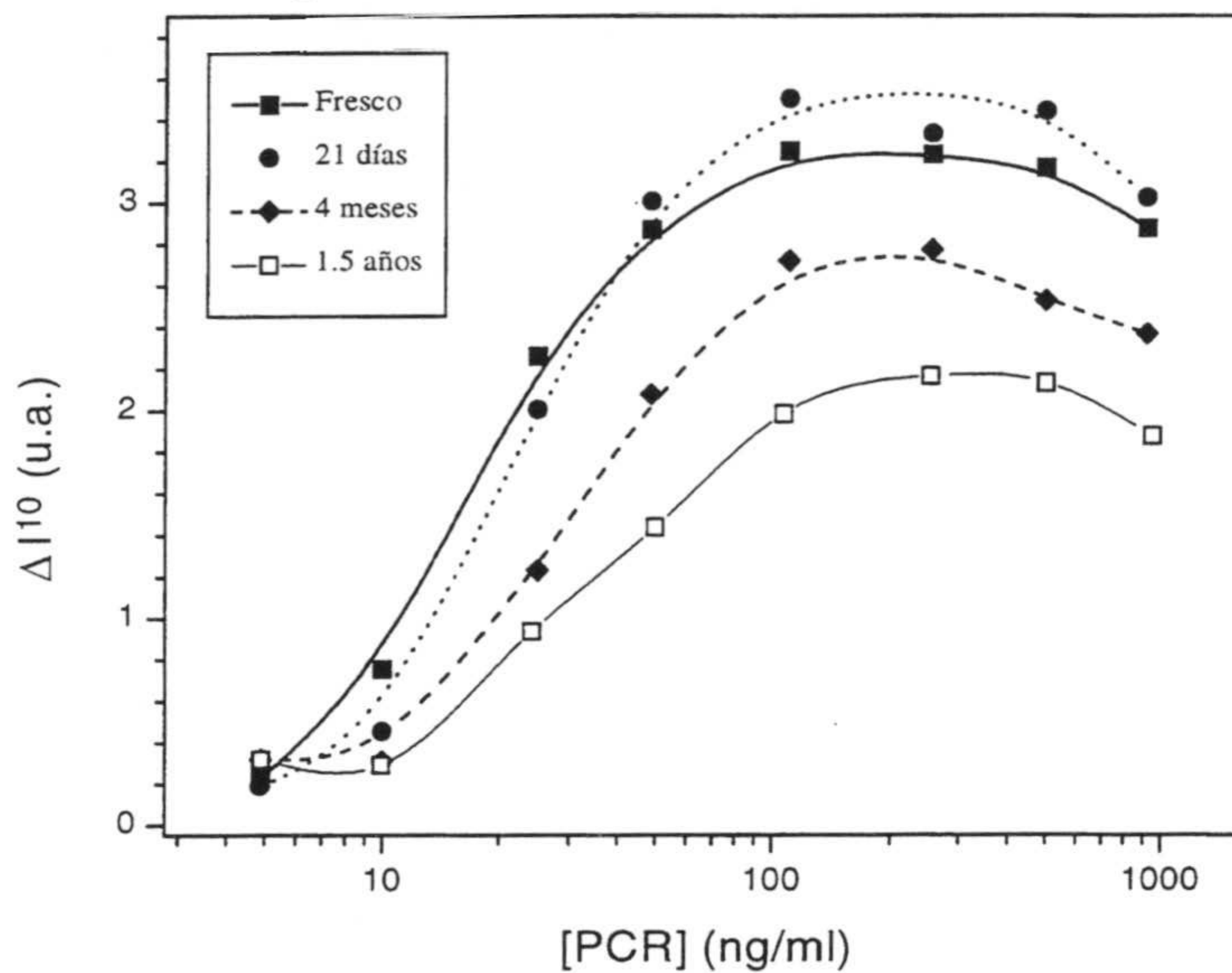
**Figura V.45.** Comparación entre la inmureactividad de un complejo JM1-IgG y otro JX2-IgG ambos con  $3.3 \text{ mg/m}^2$ .

De nuevo el complejo con covalencia presenta una mayor reactividad, aunque las diferencias no son tan marcadas como en el caso del fragmento  $F(ab')_2$ . La conformación que suele adoptar la IgG cuando se adsorbe es aquella en la que su fragmento Fc interacciona directamente con el látex presentando los fragmentos  $Fab'$  expuestos hacia la disolución (Buijs *et al.*, 1997) por lo que la influencia del soporte polimérico, en cuanto si hay covalencia o fisisorción, sobre la inmureactividad es más baja que en el caso de la  $F(ab')_2$ . Para el fragmento  $F(ab')_2$ , al ser más pequeño, es más posible que los epítomos estén cerca de la superficie del látex.

En las figuras V.46 y V.47 se ha representado la inmureactividad del complejo JM1-IgG y JX2-IgG, respectivamente, (ambos con  $3.3 \text{ mg/m}^2$ ) en función del tiempo transcurrido desde su preparación.



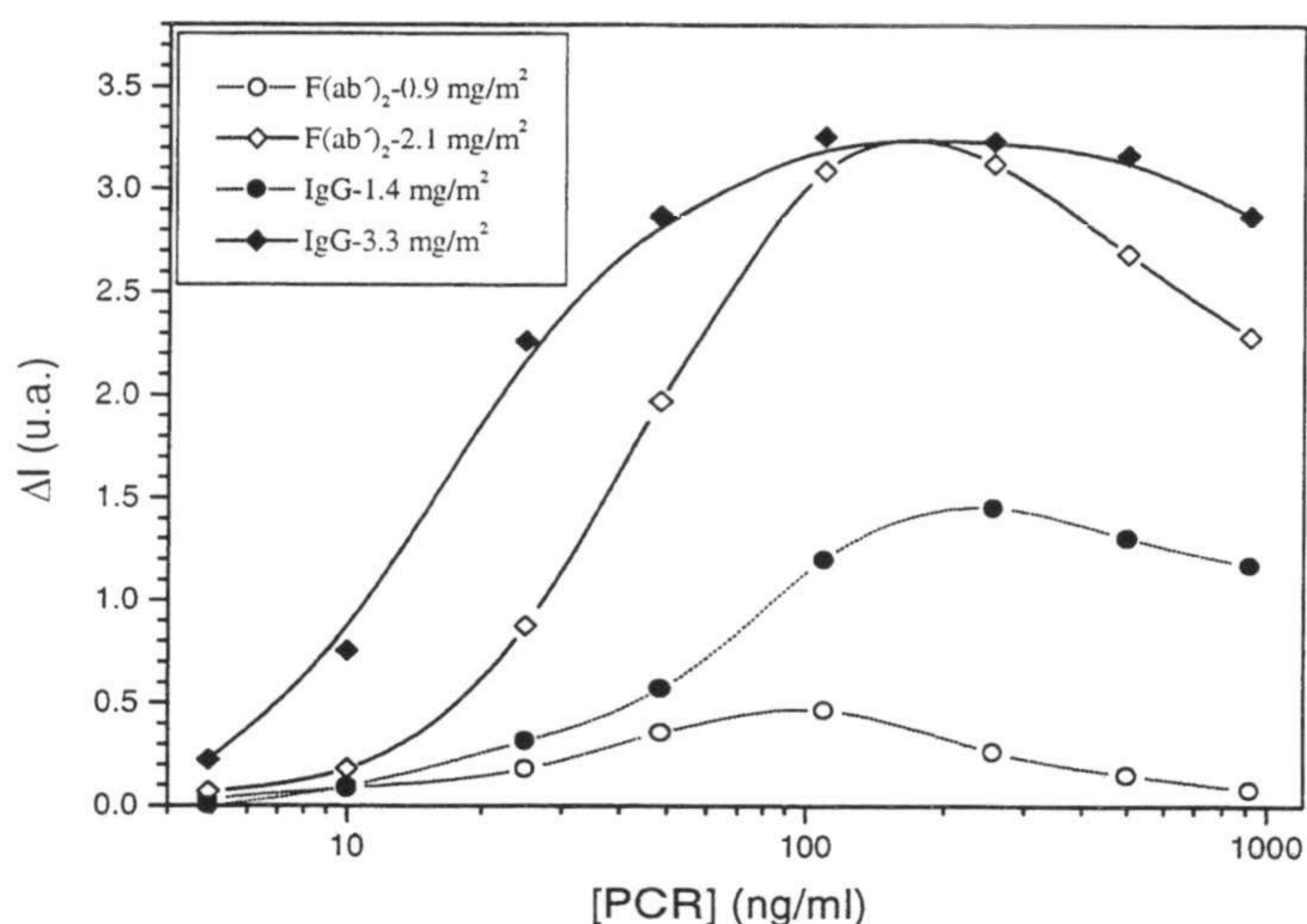
**Figura V.46.** Inmunoreactividad del complejo JM1-IgG con  $3.3 \text{ mg/m}^2$  para varios periodos de conservación del reactivo.



**Figura V.47.** Inmunoreactividad del complejo JX2-IgG con  $3.3 \text{ mg/m}^2$  para varios periodos de conservación del reactivo.

Al igual que en el caso de la  $F(ab')_2$  después de un año y medio es el reactivo con covalencia el que más reactividad ha perdido.

Para comparar la inmunoreactividad de la IgG frente a la de su fragmento  $F(ab')_2$  se ha representado en la figura V.48 los datos experimentales obtenidos para los siguientes complejos: JX2- $F(ab')_2$  con  $0.9 \text{ mg/m}^2$  y otro JX2-IgG con  $1.4 \text{ mg/m}^2$ , ambos con igual cantidad de moléculas de anticuerpo por partícula; JX2- $F(ab')_2$  con  $2.1 \text{ mg/m}^2$  y otro JX2-IgG con  $3.3 \text{ mg/m}^2$ , ambos también con igual cantidad de moléculas de anticuerpo por partícula.



