



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de:

Doctor en Tecnología Química

Título de la Tesis:

***"Caracterización Reológica y Reométrica de Soluciones
Macromoleculares Eléctricamente Cargadas: Aplicación a Gelatinas
Comerciales"***

Autora:

Bioq. María Laura Olivares

Director:

Dr. Julio A. Deiber

Co-Directora:

Lic. Marta B. Peirotti

Institución donde se realizó:

**Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química
Universidad Nacional del Litoral**

Miembros del Jurado de Tesis:

**Dra. Noemí Zaritzky
Dra. María Cristina Añón
Dra. Amelia Rubiolo**

Año de presentación: 2007

A mis padres y a mi esposo

Agradecimientos

En primer lugar quiero expresar mi gratitud a mis directores el Dr. Julio Deiber y a la Lic. Marta Peirotti por sus invaluable aportes, estímulo y guía permanente y por sus apreciables sugerencias durante la realización de la Tesis.

A mis padres y a mi esposo por el constante apoyo recibido durante estos años.

A mis compañeros, y muy especialmente a Gustavo Imoberdorf y a María Lucila Satuf, por brindarme su constante apoyo y colaboración.

A todos los integrantes del grupo de Reología y Fenómenos de Transporte del INTEC por su cooperación en la realización de tareas informáticas y de laboratorio, en especial a la Lic. Dafna Eluk y su esposo Diego Vietto.

A los integrantes del Grupo de Ingeniería de Alimentos y Biotecnología del INTEC por facilitarme equipamiento para la realización de algunas determinaciones experimentales realizadas en este trabajo de Tesis y muy especialmente, al Dr. Guillermo Shiufe y al profesional Daniel Depiante por el asesoramiento brindado.

Al Dr. Claudio Berli, por sus valiosos aportes y estímulo permanente.

A la Cátedra de Bioquímica Básica de las Macromoléculas de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, por su apoyo permanente.

Al Dr. Iván Marcipar y a la memoria del Dr. Alberto Marcipar por iniciarme en la labor científica y por brindarme su sincera amistad.

Al personal del INTEC y CERIDE en general por los importantes servicios prestados.

A la empresa PB-Leiner (Argentina) por la donación de las muestras de gelatina estudiadas en esta tesis.

A los miembros del jurado por su interés y disposición para participar en la evaluación de esta tesis.

Al Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme apoyo financiero, mediante una Beca de Formación de Posgrado.

Finalmente, a todas las personas que de alguna manera colaboraron para la concreción de esta Tesis.

Índice

Resumen	i
Prefacio	vi

Capítulo 1: Conceptos de reología y reometría

1.1 Introducción	1
1.2 El problema fluidodinámico no-Newtoniano	3
1.3 Funciones reométricas y flujo de corte	6
1.4 Clasificación de los fluidos según su respuesta reológica	11
1.5 Bibliografía	14

Capítulo 2: Conceptos estructurales asociados a macromoléculas

2.1 Introducción	16
2.2 Estructura de fluidos poliméricos	17
2.3 Conformaciones macromoleculares en estado de equilibrio termodinámico	22
2.4 Fenómenos electrocinéticos: Teoría de la doble capa eléctrica	26
2.5 Proteínas	31
2.6 Carga eléctrica de las proteínas	38
2.7 Hidratación de las proteínas	42

2.8 Bibliografía	44
------------------	----

Capítulo 3: Colágeno y gelatina

3.1 Introducción	47
3.2 Colágeno	48
3.3 Gelatina	53
3.4 Aplicaciones de la gelatina	55
3.5 Propiedad gelificante de las soluciones de gelatina	59
3.6 Propiedades ópticas de las soluciones de gelatina	61
3.7 Métodos de análisis de uso industrial para medir las propiedades mecánicas de la gelatina	63
3.8 Estabilidad y seguridad de la gelatina	64
3.9 Bibliografía	67

Capítulo 4: Características microestructurales de las soluciones de gelatina

4.1 Introducción	73
4.2 Análisis de las soluciones de gelatina en las diferentes zonas de concentración y temperatura	74
4.3 Cinética de regeneración de la triple hélice de gelatina	80
4.4 Conclusiones	83
4.5 Bibliografía	85

Capítulo 5: Obtención de la *MWD de gelatina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida**

5.1 Introducción	89
5.2 Descripción breve de la técnica de PAGE-SDS	90
5.3 Análisis de muestras de Gelatina por PAGE-SDS	99
5.4 Densitometría computacional de las bandas obtenidas por PAGE-SDS	101
5.5 Conclusiones	105
5.6 Bibliografía	107

Capítulo 6: Métodos reométricos experimentales utilizados en esta tesis

6.1. Introducción	109
6.2 Reometría capilar	111
6.3 Reometría rotacional	120
6.4 Bibliografía	124

Capítulo 7: Viscosidad intrínseca de gelatina para diferentes historias térmicas

7.1 Introducción	125
7.2 Conceptos asociados a viscosidad intrínseca de macromoléculas	126

7.3 Viscosidad intrínseca de gelatina para diferentes historias térmicas	130
7.4 Resultados	132
7.5 Conclusiones	140
7.6 Bibliografía	142

Capítulo 8: Agregación de moléculas de gelatina en solución diluida

8.1 Introducción	144
8.2 Protocolo experimental para la medición de la viscosidad específica	145
8.3 Viscosidad específica en función del tiempo de maduración	146
8.4 Agregación de moléculas de gelatina	149
8.5 Análisis de la influencia del primer efecto electro viscoso en el radio hidrodinámico de las moléculas de gelatina	164
8.6 Estabilidad de soluciones diluidas de gelatina	168
8.7 Soluciones ultra-diluidas ($C < C_c$)	180
8.8 Conclusiones	183
8.9 Bibliografía	185

Capítulo 9: Estudio de soluciones diluidas y concentradas de gelatina a diferentes pH y fuerzas iónicas

9.1 Introducción	188
9.2 Teoría de polianfolitos en solución diluida: escalas características	190
9.3 Aplicación de la teoría de polianfolitos a moléculas de gelatina	205
9.4 Viscosidad reducida de soluciones diluidas de gelatina para diferentes pH y fuerzas iónicas	218
9.5 Viscosidad aparente de soluciones concentradas de gelatina para diferentes pH y fuerzas iónicas	224
9.6 Conclusiones	231
9.7 Bibliografía	234
Conclusiones	237
 Apéndices	
I. Algoritmo numérico propuesto para la obtención de las funciones y parámetros de los modelos teóricos utilizados en esta tesis	241
II. Valores de tiempos experimentales para las distintas experiencias de viscosidad Intrínseca	245
III. Valores de tiempos experimentales para las distintas experiencias de agregación Browniana	253
IV. Valores de tiempos experimentales promedios para las distintas experiencias de viscosidad reducida en función del pH	255

Resumen

La caracterización e interpretación reológica y fisicoquímica del comportamiento microestructural de soluciones de gelatina es fundamental para el diseño y control de diferentes procesos de la elaboración de alimentos, de la ingeniería biomédica y de la biotecnología.

En términos generales, es pertinente mencionar que la gelatina, la cual es un biopolímero soluble en agua, se obtiene a partir de tejidos de colágeno mediante un proceso de hidrólisis ácida y/o alcalina que destruye la estructura terciaria, secundaria y también, en parte, la estructura primaria del colágeno nativo. En consecuencia, luego de la degradación al nivel tropo-colagénico se obtienen cadenas polidispersas que dan origen a un producto con una amplia distribución de pesos moleculares.

Debido a la presencia de aminoácidos básicos y ácidos en la secuencia peptídica, las moléculas de gelatina en solución se encuentran cargadas eléctricamente. La carga neta de cadena varía ampliamente con el pH. En efecto, el estado conformacional que adoptan estos polianfolitos es significativamente dependiente del medio fisicoquímico en el que se encuentran disueltos, donde intervienen diferentes tipos de fuerzas inter e intramoleculares. Por consiguiente, el sistema solvente – macromolécula puede presentar una diversidad de comportamientos y evoluciones, entre ellas, la que se conoce como proceso de maduración el cual conduce al estado de gel. Las variables representativas en este marco de referencia son: temperatura, fuerza iónica, pH, concentración de proteína, historias térmicas y mecánicas.

Considerando los problemas brevemente mencionados arriba, en esta tesis se estudian aspectos relevantes y no resueltos al presente de las soluciones de gelatina desde el punto de vista reológico y fisicoquímico en los regímenes de concentración ultra-diluido, diluido y concentrado, considerando otras fenomenologías estudiadas previamente en la literatura. Se analiza el efecto que tienen sobre la microestructura formada por el par solvente – macromolécula la variación de parámetros tales como temperatura, tiempo de maduración, velocidad de corte, pH y fuerza iónica.

Para la interpretación teórica de los ensayos reométricos llevados a cabo en los distintos regímenes de concentración, se requiere conocer la distribución de pesos moleculares de las cadenas de la gelatina utilizada. En tal sentido, esta función de distribución se obtiene mediante la técnica experimental de electroforesis en geles de poliacrilamida y, a través de ella, se calculan los pesos moleculares promediados en fracciones másicas y en número de moles usando densitometría computacional.

Se analiza la viscosidad de soluciones de gelatina en los regímenes de concentración ultra-diluido y diluido utilizando un viscosímetro capilar gravitatorio (no disponible comercialmente) que permite, primero, evaluar la velocidad de corte lo cual no es posible en los dispositivos comunes y, segundo, obtener velocidades de corte relativamente bajas, donde los resultados teóricos reológicos, en relación a la microestructura de los fluidos, están bien establecidos. Por consiguiente, mediante los resultados experimentales obtenidos, y a través de la interpretación teórica de los mismos, se valida y se concluye que el comportamiento microestructural de las soluciones de gelatina es fuertemente dependiente del rango de concentración,

de la temperatura de maduración y de la composición electrolítica del solvente aportando, a su vez, nuevos conocimientos no descritos previamente. En efecto, a través de ensayos de viscosidad intrínseca de soluciones diluidas, es decir para concentraciones inferiores a la concentración crítica de gelificación de 10^{-2} g/cm³ aproximadamente, se observa que por debajo de la temperatura de gelificación este tipo de soluciones experimentan agregación intermolecular. Este fenómeno se produce por la formación de zonas de triples hélices intermoleculares donde las cadenas de gelatina tienden a regenerar parcialmente la estructura tropocolagénica formando estructuras fractales.

La agregación de moléculas de gelatina en el régimen diluido también se estudia aquí mediante la medición de la viscosidad específica de soluciones diluidas maduras a distintas temperaturas. La interpretación de los resultados experimentales obtenidos se realiza a través de la teoría de agregación de Smoluchowski, observándose que a medida que el tiempo de maduración aumenta, los agregados que se producen son más polidispersos con propensión a formar una función densidad de distribución de tamaño de partícula de alta dispersión. Además, a través de los valores de dimensión fractal obtenidos se observa que estos agregados son más desordenados y ocluyen mayor cantidad de solvente cuanto menor es la temperatura de maduración (cinéticas de agregación menos lentas). En efecto, la menor dimensión fractal obtenida es de 1,79 y se registra a la menor temperatura de maduración evaluada de 5°C. Asimismo, el mayor valor de dimensión fractal obtenido a la mayor temperatura de maduración es de 2,43.

Mediante la evaluación del factor de estabilidad coloidal se observa que el proceso de agregación es lento debido a que las moléculas de gelatina

deben vencer una barrera energética de alrededor 25 veces la energía térmica estimada como el producto entre la constante de Boltzman y la temperatura absoluta. Por otro lado, mediante la evaluación reométrica de soluciones ultra-diluidas, es decir para concentraciones inferiores a 10^{-5} g/cm³ se concluye que en este rango de concentración el sistema no experimenta agregación sino que las moléculas de gelatina regeneran la estructura tropocolagénica mediante plegado intramolecular. Los resultados obtenidos se discuten en el marco de las teorías cinéticas de macromoléculas.

Asimismo, se analiza el estado de carga que poseen las moléculas de gelatina a los diferentes pH y se obtiene información referente a la conformación que pueden adoptar estas macromoléculas en solución diluida antes de que comience el proceso de agregación, las cuales dependen, principalmente, de interacciones intramoleculares de naturaleza electrostática acopladas al movimiento Browniano. En efecto, mediante un estudio reométrico de soluciones de gelatina a distintos pH y fuerzas iónicas se observa que en el régimen diluido las moléculas de gelatina adquieren diferentes radios hidrodinámicos debido a la modificación de las interacciones intramoleculares mencionadas arriba. Por otro lado, los ensayos reométricos realizados en el régimen concentrado, muestran que la variación del estado de carga de las macromoléculas a través del cambio de pH y de la fuerza iónica del medio condicionan la formación y estabilización de redes debido a la modificación de las interacciones electrostáticas intermoleculares, generando mecanismos disipativos sustancialmente diferentes a los encontrados en soluciones diluidas, los cuales se reflejan a través de la medición de la viscosidad. Asimismo, mediante el análisis teórico del estado de cargas de una secuencia peptídica

perteneciente a gelatina de vaca se observó que las cadenas de gelatina presentan un punto isoeléctrico pI 4,48 y que ésta es un polianfolito débilmente cargado, debido a que nunca (es decir para ningún pH) posee más de un 20% de aminoácidos cargados.

Prefacio

En esta tesis se estudia el comportamiento microestructural que presentan las macromoléculas de gelatina en solución cuando se disuelven en condiciones fisicoquímicas diferentes. El análisis científico formal se realiza en el marco de la reología y la fisicoquímica de macromoléculas donde las propiedades físicas de los sistemas fluidos se expresan, en general, a través de funciones materiales bien definidas. Por consiguiente, este estudio consiste en establecer la correlación existente entre las funciones reométricas y los fenómenos fisicoquímicos que ocurren en las soluciones de gelatina considerando, principalmente, la agregación de macromoléculas en soluciones diluidas, además del plegado intra-molecular en soluciones ultra-diluidas y la formación de redes en soluciones concentradas las cuales conducen al estado de gel.

En esta propuesta de trabajo, los resultados científicos obtenidos se presentan en el contexto de nueve capítulos, cuyos contenidos se describen brevemente a continuación. En efecto, en el Capítulo 1 se incluyen los fundamentos básicos de la reología y la reometría de interés en el desarrollo de esta tesis, contemplando el problema fluidodinámico no-Newtoniano, las definiciones de las funciones reométricas y de flujo de corte.

El Capítulo 2 contiene conceptos estructurales asociados a las macromoléculas en solución. Éste incluye una descripción de la estructura de fluidos poliméricos y de los fenómenos electrocinéticos que presentan estas soluciones cuando los polímeros poseen cargas en su estructura primaria. Asimismo, se describen algunas características estructurales y fisicoquímicas

de las proteínas, las cuales son biopolímeros naturales dentro de las que se incluye a la gelatina.

El Capítulo 3 presenta, en particular, una breve descripción de la estructura del colágeno (material de donde se extrae la gelatina) y de la gelatina. Asimismo, se describen algunas propiedades y aplicaciones de la gelatina que motivaron los objetivos planteados para este estudio.

En este sentido, considerando la diversidad de usos y aplicaciones de la gelatina, queda claro que se deben conocer las distintas fenomenologías que presentan las soluciones de estas macromoléculas para lograr un diseño adecuado de los distintos procesos tecnológicos involucrados en cada aplicación en particular. Por consiguiente, en el Capítulo 4 se realiza un análisis detallado de la bibliografía donde se contemplan las características microestructurales que presentan las soluciones de gelatina en las diferentes zonas de concentración y temperatura.

Para el análisis experimental llevado a cabo en esta tesis se utilizó una muestra de gelatina la cual se caracterizó desde el punto de vista estructural a los fines de obtener la distribución de pesos moleculares MWD y los pesos moleculares promediados en fracciones másicas M_w y en número de moles M_n . En tal sentido, en el Capítulo 5 se describe la técnica experimental desarrollada y llevada a cabo. Esta consiste en hacer uso de las cargas eléctricas de la gelatina y realizar una electroforesis en geles de poliacrilamida para separar las distintas fracciones polipeptídicas en función del peso molecular. Las fracciones separadas en bandas bien definidas, debido a la acción de un campo eléctrico, se ponen en evidencia mediante la tinción con colorantes específicos para proteínas y se analizan mediante densitometría

computacional obteniéndose, de esta forma la *MWD* y los pesos moleculares promedios.

El Capítulo 6 presenta los métodos reométricos utilizados en esta tesis, donde se incluye el diseño y la construcción de un viscosímetro capilar gravitatorio (no disponible comercialmente) para obtener datos de viscosidad de soluciones de gelatina diluidas y ultra-diluidas a velocidades de corte relativamente bajas. Asimismo, en este capítulo se describe el método reométrico rotacional de celda cono-plato utilizado para el estudio de soluciones concentradas de gelatina.

El Capítulo 7 comprende el estudio de soluciones de gelatina diluidas sometidas a diferentes historias térmicas mediante el análisis de la viscosidad intrínseca. Este estudio permite obtener información referente a la naturaleza fisicoquímica de las interacciones macromoleculares que ocasionan la agregación de las moléculas de gelatina en esta zona de concentración y temperatura.

En el Capítulo 8 se lleva a cabo un estudio experimental de la maduración de soluciones diluidas de gelatina en condiciones fisicoquímicas diferentes. Los resultados experimentales obtenidos se interpretan en el marco de la teoría de agregación de Smoluchowsky contemplando la estructura y la distribución de tamaño de los agregados que se forman durante el proceso de maduración. Asimismo, se analiza la naturaleza de las fuerzas que mantienen a estas macromoléculas en solución y se arriba a conclusiones concernientes a la estabilidad de estos sistemas.

Finalmente, el Capítulo 9 incluye un estudio teórico de los distintos estados de carga que presentan las moléculas de gelatina a los diferentes pH y

fuerzas iónicas y se infiere acerca de la conformación que pueden adoptar estas macromoléculas en solución diluida antes de que comience el proceso de agregación (es decir, a tiempo de maduración cero), el cual se describe y analiza en el Capítulo 8. Además, se realizan estudios reométricos de soluciones diluidas y concentradas de gelatina a diferentes pH y fuerzas iónicas. A través de ellos, es posible arribar a conclusiones concernientes a la naturaleza de las interacciones intra e intermoleculares en función del estado de carga de las moléculas de gelatina.

Capítulo 1



Conceptos de Reología y Reometría

1 Conceptos de reología y reometría

1.1 Introducción

En este capítulo se realiza una descripción breve de algunos conceptos básicos de reología y reometría, cuyo objetivo es precisamente facilitar la lectura de los contenidos específicos de esta tesis. En este marco teórico, esta tesis involucra la caracterización reológica y reométrica de soluciones de gelatina en distintos medios fisicoquímicos. Por lo tanto, se describen a continuación algunos fundamentos de la reología que se utilizan en los capítulos siguientes (ver, por ejemplo, Bird et al., 1960 y 1977; Walters, 1975; Schowalter, 1978; Barnes et al., 1991 y Macosko, 1994).

Desde el punto de vista de la mecánica del continuo material, los fluidos compuestos por moléculas chicas, los gases y las mezclas de ellos, presentan una relación lineal entre la velocidad a la que se deforman y la tensión en el material a una temperatura y presión determinada. Estos fluidos, denominados Newtonianos, se pueden caracterizar mediante dos constantes materiales: la densidad ρ y la viscosidad μ . De esta manera, en el marco de la mecánica de fluidos clásica, es posible calcular los campos de velocidad y de presión en cualquier sistema de flujo, usando la ecuación de Navier Stokes. El resto de los materiales, como por ejemplo, fluidos poliméricos, sólidos fundidos, suspensiones de partículas, soluciones de macromoléculas y coloides en general, presentan respuestas no lineales entre la tensión y la velocidad de deformación cuando son sometidos a flujos relativamente simples. Estos

fluidos, denominados en general no-Newtonianos son el objeto de estudio de la reología. En efecto, el análisis teórico y experimental del comportamiento mecánico de estos materiales en flujos cinemáticamente simples conduce a un conjunto de funciones reométricas, las cuales indican que se requiere más que una constante μ para caracterizarlos reológicamente. Estas funciones dependen de la velocidad de deformación, de la frecuencia y del tiempo, y se utilizan como identificadores de los fluidos no-Newtonianos. En este contexto, se puede decir que la reología estudia la deformación y el flujo de los materiales fluidodinámicamente complejos, mediante la caracterización del estado de tensiones en función de historias mecánicas, térmicas y químicas (Deiber, 1983). En este sentido, el proceso de caracterización es abordado mediante dos metodologías: (1) análisis reométrico experimental y (2) selección de un modelo o ecuación constitutiva que describe apropiadamente la relación entre el tensor de tensiones y los tensores deformación y velocidad de corte (Walters, 1975, Deiber, 1983).

En los comienzos de esta disciplina científica, los estudios reológicos se orientaban a caracterizar principalmente materiales tales como asfaltos, lubricantes, pinturas, plásticos y gomas desde un punto de vista predominantemente fenomenológico. Sin embargo, en las últimas décadas, la reología presenta un marco teórico consolidado y en continuo crecimiento. De esta forma, esta disciplina logra producir significativos avances en temas de alto interés tecnológico, como por ejemplo, en la biorreología donde se estudian las macromoléculas naturales, en reología de polímeros sintéticos involucrando así a la industria de materiales modernos y en la reología de suspensiones donde intervienen diferentes tipos de fases discretas. Asimismo,

últimamente surgieron importantes aplicaciones de la reología en la industria biotecnológica y en la producción de materiales biomédicos (ver, por ejemplo, Barnes et al., 1991; Macosko, 1994; Young et al., 2005; Kiessling et al., 1999; Pompe et al., 2003).

1.2 El problema fluidodinámico no-Newtoniano

El problema fluidodinámico no-Newtoniano, en la forma más simple, se formula mediante las ecuaciones de balance de propiedades de medios continuos homogéneos. Por consiguiente, el planteo del problema fluidodinámico requiere de las ecuaciones de balance de materia, cantidad de movimiento y energía interna, las cuales se expresan respectivamente,

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \underline{\nabla} \cdot (\rho \underline{v}) = 0 \quad (1.2.1)$$

$$\rho \left[\frac{\partial \underline{v}}{\partial t} + \underline{v} \cdot \underline{\nabla} \underline{v} \right] = \underline{\nabla} \cdot \underline{\underline{T}} + \rho \underline{g} \quad (1.2.2)$$

$$\rho \left[\frac{\partial u}{\partial t} + \underline{v} \cdot \underline{\nabla} u \right] = -\underline{\nabla} \cdot \underline{q} + \underline{\underline{T}} : \underline{\nabla} \underline{v} \quad (1.2.3)$$

donde ρ es la densidad y \underline{v} es el campo de velocidades. En el caso de fluidos incompresibles, la ecuación (1.2.1) se reduce a $\underline{\nabla} \cdot \underline{v} = 0$. En la ecuación (1.2.2),

\underline{g} representa un campo vectorial conservativo, típicamente la gravedad, y \underline{T} es un tensor simétrico que comprende los campos de presiones y de tensiones en el material. En la ecuación (1.2.3) la energía interna u varía debido al flujo calórico \underline{q} y a la generación interna por efecto viscoso, expresada en el segundo término del lado derecho. En particular, el problema fluidodinámico se reduce a las ecuaciones (1.2.1) y (1.2.2) cuando el sistema es isotérmico. En tal sentido, en esta tesis se realizan análisis teóricos-experimentales de soluciones de gelatina en estado isotérmico.

Las tensiones en el material provienen de dos contribuciones, una del estado isotrópico y la otra debida a las tensiones extras que se generan como consecuencia de la deformación. En este sentido, el tensor \underline{T} se expresa,

$$\underline{T} = p\underline{\delta} + \underline{\tau} \quad (1.2.4)$$

donde p es la presión, $\underline{\delta}$ es el tensor identidad y $\underline{\tau}$ es el tensor extra de tensiones. Asimismo, si no existen cuplas internas en el material, a través del balance del momento angular se demuestra que $\underline{\tau}$ es simétrico (ver, por ejemplo, Schowalter, 1978; Macosko, 1994).

En el marco simple de la reología y la reometría, el tensor $\underline{\tau}$ se puede expresar en función del tensor velocidad de deformación $\underline{\dot{\gamma}}$, el cual se define como la suma del gradiente de velocidad $\underline{\nabla v}$ más su transpuesto $\underline{\nabla v}^T$; es decir,

$$\underline{\dot{\gamma}} = \underline{\nabla v} + \underline{\nabla v}^T \quad (1.2.5)$$

De esta manera, el tensor $\underline{\dot{\gamma}}$ también es simétrico.

Para evaluar el campo de tensiones del material que fluye se requiere una ecuación constitutiva. En este sentido, el modelo reológico más simple corresponde al fluido Newtoniano, para el cual se cumple,

$$\underline{\tau} = \mu (\underline{\nabla v} + \underline{\nabla v}^T) \quad (1.2.6)$$

donde el factor de proporcionalidad μ es la viscosidad de Newton o viscosidad Newtoniana. En este caso, la divergencia del tensor \underline{T} resulta,

$$\underline{\nabla \cdot T} = -\underline{\nabla p} + \mu \nabla^2 \underline{v} \quad (1.2.7)$$

Incorporando este resultado en la ecuación (1.2.2) se obtiene la ecuación de Navier-Stokes, la cual gobierna la mecánica de los fluidos Newtonianos. En cambio, los fluidos no-Newtonianos requieren expresiones más complejas del tensor $\underline{\tau}$, las cuales en general involucran relaciones no lineales entre las tensiones del material y la velocidad de deformación.

1.3 Funciones reométricas y flujo de corte

Como se mencionó anteriormente, el estudio reológico de los fluidos complejos comprende el análisis experimental de los mismos en condiciones de flujos simples. Dentro del análisis reométrico, pueden diferenciarse dos clases bien definidas de flujo; el flujo de corte y el flujo elongacional. Para el desarrollo de este trabajo de tesis los ensayos experimentales fueron realizados en celdas reométricas que operan bajo flujo de corte.

El flujo de corte resulta importante en reología debido a varias razones: (a) muchos flujos de interés práctico pueden aproximarse a un flujo de corte, (b) las funciones reométricas reportadas en la literatura con mayor frecuencia se definen para el flujo de corte y (c) el flujo de corte simplifica las ecuaciones reológicas.

El flujo de corte se visualiza fácilmente considerando dos platos paralelos separados por una distancia d , y el fluido que llena el espacio entre ellos. De acuerdo al esquema de la Figura 1.3.1, el plato inferior se mantiene fijo y el superior se mueve a la velocidad constante v_0 .

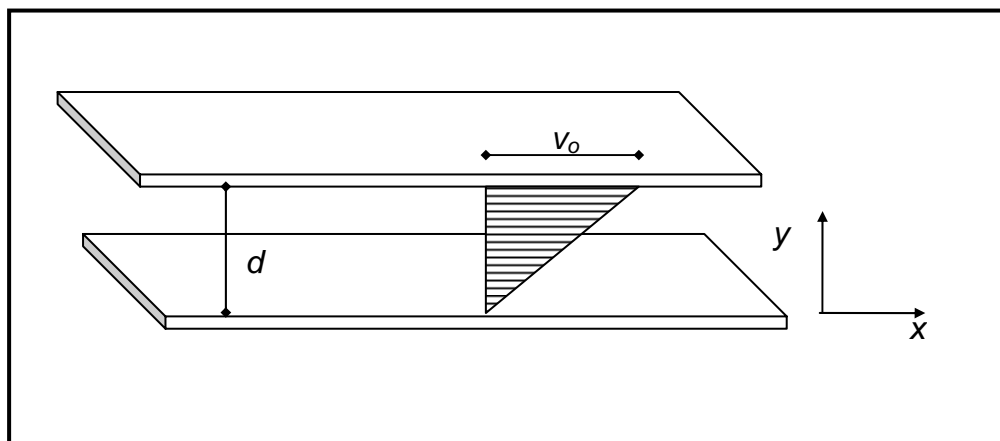


Figura 1.3.1 Flujo de corte entre dos platos paralelos separados por una distancia d (Barnes et al., 1991). El plato superior se mueve en la dirección x con una velocidad constante v_0 .

Si la dimensión de los platos es mucho mayor que la separación d y el fluido se adhiere a las superficies sólidas, se establece un perfil de velocidad con la siguiente cinemática,

$$v_x(y) = \frac{\partial v_x}{\partial y} y; \quad v_y = v_z = 0 \quad (1.3.1)$$

donde $\{x, y, z\}$ son las componentes del sistema de coordenadas cartesianas que se ilustra en la Figura 1.3.1. En estas circunstancias, el tensor - velocidad de deformación resulta,

$$\underline{\dot{\gamma}} = \begin{pmatrix} 0 & \dot{\gamma}_{xy} & 0 \\ \dot{\gamma}_{yx} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (1.3.2)$$

donde las únicas componentes no nulas se expresan,

$$\dot{\gamma}_{xy} = \dot{\gamma}_{yx} = \frac{\partial v_x}{\partial y} \quad (1.3.3)$$

De esta manera, la velocidad de corte $\dot{\gamma}$ definida a través del segundo invariante del tensor $\underline{\dot{\gamma}}$ resulta,

$$\dot{\gamma} = \sqrt{\frac{1}{2}(\underline{\dot{\gamma}} : \underline{\dot{\gamma}})} \quad (1.3.4)$$

En el caso particular de la Figura 1.3.1, la velocidad de corte se expresa $\dot{\gamma} = v_o/d$, compatiblemente con las ecuaciones (1.3.3) y (1.3.4) es decir, $\dot{\gamma}$ es constante respecto de la coordenada y , y por la ecuación de continuidad se observa que tampoco varía en la coordenada x . Por estas características en particular, el perfil de velocidad propuesto $v_x = \frac{v_o}{d}y$ genera un flujo de corte homogéneo. Cuando el gradiente de velocidad varía punto a punto en el campo de flujo, recibe el nombre de flujo de corte no-homogéneo.

La forma general del tensor de tensiones $\underline{\underline{\tau}}$ en flujo de corte se obtiene a partir de la condición de simetría del material o, más formalmente, a través del principio de objetividad material (ver por ejemplo, Truesdel, 1977; Bird et al., 1977, Schowalter, 1978). En efecto, la expresión para $\underline{\underline{\tau}}$ en este flujo resulta,

$$\underline{\underline{\tau}} = \begin{pmatrix} \tau_{xx} & \tau_{xy} & 0 \\ \tau_{yx} & \tau_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & \tau_{zz} \end{pmatrix} \quad (1.3.5)$$

donde las componentes fuera de la diagonal son iguales porque $\underline{\underline{\tau}}$ es simétrico y se denominan tensiones de corte ($\tau = \tau_{xy} = \tau_{yx}$) y las componentes de la diagonal se denominan tensiones normales. A partir del flujo de corte en estado

estacionario, donde la velocidad de corte no varía con el tiempo, se define la viscosidad aparente o viscosidad de corte $\eta(\dot{\gamma})$,

$$\eta(\dot{\gamma}) = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (1.3.6)$$

y los coeficientes de la primera $\Psi_1(\dot{\gamma})$ y segunda $\Psi_2(\dot{\gamma})$ diferencias de tensiones normales,

$$\Psi_1(\dot{\gamma}) = \frac{N_1}{\dot{\gamma}^2} = \frac{\tau_{xx} - \tau_{yy}}{\dot{\gamma}^2} \quad (1.3.7a)$$

$$\Psi_2(\dot{\gamma}) = \frac{N_2}{\dot{\gamma}^2} = \frac{\tau_{yy} - \tau_{zz}}{\dot{\gamma}^2} \quad (1.3.7b)$$

Las ecuaciones (1.3.6) a (1.3.7) representan las tres funciones reométricas básicas del flujo de corte en estado estacionario.

Otras funciones reométricas de interés provienen de ensayos reométricos basados en flujo de corte transitorios. En este sentido, se utiliza frecuentemente el flujo de corte oscilatorio con una frecuencia genérica ω , el cual se logra imponiendo al plato superior de la Figura 1.3.1 una velocidad unidireccional que varía en el tiempo de acuerdo a $v_0 \text{sen}(\omega t)$. Si además se

cumple $\omega\rho/2\eta_0 \ll 1$, donde η_0 es la viscosidad a velocidad de corte nula, entre los platos se establece un perfil de velocidad con la siguiente cinemática,

$$v_x(y) = \dot{\gamma}_0 y \text{sen}(\omega t); \quad v_y = v_z = 0 \quad (1.3.8)$$

En estas condiciones, el cociente entre la tensión y la velocidad de corte dado por la ecuación (1.3.6) tiene la siguiente expresión,

$$\tau = \left\{ \eta'(\omega) \text{sen}(\omega t) - \frac{G'(\omega)}{\omega} \cos(\omega t) \right\} \dot{\gamma}_0 \quad (1.3.9)$$

donde $\eta'(\omega)$ es la viscosidad dinámica y $G'(\omega)$ es el módulo de almacenamiento elástico. En efecto, el primer término del lado derecho de la ecuación (1.3.9) es la contribución viscosa y el segundo término representa la contribución elástica del material a la tensión de corte τ .

En general, los ensayos y funciones reométricas del flujo de corte y elongacional se ilustran en la Tabla 1.3.1 (Bird et al., 1977). En particular, la función reométrica definida anteriormente por la ecuación (1.3.6) se utiliza para evaluar las soluciones de gelatina de interés en esta tesis. El flujo de corte se obtiene mediante celdas cono-plato y capilar. Estas celdas reométricas, se describen oportunamente en las secciones siguientes conjuntamente con las expresiones que permiten evaluar $\dot{\gamma}$ y τ .

Tabla 1.3.1 Ensayos reométricos frecuentemente utilizados para la evaluación de fluidos complejos (Bird et al., 1977).

Tipo de Ensayo		Funciones Reométricas
Estacionario	Flujo de Corte con velocidad de deformación $\dot{\gamma}$	$\eta(\dot{\gamma})$: viscosidad aparente $\Psi_1(\dot{\gamma})$: coeficiente de la primera diferencia de tensiones normales. $\Psi_2(\dot{\gamma})$: coeficiente de la segunda diferencia de tensiones normales.
	Flujo elongacional con velocidad de deformación $\dot{\epsilon}$	$\eta_e(\dot{\epsilon})$: viscosidad elongacional $\eta_{eb}(\dot{\epsilon})$: viscosidad elongacional biaxial $\eta_{sb}(\dot{\epsilon})$: viscosidad elongacional planar
Transitorio	Ensayo de arranque en flujo de corte con velocidad de deformación constante $\dot{\gamma}_0$	$\eta^+(t, \dot{\gamma}_0)$: viscosidad aparente de arranque. $\Psi_1^+(t, \dot{\gamma}_0)$: coeficiente de primera diferencia de tensiones normales de arranque. $\Psi_2^+(t, \dot{\gamma}_0)$: coeficiente de segunda diferencia de tensiones normales de arranque.
	Ensayo de parada en flujo de corte con velocidad de deformación constante $\dot{\gamma}_0$	$\eta^-(t, \dot{\gamma}_0)$: viscosidad aparente de parada. $\Psi_1^-(t, \dot{\gamma}_0)$: coeficiente de primera diferencia de tensiones normales de parada. $\Psi_2^-(t, \dot{\gamma}_0)$: coeficiente de segunda diferencia de tensiones normales de parada.
	Ensayo de relajación para deformación constante γ_0	$G(t, \gamma_0)$: módulo de relajación
	Ensayo de cedencia para tensión de corte constante τ_0	$J(t, \tau_0)$: Función de cedencia
	Ensayo oscilatorio para frecuencia constante ω y deformación γ_0 pequeña	$\eta'(\omega)$: viscosidad dinámica $G'(\omega)$: módulo de almacenamiento elástico

1.4 Clasificación de fluidos según la respuesta reológica

Considerando la ecuación (1.2.6) y las definiciones reológicas descritas en la Sección 1.3 es interesante visualizar al fluido Newtoniano como aquel que cumple con las siguientes condiciones: (1) la viscosidad no varía con la

velocidad de corte ($\eta = \mu$), (2) las diferencias de tensiones normales son nulas en flujo de corte ($\Psi_1 = \Psi_2 = 0$) y (3) La viscosidad no varía con la frecuencia ($\eta' = \mu$ y $G' = 0$). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, muchos materiales desde el punto de vista de la reología, no cumplen estas condiciones y, por lo tanto, se encuadran dentro de los fluidos no-newtonianos. Asimismo, estos se clasifican de acuerdo a las funciones reométricas y a las propiedades particulares que presentan.

Los materiales que presentan diferencias de tensiones normales en flujo de corte involucran cierto comportamiento elástico. En este sentido, se denominan viscoelásticos a aquellos fluidos cuyo coeficiente $\Psi_1(\dot{\gamma})$ es diferente de cero. Por supuesto, otras propiedades también caracterizan a un fluido viscoelástico, como por ejemplo, la presencia del módulo elástico $G'(\omega)$. Además, las funciones reométricas que varían con el tiempo para historias mecánicas transitorias en general son de interés. No obstante, se debe mencionar aquí que las respuestas reométricas dependientes del tiempo pueden tener un origen microestructural. En efecto, los materiales tixotrópicos presentan una disminución de la viscosidad en función del tiempo cuando están sujetos en forma prolongada a una velocidad de corte constante. En estos materiales se observa una recuperación de la estructura cuando el flujo se detiene. Asimismo, se estima que los fluidos complejos pueden presentar un comportamiento tixotrópico-viscoelástico (Mewis, 1979; Cheng, 1987; Barnes, 1997).

A partir de la forma en que varía la función $\eta(\dot{\gamma})$, los fluidos se pueden clasificar en dos grandes grupos: aquellos cuya viscosidad disminuye al

incrementar la velocidad de corte se denominan pseudoplásticos, y aquellos donde la viscosidad crece con la velocidad de corte se denominan dilatantes. El comportamiento pseudoplástico aparece en la mayoría de los casos, principalmente en los materiales poliméricos y en las suspensiones coloidales. Asimismo, algunos fluidos presentan respuestas excepcionales en relación a lo descrito en esta sección, es decir, que pueden presentar varias de las propiedades mencionadas anteriormente (Barnes et al., 1991).

1.5 Bibliografía

- Barnes, H. A. (1997). Thixotropy – A Review. *Journal of Non-Newtonian Fluids Mechanics*, 70,1-33.
- Barnes, H. A.; Hutton, J. F. y Walters, K. (1991). *An Introduction to Rheology*. Elsevier, Amsterdam.
- Bird, R. B.; Armstrong, R. y Hassager, O. (1977). *Dynamics of Polymeric Liquids*. Vol. I, John Wiley & Sons, New York.
- Bird, R. B.; Stewart, W. y Lightfoot, E. (1960). *Transport Phenomena*. John Wiley & Sons, New York.
- Cheng, D. C. H. (1987). Thixotropy. *International Journal of Cosmetic Science*, 9,151-191.
- Deiber, J. A. (1983). Caracterización Reológica de Fluidos Poliméricos. En *Transferencia de calor y materia y tecnología de polímeros*. Comité Argentino de Transferencia de calor y materia (SIN 0326-2731), pp 289-351.
- Macosko, C. W. (1994). *Rheology principles, measurements and applications*. VCH Publishers, Inc., New York.
- Mewis, J. (1979). Thixotropy – A general review. *Journal of Non-Newtonian Fluids Mechanics*, 6, 1-20.
- Schowalter, W. (1978). *Mechanics of non-Newtonian Fluids*. Pergamon Press, Oxford.
- Walters, K. (1975). *Rheometry*. John Wiley & Sons, New York.
- Young, S.; Wong, M.; Tabata, Y. y Mikos, A. (2005). Gelatin as a delivery vehicle for controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release*, 109, 256-274.

Truesdel, C. (1977). *A first course in rational continuum mechanics*. Vol 1, Academic Press, New York.

Kiessling, L.; Degrado, W. F. y Eckstein, F. (1999). Biopolymers – Modulation of nucleic acids, carbohydrates and proteins for different task. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3, 641-642.

Pompe, W.; Worch, H.; Epple, M.; Friess, W.; Gelinsky, M.; Greil, P.; Hempel, U.; Scharweber, P. y Schulte, K. (2003). Functionally graded materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering A*, 362, 40-60.

Capítulo 2



Conceptos estructurales asociados
a macromoléculas

2 Conceptos estructurales asociados a macromoléculas

2.1 Introducción

A nivel molecular, existen diferencias estructurales relevantes entre las soluciones poliméricas y los fluidos compuestos por moléculas chicas. Estas diferencias son responsables de las fenomenologías adicionales que presentan las soluciones poliméricas bajo flujo y deformación, las cuales pueden ser descritas por una mecánica de fluidos Newtoniana clásica. En este sentido, es apropiado visualizar que la arquitectura macromolecular de las soluciones poliméricas presentan características fácilmente diferenciables, como por ejemplo: (a) el peso molecular de las macromoléculas disueltas varía entre 10^4 a 10^9 g/mol; (b) la población de macromoléculas puede ser tanto monodispersa como polidispersa, en este último caso se requiere definir como variable adicional la función densidad de distribución de pesos moleculares; (c) las macromoléculas pueden presentar un número muy grande de configuraciones (secuencias monoméricas) y conformaciones tanto en el estado de equilibrio como en flujo, el cual cambia las conformaciones macromoleculares como consecuencia del estiramiento y la re-orientación provocada por el solvente; (d) las microestructuras formadas por las macromoléculas en solución diluida y concentrada son substancialmente diferentes puesto que las primeras pueden presentar agregados moleculares con estructuras definidas (por ejemplo fractales) mientras que las segundas forman redes temporales (*temporary entangled networks*). En ambos casos, las microestructuras pueden evolucionar con el tiempo debido a fenómenos adicionales, como aquellos que

involucran reacciones químicas covalentes (curado, vulcanizado, etc) o asociaciones físicas (maduración, coagulación, floculación, etc.) (Tanford, 1961; Flory, 1969; Aklonis et al., 1972; Bird et al., 1977; Creighton, 1993).

Debido a que en esta tesis se estudia la caracterización reológica y reométrica de soluciones de gelatina, es apropiado introducir en este capítulo conceptos estructurales asociados a polímeros sintéticos que puedan extenderse a macromoléculas biológicas cargadas eléctricamente. Por consiguiente, se presenta a continuación una descripción breve de la estructura polimérica básica. Asimismo, se analizan aquí conceptos asociados a los fenómenos electrocinéticos que se originan como consecuencia de la presencia de cargas eléctricas en las macromoléculas, como es el caso de la gelatina. Finalmente, se realiza una descripción breve de estructuras y conformaciones típicas de proteínas, con el fin de generar un marco conceptual de referencia para el análisis de las propiedades reológicas y fisicoquímicas de la gelatina.

2.2 Estructura de fluidos poliméricos

Desde el punto de vista morfológico, un polímero es una molécula relativamente grande (macromolécula) compuesta por unidades químicas estructurales llamadas monómeros. En este sentido, algunos polímeros están compuestos por monómeros bifuncionales y, por lo tanto, dan lugar a la formación de moléculas lineales. En otras macromoléculas, sin embargo, los monómeros pueden tener una funcionalidad mayor a dos dando origen a polímeros ramificados (Flory, 1969). Muchos polímeros sintéticos están contruidos por monómeros de la misma clase y en este caso se denominan

homopolímeros. Por otro lado, los copolímeros se construyen de dos o más unidades estructurales diferentes. Asimismo, según la forma en que se combinan las unidades estructurales, los copolímeros pueden ser clasificados como copolímeros aleatorios o copolímeros por bloques (Flory, 1969; Rodríguez, 1970; Bird, et al., 1977).

Lo antes mencionado resulta importante como marco de referencia para el estudio de las macromoléculas biológicas, las cuales son designadas distintivamente como biopolímeros. En contraste con los polímeros sintéticos, los biopolímeros generalmente están compuestos de una diversidad de monómeros y además frecuentemente poseen carga eléctrica, como ocurre con las proteínas y, en particular, para las cadenas polidispersas de gelatina en solución acuosa. Más específicamente, las cadenas polipeptídicas que forman las proteínas están compuestas por aproximadamente veinte unidades estructurales diferentes que son los aminoácidos. Particularmente, la gelatina es un biopolímero que posee una distribución de peso molecular como consecuencia de la degradación del tropocolágeno utilizado como materia prima. La descripción de la estructura de la gelatina y la de su precursor, el colágeno, se detalla posteriormente en el Capítulo 3.

Para caracterizar una muestra macromolecular polidispersa compuesta de diferentes fracciones monodispersas se usan pesos moleculares promediados. En este sentido, denominando M_i al peso molecular de cada fracción genérica y N_i al número de moles de la misma, se define el peso molecular promediado en número de moles M_n mediante la siguiente expresión (Flory, 1969; Rodríguez, 1970; Bird, et al., 1977; Morawetz, 1975; Allen y Bevington, 1989),

$$M_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} \quad (2.2.1)$$

Este peso molecular tiene un valor desplazado hacia las fracciones de bajo peso molecular (ver, por ejemplo, Flory, 1969; Morawetz, 1975; Allen y Bevington, 1989). Debido a que la masa de la fracción i es $m_i = N_i M_i$ la cual corresponde a una fracción másica $w_i = m_i / \sum m_i$, es posible obtener el peso molecular promediado en fracciones másicas M_w ,

$$M_w = \sum w_i M_i = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i} \quad (2.2.2)$$

Este peso molecular tiene un valor desplazado hacia las fracciones de alto peso molecular en contraposición a lo que se observa con el M_n . Cuando $M_w/M_n = 1$ la muestra es monodispersa mientras que en el caso que $M_w/M_n > 1$ la muestra es polidispersa. Esta relación se denomina índice de polidispersidad y frecuentemente es tomado como una medida del grado de dispersión de la muestra (ver, por ejemplo, Rodríguez, 1970; Morawetz, 1975; Bird, et al., 1977). No obstante, el índice de polidispersidad no define completamente este aspecto microestructural de la muestra. Por ejemplo, dos muestras pueden arrojar índices de polidispersidad aproximados y, sin embargo, poseer distribuciones de peso molecular muy diferentes. En este

sentido, la distribución de pesos moleculares (designada *MWD* en esta tesis) resulta más representativa del grado de dispersión de una muestra polimérica. En efecto, la *MWD* se puede expresar a través de la función densidad de distribución de pesos moleculares, $f_w(M)$, la cual se describe seguidamente (ver, por ejemplo, Deiber et al., 1993 y 1997; Peirotti et al., 1998).

Dada una muestra polimérica compuesta por N fracciones de fracción másica w_i y peso molecular M_i , la función acumulativa $W(M_i)$ queda definida de la siguiente manera,

$$W(M_i) = \sum_{i=1}^{I < N} w_i < 1 \quad (2.2.3)$$

Si se consideran las N fracciones se obtiene que $W(M_N) = 1$. Asimismo, cuando la función acumulativa $W(M)$ es continua se puede expresar de la siguiente forma,

$$\lim_{M \rightarrow \infty} W(M) = 1 \quad (2.2.4)$$

En este contexto, la función de densidad de distribución continua $f(M)$ se obtiene a partir de la derivada de la función acumulativa $W(M)$ (Kendall y Stuart, 1977),

$$\frac{dW(M)}{dM} = f(M) \quad (2.2.5)$$

Por consiguiente, $W(M)$ también se puede se expresar en forma integral de la siguiente manera,

$$W(M) = \int_0^M f(M) dM \quad (2.2.6)$$

Definiendo una nueva función densidad de distribución de pesos moleculares $f_w(M) = f(M)M$ y realizando un cambio de variables la ecuación (2.2.6) se puede expresar,

$$W(M) = \int_0^M \frac{f(M)}{M} M dM = \int_{-\infty}^{\ln M} f_w(M) d \ln M \quad (2.2.7)$$

Considerando valores de M cercanos a infinito se obtiene,

$$W(\infty) = 1 = \int_0^{\infty} f(M) dM = \int_{-\infty}^{\infty} f_w(M) d \ln M \quad (2.2.8)$$

Cabe aclarar aquí que para obtener $f_w(M)$ a partir de datos experimentales se genera un problema del tipo “*ill posed*” en el sentido que infinitas soluciones satisfacen la ecuación (2.2.7) (Baker, 1977). No obstante, existen algoritmos que permiten obtener una expresión adecuada de $f_w(M)$ para cada caso particular y que puede ser validada con datos experimentales (ver, por ejemplo, Deiber et al., 1993 y 1997; Peirotti et al., 1998; Peirotti y Deiber, 2003).

Mediante $f_w(M)$ se pueden obtener los pesos moleculares promediados M_w y M_n , definidos previamente en las ecuaciones (2.2.1) y (2.2.2) (ver, por ejemplo, Deiber et al., 1993 y 1997; Peirotti et al., 1998). En este sentido, la expresión continua equivalente a la ecuación (2.2.2) resulta,

$$M_w = \int_0^{\infty} Mf(M)dM = \int_{-\infty}^{\infty} Mf_w(M)d \ln M \quad (2.2.9)$$

Asimismo, la expresión continua equivalente a la ecuación (2.2.1) es,

$$M_n = \frac{1}{\int_{-\infty}^{\infty} \frac{f_w(M)}{M} d \ln M} \quad (2.2.10)$$

En esta tesis se obtiene $f_w(M)$ de una muestra de gelatina comercial haciendo uso de la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con agregado del detergente duodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) y a partir de ésta se obtienen los pesos moleculares promedios a través de las ecuaciones (2.2.9) y (2.2.10). Este procedimiento se detalla en el capítulo 5.

2.3 Conformaciones macromoleculares en estado de equilibrio termodinámico

Uno de los modelos frecuentemente utilizados para describir las conformaciones de soluciones macromoleculares en equilibrio termodinámico es el de la cadena con rotación libre (*freely jointed chain*). Este modelo consiste

en N puntos de masa o “esferas” idénticos, conectados por $(N-1)$ varillas rígidas o conectores de longitud L como se muestra en la Figura 2.3.1. La posición de las esferas con respecto al centro de masas se encuentra especificada por el vector \underline{R}_ν , siendo $\nu = 1, 2, \dots, N$ y el vector unitario \underline{k}_ν indica la dirección desde la esfera ν hacia la esfera siguiente $\nu + 1$. Cada segmento de la cadena posee rotación libre, es decir, no hay restricciones de movimiento (Bird et al., 1977).

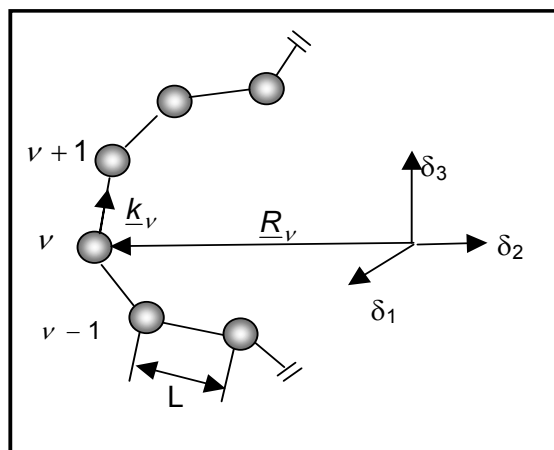


Figura 2.3.1 Sección de una cadena con rotación libre compuesta por N cuentas conectadas por $(N-1)$ varillas de longitud L (Flory, 1969; Bird et al., 1977; Bohdanecký y Kovár, 1982).

A partir de estos conceptos, se define la distancia entre los extremos de la cadena r (*end-to-end distance*) a través de la siguiente expresión (Bird et al., 1977, Bohdanecký y Kovár, 1982),

$$r^2 = (\underline{R}_N - \underline{R}_1) \cdot (\underline{R}_N - \underline{R}_1) = \underline{R} \cdot \underline{R} = |\underline{R}_N - \underline{R}_1|^2 \quad (2.3.1)$$

Asimismo, el radio de giración s se expresa,

$$s^2 = \frac{1}{N} \sum_{\nu=1}^N \underline{R}_{\nu} \cdot \underline{R}_{\nu} = \frac{1}{N} \sum_{\nu=1}^N |\underline{R}_{\nu}|^2 \quad (2.3.2)$$

Las macromoléculas flexibles varían continuamente su conformación en un modo altamente errático debido al movimiento Browniano. Como resultado de este fenómeno, tanto r como s fluctúan en el tiempo. Debido a que no es simple medir valores instantáneos de estos parámetros, es necesario la obtención de valores promedios. Por consiguiente, un sistema de esferas, como el descrito anteriormente, queda definido a través de un conjunto de coordenadas generalizadas que indican la posición $Q = \{Q_1, Q_2, \dots, Q_g\}$ y los momentos generalizados $P = \{P_1, P_2, \dots, P_g\}$ de las mismas en el cual, si no existen restricciones, $g = 3N$. No obstante, si estas restricciones existen, como en el caso en que las esferas se encuentran unidas por conectores, entonces $g < 3N$. En este contexto, la probabilidad de que a cada instante el sistema tenga coordenadas y momentos en el rango $dQ dP$ se describe con la función densidad de probabilidad $f(Q, P)$, la cual debe cumplir con la siguiente condición,

$$\iint f(Q, P) dQ dP = 1 \quad (2.3.3)$$

Integrando $f(Q, P)$ en todo el espacio de momentos se obtiene la función de distribución de conformación,

$$\psi(Q) = \int f(Q, P) dP \quad (2.3.4)$$

donde $\psi(Q)dQ$ representa la probabilidad de que a cada instante de tiempo el sistema tenga coordenadas en el rango dQ . Por consiguiente, si se consideran parámetros dinámicos, por ejemplo, $r^2(Q)$ y $s^2(Q)$ éstos tienen valores promedios definidos de la siguiente manera,

$$\langle r^2 \rangle = \int ((\underline{R}_N - \underline{R}_1) \cdot (\underline{R}_N - \underline{R}_1)) \psi(Q) dQ \quad (2.3.5)$$

$$\langle s^2 \rangle = \int \frac{1}{N} \sum_{\nu=1}^N \underline{R}_\nu \cdot \underline{R}_\nu \psi(Q) dQ \quad (2.3.6)$$

Utilizando un sistema coordenado esférico y suponiendo que la orientación del conector i th es aleatoria e independiente de la orientación de los otros conectores, la probabilidad de que éste tenga una orientación en el rango $d\theta_i d\phi_i$ es (ver, por ejemplo, Bird et al., 1977),

$$\psi_i d\theta_i d\phi_i = \frac{1}{4\pi} \text{sen}\theta_i d\theta_i d\phi_i \quad (2.3.7)$$

En efecto, mediante esta aproximación la función de distribución para la cadena completa es el producto de las funciones de distribución de los conectores individuales (Bird, et al., 1977),

$$\psi = \prod_{i=1}^{N-1} \psi_i = \left(\frac{1}{4\pi} \right)^{N-1} \prod_{i=1}^{N-1} \text{sen}\theta_i \quad (2.3.8)$$

Finalmente, introduciendo la ecuación (2.3.8) en las ecuaciones (2.3.5) y (2.3.6) se obtiene (Bird, et al., 1977; Bohdanecký y Kovář, 1982),

$$\langle r^2 \rangle = L^2(N-1) \quad (2.3.9)$$

$$\langle s^2 \rangle = \frac{1}{6} L^2 \frac{(N-1)(N+1)}{N} \quad (2.3.10)$$

Para valores grandes de N se obtiene que $\langle s^2 \rangle \cong \frac{1}{6} L^2 N$ y, por consiguiente,

$$\langle r^2 \rangle = 6 \langle s^2 \rangle.$$

2.4 Fenómenos electrocinéticos: Teoría de la doble capa eléctrica

Como se mencionó anteriormente, las macromoléculas presentan distintas conformaciones en solución las cuales, frecuentemente, se caracterizan a través de promedios estadísticos, como se mostró en la sección 2.3. Por este motivo, resulta conveniente visualizar estas macromoléculas como partículas esféricas que poseen un radio promedio. Por consiguiente, a continuación se realiza una revisión de algunos conceptos pertenecientes a la ciencia de coloides que refieren a fenómenos electrocinéticos de partículas cargadas. Estos conceptos resultan apropiados para el análisis de los resultados obtenidos en esta tesis cuando en ciertas condiciones fisicoquímicas las cadenas de gelatinas son consideradas como entidades hidrodinámicas cargadas semejantes a partículas coloidales.