**Figura V.48.** Inmunoreactividad de diferentes complejos de IgG y de  $F(ab')_2$  preparados sobre el látex JX2.

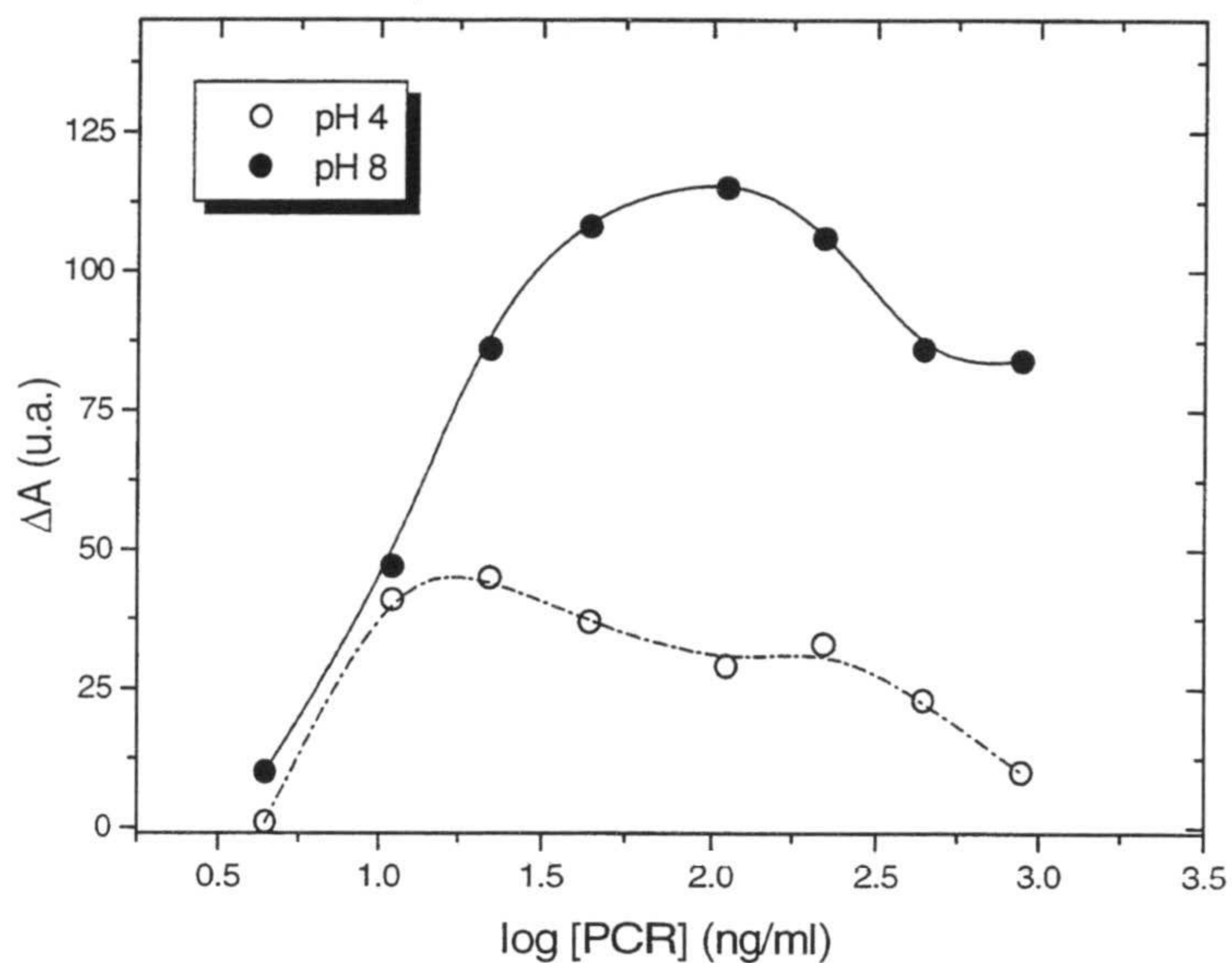
Para ambas cantidades de moléculas de anticuerpo adsorbidas por partícula se ha obtenido una mejor reactividad para los complejos de IgG en todo el intervalo de concentraciones de PCR estudiadas. Estos resultados parecen indicar que la molécula de IgG cuando se adsorbe sufre menos cambios conformacionales y/o está mejor orientada que la  $F(ab')_2$  para poder reaccionar con el antígeno. A su vez, como los cambios conformacionales que sufren las proteínas al adsorberse son más importantes para recubrimientos intermedios que para altos recubrimientos quizás por eso la diferencia observada en las inmunoreactividades entre la IgG y la  $F(ab')_2$  sean más acusada para el recubrimiento menor.

Finalmente, y a modo de corolario se va a presentar un pequeño estudio que se realizó acerca de la influencia de la conformación de la proteína adsorbida sobre su inmunoreactividad. Para ello se prepararon dos complejos de IgG sobre el látex JX2 con igual recubrimiento ( $2.9 \text{ mg/m}^2$ ) pero uno de ellos sensibilizado a pH 4 y otro a pH 8.

El pH al que se produce una adsorción proteica no sólo va a influir en la cantidad de proteína adsorbida sino también en la conformación que adopta la misma. A pH 4 la IgG tiene una carga neta positiva mientras que a pH 8 su carga es negativa, al igual que la del látex. Dado que la proteína al adsorberse sobre la superficie lo hace de la forma más favorable energéticamente, cabe esperar que la conformación de la IgG sea distinta a pH 4 que a pH 8. Concretamente a pH 4 las atracciones electrostáticas harán que la IgG se adsorba de forma que sus fragmentos Fab', que son los más cargados eléctricamente (Buijs 1995a), interaccionen directamente con la superficie del látex mientras que su fragmento Fc, el menos cargado y más hidrofóbico, quedará expuesto hacia la disolución. A pH 8 la conformación preferida por la IgG debe ser la contraria, la zona más cargada (Fab') se repele con la superficie y se encuentra expuesta hacia la disolución interaccionando el fragmento Fc con la partícula. En consecuencia la inmunoreactividad debe de ser mayor a pH 8.

Para comprobar esta hipótesis se midió mediante el espectrofotómetro ( $\lambda=570 \text{ nm}$ ) la inmunoreactividad de los dos complejos de IgG a pH 8 (figura V.49). Previamente se comprobó que el complejo sensibilizado a pH 4 no sufría desorción al cambiarlo a pH 8. La duración de los experimentos fue de 5 minutos utilizando un tampón de alta fuerza iónica con 800 mM de NaCl.

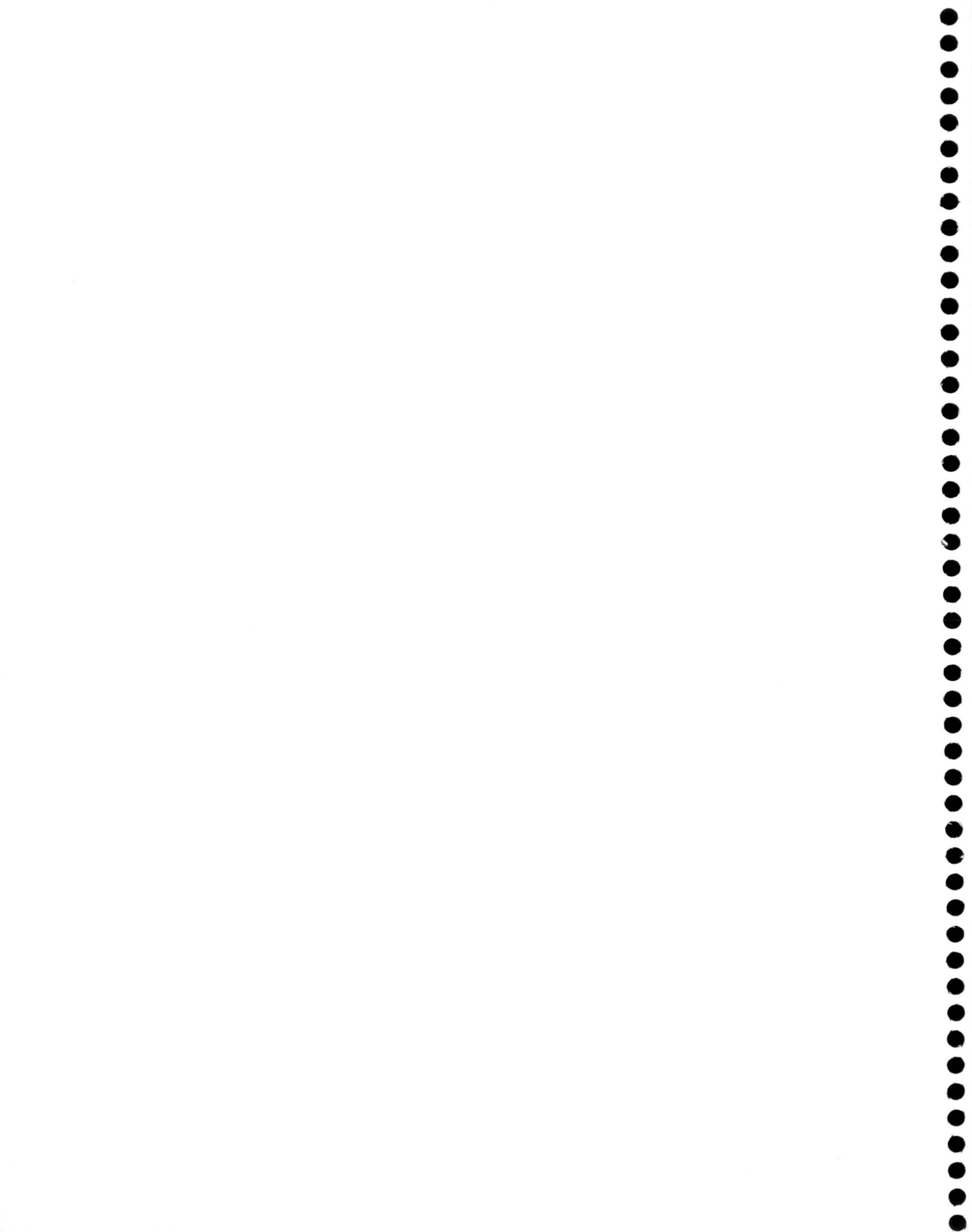




**Figura V.49.** Inmunoreactividad a pH 8 en función de la concentración de PCR para dos complejos JX2-IgG sensibilizados a pH 4 y pH 8, ambos con 2.9 mg/m<sup>2</sup>.

La inmunoreactividad del complejo sensibilizado a pH 8 es mayor a del preparado a pH 4 en concordancia con la hipótesis planteada.

# CONCLUSIONES



## Conclusiones

Las principales conclusiones que se pueden extraer de esta tesis son las siguientes:

1. Se ha mejorado la técnica de dispersión de luz a ángulos pequeños con el fin de obtener la intensidad dispersada a lo largo de un proceso de agregación coloidal. A partir de estos experimentos se ha podido obtener los diagramas de estabilidad coloidal de sistemas liofóbicos y liofílicos.
2. La constante cinética de agregación rápida para coloides liofóbicos es independiente del tamaño de partícula para diámetros superiores a 190 nm. Sin embargo, la constante de agregación disminuye bruscamente conforme disminuye el tamaño de la partícula para valores inferiores a 190 nm.
3. La constante de agregación rápida para coloides liofóbicos es independiente del potencial superficial de la partícula y del contraión empleado para inducir la agregación, por lo menos para cationes monovalentes y divalentes.
4. La fragmentación de agregados por dilución para partículas de gran tamaño puede ser explicada si suponemos que están floculando en mínimos secundarios.
5. Un nuevo concepto de concentración crítica de coagulación (c.c.c.) se ha planteado: la c.c.c. se puede alcanzar también cuando se produce la agregación en un mínimo secundario lo suficientemente profundo como para asegurar el máximo de eficacia de las colisiones entre partículas.
6. Las partículas coloidales recubiertas con una cierta cantidad de proteína (coloide liofílico) son coloidalmente estables a altas concentraciones de electrolito cuando la teoría clásica DLVO predice agregación. Se ha sugerido la existencia de fuerzas de hidratación como mecanismo estabilizador para explicar este comportamiento anómalo.

7. Se ha propuesto un potencial de interacción debido a las fuerzas de hidratación. y su inclusión en la teoría DLVO ha permitido explicar cualitativamente los datos experimentales.
8. La constante de agregación rápida para complejos látex-proteína es inferior al valor teórico predicho por la teoría para la agregación irreversible de Smoluchowski. Este hecho se puede explicar a través de la suposición de la existencia de una capa de moléculas de agua, iones e iones hidratados adsorbidos sobre la proteína del complejo. Esta capa hace que el mínimo primario en el que se produce la agregación tenga una profundidad finita, pudiéndose producir la desfloculación ó agregación reversible.
9. Los agregados de látex-proteína formados en condiciones de agregación rápida son frágiles pudiéndose fragmentar por agitación mientras que los agregados formados por partículas de látex desnudas no se fragmentan.
10. La dependencia angular de la luz dispersada estáticamente se ha empleado para acceder a la estructura interna de los agregados a través de la obtención de su dimensión fractal. Se ha encontrado que la dimensión fractal del látex desnudo agregado bajo condiciones de agregación lenta y rápida concuerda con los valores teóricos predichos para RLCA y DLCA. Sin embargo, la elevada dimensión fractal obtenida para los complejos látex-proteína, bajo ambas condiciones, sugiere que su agregación es reversible pudiéndose producir el fenómeno de reestructuración que conduce a un aumento de la dimensión fractal. Estos resultados experimentales han sido comprobados a través de fotografía de TEM.
11. Se han empleado partículas coloidales con grupos clorometilo superficiales capaces de unir covalentemente moléculas de proteína. Estos grupos químicos tienen baja estabilidad química sufriendo hidrólisis por efecto térmico.
12. El mecanismo de estabilización coloidal por fuerzas de hidratación ha permitido resolver satisfactoriamente el problema generalizado de baja estabilidad coloidal que presentan los complejos látex-proteína utilizados para test de inmunoaglutinación de látex.