Muchas macromoléculas que se disuelven en solución acuosa (o en otros solventes polares), poseen cargas eléctricas en su secuencia monomérica. Se incluyen dentro de este grupo a las proteínas, los ácidos nucleicos, ciertos polisacáridos y los polielectrolitos sintéticos. Asimismo, las soluciones de estos electrolitos se suelen formular con sales formadas por iones pequeños. En este sentido, las interacciones electrostáticas que se generan entre los macro-iones y los pequeños iones no desaparecen ni en condiciones de dilución infinita. Estas interacciones electrostáticas tienen un importante efecto en la conformación de las macromoléculas y en las propiedades ácido-base de los grupos dissociables que la componen.

En este contexto, se considera un sistema de partículas esféricas con la carga uniformemente distribuida en la superficie. Las partículas se encuentran suspendidas en un medio donde están disueltos los contra-iones de las cargas superficiales y, eventualmente, iones adicionales como se muestra en forma esquemática en la Figura 2.4.1.

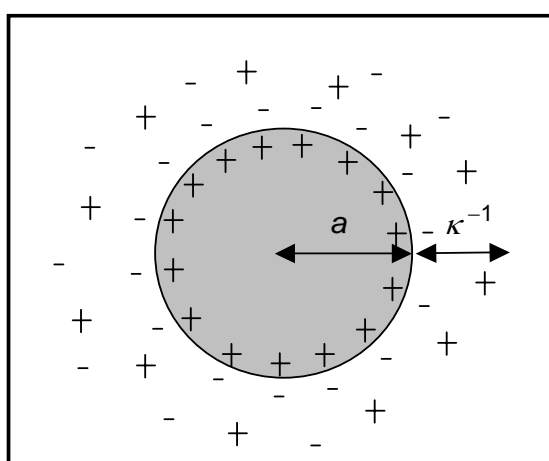


Figura 2.4.1 Esquema de una partícula de radio a con carga neta positiva (pH inferior al pI) y su doble capa eléctrica de iones, que posee una longitud característica de κ^{-1} .

Este problema electrocinético se describe a partir de la ecuación de Poisson, que relaciona la variación espacial del campo eléctrico con la densidad de carga ρ_e (Hiemenz, 1986; Probst, 1989; Russel et al., 1989),

$$\nabla^2 \psi = -\frac{\rho_e}{\varepsilon} \quad (2.4.1)$$

donde ε y ψ son la permitividad eléctrica y el potencial eléctrico del medio.

La densidad de carga ρ_e depende de la concentración numérica de iones n_i en las cercanías de la superficie de la partícula la cual puede ser expresada a través de la función de distribución de Boltzman (Hiemenz, 1986),

$$\frac{n_i}{n_o} = \exp\left(-\frac{Z_i e \psi}{k_B T}\right) \quad (2.4.2)$$

donde n_o es la concentración numérica de iones evaluada en el seno de la solución y Z_i es la valencia. Asimismo, k_B es la constante de Boltzman y T es la temperatura absoluta. Por consiguiente, la densidad de carga se relaciona con la concentración numérica de iones mediante la siguiente expresión,

$$\rho_e = \sum_i Z_i e n_i = e \sum_i Z_i n_o \exp\left(-\frac{Z_i e \psi}{k_B T}\right) \quad (2.4.3)$$

Incorporando la ecuación (2.4.3) en la ecuación (2.4.2) se obtiene la ecuación de Poisson-Boltzman. Esta ecuación se puede simplificar para las situaciones

donde se cumple $Z_i e \psi < k_B T$. En estos casos la ecuación (2.4.3) se puede expandir en series de potencia y considerar sólo el primer término, procedimiento conocido como aproximación de Debye-Hückel. De esta forma se obtiene la siguiente expresión,

$$\nabla^2 \psi = \kappa^2 \psi \quad (2.4.4)$$

donde el parámetro κ resulta ,

$$\kappa^2 = \frac{e^2 \sum Z_i n_o}{\epsilon k_B T} \quad (2.4.5)$$

En el caso particular de una esfera de radio a se asigna un valor de potencial en la superficie, es decir, $\psi(0) = \psi_o$ y éste además resulta cero en el seno de la solución. En este sentido, integrando la ecuación (2.4.4) y aplicando las condiciones de contorno mencionadas se obtiene la siguiente expresión para el potencial eléctrico,

$$\psi(r) = \psi_o \frac{a}{r} \exp[-\kappa(r-a)] \quad (2.4.6)$$

Esta ecuación permite visualizar el significado físico del parámetro κ , el cual tiene dimensiones de m^{-1} . Se observa que κ^{-1} es la longitud característica de decaimiento del potencial $\psi(r)$, a partir de su valor máximo en la superficie ψ_o .

En efecto, κ^{-1} se denomina longitud característica de la doble capa difusa de iones, o simplemente longitud de Debye.

La ecuación (2.4.6) también es útil para encontrar una relación entre el potencial de superficie ψ_0 y la carga neta eZ en la superficie de la partícula (Tanford, 1961; Hiemenz, 1986; Hunter, 1992). En este sentido, a partir de la ecuación de Poisson en forma integral, y aplicando el teorema de la divergencia de Gauss, es posible obtener el campo eléctrico en la superficie de la partícula en función de la carga,

$$\left. \frac{\partial \psi(r)}{\partial r} \right|_{r=a} = -\frac{eZ}{4\pi\epsilon a^2} \quad (2.4.7)$$

Por consiguiente, de las ecuaciones (2.4.6) y (2.4.7) se obtiene,

$$\psi_0 = \frac{eZ}{4\pi\epsilon a(1 + \kappa a)} \quad (2.4.8)$$

Para el caso de las proteínas suspendidas en agua, consideradas como una partícula coloidal, es posible estimar el estado de carga en función del pH, como se describe en las próximas secciones (ver, por ejemplo, Piaggio et al., 2005).

La longitud de Debye es frecuentemente expresada en función de la fuerza iónica I de la solución la cual se expresa,

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i Z_i^2 \quad (2.4.9)$$

donde c_i es la concentración molar de la especie i . Teniendo en cuenta que $n_i = c_i 10^3 N_A$ siendo N_A el número de Avogadro, la longitud de Debye κ^{-1} se expresa,

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{\varepsilon k_B T}{10^3 N_A 2 l e^2} \right)^{1/2} \quad (2.4.10)$$

Asimismo, cuando se trata de electrolitos monovalentes y simétricos (1:1) la longitud de Debye se reduce a (Hiemenz, 1986),

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{\varepsilon k_B T}{2 e^2 c_o N_A} \right)^{1/2} \quad (2.4.11)$$

donde c_o es la concentración de iones. Para el caso particular donde no se agrega sal al medio se puede suponer que los únicos iones presentes en solución son los contra-iones de las cargas superficiales de las proteínas.

2.5 Proteínas

Considerando que el biopolímero utilizado en esta tesis es la gelatina, resulta útil aquí revisar en forma breve algunos conceptos fisicoquímicos asociados a las proteínas en general. Como se adelantó en la sección 2.2, las proteínas son biopolímeros cuyos monómeros son los aminoácidos. Tales monómeros poseen un grupo carboxilo, un grupo α -amino y un grupo residual

que los diferencia entre sí. Los aminoácidos se unen mediante enlaces covalentes denominados enlaces peptídicos. Éstos son enlaces amida sustituida que se obtienen por eliminación de una molécula de agua entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro para formar la cadena lineal. Dichos enlaces se estabilizan por la resonancia de dos formas mesoméricas, la unión $C-N$ con la característica parcial de doble enlace y el $C=O$ con la característica de enlace simple. El enlace peptídico está formado por cuatro átomos, los cuales se encuentran en un mismo plano con dos carbonos α . Asimismo, los átomos de oxígeno e hidrógeno del grupo $CO-NH$ se encuentran en posición trans, debido a la estabilización por resonancia. En la Figura 2.5.1 se muestra un esquema de la disposición espacial de los átomos en una secuencia polipeptídica.

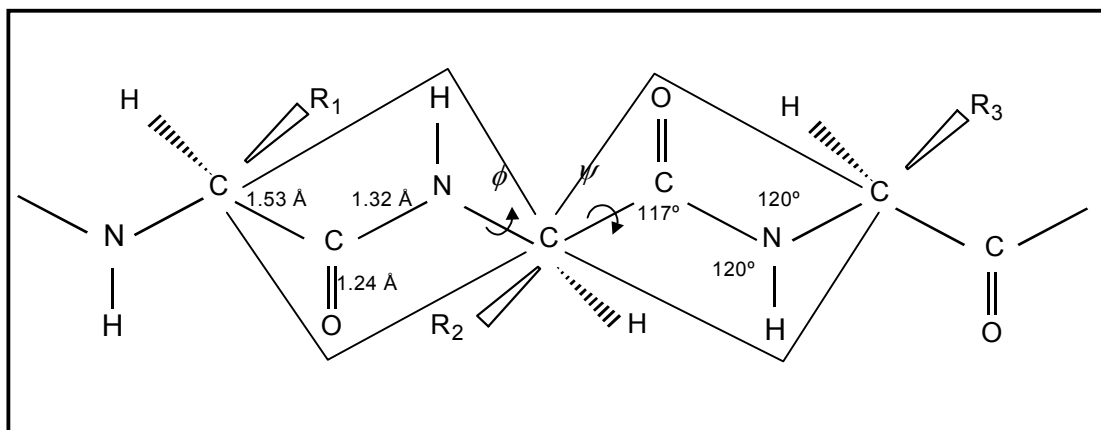


Figura 2.5.1 Esquema de un fragmento de una cadena α -L-polipeptídica. Distancia interatómica (Å) y ángulos entre enlaces ($^\circ$). ϕ y ψ representan los ángulos de rotación en torno al carbono α . R_i ($i= 1, 2, \dots, n$) representan los diferentes residuos de aminoácidos cualesquiera y están en posición trans (Cheftel et al., 1989).

En efecto, la cadena polipeptídica que conforma una proteína puede representarse como una serie de planos rígidos separados por grupos $-HCR_i$,

donde los enlaces covalentes simples de cada átomo de carbono α son los únicos que pueden rotar libremente (ver, por ejemplo, Cheftel et al., 1989, Fennema, 1993). A la secuencia lineal de aminoácidos de la cadena proteica se la denomina estructura primaria o configuración proteica (Lehninger, 1975).

Además de la estructura primaria, es también relevante mencionar la estructura secundaria. En este sentido, la hélice α es una estructura helicoidal dextrógira particularmente estable y contiene 3.6 restos de aminoácidos por vuelta. Las cadenas laterales se proyectan hacia el exterior de la hélice, como se muestra en la Figura 2.5.2.

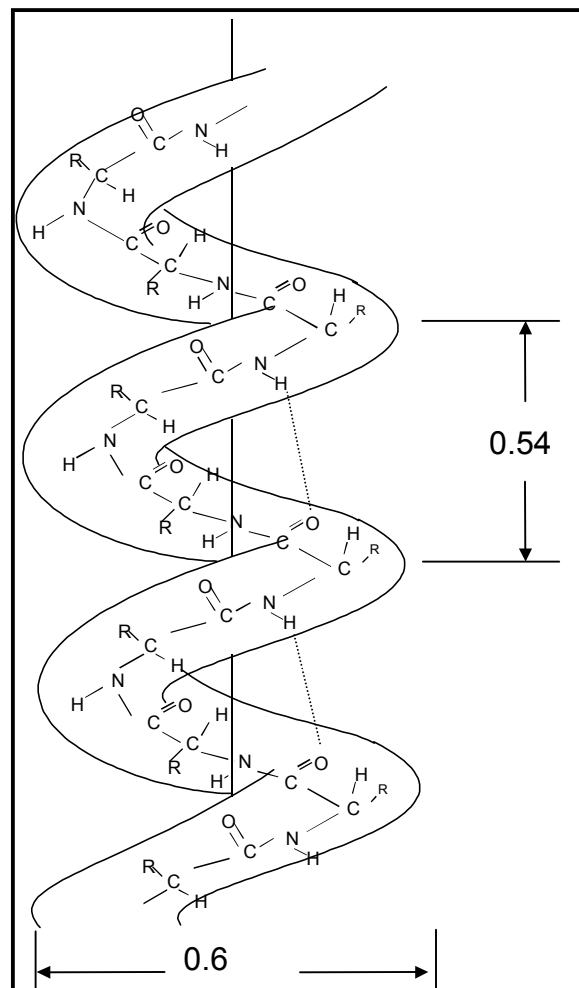


Figura 2.5.2 Esquema de la estructura de una hélice α dextrógira (Cheftel et al., 1989). Las líneas de trazos indican enlaces puente – hidrógeno.

En esta estructura, se establecen múltiples enlaces puente-hidrógeno intracatenarios, principalmente, entre el grupo $-NH-CO-$ y el oxígeno más próximo al enlace peptídico situado en el giro inferior de la hélice. Debido a que cada enlace peptídico se estabiliza mediante la formación de enlaces puente-hidrógeno y los dipolos eléctricos formados se orientan en la dirección axial, la estructura helicoidal es muy estable (Morrison y Boyd, 1987, Fennema, 1993). Sin embargo, la prolina (Pro) y la hidroxiprolina (Hyp) como consecuencia de las estructuras pirrolidínicas, pueden interrumpir la conformación helicoidal generando, por ejemplo, un plegamiento particular de la cadena. Estos plegamientos reciben el nombre de giros β . Ejemplos de proteínas donde esto ocurre son la caseína y el colágeno. Este fenómeno se produce también con otros aminoácidos debido a las propiedades electrostáticas y/o estéricas de sus cadenas laterales. Cuando esto ocurre, la cadena polipeptídica posee una estructura en la cual la distancia entre los grupos portadores de carga idéntica es máxima y entonces la energía libre de repulsión electrostática se minimiza, se generándose, entonces, zonas desestructuradas de cadenas erráticas o *random coils* (Cheftel et al. 1989, Fennema, 1993).

Otra conformación secundaria relevante en las proteínas es la estructura β , en la cual las cadenas polipeptídicas se ordenan en forma de zig-zag uniéndose por enlaces puente-hidrógeno intercatenarios para formar las denominadas hojas plegadas; todos los enlaces peptídicos intervienen en dicha formación. Asimismo, como se observa en la Figura 2.5.3, de acuerdo a la orientación de las cadenas peptídicas éstas pueden ser paralelas o antiparalelas.

Además de las α hélices y las estructuras β , las proteínas pueden presentar otros tipos de estructuras secundarias no tan frecuentes. Por ejemplo, las hélices β_{10} (a veces se encuentran en ciertas regiones de las proteínas globulares) son una variedad de α hélice con tres restos de aminoácidos por vuelta. Con menor frecuencia, es posible también encontrar en las proteínas las hélices π y las hélices γ , las cuales se diferencian de las anteriores en el número de restos aminoácidos por vuelta (ver, por ejemplo, Fennema, 1977, 1993; Cheftel et al., 1989).

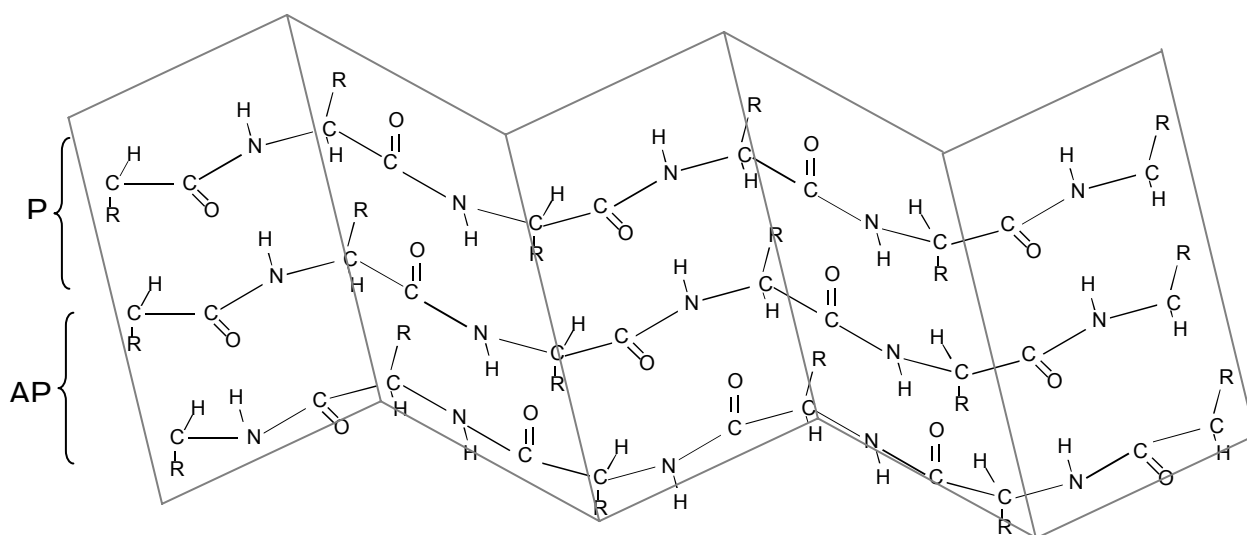


Figura 2.5.3 Esquema de la estructura de tres cadenas polipeptídicas en hojas plegadas, denominada estructura β . P: dos cadenas paralelas y AP: dos cadenas antiparalelas (Cheftel et al., 1989).

Para finalizar esta sección referida a las estructuras secundarias de proteínas, es preciso mencionar otra estructura helicoidal de relevancia en esta tesis denominada poli-L-prolina. Esta estructura presenta un elevado número de aminoácidos prolina e hidroxiprolina, lo que genera repetidos giros β (ver, por ejemplo, Neurath y Hill, 1979). Este tipo de estructuras son de particular

interés en esta tesis porque se encuentran presentes en las moléculas de colágeno y consecuentemente en las cadenas de gelatina, debido al alto contenido de aminoácidos prolina e hidroxiprolina que poseen.

Recordando que la estructura terciaria de las proteínas es la organización tridimensional de la cadena polipeptídica que comprende regiones con estructuras secundarias bien definidas y otras zonas desestructuradas, es interesante mencionar que, por ejemplo, en la mayoría de las proteínas globulares que son solubles en agua, los aminoácidos hidrofóbicos tienden a colocarse hacia el interior de la molécula, mientras que los aminoácidos hidrofílicos se reparten especialmente, en la superficie de la misma de manera bastante uniforme (ver, por ejemplo, Fennema,1977; Morrison y Boyd, 1987; Cheftel et al., 1989).

Aunque la gelatina no presenta estructura cuaternaria, la cual resulta de asociaciones de unidades proteicas, se puede mencionar que estas unidades no necesariamente presentan una organización simétrica y que las fuerzas o enlaces que estabilizan las estructuras cuaternarias son del tipo van der Waals, electroestáticas y puente-hidrógeno. Asimismo, los enlaces disulfuro, que son importantes en la formación de estructura terciaria, también pueden generar estructuras cuaternarias.

A lo largo de esta tesis, para designar el resultado de la combinación de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de una macromolécula se utiliza el término conformación. Es claro entonces que, la conformación de una macromolécula está estabilizada por diferentes tipos de fuerzas intramoleculares. Los enlaces o interacciones que mantienen la conformación nativa de una proteína son (Lehninger,1975): (a) enlaces puente-hidrógeno

entre grupos peptídicos de la cadena; (b) enlaces puente-hidrógeno entre grupos residuales; (c) interacción hidrofóbica entre residuos no polares; (d) enlaces iónicos entre grupos cargados; e) puentes disulfuro entre residuos de cisteína; (f) interacción dipolo-dipolo entre grupos polares; (g) interacciones proteína - solvente. Corresponde mencionar que la conformación de las proteínas es altamente dependiente del ambiente en el que se encuentran y se altera con los cambios de la temperatura, constante dieléctrica, pH, fuerza iónica, presencia de otras moléculas, etc (Lehinger, 1975, Fennema, 1993).

Dependiendo de la conformación, las proteínas pueden clasificarse en dos grandes grupos: las proteínas fibrosas, como el colágeno y la queratina, que consisten en polipéptidos lineales, los cuales se ordenan generando estructuras en forma de fibras u hojas. Estas proteínas constituyen elementos estructurales en los seres vivos y son generalmente insolubles en agua.

El otro grupo corresponde a las proteínas globulares, las cuales presentan estructuras tridimensionales muy complejas, que involucran un plegamiento ordenado y preciso de la cadena polipeptídica. Estas macromoléculas presentan formas que, en general, responden a funciones biológicas específicas en los seres vivos. Dentro del grupo de proteínas se pueden citar, por ejemplo, enzimas, transportadores en el suero sanguíneo, inmunoglobulinas, factores de crecimiento, interleuquinas, hormonas, etc, tan solo para mencionar algunos (Lehninger, 1975).

2.6 Carga eléctrica de las proteínas

Las proteínas pueden considerarse como polianfolitos debido a que pueden cargarse positiva o negativamente de acuerdo al pH del medio, como consecuencia de la presencia de aminoácidos básicos y ácidos en la secuencia peptídica. En este sentido, resulta relevante analizar la estructura de los aminoácidos de manera de visualizar el origen de la carga eléctrica en una cadena polipeptídica (Lehinger, 1975; Dickinson y Stainsby, 1982).

Los aminoácidos contienen en su estructura molecular un grupo amino ($-\text{NH}_2$) y un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) unidos al denominado carbono alfa. Asimismo, los aminoácidos poseen una cadena lateral de composición variable, frecuentemente denominada con la letra R y también unida covalentemente al carbono alfa. La prolina y la hidroxiprolina, que derivan de la pirrolidina, no responden a esta estructura general debido a que el grupo α -amino se encuentra dentro del anillo pirrólico y, en este caso, esta estructura particular hace que los enlaces peptídicos en los que participan estos aminoácidos den lugar a los giros β , como fue descrito en la Sección 2.5 (Lehinger, 1975; Fennema, 1993). En efecto, cada aminoácido tiene una cadena lateral R , característica que influye en sus propiedades fisicoquímicas, y por lo tanto, en las de la proteína de la cual forma parte. Debido a la presencia del grupo α -amino y del grupo α -carboxilo y de los grupos dissociables presentes en los residuos R . Un aminoácido disuelto en agua puede comportarse como un ácido o como una base dependiendo del pH de la solución como se esquematiza en la Figura 2.6.1.

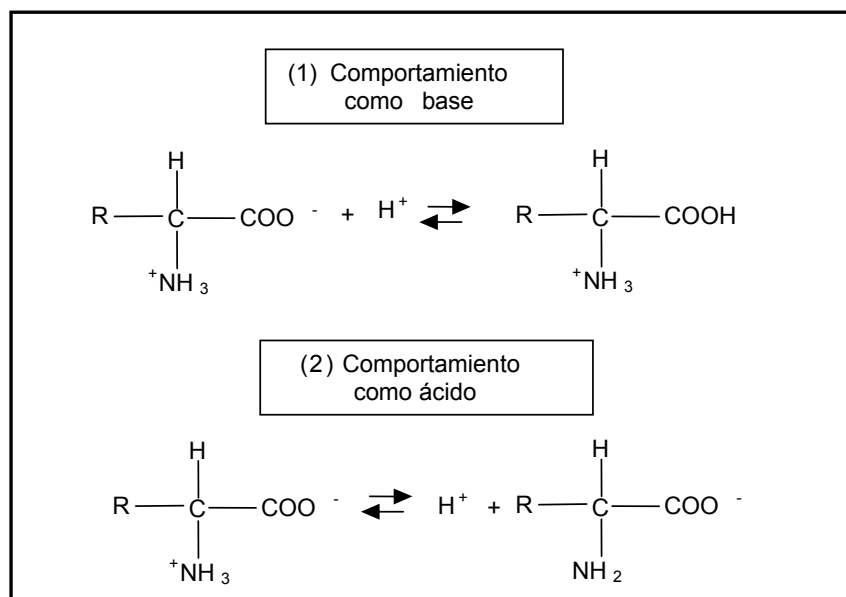


Figura 2.6.1 Comportamiento ácido y básico de los aminoácidos (Fennema, 1993).

Por lo tanto, cada grupo tiene un valor característico de pK_a en la escala ascendente de pH. En este sentido, es apropiado recordar que el pK_a se define el logaritmo de la constante de disociación afectado por el signo menos.

Por consiguiente, los pK_a en la escala ascendente de pH quedan definidos a través de las siguientes expresiones,

$$pK_{a1} = -\log \frac{[H^+][\text{amin oácido}^\pm]}{[\text{amin oácido}^+]} \quad (2.6.1)$$

$$pK_{a2} = -\log \frac{[H^+][\text{amin oácido}^-]}{[\text{amin oácido}^\pm]} \quad (2.6.2)$$

Cuando el aminoácido posee una cadena lateral cargada, además de los valores de pK_a asociados a los grupos α -amino y α -carboxilo, se requiere

también el pK_{aR} correspondiente a la disociación del grupo lateral cargado. En la Tabla 2.6.1 se listan los valores de pK_{a1} , pK_{a2} y pK_{aR} para los grupos ionizables de los distintos aminoácidos. En esta tabla también se citan los valores de punto isoeléctrico (pI) de cada aminoácido recordando que éste es el valor de pH en el que la carga neta del aminoácido en solución es cero (Fennema, 1993).

Tabla 2.6.1 Valores de pK_{a1} , pK_{a2} , pK_{aR} y pI de los aminoácidos a 25°C (Fennema, 1993).

Aminoácido	Símbolo	pK_{a1} (α -COO ⁻)	pK_{a2} (α - ⁺ NH ₃)	pK_{aR} (R = cadena lateral)	pI
Alanina	Ala	2,35	9,69		6,02
Arginina	Arg	2,17	9,04	12,48	10,76
Asparagina	Asn	2,02	8,80		5,41
Ácido Aspártico	Asp	2,09	9,82	3,86	2,97
Cisteína	Cys	1,96	10,28	8,18	5,07
Glutamina	Gln	2,17	9,13		5,65
Ácido Glutámico	Glu	2,19	9,67	4,25	3,22
Glicina	Gly	2,34	9,78		6,06
Histidina	His	1,82	9,17	6,00	7,58
Isoleucina	Ile	2,36	9,68		6,02
Leucina	Leu	2,36	9,64		6,00
Lisina	Lys	2,18	8,95	10,53	9,74
Metionina	Met	2,28	9,21		5,75
Fenilalanina	Phe	1,83	9,24		5,53
Prolina	Pro	1,99	10,6		6,30
Serina	Ser	2,21	9,15		5,68
Treonina	Thr	2,71	9,62		6,16
Triptófano	Trp	2,38	9,39		5,89
Tirosina	Tyr	2,20	9,11	10,07	5,65
Valina	Val	2,32	9,62		5,97
Ornitina ^a	Orn	1,94	8,65	10,76	9,70

^a La ornitina no es uno de los 20 aminoácidos codificados por el ADN celular sino que se produce por decarboxilación de la arginina. Este aminoácido es de particular interés en esta tesis debido a que se genera durante el proceso de extracción alcalino de la gelatina luego de la liberación de úrea (Ward y Courts, 1977).

Además, según la polaridad de la cadena lateral R es posible clasificar a los aminoácidos en cuatro clases (Fennema, 1993): (a) aminoácidos con

cadenas laterales no polares o hidrofóbicas, (b) aminoácidos con cadenas laterales polares no cargadas o hidrofílicas, (c) aminoácidos con cadenas laterales cargadas positivamente (para un pH alrededor de 7) y (d) aminoácidos con cadenas laterales cargadas negativamente (para un pH alrededor de 7).

Por lo antes mencionado, las proteínas poseen una carga neta en su configuración o estructura primaria debido a que en el equilibrio ácido-base participan los grupos ionizables de las cadenas laterales de algunos aminoácidos (ver Tabla 2.6.1) y los grupos α -amino y α -carboxilo de los aminoácidos terminales. En este sentido, se define como carga neta la diferencia entre cargas positivas y cargas negativas de la proteína tomadas en valor absoluto. No obstante, la ionización de un determinado grupo se ve afectada por la proximidad de otros grupos ionizados, por grupos hidrofóbicos o por enlaces puente-hidrógeno (Piaggio et al., 2005 y 2006). En solución acuosa, la mayor parte de los grupos ionizables están localizados en la superficie de la proteína. Asimismo, como se mencionó anteriormente, la proteína posee una carga neta cero en el punto isoeléctrico (pI); a este pH los polianfolitos no migran cuando se sitúan en un campo eléctrico externo como ocurre, por ejemplo, en la electroforesis. Es interesante mencionar que el pI de una proteína se puede estimar basándose en los aminoácidos que la constituyen. Para esta evaluación se requiere despreciar los efectos descritos anteriormente. Asimismo, el pI varía según el medio en el que se encuentra disuelta la proteína. En efecto, ciertos iones pueden ligarse a la proteína y modificar el pK_a de los grupos ionizables (Tanford, 1961; Dickinson y Stainsby, 1982; Fennema, 1993).

2.7 Hidratación de las proteínas

Las proteínas interactúan con el agua a través de sus enlaces peptídicos (mediante interacciones dipolo – dipolo o puente – hidrógeno) o a través de las cadenas laterales de los aminoácidos (mediante interacciones con grupos ionizados polares e incluso no polares). En este contexto, el agua asociada a las proteínas se puede clasificar en: (a) agua constitucional, localizada en la parte interna de la macromolécula; (b) agua interfacial, localizada en las superficies y en las cavidades; (c) agua periférica, que tiene disminuida la movilidad por la presencia de la macromolécula (Fennema, 1977, 1993). Es conveniente mencionar que el agua asociada no está totalmente inmovilizada.

La temperatura en general aumenta la hidratación, pero la solubilidad de las proteínas aumenta en un rango estrecho. Asimismo, los iones de sales neutras a molaridades del orden de 0,5 - 1 M aumentan la hidratación y la solubilidad de las proteínas (efecto de *salting-in*) al aumentar la ionización de los grupos residuales de la cadena. Cuando la fuerza iónica es elevada (mayor a 1 M aproximadamente) la solubilidad de la proteína disminuye y puede ocurrir la precipitación total (efecto de *salting-out*). Éste es un fenómeno complejo pero se debe fundamentalmente a que la alta concentración salina puede remover el agua de hidratación (debido a la competencia entre los iones salinos y la proteína, por el agua) con la consecuente pérdida de solubilidad (Tanford, 1961; Lehninger, 1975; Fennema, 1993; Israelachvili, 1995).

En lo que respecta a esta tesis, donde se estudia la hidrodinamia de las proteínas en soluciones diluidas a través de mediciones de viscosidad

intrínseca, viscosidad reducida y viscosidad específica (ver Capítulos 7, 8 y 9) es importante mencionar que sólo resulta de interés considerar el agua total inmovilizada por la proteína, sin necesidad de distinguir los mecanismos de inmovilización. En efecto, desde este punto de vista científico interesa describir a la proteína a través de un radio hidrodinámico efectivo, el cual es el resultado de la masa acuosa y proteica.

2.8 Bibliografía

- Aklonis, J.; Macknight, W. Y Mitchel, S. (1972). *Introduction to polymer Viscoelasticity*. John Wiley & Sons, New York.
- Allen, G. y Bevington, J. C. (1989). *Comprehensive polymer science*. Vol 1, Pergamon pressplc, New York.
- Baker, C. T. H. (1977). *The Numerical Treatment of Integral Equations*. Cabridge University Press: Oxford.
- Bird, R. B., Armstrog R. y Hassager O. (1977). *Dynamic of polymeric liquid*. Vol. I. John Wiley & Sons, New York.
- Bohdanecký M. y Kovář, J. (1982). *Viscosity of polymer solutions*. Elsevier Scientific Publishing Company, New York.
- Cheftel, J. C., Cuq J. L. y Lorient D. (1989). *Proteínas alimentarias*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza (España).
- Creighton, T. E. (1993). *Proteins, Structures and Molecular Properties*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Deiber, J. A.; Peirotti, M. B. y Bortolozzi, R. A. (1993). Estimation of molecular weith distribution of elastomers and polymer melts through dynamic rheometry. *Journal of elastomers and plastics*, 25, 22-45.
- Deiber, J. A.; Peirotti, M. B. y Gappa, A. (1997). The linear viscoelstic relaxation modulus related to MWD of linear homopolymer blends. *Journal of elastomers and plastics*, 29,290-313.
- Dickinson, E. y Stainsby, G. (1982). *Colloids in Foods*. Applied Science Publishers, London.

- Fennema, O. (1977). Water and protein hydration. In *Food Proteins*, eds. Whitaker, J. y Tannenbaum S. AVI Publishing, Westport.
- Fennema, O. R. (1993). *Química de los alimentos*. Editorial Acribia, S. A., Zaragoza (España).
- Flory P. J. (1969). *Statistical Mechanics of Chains Molecules*. New York: Interscience Publishers, a division of John Wiley & Sons.
- Greenstein, J. P. y Winitz, M. (1961). *Chemistry of the amino acids*. Vol I. John Wiley & Sons, New York.
- Hiemenz, P. C. (1986). *Principles of colloid and surface chemistry*, Library of Congress Cataloging in Publication Data, New York.
- Hunter, R. (1992). *Foundations of Colloids Science*, Vol I. Oxford: Clarendon Press.
- Israelachvili, J. (1992). *Intermolecular & Surface Forces*. New York: Academic Press.
- Kendall, M. y Stuart, A. (1977). *The advanced theory of statistics*. Vol 1, Macmillan Publishing Co., Inc., New York.
- Lehninger, A. (1975). *Biochemistry*. Worth, New York.
- Macosko, C. W. (1994). *Rheology principles, measurements and applications*. VCH Publishers, Inc, New York.
- Morawetz, H. (1975). *Macromolecules in solution*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Morrison, R. T. y Boyd R. N. (1987). *Química orgánica*. Quinta edición. Ed. Addison-Wesley. Iberoam.
- Neurath, H. y Hill, R. L. (1979). The proteins. In *The chemistry and Biology of Collagen*. Academic Press, Inc. New York, San Francisco, London.

- Peirotti, M. B. y Deiber, J. A. (2003). Estimation of the molecular weight distribution of linear homopolymer blends from linear viscoelasticity for bimodal and high polydisperse samples. *Lat. Am. Appl. Res.*, 33, 185 – 194.
- Peirotti, M. B.; Deiber, J. A.; Ressia, J. A.; Villar, M. A. y Vallés, E. M. (1998). Relaxation modes of molten polydimethylsiloxane. *Rheologica Acta*, 37(5), 449-461.
- Piaggio, M. V., Peirotti, M. B. y Deiber, J. A. (2006). Exploring the Evaluation of Net Charge and Hydrodynamic Size and Shape of Peptides through Experimental Electrophoretic Mobilities Obtained from Capillary Zone Electrophoresis. *Electrophoresis*, 27(23), 4631-4637.
- Piaggio, M. V.; Peirotti, M. B. y Deiber, J. A. (2005). Effect of background electrolyte on the estimation of protein hydrodynamic radius and net charge through capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, 26, 3232-3246.
- Probstein, R. (1989). *Physicochemical Hydrodynamics*. Butterworths, Boston.
- Rodriguez, F. (1970). *Principles of polymer systems*. McGraw-Hill, Inc, USA.
- Russel, W. B.; Saville, D. A. y Schowalter, W. R. (1989). *Colloidal Dispersions*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Tanford, C. (1961). *Physical Chemistry of Macromolecules*. John Wiley & Sons, New York.
- Ward, A. G. y Courts, A. (1977). *The science and technology of gelatin*. Academic Press, New York.

Capítulo 3



Gelatina y Colágeno

3 Colágeno y gelatina

3.1 Introducción

En el presente capítulo se realiza una descripción breve de las características estructurales y fisicoquímicas de la gelatina (la cual es el biopolímero que se estudia en esta tesis) y de las de su precursor el colágeno. Asimismo, seguidamente se mencionan algunas de las aplicaciones de la gelatina en las industrias alimenticia, fotográfica y biomédica siendo posible evidenciar de esta manera la versatilidad que posee esta macromolécula y el amplio panorama de situaciones que requieren un mayor estudio.

Debido a que en los siguientes capítulos (ver, por ejemplo el Capítulo 4) se realiza una discusión de las diferentes fenomenologías que presentan las soluciones de gelatina en los distintos rangos de concentración y temperatura, también se consignan brevemente aquí algunas propiedades físicas de las soluciones de gelatina que frecuentemente se utilizan como herramienta para el estudio y caracterización de estos sistemas macromoleculares.

Finalmente, se detallan en este capítulo los métodos de ensayo utilizados en la industria para determinar las propiedades mecánicas del gel de gelatina mostrándose de esta forma la necesidad de nuevos desarrollos y técnicas que permitan una mejor caracterización de este producto.

3.2 Colágeno

El colágeno es la fibra más abundante del tejido conectivo. Las fibras colagénicas son flexibles y tienen una notable resistencia a la fuerza tensional. Si se examinan con el microscopio óptico, las fibras de colágeno se caracterizan por aparecer como estructuras onduladas de espesor variable y longitud indeterminada. Con la ayuda de la microscopía electrónica se observa que estas fibras están compuestas por haces de delgadas subunidades filamentosas, designadas fibrillas colagénicas, las cuales se observan en la Figura 3.2.1 (Ross et al., 1992).

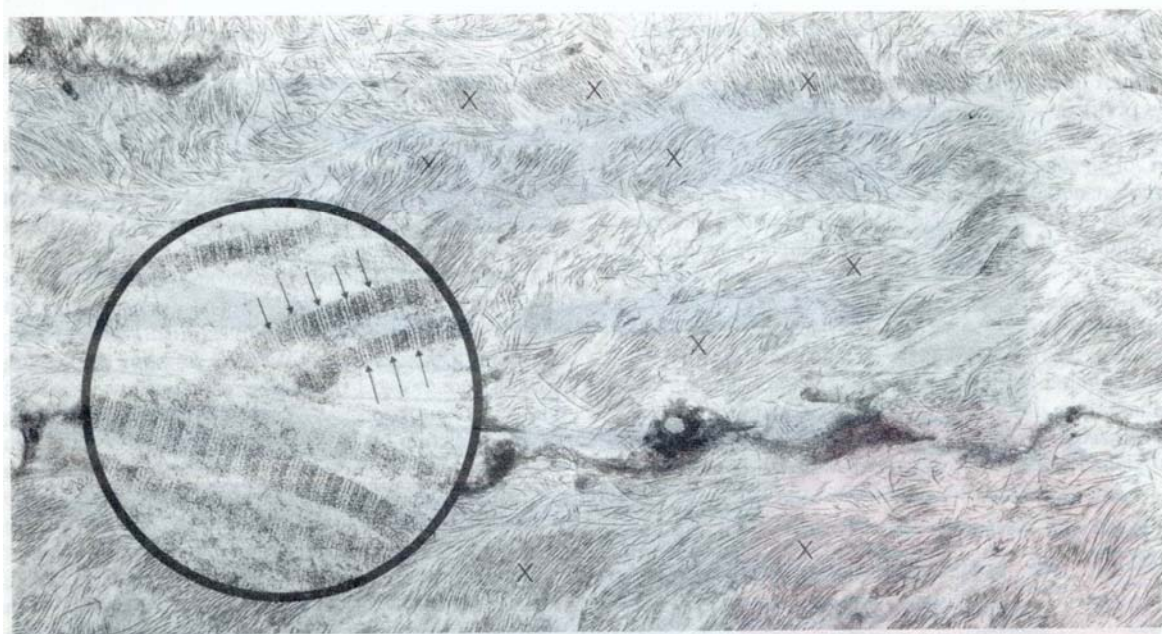


Figura 3.2.1 Microfotografía electrónica de tejido conectivo denso. En el círculo aparecen con mayor aumento cortes longitudinales de fibrillas colagénicas paralelas. Nótese las bandas transversales. Las flechas indican el espacio de periodicidad de 68 nm (Ross et al., 1992).

Las fibrillas colagénicas cuando se tiñen con osmio u otro metal pesado presentan una secuencia de bandas transversales espaciadas que se repiten

cada 68 nm en toda su longitud (ver, detalle en la Fig. 3.2.1). Las bandas son un reflejo de la disposición estructural, específicamente del tamaño y de la forma de las moléculas de colágeno que forman la fibrilla. Esta disposición se esquematiza en la Figura 3.2.2.

La estructura básica del colágeno, la cual se denomina tropocolágeno, es una proteína fibrosa de un peso molecular algo menor a 300.000 Da, mide unos 300 nm de longitud por 1,5 nm de espesor. Para formar la fibrilla, las moléculas de colágeno se alinean empalmando extremo con extremo, en hileras que se superponen presentando brechas entre las moléculas de cada hilera. La secuencia en bandas que se observa con el microscopio electrónico se debe al depósito de osmio en el espacio entre los extremos de las moléculas de cada hilera. Cada molécula de tropocolágeno está compuesta de tres cadenas polipeptídicas entrelazadas. Cada uno de estos polipéptidos se denomina cadena alfa y posee un peso molecular de 90.000 Da, aproximadamente. Estas cadenas se entrelazan para formar una triple hélice dextrógira (ver, Figura 3.2.2.d).

Cada cadena alfa se enrolla como hélice levógira de tres residuos de aminoácidos por giro, y se ubican en las esquinas de un triángulo equilátero de 0,5 nm de lado. Las tres cadenas juntas forman una súper hélice dextrógira con un paso repetido de 8,6 nm y una traslación de 0,286 nm (Ledward, 1986). Las cadenas del tipo alfa poseen una composición y secuencia aminoacídica característica donde la glicina aparece cada tres residuos de aminoácidos, salvo en las terminales de la cadena. A menudo, a cada glicina le precede una hidroxiprolina y le sigue una prolina. Esta estructura de glicina con

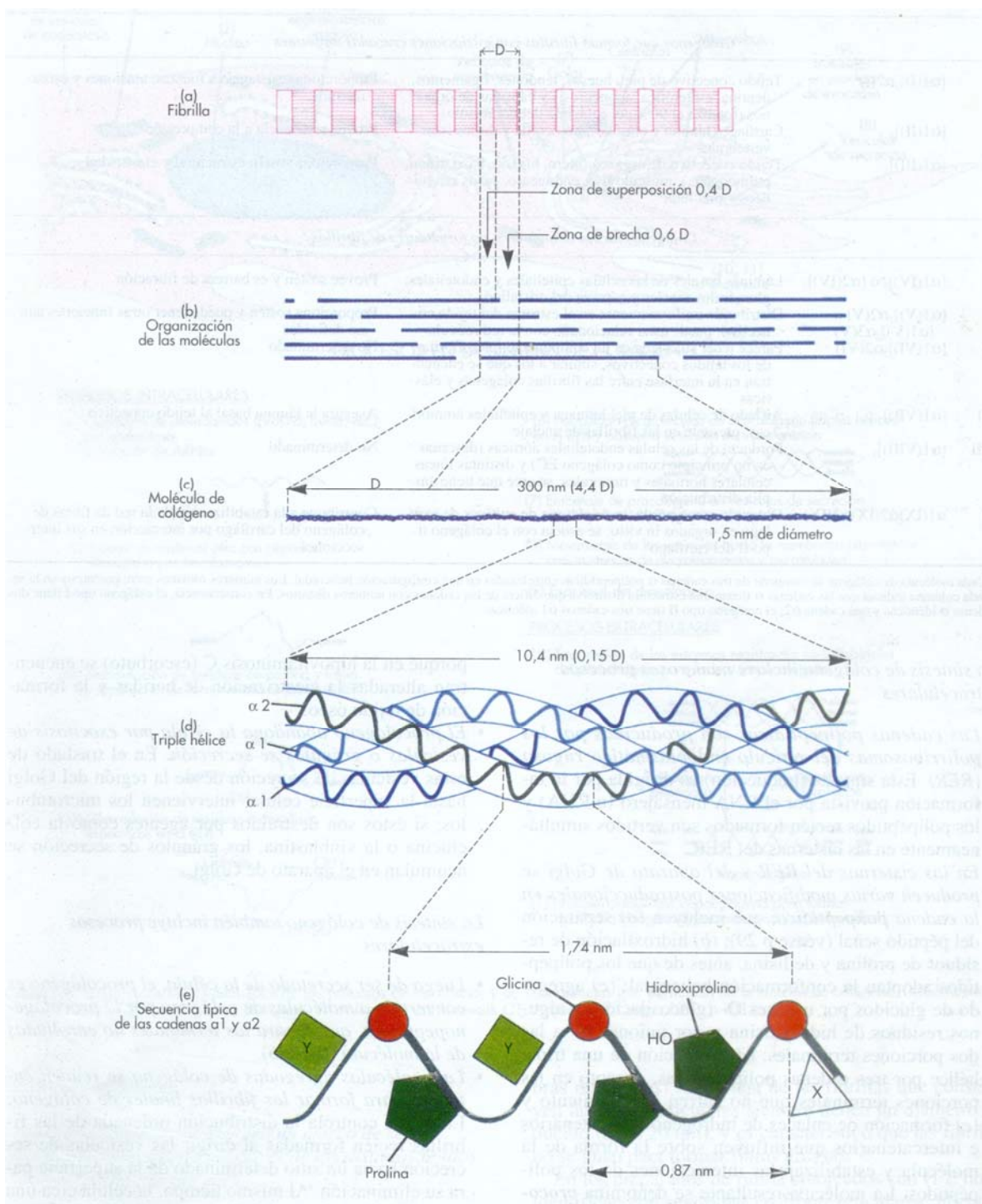


Figura 3.2.2 Diagrama que muestra las características moleculares de una fibrilla de colágeno en orden decreciente de estructura. (a) La fibrilla de colágeno presenta bandas transversales con una periodicidad de 68 nm (D). (b) Disposición en escalera de las moléculas de colágeno. (c) Triple hélice de colágeno de 300 nm de longitud y $1,5 \text{ nm}$ de diámetro. (d) Composición de la triple hélice. (e) Secuencia típica de una cadena α , la glicina aparece cada tres aminoácidos. En la posición X suele haber una prolina y en la posición Y una hidroxiprolina (Ross et al., 1992).

hidroxiprolina y prolina es esencial para la conformación de la triple hélice (ver Figura 3.2.2e) debido a que esto permite un acercamiento entre las cadenas del tipo alfa y la existencia de enlaces del tipo puente-hidrógeno intercatenarios entre el grupo carboxilo de la glicina y el grupo hidroxilo de la hidroxiprolina (Cheftel et al., 1989; Ross et al., 1992). El contenido de grandes cantidades de residuos de prolina e hidroxiprolina, genera un impedimento estérico a la rotación alrededor de las uniones peptídicas. En consecuencia, se favorece la configuración trans-poli-L-prolina II frente a la configuración cis. A los residuos hidroxilos de la hélice se le asocian grupos hidrocarbonados, por lo cual el colágeno se considera una glucoproteína (Ross et al., 1992).

Las cadenas denominadas alfa difieren en la secuencia y en el número de aminoácidos. Basándose en estas diferencias, se han encontrado hasta el momento, 20 tipos distintos de moléculas de colágeno. Los cinco tipos de colágeno más comunes y mejor caracterizados se describen a continuación (Ross et al., 1992):

- El colágeno Tipo I está formado por dos cadenas (α_1) cuya secuencia de aminoácidos es idéntica mientras que la tercera (α_2) es diferente. Por consiguiente se designa $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$.
- El colágeno Tipo II posee las tres cadenas equivalentes y se representa por $[\alpha_1(II)]_3$.
- El colágeno Tipo III es similar al colágeno tipo II y se designa como $[\alpha_1(III)]_3$.
- El colágeno Tipo IV está formado por tres cadenas iguales y existen dos subtipos denominados $[\alpha_1(IV)]_3$ y $[\alpha_2(IV)]_3$.
- El colágeno Tipo V está formado por dos cadenas iguales y una diferente, es decir $[\alpha_1(V)]_2\alpha_2(V)$.

Considerando la revisión realizada por Ledward (1986 y 1992), no se sabe si existen uno o dos enlaces puente-hidrógenos por tripéptido. Tampoco hay seguridad de que exista una molécula de agua involucrada en estos puentes. Además, los enlaces puente-hidrógenos formados por hidroxilos de hidroxiprolina proporcionan estabilidad adicional a la molécula, y forman una extensa red cooperativa de enlaces puente-hidrógenos en la molécula final de colágeno.

Es también interesante mencionar que el contenido de prolina e hidroxiprolina en el colágeno varía marcadamente entre especies. Por ejemplo, la composición en aminoácidos de colágenos provenientes de tejidos de mamíferos y aves es aproximadamente constante. Para estos tipos de colágeno, la glicina comprende aproximadamente el 33% del total del contenido de aminoácidos, la prolina e hidroxiprolina representan el 20% y la alanina el 11% aproximadamente (te Nijenhuis, 1997). En efecto, estos cuatro aminoácidos representan las dos terceras partes de los residuos de aminoácidos que conforman el colágeno. No obstante, los colágenos provenientes de pescados muestran una mayor variación en su composición de aminoácidos, especialmente en el contenido de prolina e hidroxiprolina. Este contenido es menor cuanto menor es la temperatura del agua donde los peces viven (te Nijenhuis, 1997; Gómez-Guillén et al., 2002; Fernández-Díaz et al., 2003). La composición de los colágenos de anfibios y reptiles es algo variable también, pero, generalmente se encuentra entre la variabilidad de los mamíferos y los peces (te Nijenhuis, 1997).

El contenido de pirrolidinas (prolina e hidroxiprolina) es un factor determinante en la estabilidad térmica de la estructura del colágeno. La

presencia de una hidroxiprolina en la tercera posición, después de una prolina en la segunda posición determina significativamente la estabilidad de la estructura molecular. En efecto, esta configuración tiene la habilidad de formar enlaces del tipo puente-hidrógeno (te Nijenhuis, 1997).

3.3 Gelatina

Cuando los tejidos que contienen colágeno se someten a procesos degradativos que, usualmente, involucran hidrólisis alcalina o ácida seguido de una extracción acuosa en caliente, la estructura fibrosa del colágeno se rompe irreversiblemente y se obtiene la gelatina. Por consiguiente, el proceso de manufactura involucra la destrucción de la estructura terciaria, secundaria, y en alguna medida también la estructura primaria del colágeno nativo (Ward y Courts, 1977; Ledward, 1986). En efecto, tres tipos predominantes de cadenas se pueden encontrar después de la degradación tropo-colagénica: la cadena alfa, compuesta por una sola cadena peptídica, la cadena beta, formada por dos cadenas peptídicas conectadas y la gamma, que resulta del vínculo entre tres cadenas. Debido a la presencia de las mismas y sus fragmentos intermedios, una muestra de gelatina comercial tiene una amplia distribución de pesos moleculares (*MWD*). En menor cantidad se detectan fracciones de pesos moleculares pequeñas y muy altas (Normand et al., 2000). En este sentido, debido a la diversidad de gelatinas que se pueden producir y ofrecer en el mercado, resulta relevante desarrollar métodos que permitan caracterizar la *MWD* de cada una de ellas. (Benguigui et al., 1991 Braidot y Deiber, 1999; Tromp et al., 2002).

La gelatina se puede extraer de tejido colagénico proveniente de diversas fuentes animales tales como piel de vaca, piel de cerdo, polvo de hueso, piel de pescado, y de otros recursos naturales de menor uso (Harrington y Rao, 1970; Harrinton y Karr, 1970; Ward y Court, 1977; Ledward, 1986). En principio, la composición en aminoácidos de la gelatina obtenida es similar a la del material colagénico del cual se obtiene y, por lo tanto, la diferencia de especies y de tipos de tejido da origen a productos distintos. Asimismo, los diferentes materiales colagénicos requieren variaciones en la naturaleza y severidad del tratamiento durante el proceso de obtención lo cual da lugar a variabilidades en el producto obtenido. Por ejemplo, el proceso alcalino, a través de la remoción de grupos amida, provee una gelatina con una alta densidad de grupos carboxilos que la hacen negativamente cargada a pH neutro es decir, el punto isoeléctrico pI es relativamente bajo. Por el contrario, la naturaleza eléctrica del colágeno no es sustancialmente modificada mediante el proceso de extracción ácido y como resultado se obtiene una gelatina con un punto isoeléctrico relativamente alto (Ward y Courts, 1977).

La gelatina posee propiedades características, por ejemplo, forma una solución de elevada viscosidad en agua y produce un gel cuando esta solución se enfría. Asimismo, como se mencionó anteriormente en el Capítulo 2, estas macromoléculas en solución se comportan como polianfolitos debido a la composición de aminoácidos básicos y ácidos (Dobrynin et al., 2004). En general, el estado conformacional de las cadenas de gelatina es altamente dependiente del medio fisicoquímico en el que se encuentran disueltas, teniendo en cuenta que estas moléculas tienden a estabilizarse mediante diferentes tipos de fuerzas inter e intra-moleculares, en las que intervienen

principalmente los enlaces del tipo puente-hidrógeno, (ver, por ejemplo, Pezron et al., 1991; Hering et al., 1991; Djabourov et al., 1993; Bohidar y Jena, 1994; Bohidar, 1998; Tromp et al., 2002).

3.4 Aplicaciones de la gelatina

En el presente existe una amplia variedad de hidropolímeros que se utilizan en diferentes formulaciones dentro del ámbito de la industria alimenticia y farmacéutica. Ejemplos típicos de esto son los distintos polisacáridos y la gelatina. Por tal motivo, es importante resaltar en esta tesis la relevancia del uso de esta última.

La lista de aplicaciones de la gelatina es muy grande y hasta el presente siguen apareciendo nuevos usos. Entre ellos se puede observar que, la gelatina se utiliza como conservante, agregándose en forma seca a productos de carnes enlatadas; el ejemplo más común es el jamón embutido. De este modo, la gelatina se disuelve en la conserva y forma un gel con los jugos exudados de la carne (ver Hoffman, 1991). Asimismo, la gelatina se usa normalmente como agente gelificante en alimentos elaborados con carnes, en alimentos enlatados y en sopas y caldos de los mismos. Además, se utiliza en embutidos como jamón, lengua y otras carnes rojas. También se aplica a pollos y pescados congelados para absorber el jugo de la carne. En estos últimos casos también actúa como conservante (Poppe, 1999).

Para cada producto, se recomienda que la gelatina tenga un grado de bloom (ver Sección 3.7) y una concentración típica. También se usan mezclas de gelatina, glicerina y ácido benzoico como preservante y antioxidante en

recubrimientos no comestibles de alimentos. Estos recubrimientos son adecuados para productos como jamón, tocino, embutidos y quesos (Poppe, 1999).

La gelatina se utiliza para hacer mermeladas sin azúcar debido a la alta capacidad que posee de ligar agua. Asimismo, soluciones con grandes cantidades de azúcar, con una concentración de gelatina entre 2 a 3% y 18 a 20% de agua se utilizan en la producción de golosinas como bombones y piezas dulces con formas bien definidas. La forma final de estos productos se obtiene mediante: (a) cortes a partir de planchas del gel formado, (b) moldes de almidón donde se vierte la solución o (c) extrudado.

Soluciones de gelatina con ingredientes adicionales se utilizan en la fabricación de turrónes y caramelos masticables. Algunos postres comunes también se fabrican con gelatina y agregados de leche, huevo y cacao tales como *mousse*, *soufflé* y merengue (Poppe, 1999). No obstante, se debe señalar que algunas frutas como el ananá y la papaya contienen enzimas proteolíticas como la bromelaína, la cual hidroliza la gelatina y destruye su capacidad gelificante. En estos casos, resulta esencial cocer las frutas antes de mezclarlas con las soluciones de gelatina de manera de destruir térmicamente la proteasa (Ward y Courts, 1977).

La gelatina también se utiliza como agente estabilizante y una de las aplicaciones típicas es la fabricación de helados. En este producto la solución de gelatina inhibe el crecimiento de la cristalización y la formación de diferentes fases cuando el helado se congela, previniendo la formación de cristales gruesos de hielo. Además, la gelatina provee una textura adecuada al paladar

(Ward y Courts, 1977). También se usa como estabilizante y para reducir la sinéresis en el yogurt y en postres con leche (Poppe, 1999).

Asimismo, se puede citar la propiedad emulsificante de la gelatina en el contexto de la industria alimenticia. En efecto, se utiliza en la fabricación de algunos pastas de carnes y en las denominadas sopa - cremas. Asimismo, las propiedades adhesivas y de agente de compactación de la gelatina se aprovechan para la fabricación de productos de repostería como cremas y recubrimientos de tortas (Poppe, 1999).

La gelatina es un eficiente estabilizante de espumas y, por lo tanto, esta propiedad se explota en la fabricación de distintos productos de repostería. Es también un excelente clarificante debido a que reacciona con los polifenoles (taninos) y con otras proteínas de los jugos de fruta y vinos, formando un precipitado que deja un sobrenadante límpido y estable en el tiempo (Ward y Courts, 1977).

La gelatina también se utiliza en el desarrollo de emulsiones fotográficas y aunque últimamente se han descubierto muchos polímeros sintéticos, para esta función ésta sigue siendo el principal agente de unión de las películas y papeles fotográficos. El proceso fotográfico hace uso de muchas propiedades físicas de la gelatina tales como la gelificación, la solvatación y la capacidad de formación de películas delgadas. Para elegir el tipo de gelatina que se utiliza en fotografía se tiene en cuenta principalmente el efecto fotográfico indeseado que produce el contenido de impurezas en la muestra (Poppe, 1999).

Además de las industrias fotográfica y alimenticia, la industria farmacéutica hace un intensivo uso de la gelatina. En efecto, esta industria utiliza aproximadamente el 10% del total de la producción de gelatina y la

mayor parte se destina a la fabricación de cápsulas. En la actualidad, la elaboración de cápsulas se realiza en gran escala por medio de moldes que permiten incluir la cantidad exacta de cualquier medicamento. Las cápsulas se llenan higiénicamente y no tienen inclusiones de aire; se evita así la oxidación. Estas características son importantes en el encapsulado de vitaminas que pueden ser conservadas en forma estable por varios años (Ward y Courts, 1977; Poppe, 1999). Por otra parte, la gelatina actúa como agente de unión en la producción de comprimidos y pastillas. Para este fin, los componentes del medicamento se disuelven en soluciones de gelatina, luego se seca la mezcla y a continuación se muele hasta obtener un polvo con el que se elaboran los comprimidos. En algunos casos se realiza un recubrimiento de los comprimidos con gelatina para la protección de los componentes que contiene.

La gelatina se utiliza como adhesivo con agregados de medicamentos, óxido de zinc, glicerol y agua en muchos vendajes de protección. Además, se fabrican esponjas a partir de hidrogeles estériles de gelatina que se hacen insolubles mediante un tratamiento con aldehídos o mediante tratamiento enzimático (Bigi et al., 1998; Bigi et al., 2001; Crescenzi et al., 2003). Estas esponjas se confeccionan de varios tamaños y grados de flexibilidad y se utilizan en cirugías substituyendo tejidos. Luego, las enzimas proteolíticas digieren el material que posteriormente es reabsorbido completamente. Estos hidrogeles también se utilizan como sistemas para liberación controlada de drogas. Para una liberación controlada local, se utilizan como sistemas de implantación y para la liberación controlada generalizada se utilizan en forma de microesferas inyectables (Tabata e Ikada, 1998; Tabata et al., 1998; Bigi et

al., 1998; Bigi et al., 2001; Chiellini et al., 2001; Einerson et al., 2002; Crescenzi et al., 2003; Bigi et al., 2004; Pannier et al., 2004).

3.5 Propiedad gelificante de las soluciones de gelatina

Como se mencionó anteriormente, una de las propiedades más conocidas de la gelatina es la capacidad que posee este producto de formar geles. Los geles de gelatina existen en un pequeño rango de temperatura y las propiedades mecánicas son muy sensibles a las variaciones térmicas, y aun a una temperatura constante dependen del tiempo y de la historia térmica previa (Ward y Courts, 1977; Joly-Duhamel et al., 2002b; van den Bosch y Gielens, 2003). En efecto, las soluciones de gelatina son líquidas para temperaturas relativamente altas pero en la medida que la temperatura desciende por debajo de cierto valor crítico, se producen cambios que transforman ese líquido en un gel, si la concentración es mayor a $C \approx 1\%$ p/v (Bohidar y Jena, 1993; Ross-Murphy, 1997; Tosh et al., 2003).

El fenómeno denominado gelificación involucra un número de eventos, los cuales tienen sus propias características distintivas. En efecto, cuando la solución se enfría se produce la agregación parcial de moléculas de gelatina. Este fenómeno tiene lugar aún si la solución es tan diluida como para no formar gel (Bohidar y Jena, 1993). Luego, los agregados se unen formando una red débil y si se continúa enfriando o se mantiene la temperatura constante se forma un gel cuyo módulo elástico se incrementa continuamente (Ledward, 1986; Ross-Murphy, 1992; te Nijenhuis, 1997). Durante este último período, se desarrollan diferentes estructuras de acuerdo a la historia térmica utilizada, a

través de la continua reformación (*annealing*) de las uniones en la red (Ferry, 1948; Djabourov y Papon, 1983; Clark y Ross-Murphy, 1987; Djabourov et al. 1988; te Nijenhuis, 1997). El cambio microestructural que lleva a la producción de esa red tridimensional es la reformación parcial de la estructura tropocolagénica original donde las zonas de unión entre las cadenas de gelatina se producen mediante la generación de estructuras de triple hélice, formándose una extensa red cooperativa de enlaces del tipo puente-hidrógeno que estabiliza esta estructura (Ledward, 1986; Djabourov et al., 1993; te Nijenhuis, 1997; Ross-Murphy, 1997).

Las condiciones de maduración de los geles de gelatina afectan las propiedades mecánicas, como por ejemplo los módulos dinámicos, G' y G'' (Carvalho y Djabourov, 1997; Ross-Murphy, 1997; Joly-Duhamel et al., 2002b; Ottone et al., 2005; Ottone y Deiber, 2005). En este sentido, Ferry (1948) realizó mediciones del módulo dinámico durante el tiempo de maduración y halló un marcado crecimiento al principio, seguido de un crecimiento adicional progresivamente más suave. Estos resultados fueron corroborados posteriormente por otros autores (ver, por ejemplo Djabourov et al., 1985, 1993; te Nijenhuis, 1997; Ross-Murphy, 1997; Normand, 2000). El módulo elástico también varía con el pH y con la presencia de electrolitos en el gel (Ward y Courts, 1977; Ledward, 1986; Haug et al., 2004). Asimismo, la adición de agentes que inhiben la formación de este tipo de enlace, tales como la úrea, el tiocianato de potasio (KSCN) y el bromuro de litio (LiBr) también debilitan la red y pueden ser considerados equivalentes a un aumento de temperatura (Ledward, 1986).

3.6 Propiedades ópticas de las soluciones de gelatina

Debido a que muchos estudios referidos a la cinética de regeneración parcial de la triple hélice de soluciones de gelatina se realizaron mediante medidas de la rotación óptica específica (ver Capítulo 4), en este punto se realiza una breve descripción las características microestructurales que provocan cambios en la rotación óptica específica de soluciones de gelatina maduradas a distintas concentraciones cuando la temperatura es inferior a la temperatura de gelificación.

La rotación óptica específica $[\alpha]_{\lambda}$ para una dada longitud de onda λ se especifica de la siguiente manera (Djabourov y Papón, 1983),

$$[\alpha]_{\lambda} = \frac{\alpha_{\lambda}}{Cl} \quad (3.6.1)$$

donde α_{λ} es el ángulo de rotación óptica en grados, C es la concentración en $\text{g } 100 \text{ cm}^{-3}$ y l es el paso óptico de la celda en dm.

Cuando en una muestra de gelatina se produce la regeneración parcial de la estructura tropocolagénica, la rotación óptica de esa muestra cambia debido a que es sensible a la presencia de la triple hélice dextrógira. Usualmente, se admite que el colágeno en su estructura nativa se encuentra en un estado de 100% helicoidal con una rotación óptica específica $[\alpha]_{589 \text{ nm}} = -400^{\circ} \pm 20^{\circ}$. Por otro lado, para el colágeno completamente desnaturalizado o para una solución de gelatina a altas temperaturas se obtiene una rotación óptica específica $[\alpha]_{589 \text{ nm}} = -120^{\circ} \pm 5^{\circ}$. Por consiguiente,

es posible establecer la fracción de cadenas χ en la conformación de hélices mediante la siguiente expresión,

$$\chi = \frac{[\alpha]_{\lambda}^{medida} - [\alpha]_{\lambda}^{desnaturalizada}}{[\alpha]_{\lambda}^{100\% \text{ hélice}} - [\alpha]_{\lambda}^{desnaturalizada}} \quad (3.6.2)$$

donde $[\alpha]_{\lambda}^{medida}$ es la rotación óptica específica medida, $[\alpha]_{\lambda}^{desnaturalizada}$ es la rotación óptica específica de una muestra de gelatina totalmente desnaturalizada (por ejemplo a $T > 50^{\circ}\text{C}$) y $[\alpha]_{\lambda}^{100\% \text{ hélice}}$ es la rotación óptica específica de una solución de colágeno, es decir, una muestra con un contenido de 100% de hélices (Djabourov y Papón, 1983).

Cuando se produce la gelificación de una muestra de gelatina se observa un rápido crecimiento de la fracción de hélices χ . Luego, a medida que transcurre el tiempo, χ disminuye gradualmente la velocidad de crecimiento pero nunca toma un valor constante (Djabourov y Papón, 1983; Djabourov et al., 1985; Djabourov et al., 1993; Joly-Duhamel et al., 2002a). En este sentido, Djabourov y Papón (1983) describen el proceso de gelificación para tiempos cortos de maduración mediante la ecuación cinética de Avrami,

$$\chi = 1 - e^{-kt^n} \quad (3.5.3)$$

donde k es la constante de velocidad, t es el tiempo de maduración y n es el exponente de Avrami.

3.7 Métodos de análisis de uso industrial para medir las propiedades mecánicas de la gelatina

Una de las técnicas más utilizadas a nivel industrial para estandarizar muestras de gelatina es la fuerza de gel o ensayo de bloom . Este ensayo de laboratorio, consiste en medir la fuerza en \vec{g} necesaria para producir una depresión de 4 mm de profundidad en un gel con un pistón de 12.7 mm de diámetro. Dicho gel tiene un tiempo de maduración de 18 horas a 10 °C y una concentración de 6,66 % p/p. Además, la viscosidad estándar es otro parámetro que usa la industria para caracterizar a sus productos. Este método consiste en medir la viscosidad en mPs de una solución de gelatina estándar (al 6,66 % p/v) a 60°C (Ward y Courts, 1977).

Los parámetros antes mencionados resultan útiles para una clasificación grosera de las gelatinas, sin embargo, sus valores no pueden globalizar todos los comportamientos reológicos y fisicoquímicos asociados a los diferentes tipos de gelatina que se producen en los distintos procesos. Es claro que estos ensayos normalizados y en cierto sentido muy prácticos, no necesariamente se encuadran en los ensayos reométricos para estandarizar materiales (Deiber, 2002).

En la actualidad existe un alto consenso en la práctica de la ingeniería que indica que la medida empírica de bloom no es un valor suficientemente representativo y adecuado, tanto del poder gelificante como de la calidad de las otras propiedades funcionales de las gelatinas producidas para diferentes usos industriales. Por consiguiente, aparte de la medición del bloom se requiere aplicar técnicas reológicas y fisicoquímicas modernas en la caracterización de

gelatinas para lograr productos de alta calidad y con capacidad de captación de mercados nacionales e internacionales, donde los factores de competitividad tienen como punto de referencia la excelencia, aparte de la producción eficiente (Deiber, 2002).

En un contexto más amplio, la caracterización reológica - reométrica de una solución de gelatina implica evaluar en principio las propiedades viscoelásticas lineales $G'(\omega, t_m)$ y $G''(\omega, t_m)$ y la viscosidad aparente $\eta(pH, l, \dot{\gamma}, C\%, T, t_m)$ en función de los siguientes parámetros: frecuencia ω , velocidad de corte $\dot{\gamma}$, tiempo de maduración t_m , temperatura T , concentración C y pH como variables significativas, en el contexto de los modelos reológicos, cuyas funciones reométricas son a su vez funciones de la distribución de pesos moleculares (MWD) (Deiber, 2002).

En este sentido, apuntando a las necesidades actuales mencionadas, en esta tesis se obtiene la MWD de una muestra de gelatina haciendo uso de la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida seguida de una densitometría y análisis computacional (ver Capítulo 5). Asimismo, se realiza un estudio detallado del comportamiento de soluciones diluidas (ver Capítulos 7, 8 y 9) y concentradas de gelatina (ver Capítulo 9) y se evalúan los diferentes comportamientos de las mismas al ser expuestas a distintas condiciones fisicoquímicas.

3.8 Estabilidad y seguridad de la gelatina

La gelatina se considera como un ingrediente alimenticio más que como un aditivo y es un producto GRAS (*Generally Regarded as Safe*) y puede ser

traducido como “producto generalmente considerado seguro”. En 1993 la FDA (*Food and Drug Administration*) reiteró el estatus de GRAS de la gelatina y estableció que no había objeción en el uso de la misma proveniente de ninguna fuente y de ningún país. Sin embargo, con el advenimiento de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE) en Europa se desarrolló temor por la transmisión de la enfermedad a humanos por parte de los productos bovinos. Actualmente se reconoce que la BSE es un problema neurológico y cerebral y que no está asociado con el cuero o piel del animal. Además, se reconoce que el proceso de manufactura de gelatina hace casi imposible la supervivencia del prion si este estuviera presente. Por lo tanto, la gelatina conserva todavía su estatus de sustancia GRAS.

La gelatina es un excelente medio de crecimiento para la mayoría de las bacterias, por lo tanto se debe tener especial cuidado durante la manufactura para evitar contaminaciones (Ward y Courts, 1977). Estos cuidados se pueden evidenciar en los programas documentados de HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) utilizados por los fabricantes de todo el mundo. Asimismo, para asegurar la reproducibilidad del producto la mayoría de las compañías han implementado recientemente los sistemas de gestión de calidad ISO 9000.

La gelatina seca posee una vida útil aproximadamente infinita, siempre y cuando la temperatura de almacenamiento se encuentre por debajo de la temperatura de transición vítrea, la cual es de aproximadamente 190°C (Ward y Courts, 1977). En cuanto a la estabilidad de las soluciones de gelatina, esta depende de la temperatura y del pH. Generalmente, para minimizar la pérdida de la fuerza de gel y de viscosidad en el tiempo, el pH de las soluciones

debería encontrarse en un rango de 5 a 7 mientras que la temperatura debería ser lo mas baja posible. Usualmente la degradación o hidrólisis es causada por la proliferación microbiana, por lo tanto las soluciones de gelatina no deben ser almacenadas durante tiempos más prolongados a los estrictamente necesarios (Ward y Courts, 1977).

3.9 Bibliografía

- Benguigui, L.; Busnel, J. P. y Durand, D. (1991). Study of junction zones in gelatin gels through selective enzymatic digestion. *Polymer*, 32(14), 2680-2685.
- Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S. y Rubini, K. (2004). Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, 25, 5675-5680.
- Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S.; Rubini, K. y Roveri, N. (1998). Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*, 22, 763-768.
- Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S.; Rubini, K. y Roveri, N. (2001). Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*, 22, 763-768.
- Boedtker, H. y Doty, P. (1954). A study of gelatin molecules, aggregates and gels. *J. of Chem. Phys.*, 5, 968-982.
- Bohdanecký, M. y Kovář, J. (1982). *Viscosity of Polymer Solutions*. New York: Elsevier Scientific Publishing Company.
- Bohidar, H. B. (1998). Hydrodynamic properties of gelatin in dilute solutions. *Int. J. Biol. Macrom.*, 23(1), 1-6.
- Bohidar, H. B. y Jena, S. S. (1993). Kinetics of sol-gel transition in thermoreversible gelation of gelatin. *J. of Chem. Phys.*, 98(11), 8970-8977.
- Bohidar, H. B. y Jena, S. S. (1994). Study of sol-state properties of aqueous gelatin solutions. *J. of Chem. Phys.*, 100(9), 6888-6895.
- Braidot, A. A. A. y Deiber, J. A. (1999). Linear viscoelastic model of a maturing gelatin solution. *Biorheology*, 36, 267-284.

- Busnel, J. P., Morris, E. R. y Ross Murphy, S. B. (1989). Interpretation of renaturation kinetics of gelatin solutions. *Int. J. Biol. Macromol.*, 11(2), 119-125.
- Carvalho, W. y Djabourov, M. (1997). Physical gelation under shear for gelatin gels. *Rheologica Acta*, 36(6), 591-609.
- Cheftel, J. C.; Cuq J. L. y Lorient D. (1989). *Proteínas alimentarias*. Editorial Acribia S.A, Zaragoza (España).
- Chiellini, E.; Cinelli, P.; Corti, A. and Kenawy, R. (2001). Composite films based on waste gelatin: thermal-mechanical properties and biodegradation testing. *Polymer Degradation and Stability*, 73, 549-555.
- Clark, A. H. y Ross-Murphy, S. B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. In Dušek K. (Ed.) *Advances in Polym. Sci.* (Vol. 83) (pp. 57-192). New York: Springer.
- Crescenzi, V.; Francescangeli, A. y Taglienti, A. (2002). New gelatin-based hydrogels via enzymatic networking. *Biomacromolecules*, 3, 1384-1381.
- Deiber J. A. (2002). Reología y procesabilidad de gelatinas para la industria de alimentos, Proyecto PICT 09-09752.
- Djabourov, M. y Papon, P. (1983). Influence of thermal treatment on the structure and stability of gelatin gels. *Polymer*, 24(5), 537-542.
- Djabourov, M. ; Maquet, J. ; Theveneau, H. ; Leblond, J. y Papon, P. (1985). Kinetics of gelation of aqueous gelatin solutions. *British Polymer Journal*, 17(2), 169-174.
- Djabourov, M.; Leblond, J. y Papon, P. (1988). Gelation of aqueous gelatin solutions. II. Rheology of sol-gel transition. *Journal Phys. France*, 49, 2, 333-343.

- Djabourov, M.; Lechaire, J. y Galli, F. (1993). Structure and rheology of gelatin and collagen gels. *Biorheology*, 30(3), 191-295.
- Dobrynin, A. V.; Colby, R. H. y Rubinstein, M. (2004). Polyampholytes. *J. Polym. Sci.* 42,3513-3538.
- Einerson, N. J.; Stevens, K. R. y Kao, W. J. (2002). Synthesis and physicochemical analysis of gelatin-based hydrogels for drug carrier matrices. *Biomaterials*, 24, 509-523.
- Fernández-Díaz, M. D., Montero, P. y Gómez-Guillén, M. C. (2003). Effect of freezing fish skins on molecular and rheological properties of extracted gelatin. *Food Hydrocolloids*, 17(3), 281-286.
- Ferry, J. (1980). *Viscoelastic properties of polymers*. New York: John Wiley & Sons.
- Ferry, J. D. (1948). Protein gels, In: *Adv. Proteins Chem.*, New York: Academic Press, Inc. Publishers.
- Gómez-Guillén, M. C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M. D., Ulmo, N., Lizarbe, M. A. y Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16(1), 25-34.
- Guo, L.; Colby, R. H.; Lusignan, C. P. y Whitesides, T. H. (2003). Kinetics of triple helix formation in semidilute gelatin solutions. *Macromolecules*, 36, 9999-10008.
- Harrington, W. F. y Karr, G. M. (1970). Collagen structure in solution II. Analysis of refolding kinetics in terms of nucleation and growth processes. *Biochemistry*, 9(19), 3725-3733.

- Harrington, W. F. y Rao N. V. (1970). Collagen structure in solution: I. Kinetics of helix regeneration in single-chain gelatins. *Biochemistry*, 9(19), 3714-3724.
- Harrington, W. F. y von Hippel P. T. (1961). Formation and stabilization of the collagen-fold. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 92, 100-113.
- Haug, I. J.; Draget, K. I. y Smidsrod, O.(2004). Physical and rheological properties compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18, 203-213 .
- Herning, T.; Djabourov, M.; Leblond, J. y Takerkart G. (1991). Conformation of gelatin chains in aqueous solutions: 2. A quasi-elastic light scattering study. *Polymer*, 32(17), 3211-3217.
- Hoffman, K. (1991). Method for long-term preservation of thin-layer polyacrilamide gels by producing a gelatin coating. *Journal of chromatography*, 538, 504-505.
- Horský, J. y Švantner, J. (1993). Gelatin renaturation and viscosity of dilute gelatin solutions. *Polymer International*, 32(2), 159-164.
- Joly-Duhamel, C.; Hellio, D. y Djabourov, M. (2002a). All gelatin networks:1. Biodiversity and physical chemistry. *Lagmuir*, 18, 7208-7217.
- Joly-Duhamel, C.; Hellio, D.; Adjari, A. y Djabourov, M. (2002b). All gelatin networks:2. The master curve for elasticity. *Lagmuir*, 18, 7158-7166.
- Ledward D. (1986). Gelation of gelatin. In *Functional Properties of Food Macromolecules* Mitchell, J. R. y Ledward, D. A. Eds. Elsevier Applied Science, London.
- Ledward D. (1992). Gelation. *Food Science and Technology Today*, 6(4), 236-241.
- Normand, V.; Müller, S.; Ravey, J. y Parker, A. (2000). Gelation kinetics of gelatin: a master curve and network modeling. *Macromolecules*, 33, 1063-1071.

-
- Ottone, M. L. y Deiber, J. A. (2005). Modeling the rheology of gelatin gels for finite deformations. Part 1. Elastic rheological model. *Polymer*, 46, 4928-4937.
- Ottone, M. L.; Peirrotti, M. B. y Deiber, J. A. (2005). Modeling the rheology of gelatin gels for finite deformations. Part 2. Viscoelastic solid model. *Polymer*, 46, 4938-4949.
- Pannier, A. K. and Shea, L. D. (2004). Controlled release systems for DNA delivery. *Molecular Therapy*, 10, 19-26.
- Pezron, I.; Djabourov, M. y Leblond, J. (1991). Conformation of gelatin chains in aqueous solutions: 1. A Light and small-angle neutron scattering study. *Polymer*, 32, 3201-3210.
- Poppe J. (1999). Gelatin. In *Thickening and gelling agents for food*. Imenson A. A Ed. Maryland: Chapman & Hall Food Science Book. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg.
- Ross, M. H.; Reith, E. J. y Romrell, L. J. (1992). *Histología*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Ross-Murphy, S. B. (1992). Structure and rheology of gelatin gels: recent progress. *Polymer*, 33(12), 2622-2627.
- Ross-Murphy, S. B. (1997). Structure and rheology of gelatin gels. *The Imaging Science Journal*, 45, 205-209.
- Tabata, Y. e Ikada, Y. (1998). Protein release from gelatin matrices. *Advanced drug delivery reviews*, 31, 287-301.
- Tabata, Y.; Yamamoto, M. e Ikada, Y. (1998). Biodegradable hydrogels for bone regeneration through growth factor release. *Pure & Appl. Chem.*, 70(6), 1277-1282.

Te Nijenhuis, K. (1997). Gelatin thermoreversible networks. Viscoelastic properties and structure of gels. In: Dušek K. (Ed.). *Advances in Polym. Sci.* (Vol. 130) (pp.1-267). New York: Springer.

Tosh, S. M.; Marangoni, A. G.; Hallett, F. R. y Britt, J. I. (2003). Aging dynamics in gelatin gel microstructure. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 503-513.

Tromp, R.; ten Grotenhuis, E. y Olieman, C. (2002). Self-aggregation of gelatin above the gelling temperature analyzed by SEC-MALLS. *Food Hydrocolloids*, 16, 235-239.

Van den Bosh, E. Y Gielens, C. (2003). Gelatin degradation at elevated temperature. *Int. J. Biol. Macromol*, 32, 129-138.

Ward, A. G. y Courts, A. (1977). *The Science and Technology of Gelatin*. London: Academic Press.

Capítulo 4



Características microestructurales que
presentan las soluciones de gelatina

4 Características microestructurales que presentan las soluciones de gelatina

4.1 Introducción

Las soluciones de gelatina han sido ampliamente estudiadas durante los últimos años. Por consiguiente, es posible encontrar en la literatura diversos estudios reológicos y fisicoquímicos que conciernen al comportamiento de estas soluciones para diferentes valores de concentración C , temperatura T , fuerza iónica I , pH y formulaciones de solvente. En efecto, la caracterización de soluciones de gelatina en los diversos rangos o zonas de concentración y temperatura condujo a la interpretación de fenómenos específicos presentes en cada una de ellas.

En este contexto de análisis, el principal objetivo de este capítulo (ver también Olivares et al., 2006) es brindar un marco conceptual que permita visualizar la variedad de comportamientos reológicos y fisicoquímicos que presentan las soluciones de gelatina, los cuales son causados por fenómenos microestructurales específicos de las diferentes zonas de concentración y temperatura mencionadas arriba. Al mismo tiempo, se pretende ubicar en este contexto de análisis los estudios realizados en la presente tesis. Por ello se realiza, a continuación, una discusión tomando como base la revisión bibliográfica de los principales trabajos donde se estudian las soluciones de gelatina.

4.2 Análisis de las soluciones de gelatina en las diferentes zonas de concentración y temperatura

Una de las zonas estudiadas con mayor frecuencia es aquella donde se produce la gelificación. Este fenómeno ocurre a un determinado tiempo de maduración t_m cuando la concentración de gelatina supera la concentración crítica de gelificación $C_g \approx 10^{-2} \text{ g/cm}^3$ y cuando la temperatura de maduración es inferior a la temperatura de gelificación T_g , por encima de la cual el gel no se forma (ver zona I en Figura 4.2.1). Asimismo, la temperatura de gelificación es una función de la concentración C (ver, por ejemplo, Bohidar y Jena, 1993; te Nijenhuis, 1997); de esta manera, una función $T_g(C)$ existe para $C > C_g$ con una temperatura crítica $T_g^*(C_g)$. A los fines de definir las diferentes zonas de concentración y temperatura se usan como guía T_g y $T_g^*(C_g)$ sin introducir consideraciones adicionales que involucren, por ejemplo, la temperatura de transición T_{ch} desde la conformación de cadena errática a hélice o la temperatura de fusión T_{melt} (transición sol-gel) (ver, por ejemplo, Joly-Duhamel et al., 2002a y 2002b para el análisis de estos parámetros cuando se utilizan distintas fuentes de gelatina).

Actualmente, en la literatura se encuentran revisiones detalladas y trabajos específicos que consideran fundamentalmente la zona de gel (ver, por ejemplo, Ledward, 1986; Clark y Ross-Murphy, 1987; te Nijenhuis, 1997; Ross-Murphy, 1997; Djabourov y Papón 1983; Djabourov et al.; 1985, 1988 y 1993; Tosh et al., 2003). En este sentido, las características más relevantes de los geles de gelatina fueron revisadas en forma breve en el Capítulo 3.

Cuando la temperatura es superior a T_g y $C > C_g$, las soluciones de gelatina se encuentran en una zona de redes o *entanglements* (ver, por ejemplo, Pezron et al., 1991 y Herning et al., 1991 quienes estudian soluciones semi-diluidas de gelatina a 50°C mediante técnicas de dispersión de luz). Una de las conclusiones más relevantes de esta zona es que las soluciones muestran movimientos colectivos y presentan dos modos de difusión dinámicos como fenómenos específicos: un modo rápido debido a la difusión cooperativa de redes transitorias de cadenas de gelatina y un modo lento, el cual estaría asociado a la difusión de pequeños grupos de cadenas con radio hidrodinámico constante, también llamados *clusters* (ver zona II en Figura 4.2.1).

Bohidar y Jena (1993) realizaron un estudio de soluciones de gelatina (la concentración de gelatina utilizada fue de 4 % (p/p)) abarcando las dos zonas de concentración y temperatura antes mencionadas (es decir, la zona de $T < T_g$ y $C > C_g$ y la zona de $T > T_g$ y $C > C_g$) mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y técnicas de dispersión de luz. En este trabajo los autores proponen la existencia de cuatro dominios en diagramas de temperatura versus concentración. En el dominio de temperaturas más elevadas, y específicamente cuando ésta disminuye desde 60 a 50°C, los autores modelan a las soluciones de gelatina con una cinética de agregación de Smoluchowski. En este caso, no se concluye acerca de cuáles son las fuerzas responsables de la agregación. Cuando la temperatura disminuye aún más, se concluye que las soluciones de gelatina presentarían una transición de fase conformacional que implicaría la formación de hélices simples en los agregados formados previamente a mayores temperaturas formados por cadenas en conformación errática (*random coils*). Descendiendo aún más la

temperatura, los autores concluyen que las soluciones entran en el dominio del gel, el cual se formaría mediante la generación de triples hélices interconectadas por segmentos de cadenas erráticas.

Otra de las zonas estudiadas es aquella en la cual $C < C_g$ y $T > T_g^*$ donde también se evidencia la formación de *clusters* (ver zona III en Figura 4.2.1). En tal sentido, se encuentran importantes trabajos referentes a este tema donde las soluciones de gelatina son evaluadas mediante técnicas de dispersión de luz (ver, por ejemplo, Pezron et al., 1991; Hering et al., 1991). Mediante estos estudios, se obtuvo que el modelo de *worm-like* es apropiado para representar a las cadenas de gelatina en solución a elevadas temperaturas (50°C) que poseerían una longitud de persistencia de 20 Å. También se encontró que la adición del surfactante duodecyl sulfato de sodio (SDS) remueve la formación de los *clusters*, los cuales probablemente se estabilizan en esta zona ($C < C_g$ y $T > T_g^*$) por interacciones del tipo hidrofóbicas entre residuos no polares de las cadenas de gelatina. Asimismo, Bohidar y Jena (1994) y Bohidar (1998) estudiaron las soluciones diluidas de gelatina en solventes neutros sin agregado de sales y en un rango de temperatura comprendido entre 30°C y 60°C mediante las técnicas de dispersión de luz y viscosidad intrínseca $[\eta]$. Los autores observaron que el radio de giración s , el peso molecular promediado en fracciones másicas M_w y la viscosidad intrínseca $[\eta]$ fueron mayores a medida que la temperatura disminuía, debido a la agregación de las cadenas de gelatina. A los fines de explicar el análisis teórico realizado, los autores concluyen que las soluciones de gelatina estudiadas en este rango de temperatura no sólo presentan

cadenas en la conformación del tipo errática sino que también existen sectores con estructuras de helicoidales.

Otro estudio relevante realizado en esta zona fue presentado por Tromp et al. (2002) para $C \approx 2 \cdot 10^{-3} \text{ g/cm}^3$, en donde se analiza la distribución de la masa molar de gelatina de cerdo mediante cromatografía de exclusión molecular combinada con las técnicas de dispersión de luz, índice de refracción y rotación óptica. Se observaron cambios en la distribución de la masa molar a temperaturas por encima de la temperatura crítica T_g^* . La distribución de pesos moleculares muestra la existencia de una agregación reversible de las cadenas de gelatina cuando la temperatura decrece de 80 a 40°C. En este sentido, se reporta que se produce una interacción entre pares de cadenas las cuales pueden llevarse a cabo por diferentes mecanismos; por ejemplo, dos áreas hidrofóbicas atraídas entre sí pueden unir localmente a dos cadenas de gelatina con una energía del orden de $k_B T$. En este trabajo los autores concluyen que en el rango de concentración y temperatura determinado por $C < C_g$ y $T > T_g^*$ las cadenas de gelatina no interaccionan mediante la formación de zonas de triples hélices debido a que no se registraron cambios en la rotación óptica de estas soluciones. Las últimas conclusiones se oponen a lo reportado por Bohidar y Jena (1994) y Bohidar (1998) quienes, como se expresó más arriba, proponen la presencia de zonas de triples hélices. Es claro que, tanto en esta zona como en la zona analizada previamente se arriba a conclusiones relevantes, muchas de ellas bien comprendidas y validadas por distintos autores mientras que otras todavía se encuentran bajo análisis.

Se puede definir una cuarta zona que comprende el rango de concentración $C_c < C < C_g$ y temperatura $T < T_g^*$ (ver zona IV en Figura 4.2.1). A estas temperaturas, en principio, la transición conformacional de cadena aleatoria a hélice de poliprolina es posible, teniendo en cuenta que $T_g^* < T_{ch}$ (Harrington y Rao, 1970; Bohidar y Jena, 1993). Aquí, $C_c \approx 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ define el límite por debajo del cual la regeneración de la estructura de triple hélice es intramolecular en el estado ultra-diluido. En estas zonas, Harrington y von Hippel (1961), Harrington y Rao (1970) y Harrington y Karr (1970) estudiaron la cinética de regeneración de la triple hélice de cadenas de gelatina. Éste es un mecanismo que consiste en tres procesos simultáneos de nucleación, crecimiento y estabilización (*annealing*) de la triple hélice. De estos trabajos se concluye que, dependiendo principalmente de la concentración y la temperatura, el proceso de maduración de las soluciones de gelatina puede generar diferentes estructuras macromoleculares, las cuales son el resultado de la reversión del estado conformacional desordenado a la estructura de triple hélice (ver también, Busnel et al., 1989; Benguigui et al., 1991). En este sentido, durante el proceso de maduración, las cadenas de gelatina en solución experimentan una transición del estado desordenado aleatorio a la conformación de poli-L-prolina (ver Capítulo 3) en algunas porciones de la molécula, las cuales se estabilizan mediante la agregación intermolecular formando zonas de triple hélice. Horský y Svantner (1993) evaluaron soluciones diluidas de gelatina mediante la medición de la viscosidad reducida a diferentes tiempos de maduración en un rango de temperatura comprendido entre 5 y 30°C. Los autores observaron que la viscosidad reducida aumenta con el tiempo de maduración, y que este efecto es mayor cuanto menor es la

temperatura a la que estas soluciones se maduran. También, es interesante mencionar que la adición de tiocianato de potasio (KSCN) en una concentración de 500 mM logró inhibir la agregación parcialmente, indicando esto que en este rango de concentración y temperatura los agregados formados estarían compuestos por zonas de unión de triples hélices estabilizadas por interacciones del tipo puente-hidrógeno.

Existe una zona ultra-diluida para $C < C_c \approx 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ y $T < T_g^*$ donde la regeneración de la triple hélice sería intramolecular (Boedker y Doty, 1954; Harrington y Rao, 1970; Busnel et al., 1989) (ver zona V en Figura 4.2.1). Asimismo, este plegamiento intramolecular sería más ordenado cuando la temperatura de maduración T_m se acerca a T_g^* favoreciendo la formación de estructuras con conformación de varillas rígidas (Harrington y Rao, 1970). Con el fin de esquematizar los conceptos revisados en esta sección, la Figura 4.2.1 especifica las estructuras y fenomenologías que experimentan las soluciones de gelatina en las distintas zonas de concentración y temperatura analizadas.

Luego del análisis realizado, queda claro que la concentración y temperatura seleccionadas para la formulación y maduración de soluciones de gelatina condiciona fuertemente la microestructura formada. Además, estos cambios microestructurales provocan comportamientos fisicoquímicos y reológicos diferentes que se deben considerar en los procesos y productos tecnológicos donde se utiliza la gelatina.

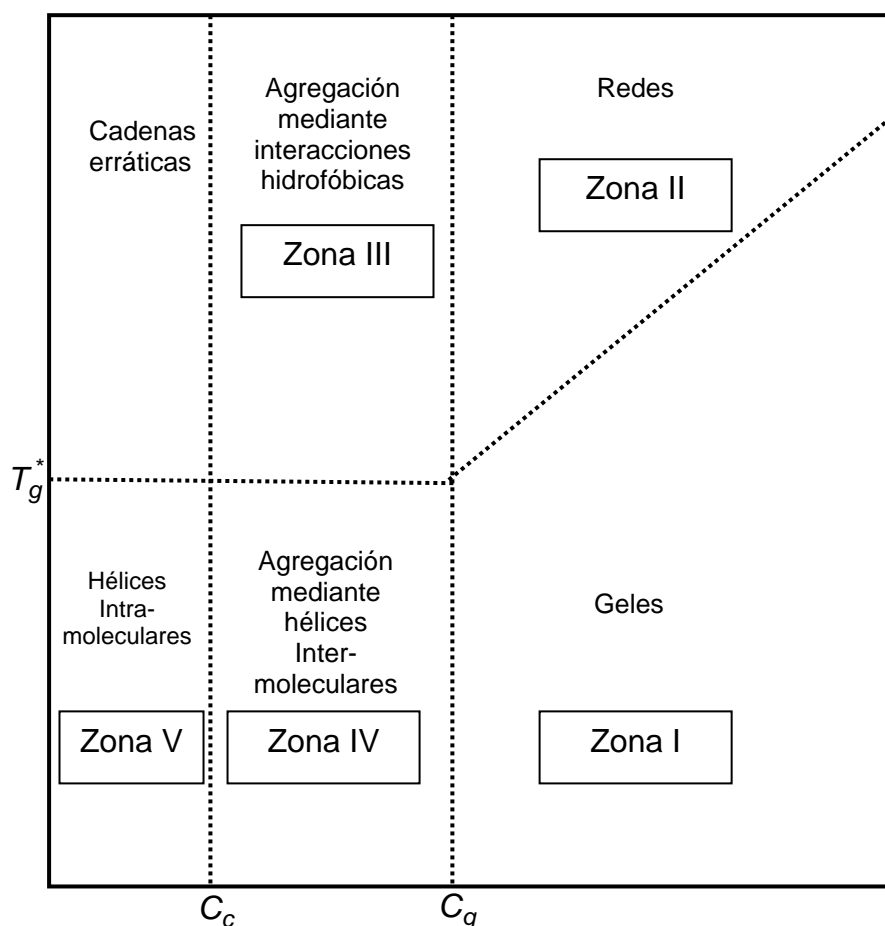


Figura 4.2.1 Esquema donde se indican las estructuras y fenomenologías que experimentan las soluciones de gelatina en las diferentes zonas de concentración y temperatura.

4.3 Cinética de regeneración de la triple hélice de gelatina

Dentro de este amplio contexto fenomenológico descrito en la Sección 4.2, el mecanismo cinético de regeneración de la triple hélice fue estudiado principalmente en las zonas comprendidas entre $C > C_c$ y $T < T_g$, teniendo en cuenta que la regeneración intramolecular sería de primer orden. Por lo tanto, la mayoría de los autores concluyen que, en general, el mecanismo es de segundo orden para estos rangos de concentración y temperatura a intervalos de tiempos de maduración cortos e intermedios. Asimismo, se propone que un

mecanismo posible es aquel en el cual una cadena en la conformación de poli-L-prolina (ver Capítulo 3) se pliega sobre sí misma (*hairpin folding*) y a su vez, interactúa con otra cadena en la misma conformación de poli-L-prolina estabilizándose mediante la formación de una zona de unión o núcleo de triple hélice (Busnel et al., 1989; Benguigui et al., 1991; Ross-Murphy, 1992; te Nijenhuis, 1997; Normand et al., 2000). No obstante, los núcleos de triple hélice formados mediante la agregación de tres cadenas diferentes no puede ser excluido y, por consiguiente, también sería posible encontrar un orden cinético mayor a 2 (te Nijenhuis, 1997). En este sentido, Busnel et al. (1989) reportaron que para un rango de concentración de $C = 10^{-3}$ a 10^{-2} g/cm³ el orden cinético es de 2.2 indicando que el proceso es mayormente bimolecular. Por su parte, Benguigui et al. (1991) estudiaron el mecanismo de maduración de una solución de gelatina de $2 \cdot 10^{-3}$ g/cm³ mediante digestión enzimática. Los autores encontraron que las zonas de unión eran más resistentes al ataque enzimático que las regiones donde las cadenas se encontraban en la configuración desordenada y que, además, el mecanismo cinético de formación de la estructura de triple hélice más probable es el bimolecular donde una de las cadenas se encontraría plegada sobre sí misma (*hairpin folding*). Djabourov y Papón (1983) y Djabourov et al. (1985) obtuvieron una expresión cinética para un amplio tiempo de maduración y a través del análisis de la misma los autores concluyen que la cantidad de hélices formadas muestran una evolución en el tiempo que comprende dos procesos: el primero, obedece a la ecuación de Avrami y el segundo, para tiempos de maduración más prolongados, presenta una dependencia logarítmica con el tiempo. Más recientemente, Tosh et al. (2003) estudiaron el desarrollo y evolución de la estructura de geles de gelatina

durante el proceso de gelificación y observaron dos regiones donde el módulo de almacenamiento en función del tiempo obedece a leyes del tipo potencial: una, donde gobierna el proceso de agregación y otra, en la cual es predominante el ordenamiento de las zonas de unión previamente formadas.

Es claro que las zonas de unión aumentan su longitud debido al proceso de crecimiento de los sitios de triple hélices formados durante la nucleación y que esta estructura de red es susceptible a un ordenamiento (*annealing*) el cual se manifiesta, por ejemplo, mediante un pequeño crecimiento en el tiempo del módulo de almacenamiento (Ross-Murphy, 1997). Asimismo, la diferencia entre la temperatura de maduración T_m y la temperatura de gelificación T_g para una dada concentración controla la microestructura que se forma durante el proceso de transición de estado aleatorio desordenado al nuevo estado ordenado. En consecuencia, cuando la temperatura de maduración es cercana a T_g^* el proceso de crecimiento y el de ordenamiento se verían favorecidos frente al proceso de nucleación (Harrington y Rao, 1970). Guo et al. (2003) también estudiaron la reversión al estado de estructura de triple hélice en soluciones acuosas mediante medidas de rotación óptica para cortos tiempos de maduración ($t_m \leq 0.08$ horas). Los resultados de estos autores mostraron que el proceso cinético de reversión era predominantemente de segundo orden para $C \leq 0.12 \text{ g/cm}^3$ y $5 \leq T \leq 20 \text{ }^\circ\text{C}$ aunque un pequeño corrimiento en la velocidad inicial de la rotación óptica en función de la concentración indica también la presencia de un mecanismo de primer orden.

Actualmente, existe un amplio consenso en los grupos de investigación de que el orden cinético de reacción depende de la concentración de gelatina y de los rangos de tiempo y temperatura de maduración. En este sentido, en la

Figura 4.3.1 se esquematizan los diversos mecanismos de regeneración de la triple hélice tropocolagénica propuestos para los diferentes casos discutidos arriba.

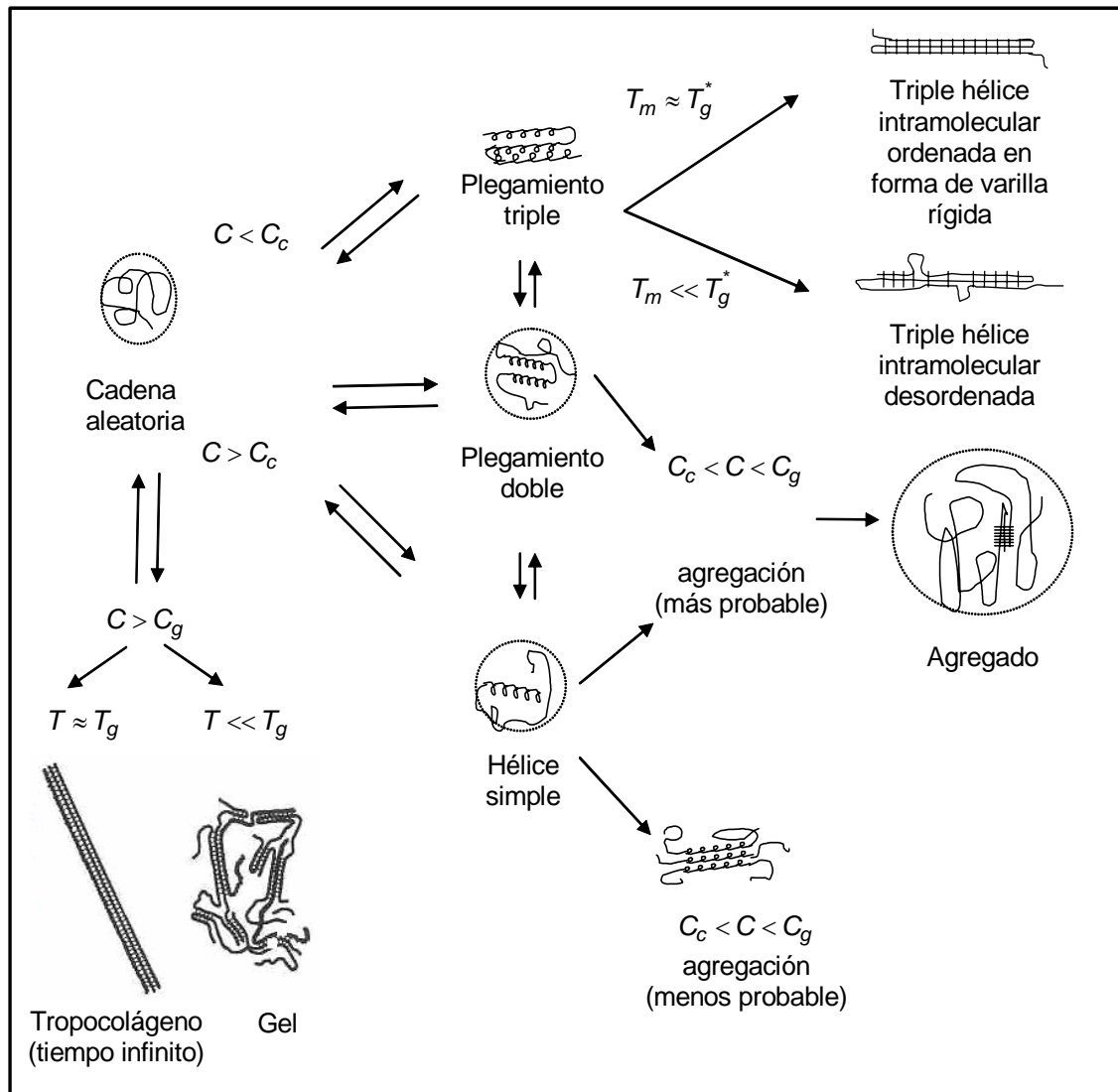


Figura 4.3.1 Esquema de los diversos mecanismos de regeneración de la triple hélice tropocolagénica propuestos para los diferentes rangos de concentración y temperatura de maduración.

4.4 Conclusiones

A partir de la revisión bibliográfica realizada, resulta relevante remarcar que el proceso de nucleación es, en principio, un mecanismo de interacción entre pares de cadenas. El mismo es susceptible a ser interpretado durante los

primeros estadios de agregación mediante la teoría cinética de Smoluchowski y cualquier desviación experimental de este contexto teórico puede introducir información adicional que concierne al mecanismo de agregación.

Asimismo, del análisis de la literatura pertinente se concluye que las cinco zonas que se han descrito aquí a través de regímenes de concentración y temperatura, fueron estudiadas mediante diferentes herramientas teóricas y técnicas experimentales. Mientras que la mayoría de estos estudios se focalizan en la zona donde se producen los geles (es decir, para $C > C_g$ y $T < T_g$), las fenomenologías que se producen en las zonas diluidas y ultra-diluidas han sido menos estudiadas hasta la actualidad. En tal sentido, en esta tesis se estudian las soluciones de gelatina en la zona diluida (es decir para $C_c < C < C_g$) y ultra-diluida a temperaturas de maduración inferiores a T_g^* .

4.5 Bibliografía

- Benguigui, L.; Busnel, J. P. y Durand, D. (1991). Study of junction zones in gelatin gels through selective enzymatic digestion. *Polymer*, 32(14), 2680-2685.
- Boedtker, H. y Doty, P. (1954). A study of gelatin molecules, aggregates and gels. *J. of Chem. Phys.*, 5, 968-982.
- Bohidar, H. B. (1998). Hydrodynamic properties of gelatin in dilute solutions. *Int. J. Biol. Macrom.*, 23(1), 1-6.
- Bohidar, H. B. y Jena, S. S. (1993). Kinetics of sol-gel transition in thermoreversible gelation of gelatin. *J. of Chem. Phys.*, 98(11), 8970-8977.
- Bohidar, H. B. y Jena, S. S. (1994). Study of sol-state properties of aqueous gelatin solutions. *J. of Chem. Phys.*, 100(9), 6888-6895.
- Braidot, A. A. A. y Deiber, J. A. (1999). Linear viscoelastic model of a maturing gelatin solution. *Biorheology*, 36, 267-284.
- Busnel, J. P., Morris, E. R. y Ross Murphy, S. B. (1989). Interpretation of renaturation kinetics of gelatin solutions. *Int. J. Biol. Macromol.*, 11(2), 119-125.
- Carvalho, W. y Djabourov, M. (1997). Physical gelation under shear for gelatin gels. *Rheologica Acta*, 36(6), 591-609.
- Clark, A. H. y Ross-Murphy, S. B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. In Dušek K. (Ed.) *Advances in Polym. Sci.* (Vol. 83) (pp. 57-192). New York: Springer.
- Djabourov, M. y Papon, P. (1983). Influence of thermal treatment on the structure and stability of gelatin gels. *Polymer*, 24(5), 537-542.

Djabourov, M. ; Maquet, J. ; Theveneau, H. ; Leblond, J. y Papon, P. (1985). Kinetics of gelation of aqueous gelatin solutions. *British Polymer Journal*, 17(2), 169-174.

Djabourov, M.; Leblond, J. y Papon, P. (1988). Gelation of aqueous gelatin solutions. II. Rheology of sol-gel transition. *Journal Phys. France*, 49, 2, 333-343.

Djabourov, M.; Lechaire, J. y Galli, F. (1993). Structure and rheology of gelatin and collagen gels. *Biorheology*, 30(3), 191-295.

Fernández-Díaz, M. D., Montero, P. y Gómez-Guillén, M. C. (2003). Effect of freezing fish skins on molecular and rheological properties of extracted gelatin. *Food Hydrocolloids*, 17(3), 281-286.

Guo, L.; Colby, R. H.; Lusignan, C. P. y Whitesides, T. H. (2003). Kinetics of triple helix formation in semidilute gelatin solutions. *Macromolecules*, 36, 9999-10008.

Harrington, W. F. y Karr, G. M. (1970). Collagen structure in solution II. Analysis of refolding kinetics in terms of nucleation and growth processes. *Biochemistry*, 9(19), 3725-3733.

Harrington, W. F. y Rao N. V. (1970). Collagen structure in solution: I. Kinetics of helix regeneration in single-chain gelatins. *Biochemistry*, 9(19), 3714-3724.

Harrington, W. F. y von Hippel P. T. (1961). Formation and stabilization of the collagen-fold. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 92, 100-113.

Haug, I. J.; Draget, K. I. y Smidsrod, O.(2004). Physical and rheological properties compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18, 203-213 .

- Herning, T.; Djabourov, M.; Leblond, J. y Takerkart G. (1991). Conformation of gelatin chains in aqueous solutions: 2. A quasi-elastic light scattering study. *Polymer*, 32(17), 3211-3217.
- Horský, J. y Švantner, J. (1993). Gelatin renaturation and viscosity of dilute gelatin solutions. *Polymer International*, 32(2), 159-164.
- Joly-Duhamel, C.; Hellio, D. y Djabourov, M. (2002a). All gelatin networks:1. Biodiversity and physical chemistry. *Lagmuir*, 18, 7208-7217.
- Joly-Duhamel, C.; Hellio, D.; Adjari, A. y Djabourov, M. (2002b). All gelatin networks:2. The master curve for elasticity. *Lagmuir*, 18, 7158-7166.
- Ledward D. (1986). Gelation of gelatin. In *Functional Properties of Food Macromolecules* Mitchell, J. R. y Ledward, D. A. Eds. Elsevier Applied Science, London.
- Ledward D. (1992). Gelation. *Food Science and Technology Today*, 6(4), 236-241.
- Normand, V.; Müller, S.; Ravey, J. y Parker, A. (2000). Gelation kinetics of gelatin: a master curve and network modeling. *Macromolecules*, 33, 1063-1071.
- Olivares, M. L.; Peirotti, M. B. y Deiber, J. A. (2006). Analysis of gelatin chain aggregation in dilute aqueous solutions through viscosity data. *Food Hydrocolloids*, 20, 1039 - 1049.
- Pezron, I.; Djabourov, M. y Leblond, J. (1991). Conformation of gelatin chains in aqueous solutions: 1. A Light and small-angle neutron scattering study. *Polymer*, 32, 3201-3210.
- Ross-Murphy, S. B. (1992). Structure and rheology of gelatin gels: recent progress. *Polymer*, 33(12), 2622-2627.

Ross-Murphy, S. B. (1997). Structure and rheology of gelatin gels. *The Imaging Science Journal*, 45, 205-209.

te Nijenhuis, K. (1997). Gelatin thermoreversible networks. Viscoelastic properties and structure of gels. In: Dušek K. (Ed.). *Advances in Polym. Sci.* (Vol. 130) (pp.1-267). New York: Springer.

Tosh, S. M.; Marangoni, A. G.; Hallett, F. R. y Britt, J. I. (2003). Aging dynamics in gelatin gel microstructure. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 503-513.

Tromp, R.; ten Grotenhuis, E. y Olieman, C. (2002). Self-aggregation of gelatin above the gelling temperature analyzed by SEC-MALLS. *Food Hydrocolloids*, 16, 235-239.

Capítulo 5

Obtención de la *MWD* de gelatina mediante
electroforesis en gel de poliacrilamida

5 Obtención de la *MWD* de gelatina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida

5.1 Introducción

Como se mencionó en el Capítulo 3, una de las características microestructurales relevantes para la formulación de productos a base de gelatina es la distribución de pesos moleculares *MWD* de la mezcla polimérica obtenida luego del proceso de extracción y los promedios en fracciones molares M_n y fracciones másicas M_w . Dentro de las técnicas utilizadas para la determinación de la *MWD* de una mezcla polimérica de naturaleza proteica se pueden mencionar a la cromatografía de tamiz molecular o GPC (Bettelheim, 1971; Benguigui et al., 1991; Tromp et al., 2002; Meyer y Morgenstern, 2003; Haug et al., 2004) y a la electroforesis en geles de poliacrilamida con agregado del surfactante duodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) (ver, por ejemplo, Mizuta et al., 2002a; Mizuta et al., 2002b; Tosh et al., 2003; Fernandez-Díaz et al., 2003; Chang et al., 2000).

En esta tesis se realizó la determinación de la función densidad de distribución de pesos moleculares $f_w(M)$ de la muestra de gelatina comercial que se usó en el programa experimental detallado en los Capítulos 7, 8 y 9 mediante PAGE-SDS y densitometría computacional de los electroferogramas obtenidos. En este sentido, los conceptos generales asociados a la $f_w(M)$ y a los pesos moleculares M_n y M_w se presentaron en el Capítulo 2.

A continuación se realiza una descripción detallada de la técnica de PAGE-SDS usada y adaptada en esta tesis. En particular se hace énfasis en

los fundamentos fisicoquímicos que hacen posible la separación, identificación y cuantificación de los fragmentos polipeptídicos de la gelatina. Luego, se describe la metodología experimental llevada a cabo para la separación electroforética de una muestra de gelatina y los procedimientos experimentales y numéricos utilizados en la densitometría computacional para la obtención de $f_w(M)$ y de los pesos moleculares promedios. Finalmente, se discuten los resultados obtenidos y se arriba a conclusiones relevantes que conciernen a la distribución de pesos moleculares de la muestra de gelatina provista por la empresa PB Leiner (Santa Fe – Argentina).