13. La nefelometría es una técnica aplicable a la cuantificación de ensayos de inmunoaglutinación donde la elección del ángulo de medida depende del tiempo de reacción, recubrimiento proteico y concentración de antígeno presente en el medio. En términos generales es aconsejable medir para un ángulo de  $10^\circ$ .
14. Los reactivos basados en la unión covalente del anticuerpo presentan una mayor reactividad que los preparados por adsorción física.
15. Para ambos mecanismos de adsorción, física y química, la inmunoreactividad de complejos de IgG es mayor a los complejos de  $F(ab')_2$ .
16. La turbidimetría y la nefelometría son técnicas reproducibles y rápidas que se pueden emplear para cuantificar la inmunoaglutinación de látex. Cuando se quieran detectar pequeñas cantidades de antígeno, las técnicas de PCS y de anisotropía angular son las más apropiadas.

## Referencias

1. Adamczyk, Z. Dabros, Z. Czarnecki, T. van de Ven, Th.G.M. *Adv. Colloid Interface Sci.* **19**, 183 (1983).
2. Ahmed, S.M. El-Aasser, M.S. Pauli, G.H. Poehlein, G.W. y Vanderhoff J.W. *J. Colloid Interface Sci.* **73**, 388 (1980).
3. Albright, L.F. y Poehlein, G.W. *Polym. News.* **21**, 126 (1996).
4. Allen, L.H. Matijevic. E. *J. Colloid Interface Sci.* **32**, 420 (1970).
5. Andrade, E.N. Da, C. Dodd, C. *Proc. R. Soc. London Ser. A.* **204**, 449 (1951).
6. Andrade, J.D. Hlady, V. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **516**, 158 (1987).
7. Arai, T. Norde, W. *Colloids Surfaces.* **51**, 1 (1990).
8. Auber, C. Cannell, D.S. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 738 (1986).
9. Bagchi, P. Gray, B.V. Birnbaum, S.M. *J. Colloid Interface Sci.* **69**, 502 (1979).
10. Bagchi, P. Birnbaum, S.M. *J. Colloid Interface Sci.* **85**, 460 (1981).
11. Bahadur, A. Bahadur, P. Riess, G. *Makromol. Chem.* **186**, 1387 (1985).
12. Bale, M.D. Danielson, S.J. Daiss, J.L. Goppert, K.E. Sutton, R.C. *J. Colloid Interface Sci.* **132**, 176 (1989).
13. Bale, M.D. Warshawsky, A. *Colloid Polym. Sci.* **269**, 139 (1991).
14. Ball, R.C. Weitz, D.A. Witten, 'l'.A. Leyvraz, F. *Phys. Rev. Lett.* **58**, 274 (1987).
15. Bangs, L.B. "Uniform Latex Particles", Seraden Diagnostics Inc., Indianapolis, 1987.
16. Bangs, L.B. *J. Clin. Immuno.* **13**, 127 (1990).
17. Barany, S. Cohen, M.A. Fleer, G.J. *Colloids Surfaces A.* **106**, 213 (1996).
18. Barouch, E. *J. Chem. Soc., Faraday Trans I.* **84**, 3093 (1988).
19. Basinska, T. Slomkowski, S. *Colloid. Polym. Sci.* **273**, 431 (1995).
20. Bastos-González, D. "Caracterización de nuevos coloides poliméricos con diferente funcionalidad: tratamiento térmico y aplicaciones". Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1993a.

21. Bastos, D. de las Nieves, F.J. *Colloid Polym. Sci.* **271**, 860 (1993b).
22. Bastos, D. de las Nieves, F.J. *Colloid Polym. Sci.* **272**, 592 (1994).
23. Bastos-González, D. Ortega-Vinuesa, J.L. de las Nieves, F.J. y Hidalgo-Álvarez, R. *J. Colloid Interface Sci.* **176**, 232 (1995).
24. Basu, S. Sharma, M.M. *J. Colloid Interface Sci.* **165**, 355 (1994).
25. Belaya, M.L. Feigelman, M.V. Levadny, V.G. *Chem. Phys. Lett.* **126**, 361 (1986).
26. Bentaleb, A. Ball, V. Haïkel, Y. Voegel, J.C. Schaaf, P. *Langmuir*, **13**, 729 (1997).
27. Berg, J.C. Virden, J.W. *J. Colloid Interface Sci.* **149**, 528 (1992).
28. Berlin, A. Kislenko, V.N. *Colloids Surfaces A.* **104**, 67 (1995).
29. Bernard, A.M. Lauwerys, R. *Clin. Chem.* **29**, 1007 (1983).
30. Bernard, A.M. Lauwerys, R. *J. Immunol. Methods.* **71**, 141 (1984).
31. Berne B., Pecora, R. "Dynamic Light Scattering". Wiley. 1990.
32. Bernhardt, J. Pauly, H. *J. Phys. Chem.* **81**, 1290 (1977).
33. Bernhardt, J. Pauly, H. *J. Phys. Chem.* **84**, 158 (1980).
34. Besseling, N.A.M. *Langmuir.* **13**, 2113 (1997).
35. Betton, F. Theretz, A. Elaissari, A. Pichot, C. *Colloids Surfaces.* **1**, 97 (1993).
36. Bezot, P. Hesse-Bezot, C. Rousset, B. Diraison, C. *Colloids Surfaces A.* **97**, 53 (1995).
37. Bijsterborch, B.H. *Colloid Polym. Sci.* **256**, 343 (1978).
38. Binning, G. Quate, C.F. Gerger, C. *Phys. Rev. Letter.* **56**, 930 (1986).
39. Buijs, J. van den Berg, A.W. Lichtenbelt, J.W.Th. Norde, W. Lyklema, J. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* **5**, 11 (1995).
40. Buijs, J. van den Berg, A.W. Lichtenbelt, J.W.Th. Norde, W. Lyklema, J. *J. Colloid Interface Sci.* **178**, 594 (1996).
41. Buijs, J. White, D.D. Norde, W. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* **8**, 239 (1997).
42. Bollet, G. Cametti, C. Codastefano, P. Tartaglia, P. *Phys. Rev. A.* **35**, 837 (1987).
43. Borque, L. *Boletín Bibliográfico Behring*, **6**, 13 (1992).
44. Borque, L. Rus, A. "Inmunoanálisis de micropartículas. Fundamentos y aplicaciones". Beckman Instruments España. 1996.
45. Botet, R. Jullien, R. "Aggregation and fractal aggregates". World Scientific. Singapore, 1987.



46. Bowen, M.S. Broide, M.L., Cohen, R.J. *J. Colloid Interface Sci.* **105**, 617 (1985).
47. Bowen, W.R. Jenner, F. *Adv. Colloids Interface Sci.* **56**, 201 (1995).
48. Breenhaar, W. Brinkman, E. Ellens, D.L. Beugeling, T. Bantjes, A. *Biomaterials.* **5**, 269 (1984).
49. Bremer, L.G.B. van Vliet, T. Walstra, P. *J. Chem. Soc. Faraday Trans 1.* **85**, 3359 (1989).
50. Bremer, L.G.B. Walstra, P. van Vliet, T. *Colloids Surfaces A.* **99**, 121 (1995).
51. Brenner, H. *Chem. Eng. Sci.*, **16**, 242 (1961).
52. Broide, M.L. Tominc, T.M. Saxowsky, M.D. *Phys. Rev. E.* **53**, 6325 (1996).
53. Brown, W. Zhao, J. *Macromolecules.* **26**, 2711 (1993).
54. Brown, W. Zhao, J. *Langmuir.* **10**, 3395 (1994).
55. Buffone, G.J. Savory, J. Hermans, J. *Clin. Chem.* **21**, 1735 (1975).
56. Butkus, M.A. Grasso, D. *J. Colloid Interface Sci.* **200**, 172 (1998).
57. Cahill, J. Cummins, P.G. Staples, E.J. Thompson, L. *J. Colloid Interface Sci.* **117**, 406 (1987).
58. Callejas-Fernández, J. Martínez-García, R. Hidalgo-Álvarez, R. de las Nieves, F.J. *Colloids Surfaces A.* **66**, 129 (1992).
59. Cametti, C. Codastefano, P. Tartaglia, P. *J. Colloid Interface Sci.* **131**, 409 (1989).
60. Candau, F. Ottewill, R.H. "An introduction to polymer colloids". NATO ASI Series C. Vol. 303. Klumer Academic Publishers. 1990.
61. Carmona-Ribeiro, A.M. *J. Phys. Chem.* **97**, 11843 (1993).
62. Carpineti, M. Ferri, F. Giglio, M. Paganini, E. Perini, U. *Phys. Rev. A.* **42**, 7347 (1990).
63. Carrique, F. "Estudio de la estabilidad de suspensiones de colesterol y de poliestireno monodisperso". Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada. 1989.
64. Chabalgoity-Rodríguez, A. Martín-Rodríguez, A. Galisteo-González, F. Hidalgo-Álvarez, R. *Progr. Colloid Polym. Sci.* **84**, 416 (1991).
65. Chan, B.M.C. Brash, J.L. *J. Colloid Interface Sci.* **84**, 263 (1981).
66. Chapel, J.P. *Langmuir.* **10**, 4237 (1994).
67. Chapman, D.L. *J. Phylos. Mag.*, **25** (6), 475 (1913).

68. Charleux, B.V. Graillat, C. Chevalier, Y. Pichot, C. Revillon, A. *Colloid Polym Sci.* **269**, 398 (1991).
69. Chow, R.S. Takamura, K. *J. Colloid Interface Sci.* **125**, 226 (1988).
70. Chow, R.D. *Colloids and Surfaces.* **61**, 241 (1991).
71. Christenson, H.K. Claesson, P.M. *Science.* **239**, 390 (1988).
72. Chu, B. "*Laser Light Scattering*" (Second Edition). Academic Press. San Diego. 1991.
73. Churaev, N.V. Derjaguin, B.V. *J. Colloid Interface Sci.* **103**, 542 (1985).
74. Churaev, N.V. "*Uspekhi Kolloidnoj Khimii*". FAN. Tashkent. pp. 70-78, 1987.
75. Cobble, J.W. Murray, R.C. *Faraday Disc.* **64**, 144 (1977).
76. Cotton, F.A. Wilkinson, G. "*Advanced Inorganic Chemistry*". Ed. John Wiley & Sons. New York. 1988.
77. Cowell, C. Li-In-Om, R. Vincent, B. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I.* **74**, 337 (1978).
78. Cowell, C. Vincent, B. *J. Colloid Interface Sci.* **87**, 518 (1982).
79. Cowell, C. Vincent, B. *J. Colloid Interface Sci.* **95**, 573 (1983).
80. Craig, V.S.J. *Colloids Surfaces A.* **129**, 75 (1997).
81. Craine, J. *Am. Biotechm. Laboratory.* **34**, 41 (1987).
82. Csempez, F. Rohrsetzer, S. *Colloids Surfaces.* **31**, 215 (1988).
83. Curtisy, A.S.G. Hocking, L. *Trans. Faraday Soc.* **66**, 138 (1970).
84. Czarnecki, J. Dadros, T. *J. Colloid Interface Sci.* **78**, 25 (1980).
85. Dandliker, W.B. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 4110 (1950).
86. Davey, C. Newman, D.J. Price, C.P. Ortega, J.L. de las Nieves, J.L. Hidalgo, R. Acción integrada Hispano-Británica 247 B. 1993-94.
87. De las Nieves, F.J. Daniels, E.S. y El-Aasser, M.S. *Colloids and Surfaces.* **60**, 107 (1991).
88. De Steenwinkel, F. Collet-Casart, D. Masson, D.L. European Patent 0038181 A2: 1981.
89. De tar, D.F. Silverstein, R. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 1013 (1966).
90. Delgado, J.M. Peula, J.M. Martínez, R. Callejas, J. *J. Colloid Interface Sci.* **189**, 58 (1997).