5.2 Descripción breve de la técnica PAGE-SDS

En términos generales, resulta relevante recordar que las técnicas de electroforesis se basan en la migración de moléculas cargadas cuando éstas son expuestas a un campo eléctrico. Como se detalló previamente en el Capítulo 2, las proteínas poseen cargas como resultado de su composición en aminoácidos básicos y ácidos y, por consiguiente, pueden migrar cuando se someten a un campo eléctrico. Las primeras aplicaciones de los métodos electroforéticos fueron realizadas en soluciones de sacarosa, luego, surgieron los métodos de electroforesis sobre medios de soporte que permitieron minimizar los efectos de difusión y convección natural. En este sentido, uno de los medios de soporte más utilizados son los geles de poliacrilamida (Cooper, 1977).

Cuando una molécula que posee una carga neta Ze se sitúa en un campo eléctrico E unidireccional, se ejerce sobre ella una fuerza F que se puede expresar de la siguiente forma (Cooper, 1977),

$$F = E Ze = \frac{V}{d} Ze \quad (5.2.1)$$

donde V es la diferencia de potencial, e es la unidad elemental de carga y d es la distancia entre los electrodos. Asimismo, si el fenómeno se lleva a cabo en solución, una fuerza de arrastre o de fricción se opone al movimiento de la molécula. Esta fuerza de arrastre se puede describir mediante la ecuación de Stokes válida para flujo reptante (número de Reynolds es pequeño) y depende del tamaño y de la forma de la macromolécula, y también de la viscosidad η del medio donde ésta se mueve, es decir,

$$F = 6\pi a\eta v \quad (5.2.2)$$

En la ecuación (5.2.2) a es el radio de la macromolécula y v es la velocidad a la cual ésta se mueve. Realizando un balance de las fuerzas que actúan sobre la macromolécula, es decir igualando (5.2.1) y (5.2.2), se obtiene la siguiente expresión para la velocidad electroforética,

$$v = \frac{VZe}{d6\pi a\eta} = \frac{EZe}{6\pi a\eta} \quad (5.2.3)$$

De la ecuación (5.2.3) se observa que la velocidad a la cual una macromolécula se mueve es proporcional al campo eléctrico aplicado y a la carga neta que posee la misma e inversamente proporcional a su tamaño (expresado a través del radio esférico equivalente) y a la viscosidad de la solución. Por consiguiente, como cada molécula posee una carga neta y tamaño característico para condiciones de pH y fuerza iónica determinadas, ésta puede migrar una distancia específica bajo un campo eléctrico en un determinado período de tiempo. Mas aún, si una mezcla de proteínas se somete a electroforesis, al cabo de un cierto tiempo cada fracción de igual carga neta y tamaño se habrá desplazado una distancia determinada bajo ese campo eléctrico y se concentrará en una banda.

Como se mencionó más arriba, para lograr una buena resolución de la técnica de electroforesis se requiere situar a la muestra en estudio en un medio de soporte estable que minimice o elimine los efectos difusivos y convectivos y que además no reaccione ni retarde su movimiento uniéndose a ella. Uno de estos soportes químicamente inertes son los geles de poliacrilamida (Cooper, 1977). En efecto, la electroforesis en gel de poliacrilamida es uno de los métodos que por su alta resolución, variedad de aplicaciones y relativo bajo costo de equipamiento y de reactivos ha sido utilizada con frecuencia creciente en los trabajos de análisis y separación de macromoléculas. Los compuestos utilizados para construir esta matriz polimérica son la acrilamida, la N,N'-metilen-bisacrilamida, la tetrametilendiamina, frecuentemente denominada TEMED y el persulfato de amonio. El persulfato de amonio forma radicales libres cuando se disuelve en agua. Estos radicales libres se preservan dentro de la molécula de acrilamida cuando ambos reactivos se ponen en contacto. La

molécula activada de acrilamida puede reaccionar con sucesivas moléculas de acrilamida para producir una cadena larga de polímero. No obstante, una solución de estos polímeros no forma necesariamente un gel, debido a que estas cadenas pueden deslizarse unas sobre las otras. La formación del gel requiere del anudamiento entre las cadenas, lo cual es posible si la polimerización se realiza en presencia de N,N'-metilen-bisacrilamida la cual está compuesta por dos moléculas de acrilamida unidas entre sí por sus extremos no reactivos (Cooper, 1977).

El tamaño de los poros en la red de poliacrilamida es determinado por dos parámetros: (a) la cantidad de acrilamida por unidad de volumen y b) por el grado de anudamiento (que depende del contenido de bisacrilamida). En la mayoría de las formulaciones el contenido de bisacrilamida se fija en 5% p/v y, por lo tanto este reactivo no controla el tamaño de los poros que se forman luego de la gelificación. El tamaño promedio de poro se fija variando el contenido total de acrilamida. No obstante, la naturaleza aleatoria del fenómeno de formación del gel, genera una distribución de tamaños de poro. Asimismo, para acelerar el proceso de gelificación, se agrega TEMED en una concentración del 0,4% debido a que este compuesto posee la capacidad de existir en la forma de radical libre. Asimismo, se usa la riboflavina para favorecer la polimerización. En presencia de oxígeno y de luz ultravioleta, ésta sufre una descomposición formando radicales libres. Para lograr este resultado se posiciona una lámpara de luz ultravioleta cerca de la reacción (Weber y Osborn, 1969; Cooper, 1977).

Asimismo, el sistema de soluciones reguladoras utilizadas en PAGE-SDS debe mantener un pH constante dentro de los reservorios y dentro del gel

y además los electrolitos que lo componen actúan como conductores a través del campo eléctrico. La solución reguladora no debe interactuar con la macromolécula que se desea separar y el pH se fija de forma tal que ésta se encuentre cargada pero no desnaturalizada. En el caso de separación de proteínas se trabaja en el rango de pH 4,5 - 9.

Finalmente, la fuerza iónica y la concentración de la solución reguladora también se deben considerar y se deben fijar en valores óptimos. En efecto, si la concentración de electrolitos es muy baja, las macromoléculas conducen una gran porción de la corriente y, por consiguiente, éstas no se concentran en bandas finas, sino que generan zonas difusas. Por otro lado, si la concentración de electrolitos dentro del gel es muy elevada, la cantidad de corriente conducida aumenta mientras que el voltaje decrece. Este fenómeno produce una disminución de la velocidad de migración y la generación de calor que puede desnaturalizar y mezclar las macromoléculas.

La ecuación (5.2.3) resulta útil para visualizar el fenómeno de electroforesis pero no es adecuada para describir el movimiento electroforético de un ión a través de un gel de poliacrilamida debido a que no tiene en cuenta la existencia de los poros. La migración de la macromolécula en el gel depende del tamaño de la macromolécula y del tamaño promedio de poro del gel. En efecto, si la mayoría de los poros poseen un diámetro menor que el radio de las proteínas, a pesar de la carga proteica y de la fuerza eléctrica éstas no se moverán en el gel. Este efecto se denomina efecto tamiz, y es el que aumenta la resolución en este tipo de geles. Rodbard y Chrumbach (1970) desarrollaron una serie de relaciones matemáticas para describir los efectos de la concentración de gel sobre la movilidad de las macromoléculas. En este

sentido los autores propusieron la siguiente expresión que relaciona la movilidad electroforética m de una macromolécula con la concentración total del gel C_T ,

$$\log m = \log m_0 - K_R C_T \quad (5.2.4)$$

donde m_0 es la movilidad electroforética libre en una solución de sacarosa y K_R es el coeficiente de retardo. Asimismo, K_R está relacionado con el radio de la macromolécula a través de la siguiente expresión (Cooper, 1977; Rodbard y Chrambach, 1970),

$$K_R = A(a + r) \quad (5.2.5)$$

donde A es una constante, a es el radio medio de la macromolécula y r es el radio de las fibras del gel, las cuales se consideran mucho más largas que la macromolécula.

No obstante, dos macromoléculas de diferentes pesos moleculares, pueden migrar a la misma velocidad si su diferencia de tamaño es balanceada o compensada por su diferencia de carga en un ensayo de electroforesis en gel de poliacrilamida nativa. En virtud de solucionar este problema Shapiro et. al (1967) intentaron separar una mezcla de proteínas en presencia del detergente aniónico duodecil sulfato de sodio (SDS); los resultados de estos esfuerzos preliminares fueron obtenidos por Weber y Osborn (1969). Estos investigadores observaron en forma empírica que la movilidad era una función lineal del logaritmo del peso molecular M , y a su vez demostraron que esta movilidad

era proporcional a la distancia relativa $X = x_0 - x$ migrada por las macromoléculas respecto de la distancia inicial de migración x_0 . Por consiguiente, validaron la siguiente relación,

$$\log M = p - b X \quad (5.2.6)$$

donde p y b son constantes. El SDS se une a las proteínas en una proporción constante de aproximadamente 1,4 gramos por gramo de proteína, con lo que la carga intrínseca de la macromolécula es despreciable frente a la carga ligada con SDS mientras que la densidad de carga (Coulomb/g de proteína) es la misma para todos los componentes (Creighton, 1993). Generalmente se usa con algún reductor de enlaces disulfuro como el 2-mercaptoetanol, ditiotreitól y la disociación se obtiene por calentamiento a 90 grados centígrados (Cooper, 1977, Margni et al., 1996). Debido a que todas las proteínas poseen la misma densidad de carga, éstas se separan solo en función de su tamaño.

La técnica de PAGE-SDS se utiliza frecuentemente para la determinación del peso molecular de proteínas, para esto también se incluyen en el ensayo patrones de peso molecular conocido. Estos patrones deben poseer pesos moleculares por encima y por debajo del peso molecular de la muestra incógnita de manera de poder construir un gráfico involucrando el logaritmo de peso molecular versus la distancia migrada por los analitos, como lo describe la ecuación (5.2.6). Una vez obtenida esta relación se ingresa al gráfico con la distancia migrada por la muestra incógnita y se obtiene el peso molecular correspondiente.

Otra variante de esta técnica es la electroforesis discontinua, donde además del gel de corrida o gel de separación se utiliza un gel espaciador de poro grueso el cual se interpone entre la muestra y el gel de corrida. En estos sistemas discontinuos las soluciones reguladoras de los geles y de los reservorios que contienen los electrodos son diferentes. Las muestras a analizar se siembran en un gel de poro grueso (gel de poro rápido o de apilamiento) en una solución reguladora Tris-ClH de pH 6,8. Este gel se polimeriza sobre el gel de corrida o resolución que se encuentra a pH 8,8. La solución reguladora del recipiente que contiene el cátodo en la parte superior del gel es Tris-Glicina de pH 8,3. Al pH del gel de apilamiento y de la muestra que en ambos casos es de 6,8, la glicina, la cual forma parte de la solución reguladora del reservorio catódico, se encuentra muy poco disociada debido a que este pH está muy próximo a su $pI = 6,06$ (ver Tabla 2.6.1 en el Capítulo 2). Como consecuencia de esta situación, la movilidad en el campo eléctrico es reducida. No obstante, los iones cloruro a ese pH poseen una movilidad mayor, mientras que las proteínas tienen una movilidad intermedia. Cuando se aplica la diferencia de voltaje los iones cloruros migran alejándose de la glicina, dejando atrás de ellos una zona de menor conductividad. Como ésta es inversamente proporcional a la fuerza del campo aplicado, esta zona genera un gradiente de voltaje mayor que acelera la migración de la glicina, que se aproxima a los iones cloruros. Estos se mueven ahora a la misma velocidad con un estrecho límite de separación entre ellos. Cualquier proteína que se mueva por delante de la banda iónica es rápidamente atrapada debido a que su movilidad es menor que la de los iones cloruros, pero mayor que la de la glicina. Como resultado las diferentes proteínas se apilan en una delgada

banda por detrás de los iones cloruros y delante de la glicina para acumularse en el límite del gel de resolución.

En el momento que las proteínas llegan al gel de resolución, a un pH 8,8, el aumento de pH hace que la glicina incremente su disociación y por consiguiente su movilidad efectiva sobrepasa a la movilidad de la proteína haciendo que ésta se mueva junto con los iones cloruros. Al mismo tiempo, al disminuir el tamaño del poro del gel, el desplazamiento de las moléculas proteicas depende de sus respectivas cargas y tamaños moleculares, lo que posibilita la separación de las diferentes proteínas dentro de la mezcla. En el caso de PAGE-SDS, la densidad de carga de las moléculas es prácticamente la misma, por lo que su separación se realiza en función del tamaño molecular (Margni et al., 1996).

Una vez finalizado el ensayo de electroforesis las macromoléculas separadas en el gel se deben visualizar mediante una técnica de coloración. El colorante Coomassie Blue es frecuentemente utilizado para proteínas (Creighton, 1993; Margni et al., 1996). El procedimiento requiere la fijación de las proteínas (desnaturalización a bajo pH) y luego los geles se tiñen en una solución acuosa del colorante. El exceso de colorante es luego removido mediante sucesivos lavados del gel en una solución compuesta por etanol y ácido acético. Una variante ampliamente utilizada consiste en colorear y fijar las proteínas simultáneamente. Para esto, los geles se sumergen en una solución de colorante disuelto en una mezcla de metanol y ácido acético glacial. Finalmente, el remanente se remueve lavando los geles con una solución que también posee agua, metanol y ácido acético glacial (Margni et al., 1996).

5.3 Análisis de muestras de Gelatina por PAGE-SDS

Preparación de las muestras

Se realizó el ensayo de PAGE-SDS a la muestra de gelatina comercial provista por la empresa PB Leiner (Santa Fe – Argentina) cuya materia prima es cuero de vaca. Esta muestra posee un valor de Bloom de $227 \vec{g}$ y una viscosidad standard al 6.66 % w/w y 60°C de 39 mps (datos suministrados por el proveedor). Para este ensayo las muestras fueron preparadas con una concentración de 5 mg/ml. La cantidad de gelatina requerida se dejó hidratar a temperatura ambiente durante diez minutos en un volumen de agua aproximado al volumen final. Posteriormente se procedió a la disolución total durante 40 minutos a 50°C en agitación. Esta solución se mezcló en una proporción de tres partes de solución de gelatina y una parte de solución reguladora de muestra, la cual posee una solución tris-ClH pH= 6,8, 8% de SDS y 20% de 2-mercaptoetanol.

Los patrones de peso molecular también se prepararon de la misma manera. Se utilizó albúmina (67 KDa), fosforilasa b (94 KDa), beta-galactosidasa (116 KDa) y myosina (212 KDa). Tanto las muestras como los patrones de peso molecular se calentaron durante cinco minutos a 90°C (Laemli, 1970).

Ensayo de PAGE-SDS

Se utilizó para el ensayo un equipo LKB 2001-001 vertical y se desarrolló la técnica descrita por Laemmli (1970) utilizando un gel de resolución con 5% de acrilamida a pH=8,8 y un gel de apilamiento de 4% de acrilamida y pH=6,8. Se sembraron 150 μg de proteína en cada carril con un 2% de SDS. Asimismo, la temperatura de la cuba electroforética se fijó en 20°C. Posteriormente los geles se colorearon con Coomasie Brilliant Blue R 250 y el exceso de colorante se retiró utilizando una mezcla de agua, metanol y ácido acético glacial.

En la Figura 5.3.1 se observa la imagen del gel obtenida donde es posible observar tres zonas de mayor intensidad de color en torno a los 100 y 200 KDa.

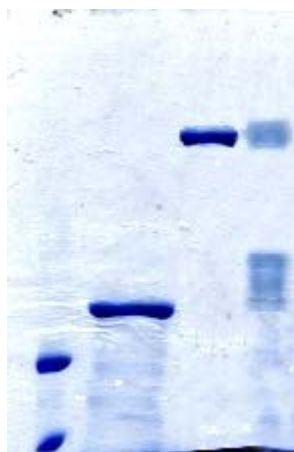


Figura 5.3.1 Imagen del gel de poliacrilamida obtenido. En el primer carril a la izquierda se observan los patrones de peso molecular albúmina y fosforilasa b, en el segundo se observa la β -galactosidasa, en el tercer carril se localiza la miosina y, finalmente, en el último carril se encuentra la muestra de gelatina ensayada.

5.4 Densitometría Computacional de las bandas obtenidas por PAGE-SDS.

Se analizó la imagen del gel coloreado mediante densitometría computacional. Para este fin, se generó un programa numérico que permite obtener la función densidad de distribución de pesos moleculares $f_w(M)$ a partir de los datos densitométricos de intensidad de color I_r en función de la posición x de las macromoléculas en cada carril de siembra. Estos datos fueron obtenidos con el programa *pixi.exe* y, posteriormente, fueron procesados como se detalla a continuación.

Los datos básicos densitométricos que consisten en la posición en función de la intensidad de color, es decir el par ordenado (x, I_r) fueron normalizados a las nuevas variables $X = x - x_0$ e $I = |I_r - I_r^{max}|$ donde x_0 es la distancia de iniciación de la migración de las macromoléculas dentro del gel de resolución e I_r^{max} es la intensidad de color máxima detectada en cada carril de siembra. Se obtuvo, de esta manera, un espectro de valores (X, I) a lo largo de cada carril de siembra en el gel de poliacrilamida. Definiendo el área de intensidad de color de cada carril de siembra hasta la posición X como,

$$A(X) = \int_0^X I(X) dX \quad (5.4.1)$$

y considerando que el área total A_T de intensidad de color en todo el carril de siembra se expresa,

$$A_T = \int_0^{\infty} I(X) dX \quad (5.4.2)$$

la intensidad de color $I(X)$ se re-normaliza tomando como referencia el área total de intensidad de color A_T . De esta manera, se obtiene la intensidad de color normalizada $i(X) = I(X)/A_T$ la cual cumple con la siguiente condición,

$$\int_0^{\infty} i(X) dX = 1 \quad (5.4.3)$$

Por consiguiente, se obtiene un nuevo espectro de pares de valores ordenados de coordenadas (X, i) .

La variable X se puede relacionar con el peso molecular de la macromolécula que ha migrado hasta esa posición. En efecto, X es una función del peso molecular M como lo muestra la ecuación (5.2.6). En tal sentido, se hace uso de esta ecuación y de los valores (X, M) correspondientes a la migración de los patrones de peso molecular para la obtención de las constantes p y b de la ecuación (5.2.6) mediante un ajuste lineal de estos datos experimentales. De esta forma, se obtienen los siguientes valores $p = 5,624$ y $b = 0,00588$. En la Figura 5.4.1 se observa la recta de calibración obtenida con los cuatro patrones de peso molecular.

En consecuencia, a través de la ecuación (5.2.6) la variable X se puede expresar de la siguiente manera,

$$X = \frac{p - \log M}{b} \quad (5.4.4)$$

Por consiguiente, derivando ambos miembros de la ecuación (5.4.4) y utilizando la constante de conversión que permite pasar de logaritmo decimal a logaritmo natural $n = 2,3025$ se obtiene,

$$dX = -\frac{d \ln M}{b n} \quad (5.4.5)$$

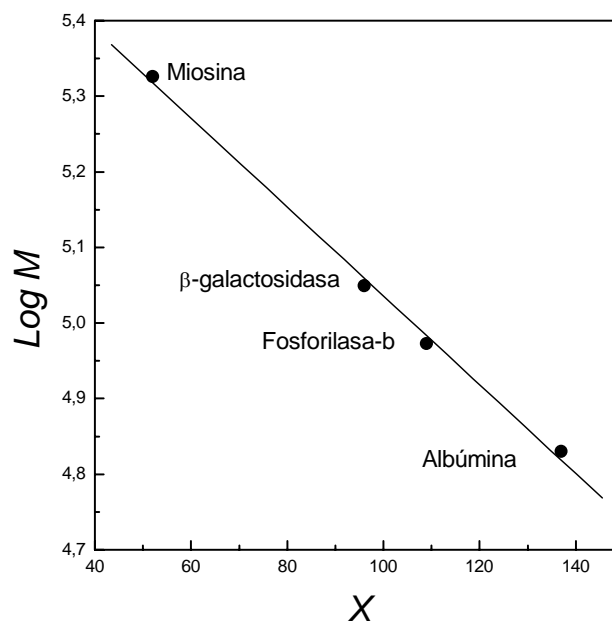


Figura 5.4.1 Logaritmo del peso molecular en función de la distancia relativa de migración X de los patrones de peso molecular: miosina, β -galactosidasa, fosforilasa-b y albúmina ensayados mediante PAGE-SDS.

Reemplazando X y dX en la ecuación (5.4.3) y realizando un cambio de variables se obtiene,

$$\int_0^{\infty} i(X) dX = \int_0^{10^p} i\left(\frac{p - \log M}{b}\right) \frac{dM}{bnM} = 1 \quad (5.4.6)$$

teniendo en cuenta que cuando $X \rightarrow 0$ se cumple que $\log M = p$ y, consecuentemente, $M = 10^p$. Asimismo, cuando $X \rightarrow \infty$ se cumple que $\log M \rightarrow -\infty$ y, por lo tanto $M \rightarrow 0$. Asimismo, sabiendo que $\ln M = p \ln(10)$ la ecuación (5.4.6) también se puede expresar de la siguiente forma,

$$\int_{-\infty}^{pn} \frac{1}{nb} i\left(\frac{p}{b} - \frac{1}{nb} \ln M\right) d \ln M = 1 \quad (5.4.7)$$

Por consiguiente, debido a que la función $i\left(\frac{p - \log M}{b}\right) / bn$ satisface los requerimientos de la función densidad de distribución para la variable $\ln M$ (ver en Capítulo 2 la ecuación (2.2.8)), $f_w(M)$ queda determinada por,

$$f_w(M) = \frac{i\left(\frac{p - \log M}{b}\right)}{bn} \quad (5.4.8)$$

Por lo tanto, el procedimiento de cálculo consiste en tomar los valores de X , $i(X)$, M y $\ln M$ de los electroferogramas de las muestras de gelatina detectados en cada calle de siembra de los geles de poliacrilamida y con ellos se obtiene $f_w(M)$.

En la Figura 5.4.2 se muestra la función densidad de distribución de pesos moleculares $f_w(M)$ obtenida, donde es posible observar tres picos principales correspondientes a las fracciones de cadena alfa (menos de 100 KDa), beta (entre 100 y 200 KDa) y gamma (entre 200 y 300 KDa).

Posteriormente se obtuvieron los pesos moleculares promediados en fracciones másicas M_w y en número de moles M_n haciendo uso de las ecuaciones (2.2.9) y (2.2.10) respectivamente. En este sentido, los valores obtenidos fueron $M_w = 136650$ g/mol y $M_n = 133000$ g/mol. Asimismo, una estimación de la polidispersidad de la muestra P_o (ver Capítulo 2) arrojó un valor de $P_o = 1,027$.

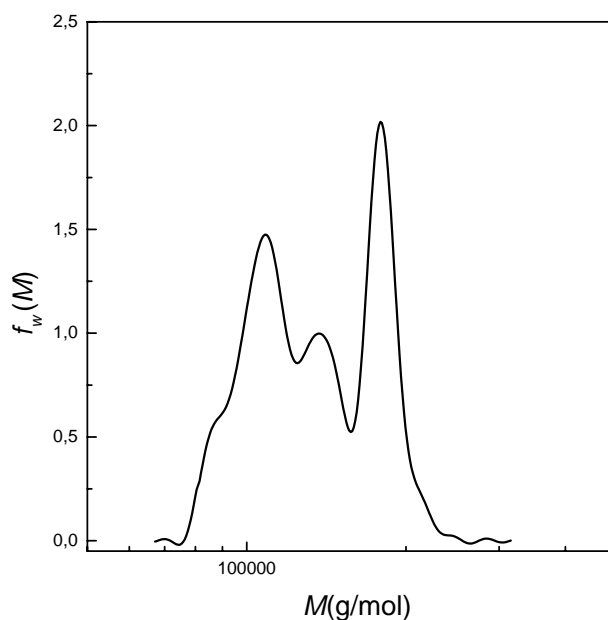


Figura 5.4.2 Función densidad de distribución de pesos moleculares $f_w(M)$ en función del peso molecular para una muestra de gelatina comercial.

5.5 Conclusiones

Se concluye que la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida desarrollada en esta tesis logra mostrar adecuadamente la composición de la

mezcla polimérica que se obtiene luego del proceso de extracción de gelatina. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Fernández-Díaz et al. (2003), Gómez-Guillén et al. (2002) y Tosh et al. (2003) quienes, entre otros, reportan imágenes similares de geles de poliacrilamida.

Asimismo, el análisis por densitometría computacional propuesto permitió obtener $f_w(M)$, M_w y M_n , los cuales son necesarios para posteriores cálculos en este trabajo de tesis. En este sentido, la técnica experimental y la metodología de análisis propuestas para la determinación de los parámetros antes mencionados resultaron apropiadas para el estudio de este tipo de muestras poliméricas polidispersas cargadas de naturaleza proteica.

5.6 Bibliografía

Benguigui, L.; Busnel, J. P. y Durand, D. (1991). Study of junction zones in gelatin gels through selective enzymatic digestion. *Polymer*, 32(14), 2680-2685.

Bettelheim, F.A. (1971). *Experimental Physical Chemistry*. W. B. Saunders Company. Philadelphia.

Chang P.; Kuan S.; Eberlein G.; Burke D. y Jones R. (2000). Characterization of bovine collagens using capillary electrophoresis- an alternative to slab gel electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22, 957.

Cooper, T. G. (1977). *The Tools of Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Creighton, T. E. (1993). *Proteins, Structures and Molecular Properties*. W. H. Freeman and Company, New York.

Creighton, T. E. (1993). *Proteins, Structures and Molecular Properties*. W. H. Freeman and Company, New York.

Fernandez-Díaz M.; Montero P. y Gómez-Guillén M. (2003). Effect of freezing fish skins on molecular and rheological properties of extracted gelatine. *Food Hydrocolloids*, 17, 281-286.

Gómez-Guillén M.; Turnay J.; Fernandez-Diaz M.; Ulmo N.; Lizarbe M. y Montero P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16, 25-34.

Haug I. J.; Draget K. I. y Smidsrod O. (2004). Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18, 203-213.

Laemli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Margni, R.; Malchiodi, E. L. Y Chiaramonte, M. G. (1996). Electroforesis en gel de poliacrilamida; Isoelectroenfocado; Inmunotransferencia. En *Inmunología e Inmunoquímica – Fundamentos*. Margni, R. Ed. Editoreal Médica Panamericana, Buenos Aires.

Meyer M. y Morgentern B. (2003). Characterization of gelatine and acid soluble collagen by size exclusion chromatography coupled with multi angle light scattering (SEC-MALS). *Biomacromolecules*, 4, 1727-1732.

Mizuta S.; Miyagi T.; Nishimiya T. y Yoshinaka R. (2002a). Molecular species of collagen from wing muscle of skate. *Food Chemistry*, 79, 319-325.

Mizuta S.; Miyagi T.; Nishimiya T. Y Yoshinaka R. (2002b). Partial characterization of collagen in mantle and adductor of pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Food Chemistry*, 79, 319-325.

Rodbard, D. y Chrambach, A. (1970). Unified theory for gel electrophoresis and gel filtration. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 65 (4), 970-977.

Shapiro, A. L. y Maizel, J. V. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrilamide gels. *Bochemical and Biophysical Research Communications*, 28 (5), 815-820.

Tromp R.H.; ten Grotenhuis E. y Olieman C. (2001). Self-aggregation of gelatine above the gelling temperature analyzed by SEC-MALLS. *Food Hydrocolloids*, 16, 235-239.

Weber, K. y Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(16), 4406-4412.

Capítulo 6



Métodos reométricos experimentales
utilizados en esta tesis

6 Métodos reométricos experimentales utilizados en esta tesis

6.1. Introducción

Como se describió previamente en el Capítulo 3, la gelatina está compuesta por tres tipos predominantes de cadenas alfa, beta y gamma que, en solución diluida, presentan radios hidrodinámicos característicos. En tal sentido, el estudio de este sistema macromolecular en condiciones diluidas resulta de fundamental importancia debido a que las teorías fisicoquímicas y reológicas que permiten interpretar los resultados experimentales se encuentran más desarrolladas en este rango de concentración. Por consiguiente, en esta tesis se evalúa vía reometría el comportamiento reológico de soluciones diluidas de gelatina y a partir de la interpretación de estos datos experimentales se arriba a conclusiones concernientes a la microestructura y al estado conformacional de estas macromoléculas.

En general, las soluciones acuosas y diluidas de macromoléculas producen torques chicos a bajas velocidades de corte en los reómetros comerciales. Por ejemplo, mediante el uso de viscosímetros del tipo Brookfield de celda cono-plato se pueden generar velocidades de corte relativamente bajas de alrededor de 1.1 s^{-1} pero los datos experimentales que se obtienen con este tipo de instrumentos resultan poco precisos. Por lo tanto, para el análisis reométrico de soluciones macromoleculares diluidas se utiliza, generalmente, la viscosimetría capilar aunque esta reometría, tal como usualmente se la propone, no sería lo suficientemente adecuada para la aplicación de las teorías moleculares. En efecto, los dispositivos capilares

disponibles comercialmente (por ejemplo, viscosímetros del tipo *Ostwald-Cannon Fenske*) no permiten establecer en forma precisa ni el valor ni el rango de velocidad de corte alcanzado durante el ensayo reométrico. Mediante cálculos estimativos realizados en esta tesis se obtuvo que la velocidad de corte alcanzada dentro de estos viscosímetros comerciales es de 1000 a 3000 s^{-1} . De esta forma, haciendo uso de los viscosímetros capilares comerciales no es posible detectar reológicamente los comportamientos macromoleculares en solución diluida de interés en esta tesis como, por ejemplo, la respuesta newtoniana estricta o la presencia de pseudoplasticidad.

Por lo mencionado arriba, y en base a un trabajo previo (Berli y Deiber, 2004) se construyó un dispositivo capilar (no disponible comercialmente) que permite ensayar soluciones diluidas y ultra-diluidas de gelatina a bajas velocidades de corte. En este sentido, resulta relevante realizar en este capítulo una descripción del dispositivo diseñado, de la metodología experimental utilizada y del algoritmo de cálculo empleado para la obtención de las funciones reométricas (ver, también Olivares et al., 2006).

Asimismo, en este capítulo se realiza una revisión breve de la celda capilar clásica, la cual constituye la base para el desarrollo de la reometría capilar gravitatoria. En la derivación de las ecuaciones que permiten obtener las funciones reométricas se siguen los conceptos básicos de reometría descritos en los libros clásicos de Walters (1975), Bird et al. (1977) y Schowalter (1978).

Debido a que en esta tesis también se estudia mediante reometría rotacional el comportamiento reológico de soluciones concentradas de gelatina en distintas condiciones fisicoquímicas de pH y fuerza iónica, en este capítulo

se describe brevemente la teoría básica de la reometría cono-plato utilizada para estos ensayos reométricos.

6.2 Reometría capilar

Reometría capilar clásica

La reometría capilar permite, en general, calcular la viscosidad aparente η en función de la velocidad de corte $\dot{\gamma}$, a partir de los datos experimentales del gradiente de presión y caudal en el tubo capilar. Si la muestra fluye debido a su propio peso desde un depósito directamente conectado al capilar se obtiene una variación continua de la presión de entrada. En este caso, el gradiente de presión y el caudal se calculan a partir de los datos de la altura del fluido en el depósito en función del tiempo.

El tubo capilar, como geometría de flujo reométrico, se analiza en un sistema coordenado cilíndrico de variables $\{\theta, r, z\}$. En tubos donde la longitud L es mucho mayor que el radio R , el flujo es unidireccional. Luego, interesa en particular, la componente axial (dirección z) de la ecuación de cantidad de movimiento. La misma se expresa,

$$\rho \frac{\partial v_z}{\partial t} = -\frac{\partial p}{\partial z} + \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} (r \tau_{rz}) + \rho g \quad (6.2.1)$$

donde v_z es la velocidad axial del fluido, la cual es función de la coordenada radial r y p es la presión que depende solo de la posición axial z medida a

partir de la entrada del tubo. Asimismo, ρ es la densidad del fluido, g es la aceleración de la gravedad y τ_{rz} es la tensión de corte, de ahora en más denominada simplemente τ . Debido a que p es una función lineal de z , en la ecuación (6.2.1) se puede definir un gradiente de presión generalizado de la siguiente manera,

$$\frac{\Delta P}{L} = -\frac{\partial}{\partial z}(p - \rho g z) \quad (6.2.2)$$

donde ΔP es la diferencia de presión aplicada al fluido en el tubo capilar. La ecuación (6.2.1) en estado estacionario genera una tensión de corte de acuerdo a la siguiente expresión,

$$\tau(r) = \frac{\Delta P r}{2L} = \tau_w \frac{r}{R} \quad (6.2.3)$$

donde τ_w es la tensión de corte en la pared del tubo, es decir $\tau_w = \tau(R)$.

Para obtener la función $\eta(\dot{\gamma})$ se requiere conocer la velocidad de corte $\dot{\gamma}$ además de la tensión τ . En el tubo cilíndrico $\dot{\gamma}$ se expresa,

$$\dot{\gamma} = |\dot{\gamma}_{rz}| = -\frac{dv_z(r)}{dr} \quad (6.2.4)$$

En el capilar no se obtiene un flujo de corte homogéneo debido a que $\dot{\gamma}$ no es uniforme en todo el dominio de r . Asimismo, la funcionalidad de $\dot{\gamma}(r)$ depende del tipo de fluido. En consecuencia, no es posible obtener una expresión

general de $\dot{\gamma}(r)$ en el tubo. En reometría capilar, la velocidad de corte se debe calcular a partir del caudal volumétrico Q . En efecto, las magnitudes medibles en el tubo son Q y el gradiente $\Delta P/L$, a partir del cual se obtiene τ [ecuación (6.2.3)]. La expresión para calcular el caudal del fluido en el tubo capilar se obtiene a partir del balance de materia, de donde resulta,

$$Q = 2\pi \int_0^R v_z(r) r dr \quad (6.2.5)$$

Si se cumple la condición de no resbamiento $v_z(R) = 0$ en la pared del tubo el caudal se puede expresar entonces en función de $\dot{\gamma}(r)$ de acuerdo a,

$$Q = \pi \int_0^R \dot{\gamma}(r) r^2 dr \quad (6.2.6)$$

Realizando un cambio de variables apropiado mediante la ecuación (6.2.3) se obtiene,

$$\frac{Q \tau_w^3}{\pi R^3} = \int_0^{\tau_w} \tau^2 \dot{\gamma} d\tau \quad (6.2.7)$$

La ecuación (6.2.7) expresa el vínculo que existe entre el caudal Q y la tensión de corte τ_w en la pared del capilar. En la misma se observa que los valores experimentales Q versus τ_w están relacionados por una ecuación integral de primera especie (Hildebrand, 1965). Luego, determinar $\dot{\gamma}$ a partir de la

ecuación (6.2.7) constituye matemáticamente un problema *ill posed* (Honerckamp, 1989) debido a la inevitable dispersión de los datos experimentales asociados a Q y τ_w . Por tal motivo, la determinación correcta de $\eta(\dot{\gamma})$ es aún materia de debate en la literatura (ver, por ejemplo, Baker, 1977; Berli y Deiber, 2001). El mecanismo más utilizado para obtener $\dot{\gamma}$ se basa en transformar la ecuación (6.2.7) a la forma diferencial. Esto se logra diferenciando la ecuación (6.2.7) respecto de τ_w , haciendo uso de la regla de derivación de Leibnitz. De esta manera se obtiene la velocidad de corte en la pared del tubo $\dot{\gamma}_w$. Esto es,

$$\dot{\gamma}_w = \frac{1}{\tau_w^2} \frac{\partial}{\partial \tau_w} \left(\frac{Q \tau_w^3}{\pi R^3} \right) \quad (6.2.8)$$

Esta expresión se conoce como la ecuación de Weissemberg-Rabinowitsch y permite el cálculo de la velocidad de corte en la pared del tubo a partir de datos de tensión y caudal. Posteriormente, se obtiene la función viscosidad $\eta = \tau_w / \dot{\gamma}_w$. No obstante, el valor de $\dot{\gamma}_w$ es muy sensible a la forma de calcular el lado derecho de la ecuación (6.2.8) debido a la dispersión de los datos de Q versus τ_w como se mencionó anteriormente. Es decir, la transformación no evita las infinitas soluciones que provee el problema *ill posed*.

Como se mencionó más arriba, con los dispositivos tradicionales los cuales poseen el capilar en posición vertical no se logran velocidades de corte bajas y, por consiguiente, resulta necesario realizar una adaptación de esta celda reométrica que permita alcanzar velocidades de corte más bajas como se describe a continuación.

Viscosimetría capilar para bajas velocidades de corte

Como se mencionó en la sección 6.1, con el fin de obtener un rango de velocidad de corte relativamente bajo, se construyó un viscosímetro capilar en el cual la velocidad de corte alcanzada fue minimizada colocando el capilar en forma horizontal. De esta forma, el peso del líquido en el capilar no interviene en la presión efectiva (ver, por ejemplo Osorio y Deiber, 1986; Berli y Deiber, 2004). Este dispositivo se diseñó principalmente para atender a las necesidades experimentales de este trabajo de tesis. El mismo se construyó en el Taller de vidrio de la facultad de Ingeniería Química (UNL). Con este instrumento se pudo realizar un programa experimental que consistió en la medición de soluciones diluidas y ultra - diluidas de gelatina en diferentes condiciones fisicoquímicas. La metodología experimental llevada a cabo para estos estudios se detalla en los capítulos 7, 8 y 9.

El dispositivo capilar diseñado (la Figura 6.2.1 muestra una representación simple del dispositivo) permite obtener la función reométrica $\eta(\dot{\gamma})$ en un amplio rango de velocidades de corte y calcular los diferentes parámetros reológicos de distintos modelos a partir de la variación de la altura del fluido en los reservorios.

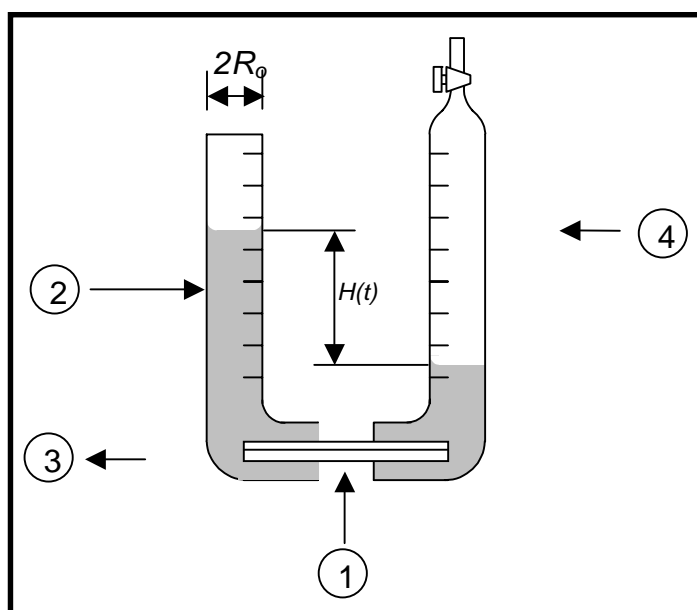


Figura 6.2.1 Viscosímetro gravitatorio con el capilar en posición horizontal. (1) Capilar de radio R , (2) Reservorio de radio R_0 y escala de lectura graduada en cm, (3-4) Entrada y salida del fluido de termostatación.

El viscosímetro gravitatorio consta de un reservorio cilíndrico de radio R_0 el cual alimenta la muestra al capilar de radio R y longitud L . Al final del capilar, la muestra ingresa y sube por otro tubo cilíndrico que en este caso particular también es de radio R_0 . Ambos reservorios poseen una escala graduada en centímetros que permite registrar con un cronómetro el tiempo en el cual el menisco de líquido atraviesa cada graduación. Este dispositivo se coloca en una cámara de termostatación, que permite mantener la temperatura constante con una precisión de $0,01^\circ\text{C}$ (Olivares et al., 2006).

Cuando el fluido se encuentra a temperatura constante, se inicia el flujo a través del capilar abriendo la llave situada en uno de los reservorios. Una vez establecido el estado estacionario se comienza a registrar la diferencia de

altura efectiva en los reservorios $H(t) = h_1(t) - h_2(t)$ en función del tiempo (ver Figura 6.2.1).

A partir de los balances de materia y de cantidad de movimiento en el dispositivo, se deducen la tensión de corte y la velocidad de deformación en el capilar. Para este caso, se desprecia la fricción en los reservorios respecto de la fricción dentro del capilar debido a que $R_0 \gg R$. Asimismo, mediante un balance de materia dentro del dispositivo el caudal se puede expresar de la siguiente manera (Osorio y Deiber, 1986; Berli y Deiber, 2004),

$$Q = - \frac{\pi R_0^2}{2} \frac{dH}{dt} \quad (6.2.9)$$

Debido a que la diferencia de presión ΔP aplicada al fluido en el tubo capilar es $\Delta P = \rho g R H(t)$ y considerando la ecuación (6.2.3), la tensión de corte en la pared del capilar, es decir para $r = R$ en estado estacionario es,

$$\tau_w = \frac{\rho g R H(t)}{2L} \quad (6.2.10)$$

Asimismo, la velocidad de corte en la pared del capilar se puede obtener de la ecuación (6.2.8) introduciendo las expresiones para Q y τ_w [ecuaciones (6.2.9) y (6.2.10) respectivamente]. De esta forma, es posible obtener la velocidad de corte de acuerdo a la siguiente expresión,

$$\dot{\gamma}_w = \frac{R_0^2}{2R^3} \left[3H' + H \frac{H''}{H'} \right] \quad (6.2.11)$$

donde H' y H'' son la primera y segunda derivada de la altura efectiva en función del tiempo respectivamente.

Una vez que se obtienen los datos de altura efectiva del fluido en el recipiente $H(t)$ en función del tiempo t , es posible calcular las variables τ_w y $\dot{\gamma}_w$ y para cada tiempo registrado se evalúa la función viscosidad aparente $\eta = \tau_w / \dot{\gamma}_w$.

Las ecuaciones (6.2.10) y (6.2.11) se pueden resolver para cada modelo de fluido. En particular, para fluidos newtonianos se obtiene (Berli y Deiber, 2004),

$$H = H_o \exp\left(-\frac{t\rho g R^4}{4\eta L R_o^2}\right) \quad (6.2.12)$$

donde $H_o = H(0)$ en este caso particular. Aplicando el logaritmo a ambos términos de la ecuación (6.2.12) es posible realizar un ajuste lineal de los datos experimentales de $H(t)$ versus t y, de este modo, se calcula la viscosidad η del valor correspondiente a la pendiente. Asimismo, se pueden obtener otras expresiones de $H(t)$ para los fluidos Newtonianos generalizados (Berli y Deiber, 2004). En este sentido, el mejor ajuste de los datos experimentales de $H(t)$ versus t define qué tipo de modelo describe el comportamiento de la solución sometida a flujo de corte.

En este trabajo se utilizó un dispositivo capilar con las siguientes características: $R_o = 1$ cm, $R = 0,03724$ cm y $L = 10,048$ cm. Para todas las

determinaciones realizadas en esta tesis el dispositivo se trató previamente con solución sulfocrómica con el fin de eliminar restos proteicos. También se realizaron múltiples lavados con agua destilada con una solución de detergente no iónico al 0,01% para remover grasas y otros contaminantes. Antes de obtener las mediciones de H versus t con cada muestra se realizaron dos lavados con agua deionizada para dejar la superficie libre de iones.

Para el procesamiento de E datos experimentales, el error relativo de ajuste se evaluó de la siguiente manera (Olivares et al., 2006),

$$\varepsilon = \frac{1}{E} \sum_{i=1}^E \left| \frac{H^{exp}(t_i) - H(t_i)}{H^{exp}(t_i)} \right| \quad (6.2.13)$$

donde t_i son los valores de tiempo a los cuales se realizan las medidas experimentales $H^{exp}(t_i)$, mientras que $H(t_i)$ son los valores de alturas efectivas teóricas obtenidas a t_i para cada modelo de fluido considerado. El programa de cálculo de la viscosidad aparente y el correspondiente análisis del error relativo de ajuste se realizó en lenguaje de programación Fortran. En este sentido, el algoritmo correspondiente se describe en el Apéndice I.

Asimismo, para determinar la precisión de la técnica experimental se realizaron 20 mediciones independientes de la viscosidad del agua y luego de un análisis estadístico de los datos de viscosidad evaluados, se obtuvo una desviación Standard de $4,5 \cdot 10^{-6}$ poise.

6.3 Reometría rotacional

Para el estudio reométrico de soluciones concentradas de gelatina (es decir para $C > C_g$) se utilizó un reómetro digital Brookfield modelo DV-III, controlado a partir de una computadora mediante el software Rheocalc de Brookfield. La celda reométrica es de tipo cono-plato, la cual se ubica en una cavidad cerrada como se esquematiza en la Figura 6.3.1 permitiendo así mantener la temperatura constante con una precisión de $0,01^\circ\text{C}$. Las dimensiones de la celda admiten conos de radio R_c de 24 mm y diferentes ángulos α_c . En este trabajo se utilizó un cono de $\alpha_c = 1.565^\circ$ donde se requiere un volumen de muestra de 1 cm^3 de acuerdo a las recomendaciones del manual del instrumento (Nº M/91-210-D493, Brookfield Eng. Labs. Inc. USA).

El modelo de reómetro utilizado tiene control cinemático, es decir, la variable de entrada es la velocidad de rotación. El sensor mide el torque M necesario para rotar el cono a una velocidad angular w .

A continuación se describe la teoría básica de la reometría cono-plato (ver, por ejemplo, Walters, 1975 y Bird et al., 1977).

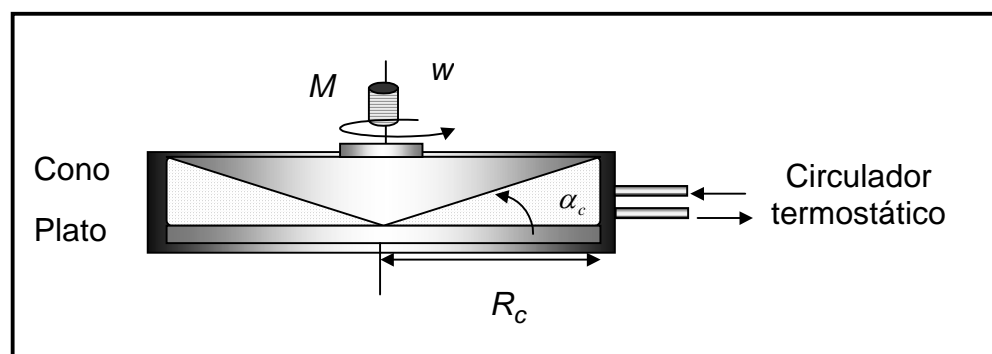


Figura 6.3.1 Esquema de la celda cono-plato utilizada en este trabajo

Considerando la geometría de flujo en un sistema de coordenadas esféricas $\{r, \phi, \theta\}$, se resuelve la ecuación de cantidad de movimiento del fluido

(ecuación (1.2.2)) para el caso donde el cono gira a una velocidad angular w . Si el ángulo del cono es suficientemente pequeño, el perfil de velocidades en estado estacionario se puede expresar,

$$v_{\phi}(r, \theta) = \frac{wr(\pi/2 - \theta)}{\alpha_c} \quad (6.3.1)$$

Exceptuando las situaciones en las cuales existen flujos secundarios, la velocidad del fluido tiene solo la componente tangencial ϕ . Asimismo, la única componente no nula del tensor de velocidad de deformación es,

$$\dot{\gamma}_{\phi\theta} = \dot{\gamma}_{\theta\phi} = -\frac{1}{r} \frac{\partial v_{\phi}}{\partial \theta} \quad (6.3.2)$$

Luego, a partir de las ecuaciones (6.3.1) y (6.3.2), es posible obtener la velocidad de corte en la celda,

$$\dot{\gamma} = \frac{w}{\alpha_c} \quad (6.3.3)$$

Debido a que los conos empleados en este tipo de celdas reométricas presentan la particularidad de tener ángulos pequeños, la velocidad de corte obtenida es uniforme, produciendo una velocidad de corte constante en todo el dominio de flujo. Esta característica particular de la celda cono-plato es una ventaja debido a la simplificación que resulta en los cálculos de la velocidad de corte. En efecto, si $\dot{\gamma}$ depende de la posición dentro de la celda (velocidad de

corte no uniforme) el estudio de los fluidos no-Newtonianos requiere consideraciones adicionales.

El torque que mide el instrumento se debe a la fuerza viscosa que realiza el fluido sobre el cono. El mismo se puede calcular a partir de la componente de corte $\tau_{\theta\phi}$ del tensor de tensiones,

$$M = \pi \int_0^{R_c} \tau_{\phi\theta} r^2 dr \quad (6.3.4)$$

Luego, para ángulos de cono pequeños, la tensión de corte $\tau = \tau_{\theta\phi}$ en la celda resulta,

$$\tau = \frac{3M}{2\pi R_c^3} \quad (5.3.5)$$

Corresponde remarcar que las ecuaciones (6.3.3) y (6.3.5) son válidas para ensayos con flujos de corte estacionarios, transitorios y dinámicos. En particular, en condiciones de flujo de corte estacionario ($w = \text{constante}$) la función reométrica viscosidad η se obtiene de la siguiente relación,

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (5.3.6)$$

como se indica en la ecuación (1.3.6). Esta función es sensible a la velocidad de corte, la temperatura y el tiempo transcurrido desde la imposición de un valor de velocidad angular w .

En esta tesis este instrumento se utiliza para evaluar la viscosidad aparente de soluciones concentradas de gelatina a diferentes pH y fuerzas iónicas. En este sentido, la metodología experimental y los resultados obtenidos se discuten en el capítulo 9.

6.4 Bibliografía

Baker, C. T. H. (1977). *The numerical treatment of integral equations*. Clarendon, Oxford.

Berli, C. L. A. y Deiber, J. A. (2001). A procedure to determine the viscosity function from experimental data of capillary flow. *Rheol. Acta*, 40, 272-278.

Berli, C. L. A. y Deiber, J. A. (2004). Theoretical analysis of the gravity-driven capillary viscometers. *Review of Scientific Instruments*, 75(4), 976-982.

Bird, R. B., Armstrong, R. y Hassager, O. (1977). *Dynamics of Polymeric Liquids*. Vol I. J. Wiley & Sons: New York.

Hildebrand, F. (1965). *Methods of Applied Mathematics*. Prentice Hall, New Jersey.

Honerkamp, J. (1989). Ill-posed problems in rheology. *Rheologica Acta*, 28, 263-371.

Olivares, M. L.; Peirótti, M. B. y Deiber, J. A. (2006). Analysis of gelatin chain aggregation in dilute aqueous solutions through viscosity data. *Food Hydrocolloids*, 20, 1039 - 1049.

Osorio, J. y Deiber, J. A. Medición de la viscosidad aparente mediante un flujo capilar gravitacional y cuasiestacionario. *Boletín de la Asociación Argentina de Reología*, IV, 16-25.

Schowalter, W. (1978). *Mechanics of Non-Newtonian Fluids*. Pergamon Press, Oxford.

Walters, K. (1975). *Reometry*. J. Wiley & Sons: New York.

Capítulo 7



Viscosidad intrínseca de gelatina para
diferentes historias térmicas

7 Viscosidad intrínseca de gelatina para diferentes historias térmicas

7.1 Introducción

Siguiendo los objetivos planteados en esta tesis, en el presente capítulo se realiza un estudio teórico y experimental de soluciones de gelatina en el rango de concentración diluido (es decir, para $C_c < C < C_g$) maduras a temperaturas inferiores a T_g^* (ver Capítulo 4 en el cual se detallan los fenómenos microestructurales asociados a esta zona de concentración y temperatura). En el contexto de este análisis, las soluciones de gelatina se estudian experimentalmente mediante la evaluación de la viscosidad intrínseca, haciendo uso de un viscosímetro capilar gravitatorio, especialmente diseñado para tal fin, el cual permite medir la viscosidad aparente en un rango de velocidades de corte relativamente bajas (para más detalles, ver Capítulo 6).

En este sentido, primeramente se introduce al lector en el contexto teórico-experimental que se requiere para el estudio de soluciones macromoleculares diluidas mediante la evaluación de la viscosidad intrínseca. Luego, se realiza una descripción de los ensayos experimentales llevados a cabo para el estudio de la maduración de soluciones diluidas de gelatina a diferentes historias térmicas y, finalmente, se exponen los resultados obtenidos en los cuales se concluye acerca del fenómeno de agregación que experimentan las cadenas de gelatina bajo las condiciones fisicoquímicas impuestas en cada experiencia.

7.2 Conceptos asociados a la viscosidad intrínseca de macromoléculas

Cuando una suspensión de partículas, las cuales poseen un tamaño significativamente mayor que el de las moléculas del solvente, se somete a flujo a través de un tubo capilar o en alguna otra celda reométrica utilizada para la medida de viscosidad, se observa un aumento de esta función reométrica con respecto a la viscosidad del solvente puro. Dicho fenómeno se produce debido a que las partículas se sitúan entre las capas que forman las moléculas del solvente distorsionando, de esta manera, el patrón de flujo (Tanford, 1961). El primer análisis fluidodinámico de estos sistemas fue realizado por Einstein en 1906, quien obtuvo una expresión de la viscosidad aparente η para un sistema diluido de esferas rígidas. De esta manera se demostró que la viscosidad bajo condiciones diluidas se puede evaluar con la siguiente expresión (Tanford, 1961; Hiemenz, 1986; Barnes et al., 1991),

$$\eta = \eta_s(1 + 2,5\phi) \quad (7.2.1)$$

donde η_s es la viscosidad del solvente y ϕ es la fracción volumétrica de las partículas. Extendiendo este análisis a suspensiones de partículas asimétricas se concluye que la viscosidad depende de la orientación de las mismas (Tanford, 1961). En efecto, si éstas se orientan paralelamente a las líneas de corriente, lo cual se produciría a gradientes de velocidad relativamente grandes, se registraría un menor valor de la viscosidad contrapuesto a aquel que se observa cuando éstas se disponen en forma aleatoria a bajos valores de velocidad de corte. En este último caso, algunas de estas partículas se

ubicarían en forma perpendicular a las líneas de corriente. En otras palabras, algunas soluciones o suspensiones macromoleculares pueden mostrar comportamientos no-Newtonianos aun cuando el solvente es Newtoniano (Tanford, 1961). No obstante, cuando el gradiente de velocidad es lo suficientemente bajo, la orientación de las partículas es despreciable. Para esta situación Simha, en 1940, extendió el tratamiento a suspensiones de partículas que son elipsoides de revolución para gradientes de velocidad bajos (Tanford, 1961; Bohdanecký y Kovár, 1982),

$$\eta = \eta_s(1 + \beta\phi) \quad (7.2.2)$$

donde el parámetro β toma el valor de 2,5 en el caso de partículas esféricas y valores mayores a 2,5 cuando éstas son elipsoides.

Muchas veces, resulta conveniente expresar los datos experimentales en términos de la viscosidad específica $\eta_{sp} = (\eta - \eta_s)/\eta_s$ y, de esta forma, en el límite de dilución infinita, las ecuaciones (7.2.1) y (7.2.2) indican que η_{sp} es proporcional al número de partículas suspendidas por unidad de volumen. Por consiguiente, se puede esperar que η_{sp} sea proporcional a la concentración C . La cantidad η_{sp}/C se conoce como viscosidad reducida η_{red} y en el límite de concentración cero se obtiene la viscosidad intrínseca $[\eta]$ (Tanford, 1961; Bird et al., 1977; Bohdanecký y Kovár, 1982),

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{C} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_s}{\eta_s C} \quad (7.2.3)$$

La viscosidad intrínseca es de interés para estudiar las soluciones macromoleculares diluidas. Ésta se determina midiendo η_{red} a varias concentraciones y extrapolando la secuencia a valores de concentración cero.

Efecto de la concentración

La viscosidad reducida η_{red} (la cual se extrapola a concentración cero para obtener la viscosidad intrínseca) es fuertemente dependiente de la concentración. Esta dependencia se expresa frecuentemente a través de la ecuación de Huggins (Tanford, 1961; Bird et al., 1977; Bohdanecký y Kovár, 1982),

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_1[\eta]^2 C \quad (7.2.4)$$

donde k_1 representa una medida de la interacción entre moléculas suspendidas (Bohdanecký y Kovár, 1982; Flickinger et al., 1999). Asimismo, la dependencia de la viscosidad con la concentración de soluciones macromoleculares diluidas también se describe con la ecuación de Kraemer (Bohdanecký y Kovár, 1982),

$$\ln \frac{\eta_r}{C} = [\eta] - k_2[\eta]^2 C \quad (7.2.5)$$

donde $\eta_r = \eta/\eta_s$ es la viscosidad relativa a la viscosidad del solvente η_s y k_2 es una constante que se debe determinar a partir de los datos experimentales junto con la viscosidad intrínseca. Además, k_1 y k_2 deben satisfacer la condición $k_1 + k_2 \approx 1/2$ (Bohdanecký y Kovár, 1982). Excepto en el caso de macromoléculas de pesos moleculares muy grandes, frecuentemente se supone que las medidas de viscosidad en el régimen diluido ($C \leq 10^{-2} \text{ g/cm}^3$) se describen apropiadamente por las ecuaciones (7.2.4) y (7.2.5) (Bohdanecký y Kovár, 1982). Por consiguiente, la viscosidad intrínseca de una solución macromolecular diluida se puede obtener considerando las siguientes condiciones,

$$\lim_{C \rightarrow 0} \left(\ln \frac{\eta_r}{C} \right) = \lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{C} \right) = [\eta] \quad (7.2.6)$$

Efecto de la velocidad de corte

Como se mencionó arriba, las moléculas muy asimétricas o fácilmente deformables tienden a orientarse o deformarse a elevados gradientes de velocidad siendo este efecto muy importante en moléculas que poseen valores de viscosidad intrínseca elevados (Tanford, 1961). Por tal motivo, resulta importante realizar mediciones de viscosidad intrínseca a velocidades de corte lo más bajas posibles para evitar cuantificaciones erróneas de $[\eta]$ en un rango de velocidad de corte desconocido y para poder realizar una extrapolación confiable de los valores de viscosidad a velocidad de corte nula.

7.3 Viscosidad intrínseca de gelatina para diferentes historias térmicas

Maduración de soluciones de Gelatina

Para este estudio se utilizó una gelatina comercial (materia prima de cuero vacuno) provista por la empresa PB Leiner Gelatin (Santa Fe- Argentina) con un Bloom de 227 \bar{g} y una viscosidad de norma (6,66 % p/p a 60 °C) de 39 mps cuyo peso molecular promediado en número de moles $M_n = 133$ kDa fue determinado mediante la técnica de PAGE-SDS (ver Capítulo 5).

Para la determinación de la viscosidad intrínseca se prepararon soluciones de gelatina con concentraciones de 10^{-3} a $4 \cdot 10^{-3}$ g/cm³ fijando la fuerza iónica en 110 mM con cloruro de sodio (NaCl) y también el pH en 9,8 con hidróxido de sodio. En este sentido, es relevante mencionar que en ausencia de sal, los únicos iones móviles presentes en la solución son los contra-iones que acompañan a la macromolécula cargada. Por lo tanto, la concentración de estos contra-iones y, consecuentemente, la fuerza iónica del medio caen a medida que la concentración de gelatina disuelta disminuye causando, de esta manera, una mayor expansión de la cadena polimérica (Tanford, 1961). Por consiguiente, el valor de fuerza iónica seleccionado para las determinaciones de viscosidad intrínseca ($I=110$ mM) fue lo suficientemente alto como para que la contribución a la misma por parte de los contra-iones de la cadena de gelatina eléctricamente cargada sea despreciable. De esta forma, se logra que las soluciones preparadas a cuatro concentraciones de gelatina diferentes para la determinación de $[\eta]$, posean el mismo valor de fuerza iónica determinado por el NaCl adicionado.

Para la disolución de la gelatina se realizó, primero, una etapa de hidratación de diez minutos con agua deionizada a 50°C y luego, otra etapa de disolución total en un volumen cercano al volumen final con el contenido de NaCl a la misma temperatura. Esta etapa se realizó con agitación durante cuarenta minutos. Seguidamente, se ajustó el pH con NaOH y se completó el volumen final verificando el pH requerido. Asimismo, se adicionó azida sódica en una concentración de 0.02% para prevenir degradaciones bacterianas durante el período de maduración. Luego, las soluciones se filtraron, se almacenaron en botellas de vidrio color caramelo para evitar el contacto con la luz y se sometieron a procesos de maduración a diferentes temperaturas como se describe más abajo. Una vez finalizado el proceso de maduración se midió la viscosidad intrínseca a 25°C para todas las experiencias que se describen a continuación (Olivares et al., 2006):

Experiencia 1 (E₁): Las soluciones de gelatina a las cuatro concentraciones requeridas para la medición de viscosidad intrínseca se maduraron por 20 horas a las siguientes temperaturas de maduración: 5, 15, 25, 30 y 35°C.

Experiencia 2 (E₂): Las soluciones de gelatina a las cuatro concentraciones requeridas para la medición de viscosidad intrínseca se maduraron por 20 horas a 5°C. Posteriormente se calentaron a 50 °C, durante una hora, antes de ser evaluadas.

Experiencia 3 (E₃): Las soluciones de gelatina de la experiencia (E₂) se re-maduraron por 20 horas a 5 °C.

Experiencia 4 (E₄): Las soluciones de gelatina a las cuatro concentraciones requeridas para la medición de viscosidad intrínseca se maduraron por 20

horas a 5°C; en este caso una fuerza iónica de 110 mM se estableció con tiocianato de potasio (KSCN).

Experiencia 5 (E₅): Las soluciones de gelatina a las cuatro concentraciones requeridas para la medición de viscosidad intrínseca con adición de urea 5, 20, 50 y 500 mM se maduraron por 20 horas a 5°C.

Para los ensayos reométricos se utilizó un viscosímetro capilar gravitatorio que posee el capilar en posición horizontal, el cual se describe en el Capítulo 6. Aquí también se presenta la metodología experimental llevada a cabo y el procesamiento de los datos obtenidos de cada experiencia.

7.4 Resultados

Viscosidad aparente de las soluciones diluidas de gelatina

Se observó que todas las soluciones diluidas de gelatina estudiadas aquí presentaron un comportamiento Newtoniano en el rango de velocidad de corte comprendido entre 2800 y 50 seg^{-1} . En efecto, los datos experimentales obtenidos de H versus t se ajustaron satisfactoriamente con la ecuación (6.2.12). En la Figura 7.4.1 se observa, a modo de ejemplo, el ajuste de los datos experimentales con un error relativo de ajuste $\varepsilon = 0,019$ (ver ecuación (6.2.13)) correspondiente a un coeficiente de regresión lineal cuadrado de $r^2 \geq 0,999$. Asimismo, en el Apéndice II se resume en forma de tablas los datos experimentales de H versus t obtenidos en cada experiencia.

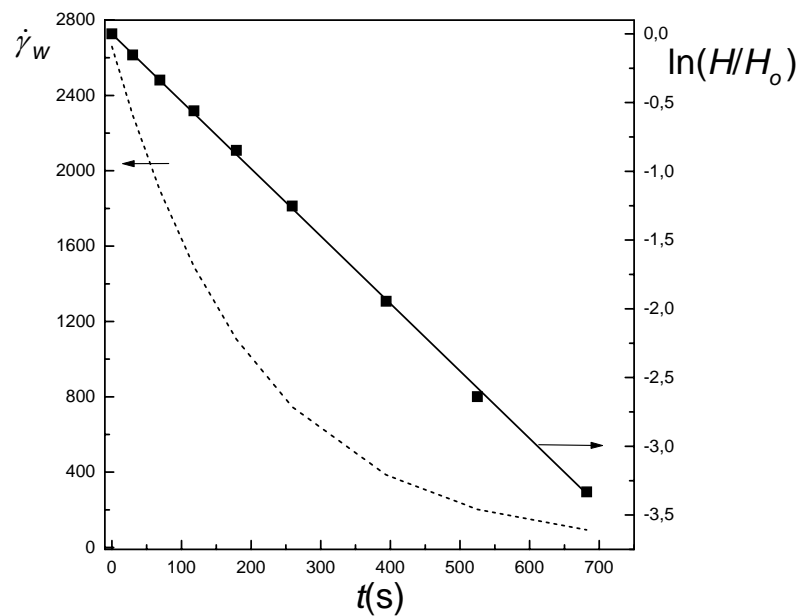


Figura 7.4.1. Comportamiento Newtoniano de una solución de gelatina de concentración 1.10^{-3} g/cm³. La historia térmica corresponde a la experiencia E₁ a 25°C. Los símbolos (●) representan los valores experimentales y la línea sólida es el ajuste realizado con la ecuación. (6.2.12). La línea de trazos muestra la variación de la velocidad de corte en la experiencia.

El comportamiento Newtoniano se observó en todas las experiencias realizadas a las diferentes concentraciones de gelatina, temperaturas de maduración y en presencia de KSCN y urea. Consecuentemente, la microestructura que presentan las soluciones diluidas de gelatina evaluadas estaría compuesta de moléculas individuales de gelatina y de agregados que poseen conformaciones relativamente simétricas (debido a que no se detectaron comportamientos pseudoplásticos). En este sentido, es sabido que las estructuras no esféricas (por ejemplo, las estructuras con conformación de varillas rígidas) pueden presentar comportamientos pseudoplásticos (Fox et al., 1951; Bird et al., 1977; Bohdanecký y Kovár, 1982).

Viscosidad intrínseca e historia térmica

Luego de comprobar el comportamiento Newtoniano de las soluciones diluidas de gelatina en la zona comprendida en $C_c < C < C_g$ y $T < T_g^*$ y en el rango de velocidades de corte ensayadas, se procedió a la evaluación de la viscosidad intrínseca de estas soluciones con el objetivo de inferir sobre el tamaño de las estructuras generadas durante el proceso de maduración. En las Figuras 7.4.2 a y b se muestran los resultados obtenidos con las experiencias E_1 y E_2 respectivamente donde se observa que las ecuaciones (7.2.4) y (7.2.5) proveen consistentemente el valor de $[\eta]$. El resto de las experiencias se reportan en el Apéndice II.

Asimismo, en la Tabla 7.4.1 se resumen los resultados de viscosidad intrínseca obtenidos para todas las experiencias realizadas a las distintas historias térmicas. Se observa que la temperatura de maduración tiene un efecto significativo en estos resultados. El menor valor promedio de $[\eta] \cong 56.5$ cm^3/g corresponde a la experiencia E_2 donde la posible agregación ocurrida durante la maduración a 5°C durante 20 horas fue destruida calentando la solución a 50°C durante una hora antes de llevar a cabo el ensayo reométrico. Este estado desagregado se obtuvo solamente para temperaturas de calentamiento substancialmente mayores a T_g^* .

Además, es importante indicar que los valores de viscosidad intrínseca obtenidos tienen el orden de magnitud esperado. Por ejemplo, Boedtker y Doty (1954), Bohidar y Jena (1994) y Haug et al. (2004) reportaron valores de viscosidad intrínseca desde 39 a $42 \text{ cm}^3/\text{g}$ en un rango de temperatura de 25 a 50°C con otras muestras de gelatina.

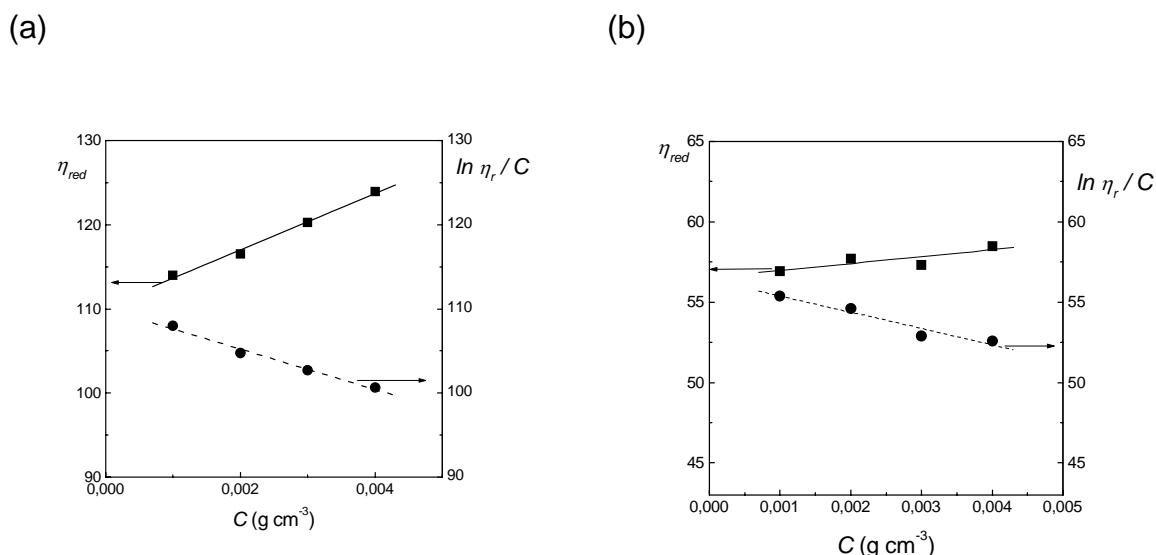


Figura 7.4.2. Valores experimentales de η_{red} (■) y de $\ln \eta_r / c$ (●) para las distintas concentraciones de gelatina. Los datos experimentales corresponden a: (a) la experiencia E_1 a 5°C y (b) la experiencia E_2 . Asimismo, la línea sólida representa al ajuste de los datos experimentales con la ecuación de (7.2.4) y la línea de trazos representa al ajuste de los mismos con la ecuación (7.2.5).

Además, la concentración de superposición (*overlap concentration*) $C^* = 1/[\eta]$ (ver, por ejemplo, Bohdanecký y Kovár, 1982), estimada a través de los resultados de la experiencia E_2 (correspondiente a cadenas de gelatina sin agregar) es de 1,78 %, lo cual coincide con lo estimado por Bohidar y Jena (1994) quienes reportan valores de C^* de 2,09 % a 3,31 % cuando la temperatura aumenta de 35°C a 60°C respectivamente.

La Tabla 7.4.1 también muestra los valores de los parámetros k_1 y k_2 calculados en forma separada a través de las respectivas pendientes (ver Figura 7.4.2), validando que $k_1 + k_2 \approx 0,5$. Debido a que el parámetro k_1 está relacionado en general con las interacciones partícula-partícula y partícula-solvente, se encontró que los valores de k_1 obtenidos indican que estas interacciones decrecen substancialmente a medida que la temperatura se

aproxima a T_g^* (ver Capítulo 4) generando estructuras de menor tamaño. Este resultado indicaría que la transición de cadena errática a hélice disminuye o, eventualmente, termina alrededor de los 30°C.

Tabla 7.4.1 Viscosidad intrínseca en cm^3/g y coeficientes k_1 y k_2 obtenidos a través de los ajustes experimentales con las ecuaciones (7.2.4) y (7.2.5) (Olivares et al., 2006).

Experiencia	T_m (°C)	Urea (mM)	$[\eta]$	$[\eta]$	k_1	k_2
			($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$) Ec. (7.2.4)	($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$) Ec. (7.2.5)	($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$) Ec. (7.2.4)	($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$) Ec.(7.2.5)
E ₁	5		116.2	115.5	0.22	0.23
	15		92.6	92.3	0.23	0.23
	25		62.6	62.4	0.14	0.31
	30		59.5	59.2	0.03	0.44
	35		56.8	56.7	0.14	0.32
E ₂			56.5	56.4	0.13	0.32
E ₃			110.3	110.0	0.28	0.20
E ₄			77.7	77.3	0.11	0.31
E ₅		5	94.3	94.1	0.33	0.17
		20	84.6	84.5	0.33	0.15
		50	85.7	85.5	0.29	0.19
		500	85.8	85.5	0.22	0.23

Debido a que k_1 aumenta nuevamente por encima de 30°C, se podría esperar que superando esta temperatura ($T > T_g^*$) se produzcan otros tipos de interacciones entre cadenas (por ejemplo, las interacciones hidrodinámicas), donde las unidades hidrodinámicas básicas se encuentran bajo un movimiento Browniano más intenso, el cual es proporcional a $k_B T_m$, y probablemente no contienen triples hélices (Olivares et al., 2006). Este resultado es consistente con el valor de $T_g^* \cong 26^\circ\text{C}$ estimado por Braidot y Deiber (1999).

Es claro que el aumento de la viscosidad intrínseca para valores menores de temperatura de maduración (ver Tabla 7.4.1) puede estar asociado a la agregación de cadenas de gelatina mediante la formación de zonas de

triples hélices; de esta manera el volumen hidrodinámico ocupado por estos agregados es mayor que el correspondiente a la experiencia E₂. La Figura 7.4.3 muestra la evolución de la viscosidad intrínseca con la temperatura de maduración y permite evidenciar claramente estos resultados.

Además, el fenómeno de agregación se refleja en el aumento de k_1 para las soluciones de gelatina maduras a bajas T_m . Más aún, a través de la experiencia E₃ se concluye que el proceso de agregación es térmicamente reversible debido a que el valor de viscosidad intrínseca obtenido en E₁ a 5°C fue prácticamente reproducido. Por consiguiente, el proceso de agregación en la zona diluida involucra interacciones termo-reversibles entre cadenas diferentes de gelatina asociadas mediante la formación de zonas de triples hélices (Boedtker y Doty, 1954; Harrington y Rao, 1970; Harrington y Karr, 1970; Busnel et al., 1989).

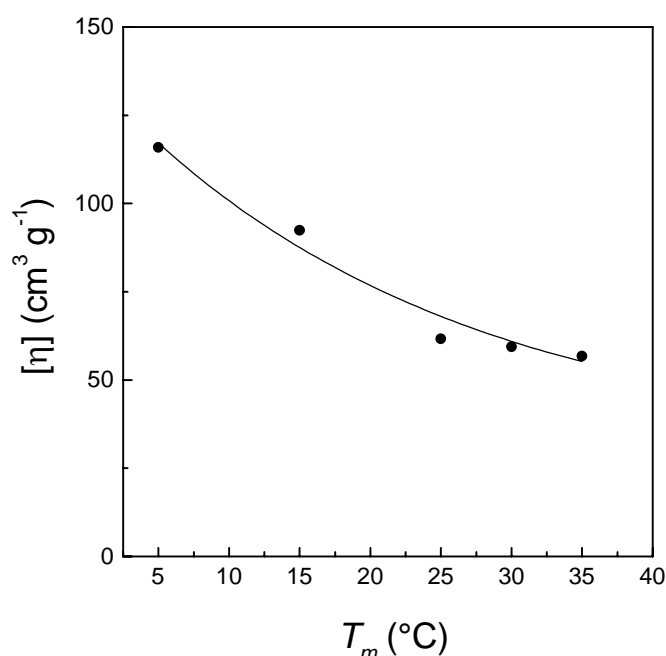


Figura 7.4.3. Viscosidad Intrínseca en función de la temperatura de maduración de las experiencias descritas en E₁.

Con el fin de verificar el fenómeno de agregación, en las experiencias E₄ y E₅ se utilizaron inhibidores de enlaces del tipo puente-hidrógeno. Tanto el tiocianato de potasio (KSCN) como la urea inhibieron el proceso de agregación debido a que los valores de viscosidad intrínseca obtenidos fueron menores que aquellos realizados en las mismas condiciones experimentales pero en ausencia de estos agentes químicos. No obstante, los valores obtenidos fueron mayores que en el caso de la experiencia E₂ (ver Tabla 7.4.1). En E₄ el proceso de inhibición fue logrado parcialmente y, a una concentración de 110 mM de KSCN, las cadenas de gelatina tuvieron poca agregación. Este resultado es consistente con el reportado por Horský y Švanter (1993) quienes trabajaron con soluciones diluidas de gelatina a 15°C en presencia de una concentración de 500 mM de KSCN. En nuestro análisis experimental se evitó la variación de la concentración de KSCN debido a que el cambio en la fuerza iónica afecta, por supuesto, los valores de viscosidad intrínseca (ver Capítulo 9, Figura 9.4.1).

De E₅ se observa que la viscosidad intrínseca decrece a medida que aumenta la concentración de urea. Para concentraciones de urea mayores a 20 mM se obtiene un valor constante de viscosidad intrínseca de 85 cm³/g aproximadamente. La Figura 7.4.4 muestra estos resultados.

En lo referente a este tema, Boedtker y Doty (1954) obtuvieron valores de viscosidad intrínseca a 40,2 °C y encontraron resultados similares en presencia de urea 9 M (este valor es muy superior al valor de saturación encontrado en esta tesis y reportados en la Tabla 7.4.1). Dichos autores argumentaron que las cadenas de gelatina presentan una expansión en presencia de urea y, por lo tanto, el valor de viscosidad intrínseca que se obtiene es mayor. Por consiguiente, se podría inferir que el mismo fenómeno

de expansión estaría presente en la experiencia E₅. En este sentido, la urea no permitiría la estabilización de las zonas de triples hélices formadas durante el proceso de agregación. No obstante, las bases moleculares por las cuales la urea posee la habilidad de desnaturalizar una proteína (o inhibir la estructura secundaria) todavía se encuentra bajo estudio (Bennion y Daggett, 2003). Es así como, se observa que la estabilización de la triple hélice de poli-L-prolina se debe a la formación de enlaces del tipo puente-hidrógeno entre el grupo -C=O de la prolina o hidroxiprolina y el grupo -H de la glicina produciendo una unión intercatenaria (Ward y Courts, 1977). En consecuencia, el efecto de inhibición de la urea y del KSCN se produciría a este nivel molecular.

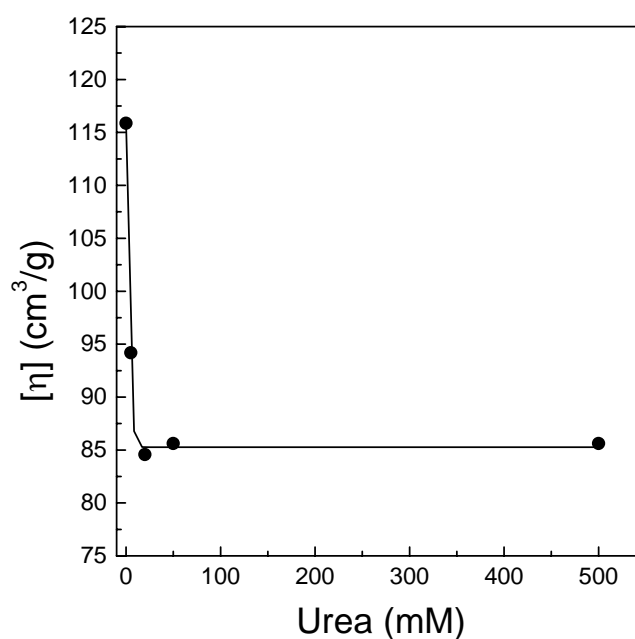


Figura 7.4.4. Viscosidad Intrínseca en función de la concentración de urea (mM) de las experiencias descritas en E₅.

7.5 Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que para $C_c < C < C_g$ la temperatura de maduración afecta los valores de viscosidad intrínseca debido a la agregación de las cadenas de gelatina. Así, cuando la temperatura de maduración se encuentra por debajo del valor crítico T_g^* , las cadenas de gelatina evolucionan a la conformación de poli-L-prolina y se estabilizan mediante la generación de zonas de triples hélices, dando lugar a la formación de agregados o *clusters*. Estos agregados son termo-reversibles y se destruyen calentando las soluciones a 50°C.

La urea y KSCN inhibieron el proceso de agregación y arrojaron valores de viscosidad intrínseca inferiores a los obtenidos en las mismas condiciones de tiempo y temperatura de maduración en ausencia de estos agentes químicos. Para una concentración de urea mayor a 20 mM se obtuvieron valores de viscosidad intrínseca más grandes que para el caso en el que se eliminó la formación de agregados mediante calentamiento térmico (Experiencia E₂).

Es claro que este tipo de ensayo macroscópico, como es la determinación de la viscosidad intrínseca, permite obtener conclusiones relevantes que conciernen a la evolución de las moléculas de gelatina en el rango de concentración diluido. En tal sentido, haciendo uso de esta técnica reométrica y tomando como base estos resultados, en el Capítulo 8 se realiza un estudio cinético del proceso de agregación de cadenas y se obtienen conclusiones acerca de la microestructura de los *clusters* que se forman durante la maduración a distintas temperaturas.

En general se concluye que el estudio de la evolución de las soluciones diluidas de gelatina provee información relevante sobre la dinámica de las cadenas que, a concentraciones más elevadas, generan el gel.

7.6 Bibliografía

- Barnes, H. A.; Hutton, J. F. and Walters, K. (1991). *An Introduction to Rheology*, Elsevier, Amsterdam.
- Bennion, B. J. y Daggett, V. (2003). The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *PNAS*, 100(9), 5142-5147.
- Bird, R.; Armstrong, C. y Hassager O. (1977). *Dynamic of Polymeric Liquids*, vol I, John Wiley & Sons, New York.
- Boedtker, H. y Doty, P. (1954). A study of gelatin molecules, aggregates and gels. *J. of Chem. Phys.*, 5, 968-982.
- Bohdanecký, M. y Kovár, J. (1982). *Viscosity of Polimer Solutions*, Elsevier Scientific Publishing Company. New York.
- Bohidar H. B. y Jena S. S. (1994). Study of sol-state properties of aqueous gelatin solutions, *J. Chem. Phys.* 100, 6888-6895.
- Braidot, A. A. A. y Deiber, J. A. (1999). Linear viscoelastic model of a maturing gelatin solution. *Biorheology*, 36, 267-284.
- Busnel, J. P., Morris, E. R. y Ross Murphy, S. B. (1989). Interpretation of renaturation kinetics of gelatin solutions. *Int. J. Biol. Macromol.*, 11(2), 119-125.
- Einstein A. (1906). *Investigation on the Theory of the Brownian Movement*. Dover Publications, New York.
- Flickinger, G. L.; Dairanieh, I. S. y Zukoski, C. F. (1999). The rheology of aqueous polyurethane dispersions. *J. Non-Newtonian Fluid Mech.*, 87(2&3), 283-305.

Harrington, W. F. y Karr, G. M. (1970). Collagen structure in solution II. Analysis of refolding kinetics in terms of nucleation and growth processes. *Biochemistry*, 9(19), 3725-3733.

Harrington, W. F. y Rao N. V. (1970). Collagen structure in solution: I. Kinetics of helix regeneration in single-chain gelatins. *Biochemistry*, 9(19), 3714-3724.

Haug, I. J.; Draget, K. I. y Smidsrod, O.(2004). Physical and rheological properties compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18, 203-213 .

Hiemenz, P. C. (1986). *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. Marcel Dekker, Inc., New York.

Horský, J. y Švantner, J. (1993). Gelatin renaturation and viscosity of dilute gelatin solutions. *Polymer International*, 32(2), 159-164.

Olivares, M. L.; Peirotti, M. B. y Deiber, J. A. (2006). Analysis of gelatin chain aggregation in dilute aqueous solutions through viscosity data. *Food Hydrocolloids*, 20, 1039 - 1049.

Simha R. (1940). The Influence of Brownian Movement on the viscosity of solutions. *J. Phys. Chem.*,44,25- 42.

Tanford, Ch. (1961). *Fisical Chemistry of Macromolecules*, Wiley, New York.

Ward, A. G. y Courts, A. (1977). *The Science and Technology of Gelatin*. London: Academic Press.

Capítulo 8



Agregación de moléculas de gelatina
en solución diluida

8 Agregación de moléculas de gelatina en solución diluida

8.1 Introducción

En el presente capítulo se estudia la agregación de cadenas de gelatina en las zonas de concentración diluida ($C_c < C < C_g$) y ultra-diluida $C < C_c$, a temperaturas inferiores a la temperatura de gelificación ($T < T_g^*$). Para este estudio, las soluciones de gelatina se someten a distintas temperaturas de maduración T_m durante diferentes tiempos de maduración t_m y se evalúan a través de medidas de viscosidad específica η_{sp} . Para los ensayos experimentales se utiliza el viscosímetro capilar gravitatorio, diseñado y construido especialmente para obtener un rango de velocidades de corte bajas (ver Capítulo 6).

En este sentido, es relevante recordar que mediante el estudio realizado a través de medidas de viscosidad intrínseca, se concluye que para la zona de concentración comprendida en $C_c < C < C_g$ y $T < T_g^*$ la agregación de cadenas de gelatina es debida a la formación de zonas o núcleos de triples hélices. Estos núcleos se estabilizan principalmente por enlaces del tipo puente-hidrógeno, y dan lugar a una agregación termo-reversible (para mayores detalles ver Capítulo 7). Asimismo, considerando lo discutido en el Capítulo 4, donde se concluye que el mecanismo de formación del núcleo de triple hélice es predominantemente bimolecular, los resultados experimentales obtenidos se interpretan con la teoría cinética de Smoluchowski. Mediante este análisis teórico se arriba a conclusiones que conciernen al tamaño de los *clusters*

formados durante la agregación y a las características microestructurales de los mismos. Además, se obtiene información acerca del número promedio de cadenas de gelatina presentes en estos *clusters* para diferentes tiempos y temperaturas de maduración.

8.2 Protocolo experimental para la medición de la viscosidad específica

Para este estudio se utilizó la misma muestra de gelatina analizada a través de los ensayos de viscosidad intrínseca (ver características de dicha muestra de gelatina en el Capítulo 7) la cual posee un peso molecular promedio $M_n = 133$ KDa obtenido mediante PAGE-SDS (ver los detalles de este estudio en el Capítulo 5).

Para la determinación de la viscosidad específica a distintos tiempos y temperaturas de maduración se prepararon soluciones de gelatina con una concentración de 10^{-3} g/cm³. La fuerza iónica se estableció en 110 mM con cloruro de sodio (NaCl) y el pH en 9,8 con hidróxido de sodio (NaOH). Para la disolución de la gelatina se realizó, primero, una primera etapa de hidratación de diez minutos con agua deionizada a 50°C y luego, otra etapa de disolución total en un volumen cercano al volumen final con el contenido de NaCl a la misma temperatura. Esta etapa se realizó con agitación durante cuarenta minutos. Seguidamente, se ajustó el pH con NaOH, se completó el volumen final verificando el pH requerido. Por otra parte, se adicionó azida sódica en una concentración de 0,02 % para prevenir degradaciones bacterianas durante el período de maduración. Las soluciones se filtraron, se almacenaron en botellas de vidrio color caramelo y se sometieron a maduración durante 24

horas, evaluándose la viscosidad específica η_{sp} a 25°C a los tiempos de maduración 0, 2, 8, 11, 20 y 24 horas. Este procedimiento se realizó para las temperaturas de maduración 5, 15, 20 y 25 °C. Asimismo, se preparó una solución de gelatina de concentración 10^{-3} g/cm³ (fuerza iónica 110 mM y pH 9,8) a la cual se le adicionó una concentración de $6 \cdot 10^{-4}$ M de duodecyl sulfato de sodio (SDS) y, posteriormente, se maduró durante 24 horas a 15°C, evaluando la viscosidad específica a 25°C a los tiempos de maduración 0, 2, 8, 11, 20 y 24 horas. Es preciso aclarar aquí, que la concentración de surfactante es inferior a la concentración micelar crítica ($8 \cdot 10^{-3}$ M) (ver también Hering et al., 1991). Esta experiencia se realizó con el objetivo de evaluar si las interacciones hidrofóbicas también participan en el fenómeno de agregación en la zona diluida.

Para el estudio de las soluciones ultra-diluidas ($C < C_c$), se preparó una solución de gelatina de concentración 10^{-5} g/cm³ en idénticas condiciones fisicoquímicas que las establecidas para las soluciones diluidas (pH= 9,8 y I= 110 mM). La misma se maduró a 25°C durante 168 horas (siete días) a un valor de T_m cercano a T_g^* promoviendo, de esta manera, la formación de estructuras ordenadas con la conformación del tipo varillas rígidas (Harrington y Rao, 1970).

8.3 Viscosidad específica en función del tiempo de maduración

Antes de comenzar la discusión concerniente a la evolución de la viscosidad específica con el tiempo y la temperatura de maduración, es preciso aclarar que, al igual que en las experiencias de viscosidad intrínseca, en todos

los casos las soluciones se comportaron como fluidos newtonianos en el rango de velocidad de corte comprendido entre 2800 y 50 s^{-1} . En efecto, los datos experimentales de H versus t se ajustaron satisfactoriamente con la ecuación 6.2.12 y arrojaron coeficientes de regresión lineal cuadrado $r^2 \geq 0,999$ y errores relativos de ajuste $\varepsilon \leq 0,02$. A esta conclusión solamente se arriba mediante el uso de un dispositivo como el que se propone en esta tesis. Más aún, mediante el uso de los viscosímetros comerciales no es posible al presente determinar si la solución macromolecular presenta pseudoplasticidad en mayor o menor grado. Tanto es así que en las bibliografías previas sobre el tema no se reportan las velocidades de corte a las cuales se ensayaron las soluciones macromoleculares. Sorprende que la única excepción a esta crítica sea el trabajo de Fox et al., (1951) el cual está referenciado en el conocido libro de Tanford (1961).

En la Figura 8.3.1 se observa la evolución de la viscosidad específica a medida que transcurre el tiempo de maduración en las experiencias realizadas a las distintas T_m . Los datos experimentales muestran que en todas las experiencias η_{sp} aumenta en forma lineal en el rango de tiempo de maduración evaluado arrojando coeficientes de regresión lineal cuadrados $r^2 \geq 0,98$.

Asimismo, mediante la evaluación de la viscosidad específica de la solución de gelatina con agregado de SDS, se obtuvieron los mismos valores de η_{sp} que en la experiencia realizada a la misma temperatura de maduración ($T_m = 15^\circ\text{C}$) en ausencia de este surfactante. Estos resultados sugieren que las interacciones hidrofóbicas no son responsables de la agregación de cadenas de gelatina en la zona de temperaturas inferiores a T_g^* (ver también Hering et

al., 1991, quienes sugieren que las interacciones hidrofóbicas son, posiblemente, las responsables de la agregación de cadenas de gelatina en la zona diluida $C < C_g$ pero a temperaturas elevadas ($T > T_g^*$)).

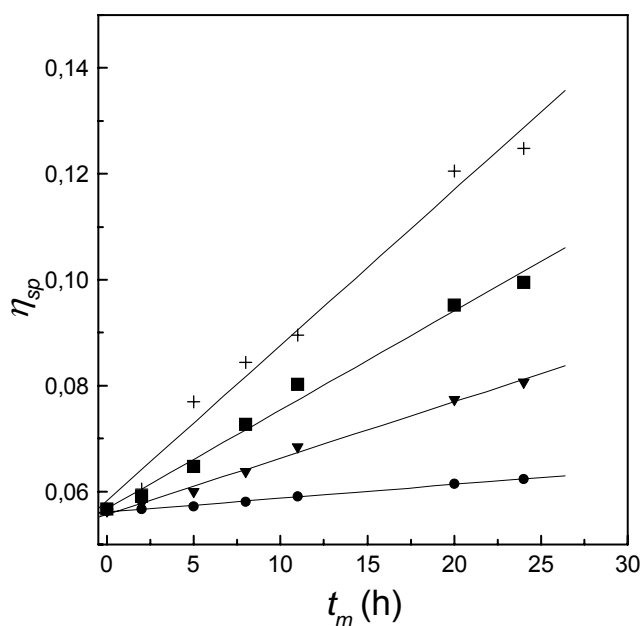


Figura 8.3.1 Viscosidad específica η_{sp} en función del tiempo de maduración. Las temperaturas de maduración T_m evaluadas fueron: 5°C (+), 15°C (■), 20°C (▼), 25°C (●).

Por consiguiente, se podría concluir que en la zona diluida los *clusters* se forman por la agregación de cadenas de gelatina mediante la formación de uniones físicas con estructuras de triple hélice, como también lo revelan los resultados obtenidos de viscosidad intrínseca (ver discusión referente a este tema en el Capítulo 7).

8.4 Agregación de moléculas de gelatina

Antes de comenzar con el análisis de la agregación de cadenas de gelatina en solución diluida, es preciso indicar que al inicio de la maduración, los valores de η_{sp}/C a todas las temperaturas de maduración son cercanos al valor de viscosidad intrínseca obtenido cuando las soluciones de gelatinas son tratadas térmicamente durante una hora a 50°C (ver experiencia E₂ descrita en el Capítulo 7). En efecto, estos valores no difieren de los valores de η_{sp}/C obtenidos en E₂ para la misma concentración en más de 0,41%. Como se explicó en el Capítulo 7, mediante este tratamiento térmico se destruyen las zonas de unión entre cadenas de gelatina, y se obtiene una solución libre de agregación. Por consiguiente, estos resultados muestran que para la concentración de gelatina utilizada en estas experiencias ($C = 10^{-3}$ g/cm³) las macromoléculas no se encuentran asociadas o agregadas al inicio de la maduración. Asimismo, es preciso aclarar que esta concentración es lo suficientemente baja como para obtener valores cercanos a los de la viscosidad Intrínseca pero lo suficientemente elevada como para evitar la zona ultra-diluida ($C > C_c$), donde se produciría la formación de hélices intramoleculares (ver en el Capítulo 4 una discusión más detallada de esta fenomenología).

Teniendo en cuenta los estudios previos realizados por distintos autores, los cuales fueron discutidos en el Capítulo 4, se considera que las cadenas de gelatina en solución diluida ($C_c < C < C_g$) se encuentran inicialmente en la conformación de cadena errática (*random coils*) y que durante el transcurso de la maduración, cuando la temperatura es lo suficientemente baja, experimentan

una conversión por tramos a la conformación de hélice de poli-L-prolina. Estas estructuras pueden, en principio, visualizarse como esferas equivalentes compuestas por la cadena proteica y el solvente ocluido (Tanford, 1961), teniendo en cuenta que el número de uniones virtuales (Flory, 1969) en la cadena polipeptídica es mayor a 200 para la muestra estudiada.

Por otra parte, para el rango de concentración comprendido entre 10^{-3} y 10^{-4} g/cm³ la formación de núcleos se puede considerar bimolecular (Busnel et al., 1989; Benguigui et al., 1991, Ross-Murphy, 1992), por consiguiente, este mecanismo de asociación se adopta como válido para el proceso de maduración descrito en la Sección 8.2. Además, debido a que la formación de los núcleos es el mecanismo que controla la cinética del proceso de agregación (Harrington y von Hippel, 1961; Harrington y Rao, 1970; Busnel et al., 1989), se infiere que el fenómeno de agregación de cadenas de gelatina se puede interpretar mediante la teoría cinética de Smoluchowski, a los efectos de explorar la validez del mecanismo de agregación bimolecular propuesto por diversos autores. Este contexto teórico se describe en términos de fracciones de agregados donde cada uno posee k moléculas con un radio equivalente a_k . En este sentido, el proceso de crecimiento es controlado por la velocidad de colisión J_{ij} de pares de agregados (ver, por ejemplo, Russel et al., 1989),

$$J_{ij} = \frac{2k_B T_m}{3\eta_s} (a_i + a_j) \left(\frac{1}{a_i} + \frac{1}{a_j} \right) \frac{n_i n_j}{W_{ij}} \quad (8.4.1)$$

donde n_i y n_j son el número de agregados por unidad de volumen que contienen i y j moléculas, respectivamente y, W_{ij} es el factor de estabilidad coloidal. Luego, el balance de masa se expresa,

$$\frac{dn_k}{dt_m} = \frac{1}{2} \sum_{\substack{i=1 \\ j=k-i}}^{k-1} J_{ij} - \sum_{i=1}^{\infty} J_{ki} \quad (8.4.2)$$

con la condición inicial $n_1(0) = n_0$ y $n_k(0) = 0$ para $k > 1$. Aquí, n_0 es el número inicial de moléculas de gelatina. Es posible obtener una solución analítica de este problema suponiendo que: (a) La colisión se produce entre pares de agregados de tamaños aproximadamente iguales, esto es,

$$(a_i + a_j) \left(\frac{1}{a_i} + \frac{1}{a_j} \right) = 4 \quad (8.4.3)$$

y (b) El factor de estabilidad coloidal es independiente del tamaño de los agregados, es decir $W_{ij} = W$. Luego, aplicando las hipótesis (a) y (b) a las ecuaciones (8.4.1) y (8.4.2) se obtiene,

$$n_k = \frac{n_0 (t_m/t_p)^{k-1}}{(1 + t_m/t_p)^{k+1}} \quad (8.4.4)$$

donde el tiempo característico es $t_p = 3\eta_s W / 4n_0 k_B T_m$. En este contexto, el número total de agregados por unidad de volumen $n_{tot} = \sum_{i=1}^{\infty} n_i$ se utiliza para definir el número promedio de moléculas por agregado $N = n_0 / n_{tot}$ al tiempo de maduración t_m ; por consiguiente,

$$N = 1 + \frac{t_m}{t_p} \quad (8.4.5)$$

En la ecuación (8.4.5) el tiempo característico se puede expresar como $t_p = 1/k_a n_0$, donde $k_a = 4k_B T_m / 3\eta_s W = k_d / W$ es la constante de velocidad de agregación y k_d es la constante de agregación limitada por difusión (Hunter, 1992). Es bien conocido que cuando la agregación es rápida $W = 1$ y $k_a = k_d$. Por otro lado, cuando existe una barrera energética en la interacción entre las unidades cinemáticas la frecuencia de colisión disminuye. En efecto, la estabilidad de una suspensión coloidal depende de la presencia de fuerzas repulsivas que superen a las fuerzas atractivas (siempre presentes) entre moléculas. En estas circunstancias, $k_a \neq k_d$ y el factor de estabilidad coloidal adquiere valores mayores. Este régimen se conoce como agregación lenta o difusión limitada por reacción (Overbeek, 1977; Hunter, 1992).

La ecuación (8.4.5) se puede vincular con la viscosidad de soluciones diluidas de gelatina bajo las hipótesis establecidas anteriormente mediante la viscosidad específica η_{sp} como sigue,

$$\eta_{sp} = \left(\frac{\eta - \eta_s}{\eta_s} \right) = \beta \phi_a \quad (8.4.6)$$

donde ϕ_a es la fracción volumétrica efectiva de la fase discreta en el estado agregado y β es el factor de forma, el cual, como ya se expresó en el Capítulo 7, para macromoléculas esféricas toma el valor de 2,5. Asimismo, es necesario una relación entre ϕ_a y la fracción volumétrica inicial de cadenas simples de gelatina ϕ , expresada como,

$$\phi = \frac{4}{3} \pi a^3 C \frac{N_A}{M_n} \quad (8.4.7)$$

donde a es el radio promedio inicial de las cadenas simples, teniendo en cuenta que este biopolímero es a su vez polidisperso. En este sentido, dentro del marco de la teoría utilizada aquí, se supone que los agregados en el régimen diluido forman estructuras fractales a temperaturas de maduración inferiores a T_g^* . De esta manera, los agregados constituyen *clusters* que ocluyen solvente en su interior. Luego, el número de moléculas de gelatina promedio por agregado N , se relaciona con la dimensión fractal $f \leq 3$ a través de la siguiente relación (Russel et al., 1989),

$$N = \left(\frac{R}{a} \right)^f \quad (8.4.8)$$

donde R es el radio promedio de la población de agregados a un valor específico del tiempo de maduración. Es apropiado indicar que f representa la estructura interna de los agregados y depende de la velocidad de agregación. Por ejemplo, para velocidades de agregación altas $f = 1,75$ mientras que para velocidades de agregación bajas, $f = 2,0 - 2,2$. Además, cuando ocurren reordenamientos internos dentro de los agregados, este parámetro se aproxima cada vez más al valor 3 debido a que ese arreglo interno condiciona la formación de estructuras más compactas removiendo solvente ocluido (Russel et al., 1989). Haciendo uso del peso molecular promediado en número de moles obtenido mediante PAGE-SDS (ver procedimiento en el Capítulo 5), el radio equivalente promedio inicial de las cadenas simples de gelatina a se puede estimar a partir del valor experimental de viscosidad intrínseca de la experiencia E_2 descrita en el Capítulo 7 utilizando la siguiente ecuación (Tanford, 1961),

$$[\eta] = \frac{\beta 4\pi a^3 N_A}{3M_n} \quad (8.4.9)$$

obteniéndose un valor de $a \cong 106 \text{ \AA}$. Luego, dentro de este contexto teórico, a través de la ecuación (8.4.8) la fracción volumétrica efectiva promedio

$$\phi_a = n_{tot} \frac{4}{3} \pi R^3 = \frac{n_o}{N} \frac{4}{3} \pi R^3 \text{ se puede expresar de la siguiente manera,}$$

$$\phi_a = \phi N^{(3-f)/f} \quad (8.4.10)$$

para obtener a partir de las ecuaciones (8.4.6) y (8.4.10) la siguiente ecuación,

$$N = \left(\frac{\eta_{sp}}{\beta\phi} \right)^{f/(3-f)} \quad (8.4.11)$$

El valor de la fracción volumétrica efectiva de la fase discreta en ausencia de agregación se puede estimar realizando $\phi = \eta_{sp}/\beta$ a $t_m = 0$ debido a que, como se mostró más arriba, a este tiempo de maduración las moléculas de gelatina todavía no han sufrido agregación. De este modo, el valor obtenido es $\phi = 0,023$ para $C = 10^{-3} \text{ g/cm}^3$.

A los efectos de cuantificar el parámetro t_p a cada temperatura de maduración se evaluó el valor de f requerido en la ecuación (8.4.11). Para esto, se realizó un proceso iterativo dando diferentes valores de f en la ecuación (8.4.11) para obtener valores de N a los distintos tiempos de maduración t_m . Luego, con los pares de valores de N versus t_m obtenidos en este proceso iterativo se evaluó t_p a través de la ecuación (8.4.5). El valor definitivo de t_p fue aquel que arrojó el mejor coeficiente de regresión lineal cuadrado en la ecuación (8.4.5) de todo el proceso iterativo. Para la ejecución de este procedimiento se realizó un programa numérico en lenguaje de programación Fortran cuyo diagrama de flujo se presenta en el Apéndice I. Estos resultados se muestran en la Figura 8.4.2.

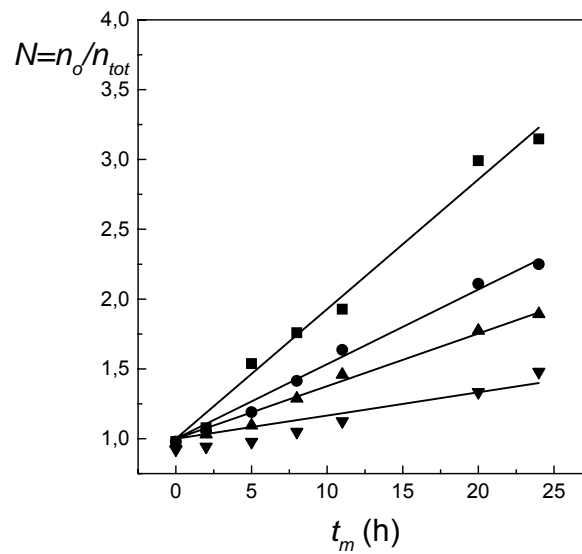


Figura 8.4.2. Número promedio de moléculas de gelatina por agregado (N) en función del tiempo de maduración t_m a las siguientes temperaturas de maduración: 5°C (■), 15°C (●), 20°C (▲) y 25°C (▼).

Debido a que $n_o = C \frac{N_A}{M_n} = 4,53 \cdot 10^{15}$ moléculas/cm³ en la Tabla

8.4.1 se reportan los valores obtenidos de f , t_p , k_a y W . También se reportan en esta tabla los coeficientes de regresión lineal cuadrado obtenidos con los ajustes de los datos experimentales de cada experiencia.

Siguiendo la evolución de k_a o t_p en la Tabla 8.4.1 se observa que la velocidad de reacción aumenta a medida que la temperatura de maduración disminuye. En este sentido, W aumenta con la temperatura de maduración consistentemente. Estos resultados muestran en forma cuantitativa que menores temperaturas promueven la agregación en la zona de concentración diluida (para $C_c < C < C_g$). Los valores grandes de W reportados en la Tabla 8.4.1 permiten concluir que la agregación es lenta en todo el rango de

temperatura ensayado. Asimismo, para 5, 15 y 20°C la dimensión fractal obtenida es relativamente baja. Estos valores probablemente indican que el fenómeno de nucleación, el cual se promueve a bajas temperaturas, produce agregados desordenados que ocluyen gran cantidad de solvente. Dicha situación cambia para la temperatura de maduración de 25°C donde la dimensión fractal obtenida es $f = 2.43$. En efecto, a temperaturas de maduración mayores (T_m cercanas a T_g^*) es esperable que los procesos de nucleación y de crecimiento ocurran simultáneamente (ver, por ejemplo, Harrington y Rao, 1970; Harrington y Karr, 1970) generando estructuras fractales más compactas. Además, es posible observar que para $T_m = 25$ °C el coeficiente de regresión lineal cuadrado es $r^2 \approx 0.84$, y que este valor es menor que el obtenido para las otras temperaturas de maduración. Este resultado se debe a que, probablemente, el modelo de agregación se basa en la formación de un núcleo de triple hélice bimolecular y a esta temperatura el proceso de crecimiento de los núcleos formados comienza a ser relevante.

Tabla 8.4.1 Dimensión fractal f , tiempo característico t_p , constante de velocidad de agregación k_a , factor de estabilidad coloidal W y coeficiente de regresión cuadrado r^2 obtenidos mediante la teoría de agregación de Smoluchowsky.

T_m (°C)	f	t_p (horas)	k_a (cm ³ seg ⁻¹)	W	r^2
5	1,79	10,8	$5,7 \cdot 10^{-21}$	$5,8 \cdot 10^8$	0,99
15	1,79	18,7	$3,3 \cdot 10^{-21}$	$1,4 \cdot 10^9$	0,99
20	1,82	26.5	$2,3 \cdot 10^{-21}$	$2,3 \cdot 10^9$	0,98
25	2,43	60.2	$1,0 \cdot 10^{-21}$	$6,0 \cdot 10^9$	0,84

Estas conclusiones son consistentes con los resultados obtenidos por Harrington y Karr (1970) quienes predijeron, mediante mediciones de rotación óptica de soluciones diluidas de gelatina, que el proceso de crecimiento aumenta a mayores temperaturas de maduración.

En la Figura 8.4.3 se analiza el fenómeno de agregación a un mismo tiempo de maduración de 24 horas. Se observa que el número promedio de partículas por agregado N disminuye a medida que aumenta la temperatura de maduración variando de 1,38 partículas en promedio por agregado para la temperatura de 25°C a 3,20 partículas en promedio por agregado para la temperatura de maduración de 5°C.

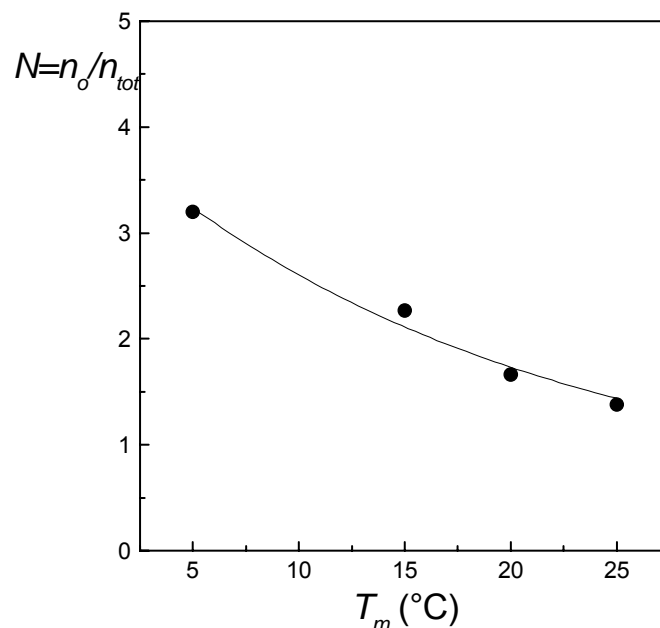


Figura 8.4.3 Número promedio de partículas por agregado N en función de la temperatura de maduración T_m para un tiempo de maduración de 24 horas.

Una vez conocido el tiempo característico t_p se analizó la variación de la relación n_k/n_0 en función del tiempo de maduración para diferentes valores k de moléculas de gelatina, haciendo uso de la ecuación (8.4.4). La Figura 8.4.4 muestra, a manera de ejemplo, los resultados obtenidos para la temperatura de maduración de 5°C.

En todas las experiencias se observa que, a medida que transcurre el tiempo de maduración, el número de moléculas sin agregar ($k=1$) disminuye mientras que los agregados con diferentes cantidades de k moléculas aumentan en un principio, luego toman un valor máximo y posteriormente comienzan a disminuir nuevamente a expensas del crecimiento de agregados con mayor cantidad de moléculas asociadas (en la Figura 8.4.4 se observa n_k/n_0 para $k=2$ y $k=4$).

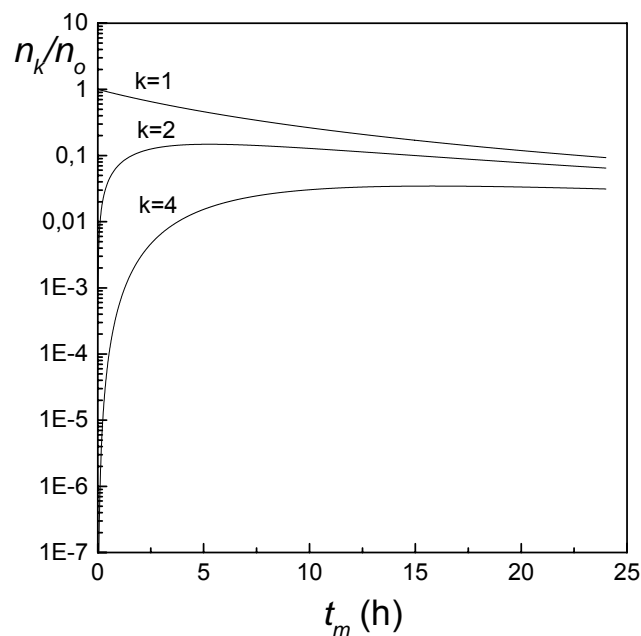


Figura 8.4.4 Variación de la relación n_k/n_0 en función del tiempo de maduración para diferentes valores de k moléculas de gelatina a una temperatura de maduración de 5°C.

Asimismo, resulta relevante evaluar la distribución de tamaño de los agregados $S_k = kn_k/n_0$. Debido a que el número k de moléculas de gelatina por agregado, las cuales poseen radio a_k , satisface $k = A_k^f$ siendo $A_k = (a_k/a)$ (Russel et al., 1989), es claro que S_k puede ser expresada en términos del tiempo adimensional t_m/t_p ; luego, de la ecuación (8.4.4) se obtiene,

$$S_k = \frac{kn_0(t_m/t_p)^{k-1}}{n_0(1+t_m/t_p)^{k+1}} \quad (8.4.12)$$

La ecuación (8.4.12) satisface $\sum_{k=1}^{\infty} S_k = 1$. La Figura 8.4.5 muestra la variación de S_k en función de k para distintos tiempos de maduración en la experiencia realizada a 5°C.