91. Depasse, J. Watillon, A. *J. Colloid Interface Sci.* **33**, 430 (1970).
92. Derjaguin, B.V. *Kolloid-Z.* **69**, 155 (1934).
93. Derjaguin, B.V. Landau, L.D. *Acta Physicochim. URSS* **14**, 633 (1941).
94. Derjaguin, B.V. *Dokl. Akad. Nauk. SSR.* **109**, 967 (1956).
95. Derjaguin, B.V. Muller, V.M. *Dokl. Akad. Nauk. SSR.* **176**, 869 (1967).
96. Derjaguin, B.V. Y. Radinovich, Churaev, N.V. *Adv. Colloid Interface Sci.* **16**, 63 (1982).
97. Derjaguin, B.V. Churaev, N.V. *Colloids Surfaces.* **41**, 223 (1989).
98. Desnuelle, P. *VI<sup>th</sup> Intern. Congress Surface Active Substances.* Zurich, Proceeding I. Carl Hanser Verlag, München, p. 21.
99. Dhont, J.K.G. *"An Introduction to Dynamic of Colloids"*. Elsevier, 1996.
100. Dimon, P. Sinka, S.K. Weitz, D.A. Safinya, C.R. Smith, G.S. Varady, W.A. Lindsay, H.M. *Phys. Rev. Lett.* **57**, 595 (1986).
101. Donath, E. Pastuchenko, V. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **6**, 543 (1979).
102. Ducker, W.A. Senden, T.J. Pashley, R.M. *Nature.* **353**, 2239 (1991).
103. Duckworth, R.M. Lips, J. *J. Colloid Interface Sci.* **64**, 311 (1978).
104. Dukhin, S.S. Semenikhin, N.M. *Kolloidn. Zh.* **31**, 36 (1970).
105. Dukhin, S.S. Derjaguin, B.V. *Surface and Colloid Sci.* **7**, 274 (1974).
106. Duncan, T. Engelberth, L. LaBrash, B. *J. Clin. Immunoassay.* **14**, 105 (1991).
107. Dupré, A. *"Theorie Mecanique de la Chaleur"*. p. 367. Gauthier-Villars, Paris. 1869.
108. Dzyaloshinskii, I.E. Litshitz, E.M. Pitaevskii, L.P. *Adv. Phys.* **10**, 165 (1961).
109. Edsall, J.T. McKenzie, H.A. *Adv. Biophys.* **16**, 53 (1983).
110. Edwards, J. Everett, D.H. O'Sullivan, T. Panpalou, I. Vincent, B. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I.* **80**, 2599 (1984).
111. Eisen, H.N. *"Immunology"*. Harper and Row. New York. (1974).
112. Elgersma, A.V. Zsom, R.L.J. Norde, W. Lyklema, J. *J. Colloid Interface Sci.* **138**, 145 (1990).
113. Elgersma, A.V. Zsom, R.L.J. Norde, W. Lyklema, J. *Colloids Surfaces.* **54**, 89 (1991).

114. Elgersma, A.V. Zsom, R. Lyklema, J. Norde, W. *J. Colloid Interface Sci.* **152**, 410 (1992).
115. Elimelech, M. O'Melia, C.R. *Colloids and Surfaces.* **44**, 165 (1990a).
116. Elimelech, M. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **86**, 1623 (1990b).
117. Elimelech, M. Gregory, J. Jia, X. Williams, R. "Particle Deposition & Aggregation", Ed. Butterworth Heinemann. 1995.
118. Feder, J. Jossang, T. Rosenqvist, E. *Phys. Rev. Lett.* **53**, 1403 (1984).
119. Feng, M. Berdugo, A. Poot, A. Beugeling, T. Bantjes, A. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 7*, 415 (1995).
120. Feke, D.L. Prabhu, N.D. Mann, J.A. *J. Phys. Chem.* **88**, 5735 (1984).
121. Feke, D.L. Schowalter, W.R. *J. Colloid Interface Sci.* **106**, 203 (1985).
122. Feng, M. Berdugo, A. Poot, A. Beugeling, T. Bantjes, A. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 7*, 415 (1995).
123. Fernández-Barbero, A. Martín-Rodríguez, A. Callejas-Fernández, J. Hidalgo-Álvarez, R. *J. Colloid Interface Sci.* **162**, 257 (1994).
124. Fernández-Barbero, A. Cabrerizo-Vílchez, M. Martínez-García, R. Hidalgo-Álvarez, R. *Phys. Rev. E.* **53**, 4981 (1996).
125. Fernández-Barbero, A. Schmitt, A. Cabrerizo, M.A. Martínez, R. Hidalgo, R. *Phys. Rev. E.* **56**, 4337 (1997).
126. Fitch, R.M. "Polymer colloids: a comprehensive introduction". Academic Press. New York. 1997.
127. Forrest, S.R. Witten, T.A. *J. Phys. A.* **12**, L109 (1979).
128. Fowkes, F.M. "Physico-Chemical Aspects of Polymer Sciences". Vol. 2, K.L. Mittal, De. Plenum, New York. 1983.
129. Franks, F. "Water a comprehensive treatise". Plenum Press. New York. 1973.
130. Frens, G. Overbeek, J.Th.G. *J. Colloid Interface Sci.* **36**, 286 (1971).
131. Frens, G. Overbeek, J.Th.G. *J. Colloid Interface Sci.* **38**, 376 (1972).
132. Frens, G. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **65**, 146 (1978).
133. Freundlich, H. *Colloid and Capillary Chemistry.* Methuen. London. 1926.
134. Frolov, Y.H. Shabanova, N.A. Savochkina, T.V. *Kolloidn. Zh.* **45**, 509 (1983).
135. Fuchs, N. *Z. Phys.* **89**, 736 (1934).

136. Galisteo F. "Adsorción de proteínas sobre modelos coloidales". Tesis Doctoral. Universidad de Granada, 1992.
137. Galisteo-González, F. Puig, J. Martín-Rodríguez, A. Serra-Domenech, J. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*. **2**, 435 (1994).
138. Galisteo-González, F. Norde, W. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*. **4**, 389 (1995).
139. Galisteo, F. Norde, W. *J. Colloid Interface Sci.* **172**, 502 (1995).
140. Gekko, K. Hasegawa, Y. *Biochemistry*. **25**, 6563 (1986).
141. Gella, F. Serra, J. Gener, J. *J. Pure and Appl. Chem.* **63**, 1131 (1991).
142. Glasgow, L.A. Liu, X. *AIChE. J.* **37**, 1411 (1991).
143. Goldstein, B. Zimm, B.H. *J. Chem. Phys.* **54**, 4408 (1971).
144. Goers, J.W.F. "Immunochemical Techniques; Laboratory Manual". Academic Press. San Diego. CA. p. 137. 1993.
145. Goodwin, J.W. Hearn, J. Ho, C.C. y Otewill R.H. *Colloid Polymer Sci.* **252**, 464 (1974).
146. Goossens, J.W.S. Zembrod, A. *J. Dispersion Sci. Tech.* **2**, 255 (1981).
147. Goossens, J.W.S. Zembrod, A. *Colloid Polym. Sci.* **257**, 437 (1979).
148. Gouy, G. *J. Phys. Radium*. **9**, 457 (1910).
149. Grabbe, A. Horn, R.G. *J. Colloid Interface Sci.* **157**, 375 (1993).
150. Grand, M.L. Saville, D.A. *J. Phys. Chem.* **98**, 10358 (1994).
151. Grange, J. Roch, A.M. Quash, G.A. *J. Immunol. Methods*. **18**, 365 (1977).
152. Gregory, J. *J. Colloid Interface Sci.* **83**, 138 (1981).
153. Gregory, J. Nelson, D. *Colloids Surfaces*. **18**, 175 (1986).
154. Gruen, D.W. Marcelja, R. Pailthorpe, B.A. *Chem. Phys. Lett.* **82**, 315 (1981).
155. Gruen, D.W. Marcelja, R. Pailthorpe, B.A. *Adv. Colloid Interface Sci.* **16**, 79 (1982).
156. Gruen, D.W. Marcelja, R. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2.* **79**, 225 (1983).
157. Grygiel, W. Starzak, M. *J. Lum.* **63**, 47 (1995).
158. Griffin, W.G. Griffin, M.C.A. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **89**, 2879 (1993).
159. Haeckel, R. *J. Automatic Chem.* **13**, 53 (1991).
160. Hager, H. Patente U.S. N° 3.857.391. (1974).

161. Hamaker, H.C. *Rec. Trav. Chim.* **55**, 1015 (1936).
162. Hamaker, H.C. *Rec. Trav. Chim.* **56**, 727 (1937).
163. Hardy, W.B. *Proc. R. Soc. Lond.* **66**, 110 (1900).
164. Hatton, W.P. McFadayen, P.F. Smith, A.L. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I.* **70**, 655 (1974).
165. Haynes, C.A. Norde, W. *J. Colloid Interface Sci.* **169**, 313 (1995).
166. Healy, T.W. La Mer, V.K. *J. Phys. Chem.* **66**, 1835 (1962).
167. Heidelberger, M. Kendall, F.W. *J. Exp. Med.* **62**, 467 (1935).
168. Herman, M.C. Papadopoulos, K.D. *J. Colloid Interface Sci.* **136**, 385 (1990).
169. Herman, M.C. Papadopoulos, K.D. *J. Colloid Interface Sci.* **142**, 331 (1991).
170. Herrington, T.M. Midmore, B.R. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1.* **85** (10), 3529 (1989).
171. Hidalgo-Álvarez, R. Moleon, J.A. de las Nieves, F.J. Bijsterbosch, B.H. *J. Colloid Interface Sci.* **149**, 23 (1992).
172. Hidalgo-Álvarez, R. Galisteo-González, F. *Heterogeneous Chem. Rev.* **2**, 249 (1995).
173. Hidalgo-Álvarez, R. Martín, A. Fernández, A. Bastos, D. Martínez, F. de las Nieves, F.J. *Adv. Colloid Interface Sci.* **67**, 1 (1996).
174. Hiemenz, P.C. Rajagopalan, R. "Principles of Colloid and Surface Chemistry". Marcel Dekker Inc. 1997.
175. Higashitani, K. Kondo, M. Hatade, S. *J. Colloid Interface Sci.* **142**, 204 (1991).
176. Higuchi, W.J. Okada, R. Stelter, A. Lemberger, P. *J. Pharm. Sci.* **52**, 49 (1963).
177. Hoekstra, L.L. Vreeker, R. Agterof, W.G.M. *J. Colloid Interface Sci.* **151**, 17 (1992).
178. Hogg, R. Yang, K.C. *J. Colloid Interface Sci.* **56**, 573 (1976).
179. Hogg, R. *J. Colloid Interface Sci.* **102**, 232 (1984).
180. Holthoff, H. Schmitt, A. Fernández, A. Borkovec, M. Cabrerizo, M.A. Schurtenberger, P. Hidalgo, R. *J. Colloid Interface Sci.* **192**, 463 (1997).
181. Homola, A. James, R.O. *J. Colloid Interface Sci.* **59**, 123 (1977).
182. Honing, E.P. Roebersen, G.J. Wiersema, P.H. *J. Colloid Interface Sci.* **36**, 97 (1971).