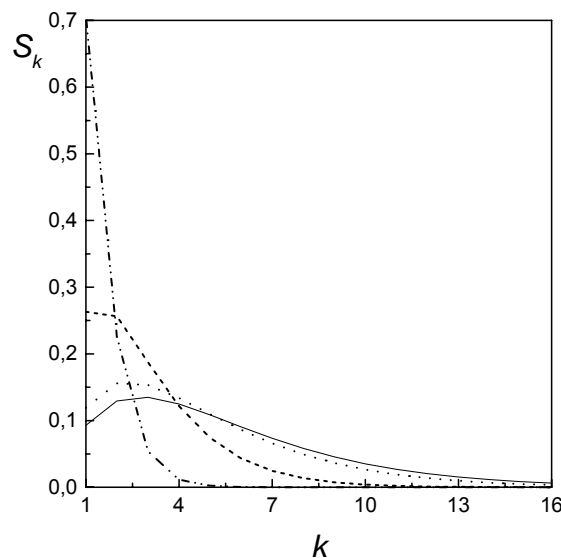


Figura 8.4.5 S_k en función del número de moléculas de gelatina por agregado k de la experiencia realizada a 5°C. Los tiempos de maduración son: 2 (---), 10 (— · —), 20 (·····) y 24 (—) horas.

Se observa que S_k tiende a ser altamente polidispersa adoptando una forma del tipo gaussiana a medida que el tiempo de maduración aumenta (ver Figura 8.4.5 para los tiempos de maduración de 20 y 24 horas).

Además, en la Figura 8.4.6 se observa la variación de S_k en función de a_k para distintos tiempos de maduración de la experiencia realizada a 5°C. En esta figura también se observa, a través de la dispersión de la función S_k , cómo a medida que transcurre el tiempo de maduración la población de agregados de distintos tamaños se vuelve más heterogénea.

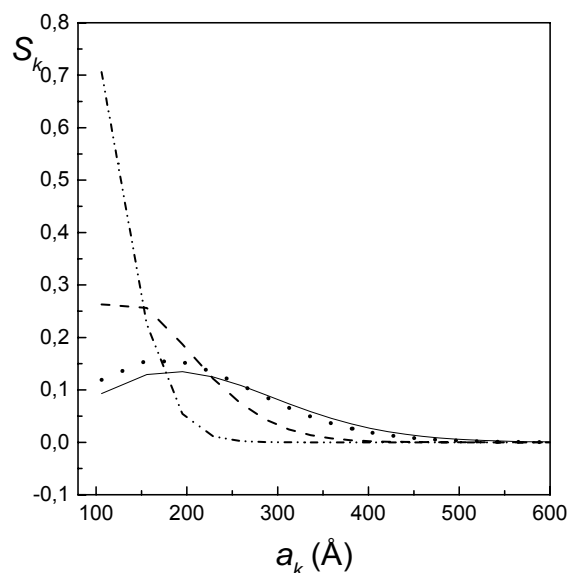


Figura 8.4.6 Variación de S_k en función del tamaño de los agregados a_k de la experiencia realizada a 5°C. Los tiempos de maduración son: 2 (— · —), 10 (---), 20 (·····) y 24 (—) horas.

El radio promedio de los agregados en solución para valores específicos de tiempo y temperatura de maduración se puede expresar,

$$R = \sum_{k=1}^{\infty} S_k a_k \quad (8.4.13)$$

La Figura 8.4.7 muestra la evaluación de R en función de la temperatura de maduración mientras se mantiene constante el tiempo de maduración.

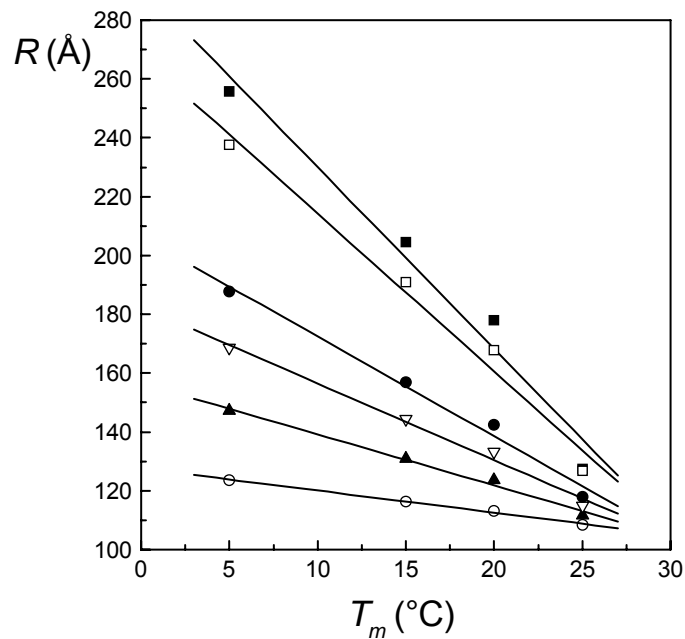


Figura 8.4.7 Variación del tamaño promedio de agregado R en función de la temperatura de maduración T_m . Los tiempos de maduración son: 2 (○), 5 (▲), 8 (▽), 11(●), 20 (□) y 24 (■) horas.

Se observa que el radio promedio R decrece linealmente a medida que aumenta la temperatura de maduración, dentro del rango de tiempos y temperaturas evaluadas, lo que resulta claramente una consecuencia de la menor agregación y de la formación de estructuras más compactas a medida que aumenta la temperatura.

8.5 Análisis de la influencia del primer efecto electroviscoso en el radio hidrodinámico de las moléculas de gelatina

Como se mencionó en el Capítulo 2, las moléculas de gelatina poseen cargas eléctricas en la secuencia peptídica debido a la presencia de aminoácidos básicos y ácidos generando, de esta forma, una doble capa difusa de iones de longitud característica κ^{-1} , cuando están disueltas en un medio donde se encuentran los contra-iones y eventualmente iones adicionales (ver Capítulo 2 donde se discute la teoría de la doble capa eléctrica). Es por esto que cuando una solución de macromoléculas de estas características se somete a flujo de corte, existe una contribución a la viscosidad de esta solución debido a la distorsión de la nube iónica que rodea a la macromolécula (Conway y Dobry-Duclaux, 1960). Este fenómeno de naturaleza electrostática se denomina primer efecto electroviscoso y se debe analizar en el presente estudio de agregación de cadenas de gelatina en el régimen de concentración diluido.

Los primeros intentos por cuantificar la influencia del primer efecto electroviscoso sobre la viscosidad de soluciones diluidas fueron realizados por Smoluchowski en 1916. Una de las formas aceptadas actualmente fue obtenida por Booth en 1950 la cual consiste en agregar un factor de corrección p_B a la ecuación de Einstein (Conway y Dobry-Duclaux, 1960; Allison et al., 2003),

$$\eta = \eta_s \{1 + 2.5\phi[1 + p_B]\} \quad (8.5.1)$$

donde p_B posee la siguiente expresión,

$$\rho_B = q^* y^2 \Gamma \quad (8.5.2)$$

siendo a su vez,

$$q^* = \frac{\varepsilon k_B T}{\eta_s e^2} \left(\frac{\sum_{\alpha} C_{\alpha} Z_{\alpha}^2 m_{\alpha}^{-1}}{\sum_{\alpha} C_{\alpha} Z_{\alpha}^2} \right) \quad (8.5.3)$$

$$y = \frac{Ze^2}{\varepsilon \kappa a^2 k_B T} \quad (8.5.4)$$

$$\Gamma = \frac{3}{2} \pi (\kappa a)^{-4} \quad (8.5.5)$$

En la ecuación (8.5.3) C_{α} , Z_{α} y m_{α} son la concentración, valencia y movilidad de la especie α respectivamente. Asimismo, en la ecuación (8.5.4) Z es el número de carga neta o valencia de la partícula que posee un radio a . También la movilidad de las especies m_{α} se puede calcular a partir de los radios iónicos r_{α} de las especies de la siguiente manera (Allison et al., 2003),

$$m_{\alpha} = \frac{1}{6\pi\eta_s r_{\alpha}} \quad (8.5.6)$$

Debido a que en las experiencias de viscosidad específica la fuerza iónica se estableció utilizando NaCl, y considerando que los radios r_{α} de las especies

sodio y cloruro son 1.837 Å y 1.206 Å respectivamente (Yamanaka et al., 1995; Allison et al., 2003) en la Tabla 8.5.1 se muestran los valores de ρ_B obtenidos para cadenas simples y agregados de gelatina a distintos tiempos y temperaturas de maduración para las condiciones fisicoquímicas (pH=9,8 y fuerza iónica I=110 mM) establecidas en los ensayos experimentales de viscosidad específica.

Tabla 8.5.1 Contribución de primer efecto electroviscoso ρ_B a la viscosidad de una solución diluida de gelatina a distintos tiempos y temperaturas de maduración.

T_m (°C)	t_m (horas)	N	R (Å)	Z	ρ_B
5	0	1.00	106.00	75.00	$6.761 \cdot 10^{-2}$
	2	1.19	123.50	89.25	$4.268 \cdot 10^{-2}$
	5	1.46	147.25	109.50	$2.533 \cdot 10^{-2}$
	8	1.74	168.40	130.50	$1.739 \cdot 10^{-2}$
	11	2.02	187.73	151.50	$1.293 \cdot 10^{-2}$
	20	2.86	237.53	214.50	$7.006 \cdot 10^{-3}$
	24	3.23	255.76	242.25	$5.855 \cdot 10^{-3}$
15	0	1.00	106.00	75.00	$6.761 \cdot 10^{-2}$
	2	1.11	116.37	89.25	$5.093 \cdot 10^{-2}$
	5	1.27	130.84	95.25	$3.587 \cdot 10^{-2}$
	8	1.43	144.27	107.25	$2.699 \cdot 10^{-2}$
	11	1.59	156.85	119.25	$2.128 \cdot 10^{-2}$
	20	2.07	190.81	155.25	$1.240 \cdot 10^{-2}$
	24	2.28	204.48	171	$1.029 \cdot 10^{-2}$
20	0	1.00	106.00	75.00	$6.761 \cdot 10^{-2}$
	2	1.07	113.23	80.25	$5.499 \cdot 10^{-2}$
	5	1.19	123.51	89.25	$4.266 \cdot 10^{-2}$
	8	1.30	133.21	97.50	$3.410 \cdot 10^{-2}$
	11	1.41	142.41	105.75	$2.808 \cdot 10^{-2}$
	20	1.75	167.70	131.25	$1.779 \cdot 10^{-2}$
	24	1.90	178.03	142.5	$1.512 \cdot 10^{-2}$
25	0	1.00	106.00	75.00	$6.761 \cdot 10^{-2}$
	2	1.03	108.29	77.25	$6.371 \cdot 10^{-2}$
	5	1.08	111.63	81.00	$5.889 \cdot 10^{-2}$
	8	1.13	114.84	84.75	$5.477 \cdot 10^{-2}$
	11	1.18	117.95	88.50	$5.120 \cdot 10^{-2}$
	20	1.33	126.69	99.75	$4.292 \cdot 10^{-2}$
	24	1.40	127.51	105.00	$4.401 \cdot 10^{-2}$

Para estos cálculos se utilizó una carga neta promedio de las cadenas de gelatina de peso molecular $M_n = 133$ KDa a pH= 9,8 de $Z = 75$ (ver, Piaggio, et al., 2005) y se tomó como radio de partícula el radio equivalente promedio $a \approx R$ de las cadenas sin agregar y de los *clusters* formados durante el proceso de agregación. Por otra parte, el valor de $\kappa = 1,09 \cdot 10^9 \text{ m}^{-1}$ correspondiente a un valor de fuerza iónica $I = 110$ mM se obtuvo con la ecuación (2.4.10) (ver Capítulo 2).

A través de los resultados obtenidos se observa que el primer efecto electroviscoso es despreciable para las soluciones de gelatina estudiadas en esta tesis. En tal sentido, es relevante mencionar que en todos los casos $\kappa a \geq 12$ y, en estas circunstancias, la longitud de la doble capa eléctrica es delgada en relación al tamaño de las moléculas simples y *clusters* de gelatina. En efecto, Garcías-Salinas et al. (2000) y Allison et al. (2003) reportaron resultados similares concernientes al efecto de la fuerza iónica sobre ρ_B en partículas rígidas.

8.6 Estabilidad de soluciones diluidas de gelatina.

Factor de estabilidad coloidal

Como se mencionó anteriormente en la Sección 8.5, el factor de estabilidad coloidal W representa la relación existente entre la velocidad de agregación de partículas primarias en ausencia de interacciones repulsivas o atractivas y la velocidad de agregación cuando estas interacciones se encuentran presentes. En este sentido, la manera más conveniente de medir

experimentalmente el valor de W es determinando la velocidad de formación de dobletes a bajos tiempos de agregación y en condiciones diluidas (Russel et al., 1989; Lattuada et al., 2003). En las experiencias realizadas en este trabajo se observó que, al tiempo máximo de maduración evaluado, el número promedio de moléculas por agregado N a la menor temperatura de maduración fue $N=3,2$. Por consiguiente, en estas condiciones, los valores de W obtenidos se pueden considerar apropiados.

Luego de la evaluación de W a las diferentes temperaturas de maduración, resulta relevante realizar una estimación de la barrera energética asociada con la agregación de cadenas de gelatina en solución diluida, la cual incluye fuerzas de largo alcance. Para este propósito, W se expresa (Russel, et al., 1989),

$$W = 2a \int_0^{\infty} \frac{\exp(U_T(h)/k_B T_m)}{(h+2a)^2 G(h)} dh \quad (8.6.1)$$

donde U_T es la energía de interacción total entre pares de la partículas y h es la distancia entre la superficie de las mismas. Asimismo, $G(h)$ es un factor de corrección que tiene en cuenta la resistencia adicional a la agregación causada por la interacción hidrodinámica. Una de las expresiones utilizadas de este factor $G(h)$ es (Hunter, 1992),

$$G(h) = \frac{2h}{a} \left[\frac{1 + 3h/2a}{1 + 13h/2a + 3h^2/a^2} \right] \quad (8.6.2)$$

La energía de interacción entre dos superficies o partículas coloidales está dada, fundamentalmente, por el resultado de las fuerzas de la doble capa eléctrica y las fuerzas de van der Waals. La combinación de estas dos interacciones es la esencia de la teoría de Deryaguin-Landau-Verwey-Overbeek conocida como DLVO (Hiemenz, 1986; Hunter, 1992; Israelachvili, 1995). En este contexto, la energía total de interacción entre pares de partículas U_T es,

$$U_T = U_R + U_A \quad (8.6.3)$$

Sin embargo, el comportamiento de muchos sistemas no se puede explicar usando la teoría de la DLVO. Numerosas experiencias sugieren la existencia de un término extra que aparece por la interacción entre la superficie y las capas de solvente adyacente. En tal sentido, Hunter (1992) propone incluir un término debido a la estructura del solvente U_S en el cálculo de la energía total de interacción como se indica en la siguiente expresión,

$$U_T = U_R + U_A + U_S \quad (8.6.4)$$

Estas fuerzas adicionales pueden ser monótonamente repulsivas, monótonamente atractivas u oscilatorias y son mucho más fuertes que las fuerzas DLVO a distancias cortas. Asimismo, Israelachvili (1995) las clasifica como fuerzas no-DLVO. Cuando el medio es agua, valores positivos de la energía de interacción indican la presencia de fuerzas de hidratación de

naturaleza repulsiva y valores negativos indican la presencia de fuerzas hidrofóbicas de naturaleza atractiva (Hunter, 1992).

A los fines de estimar $U_T(h)$ se describen a continuación las distintas energías de interacción que intervienen en el sistema macromolecular estudiado.

Energía repulsiva debida a la doble capa eléctrica

Como se detalló en el Capítulo 2, debido a la presencia de cargas en las moléculas de gelatina, (las cuales están a su vez suspendidas en un medio donde están disueltos los contraiones y los iones adicionales) el sistema se puede interpretar en términos de la teoría de la doble capa eléctrica donde el potencial de superficie ψ_0 y la longitud de Debye κ^{-1} son expresados a través de las ecuaciones (2.4.8) y (2.4.10) respectivamente (ver Capítulo 2). Además, la energía repulsiva U_R entre dos esferas separadas entre sí por una distancia h se expresa (Tanford, 1961; Hunter, 1992),

$$U_R = \frac{4\pi\epsilon\psi_0^2 a^2}{h+2a} \exp[-\kappa h] \quad \text{para } \kappa a < 5 \quad (8.6.5)$$

$$U_R = -2\pi\epsilon\psi_0^2 a \ln\{1 - \exp[-\kappa h]\} \quad \text{para } \kappa a > 10 \quad (8.6.6)$$

Para las condiciones de trabajo de pH=9,8 y fuerza iónica I=110 mM, se obtiene que $\kappa a \cong 12$, por lo tanto, se utilizó la ecuación (8.6.6) de la energía repulsiva U_R y un potencial de superficie de $\psi_0 = 10 \text{ mV}$. Para el cálculo

estimativo de este potencial se utilizó una valencia promedio de las cadenas de gelatina $Z = 75$ (ver, Piaggio, et al., 2005). No obstante, se verificó que debido a que la fuerza iónica del medio es considerablemente elevada, estas cargas se encuentran fuertemente apantalladas y la energía de interacción total entre las moléculas no cambia considerablemente si se varía el potencial en un rango de 5 a 30 mV.

Energía Atractiva debida a las fuerzas de van der Walls

Debido a que las fuerzas de van der Walls son siempre atractivas entre partículas de la misma naturaleza, en el caso especial de dos esferas en un líquido la energía de interacción U_A debida a este tipo de fuerzas es (Hunter, 1992),

$$U_A = -\frac{A_H}{6} \left\{ \frac{2a^2}{h^2 + 4ah} + \frac{2a^2}{h^2 + 4ah + 4a^2} + \ln \left(\frac{h^2 + 4ah}{h^2 + 4ah + 4a^2} \right) \right\} \quad (8.6.5)$$

donde A_H es la constante de Hamaker. Para sistemas proteína-agua-proteína la constante de Hamaker resulta $A_H \cong 10k_B T$ aproximadamente (Coen et al., 1995).

Energía repulsiva de hidratación

Las fuerzas que dan origen a este tipo de energía repulsiva aparecen en superficies hidrofílicas que tienen la capacidad de ligar agua fuertemente,

mediante grupos hidrofílicos (grupos iónicos, suiteriónicos o ligantes de hidrógeno) como ocurre con las proteínas altamente solubles. Comúnmente se conocen como fuerzas de hidratación o fuerzas estructurales (Israelachvili, 1992). La estabilización por solvatación y por formación de enlaces del tipo puente - hidrógeno origina una fuerza repulsiva entre dos superficies adyacentes. La fuerza de hidratación repulsiva es de largo alcance, con una longitud efectiva de 3 a 5 nm y una longitud de decaimiento típica de 0,6-1,1 nm. Dicha fuerza es de tipo estructural y surge a partir de los fuertes enlaces de tipo puente - hidrógeno entre los grupos superficiales y las moléculas de agua. Esto modifica la red de enlaces puente - hidrógeno por moléculas de agua en las cercanías de una superficie hidrofílica que en el agua pura confiere la energía de estabilización y se traduce en una fuerza de repulsión. En efecto, al aproximarse dos superficies se deben liberar moléculas de agua, las cuales pierden la posibilidad de formar puentes - hidrógeno.

Si la superficie hidrofílica es lisa, a distancias muy cortas la fuerza resultante es oscilatoria debido al ordenamiento de las moléculas de agua muy cerca de la pared (Hunter, 1992). En cambio si las superficies son rugosas o semifluidas, las oscilaciones se pierden rápidamente y la interacción es monótonamente decreciente (Israelachvili, 1995). En forma general, los resultados indican que la fuerza es de largo alcance y decae exponencialmente con la distancia.

Asimismo, la energía de interacción por unidad de superficie para dos superficies hidrofílicas en agua, está dada de acuerdo a la siguiente relación experimental,

$$w^{(+)} = w_0 \exp(-h/l) \quad (8.6.6)$$

donde w_0 es una energía por unidad de área que representa el grado absoluto de hidrofiliidad, usualmente está entre 3 y 30 mJm⁻² (Israelachvili, 1995). En el caso de biosuperficies en agua, la energía de interacción puede ser de hasta 160 mJm⁻² y la longitud de decaimiento l típica de 1 nm (van Oss, 1997).

Energía atractiva hidrofóbica

La interacción hidrofóbica describe la fuerte atracción que se da entre moléculas y superficies hidrofóbicas en un medio acuoso. Una superficie hidrofóbica es aquella que es inerte al agua; la orientación de las moléculas de agua en torno a una superficie de este tipo es entrópicamente desfavorable. Luego, la interacción hidrofóbica surge cuando hay dos o más superficies hidrofóbicas puestas en juego. En efecto, cuando ocurre solapamiento entre dos especies hidrofóbicas aparece una fuerza netamente atractiva. En el caso de moléculas de gelatina, grupos apolares de algunos aminoácidos como prolina (12 %), alanina (10 %), leucina e isoleucina (3 %) proveen sitios específicos para la asociación de cadenas (Herning et al. 1991).

Israelachvili (1995) propone que la energía de interacción hidrofóbica por unidad de superficie entre dos superficies en agua en el rango de 0-10 nm se describe,

$$w^{(-)} = -2\gamma_i \exp(-h/l) \quad (8.6.7)$$

donde $\gamma_i = 10-50 \text{ mJm}^{-2}$ es la energía interfacial de la superficie en agua y $l=1-2 \text{ nm}$ es la longitud de decaimiento exponencial.

Energía de interacción debida a las fuerzas no DLVO

En principio, se puede realizar cierta simplificación en relación a la energía de interacción ocasionada por las fuerzas estructurales U_s . Teniendo en cuenta que para biosuperficies en agua las dos fuerzas debidas al solvente, hidrofílicas e hidrofóbicas, tienen la misma longitud de decaimiento $l= 1 \text{ nm}$ (van Oss, 1997), se puede escribir una energía de interacción absoluta proteína-agua-proteína (Berli et al. 1999a y 1999b),

$$w = w^{(+)} - w^{(-)}$$

$$w = (w_0 - 2\gamma_i) \exp(-h/l) \tag{8.6.8}$$

$$w = \Delta G \exp(-h/l)$$

donde ΔG es la energía por unidad de área que representa el grado absoluto de hidrofobicidad ($\Delta G < 0$) o hidrofiliidad ($\Delta G > 0$).

Asimismo, la aproximación de Deryaguin (Hunter, 1992; Israelachvili, 1995) permite obtener la fuerza entre dos esferas de radio a separadas por una distancia h , a partir de la energía de interacción por unidad de superficie $w(h)$,

$$F(h) = \pi a w(h) \tag{8.6.9}$$

Luego, la energía potencial de interacción se obtiene integrando la fuerza en el dominio de interés,

$$U_s(h) = - \int_{\infty}^h F(h') dh' \quad (8.6.10)$$

$$U_s(h) = \Delta G \pi a l \exp(-h/l) \quad (8.6.11)$$

Las fuerzas de hidratación y las fuerzas hidrofóbicas son probablemente importantes en la estabilidad de suspensiones de proteínas en el rango diluido aunque son las menos comprendidas teóricamente, entre todas las fuerzas que ocurren en estos fluidos complejos (Israelachvili, 1995). En el caso de proteínas en agua se acepta el concepto de una capa de solvente estructural (Fennema, 1977). Asimismo, se reporta en la bibliografía la existencia de estas interacciones en sistemas proteicos, las cuales serían las principales responsables de la estabilidad de los mismos (Petsev y Vekilov, 2000).

Resultados obtenidos del análisis del factor de estabilidad coloidal

El cálculo del factor de estabilidad coloidal W a partir de la energía de interacción total U_T compuesta solamente por las energías de interacción que conforman la teoría de la DLVO, no verifica los valores encontrados experimentalmente (ver Tabla 8.4.1) debido a que, en las condiciones de ensayo, considerando las energías de interacción U_R y U_A se obtiene un valor de $W \approx 1$. Por tal motivo, se propone la existencia de una fuerza resultante del

tipo no-DLVO que daría origen a una energía neta repulsiva U_S . La Tabla 8.6.1 muestra los valores de ΔG en $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-1}$ necesarios para reproducir los valores experimentales de W reportados en la Tabla 8.4.1, tomando una longitud de decaimiento de $l = 1\text{nm} = 10\text{ \AA}$ y un radio de partícula $a \approx R = 106\text{ \AA}$.

Tabla 8.6.1 Energía libre en $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ correspondientes a las energías no-DLVO presentes en las soluciones de gelatina maduras a diferentes temperaturas.

T_m ($^{\circ}\text{C}$)	ΔG ($\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$)
5	10.5
15	11.2
20	11.6
25	11.9

Los valores de ΔG obtenidos son del orden de magnitud esperados (ver, por ejemplo, Israelachvili, 1995). Además, estos valores muestran que a medida que la temperatura de maduración decrece, ΔG es menor y la agregación se ve favorecida. En la Figura 8.6.1 se observa, a modo de ejemplo, la variación de las energías relativas a la energía térmica $k_B T_m$ para la experiencia realizada a la temperatura de maduración de 5°C .

Cuando una proteína sufre un proceso de desnaturalización, se producen una serie de cambios estructurales que favorecen la unión de moléculas de agua. Esto, estaría favorecido por (Fennema, 1977):

- 1-Ruptura de uniones puente hidrógeno proteína-proteína.
- 2-Ruptura de uniones iónicas.
- 3-Ruptura de uniones hidrofóbicas mediadas por agua.
- 4-Disociación de grupos hidrofóbicos.

Todos estos cambios favorecerían colectivamente la generación de un incremento en el área interfacial de la proteína, un decrecimiento en las interacciones intramolecular del tipo proteína-proteína y un incremento de las interacciones proteína-agua (Fennema, 1977).

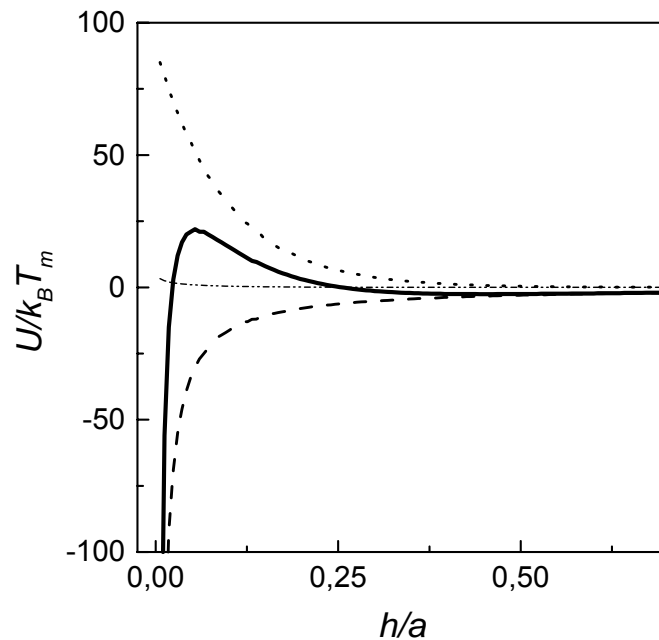


Figura 8.6.1. Energías potenciales de interacción relativas a la energía térmica $k_B T_m$ en función de la distancia adimensional h/a entre moléculas correspondiente a la experiencia realizada a la temperatura de maduración de 5°C . Las líneas $(-\cdot-\cdot-)$ y $(---)$ corresponden a las interacciones del tipo DLVO U_R y U_A , respectivamente, mientras que la línea $(\dots\dots)$ corresponde a las interacciones del tipo no-DLVO U_S . La línea llena (—) corresponde a $U_T = U_R + U_A + U_S$.

Como se mencionó anteriormente, el proceso de agregación de moléculas de gelatina estaría favorecido por el cambio de conformación que se produce cuando disminuye la temperatura, desde la estructura de cadena errática (*random coil*) a hélice de poliprolina. Este cambio podría ser

interpretado como un proceso de re-naturalización parcial de la estructura nativa helicoidal de las moléculas de gelatina (ver Capítulo 2), que estaría favoreciendo la disminución de la cantidad de moléculas de agua unidas superficialmente a las proteínas. De esta manera, la energía de hidratación repulsiva disminuiría y las moléculas podrían acercarse para agregar mediante la formación de zonas de triple hélices intermoleculares.

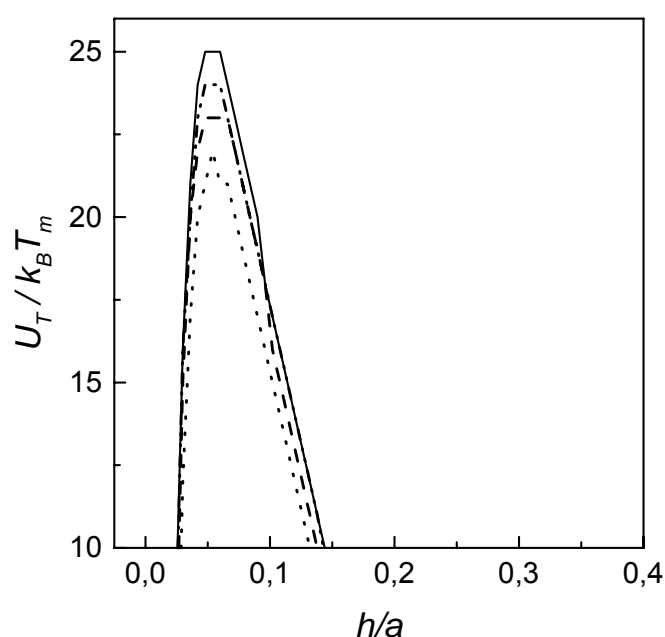


Figura 8.6.2. Energías potenciales de interacción total relativas a la energía térmica $k_B T_m$ en función de la distancia adimensional entre moléculas de gelatina. Las temperaturas de maduración son: 5 (.....), 15 (---), 20 (-·-·-) y 25°C (—).

En la Figura 8.6.2 se observa la variación de la energía de interacción total U_T relativa a la energía térmica para las experiencias realizadas a las distintas temperaturas de maduración. Se observa que la barrera energética que deben vencer las moléculas de gelatina para agregar es más chica a medida que la

temperatura de maduración disminuye. En efecto, esta barrera energética presenta valores de 21 a 25 veces la energía térmica $k_B T_m$ desde la menor temperatura de maduración de 5°C hasta la mayor de 25°C, respectivamente.

8.7 Soluciones ultra-diluidas ($C < C_c$)

Con el propósito de analizar la evolución de cadenas de gelatina cuando la concentración es mucho menor a C_c (zona ultra - diluida), se maduró una solución de gelatina de concentración 10^{-5} g/cm³ a 25°C durante 168 horas (siete días). Como se detalló previamente en la Sección 8.2, este valor de T_m es cercano a T_g^* y, por consiguiente, resulta apropiado para promover la formación de estructuras de triple hélice con conformación de varillas rígidas que involucra una evolución intramolecular (Harrington y Rao, 1970). La Figura 8.7.1 muestra la evolución de la viscosidad específica a lo largo de todo el tiempo de maduración. Los resultados muestran que se produce un incremento relativamente pequeño de la viscosidad específica durante el tiempo de maduración. Solo se obtuvieron diferencias apreciables con respecto a la viscosidad del solvente a las 24 horas, y luego de las 72 horas la viscosidad de la solución se mantuvo constante.

Estos resultados indican que la evolución de las cadenas de gelatina en el régimen ultra diluido ($C < C_c$) es diferente al que se produce en el régimen diluido ($C_c < C < C_g$). En efecto, luego de las 72 horas se alcanza una microestructura definitiva que solamente se puede explicar mediante la

formación de hélices intramoleculares en cadenas individuales (ver en el Capítulo 4 la Figura 4.2.1). Más aún, cuando se intentó interpretar los datos experimentales de la zona ultra - diluida se mediante la teoría de agregación de Smoluchowski, se obtuvieron valores muy bajos de t_p y W (t_p fue del orden de 10^{-4} horas lo que corresponde a un $W < 1$). Esto es físicamente inadmisibles teniendo en cuenta los pequeños incrementos de la viscosidad específica durante un prolongado tiempo de maduración hasta alcanzar un valor constante, lo que indica un proceso lento. Por consiguiente, dicho proceso no sería agregativo.

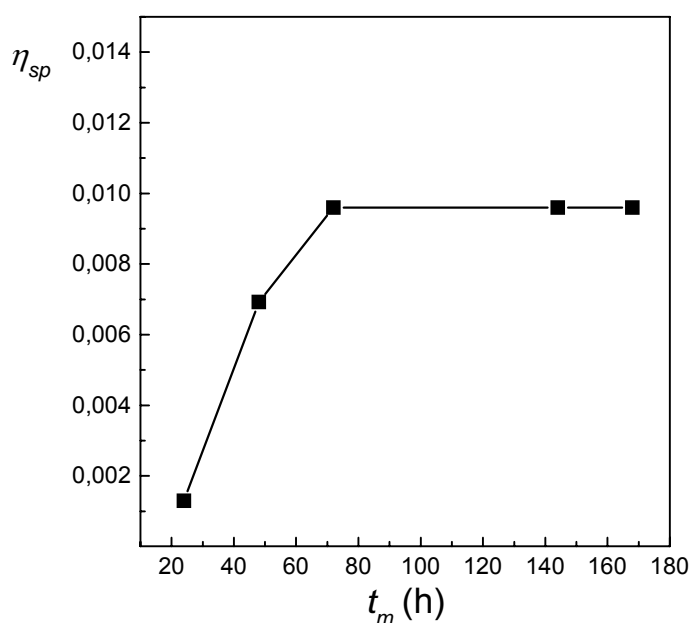


Figura 8.7.1 Viscosidad específica η_{sp} en función del tiempo de maduración t_m de una solución de gelatina de concentración 10^{-5} g/cm³ a una temperatura de maduración de 25°C.

De estos resultados se podría inferir que la formación de triple hélice intramolecular es el fenómeno básico en estas circunstancias, donde las cadenas de gelatina evolucionan a estructuras más compactas, como fue

sugerido previamente (Harrington y Rao, 1970; Harrington y Karr, 1970; Busnel et al., 1989).

El otro aspecto que se debe ser considerar en este análisis de la zona de concentración ultra-diluida es el hecho que podrían aparecer efectos pseudoplásticos como consecuencia de la estructura de varilla rígida de las cadenas simples de gelatina. Por ejemplo, las teorías cinéticas de *dumbbells* rígidos (Bird, et al, 1977) predicen una ecuación del tipo,

$$[\eta] = [\eta]_o \left(1 - \frac{18}{35} \beta^2 + \frac{1326}{1925} \beta^4 - \dots \right) \quad (8.7.1)$$

donde $\beta = \frac{[\eta]_o \eta M}{N_A k_B T} \dot{\gamma}$ la cual indica que las soluciones de estas macromoléculas del tipo de varillas rígidas deben presentar pseudoplasticidad.

Se observó que esta solución de gelatina se comporta como un fluido newtoniano en un rango de velocidad de corte comprendido entre 50 y 2600 s⁻¹, a lo largo de todo el período de maduración (los errores de ajuste de los datos experimentales con la ecuación (6.2.13) fueron $\varepsilon \leq 0,03$ para todos los tiempos de maduración, indicando que no se encuentran efectos pseudoplásticos significativos en este rango de velocidad de corte). Desafortunadamente, resulta difícil aquí detectar pseudoplasticidad experimentalmente debido a la respuesta débil reológica de las soluciones ultra-diluidas. En efecto, partiendo de la ecuación (8.7.1) se encuentra que

asintóticamente $\frac{[\eta]}{[\eta]_o} \approx 1 - \frac{18}{35} \left(\frac{[\eta]_o \eta_s M_n}{N_A k_B T} \dot{\gamma} \right)^2$, indicando que la detección de

pseudoplasticidad, la cual produce el decaimiento del 1% del valor de

$[\eta]_0 \approx 960 \text{ cm}^3/\text{g}$, requiere de velocidades de corte mayores a 3000 s^{-1} aproximadamente, siendo estos valores significativamente más grandes a los alcanzados en la práctica.

8.8 Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que para $C_c < C < C_g$ y para una temperatura de maduración menor a T_g^* se produce la agregación de cadenas de gelatina mediante la formación de *clusters*. Este proceso se puede interpretar haciendo uso de la teoría de agregación de Smoluchowski. En tal sentido, se observó que a medida que el tiempo de maduración aumenta, se producen agregados más heterogéneos. Asimismo, los agregados son más desordenados y ocluyen mayor cantidad de solvente cuanto menor es la temperatura de maduración. Este resultado se refleja en los pequeños valores de dimensión fractal obtenidos en estas experiencias. En cambio, los agregados formados a mayores temperaturas son más compactos y, por consiguiente, se obtiene un mayor valor de dimensión fractal, posiblemente debido a que los procesos de crecimiento y reordenamiento de las estructuras formadas se ven favorecidos cuando $T_m \approx T_g^*$.

Mediante la evaluación del factor de estabilidad coloidal W se observa que el proceso de agregación es lento debido a que las moléculas de gelatina deben vencer una barrera energética en el rango de 21 a 25 veces la energía térmica $k_B T_m$. También se observa que, en la zona ultra – diluida, la agregación sería excluida debido a que en esta zona sólo se obtuvieron

incrementos muy pequeños de la viscosidad específica y luego de las 72 horas de maduración la viscosidad de las soluciones se mantuvo constante. Los valores experimentales de esta zona de concentración no se pudieron interpretar mediante la teoría de agregación de Smoluchowski. Estos resultados indicarían que se produciría un plegamiento intramolecular debido a la formación de estructuras de triple hélice.

8.9 Bibliografía

Allison, S. Rasmusson, M. y Wall, S. (2003). The primary electroviscous effect, free electrophoretic mobility and diffusion of dilute prolate ellipsoid particles (minor axis=3nm) in monovalent salt solution. *J. Colloid Interface Sci.*, 258, 289-297.

Benguigui, L., Busnel, J. P. y Durand, D. (1991). Study of junction zones in gelatin gels through selective enzymatic digestion. *Polymer*, 32(14), 2680-2685.

Berli, C. L. A., Deiber, J. A. y Añón, M. C. (1999 a). Connection between rheological parameters and colloidal interactions of a soy protein suspension. *Food Hydrocolloids*, 13, 507-515.

Berli, C. L. A., Deiber, J. A. y Añón, M. C. (1999 b). Heat-induced phenomena in soy protein suspensions. Rheometric data and theoretical interpretation. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 893-900.

Bird, R. B.; Hassager, O.; Armstrong, R. C. y Curtiss, C. F. (1977). *Dynamics of Polymeric Liquids*. Vol 2. John Wiley and Sons, New York.

Busnel, J. P., Morris, E. R. y Ross Murphy, S. B. (1989). Interpretation of renaturation kinetics of gelatin solutions. *Int. J. Biol. Macromol.*, 11(2), 119-125.

Coen, C. J., Blanch, H. W. y Prausnitz, J. M. (1995). Salting out of aqueous proteins: phase equilibria and intermolecular potentials. *AIChE Journal*, 41, 996-1004.

Conway, B. y Dobry –Duclaux, A. (1960). Viscosity of suspensions of electrically charged particles and solutions of polymer electrolytes. In *Rheology* 3, ed. Eirich, Academic Press, London.

Fenema, O. (1997). In J. Whitaker y S. Tannenbaum (Eds.), *Food Proteins* (pp. 50-90). Westport, CT: AVI Publishing.

Flory P. J. (1969). *Statistical Mechanics of Chains Molecules*. New York: Interscience Publishers, a division of John Wiley & Sons.

Fox, T. G., Fox Jr., J. C. & Flory, P. J. (1951). The effect of rate of shear on the viscosity of dilute solutions of polyisobutylene. *J. of the Am. Chem. Soc.*, 73(5), 1901-1920.

Garcia-Salinas, M. J. y de las Nieves, F. J. (2000). Anomalous trends in the electroviscous effect of polystyrene latexes: experimental and theoretical study. *Langmuir*, 16, 7150-7155.

Harrington, W. F. y Karr, G. M. (1970). Collagen structure in solution II. Analysis of refolding kinetics in terms of nucleation and growth processes. *Biochemistry*, 9(19), 3725-3733.

Harrington, W. F. y Rao N. V. (1970). Collagen structure in solution: I. Kinetics of helix regeneration in single-chain gelatins. *Biochemistry*, 9(19), 3714-3724.

Harrington, W. F. y von Hippel P. T. (1961). Formation and stabilization of the collagen-fold. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 92, 100-113.

Haug, I. J., Draget, K. I. y Smidsrød, O. (2004). Physical and rheological properties compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18(2), 203-213.

Herning, T., Djabourov, M., Leblond, J. y Takerkart G. (1991). Conformation of gelatin chains in aqueous solutions: 2. A quasi-elastic light scattering study. *Polymer*, 32(17), 3211-3217.

Hiemenz, P. C. (1986). *Principles of colloid and surface chemistry*, Library of Congress Cataloging in Publication Data, New York.

Hunter, R. (1992). *Foundations of Colloids Science*, Vol I. Oxford: Clarendon Press.

Israelachvili, J. (1995). *Intermolecular & Surface Forces*. Academic Press, London.

Lattuada, M.; Sandkühler, H. W.; Sefcik, J. y Morbidelli, M. (2003). Aggregation Kinetics of polymer colloids in reaction limited regime: experiments and simulations. *Advances in Colloid and Interface Science*, 103, 33-56,

Overbeek, Th. G. (1977). Recent developments in the understanding of colloids stability. In *Colloid and Interface Science*, Vol I, eds. M. Kerker, R.L. Rowel y A. C. Zettlemoyer, Academic Press, New York.

Petsev, D. N. y Vekilov, P. G. (2000). Evidence for non-DLVO hydration interactions in solutions of protein apoferritin. *Physical Review Letters*. 84, (6), 1339-1342.

Piaggio, M. V., Peirotti, M. B. y Deiber, J. A. (2005). Effect of background electrolyte on the estimation of protein hydrodynamic radius and net charge through capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 26(17), 3232-3246.

Ross-Murphy, S. B. (1992). Structure and rheology of gelatin gels: recent progress. *Polymer*, 33(12), 2622-2627.

Russel, W. B., Saville, D. A. y Schowalter, W. R. (1989). *Colloidal Dispersions*. Cambridge: Cambridge University Press.

Tanford, Ch. (1961). *Fisical Chemistry of Macromolecules*. NewYork: Wiley.

van Oss, C. J. (1997). Hidrofobicity and hydrophilicity of biosurfaces. *Curr. Opin Colloid Interface Sci.* 2,503-512.

Yamanaka, J., Ise, N., Miyoshi, H. y Yamaguchi, T. (1995). Experimental examination of the Booth theory on the first-order electroviscous effect in ionic colloidal dispersions. *Physical Review E*, 51(2), 1276-1281.

Capítulo 9



Estudio de soluciones de gelatina a
diferentes pH y fuerzas iónicas

9 Estudio de soluciones de gelatina a diferentes pH y fuerzas iónicas

9.1 Introducción

Como se mencionó en el Capítulo 2, las moléculas de gelatina poseen en la secuencia primaria aminoácidos básicos y ácidos y cada uno de ellos posee una constante de disociación de protones diferente (Fennema, 1993; Dickinson y Stainsby, 1982). Por consiguiente, las cadenas de gelatina en solución diluida pueden adoptar distintas conformaciones a diferentes pH dependiendo así del ambiente fisicoquímico en el que se encuentran disueltas. Sin embargo, las interacciones intermoleculares (entre cadenas de gelatina) las cuales se producen cuando éstas se encuentran formando soluciones concentradas, están condicionadas no solo por el estado de carga que posee cada macromolécula (debida a la composición electrolítica de la solución), sino también por la red de entrapamiento generada por las macromoléculas circundantes.

El conocimiento de las distintas conformaciones que adoptan las cadenas de gelatina en solución diluida y de las interacciones que se producen en soluciones concentradas debido al estado de carga total y neta es relevante para el diseño de muchos procesos tecnológicos donde se utiliza esta macromolécula. En este sentido, cabe mencionar que la gelatina se usa en la confección de hidrogeles para la liberación controlada de fármacos donde, en muchos casos, la inmovilización de estas drogas se basa en la inducción de interacciones electrostáticas entre el compuesto farmacéutico y el hidrogel de gelatina cargado. Además, la capacidad de hinchamiento (*swelling*) de estos

hidrogeles depende del pH y de la fuerza iónica del medio fisicoquímico en el que se encuentran estos sistemas y de la malla formada por el entrecruzamiento covalente (Tabata e Ikada, 1998; Fukunaka et al., 2002; Einerson et al., 2002). Asimismo, entre otras aplicaciones, la gelatina se utiliza en productos donde estas macromoléculas se mezclan con compuestos como, por ejemplo, otras proteínas, carbohidratos y lípidos en condiciones de soluciones concentradas. En consecuencia, la interacción eléctrica que se lleva a cabo entre la gelatina y estos compuestos resulta relevante para la formulación de nuevos alimentos.

Por otra parte, la composición de aminoácidos de la gelatina que se obtiene mediante el proceso de extracción alcalino es diferente a aquella que surge luego del proceso de extracción ácido (ver Capítulo 3). Por lo tanto, el conocimiento de la naturaleza eléctrica (es decir el estado de carga total y neta) de soluciones de gelatina provenientes tanto del proceso de extracción ácido como del alcalino constituye una herramienta de utilidad para el diseño de productos a base de gelatina.

Con el objetivo de obtener información concerniente al comportamiento fisicoquímico de la gelatina a diferentes pH y fuerzas iónicas, en este capítulo primero se estudian teóricamente mediante una teoría de escalas los diferentes estados conformacionales que pueden adoptar las moléculas de gelatina en solución diluida antes de que comience el proceso de maduración cuando estas varían en su estado de carga. Segundo, haciendo uso de la reometría capilar gravitatoria y la reometría rotacional descriptas en el Capítulo 6 se evalúan soluciones de gelatina en las zonas de concentración diluida ($C_c < C < C_g$) y concentrada ($C > C_g$) a diferentes pH y fuerzas iónicas (ver

Capítulo 4 donde se detallan las particularidades de cada zona de concentración) y se arriba a conclusiones donde los resultados experimentales se interpretan en términos de los conceptos teóricos revisados

9.2 Teoría aproximada de polianfolitos en solución diluida: escalas características

Un polianfolito es una macromolécula cargada que posee grupos ácidos, alcalinos y neutros en su secuencia primaria. Bajo condiciones apropiadas, como por ejemplo en solución acuosa, estos grupos se disocian, generando iones en la cadena y arrojando los contraiones a la solución. Como consecuencia de la ionización, la cadena polimérica posee cargas positivas y negativas por tramos y, en cierto grado, se puede atribuir una variabilidad en la distribución de la carga lo cual permite un análisis estadístico de las configuraciones que adoptan estas macromoléculas. Son ejemplos de polianfolitos las proteínas desnaturalizadas (dentro de las que se encuentra la gelatina), las proteínas en estado nativo y los polímeros sintéticos que poseen monómeros ácidos y básicos (Dickinson y Stainsby, 1982). Asimismo, si los grupos son ácidos o bases débiles (como es el caso de las proteínas) la carga neta se puede variar cambiando el pH de la solución (Dobrynin y Rubinstein, 1997; Dobrynin et al., 2004).

En virtud de interpretar el comportamiento de los polianfolitos en soluciones diluidas desde el punto de vista descrito arriba, se puede visualizar a una cadena de este tipo de macromoléculas como una secuencia de una mezcla de N monómeros positivos, negativos y neutros. En efecto, cada

cadena posee una fracción f_+ de monómeros cargados positivamente y otra fracción f_- cargada negativamente. Asimismo, la asimetría de carga del polianfolito $N\delta f = |f_+N - f_-N|$ es igual a la diferencia entre el número de cargas positivas y negativas presentes en el mismo y la fracción de carga total $f = f_+ + f_-$ es la suma de la fracciones de cargas positivas y negativas.

En solución diluida, las moléculas de polianfolitos se encuentran alejadas unas de otras y no interaccionan entre sí. En estas circunstancias, la conformación de las cadenas en solución queda determinada por la competencia entre la repulsión ocasionada por cargas de igual signo dentro de la misma cadena (la cual tiende a expandirla) y la atracción generada por cargas de signo opuesto que induce el colapso de la macromolécula.

Muchos autores investigaron el comportamiento de polianfolitos a través de estudios experimentales y de análisis teóricos computacionales. A partir de estas investigaciones, actualmente, existe cierto consenso de que cuando los polianfolitos poseen una carga neta elevada (esta puede ser tanto positiva como negativa), hay un predominio de la repulsión intramolecular y, de esta forma, la cadena se comporta como un polielectrolito (Dobrynin y Rubinstein, 1997, Dobrynin et al., 2004; Higgs y Joanny, 1991). El término polielectrolito a lo largo de esta tesis tiene un significado preciso en el sentido conformacional. En efecto, un polielectrolito presenta una conformación significativamente extendida. Por otra parte, cuando los polianfolitos poseen carga neta cero, pueden colapsar debido a la atracción electrostática entre cargas de signo opuesto formando, de esta forma, estructuras globulares compactas (Edwards et al., 1980; Dobrynin et al., 1997; Srivastava y Muthukumar, 1996; Dobrynin et al., 1997; Dobrynin et al., 2004). No obstante, cuando las cadenas poseen una

baja cantidad de grupos cargados, tanto las atracciones como las repulsiones son pequeñas y, por consiguiente, permanecen en una configuración gaussiana la cual se podría interpretar como una cadena errática (Higgs y Joanny, 1991; Kantor et al., 1992; Dobrynin y Rubinstein, 1995; Srivastava y Muthukumar, 1996; Bratko y Chakraborty, 1996; Dobrynin et al., 1997; Dobrynin et al., 2004).

Frecuentemente, la carga neta de un polianfolito no es cero. En el caso de los polianfolitos sintéticos, que usualmente, se generan por medio de copolimerización aleatoria, esto es muy probable. En consecuencia, estas moléculas poseen generalmente una carga neta (ver, por ejemplo, Mc Cormick y Jonson, 1988; McCormick y Salazar, 1992; Candau et al., 1997; Kudaibergenov, 1999). Por consiguiente, además de las fenomenologías mencionadas arriba (comportamiento polielectrolito y formación de glóbulos compactos como se describe con más detalle abajo), existe una variedad de conformaciones que dependen del estado de carga de las macromoléculas las cuales merecen ser analizadas detalladamente en el marco de los estudios teóricos reportados en la bibliografía.

De lo expuesto anteriormente, Dobrynin et al. (2004) sugieren que cuando un polianfolito con un grado de polimerización N y una fracción de carga total relativamente grande posee las cargas balanceadas ($f_+N = f_-N$) y a su vez las cadenas son lo suficientemente largas, este colapsa debido a las atracciones electrostáticas entre cargas de signo opuesto formando un glóbulo compacto. Los autores describen a una cadena de polianfolito en el estado colapsado como un arreglo denso de esferas de tamaño ξ y número g de monómeros de tamaño b (en las proteínas b podría ser considerado del orden

de la longitud del enlace peptídico el cual es igual a 3,8 Å). El tamaño de las esferas ξ separa dos dominios diferentes: (a) para longitudes menores a ξ las interacciones electrostáticas no alcanzan a perturbar la conformación de la cadena conservando así una distribución estadística Gaussiana ($\xi^2 \approx b^2 g$); (b) para longitudes mayores a ξ las atracciones electrostáticas provocan el colapso de las cadenas formando la esfera.

Cada esfera con una carga neta positiva tiene mayor probabilidad de estar rodeada de esferas con carga neta negativa. En este sentido, la energía cohesiva entre esferas en solución es $k_B T$ y es proporcional a la energía de interacción electrostática entre dos esferas vecinas que poseen carga neta eZ^+ y eZ^- las cuales están separadas por una distancia ξ . Esta energía de interacción electrostática resulta,

$$U_{el}(g) \approx -\frac{e^2 Z^2}{4\pi\epsilon\xi} \approx -\frac{k_B T l_B Z^2}{\xi} \quad (9.2.1)$$

donde $l_B \equiv e^2/(4\pi\epsilon k_B T)$ es la longitud de Bjerrum que representa la distancia a la cual la energía de interacción electrostática entre dos elementos de carga e en un medio con una constante dieléctrica ϵ es igual a la energía térmica $k_B T$.

Una esfera que posee g monómeros tiene una valencia neta promedio $eZ = e(gf_+ + gf_-)^{1/2}$ (donde gf_+ y gf_- son los números promedios de cargas positivas y negativas en una esfera). Así, $U_{el}(g)$ se puede expresar,

$$U_{el}(g) \approx -\frac{e^2 g f}{4\pi\epsilon\xi} \approx -k_B T l_B g f / \xi \quad (9.2.2)$$

En el equilibrio, esta atracción electrostática está balanceada con la repulsión debida a los contactos entre monómeros de la cadena (impedimento estérico). Esta energía repulsiva es g veces proporcional a la energía térmica $k_B T$ y al cuadrado de la fracción volumétrica $\phi \approx g b^3 / \xi^3 \approx \rho b^3$ de monómeros dentro de la esfera, siendo $\rho \approx g / \xi^3$ la densidad de monómeros dentro de una esfera. En este sentido, esta energía repulsiva se puede expresar de la siguiente manera,

$$U_{rep}(g) \approx k_B T g \phi^2 \approx k_B T g (\rho b^3)^2 \approx k_B T g^3 b^6 / \xi^6 \quad (9.2.3)$$

El balance entre la repulsión estérica y las atracciones electrostáticas determina el tamaño de las esferas y el número de monómeros dentro de ellas,

$$\xi \approx b / (u f) \quad (9.2.4. a)$$

$$g \approx (u f)^{-2} \quad (9.2.4. b)$$

donde $u = l_B / b$ es un parámetro de interacción que es la relación entre la longitud de Bjerrum y la longitud del monómero. De esta forma, las ecuaciones (9.2.4.a) y (9.2.4.b) determinan la densidad de polímero dentro de un glóbulo,

$$\rho \approx g/\xi^3 \approx ufb^{-3} \quad (9.2.5)$$

Así, un glóbulo (es decir una cadena de polianfolito en un estado de colapso total) con una densidad monomérica ρ posee un tamaño,

$$R \approx (N/\rho)^{1/3} \approx b\left(\frac{N}{uf}\right)^{1/3} \quad (9.2.6)$$

A través de la ecuación (9.2.6) se observa que a medida que aumenta la fracción de monómeros cargados f en una cadena de polianfolito que posee las cargas balanceadas, el tamaño de glóbulo disminuye. Luego, la energía electrostática de un glóbulo es igual a la contribución de la energía electrostática de las N/g esferas (Dobryning et al., 2004),

$$U_{glob}(R) \approx -k_B T \frac{N}{g} \frac{l_B g f}{\xi} \approx k_B T u^2 f^2 N \quad (9.2.7)$$

Por consiguiente, una cadena colapsa cuando la energía atractiva electrostática U_{glob} supera a la energía térmica $k_B T$. Como lo muestra la ecuación (9.2.7), esto sucede cuando se cumple la siguiente condición (Yamakov, et al., 2000),

$$N > u^{-2} f^{-2} \quad (9.2.8)$$

Asimismo, es relevante mencionar que el tamaño ξ de una esfera dentro de un glóbulo es del orden de la longitud de Debye, la cual se debe a los grupos cargados en la cadena (Dobryning et al., 2004),

$$\kappa^{-2} = 4\pi l_B f \rho \approx b^{-2} (uf)^2 \approx \xi^{-2} \quad (9.2.9)$$

Existe otra contribución importante a la energía libre de un glóbulo de polianfolito, la energía superficial. Cada esfera en la superficie del glóbulo está rodeada por menos esferas que aquellas que se encuentran en el interior del mismo. Dado que dos esferas dentro de un glóbulo interactúan entre sí con una energía del orden de la energía térmica $k_B T$, entonces el costo energético para llevar una esfera hacia la superficie también es proporcional a este valor. Si S es el área superficial del glóbulo, existen entonces S/ξ^2 esferas en la superficie del glóbulo y cada una de ellas hará una contribución del orden de $k_B T$ a la energía total del mismo. Este razonamiento conduce a la siguiente estimación de la energía superficial de un glóbulo (Dobryning et al., 2004),

$$U_{\text{sup}}(R) \approx k_B T \frac{S}{\xi^2} \approx k_B T (uf)^{4/3} N^{2/3} \quad (9.2.10)$$

donde el área superficial S se estima como R^2 (ecuación (9.2.6)). Asimismo, la tensión superficial γ es la relación entre la energía superficial U_{sup} y el área superficial S ,

$$\gamma \approx \frac{U_{\text{sup}}}{S} \approx \frac{k_B T}{\xi^2} \approx k_B T (uf/b)^2 \quad (9.2.11)$$

Esta expresión es muy importante porque permite calcular la estabilidad de la estructura globular como se describe abajo.

Luego del análisis de las energías actuantes en las moléculas de polianfolitos, es posible concluir que las atracciones inducidas por fluctuación inducen al colapso de la molécula pero, por otro lado, la interacción conjunta de la energía superficial y la repulsión entre cargas del mismo signo la desestabilizan produciendo una expansión de la misma. En efecto, la energía de interacción electrostática repulsiva entre el exceso de cargas del mismo signo resulta,

$$U_{\text{rep}}(R) \approx \frac{e^2 N^2 (f_+ + f_-)^2}{4\pi\epsilon R} \quad (9.2.12)$$

A partir de este razonamiento, es posible observar que un glóbulo de polianfolito pierde la estructura globular cuando la energía de interacción electrostática repulsiva entre el exceso de cargas del mismo signo es comparable con la energía superficial globular $U_{\text{sup}}(R) \approx \gamma R^2$, este criterio de estabilidad es similar al aplicado por Rayleigh a gotas líquidas cargadas (Dobrynin et al., 2004), por consiguiente,

$$\frac{l_B N^2 (f_+ - f_-)^2}{R} \approx \frac{R^2}{\xi^2} \quad (9.2.13)$$

En este contexto, operando sobre la ecuación (9.2.13), es posible estimar la carga neta crítica $e\delta Z_{crit}$ a partir de la cual una cadena de polianfolito cargada en forma aleatoria rompe su estructura globular compacta, esto es (Dobrynin et al., 2004),

$$e\delta Z_{crit} \approx e\sqrt{fN} \quad (9.2.14)$$

De esta forma, un polianfolito se encuentra en estado colapsado cuando posee una carga neta menor a $e\sqrt{fN}$. No obstante, cuando la carga neta es superior a la carga neta crítica la cadena de polianfolito se expande reduciendo su energía total mediante la disminución de la energía de interacción electrostática por medio de la creación de una mayor interfase polímero-solvente.

Uno de los modelos más utilizados para describir a un polianfolito que posee una carga neta mayor a la carga neta crítica es aquel que considera a la cadena con una conformación del tipo de collar de perlas (*necklase globule*) como se muestra, en forma esquemática, en la Figura 9.2.1 (Bratko y Chakraborty; 1996; Dobrynin y Rubinstein, 1997; Dobrynin et al., 2004). Las regiones globulares de la molécula poseen una carga neta baja y, por consiguiente, la energía atractiva electrostática hace que en estas zonas la cadena colapse. Por otro lado, en las regiones con elevada asimetría de carga, la repulsión Coulómbica produce la elongación de la cadena (Dobrynin et al., 1997; Dobrynin et al., 2004). En efecto, la cadena de polianfolito se puede visualizar como una secuencia de pequeñas cuentas de diámetro D conectadas por delgados segmentos lineales denominados conectores de longitud l_{con} (Dobrynin et al., 2004).

El número de monómeros m en cada cuenta de diámetro D se encuentra determinado por la condición de estabilidad de Rayleigh, es decir, cuando la energía superficial de una cuenta $\gamma D^2 \approx k_B T (uf)^2 D^2 / b^2$ es del orden de su energía electrostática repulsiva $(e\delta fm)^2 / 4\pi\epsilon D$ (Dobrynin et al., 2004),

$$\gamma D^2 \approx k_B T (uf)^2 \frac{D^2}{b^2} \approx \frac{(e\delta fm)^2}{4\pi\epsilon D} \quad (9.2.15)$$

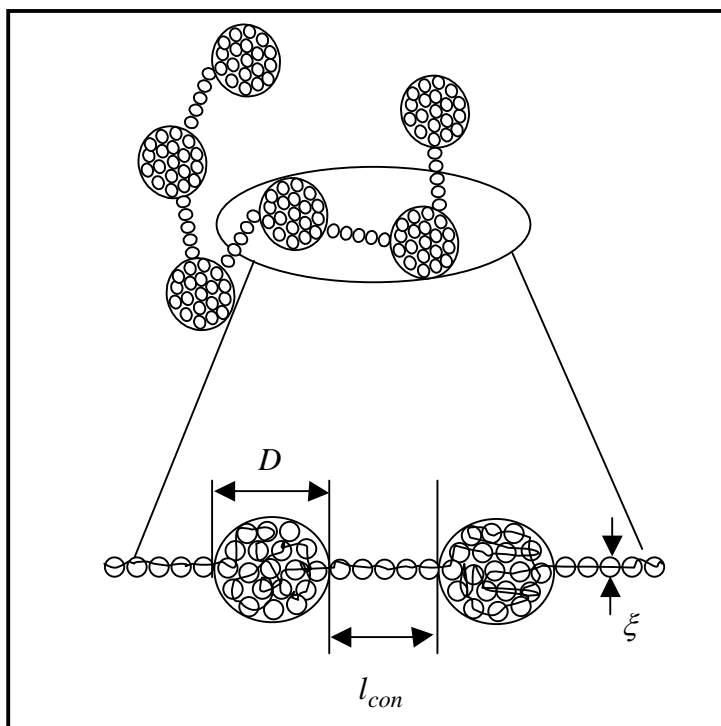


Figura 9.2.1 Esquema que muestra la conformación en collar de perlas que posee cuentas de tamaño D , conectores de longitud l_{con} compuesto por esferas de tamaño ξ .

La tensión superficial γ se estima con la ecuación. (9.2.11) y δf es la asimetría de carga ($\delta f = |f_+ - f_-|$). Las cuentas de densidad ρ poseen un tamaño

$D \approx (m/\rho)^{1/3}$. Mediante la sustitución de esta relación en la ecuación (9.2.15) y utilizando la ecuación (9.2.5) para ρ es posible estimar el número de monómeros en una cuenta, así,

$$m \approx f/(\delta f)^2 \quad (9.2.16)$$

Mediante este análisis teórico es posible concluir que existe más de una cuenta en la cadena cuando el número de monómeros en cada una de ellas es menor que el número de monómeros de la cadena de polianfolito N . Asimismo, el número de monómeros en una cuenta aumenta a medida que la asimetría de carga δf decrece (ver ecuación (9.2.16)).

Como se detalló anteriormente, las cuentas están separadas por conectores compuestos de esferas de tamaño ξ (ver Figura 9.2.1). La longitud de equilibrio del conector l_{con} se obtiene igualando la energía superficial de un conector $\gamma_{\xi} l_{con} \approx k_B T (uf) l_{con} / b$ con la energía de repulsión electrostática entre dos cuentas vecinas $(e\delta f m)^2 / 4\pi\epsilon l_{con}$ (Dobrynin et al., 2004),

$$k_B T (uf) \frac{l_{con}}{b} \approx \frac{(e\delta f m)^2}{4\pi\epsilon l_{con}} \quad (9.2.17)$$

Por consiguiente, la longitud del conector se puede estimar resolviendo la ecuación (9.2.17) cuando se hace uso de la ecuación (9.2.16); es decir,

$$l_{con} \approx b\sqrt{f}/\delta f \approx b\sqrt{m} \quad (9.2.18)$$

A través de la ecuación (9.2.16) se observa que la longitud del conector aumenta a medida que la asimetría de carga decrece. Asimismo, cuando la asimetría de carga decrece las cuentas crecen en tamaño acumulando mayor cantidad de carga. Este aumento de la carga obliga a que la longitud del conector también aumente en la misma proporción para minimizar la repulsión electrostática entre cuentas vecinas.

Cuando la molécula se encuentra en el régimen de polielectrolito, es decir que posee una asimetría de cargas mayor a $N\delta f > Nuf^{3/2}$ (Dobrynin et al., 1997) y que, además, no existe adición de sal ésta se encuentra expandida en su máxima longitud debido a la repulsión creada por el exceso de carga (Kantor et al., 1994; Dobrynin et al., 1997 y Dobrynin et al., 2004). En la Tabla 9.2.1 resumen las energías que condicionan el estado conformacional de un polianfolito.

Tabla 9.2.1. Energías de interacción que condicionan los estados conformacionales de una cadena de polianfolito.

Tipo de Energía	Expresión Matemática
Energía de interacción electrostática atractiva entre esferas dentro de un glóbulo	$U_{el}(g) \approx -\frac{e^2 g f}{4\pi\epsilon\xi} \approx -k_B T l_B g f / \xi$
Energía de interacción repulsiva debida a los contactos entre monómeros de la cadena dentro de la esfera (impedimento estérico).	$U_{rep}(g) \approx k_B T g \phi^2 \approx k_B T g (\rho b^3)^2 \approx k_B T g^3 b^6 / \xi^6$
Energía de interacción electrostática atractiva de un glóbulo	$U_{glob}(R) \approx -k_B T \frac{N l_B g f}{g \xi} \approx k_B T u^2 f^2 N$
Energía superficial de un glóbulo	$U_{sup}(R) \approx k_B T \frac{S}{\xi^2} \approx k_B T (uf)^{4/3} N^{2/3}$
Energía de interacción electrostática repulsiva entre el exceso de cargas del mismo signo en un glóbulo	$U_{el}(R) \approx \frac{l_B N^2 (f_+ - f_-)^2}{R}$

A partir del análisis teórico realizado en esta sección, se observa que el tamaño y la forma de un polianfolito en solución diluida libre de agregado de sal queda determinado por el balance de cuatro factores: (1) la entropía de la cadena que tiende a mantener al polímero en una conformación estadística Gaussiana; (2) las atracciones entre cargas de signo opuesto inducidas por fluctuación que tienden a colapsar la cadena en un glóbulo; (3) las interacciones entre monómeros de la cadena (impedimento estérico) que estabilizan el tamaño del glóbulo; (4) cuando la cadena no posee carga neta cero (es decir si tiene carga neta positiva o negativa) la repulsión de tipo Coulómbica entre cargas del mismo signo tienden a expandirla. No obstante, la importancia relativa de estos factores depende de la fracción de cargas positivas f_+ y negativas f_- , de la secuencia de cargas, del grado de polimerización N y del parámetro u . La Figura 9.2.2 muestra un diagrama de los estados conformacionales de una cadena de polianfolito en función de la asimetría de carga y de la fracción total de monómeros cargados reportados por Dobrynin et al. (1997). Debido a que esta teoría permite obtener solamente valores que representan el orden de magnitud de las energías de interacción intramoleculares, es preciso observar que los límites cuantitativos que determinan la conformación que presentan los polianfolitos (ver Figura 9.2.2) aún dependen de la generación de una teoría más precisa que permita evaluar las constantes de proporcionalidad. No obstante, esta teoría resulta útil como marco de referencia para el análisis conformacional de polianfolitos en solución diluida y permite comprender los cambios que se producen en la microestructura de estas macromoléculas al variar el estado de carga.

No obstante, la adición de sal puede inhibir la repulsión debido al exceso de cargas del mismo signo y la atracción entre cargas opuestas (Dobrynin et al., 2004). Como se mencionó anteriormente, en el régimen polielectrolito, y cuando no hay agregado de sal, la cadena de polianfolito se encuentra en su máxima longitud debido a la repulsión entre el exceso de cargas del mismo signo. Cuando se agrega sal a la solución, la longitud de Debye decrece y la repulsión entre cargas disminuye. Este efecto produce una disminución del tamaño de la cadena. A medida que se agrega más cantidad de sal la longitud de Debye en el seno de la solución resulta menor que la longitud de Debye interna en el dominio del polianfolito debido a la presencia de monómeros cargados, por consiguiente, un mayor agregado de sal produce inhibición de las atracciones inducidas por fluctuación provocando el hinchamiento o expansión de la cadena. En el régimen polianfolito el agregado de sal solo aumenta el tamaño de la macromolécula debido a que las atracciones inducidas por fluctuación son inhibidas por los iones salinos.

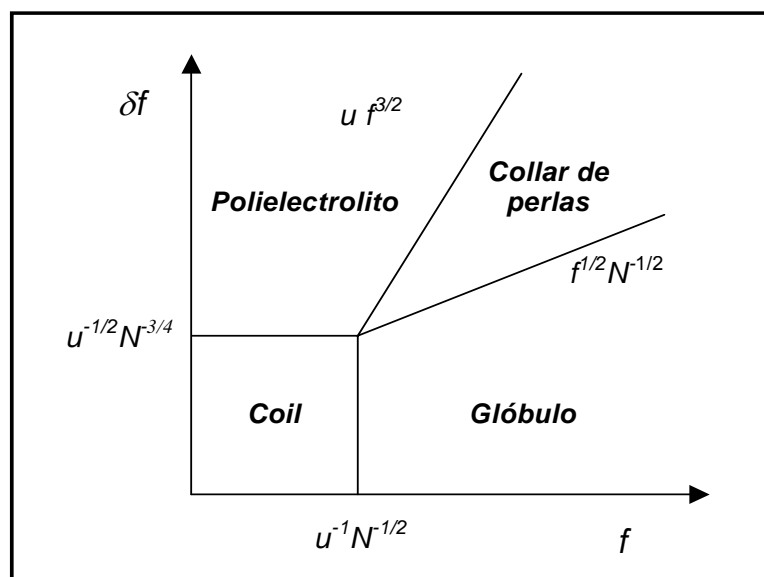


Figura 9.2.2 Esquema que muestra los distintos estados conformacionales de una cadena de polianfolito en solución diluida en función de la asimetría de carga y la fracción total de monómeros cargados (Dobrynin et al., 1997).

9.3 Aplicación de la teoría de polianfolitos a moléculas de gelatina

En esta sección se presenta un análisis teórico de la conformación de cadenas de gelatina en solución diluida en distintos medios fisicoquímicos haciendo uso de la teoría de polianfolitos descrita en la sección 9.2.

Como se mencionó anteriormente en el Capítulo 3, la gelatina es un biopolímero polidisperso que posee una distribución de peso molecular MWD . En este sentido, en el Capítulo 5 se describe en forma detallada la obtención de dicha distribución mediante la técnica de PAGE-SDS y el cálculo de los pesos moleculares promedios M_n y M_w .

A partir de una secuencia peptídica de una cadena de gelatina de vaca (*Bos Taurus*) reportada en el *Protein Data Bank* (PDB) que posee 779 aminoácidos con un peso molecular de 71170 Da se construyó una cadena genérica que posee esta misma composición de aminoácidos (igual proporción) pero con un peso molecular correspondiente al M_n de la gelatina caracterizada en esta tesis. En efecto, la cadena genérica de peso molecular $M_n = 133$ KDa posee 1456 aminoácidos en una proporción equivalente a la reportada en el PDB. La Tabla 9.3.1 muestra el número de aminoácidos cargados en un total de 1456 aminoácidos de la cadena genérica.

Tabla 9.3.1. Composición de aminoácidos cargados de una gelatina de vaca extraída mediante el proceso alcalino.

Aminoácido	Número sobre un total de 1456 aminoácidos
Tyrosina (Tyr)	9.35
Arginina (Arg)	71.06
Histidina (His)	5.61
Cisteína (Cys)	0
Lysina (Lys)	54.23
Ácido Aspártico (Asp)	48.62
Ácido Glutámico (Glu)	63.58

Asimismo, para este análisis se tomó un tamaño de monómero $b = 3,8$ ^o Å el cual corresponde a la longitud del enlace peptídico (Flory, 1969).

Considerando el número y la composición de aminoácidos de la cadena de gelatina y haciendo uso de los datos de pK_a reportados en la Tabla 2.6.1 se calculó valencia neta $Z = N\delta f$ y el número total de grupos cargados $Z^+ + Z^-$ de la cadena para distintos pH comprendidos entre 2 y 12. Este procedimiento se llevó a cabo considerando la cantidad de cada residuo de aminoácido cargado presente en la cadena genérica (ver Tabla 9.3.1) y contemplando, además, los pK_a de los grupos amino (pK_{NH_3}) y carboxilo (pK_{COOH}) terminales de la misma. En efecto, la carga neta de una molécula de gelatina es (Piaggio et al., 2005),

$$eZ = \sum_{i=1}^N eZ_i \quad (9.3.1)$$

siendo eZ_i la carga de los i -grupos cargados presentes en la molécula. Asimismo, el valor de Z_i se puede obtener de la siguiente manera,

$$Z_i = \pm \frac{n_i}{1 + 10^{\pm(pK_{ai} - pH)}} \quad (9.3.2)$$

donde los signos (+) y (-) se definen de acuerdo a las propiedades ácidas o básicas de los grupos cargados. Asimismo, la ecuación (9.3.2) contempla el pH de la solución donde se encuentran disueltas las cadenas de gelatina. Luego, la asimetría de carga $Z = N\delta f$ se obtiene considerando tanto los $i = 7$ tipos de

aminoácidos cargados como la cantidad de cada uno de ellos (ver Tabla 9.3.1) y los grupos amino y carboxilo terminales,

$$Z = \sum_{i=1}^7 \frac{\pm n_i}{1 + 10^{\pm(pK_{ai} - pH)}} + \frac{1}{1 + 10^{-(pK_{NH_3} - pH)}} - \frac{1}{1 + 10^{+(pK_{COOH} - pH)}} \quad (9.3.3)$$

La Figura 9.3.1 muestra los resultados obtenidos donde se observa que el número neto de grupos cargados o asimetría de carga $Z = N\delta f$ disminuye bruscamente desde el pH 2 hasta el pH 4,48 donde se alcanza una carga neta nula. Luego, la carga neta aumenta hasta un valor de pH 6. A partir de este valor de pH y hasta un valor de pH 9 el aumento de la carga neta es menos pronunciado. Resulta relevante destacar, que en este rango de pH se encuentra el pH fisiológico en el cual las moléculas de colágeno (material histológico de donde se obtiene la gelatina) cumplen su función natural de sostén estructural. A partir de pH 9 la carga neta aumenta en forma más pronunciada hasta el valor pH 12. Mediante este proceso de cálculo se obtuvo el valor $pI = 4.48$ de la cadena. Este resultado es el esperado para una gelatina producida mediante un proceso de extracción alcalino.

En este marco de trabajo cuantitativo, la variación de la fracción de carga total f de la cadena se muestra en la Figura 9.3.2, donde se observa que f aumenta desde pH 2 hasta pH 6, a partir del cual f se mantiene aproximadamente constante hasta pH 9. Finalmente, a partir del pH 10, f desciende nuevamente hasta el último valor de pH calculado (pH 12).

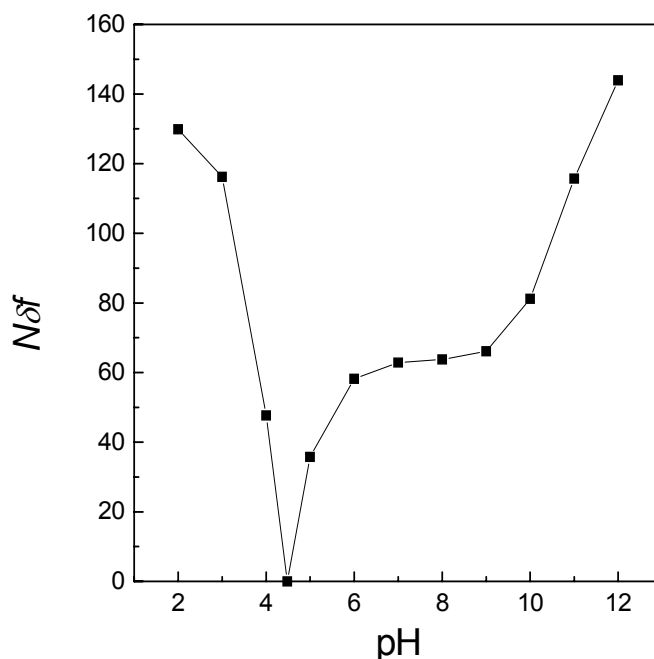


Figura 9.3.1. Asimetría de carga $Z = N\delta f$ en función del pH de una cadena de gelatina en solución diluida considerando la secuencia de aminoácidos reportada en la Tabla 9.3.1.

La Figura 9.3.2 también permite observar que la gelatina es una macromolécula que posee entre un 9% a 21% de los aminoácidos cargados dependiendo del pH de la solución en la que se encuentre disuelta. En este sentido, se puede considerar a esta macromolécula como un polianfolito débilmente cargado.

De las Figuras 9.3.1 y 9.3.2 se observa que al variar el pH de la solución las moléculas de gelatina varían tanto su fracción de carga total como la valencia neta simultáneamente. Este aspecto debe ser tenido en cuenta cuando se desea conocer cuál es la conformación que presentan estas macromoléculas en solución a los distintos pH.

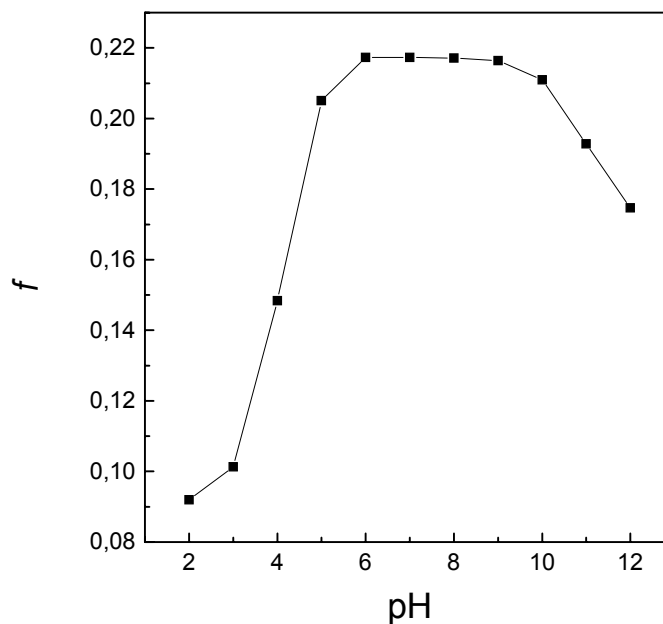


Figura 9.3.2. Fracción total de carga f en función del pH para una cadena de gelatina en solución diluida con la composición de aminoácidos reportada en la Tabla 9.3.1.

En la Tabla 9.3.2 se muestran los valores numéricos obtenidos de f_+ , f_- , f y δf obtenidos para la muestra de gelatina cuya composición se reporta en la Tabla 9.3.1.

Tabla 9.3.2. Fracción de cargas positivas f_+ , fracción de cargas negativas, fracción total de cargas f y fracción de cargas netas δf a diferentes pH para una molécula de gelatina que posee la composición de aminoácidos reportada en la Tabla 9.3.1.

pH	f_+	f_-	f	δf
2	0.09059	0.00141	0.09199	0.08918
3	0.09058	0.01075	0.10133	0.07983
4	0.09055	0.05782	0.14836	0.03273
5	0.09024	0.11479	0.20503	0.02455
6	0.08866	0.12863	0.21729	0.03997
7	0.08707	0.13023	0.21731	0.04316
8	0.08665	0.13044	0.21709	0.04379
9	0.08552	0.13091	0.21643	0.04538
10	0.07759	0.13336	0.21095	0.05576
11	0.05670	0.13615	0.19285	0.07946
12	0.03788	0.13675	0.17464	0.09887

La Figura 9.3.3 muestra la variación del logaritmo de la fracción de carga neta $\delta f = |f_+ - f_-|$ en función del logaritmo de la fracción total de grupos cargados f permitiendo, de esta manera, visualizar esta problemática.

Teniendo en cuenta el diagrama de estados conformacionales de moléculas de polianfolitos en ausencia de sales reportados por Dobrynin et al. (1997) (ver Figura 9.2.2), analizando los distintos estados de carga que poseen las moléculas de gelatina a los diferentes pH y aplicando los conceptos teóricos revisados en la sección 9.2 se puede realizar un análisis cualitativo de las posibles conformaciones que pueden presentar las moléculas de gelatina. Se observa que a los pH 2 y 3 las cadenas de gelatina probablemente se encuentran en una conformación de polielectrolito debido a que éstas poseen una fracción total de carga f baja y una elevada asimetría de carga δf . Por otra parte, a pH 4, las moléculas podrían encontrarse en una conformación de cadena errática (*coil*) o de glóbulo debido a que tanto f como δf son bajas. A pH 5, las cadenas de gelatina poseen f medianamente elevada y δf baja, por consiguiente, en esta situación las cadenas de gelatina podrían estar en la conformación de glóbulo. A los pH 6, 7, 8, 9 y 10 probablemente las cadenas de gelatina se encuentren en la conformación de collar de perlas y, finalmente a los pH 11 y 12 nuevamente adoptarían la conformación de polielectrolitos debido a que δf toma valores de intermedios a elevados siendo a su vez f elevada (ver Figura 9.2.2).

Asimismo, en la Figura 9.3.3 se realizó un reticulado o malla formado por rectas igualmente espaciadas que poseen pendientes 0.5 y 1.5. Estos valores de pendientes se seleccionaron a partir de los valores críticos de corte mostrados en la Figura 9.2.2. En efecto, si se aplica el logaritmo decimal al

límite de corte entre la conformación globular y la conformación de collar de perlas se obtiene una recta con pendiente 0.5 y si el mismo procedimiento se realiza para el límite de corte entre la conformación de collar de perlas y la conformación de polielectrolito se obtiene una recta de pendiente 1.5.

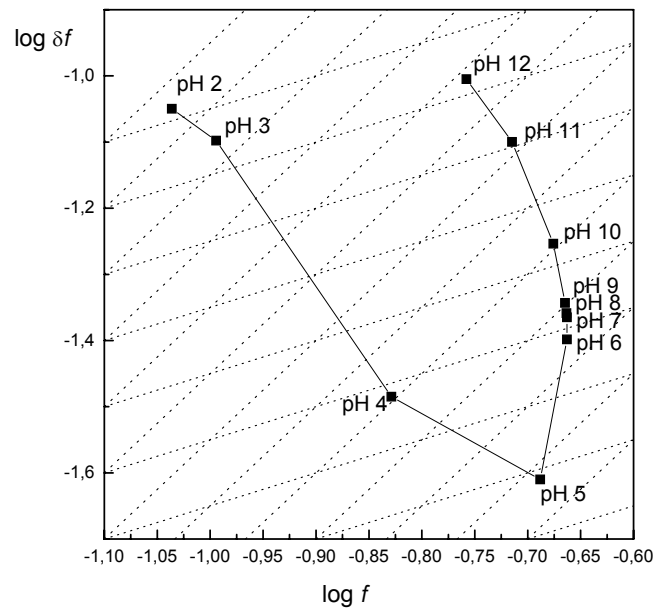


Figura 9.3.3. Fracción de carga neta $\delta f = |f_+ - f_-|$ en función de la fracción total de carga f de una cadena de gelatina en solución diluida que posee la composición de aminoácidos reportada en la Tabla 9.3.1.

Al tratarse de una teoría de escalas, no es posible obtener las constantes de proporcionalidad que permitirían obtener el par de rectas que determinan los límites de corte exactos. No obstante, resulta útil analizar algunos casos. En la Figura 9.3.4 se muestran cuatro ejemplos donde se establecen los límites conformacionales. Claramente se observa que en todos los casos cuando la solución posee pH 5 las cadenas de gelatina se encontrarían en un estado globular y que tanto a los pH extremos tanto ácidos

(pH 2 y 3) como alcalinos (pH 11 y 12) las macromoléculas se encontrarían en la conformación de polielectrolito.

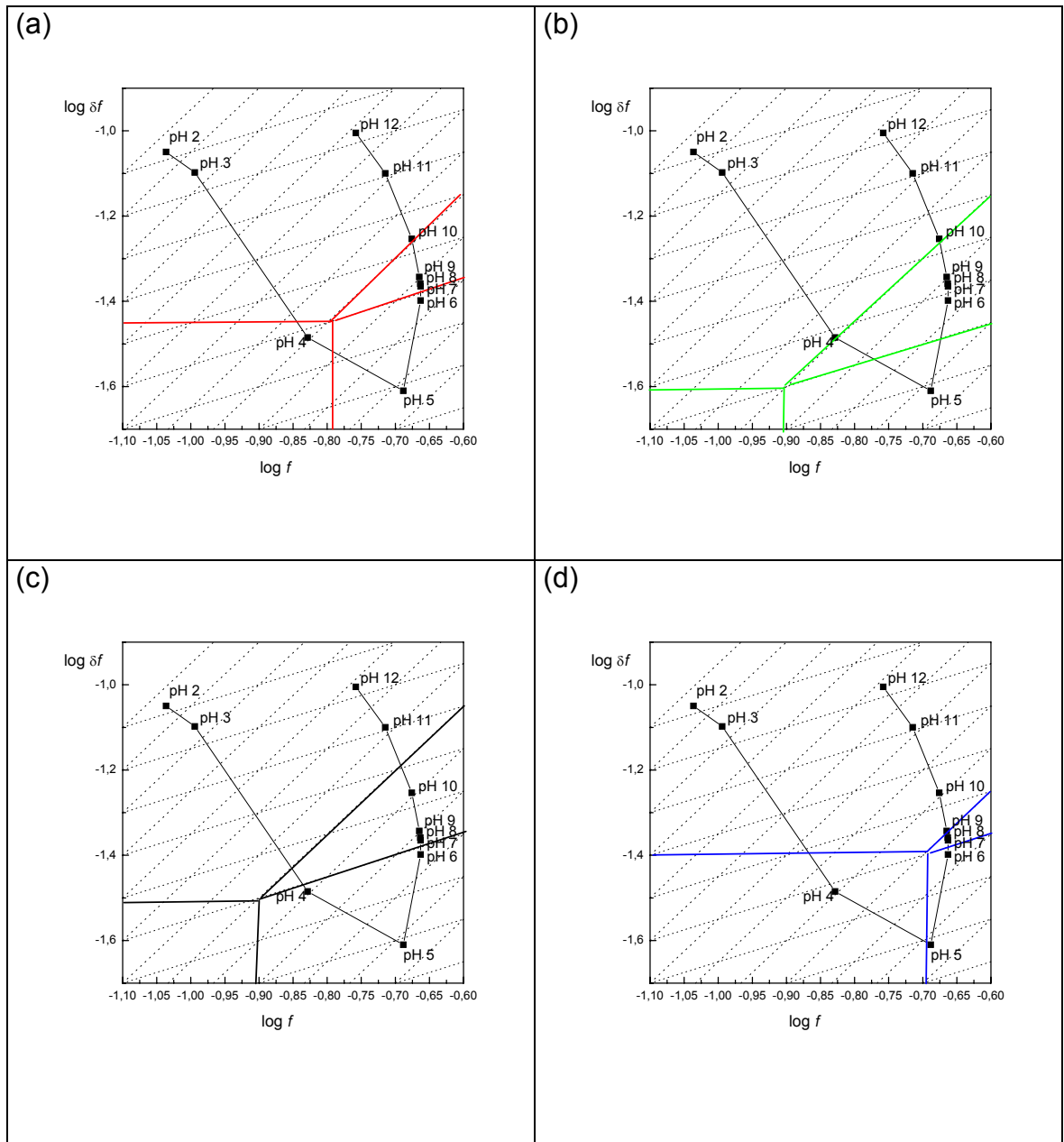


Figura 9.3.4: Logaritmo de la fracción de asimetría de carga de cadenas de gelatina en función del logaritmo de la fracción de carga total. Las figuras (a), (b), (c) y (d) muestran distintos límites conformacionales posibles

Asimismo, en el rango de pH comprendido entre 6 y 10 se observa que las cadenas de gelatina podrían estar formando estructuras con conformaciones del tipo collar de perlas. En cuanto a la conformación

adoptada por las moléculas de gelatina a pH 4 no se podría definir si estas se encontrarían en conformación errática (ver Figura 9.3.4 a y d), globular (ver Figura 9.3.4 c) o de polielectrolito (ver Figura 9.3.4 b).

Con el fin de obtener datos que permitan realizar una estimación semicuantitativa de las diferentes conformaciones macromoleculares que pueden adoptar las moléculas de gelatina a los distintos pH, se utilizaron los conceptos teóricos revisados en la sección 9.2 y se obtuvieron dimensiones, que aunque sólo permiten estimar escalas u órdenes de magnitud, sirven como marco de referencia de la problemática planteada la cual, actualmente, posee un grado de conocimiento poco desarrollado según lo reportado en la literatura.

Considerando las ecuaciones (9.2.4. a y b) se obtuvieron los valores del tamaño de las esferas ξ y el número de monómeros g en cada una de ellas para los diferentes estados de carga a los distintos pH. Estos resultados se muestran en las Figuras 9.3.4 y 9.3.5 respectivamente.

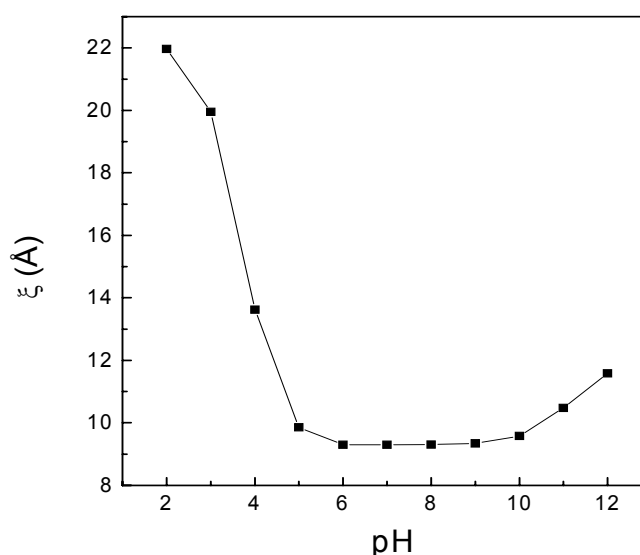


Figura 9.3.5 Tamaño de las esferas ξ en función del pH de cadenas de gelatina en solución diluida. La composición de aminoácidos se reporta en la Tabla (9.3.1).

En la Figura 9.3.5 se observa que ξ disminuye desde pH 2 hasta pH 6 y luego se mantiene constante hasta un pH de aproximadamente 9 a partir del cual aumenta nuevamente su tamaño hasta el pH 12, aunque este aumento no es muy pronunciado. Consistentemente, la misma tendencia muestra el número de monómeros dentro de cada esfera g (ver, Figura 9.3.6). En este sentido, es relevante notar que a los pH 2 y 3, donde las esferas son más grandes, las cadenas de gelatina estarían en una conformación de polielectrolito y, de esta forma se formaría una estructura más rígida y expandida.

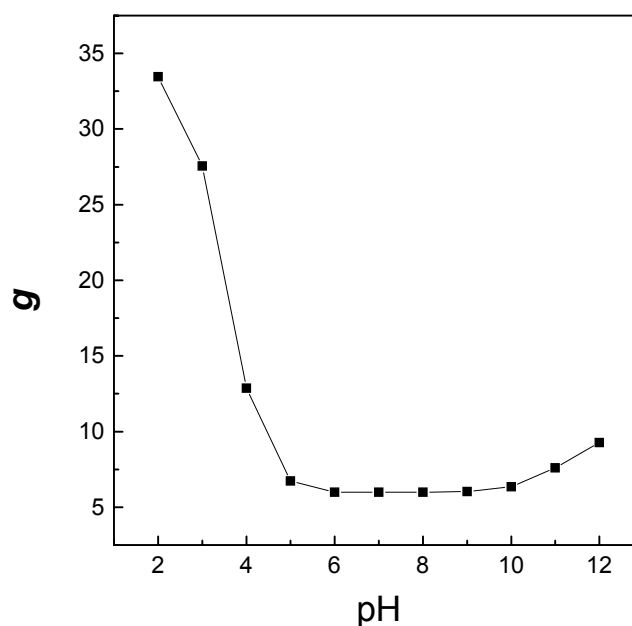


Figura 9.3.6 Número de monómeros g en cada esfera en función del pH para cadenas de gelatina en solución diluida. La composición de aminoácidos se reporta en la Tabla (9.3.1).

La Figura 9.3.7 muestra la variación del tamaño de cuentas D y de la longitud de los conectores l_{con} a los diferentes valores de pH. Se observa que en la zona del punto isoeléctrico las cuentas alcanzan el tamaño máximo y, consecuente como lo predice la teoría para polianfolitos, la longitud del conector también aumenta debido a que la elevada carga acumulada en las cuentas fuerza a incrementar la longitud de los conectores en virtud de minimizar la repulsión electrostática entre dos cuentas vecinas. Asimismo, en la zona de pH comprendido entre 6 y 10 se observa una zona estable donde ambas dimensiones se mantienen aproximadamente constantes.

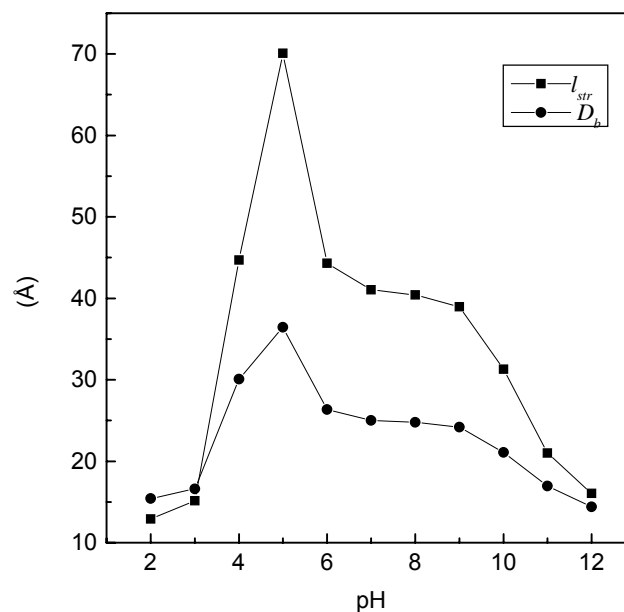


Figura 9.3.6 Longitud del conector (■) y tamaño de las cuentas (●) en función del pH para cadenas de gelatina en solución diluida. La composición de aminoácidos se reporta en la Tabla (9.3.1).

Teniendo en cuenta el número total de esferas $N_{ET} = N/g$, el número de esferas en cada conector $N_{ECON} = l_{con}/\xi$ y el número de esferas en una

cuenta $N_{EC} = m/g$, se obtiene el número de cuentas en una cadena n_C , es decir,

$$n_C = \frac{N_{ET} + N_{ECON}}{N_{ECON} + N_{EC}} \quad (9.3.4)$$

La Figura 9.3.8 muestra el número de cuentas en una cadena en función del pH.

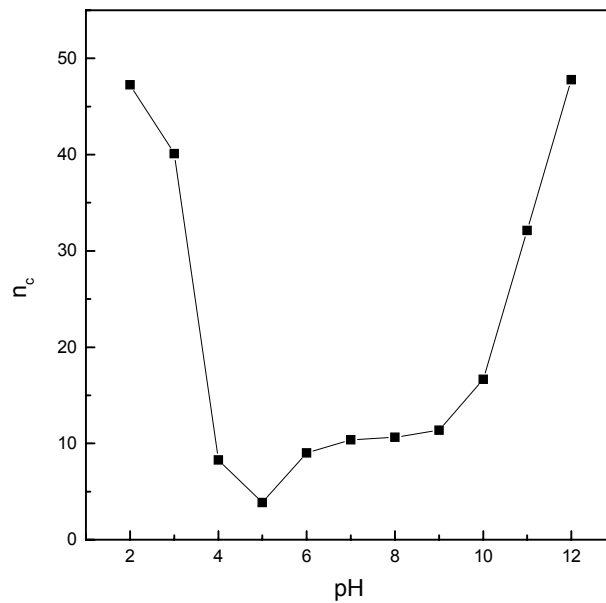


Figura 9.3.8 Número de cuentas por cadena n_c en función del pH para cadenas de gelatina en solución diluida. La composición de aminoácidos se reporta en la Tabla (9.3.1).

Se observa que en los pH extremos ácidos 2 y 3 las cadenas de gelatina estarían constituidas por un elevado número de cuentas mientras que en la zona del punto isoeléctrico éstas tendrían una estructura más compacta

compuesta de cuatro cuentas aproximadamente. Por otro lado, en la zona comprendida entre los pH 6 y 9 las cadenas de gelatina estarían compuestas de 9 a 16 cuentas y para valores de pH mayores éstas tendrían un número de cuentas mayor a 30. Asimismo, es relevante notar que el número de conectores por cadena es $n_{con} = n_c - 1$.

9.4 Viscosidad reducida de soluciones diluidas de gelatina para diferentes pH y fuerzas iónicas

Preparación de las soluciones

Con el objetivo de evaluar el comportamiento reométrico de soluciones diluidas de gelatina a diferentes pH y fuerzas iónicas se realizaron ensayos de reometría capilar gravitatoria. Estas experiencias se llevaron a cabo utilizando el viscosímetro capilar gravitatorio diseñado especialmente para obtener un rango de velocidades de corte bajas (ver Capítulo 6). Se evaluó la viscosidad reducida η_{red} de las soluciones de gelatina a distintos pH y fuerzas iónicas, donde en todos los casos los valores de η_{red} resultaron del orden de magnitud de la viscosidad intrínseca (ver Capítulo 7 y 8 una discusión más detallada de este aspecto).

Para este estudio se utilizó la misma muestra de gelatina analizada a través de los ensayos de viscosidad intrínseca a diferentes historias térmicas y viscosidad específica en función del tiempo de maduración (ver características de esta muestra de gelatina en el Capítulo 7) la cual posee un peso molecular

promedio $M_n = 133$ KDa obtenido mediante PAGE-SDS (ver los detalles de este estudio en el Capítulo 5).

Para la determinación de la viscosidad reducida a los distintos pH y fuerzas iónicas se prepararon soluciones diluidas de gelatina con una concentración de $2 \cdot 10^{-3}$ g/cm³. La fuerza iónica se estableció en con cloruro de sodio (NaCl) y el pH con ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH) para las soluciones con pH ácidos o alcalinos respectivamente. Para la disolución de la gelatina se realizó primero una etapa de hidratación de diez minutos con agua deionizada a 50°C y luego otra etapa de disolución total en un volumen cercano al volumen final con el contenido de NaCl a la misma temperatura. Esta etapa se realizó con agitación durante cuarenta minutos. Seguidamente, se ajustó el pH con NaOH o HCl, se completó el volumen final verificando el pH requerido. Asimismo, se adicionó azida sódica en una concentración de 0,02% para prevenir degradaciones bacterianas. Mediante este procedimiento se prepararon soluciones con diferentes valores de pH (pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) y a fuerza iónica ($I = 6, 20, 110, 300$ y 500 mM). Las soluciones se filtraron y se almacenaron en botellas de vidrio color caramelo para evitar el contacto con la luz. Antes de realizar los ensayos reométricos las soluciones se calentaron a 50°C durante una hora bajo agitación con el objetivo de eliminar las posibles asociaciones producidas durante el tiempo comprendido entre la preparación de las mismas y los ensayos experimentales lo cual insume un cierto tiempo. Finalmente se midió la viscosidad aparente de las soluciones a 25°C y se obtuvo el valor de la viscosidad reducida $\eta_{red} = \eta - \eta_s / \eta_s C$ considerando la viscosidad del solvente η_s y la concentración de las soluciones diluidas.

Resultados

Al igual que en las experiencias realizadas para obtener la viscosidad intrínseca (Capítulo 7) y la viscosidad específica en función del tiempo de maduración (Capítulo 8), en todos los casos (es decir para todos los pH y las fuerzas iónicas) las soluciones se comportaron como fluidos newtonianos en el rango de velocidad de corte comprendido entre 50 y 2800 seg^{-1} . En efecto, los datos experimentales de H versus t se ajustaron satisfactoriamente con la ecuación (6.2.12) (ver Capítulo 6) arrojando coeficientes de regresión lineal cuadrado $r^2 \geq 0,999$ y errores relativos de ajuste $\varepsilon \leq 0,02$.

La Figura 9.4.1 muestra el comportamiento de la viscosidad reducida de las soluciones diluidas de gelatina con el pH y la fuerza iónica. Se observa claramente que en la zona de pH correspondiente a la zona del punto isoeléctrico ($pI \approx 4-5$) la viscosidad reducida alcanza un mínimo en todos los valores de fuerza iónica ensayados. Esto indica que con la variación del pH en un pequeño rango alrededor del pI las atracciones electrostáticas entre cargas de signo opuesto conducen al colapso de cada cadena de gelatina conduciendo a la formación de estructuras con un radio hidrodinámico menor y, por consiguiente, una disminución de la η_{red} . Por el contrario, para pH alejados de la zona del pI η_{red} aumenta gradualmente hacia valores de pH extremos. Esto se debería a que a medida que aumenta la carga neta de las macromoléculas (estas serán positivas en las zonas de pH ácidos y negativas en las zonas de pH alcalino) se produce la expansión de las mismas como consecuencia de la repulsión electrostática entre cargas del mismo signo.

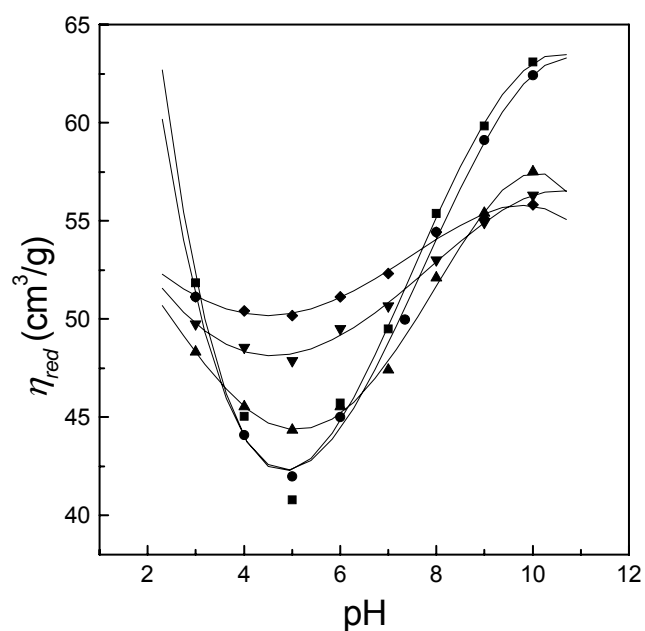


Figura 9.4.1. Efecto del pH y la fuerza iónica en el comportamiento de soluciones diluidas de gelatina para una concentración de $2 \cdot 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ en un amplio rango de pH para las fuerzas iónicas (■) 6 mM, (●) 20 mM, (▲) 110 mM, (▼) 300 mM and (◆) 500 mM.

El efecto de la fuerza iónica también se muestra en la Figura 9.4.1. donde se observa que la η_{red} y, por lo tanto, el tamaño de las macromoléculas disminuye a medida que se agrega mayor cantidad de sal en los rangos de pH donde las macromoléculas poseen una asimetría de carga elevada (ver en Figura 9.4.1 a pH 10). En estas circunstancias, el agregado de sal inhibe las repulsiones electrostáticas (mediante el apantallamiento de las cargas) provocando que la macromolécula adopte una estructura más compacta disminuyendo, de esta manera, el radio hidrodinámico.

Por otro lado, en la zona de pH del pI (ver en Figura 9.4.1 a pH 4-5) el tamaño de las macromoléculas y, consecuentemente, η_{red} aumentan a medida

que se agrega mayor cantidad de sal. Esto se debería a que en la medida que las atracciones electrostáticas entre cargas de signo opuesto y relativamente iguales en número se inhiben por el apantallamiento de las cargas por parte de los iones salinos.

En las zonas de pH intermedios, se encuentran presentes tanto las atracciones entre cargas de signo opuesto como las repulsiones entre cargas del mismo signo. En este sentido, para un análisis más detallado de este fenómeno se presenta, a continuación, la Figura 9.4.2 la cual muestra la variación de la viscosidad reducida en función de la fuerza iónica para valores constantes de pH.

A pH 3, por ejemplo, por la fracción de carga total y neta que posee la gelatina (ver Tabla 9.3.3) y considerando, además, lo discutido en la sección 9.3, las moléculas de gelatina se encontrarían, probablemente, en una conformación de polielectrolito en ausencia de iones salinos. En este sentido, la adición de sal obligaría a las macromoléculas a adoptar la conformación de collar de perlas (necklace globule) mediante el apantallamiento de las repulsiones electrostáticas. A fuerzas iónicas mayores a 100 mM la adición de mayores cantidades de sal induce a que las moléculas de gelatina evolucionen a una transición en cascada de conformaciones en collar de perlas con mayor número de cuentas (Dobrynin et al., 1996; Dobrynin y Rubinstein, 2004) y, por lo tanto, el tamaño hidrodinámico de estas estructuras aumenta nuevamente reflejándose en el aumento de la η_{red} . Un comportamiento similar se observa a pH 4.

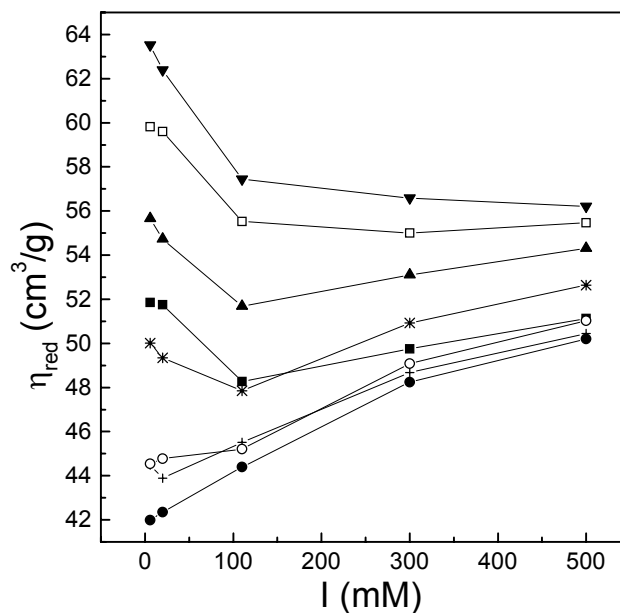


Figure 9.4.2 Viscosidad reducida de soluciones diluidas de gelatina a una concentración de $2 \cdot 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ en función de la fuerza iónica a los pH 3 (■), 4 (+), 5 (○), 6 (○), 7(*), 8 (▲), 9 (□) y 10 (▼).

Asimismo, la Figura 9.4.2 muestra que a pH 5 (cerca del punto isoeléctrico) η_{red} aumenta para todos los valores de fuerza iónica usados en las experiencias. En este caso, las moléculas de gelatina en ausencia de sal se encontrarían en un estado de globular. La adición de sal solamente induciría una expansión de la molécula mediante el aumento progresivo del número de cuentas provocando, de esta forma, la expansión de la cadena y el aumento del radio hidrodinámico con el consecuente aumento de la η_{red} . Un fenómeno similar se observa a pH 6.

A los pH 8 y 9 la Figura 9.4.2 muestra que η_{red} presenta un comportamiento similar que a pH 3. En este caso, primeramente, el tamaño de las macromoléculas disminuiría (lo cual se refleja en la disminución de η_{red})

debido a la inhibición de las repulsiones electrostáticas provocando, de esta forma, el aumento del tamaño de las cuentas a expensas de la reducción de la cantidad de las mismas presentes en cada cadena de gelatina. Luego, por encima de un valor de fuerza iónica de 100 mM aproximadamente, la inhibición de las atracciones electrostáticas entre cargas opuestas produciría la expansión de la cadena (y el consecuente aumento de η_{red}) mediante el aumento del número de cuentas.

Finalmente, a pH 10 η_{red} solamente disminuye con el agregado de sal. En este caso, las cadenas de gelatina evolucionarían a estructuras más compactas a medida que la fuerza iónica aumenta, debido a la inhibición de las repulsiones entre cargas del mismo signo.

9.5 Viscosidad aparente de soluciones concentradas de gelatina para diferentes pH y fuerzas iónicas

Con el objetivo de evaluar el comportamiento reométrico de soluciones concentradas de gelatina a diferentes pH y fuerzas iónicas se realizaron ensayos de reometría en flujo de corte con geometría rotacional. Los ensayos reométricos se llevaron a cabo utilizando el viscosímetro rotacional de celda cono-plato cuyas características y metodología para la obtención de las funciones reométricas se detallan en el Capítulo 6.

Para este estudio se utilizó la misma muestra de gelatina que se analizó en condiciones diluidas (ver Sección 9.3). Se realizó la determinación de la viscosidad aparente η a los distintos pH y se evaluó también el efecto del agregado de sal realizando experiencias en presencia de 300 mM de NaCl.

Para esto, se prepararon soluciones concentradas de gelatina con una concentración de $0,08 \text{ g/cm}^3$ (8% p/v) siguiendo el mismo protocolo utilizado para la preparación las soluciones diluidas. Se colocó la muestra en la celda reométrica, se llevó a 25°C en 30 segundos y se midió la viscosidad aparente a una velocidad de corte de $76,8 \text{ s}^{-1}$ (20 rpm) durante diez minutos tomando valores de η a intervalos de 1 minuto. En este sentido, se seleccionó una velocidad de corte baja para minimizar la destrucción de la microestructura formada a elevadas velocidades corte (Carvalho y Djabourov, 1997; Eluk et al., 2005).

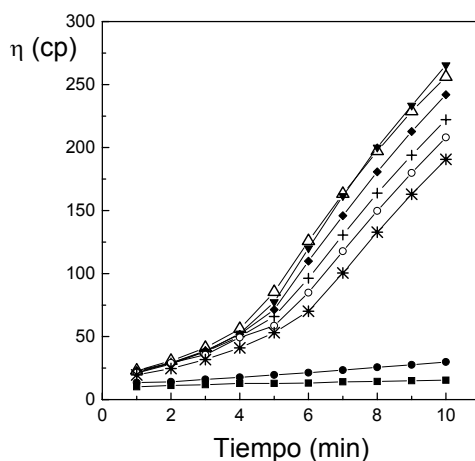
Resultados

Se observó en todos los casos (es decir para todos los pH ensayados tanto en ausencia como en presencia de sal) que η aumenta progresivamente a medida que transcurre el tiempo de maduración. En este sentido, la Figura 9.5.1 a y b muestra la evolución de η paraméricamente con los valores de pH.

Como es esperable, el aumento de la viscosidad aparente a medida que transcurre el tiempo de maduración cuando $C > C_g$ y $T < T_g$ se debe a la regeneración parcial de la estructura tropocolagénica de las cadenas de gelatina (Normand et al.; 2000. Joly-Duhamel et al., 2002a y 2002b). Es decir, se producen zonas de triples hélices intermoleculares que conducen a la formación de una red cooperativa la cual provoca la gelificación al tiempo t_g (ver Capítulo 4). Asimismo, la presencia de cargas en las cadenas de gelatina estabiliza las zonas de triples hélices formadas y, por consiguiente, la variación

del pH de la solución (con el consecuente cambio del estado de cargas de las macromoléculas) influye en la maduración de estas soluciones.