183. Horikawa, Y. Murray, R.S. Quirk, J.P. *Colloids and Surfaces*. **32**, 181 (1988).
184. Horn, R.G. Smith, D.T. Haller, W. *Chem. Phys. Lett.* **162**, 404 (1989).
185. Hórvölgyi, Z. Máté, M. Zrínyi, M. *Colloids Surfaces*. **60**, 79 (1991).
186. Hórvölgyi, G. Medveczky, G. Zrínyi, M. *Colloid Polym. Sci.*, **271**, 396 (1993).
187. Hórvölgyi, Z. Máté, M. Zrínyi, M. *Colloids Surfaces A*. **84**, 207 (1994).
188. Hough, D.B. White, L.R. *Advan. Colloid Interface Sci.* **14**, 3 (1980).
189. Huang, Y.H. Li, Z.M. y Morawetz, H. *J. Polym. Sci.* **23**, 795 (1985).
190. Hunter, R.J. "Zeta potential in Colloid Science. Principles and Applications". Academic Press. London. 1981.
191. Hunter, R.J. "Foundations of colloid science". Oxford Univ. Press. Oxford, 1987.
192. Hunter, R.J. "Introduction to modern colloid science". Oxford Univ. Press. Oxford. 1993.
193. Ikewa, S. Kitazima, T. Ikeda, K. World Congress of Pathology. Abstract N° FP-13: 341. Tokyo, October 1983.
194. Israelachvili, J.N. Tabor, D. *Proc. R. Soc. London. Ser A*. **331**, 19 (1972).
195. Israelachvili, J.N. Adams, G.E. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*. **74**, 975 (1978).
196. Israelachvili, J.N. *Science*. **300**, 341 (1982).
197. Israelachvili, J.N. Pashley, R.M. *J. Colloid Interface Sci.* **98**, 500 (1984).
198. Israelachvili, J.N. "Intermolecular and Surface Forces". Academic Press. New York. 1991.
199. Jayasuriya, R.M. El-Aasser, M.S. Vanderhoff, J.W. *J. Polymer Sci.* **23**, 2819 (1985).
200. Jeffrey, G.C. Ottewill, R.H. *Colloid Polymer Sci.* **266**, 173 (1988).
201. Jeffrey, G.C. Ottewill, R.H. *Colloid Polymer Sci.* **268**, 179 (1990).
202. Johnson, J.E. Matijevic, E. *Colloid Polym. Sci.* **270**, 353 (1992).
203. Jönsson, U. Lundström, I. Rönnerberg, I. *J. Colloid Interface Sci.* **117**, 127 (1987).
204. Jullien, R. Botet, R. Mors, P.M. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **83**, 125 (1987).
205. Kamel, A.A. Ma, C.M. El-Aasser, M.S. Micale, F.J. Vanderhoff, J.W. *J. Disp. Sci. Tech.* **2**, 315 (1981).
206. Kapmeyer, W.H. Pauly, H.E. Tuengler, J. *Clin. Lab. Anal.* **2**, 76 (1988).
207. Kapmeyer, W.H. *Pure Appl. Chem.* **63**, 1135 (1991).

208. Kerker, M. *"The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation"*. Academic Press. New York. 1969.
209. Kleijn, M. Norde, W. *Heterogeneous Chem. Rev.* **2**, 157 (1995).
210. Klein, R. Weitz, D.A. M.Y. Lin, Lindsay, H.M. Ball, R.C. Meakin, P. *Prog. Colloid Polym. Sci.* **8**, 161 (1990).
211. Kihira, H. Ryde, N. Matijevic, E. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **88**, 2379 (1992).
212. Killingsworth, L.M. Savory, J. *Clin. Chem.* **17**, 936 (1971).
213. Kim. K. Kauzmann, W. *J. Phys. Chem.* **84**, 163 (1980).
214. Kimura, H. *J. Immunol. Methods.* **38**, 353 (1980).
215. Kitano, H. Iwai, S. Okubo, T. Ise, N. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 7608 (1987).
216. Kohen, F. Amir-Zaltzman, Y. Strasburger, C.J. Bayer, E.A. Wilchek, M. *"The avidin-biotin reaction in immunoassays"*. En Collins W.P. ed. *Complementary Immunoassays*. Chichester. John Wiley & Sons. 57-69 (1988).
217. Kolb, M. Botet, R. Jullien, R. *Phys. Rev. Lett.* **51**, 1123 (1983).
218. Kolthoff, I.M. y Miller, I.K. *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 3055 (1951).
219. Koning, B.L.J.C. Pelssers, E.G.M. Verhoeven, A.J.C.M. Kamps, K.M.P. *Colloids Surface B.* **1**, 69 (1993).
220. Kondo, A. Oku, S. Higashitani, K. *J. Colloid Interface Sci.* **143**, 214 (1991).
221. Koopal, L.K. Van Riemsdijk, W.H. *J. Colloid Interface Sci.* **128**, 188 (1989).
222. Kotera, A. Furusawa, F. Kudo, K. *Kolloid Z.Z. Polym.* **240**, 837 (1970).
223. Koutsoukos, P.G. Mumme, Y.C.A. Norde, W. Lyklema, J. *Colloids Surfaces.* **5**, 93 (1982).
224. Kruyt, H.R. van Arkel, E. *Trav. Chim. Pays-Bas.* **39**, 656 (1920).
225. Kruyt, H.R. van Arkel, E. *Trav. Chim. Pays-Bas.* **40**, 169 (1921).
226. Kuin, J.A. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **90**, 235 (1990).
227. Kumar, A. Beysens, D. *Physica A.* **224**, 68 (1996).
228. Kushner, I. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **82**, 39 (1982).
229. Labid, M.E. y Robertson, A.A. *J. Colloid Interface Sci.* **77**, 151 (1980).
230. Lafuma, F. Wong, K. Cabane, B. *J. Colloid Interface Sci.* **143**, 9 (1991).
231. Lee, R.G. Adamson, C. Kim, S.W. Lyman, D.J. *Thrombosis Res.* **3**, 87 (1973).
232. Lee, S.H. Ruckenstein, E. *J. Colloid Interface Sci.* **125**, 365 (1987).



233. Lehtonen, O.P. Viljamen, M.K. *J. Immunol. Methods.* **34**, 60 (1980).
234. Leikin, S. Kornyshev, A.A. *J. Chem. Phys.* **92**, 6890 (1990).
235. Leikin, S. Parsegian, A. Rau. D.C. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **44**, 369 (1993).
236. LeNeveu, D.M. Rand, R.P. Parsegian, V.A. *Nature.* **259**, 601 (1976).
237. Lessard, R.R. Zieminski, S.A. *Ind. Eng. Chem. Fundam.* **10**, 260 (1971).
238. Levine, S. Levine, M. Sharp, K.A. Brooks, D.E. *Biophys. J.* **42**, 127 (1983).
239. Lichtenfeld, J.W.Th. Heuvelsland, W.J. Oldenzeel, M.E. Zsom, R.L. *Colloid Surfaces B: Biointerfaces.* **1**, 75 (1993).
240. Lichtenfeld, H. Knapschinsky, L. Sonntag, H. Shilov, V. *Colloids Surfaces A.* **104**, 313 (1995).
241. Lichtenfeld, A. Shilov, H. Knapschinsky, L. *Colloid Surface A.* **142**, 155 (1998).
242. Limet, J.N. Moussebois, C.H. Cambiaso, C.L. Vaerman, J.P. Mason, P.L. *J. Immunol. Methods.* **28**, 25 (1979).
243. Lin, M.Y. Lindsay, H.M. Weitz, D.A. Ball, R.C. Klein, R. Meakin, P. *Nature.* **339**, 360 (1989).
244. Lin, M.Y. Lindsay, H.M. Weitz, D.A. Ball, R.C. Klein, R. Meakin, P. *Phys. Rev. A.* **41**, 2005 (1990a).
245. Lin, M.Y. Klein, R. Lindsay, H. M. Weitz, D.A. Ball, R.C. Meakin, P. *J. Colloid Interface Sci.* **137**, 263 (1990b).
246. Lindsay, H.M. Klein, R. Weitz, D.A. Lin, M.Y. Meakin, P. *Phys. Rev. A.* **39**, 3112 (1989).
247. Lips, A. Willis, E. *Trans. Faraday Soc.* **67**, 2979 (1971).
248. Lips, A. Willis, E. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **69**, 1226 (1973).
249. Litchfield, W.J. Craig, A.R. Frey, W.A. Leflar, C.C. Looney, C.E. Luddy, M.A. *Clin.Chem.* **30**, 1489 (1984).
250. Litshitz, E.M. *Sov. Phys. JETP.* **2**, 73 (1956).
251. Litton, G.M. Olson, T.M. *Colloids Surfaces A.* **107**, 273 (1996).
252. Lloyd, T.B. *Colloids Surfaces A.* **93**, 25 (1994).
253. Loeb, A.L. Wiersema, P.H. Overbeek, J.Th.G. "The electrical double layer around a spherical colloid particle". MIT Press. Cambridge, Mass. 1961.
254. London, F. *Z. Phys.* **89**, 736 (1934)

255. Lu, D. Lee, S. Park, K. "Bookhaven Protein Data Bank". 1991.
256. Lu, D. Lee, S.J. Park, K. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **3**, 127 (1992).
257. Lyklema, J. Overbeek, J.Th.G. *J. Colloid Interface Sci.* **15**, 501 (1961).
258. Lyklema, J. Norde, W. *Progr. Colloid Polym. Sci.* **101**, 9 (1996).
259. Mahanty, J. Ninham, B.W. "Dispersion Forces". Academic, London. 1976.
260. Majolino, D. Mallamace, F. Migliardo, P. Micali, N. Vasi, C. *Phys. Rev. A.* **40**, 4665 (1989).
261. Malmsten, M. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* **3**, 297 (1995).
262. Mandelbrot, B.B. *J. Fluid. Mech.* **62**, 331 (1974).
263. Mandelbrot, B.B. *Annals New York Acad. Sci.* **357**, 249 (1980).
264. Mandelbrot, B.B. "The fractal geometry of nature". Freeman, San Francisco. 1982.
265. Mandelbrot, B.B. "Fractals in Physics". L. Pietronero and E. Tosatti. Elsevier, Amsterdam, 1986.
266. Marcelja, S. Radic, N. *Chem. Phys. Lett.* **42**, 129 (1976).
267. Marchand, J. Varcin, P. Riochet, D. *Biopolymers.* **22**, 971 (1992).
268. Margel, S. y Offarin, M. *Anal. Biochem.* **128**, 342 (1982).
269. Margel, S. Nov, E. y Fisher, I. *J. Polym. Sci. Part A.* **29**, 347 (1991).
270. Marmur, A. *J. Colloid Interface Sci.* **72**, 41 (1979).
271. Maron, S.H. Pierce, P.E. Elder, M. *J. Colloid Interface Sci.* **18**, 391 (1963).
272. Martin, Y. Abraham, D.W. Wickramasinghe, H.K. *Appl. Phys. Lett.* **52**, 1103 (1988).
273. Martin, J.E. Wilconxon, J.P. Schaefer, D. Odinek, J. *Phys. Rev. A.* **41**, 4379 (1990).
274. Martin, J.E. Ackerson, B.J. *Phys. Rev. A.* **31**, 1180 (1985).
275. Martín Rodríguez, A. Puig, J. Galisteo, F. Serra, J. Hidalgo Álvarez, R. *J. Dispersion Sci. & Technol.* **13**, 399 (1992).
276. Martín Rodríguez, A. "Síntesis, caracterización y aplicaciones de coloides poliméricos funcionalizados". Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1993.
277. Martín, A. Cabrerizo, M.A. Hidalgo, R. *Colloids Surfaces.* **92**, 113 (1994).

278. Martín-Rodríguez, A. Carbrerizo-Vílchez, M. Hidalgo-Álvarez, R. *An. Física.* **91**, 100 (1995).
279. Marquart, M. Deisenhofer, J. Huber, R. Palm, W. *J. Mol. Biol.* **141**, 369 (1980).
280. Marumoto, K. Suzuta, T. Noguchi, H. Uchida, I. *Polymer.* **19**, 867 (1978).
281. Mathai K.G. and Ottewill R.H., *Trans. Faraday Soc.* **62**, 759 (1966).
282. Matthews, B.A. Rhodes, C.T. *J. Pharm. Sci.* **57**, 558 (1967).
283. Matthews, B.A. Rhodes, C.T. *J. Colloid Interface Sci.* **32**, 332 (1970).
284. Matijevic, K.G. Mathal, R.H. Otewill and M. Kerker, *J. Phys. Chem.* **65**, 826 (1961).
285. Matijevic, K.G. Allen, L.H. *J. Colloid Interface Sci.* **31**, 287 (1969).
286. McGown D.N.L. Partiff, G.D. *J. Phys. Chem.* **71**, 449 (1967).
287. McRitchie, F. *Adv. Prot. Chem.* **32**, 283 (1978).
288. McTaggart, H.A. *Phil. Mag.* **27**, 297 (1914).
289. Meagher, L. *J. Colloid Interface Sci.* **152**, 293 (1992).
290. Meakin, P. *Phys. Rev. A.* **27**, 604 (1983a).
291. Meakin, P. *Phys. Rev. A.* **27**, 1495 (1983b).
292. Meakin, P. *J. Chem. Phys.* **79**, 2426 (1983c).
293. Meakin, P. *Phys, Rev. Lett.* **51**, 1119 (1983d).
294. Meakin, P. *Adv. Colloid Interface Sci.* **28**, 249 (1988).
295. Medcalf, E.A. Newman, D.J. Gilboa, A. Price, C.P. *J. Immunol. Methods.* **129**, 97 (1990).
296. Melik, D.K. Fogler, H.S. *J. Colloid Interface Sci.* **12**, 161 (1983).
297. Meyer, G. Amer, N.M. *Appl. Phys. Lett.* **53**, 1045 (1988).
298. Midmore, B.R. Hunter, R.J. *J. Colloid Interface Sci.* **122**, 521 (1988).
299. Mie, G. *Ann. Physik.* **25**, 377 (1908).
300. Miraballes-Martínez, I. Martín-Rodríguez, A. Hidalgo-Álvarez, R. *J. Dispersion Sci. and Technology.* **17**, 321 (1996).
301. Modi, H.J. Fuerstenau, D.W. *J. Phys. Chem.* **61**, 640 (1957).
302. Molina, F.J. Hernández, F. Enguinos, S. *An. Quim.* **85**, 186 (1989).
303. Molina-Bolívar, J.A. Galisteo-González, F. Hidalgo-Álvarez, R. *J. Immunol. Methods.* **211**, 87 (1998).

304. Molina-Bolivar, J.A. "Seguimiento nefelométrico de procesos de agregación de látex cloroactivado". Memoria de Licenciatura. 1995. Universidad de Granada.
305. Montagne, P. Laroche, P. Cuilliere, M.L. Riochet, D. Flecheux, O. Varcin, P. Mrchand, J. Pau, B. Duheille, J. *J. Immunoassay*. **12**, 165 (1991).
306. Montagne, P. Laroche, P. Cuilliere, M.L. Varcin, P. Pau, B. Duheille, J. *J. Clin. Lab. Anal.* **6**, 24 (1992).
307. Montagne, P. Varcin, P. Cuilliere, M.L. Duheille, J. *Bioconjugate. Chem.* **3**, 187 (1992a).
308. Moudgil. B.M. Shah, B.D. Soto, H.S. *J. Colloid Interface Sci.* **119**, 466 (1987).
309. Mühle, K. Domasch, K. *Cem. Eng. Process.* **29**, 1 (1991).
310. Mühle, K. "Coagulation and flocculation, theory and applications". ed. Dobiás, B. Marcel Dekker, New York. 355. 1993.
311. Muller, V.M. *Kolloidn. Zh.* **40**, 885 (1978).
312. Muller, V.M. *J. Colloid Interface Sci.* **136**, 61 (1990).
313. Muratsugu, M. Kurosawa, S. Kamo, N. *J. Colloid Interface Sci.* **147**, 378 (1991).
314. Nakamura, M. Oshima, H. Kondo, T. *J. Colloid Interface Sci.* **154**, 393 (1992).
315. Nakamura, M. Oshima, H. Kondo, T. *J. Colloids and Surfaces A.* **81**, 281 (1993).
316. Napper, D.H. *J. Colloid Interface Sci.* **33**, 384 (1970).
317. Negre, M. Bartholin, M. Guyot, A. *Makromol. Chem.* **80**, 19 (1979).
318. Newman, D.J. Henneberry, H. Price, C.P. *Ann. Clin. Biochem.* **29**, 22 (1992).
319. Newman, D. Henneberry, H. Price, C. *Am. Clin. Biochem.* **29**, 22 (1992).
320. Niveleau, A. Sage, D. Reynard, C. Bruno, C. Legastelois, S. Thomas, V. Dante, R. *J. Immunol. Methods.* **159**, 177 (1993).
321. Norde, W. Lyklema, J. *J. Colloid Interface Sci.* **66**, 277 (1978).
322. Norde, W. Lyklema, J. *J. Colloid Interface Sci.* **71**, 350 (1979).
323. Norde, W. *Adv. Colloid Interface Sci.* **25**, 267 (1986a).
324. Norde, W. MacRitchie, F. Nowicka, G. Lyklema, J. *J. Colloid Interface Sci.* **112**, 447 (1986b).
325. Norde, W. Takaaki, A. Shiraham, H. *Biofouling.* **4**, 37 (1991).
326. Norde, W. *Clinical Materials.* **11**, 85 (1992a).
327. Norde, W. Favier, J.P. *Colloids Surfaces.* **64**, 87 (1992b).

328. Norde, W. Galisteo-González, F. Haynes, C.A. *Polymers Adv. Technologies*. **6**, 518 (1994).
329. Norde, W. *Cells and Materials*. **5**, 97 (1995).
330. Oenick, M.D.B. Warshawsky, A. *Colloid Polym. Sci.* **269**, 139 (1991).
331. Ofoli, R.Y. *Initial rate of flocculation of polystyrene latexes: effects of surface annealing and a distribution in surface potential*. Ph. D. thesis. Carnegie Mellon University. 1994.
332. Ohshima, H. Ohki, S. *Biophys. J.* **47**, 673 (1985).
333. Ohshima, H. Kondo, T. *Colloid Polym. Sci.* **264**, 1080 (1986).
334. Ohshima, H. Kondo, T. *J. Colloid Interface Sci.* **116**, 305 (1987).
335. Ohshima, H. Kondo, T. *J. Colloid Interface Sci.* **130**, 281 (1989).
336. Ohshima, H. Kondo, T. *Biophys. Chem.* **39**, 191 (1991).
337. Ohshima, H. Nakamura, M. Kondo, T. *Colloid Polym. Sci.* **270**, 873 (1992).
338. Okubo, M. Yamamoto, Y. Uno, M. Kamei, S. Matsumoto, T. *Colloid Polym. Sci.* **265**, 1061 (1987).
339. Onoda, G.Y. *Phys. Rev. Lett.* **55**, 226 (1985).
340. Ortega-Vinuesa, J.L. Hidalgo-Álvarez, R. *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces*. **1**, 365 (1993).
341. Ortega-Vinuesa, J.L. Hidalgo-Álvarez, R. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* **6**, 269 (1994).
342. Ortega-Vinuesa, J.L. Hidalgo-Álvarez, R. *Biotechnol. Bioeng.* **47**, 633 (1995).
343. Ortega-Vinuesa, J.L. "Estabilidad coloidal de interfases estructuradas: aplicación a inmunosensores". Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1995a.
344. Ortega-Vinuesa, J.L. Martín-Rodríguez, A. Hidalgo-Álvarez, R. *Colloids Surfaces A*. **95**, 261 (1995b).
345. Ortega-Vinuesa, J.L. Bastos-González, D. Hidalgo-Álvarez, R. *J. Colloid Interface Sci.* **176**, 240 (1995c).
346. Ortega-Vinuesa, J.L. Gálvez-Ruiz, M.J. Hidalgo-Álvarez, R. *J. Mater. Sci.* **6**, 754 (1995d).
347. Ortega-Vinuesa, J.L. Gálvez-Ruiz, M.J. Hidalgo-Álvarez, R. *J. Surface. Sci. Technol.* **11**, 59 (1995e).

348. Ortega-Vinuesa, J.L. Gálvez-Ruiz, M.J. Hidalgo-Álvarez, R. *Progr. Colloid Polym. Sci.* **98**, 233 (1995f).
349. Ortega-Vinuesa, J.L. Molina-Bolívar, J.A. Hidalgo-Álvarez, R. *J. Immunol. Methods.* **190**, 29 (1996).
350. Ortega-Vinuesa, J.L. Bastos-González, D. Hidalgo-Álvarez, R. *J. Colloid Interface Sci.* **184**, 331 (1996a).
351. Ortega-Vinuesa, J.L. Tengvall, P. Lundström, I. *J. Colloid Interface Sci.* **207**, 228 (1998a).
352. Ortega-Vinuesa, J.L. Tengvall, P. Lundström, I. *Thin Solid Films.* **324**, 257 (1998b).
353. Ortega-Vinuesa, J.L. Hidalgo-Álvarez, R. de las Nieves, F.J. Davey, C.L. Newman, D.J. Price, C.P. *J. Colloid Interface Sci.* **204**, 300 (1998c).
354. Osmond, D.W.J. Vincent, B. Waite, F.A. *J. Colloid Interface Sci.* **42**, 262 (1973).
355. Ostrowsky, N. *Chem. Phys. Lipids.* **64**, 45 (1993).
356. Ottewill, R.H. Shaw, J.N. *Disc. Faraday Soc.* **42**, 154 (1966)
357. Ottewill, R.H. Walker, T. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I.* **70**, 917 (1974).
358. Overbeek, J.Th.G. *J. Colloid Interface Sci.* **58**, 2 (1977a).
359. Overbeek, J.Th.G. "Colloid and Interface Science". Vol.I. Plenary and Invited Lectures. Ed. Kerker, M. Zettlemoyer, A.C. Rowel, R.L. Academic Press. 1977b.
360. Overbeek, J.Th.G. *Pure & Appl. Chem.* **52**, 1151 (1980).
361. Overbeek, J.Th.G. *Adv. Colloid Interface Sci.* **16**, 17 (1982).
362. Papenhuijzen, J. Flier, G.J. Bijsterbosch, B.H. *J. Colloid Interface Sci.* **104**, 553 (1985).
363. Parfitt, G.D. "Fundamental Aspects of Dispersions". En "Dispersions of Powders in Liquids". Cap. I. Applied Sciences Publ. Essex. 1981.
364. Parsegian, V.A. *Adv. Colloid Interface Sci.* **16**, 49 (1982).
365. Pashley, R.M. *J. Colloid Interface Sci.* **83**, 153 (1981a).
366. Pashley, R.M. *J. Colloid Interface Sci.* **83**, 531 (1981b).
367. Pashley, R.M. *Adv. Colloid Interface Sci.* **16**, 57 (1982).
368. Pashley, R.M. Israelachvili, J. *J. Colloid Interface Sci.* **97**, 446 (1984a).
369. Pashley, R.M. Quirk, J.P. *Colloids Surfaces.* **9**, 1 (1984b).