(a)



(b)

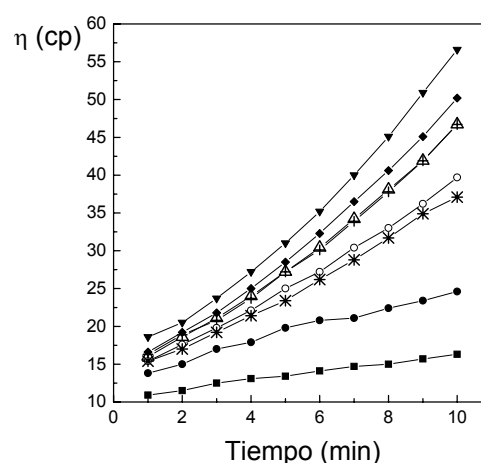


Figura 9.5.1 Viscosidad aparente η en función del tiempo de maduración correspondiente a una solución de gelatina con una concentración $C = 0,08 \text{ g/cm}^3$ a 25°C evaluada a una velocidad de corte de $76,8 \text{ s}^{-1}$. La Figura (a) corresponde a la experiencia realizada en ausencia de sal y la Figura (b) corresponde a la experiencia realizada en presencia de 300 mM de NaCl . Los pH evaluados son: 3 (\blacksquare), 4 (\bullet), 5 (Δ), 6 (\blacktriangledown), 7 (\blacklozenge), 8 (+), 9 (\circ) y 10(*).

Se observa que en ausencia de sal (ver Figura 9.5.1a), las soluciones de gelatina que poseen valores de pH mayores a cinco experimentan un marcado aumento de la viscosidad aparente luego de los cinco minutos de maduración, mientras que para valores de pH menores (pH 3 y 4) las soluciones no registran un aumento de viscosidad tan marcado. En tal sentido, es relevante recordar que la fracción de grupos cargados f presenta un marcado aumento para valores de pH mayores a cinco (ver Figura 9.3.2), manteniéndose constante hasta nueve aproximadamente y descendiendo nuevamente a pH

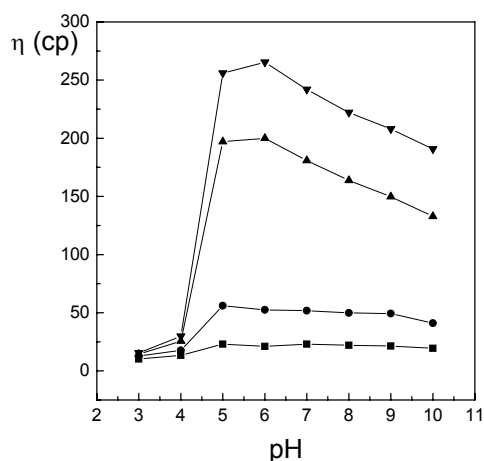
mayores a este valor. Por consiguiente, a través del análisis reométrico realizado se observa cuanto mayor es el estado de carga de las cadenas de gelatina más rápida es la formación de la red macromolecular debido a la estabilización mediante interacciones electrostáticas atractivas entre las cadenas de gelatina.

Mediante el agregado de sal ($I= 300 \text{ mM}$) se observa que las soluciones de gelatina presentan una maduración más lenta, debido a que para un mismo tiempo y temperatura de maduración se obtuvieron valores de η menores respecto a los presentados por las soluciones de gelatina en ausencia de sal (ver Figura 9.5.1 b). En este sentido, los iones salinos apantallarían las cargas eléctricas y, de esta forma, disminuiría la estabilización mediada por cargas de las estructuras de triples hélices.

Para analizar el efecto del pH y, consecuentemente, del estado de cargas en la formación de triples hélices intermoleculares en soluciones concentradas de gelatina en la Figura 9.5.2 a y b se presenta la variación de η en función del pH a tiempos de maduración constantes tanto para la experiencia donde no se adicionó sal como para aquella que se evaluó en presencia de 300 mM de NaCl. Se observa que η presenta un máximo en la zona de pH comprendido entre 5 y 6. En este sentido, es preciso recordar que a estos pH las cadenas de gelatina poseen tanto cargas positivas como negativas y, de esta forma, la atracción electrostática entre cargas opuestas favorecería la estabilización de las zonas de triples hélices formadas. Por consiguiente, es esperable que en esta zona de pH, η sea mayor que en las zonas de pH donde predominan las cargas igual signo en las cuales se

produciría repulsión entre las cadenas desfavoreciendo, de este modo, la formación y estabilización de zonas de triple hélices intermoleculares.

(a)



(b)

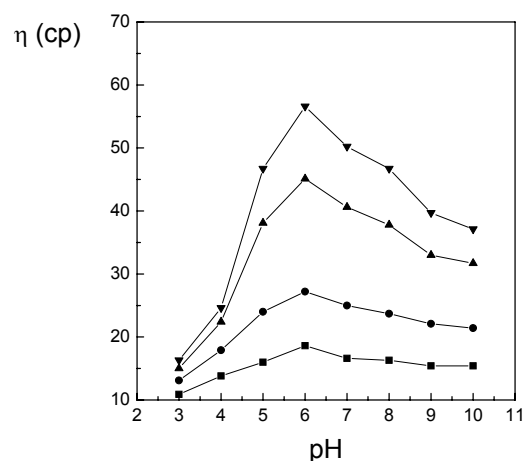


Figura 9.4.2 Viscosidad aparente η en función del pH correspondiente a una solución de gelatina con una concentración $C = 0,08 \text{ g/cm}^3$ a 25°C evaluada a una velocidad de corte de $76,8 \text{ s}^{-1}$. La Figura (a) corresponde a la experiencia realizada en ausencia de sal y la Figura (b) corresponde a la experiencia realizada en presencia de 300 mM de NaCl. Los tiempos de maduración evaluados son: 1 (■), 4 (●), 8 (▲) y 10 (▼) minutos.

Asimismo, resulta relevante analizar por qué el máximo de η en las soluciones concentradas se registra entre los pH 5 y 6. Aunque el punto isoeléctrico de las cadenas de gelatina analizadas en este trabajo se encuentra comprendido entre los pH 4 y 5 a estos valores de pH, la fracción de grupos cargados f es menor que a pH 6 donde se alcanza el valor máximo de f (ver Figura 9.3.2). Por consiguiente, a pH 6 habría un mayor número de grupos cargados positivos y negativos que intervendrían en la estabilización de las zonas de triples hélices intermoleculares. Asimismo, resulta relevante mencionar que las cadenas de gelatina a pH 5 poseen una conformación del

tipo globular debido a la presencia de interacciones electrostáticas atractivas intramacromoleculares y, por consiguiente, las interacciones intermoleculares durante el proceso de maduración no sería tan favorable como en los casos donde el pH de la solución es mayor a 5 donde las cadenas están más expandidas. Por otro lado, es importante recordar que en el caso de soluciones diluidas, donde las interacciones entre cargas son intramoleculares se observa que el mínimo de η_{red} (es decir el menor radio hidrodinámico de las moléculas individuales de gelatina) se produce en la zona del punto isoeléctrico como lo predice la teoría de polianfolitos (ver Figura 9.4.1).

Asimismo, en las Figura 9.5.2 a y b se observa que en la zona de pH comprendida entre 7 y 9 η disminuye de una manera menos pronunciada. En este sentido, es interesante notar que en esta zona de pH tanto la asimetría de carga $N\delta f$ (ver Figura 9.3.1) como la fracción total de grupos cargados f (ver Figura 9.3.2) mantienen un valor aproximadamente constante. Por consiguiente, en esa zona de pH la estabilización a través de cargas de las estructuras de triple hélice sería semejante.

Con el objetivo de analizar el efecto del agregado de sal en el comportamiento de soluciones concentradas de gelatina a los diferentes pH, en la Figura 9.5.3 se realiza una comparación del comportamiento de estas soluciones a un tiempo de maduración constante de 10 minutos. Se observa que el agregado de NaCl inhibe la maduración de las soluciones de gelatina obteniéndose valores de η menores respecto de la misma experiencia (es decir al mismo pH y tiempo de maduración) en ausencia de sal. No obstante, aún a 300 mM de NaCl la presencia de las cargas influencia la maduración de

las soluciones concentradas de gelatina debido a que se observa que igualmente η varía con el pH de la solución.

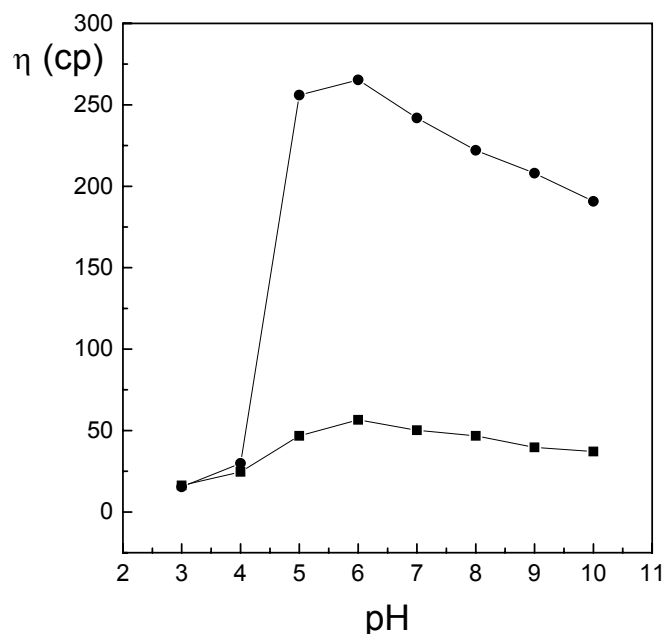


Figura 9.4.3 Viscosidad aparente η en función del pH correspondiente a una solución de gelatina con una concentración $C = 0,08 \text{ g/cm}^3$ a 25°C evaluada a una velocidad de corte de $76,8 \text{ s}^{-1}$ a un tiempo de maduración de 10 minutos. Las experiencias se realizaron en ausencia de sal (●) y en presencia de 300 mM de NaCl (■).

9.6 Conclusiones

Mediante el estudio teórico y experimental de soluciones diluidas y concentradas de gelatina a diferentes pH se observó que éstas presentan un comportamiento típico de polianfolitos. En efecto, el análisis del estado de cargas de la secuencia peptídica perteneciente a una gelatina de vaca (*Bos Taurus*) permitió observar que las cadenas de gelatina presentan un punto

isoeléctrico $pI = 4,48$ y que desde el valor de pH 6 hasta el valor de pH 9 la carga neta no aumenta considerablemente. Además se observó que la fracción total de carga aumenta desde el pH 2 hasta el pH 7 donde adquiere su valor máximo. En este sentido, resulta importante considerar en forma conjunta en el análisis del estado eléctrico de las soluciones de gelatina tanto la carga neta como la carga total. Además, de este estudio también se concluye que la gelatina es un polianfolito débilmente cargado debido a que nunca (es decir a ningún pH) posee más de un 20% de sus aminoácidos cargados.

Mediante la aplicación de la teoría de polianfolitos a cadenas de gelatina se observó que este biopolímero en la zona del pI y en ausencia de sal estaría formando un glóbulo compacto y que en la zona de pH comprendida 6 y 10 formaría estructuras más expandidas (conformación en collar de perlas) que ocluirían mayor cantidad de solvente. Asimismo, a los pH extremos ácidos (pH 2 y 3) y alcalinos (pH 11 y 12) estas macromoléculas se comportarían como polielectrolitos.

A través del análisis reométrico de soluciones diluidas de gelatina se observó que la viscosidad reducida alcanza un mínimo en la zona de pH entorno al pI mientras que en las zonas alejadas a este punto ésta aumenta gradualmente. Estos resultados reflejan, claramente, que las fuerzas de interacción en soluciones diluidas son intramoleculares, las cuales modifican el radio hidrodinámico de estas entidades.

Asimismo, analizando el efecto de la fuerza iónica en las soluciones diluidas de gelatina se observó que el tamaño macromolecular y, consecuentemente, la η_{red} disminuyen a medida que aumenta la cantidad de sal adicionada cuando las macromoléculas poseen una carga neta elevada (es

decir a pH alejados del pI), debido a la inhibición de las repulsiones electrostáticas. Por otra parte, en la zona de entorno al pI el tamaño macromolecular y la η_{red} aumentan con el agregado de sal debido a que la inhibición de las atracciones entre cargas opuestas permite la expansión de las macromoléculas.

Mediante el estudio reométrico de soluciones concentradas de gelatina, se observó que la variación del estado de carga (que se produce al variar el pH de la solución) influye en la formación de zonas de triples hélices intermoleculares. A través de este análisis reométrico se observó que cuanto mayor es el estado de carga (cuantificado a través de la fracción total de grupos cargados) de las cadenas de gelatina más rápida es la formación de la red macromolecular debido a la estabilización mediante interacciones electrostáticas atractivas entre las cadenas de gelatina. A pH 6 las soluciones presentan un máximo de viscosidad aparente debido a que en estas condiciones fisicoquímicas las cadenas de gelatina presentan cargas de signo opuesto y además se encuentran en el estado máximo de carga total. Además, a este valor de pH las cadenas se encontrarían en una conformación más expandida (respecto a la conformación globular que se produce en el punto isoeléctrico) que favorecería formación de la red macromolecular que se produce durante el proceso de maduración. Asimismo, se observó que el agregado de sal inhibe, parcialmente, la estabilización de las zonas de triple hélices formadas.

Finalmente, resulta relevante observar en esta etapa de investigación que el comportamiento de las cadenas de gelatina en condiciones diluidas es importante para la interpretación de las fenomenologías que presentan estas

macromoléculas en soluciones concentradas. En efecto, la naturaleza eléctrica de la gelatina es uno de los aspectos menos estudiados hasta la actualidad y a su vez una de las características más importantes para el diseño de numerosas aplicaciones tecnológicas.

9.7 Bibliografía

- Bratko D. and Chakraborty A. K. (1996). A numerical study of polyampholyte configuration. *J. Phys. Chem.*, 100, 1164-1173.
- Candau, F.; Ohlemacher, A.; Munch, J. P. y Candau, S. J. (1997). Effect of the net charge distribution on the aqueous solution properties of polyampholytes. *Revue de l' Institut Francais du Pétrole*, 52(2), 133-137.
- Carvalho, W. y Dajabourov, M. (1997). Physical gelation under shear for gelatin gels. *Rheol. Acta*, 36, 591-609.
- Dickinson, E. y Stainsby, G. (1982). *Colloids in Foods*. Applied Science Publishers, London.
- Dobrynin, A. V.; Colby, R. H. y Rubinstein, M. (2004)
- Dobrynin, A. V.; y Rubinstein, M. (1995). Flory theory of a polyanpholyte chain. *J. Phys. II*, 5, 677-695.
- Drobrynin, A. V. y Rubinstein, M. (1997). Adsorption of a polyampholyte chain on a charged surface. *Macromolecules*, 30, 4332-4341.
- Drobrynin, A. V.; Rubinstein, M. y Obukhov, S. P. (1996). Cascade transition of polyelectrolytes in poor solvents. *Macromolecules*, 29, 2974-2979.
- Edwards, S. F.; King, P. R. y Pincus, P. (1980). Phase changes in polyampholytes. *Ferroelectrics*, 1980, 30, 3-6.
- Einerson N. J.; Stevens, K. R. and Kao W. J. (2002). Synthesis and physicochemical analysis of gelatin-based hydrogels for drug carrier matrices. *Biomaterials*, 24, 509-523.

Eluk, D.; Ottone, M. y Deiber Julio A. Reometría en flujo de corte de soluciones de gelatina en maduración. *III Argentine-Chilean Polymer Symposium*. Los Cocos-Córdoba, Argentina, 4 al 7 de diciembre de 2005.

Fennema, O. R. (1993). *Química de los alimentos*. Editorial Acribia, S. A., Zaragoza (España).

Fukunaka, Y.; Iwanaga, K.; Morimoto, K.; Kakemi, M. y Tabata, Y. (2002). Controlled release of plasmid DNA from cationized gelatin hydrogels based on hydrogel degradation. *Journal of Control Release*, 80, 333-343.

Higgs, P. G. and Joanny, J. (1991). Theory of polyampholyte solutions. *J. Chem. Phys.*, 94(2), 1543-1553.

Joly Duhamel, C.; Hellio, D. y Djabourov, M. (2002b). All gelatin networks: II. Biodiversity and physical chemistry. *Langmuir*, 18, 7208-7217.

Joly Duhamel, C.; Hellio, D.; Adjari, A. y Djabourov, M. (2002a). All gelatin networks: I. The master curve for elasticity. *Langmuir*, 18, 7208-7217.

Kantor, Y.; Kardar, H. L. y Kardar, M. (1992). Conformations of Polyampholytes. *Physical Review letters*, 69(1), 61-64.

Kantor, Y.; Kardar, M. Y Li, H. (1994). Statistical mechanics of polyampholytes. *Physical Review E*, 49(2), 1383-1392.

Katchalsky, A. y Miller, I. R. (1954). Polyampholytes. *Journal of Polymer Science*, 8, 57-68.

Kudaibergenov, S. E. (1999). Recent advances in the study of synthetic polyampholytes in solutions. *Advances in Polymer Science*, 44, 115-197.

Mc Cornick C. L. y Jhonson, B. (1988). Water-soluble copolymers. 29. Ampholytic copolymers of sodium 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonate with

(2-acrylamido-2-methylpropyl) dimethylamonium chloride: solution properties. *Macromolecules*, 21, 694-699.

McCormick, C. L. y Salazar, L. C. (1992). Water soluble copolymers: 44. Ampholitic terpolymers of acrylamide with sodium 2-acrylamido-2-methylpropanesulphonate and 2-acrylamido-2-methylpropanetrimethylammonium chloride. *Polymer*, 33(20), 4384-4387.

Normand, V., Muller, S., Ravey, J. & Parker, A. (2000). Gelation kinetics of gelatin: a master curve and network modeling. *Macromolecules*, 33(3), 1063-1071.

Piaggio, M. V.; Peirotti, M. B. y Deiber, J. A. (2005). Effect of background electrolyte on the estimation of protein hydrodynamic radius and net charge through capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, 26, 3232-3246.

Srivastava, D. and Muthukumar, M. (1996). Sequence dependence of conformations of polyampholytes. *Macromolecules*, 29, 2324-2326.

Tabata, Y. e Ikada, Y. (1998). Protein release from gelatin matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31, 287-301.

Ward, A. G. y Courts, A. (1977). *The Science and Technology of Gelatin*. Academic Press, London.

Yamakov, V.; Milchev, A.; Limbach, H. J.; Dünweg, B. y Everaers, R. (2000). Conformations of random polyampholytes, *Physical Review Letters*, 85(20), 4305-4308.



Conclusiones

Conclusiones

Resultados particulares más relevantes del trabajo

- ✓ Haciendo uso de la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida se logró mostrar adecuadamente la composición de la mezcla polimérica que se obtiene luego del proceso de extracción de gelatina. Asimismo, el análisis por densitometría computacional propuesto permitió obtener $f_w(M)$, M_w y M_n .
- ✓ Se construyó un viscosímetro capilar en el cual la velocidad de corte alcanzada fue minimizada colocando el capilar en forma horizontal. Con este instrumento se realizó un programa experimental adecuado para la medición de soluciones diluidas y ultra - diluidas de gelatina en diferentes condiciones fisicoquímicas. El dispositivo capilar diseñado permite obtener la función reométrica viscosidad aparente en un amplio rango de velocidades de corte y calcular los diferentes parámetros reológicos de distintos modelos a partir de la variación de la altura del fluido en los reservorios.
- ✓ Se observó que en el régimen de concentración diluido ($C_c < C < C_g$) la temperatura de maduración afecta los valores de viscosidad intrínseca debido a la agregación de las cadenas de gelatina. Así, cuando la temperatura de maduración se encuentra por debajo del valor crítico T_g^* , las cadenas de gelatina evolucionan a la conformación de poli-L-prolina y se estabilizan mediante la generación de zonas de triples hélices, dando lugar a la formación de agregados o *clusters*.
- ✓ El proceso de agregación se interpretó haciendo uso de la teoría de agregación de Smoluchowski. En tal sentido, se observó que a medida que el tiempo de maduración aumenta, se producen agregados más heterogéneos.

Asimismo, los agregados son más desordenados y ocluyen mayor cantidad de solvente cuanto menor es la temperatura de maduración.

✓ Mediante la evaluación del factor de estabilidad coloidal W se observa que el proceso de agregación es lento debido a que las moléculas de gelatina deben vencer una barrera energética de aproximadamente 25 veces la energía térmica $k_B T_m$.

✓ También se observa que, en la zona ultra – diluida, la agregación sería excluida debido a que en esta zona sólo se obtuvieron incrementos muy pequeños de la viscosidad específica y luego de las 72 horas de maduración la viscosidad de las soluciones se mantuvo constante. Los valores experimentales de esta zona de concentración no pudieron ser interpretados mediante la teoría de agregación de Smoluchowski. Estos resultados indicarían que se produciría un plegamiento intramolecular debido a la formación de estructuras de triple hélice.

✓ Mediante el estudio teórico y experimental de soluciones diluidas y concentradas de gelatina a diferentes pH se observó que éstas presentan un comportamiento típico de polianfolitos. En efecto, el análisis del estado de cargas de la secuencia peptídica perteneciente a una gelatina de vaca (Bos Taurus) permitió observar que las cadenas de gelatina presentan un punto isoeléctrico $pI = 4,48$ y que desde el valor de pH 6 hasta el valor de pH 9 la carga neta no aumenta considerablemente. Además se observó que la fracción total de carga aumenta desde el pH 2 hasta el pH 7 donde adquiere su valor máximo. Además, de este estudio también se concluye que la gelatina es un polianfolito débilmente cargado debido a que nunca (es decir a ningún pH) posee más de un 20% de sus aminoácidos cargados.

✓ A través del análisis reométrico de soluciones diluidas de gelatina se observó que la viscosidad reducida alcanza un mínimo en la zona de pH entorno al pI mientras que en las zonas alejadas a este punto ésta aumenta gradualmente. Estos resultados reflejan, claramente, que las fuerzas de interacción en soluciones diluidas son intramoleculares, las cuales modifican el radio hidrodinámico de estas entidades. No obstante, la adición de sal puede inhibir la repulsión debido al exceso de cargas del mismo signo y la atracción entre cargas opuestas.

✓ Mediante el estudio reométrico de soluciones concentradas de gelatina, se observó que la variación del estado de carga (que se produce al variar el pH de la solución) influye en la formación de zonas de triples hélices intermoleculares. En la zona de pH entorno a 6 las soluciones presentan un máximo de viscosidad aparente debido a que a estos pH las cadenas de gelatina presentan cargas de signo opuesto y además poseen se encuentran en el estado máximo de carga total. Además la conformación individual de las cadenas (respecto a la conformación globular que presentan en el pI) favorecería las interacciones intermoleculares durante el proceso de maduración. Asimismo, se observó que el agregado de sal inhibe, parcialmente, la estabilización de las zonas de triple hélices formadas.

Conclusiones generales

✓ Finalmente, se puede concluir que este trabajo muestra el comportamiento reológico de soluciones de gelatina en un rango amplio de concentración, temperatura y bajo distintas condiciones fisicoquímicas.

- ✓ Se propone un marco teórico apropiado para la comprensión de la respuesta de estas soluciones y, en este aspecto, se realizan importantes esfuerzos.
- ✓ Se relacionan las propiedades macroscópicas, como la viscosidad aparente y la viscosidad intrínseca, con las variables principales de la microestructura de la solución, como es el tamaño y estructura de los agregados, el radio hidrodinámico de las cadenas individuales de gelatina a distintos pH y fuerza iónica y la formación de interacciones intermoleculares en soluciones concentradas.



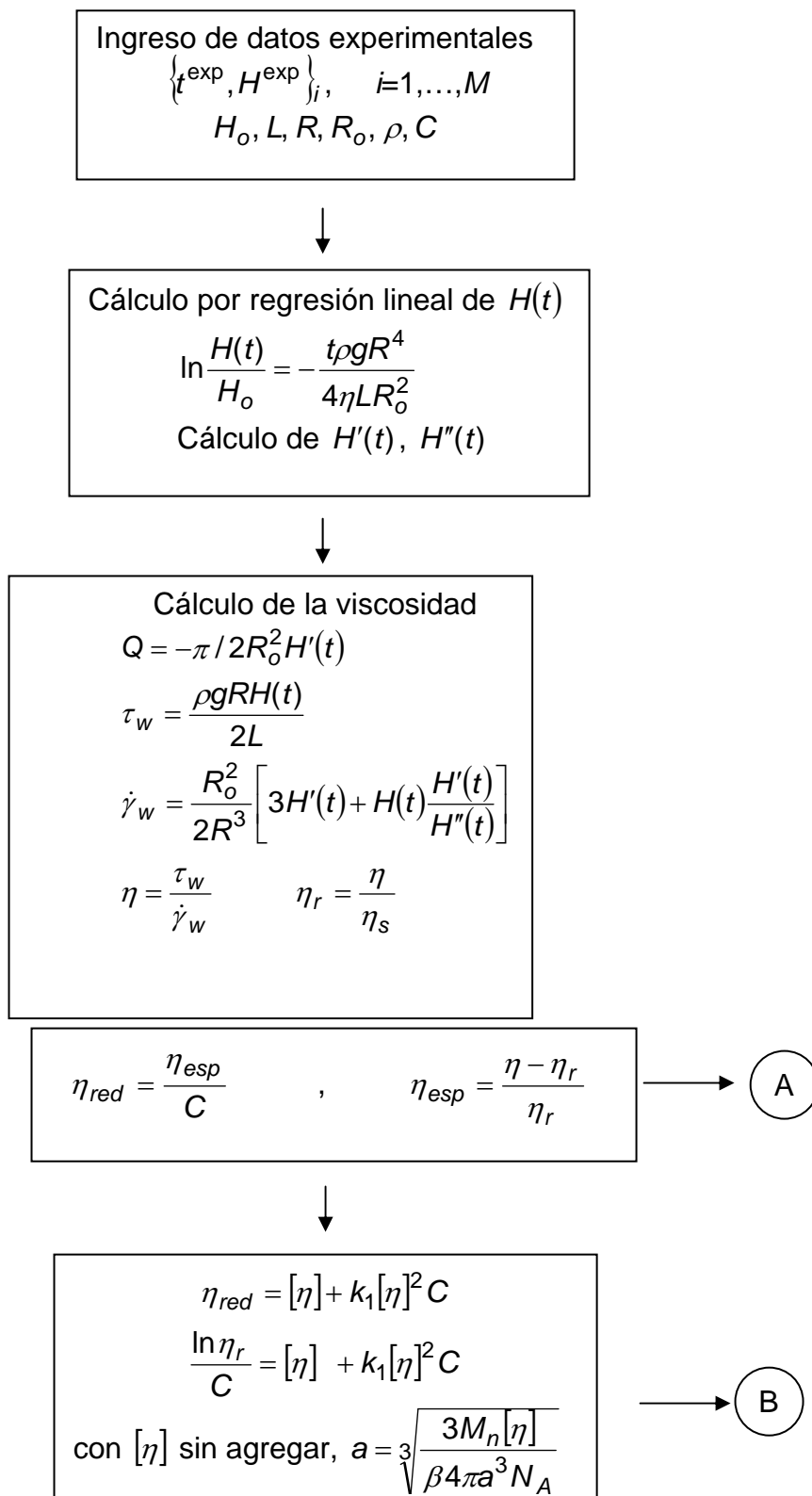
Apéndices

Apéndice I: Algoritmo numérico propuesto para la obtención de las funciones y parámetros de los modelos teóricos utilizados en esta tesis

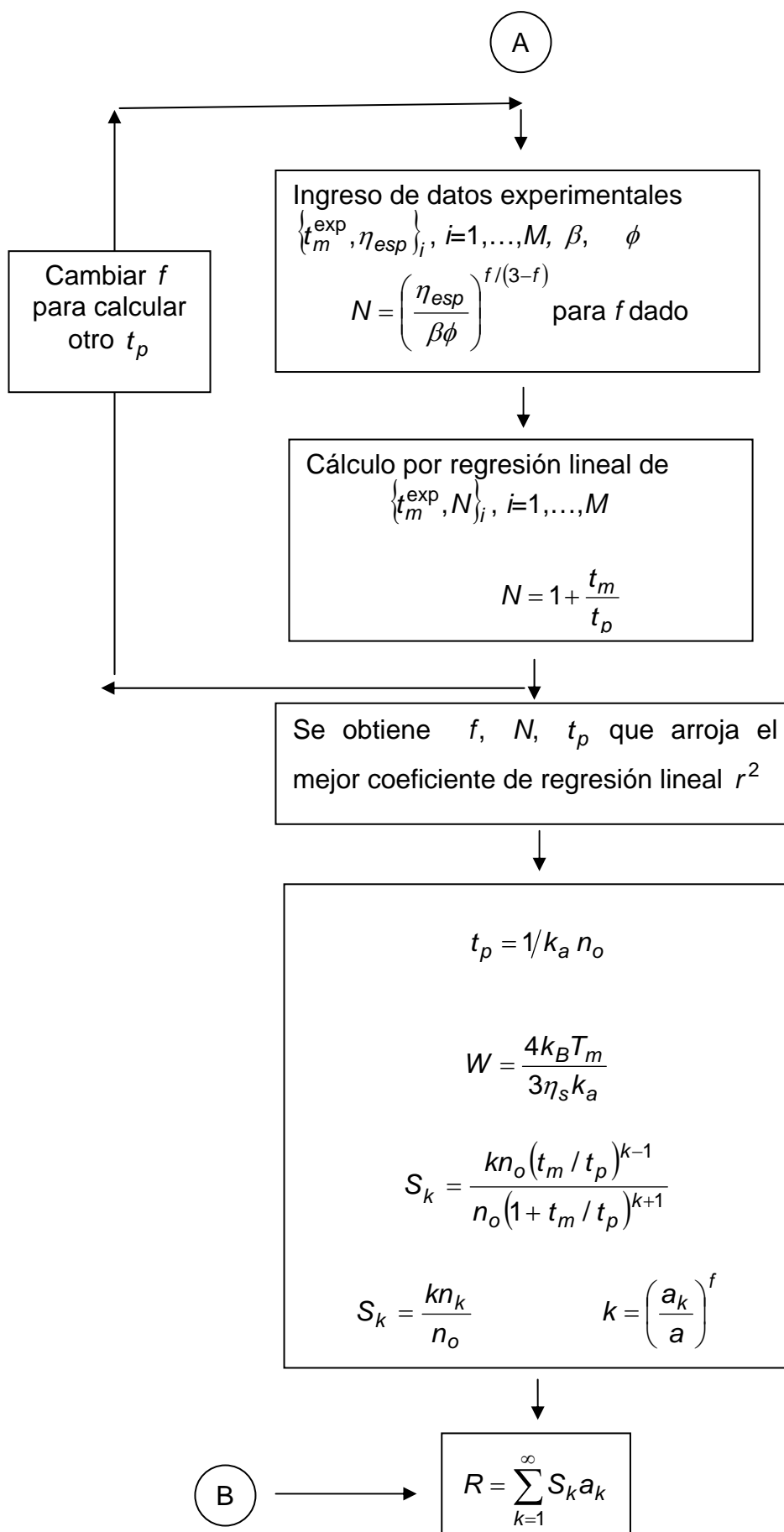
El algoritmo numérico propuesto para la obtención de las funciones y parámetros de los modelos teóricos utilizados en esta tesis se compone de tres partes fundamentales: (1) Cálculo de la viscosidad aparente y viscosidad intrínseca, (2) Aplicación de la teoría de Smoluchowski para el procesamiento de los datos experimentales obtenidos en los ensayos de agregación de moléculas de gelatina en solución diluida y (3) Análisis de la estabilidad de las soluciones diluidas de gelatina para diferentes temperaturas de maduración. Por consiguiente, se realiza un diagrama de bloques simple que permite visualizar estos procedimientos.

(1) Cálculo de viscosidad aparente y viscosidad intrínseca

Se presenta a continuación el procesamiento de datos obtenidos de tiempo de fluencia en función de la altura efectiva dentro del dispositivo capilar.



(2) Teoría de Smoluchowski



(3) Estabilidad de soluciones de gelatina

(B)



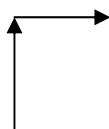
$$U_R = -2\pi\epsilon\psi_0^2 a \ln\{1 - \exp[-\kappa h]\}$$

$$U_A = -\frac{A_H}{6} \left\{ \frac{2a^2}{h^2 + 4ah} + \frac{2a^2}{h^2 + 4ah + 4a^2} + \ln\left(\frac{h^2 + 4ah}{h^2 + 4ah + 4a^2}\right) \right\}$$

$$U_S = \Delta G \pi a l \exp(-h/l)$$

$$U_T = U_R + U_A + U_S$$

Cambiar ΔG
para calcular
otro W



$$G(h) = \frac{2h}{a} \left[\frac{1 + 3h/2a}{1 + 13h/2a + 3h^2/a^2} \right]$$

$$W = 2a \int_0^\infty \frac{\exp(U_T(h)/k_B T)}{(h + 2a)^2 G(h)} dh$$



Obtención de U_S que reproduce los valores de W a distintas T_m

Apéndice II: Valores de tiempos experimentales para las distintas experiencias de viscosidad Intrínseca

Tabla II.1: Tiempos promedios experimentales registrados para experiencia E₁ a 5 °C de viscosidad intrínseca.

H(t)	Tiempo (s) C= 0,1 %p/v	Tiempo (s) C= 0,2 %p/v	Tiempo (s) C= 0,3 %p/v	Tiempo (s) C= 0,4 %p/v
14	0	0	0	0
12	33	36	41	44
10	73	79	90,5	98
8	121	133	151	163,5
6	184,5	205,5	227,5	247,5
4	272,5	304	334	364,5
2	422	475	510,5	566,5
1	573	624	700	749,5
0.5	705	788	880	985

Tabla II.2: Tiempos promedios experimentales registrados para experiencia E₁ a 15 °C de viscosidad intrínseca.

H(t)	Tiempo (s) C= 0,1 %p/v	Tiempo (s) C= 0,2 %p/v	Tiempo (s) C= 0,3 %p/v	Tiempo (s) C= 0,4 %p/v
14	0	0	0	0
12	32	35	39	43
10	71	77	86	93
8	119	131	142	152
6	179	197	214	228
4	265	288	311	336
2	410	445	483	524
1	556	603	653	712
0.5	699	763	831	898

Tabla II.3: Tiempos promedios experimentales registrados para experiencia E₁ a 20 °C de viscosidad intrínseca.

H(t)	Tiempo (s) C= 0,1 %p/v	Tiempo (s) C= 0,2 %p/v	Tiempo (s) C= 0,3 %p/v	Tiempo (s) C= 0,4 %p/v
14	0	0	0	0
12	31	35	37	40
10	70	76	79	84
8	120	126	132	142
6	179	192	200	212
4	261	281	293	311
2	394	421	450	475
1	527	561	598	620
0.5	682	707	753	796

Tabla II.4: Tiempos promedios experimentales registrados para experiencia E₁ a 25 °C de viscosidad intrínseca.

H(t)	Tiempo (s) C= 0,1 %p/v	Tiempo (s) C= 0,2 %p/v	Tiempo (s) C= 0,3 %p/v	Tiempo (s) C= 0,4 %p/v
14	0	0	0	0
12	31	35	37	40
10	70	76	79	84
8	120	126	132	142
6	179	192	200	212
4	261	281	293	311
2	394	421	450	475
1	527	561	598	620
0.5	682	707	753	796

Tabla II.5: Tiempos promedios experimentales registrados para experiencia E₁ a 30 °C de viscosidad intrínseca.

H(t)	Tiempo (s) C= 0,1 %p/v	Tiempo (s) C= 0,2 %p/v	Tiempo (s) C= 0,3 %p/v	Tiempo (s) C= 0,4 %p/v
14	0	0	0	0
12	30	33	36	39
10	69	74	78	82
8	118	124	131	140
6	179	188	196	208
4	258	274	285	299
2	394	422	440	458
1	529	564	592	620
0.5	679	707	752	792

Tabla II.6: Tiempos promedios experimentales registrados para experiencia E₁ a 35 °C de viscosidad intrínseca.

H(t)	Tiempo (s) C= 0,1 %p/v	Tiempo (s) C= 0,2 %p/v	Tiempo (s) C= 0,3 %p/v	Tiempo (s) C= 0,4 %p/v
14	0	0	0	0
12	30	32	36	39
10	70	72	78	82
8	118	124	131	140
6	179	187	196	206
4	255	274	283	296
2	392	422	437	456
1	528	561	590	619
0.5	679	704	748	791

Tabla II.7: Tiempos promedios experimentales registrados para experiencia E₂ de viscosidad intrínseca.

H(t)	Tiempo (s) C= 0,1 %p/v	Tiempo (s) C= 0,2 %p/v	Tiempo (s) C= 0,3 %p/v	Tiempo (s) C= 0,4 %p/v
14	0	0	0	0
12	30	32	36	39
10	69,5	72	77,5	82
8	118	123,5	131	140
6	179	187	195	206
4	255,5	274	282	296
2	392	422	437	456,5
1	527	561	589	618,5
0.5	679,5	703,5	748	790

Tabla II.8: Tiempos promedios experimentales registrados para experiencia E₃ de viscosidad intrínseca.

H(t)	Tiempo (s) C= 0,1 %p/v	Tiempo (s) C= 0,2 %p/v	Tiempo (s) C= 0,3 %p/v	Tiempo (s) C= 0,4 %p/v
14	0	0	0	0
12	33	36	41	44
10	72,5	78,5	90	96
8	121,5	132	150	162,5
6	182	204	223	245
4	268,5	301	327,5	360,5
2	414	464	502,5	561
1	571	622	691,5	754
0.5	709,5	788	872	962

Tabla II.9: Tiempos promedios experimentales registrados para experiencia E₄ de viscosidad intrínseca.

H(t)	Tiempo (s) C= 0,1 %p/v	Tiempo (s) C= 0,2 %p/v	Tiempo (s) C= 0,3 %p/v	Tiempo (s) C= 0,4 %p/v
14	0	0	0	0
12	32	35	39	40
10	118,5	78	83	90
8	178	128	136	151,5
6	178,5	193	205,5	211
4	262	284	301	314
2	407	433	460,5	492
1	537,5	580	621,5	667
0.5	692	738	793	847

Tabla II.10: Tiempos promedios experimentales registrados para experiencia E₅ de viscosidad intrínseca para una concentración urea 5 mM.

H(t)	Tiempo (s) C= 0,1 %p/v	Tiempo (s) C= 0,2 %p/v	Tiempo (s) C= 0,3 %p/v	Tiempo (s) C= 0,4 %p/v
14	0	0	0	0
12	32	36	40	43
10	12	78	87	95
8	118	131	143	157
6	180	200	217	233
4	266	291	318	341
2	409	448	486	524
1	556	605	660	714
0.5	700	768	838	909

Tabla II.11: Tiempos promedios experimentales registrados para experiencia E₅ de viscosidad intrínseca para una concentración urea 20 mM.

H(t)	Tiempo (s) C= 0,1 %p/v	Tiempo (s) C= 0,2 %p/v	Tiempo (s) C= 0,3 %p/v	Tiempo (s) C= 0,4 %p/v
14	0	0	0	0
12	32	35	39	41
10	71	79	86	90
8	118	131	143	149
6	179	194	216	221
4	260	284	302	331
2	406	438	474	513
1	551	597	647	697
0.5	696	765	815	883

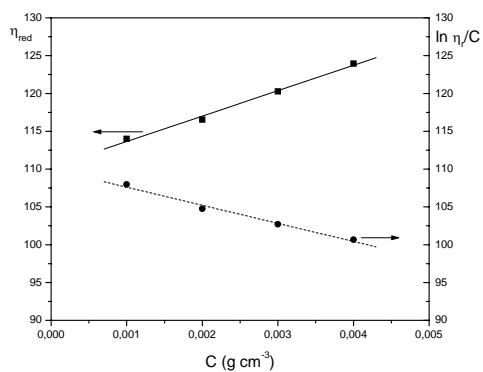
Tabla II.12: Tiempos promedios experimentales registrados para experiencia E₅ de viscosidad intrínseca para una concentración urea 50 mM.

H(t)	Tiempo (s) C= 0,1 %p/v	Tiempo (s) C= 0,2 %p/v	Tiempo (s) C= 0,3 %p/v	Tiempo (s) C= 0,4 %p/v
14	0	0	0	0
12	32	35	39	41
10	71,5	78,5	86	88,5
8	119	131	143,5	148
6	180	194	218	221
4	261	283	302	330
2	404	438	474	514,5
1	552	598	646,5	697
0.5	696	755	816	886

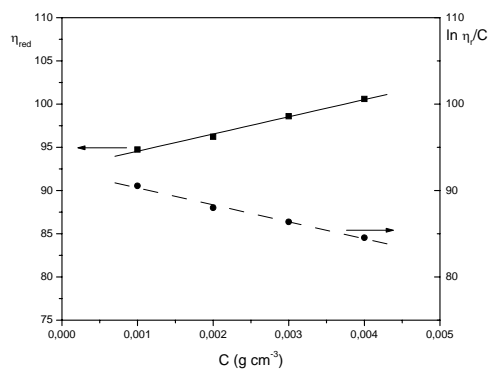
Tabla II.13: Tiempos promedios experimentales registrados para experiencia E₅ de viscosidad intrínseca para una concentración urea 500 mM.

<i>H(t)</i>	Tiempo (s) C= 0,1 %p/v	Tiempo (s) C= 0,2 %p/v	Tiempo (s) C= 0,3 %p/v	Tiempo (s) C= 0,4 %p/v
14	0	0	0	0
12	32	35	39	41
10	71	79	85	88
8	117	131	138	148
6	178,5	193	212	220
4	262	283	303	328,5
2	407	436,5	473	513,5
1	552	596	645	696
0.5	696	754	815	880

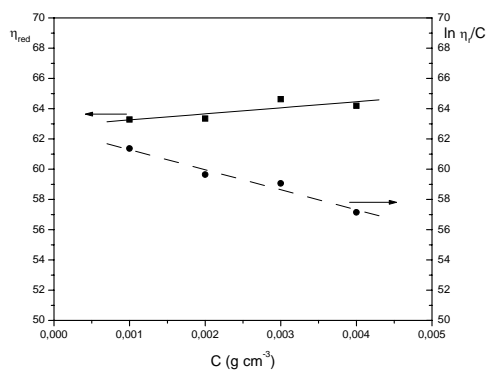
(a)



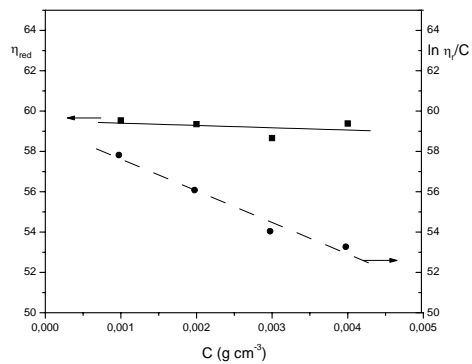
(b)



(c)



(d)



(e)

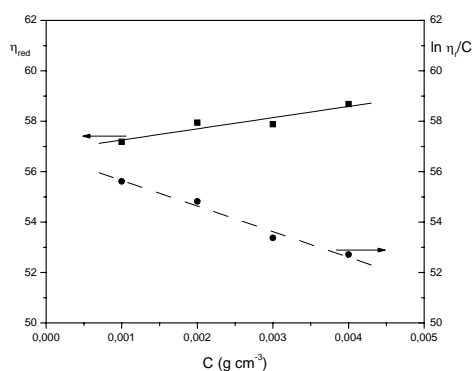


Figura II.1: Valores experimentales de η_{red} y $\ln \eta_r / C$ para la experiencia E₁ a: (a) 5 °C, (b) 15 °C, (c) 25 °C y (d) 30 °C y (e) 35 °C.

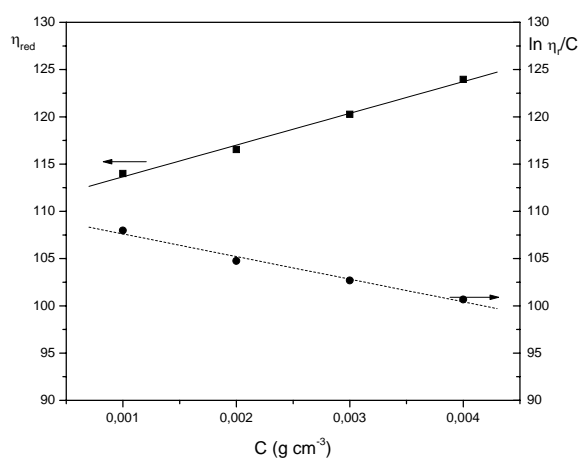


Figura II.2: Valores experimentales de η_{red} y $\ln \eta_r / C$ para la experiencia E_3

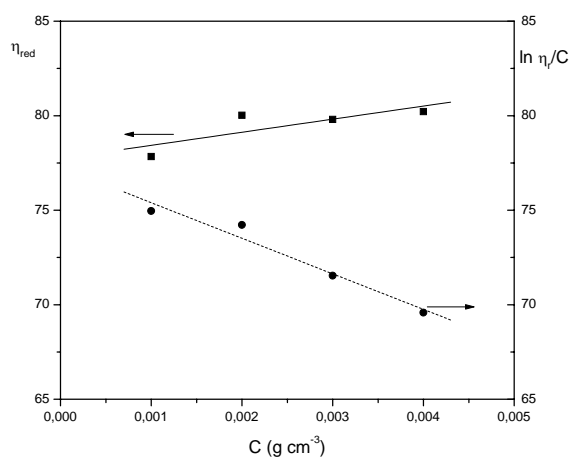


Figura II.3: Valores experimentales de η_{red} y $\ln \eta_r / C$ para la experiencia E_4

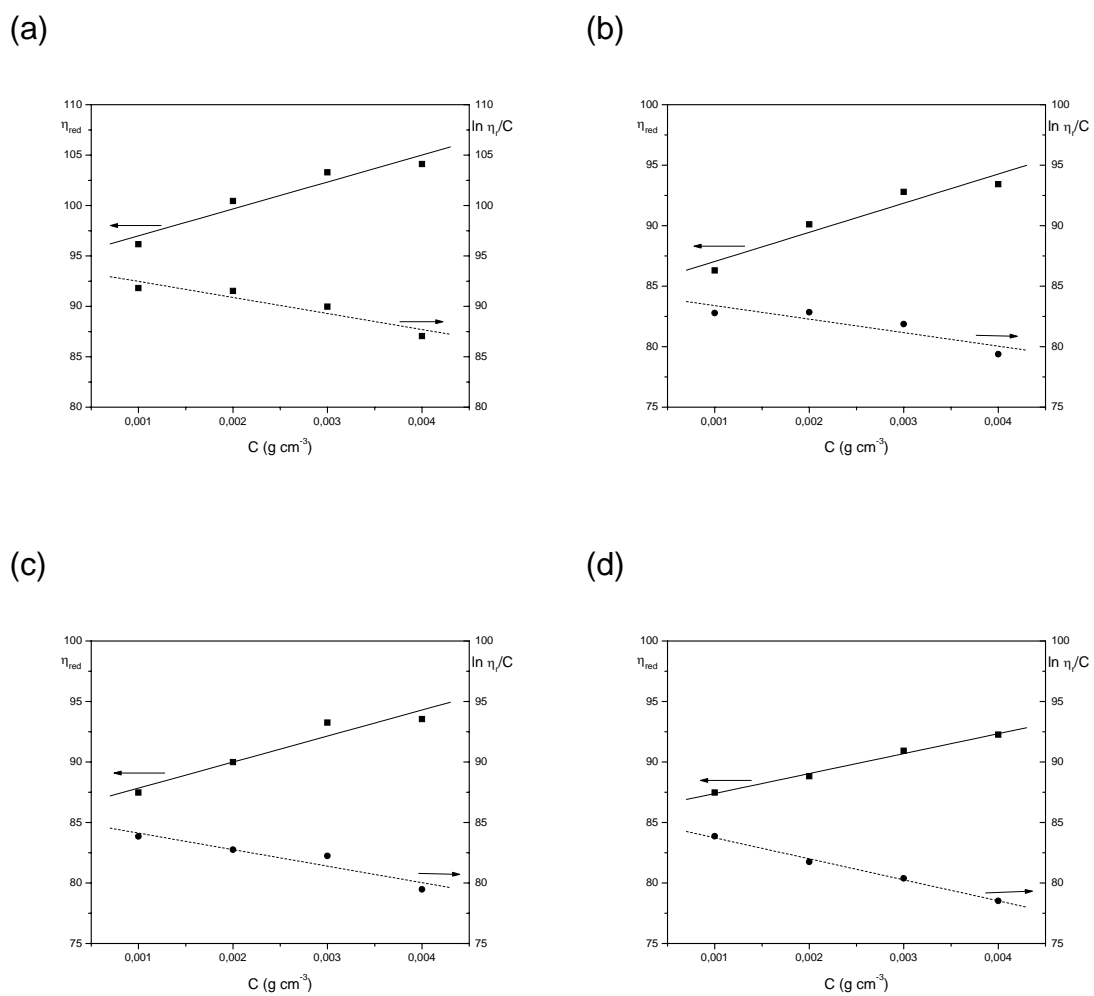


Figura II.4: Valores experimentales de η_{red} y $\ln \eta_r / C$ para la experiencia E₅ a las siguientes concentraciones de Urea: (a) 5 mM, (b) 20 mM, (c) 30 mM y (d) 500 mM.

Apéndice III: Valores de tiempos experimentales para las distintas experiencias de agregación Browniana

Tabla III.1: Tiempos experimentales promedios de una solución de gelatina de concentración 10^{-3} g/cm³ a la temperatura de maduración de 5°C.

Tiempo de maduración (h)	Tiempos experimentales de fluencia dentro del dispositivo capilar (s) en función de la altura efectiva $H(t)$								
	14	12	10	8	6	4	2	1	0.5
0	0	30	70	118	179	254	392	527	680
2	0	30	70	118	179	255	394	528	682
5	0	31	71	119	180	260	398	544	690
8	0	31	71	119	180	264	402	548	694
11	0	31	71	119	180	266	404	551	697
20	0	33	72	121	184	272	422	573	709
24	0	33	72	121	185	274	424	574	712

Tabla III.2: Tiempos experimentales promedios de una solución de gelatina de concentración 10^{-3} g/cm³ a la temperatura de maduración de 15°C.

Tiempo de maduración (h)	Tiempos experimentales de fluencia dentro del dispositivo capilar (s) en función de la altura efectiva $H(t)$								
	14	12	10	8	6	4	2	1	0.5
0	0	30	70	118	179	254	392	527	680
2	0	30	70	118	179	255	394	528	681
5	0	30	70	118	179	256	396	534	684
8	0	30	70	118	179	259	401	537	690
11	0	30	70	118	179	262	403	544	691
20	0	30	70	118	180	266	409	556	699
24	0	30	70	118	180	267	411	558	703

Tabla III.3: Tiempos experimentales promedios de una solución de gelatina de concentración 10^{-3} g/cm³ a la temperatura de maduración de 20°C.

Tiempo de maduración (h)	Tiempos experimentales de fluencia dentro del dispositivo capilar (s) en función de la altura efectiva $H(t)$								
	14	12	10	8	6	4	2	1	0.5
0	0	30	70	118	179	254	392	526	680
2	0	30	70	118	179	254	392	528	681
5	0	30	70	118	179	254	393	530	683
8	0	30	70	118	179	256	395	533	684
11	0	31	71	119	180	257	397	535	685
20	0	31	71	119	180	262	404	538	689
24	0	31	71	119	180	263	405	540	692

Tabla III.4: Tiempos experimentales promedios de una solución de gelatina de concentración 10^{-3} g/cm³ a la temperatura de maduración de 25°C.

Tiempo de maduración (h)	Tiempos experimentales de fluencia dentro del dispositivo capilar (s) en función de la altura efectiva $H(t)$								
	14	12	10	8	6	4	2	1	0.5
0	0	30	70	118	179	254	392	526	680
2	0	30	70	118	179	254	392	527	681
5	0	30	70	118	179	254	393	528	681
8	0	30	70	118	179	254	392	528	682
11	0	30	70	118	179	254	393	528	683
20	0	30	70	119	179	254	394	529	685
24	0	30	70	119	179	254	394	530	686

Apéndice IV: Valores de tiempos experimentales promedios para las distintas experiencias de viscosidad reducida en función del pH.

Tabla IV.1: tiempos experimentales promedios de ensayos de viscosimetría capilar de soluciones de gelatina al 0,2 % p/v y $I=0,006$ M.

Tiempos experimentales de fluencia dentro del dispositivo capilar (s)								
H(t)(cm)	pH 10	pH 9	pH 8	pH 7	pH 6	pH 5	pH 4	pH 3
14	0	0	0	0	0	0	0	0
12	33	33	32	32	31	32	32	33
10	73	72	71	71	70	72	72	73
8	123	121	120	120	119	120	121	123
6	184	183	181	181	180	181	182	184
4	273	268	264	264	262	264	268	273
2	421	417	411	407	402	406	414	421
1	564	562	557	549	546	549	556	564
0.5	713	709	704	700	693	697	705	713

Tabla IV.2: tiempos promedios de ensayos de viscosimetría capilar de soluciones de gelatina al 0,2 % p/v y $I=0,020$ M.

Tiempos experimentales de fluencia dentro del dispositivo capilar (s)								
H(t)(cm)	pH 10	pH 9	pH 8	pH 7	pH 6	pH 5	pH 4	pH 3
14	0	0	0	0	0	0	0	0
12	33	33	33	32	32	31	32	32
10	74	73	72	71	71	70	72	72
8	124	123	121	120	120	119	120	121
6	186	184	183	181	181	180	181	182
4	275	272	268	265	264	263	264	267
2	423	420	416	412	407	404	405	413
1	566	564	560	557	548	547	548	556
0.5	714	712	708	704	698	694	695	704

Tabla IV.3: tiempos promedios de ensayos de viscosimetría capilar de soluciones de gelatina al 0,2 % p/v y $I=0,110$ M.

Tiempos experimentales de fluencia dentro del dispositivo capilar (s)								
H(t)(cm)	pH 10	pH 9	pH 8	pH 7	pH 6	pH 5	pH 4	pH 3
14	0	0	0	0	0	0	0	0
12	33	33	32	32	32	32	32	32
10	72	72	71	71	71	71	71	71
8	122	122	121	120	120	120	120	120
6	183	182	181	180	180	180	180	181
4	273	271	267	263	263	263	264	266
2	418	417	415	407	406	405	406	409
1	564	561	559	555	552	550	551	555
0.5	709	707	705	703	699	697	699	701

Tabla IV.4: tiempos promedios de ensayos de viscosimetría capilar de soluciones de gelatina al 0,2 % p/v y I=0,300 M.

Tiempos experimentales de fluencia dentro del dispositivo capilar (s)								
H(t)(cm)	pH 10	pH 9	pH 8	pH 7	pH 6	pH 5	pH 4	pH 3
14	0	0	0	0	0	0	0	0
12	33	33	33	33	33	33	33	33
10	72	72	72	72	72	72	72	72
8	122	122	122	122	122	122	122	122
6	183	183	183	182	182	182	182	182
4	272	272	270	267	267	264	264	265
2	417	417	414	411	410	409	409	410
1	563	560	558	556	554	553	554	555
0.5	707	704	703	702	700	698	700	702

Tabla IV.5: tiempos promedios de ensayos de viscosimetría capilar de soluciones de gelatina al 0,2 % p/v y I=0,500 M.

Tiempos experimentales de fluencia dentro del dispositivo capilar (s)								
H(t)(cm)	pH 10	pH 9	pH 8	pH 7	pH 6	pH 5	pH 4	pH 3
14	0	0	0	0	0	0	0	0
12	33	33	33	33	33	33	33	33
10	72	72	72	72	72	72	72	72
8	122	122	122	122	122	122	122	122
6	183	183	183	182	182	182	182	182
4	272	272	271	268	267	266	266	266
2	417	416	415	413	411	410	410	411
1	562	561	560	558	557	556	557	558
0.5	706	705	705	704	703	702	702	703