370. Paunov, V.N. Dimova, R.I. Kralchevsky, P.A. Broze, G. Mehreteab, A. *J. Colloid Interface Sci.* **182**, 239 (1996).
371. Pecora, R. "*Dynamic Light Scattering*", Ed. Pecora R., Plenum Press, 1985.
372. Penners, N.H.G. Koopal, L.K. *Colloids Surfaces A.* **28**, 67 (1987).
373. Pepys, M.B. "*Immunoassays for the 80's*". MTP Press. Lancaster, England. pp. 341-352. 1981.
374. Peshel, G. Belouschek, P. Müller, M. Müller, R. Köning, R. *Colloid Polym Sci.* **260**, 441 (1982).
375. Petch, I. Mazurek, M. Petrank, A. y Margel, S. "*Targeting of Drugs*", Gregoriadis, Senior y Trouet, Plenum, New York, 1982.
376. Peula-García, J.M. "*Adsorción de BSA sobre látex de funcionalidad sulfonato: caracterización y estabilidad del complejo*". Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada. 1992.
377. Peula, J.M. Hidalgo-Álvarez, R. Santos, R. Forcada, J. de las Nieves, F.J. *J. Mater.Sci.* **6**, 779 (1995).
378. Peula, J.M. Fernández-Barbero, A. Hidalgo-Álvarez, R. de las Nieves, F.J. *Langmuir.* **13**, 3938 (1997).
379. Peula, J.M. Hidalgo-Álvarez, R. de las Nieves, F.J. *Colloid Polym. Sci.* **275**, 198 (1997a).
380. Peula, J.M. Santos, R. Forcada, J. Hidalgo-Álvarez, R. de las Nieves, F.J. *Langmuir.* **14**, 6377 (1998).
381. Peula, J.M. Hidalgo-Álvarez, R. de las Nieves, F.J. *J. Colloid Interface Sci.* **201**, 132 (1998a).
382. Peula, J.M. Hidalgo-Álvarez, R. de las Nieves, F.J. *J. Colloid Interface Sci.* **201**, 139 (1998b).
383. Pitt, W.G. Spiegelberg, S.H. Cooper, S.L. "*Proteins at Interfaces: Physicochemical and Biomechanical Studies*". Edited by Brash, J.L. and Horbett, T.A. ACS Series (Amer. Chem. Soc., Washington, DC, 1987). pp. 324-388.
384. Platsoucas, C.D. Wilkins, T.A. Hansen, F.N. Jolley, M.E. Nustad, K. Papamichail, M. Ugelsad, J. Wang, C.J. "*Future directions in polymer colloids*".

- Ed. M.S. El-Aasser y R.M. Fitch. NATO ASI Series E. Applied Sciences. N° 138. NATO. 1987
385. Polverari, M. van de Ven, T.G.M. *Colloids Surf. A.* **86**, 209 (1994).
386. Poncelet, S. Lavenne, E. Limet, J.N. Collet, D. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **28**, 181 (1990).
387. Poot, A. Beugeling, T. van Aken, W.G. Bantjes, A. *J. Biomed. Mater. Res.* **24**, 1021 (1990).
388. Prescott, J.H. Shiau, S. Rowell, R.L. *Langmuir.* **9**, 2071 (1993).
389. Price, C.p. Spencer, K. Whicher, J. *Ann. Clin. Chem.* **20**, 1 (1983).
390. Price, C.P. Newman, D.J. "*Principles and Practice of Immunoassay*". Stockton Press, 1991.
391. Prieve, D.C. Ruckenstein, E. *J. Colloid Interface Sci.* **73**, 539 (1980).
392. Prieve, D.C. Lin, M.J. *J. Colloid Interface Sci.* **86**, 17 (1982).
393. Prieve, D.C. Russel, W.B. *J. Colloid Interface Sci.* **125**, 1 (1988).
394. Privalov, P.L. *Adv. Protein Chem.* **33**, 167 (1979).
395. Puertas, A.M. de las Nieves, F.J. *J. Phys. Condens. Matter* **9**, 3313 (1997).
396. Puertas, A.; Fernández-Barbero, A. de las Nieves, F.J. *J. Colloid Interface Sci.* Enviado para su publicación. 1998.
397. Pynn, R. Skjeltorp, A. Eds., "*Scaling phenomena in disordered system*". Plenum, N.Y. 1986.
398. Rabinovich, Y.I. Derjaguin, B.V. Churaev, N.V. *Adv. Colloid Interface Sci.* **16**, 63 (1982).
399. Rand, R.P. Parsegian, V.A. *Biochim. Biophys. Acta.* **988** (1989).
400. Rapoza, R.J. Horbett, T.A. *J. Colloid Interface Sci.* **136**, 480 (1990).
401. Rayleigh, L. *Philos, Mag.* **47**, 375 (1899).
402. Reerink, H. Overbeek, J.Th.G. *Disc. Faraday Soc.* **18**, 74 (1954).
403. Reckel, R. Harris, J. "*Attachment of proteins to inert particles*". U.S. Patent 4, 140, 662: 1979.
404. Rembaum, A. Yen, R.C.K. Kempner, D.H. y Ugelstad, J. *J. Immunol. Methods*, **52**, 341 (1982).
405. Richmond, P. *J. Chem. Soc. Faraday Trans II.* **70**, 1066 (1974).



406. Richmond, P. Smith, A. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II.* **71**, 468 (1975a).
407. Richmond, P. *J. Chem. Soc. Faraday Trans II.* **71**, 1154 (1975b).
408. Rogak, S.N. Flagan, R.C. *J. Colloid Interface Sci.* **151**, 203 (1992).
409. Romero-Cano, M.S. Martín-Rodríguez, A. de las Nieves, F.J. *J. Colloid Interface Sci.* **198**, 273 (1998a).
410. Romero-Cano, M.S. "Estudio de la estabilización electroestérica de partículas de látex funcionalizadas después de la adsorción de Triton X-100". Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1998b.
411. Romero-Cano, M.S. Martín-Rodríguez, A. de las Nieves, F.J. *Colloids Surfaces A.* **140**, 347 (1998c).
412. Rosen, L.A. Saville, D.A. *J. Colloid Interface Sci.* **149**, 2 (1992).
413. Rubio-Hernández, F.J. *J. Non-Equilib. Thermodyn.* **21**, 153 (1996).
414. Ruckenstein, E. *J. Colloid Interface Sci.* **99**, 270 (1984).
415. Russell, A.S. Scales, P.J. Mangeldorf, Ch. Underwood, S.M. *Langmuir.* **11**, 1112 (1995).
416. Russel, W.B. Saville, D.A. Schowalter, W.R. "Colloidal Dispersion". Cambridge University Press. Cambridge. 1989.
417. Ruzgas, T.A. Razumas, V.J. Kulys, J.J. *J. Colloid Interface Sci.* **151**, 136 (1992).
418. Sadana, A. *Chem. Rev.* **92**, 1799 (1992).
419. Sakuma, S. Ohshima, H. Kondo, T. *J. Colloid Interface Sci.* **133**, 1 (1989).
420. Sakuma, S. Ohshima, H. Kondo, T. *J. Colloid Interface Sci.* **135**, 2 (1990).
421. Salou, M. Siffert, B. Jada, A. *Colloids Surfaces A.* **142**, 9 (1998).
422. Salzman, E.W. *Blood.* **38**, 509 (1971).
423. Sarobe, J. Miraballes, I. Molina, J.A. Forcada, J. Hidalgo-Álvarez, R. *Polym. Adv. Technologies.* **7**, 749 (1996a).
424. Sarobe, J. Forcada, J. *Colloid. Polym. Sci.* **274**, 8 (1996b).
425. Sasaki, S. *Colloid Polym. Sci.* **262**, 406 (1984).
426. Schaefer, D.W. Martin, J.E. *Phys. Rev. Lett.* **52**, 2371 (1984).
427. Schenkel, J. Kitchener, J.A. *Trans. Faraday Soc.* **56**, 161 (1969).
428. Schild, R.L. El-Aasser, M.S. Poehlein, G.W. Vanderhoff, J.W. "Emulsion Latexes and Dispersions". Dekker. New York. 1978.

429. Schmidt, P.W. en D. Avnir (ed.). "The fractal approach to heterogeneous chemistry". Wiley. New York. 1989.
430. Schramm, W. Yang, T. Midgley, A. *Clin. Chem.* **33**, 1338 (1987).
431. Schudel, M. Behrens, S.H. Holthoff, H. Kretzschmar, R. Borkovec, M. *J. Colloid Interface Sci.* **196**, 241 (1997).
432. Schulze, H. *J. Prakt. Chem.* **25**, 431 (1882)
433. Schulze, H. *J. Prakt. Chem.* **27**, 320 (1883).
434. Schuhmann, D. D' Epenoux, B. *J. Colloid Interface Sci.* **116**, 159 (1987).
435. Schuhmann, D. *Phys. Chem. Hydrodynamics.* **5**, 383 (1984).
436. Schurtenberger, P. Newman, M.E. "Environmental particle". (Buffle, J. van Leeuwen, H.P. Eds.). Lewis, Boca Ra. FL. 1993.
437. Seebergh, J.E. Berg, J.C. *Colloids Surfaces A.* **100**, 139 (1995).
438. Seradyn Inc. Procedures. Particle Technology. Microparticle Immunoassay Techniques. Particle Technique Division, 1988.
439. Serra, J. Puig, P. Martin, A. Galisteo, F. Gálvez, M.J. Hidalgo-Álvarez, R. *Colloid Polym Sci.* **270**, 574 (1992).
440. Sharp, K.A. Brooks, D.E. *Biophys. J.* **47**, 563 (1985).
441. Shih, W.Y. Aksay, I.A. Kikuchi, R. *Phys. Rev. A.* **36**, 5015 (1987).
442. Shirahama, H. Takeda, K. Suzawa, T. *J. Colloid Interface Sci.* **109**, 552 (1986).
443. Shirahama, H. Lyklema, J. Norde, W. *J. Colloid Interface Sci.* **139**, 177 (1990).
444. Shulepov, S.Y. Frens, G. *Colloid. J.* **54**, 550 (1995a).
445. Shulepov, S.Y. Frens, G. *J. Colloid Interface Sci.* **170**, 44 (1995b).
446. Shulepov, S.Y. Frens, G. *J. Colloid Interface Sci.* **182**, 388 (1996).
447. Singer, J.M. Plotz, C.M. *Am. J. Med.* **21**, 888 (1956).
448. Singer, J.M. "The latex fixation test in rheumatoid diseases". *Am. J. Med.* **31**, 766 (1961).
449. Skvarla, J. *Mag. Elec. Sep.* **3**, 171 (1992).
450. Smellie, R.H. La Mer, V.K. *J. Colloid Interface Sci.* **23**, 589 (1958).
451. Smith, A.L. *Spec. Discuss. Faraday Soc.*, **1**, 32 (1970).
452. Smoluchowski, M. *Z. Physik. Chem.* **92**, 129 (1917).
453. Soderquist, M.E. Walton, A.G. *J. Colloid Interface Sci.* **74**, 386 (1980).

454. Sonntag, R.C. Russel, W.B. *J. Colloid Interface Sci.* **113**, 399 (1986a).
455. Sonntag, H. Shilov, V. Lichtenfeld, H. Gedan, H. Dürr, C. *Colloids Surfaces.* **20**, 303 (1986b).
456. Sonntag, H. Strenge, K. "Coagulation Kinetics and Structure Formation". Plenum Press. New York. 1987.
457. Spencer, K. Price, C.P. *UV Spectro Group Bull.* **8**, 38 (1981).
458. Spielmann, L. *J. Colloid Interface Sci.* **33**, 562 (1970).
459. Spitzer, J.J. *J. Colloid Interface Sci.* **92**, 198 (1982).
460. Stankiewicz, J. Cabrerizo-Vílchez, M. Hidalgo-Álvarez, R. *Phys. Rev. E.* **47**, 2663 (1993).
461. Starchev, K. Peikov, V. Stoylov, S.P. Petkanchin, I.B. Streb, K.D. Sonntag, H. *Colloids Surfaces A.* **76**, 95 (1993).
462. Stern, O. *Z. Elrktrochem.* **30**, 508 (1924).
463. Stoll, S. Pefferkorn, E. *J. Colloid Interface Sci.* **152**, 247 (1992).
464. Stoll, S. Pefferkorn, E. *J. Colloid Interface Sci.* **175**, 302 (1993).
465. Stoll, S. Buffle, J. *J. Colloid Interface Sci.* **180**, 548 (1996).
466. Stoner, G. Srinivasan, S. *J. Phys. Chem.* **74**, 1088 (1970).
467. Sudo, T. Tsutsui, S. Ito, M. Morita, S. Sawai, M. "Kitasato Archives of Experimental Medicine". Vol. 53 n° 1, 55 (1980).
468. Suen, C.H. Morawetz, H. *Macromolecules.* **17**, 1800 (1984).
469. Suen, C.H. Morawetz, H. *Makromol. Chem.* **186**, 255 (1985).
470. Sundoro, B. "Bifunctional linker". U.S. Patent 4, 680, 338: 1987.
471. Suresh, L. Walz, J.Y. *J. Colloid Interface Sci.* **183**, 199 (1996).
472. Suresh, L. Walz, J.Y. *J. Colloid Interface Sci.* Aceptado para su publicación. (1998).
473. Sutherland, D.N. *J. Colloid Interface Sci.* **22**, 300 (1966).
474. Tadros, Th.F. "Solid/Liquid Dispersion". Academic Press. New York . 1987.
475. Tamai, H. Hasegawa, M. Suzawa, T. *J. Applied Polym Sci.* **38**, 403 (1989).
476. Tan, J.S. Martic, P.A. *J. Colloid Interface Sci.* **136**, 415 (1990).
477. Tanford, C. Roxby, R. *Biochemistry.* **11**, 2192 (1972).

478. Teixeira, J. "Growth and form". Ed. H.E. Stanley, H. Ostrowsky. (Nijhoff, Dordrecht, 1986).
479. Tence, M. Chevalier, J.P. Jullien, R. *J. Phys. (Paris)*. **47**, 1989 (1986).
480. Tendery, R.O.P. *J. Immunol. Methods*. **99**, 126 (1967).
481. Thompson, L. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*. **80**, 1673 (1984).
482. Thompson, D.W. Collins, I.R. *J. Colloid Interface Sci.* **163**, 347 (1994).
483. Tilton, R.D. Robertson, C.R. Gast, A.P. *Langmuir*. **7**, 2710 (1991).
484. Tirado, M. "Escalado espacial y temporal en agregación de sistemas mesoscópicos estudiado mediante dispersión de luz". Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada. 1997.
485. Torres, F.F. Russel, W.B. Schowalter, W.R. *J. Colloid Interface Sci.* **142**, 554 (1991).
486. Tsaur, S.L. y Fitch, R.M. *J. Colloid Interface Sci.* **115**, 450 (1987).
487. Tsuruta, L.R. Lessa, M.M. Carmona-Ribeiro, A.M. *J. Colloid Interface Sci.* **175**, 470 (1995).
488. Tsuruta, L.R. Carmona-Ribeiro, A.M. *J. Phys. Chem.* **100**, 7130 (1996).
489. Tuin, G. Senders, J.H. Stein, H.N. *J. Colloid Interface Sci.* **179**, 522 (1996).
490. Tuorilla, A. *Kolloidchem. Beih.* **22**, 193 (1926).
491. Usui, S. in "Electrical Phenomena at Interfaces". (A. Kitahara and A. Watanabe, Eds.) Surfactant Science Series. Vol. 15. p. 15. Dekker, New York. 1984.
492. Vanderhoff, J.W. van der Hul, H.J. Tansk, R.J. y Overbeek, J.T.G. "Clean surfaces: Their preparation and characterization for interfacial studies". Marcel Dekker. New York. 1970.
493. van de Ven, T.G.M. Mason, S.G. *Colloid Polymer Sci.* **255**, 468 (1977).
494. van de Ven, T.G.M. *Adv. Colloid Interfaces Sci.* **17**, 105 (1982).
495. van der Hul, H.J. y Vandehoff, J.W. *J. Colloid Interface Sci.* **28**, 336 (1968).
496. van der Put, A.G. Bijsterbosch, B.H. *J. Colloid Interface Sci.* **92**, 499 (1983).
497. van der Scheer, M. Tanke, A. Smolders, C. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **65**, 264 (1978).
498. van Dulm, P. Norde, W. Lyklema, J. *J. Colloid Interface Sci.* **82**, 77 (1981).

499. van Holde, K.E. *Physical Biochemistry*. 2nd de. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1985.
500. van Oss, C.J. Singer, J. *J. Reticuloendothelial Soc.* **3**, 29 (1966).
501. van Oss, C.J. Moore, L.L. Good, R.J. Chaudhury, M.K. *J. Protein Chem.* **4**, 245 (1985).
502. van Oss, C.J. Good, R.J. Chaudhury, M.K. *J. Protein Chem.* **5**, 385 (1986a).
503. van Oss, C.J. Good, R.J. Chaudhury, M.K. *J. Colloid Interface Sci.* **111**, 378 (1986b).
504. van Oss, C.J. Chaudhury, M.K. Good, M.K. *Adv. Colloid Interface Sci.* **28**, 35 (1987).
505. van Oss, C.J. Chaudhury, M.K. Good, M.K. *Chem. Rev.* **88**, 927 (1988a).
506. van Oss, C.J. Good, R.J. *J. Protein Chem.* **7**, 179 (1988b).
507. van Oss, C.J. Ju, L. Chaudhury, M.K. Good, R.J. *J. Colloid Interface Sci.* **128**, 313 (1989a).
508. van Oss, C.J. *J. Protein Chem.* **8**, 661 (1989b).
509. van Oss, C.J. *Colloids Surfaces A.* **78**, 1 (1993).
510. van Oss, C.J. *Interfacial Forces in Aqueous Media*. Marcel Dekker, Inc. New York. 1994.
511. van Streun, K.H. Belt, W.J. Piet, P. y German, A.L. *Eur. Polym. J.*, **27**, 931 (1991).
512. van Zanten, J.H. Elimelech, M. *J. Colloid Interface Sci.* **154**, 1 (1992).
513. Velázquez, A. *Microcalorímetro isotérmico de valoración de alta sensibilidad. Aplicación al estudio de la adsorción de proteínas sobre coloides modelo poliméricos*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1998.
514. Verdegan, B.M. Anderson, M.A. *J. Colloid Interface Sci.* **158**, 372 (1993).
515. Verwey, E.J.W. Overbeek, J.Th.G. *Theory of Stability of Lyophobic Colloids*. Elsevier, Amsterdam. 1948.
516. Vicsek, T. *Fractal growth phenomena*. World Scientific. 1992.
517. Vigil, G. Xu, Z. Steinberg, S. Israelachvili, *J. Colloid Interface Sci.* **165**, 367 (1994).
518. Vincent, B.H. Bijsterbosch, J. Lyklema, *J. Colloid Interface Sci.* **37**, 171 (1970).
519. Vincent, B. *J. Colloid Interface Sci.* **42**, 270 (1973).

520. Vincent B. Luckham, P.F. Waite, F.J. *J. Colloid Interface Sci.* **73**, 508 (1980).
521. Vincent, B. Edward, J. Emmett, S. Jones, A. *Colloids Surfaces.* **18**, 261 (1986).
522. Visser, J. *Adv. Colloid Interface Sci.* **3**, 331 (1972).
523. Voegtli, L.P. Zukoski, C.F. *J. Colloid Interface Sci.* **141**, 92 (1991).
524. Vogler, E.A. *Adv. Colloid Interface Sci.* **74**, 69 (1998).
525. Vold, M.J. *J. Colloid Interface Sci.* **14**, 168 (1959).
526. Vold, M.J. *J. Colloid Interface Sci.* **16**, 1 (1961).
527. Vold, M.J. *J. Colloid Interface Sci.* **18**, 684 (1963).
528. Von Schultness, G.K. Giglio, M. Cannell, D.S. Benedek, G.B. *Mol. Immunol.* **17**, 81 (1980)
529. Vreeker, R. Kuin, A.J. Den Boer, D.C. Hoekstra, L.L. Asterof, W.G.M. *J. Colloid Interface Sci.* **154**, 138 (1992).
530. Walz, J.Y. *Adv. Colloid Interface Sci.* **74**, 119 (1998).
531. Wan, J.L. Shih, W.Y. Sarikaya, M. Aksay, I.A. *Phys. Rev. A.* **41**, 3206 (1990).
532. Wang, Q. *J. Colloid Interface Sci.* **145**, 99 (1991).
533. Watillon, A. Romerowski, M. van Grunderbeek, F. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **68**, 450 (1959).
534. Watillon, A. Joseph-Petit, A.M. "A.C.S. Symposium on Coagulation Coagulant Aids". 61, 1961.
535. Watillon, A. *J. Colloid Interface Sci.* **33**, 430 (1970).
536. Weitz, D.A. Oliveria, M. *Phys. Rev. Lett.* **52**, 1433 (1984a).
537. Weitz, D.A. Huang, J.S. Lin, Y. Sung, J. *Phys. Rev. Lett.* **53**, 1657 (1984b).
538. Weitz, D.A. Huang, J.S. "Kinetics of aggregation and gelation". North-Holland. 1984c.
539. Weitz, D.A. Huang, J.S. Lin, Y. Sung, J. *Phys. Rev. Lett.* **54**, 1416 (1985).
540. Weitz, D.A. Lin, M.Y. Huang en "Physics of complex and supermolecular fluids". (S.A. Safran, N.A. Clark Eds.). Wiley-Interscience, New York. 1987.
541. Wessling, R.A. y Yats, L.D. *Macromol. Chem. Suppl.* **10**, 319 (1985).
542. Whicher, J.T. Blow, C. *Ann. Clin. Biochem.* **17**, 170 (1980).
543. Whicher, J.T. "Marker Proteins in inflammation". Vol 2. Walter de Gruyter, Berlin, p. 89. 1984.

544. Wilcoxon, J.P. Martin, J.E. Schaefer, D.W. *Phys. Rev. A.* **39**, 2675 (1989).
545. Witten, T.A. Sander, L.M. *Phys. Rev.* **47**, 1400 (1981).
546. Witten, T.A. Sander, L.M. *Phys. Rev.* **50**, 5686 (1983).
547. Wu, W. Giese, R.F. van Oss, C.J. *Colloids Surfaces A.* **89**, 241 (1994).
548. Wunderlich, R.W. *J. Colloid Interface Sci.* **88**, 385 (1982).
549. Xu, Z. Yoon, R.H. *J. Colloid Interface Sci.* **134**, 427 (1990).
550. Yoon, J.Y. Park, H.Y. Kim, J.H. Kim, W.S. *J. Colloid Interface Sci.* **177**, 613 (1996).
551. Yoon, R.H. Ravishankar, S.A. *J. Colloid Interface Sci.* **179**, 391 (1996).
552. Yoshida, M. Asano, M. Yosota, T. Kumakura, M. *Polymer.* **31**, 371 (1990).
553. Yotsumoto, H. Yoon, R.H. *J. Colloid Interface Sci.* **157**, 426 (1993a).
554. Yotsumoto, H. Yoon, R.H. *J. Colloid Interface Sci.* **157**, 434 (1993b).
555. Young, D.W. Prieve, D.C. *Langmuir.* **7**, 2887 (1991).
556. Yu, X. Somasundaran, P. *J. Colloid Interface Sci.* **178**, 770 (1996).
557. Zamora Lucas, A. *Tesis Doctoral.* Universidad del País Vasco, 1991.
558. Zhang, J. Buffle, J. *J. Colloid Interface Sci.* **174**, 500 (1995).
559. Zhang, J. Buffle, J. *Colloids Surfaces A.* **107**, 175 (1996).
560. Zhao, J. Brown, W. *J. Colloid Interface Sci.* **179**, 255 (1996).
561. Zhu, P.W. Napper, D.H. *Phys. Rev. E.* **50**, 1360 (1994).
562. Zhu, P.W. Napper, D.H. *Colloids Surfaces A.* **98**, 93 (1995).
563. Zeichner, G.R. Showalter, W.R. *J. Colloid Interface Sci.* **71**, 237 (1979).
564. Zimehl, R. Lagaly, G. *Colloids Surfaces.* **22**, 225 (1987).
565. Zollars, R.I. Ali, S.I. *J. Colloid Interface Sci.* **114**, 149 (1986).
566. Zukoski, C.F. Saville, D.A. *J. Colloid Interface Sci.* **114**, 32 (1986a).
567. Zukoski, C.F. Saville, D.A. *J. Colloid Interface Sci.* **114**, 32 (1986b).



Biblioteca Universitaria de Granada



01037522