UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

ESTABILIDAD, CONFORMACION E HIDRATACION DE PROTEINAS. ADSORCION DE AGUA EN FASE LIQUIDA Y GASEOSA

Inés Graciela Mogilner

Esta Tesis para optar al título de Doctor en Física ha sido pealizada en el Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos bajo la dirección del Prof. Dr. J. Raul Grigera.

A Lito, Martin y Anita Barbieri

)

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar ante todo mi mayor agradecimiento al Dr. J.R. Grigera,quien no solo me ha formado en el trabajo de investigacion y dirigido en mi tesis doctoral; sino que me ha brincado su apoyo, solidaridad y calor humano en los aciagos ahos en cue la discriminacion ideologica y el no compromiso imperaban en los ambitos universitarios y científicos, al igual que en el resto de la sociedad.

Quiero tambien agradecer:

Al Dr. N. Bianchi, Director del Instituto Multidisciplinario de Fiologia Celular; quien me tramito en forma personal el ingreso como becaria del C.O.N.I.C.E.T. al I.M.B.I.C.E., a pesar de que en otros ambitos se me rechazaba por motivos extra científicos.

Al Dr. A. Rodriguez, quien como Director del I.F.L.Y.S.I.B. me dio lugar de trabajo a partir de 1980; y que al igual que los Dres. A. Plastino, H. Fanchiotti y C. Alvarez, me avalo cientificamente.

- 42

Al C.O.N.I.C.E.T. por haber sido la unica Institucion que me dio un lugar de trabajo y la posibilidad de quedarme en el país.

Al Lic. D. Vera del C.I.T.E.C. y sus colaboradores por el rico intercambio de informaciones, apoyo experimental, discusiones; que nos permitio desarrollar en la practica la tan ansiada busqueda de una proyeccion social y latinoamericana de la ciencia basica aplicada.

Al Lic. E. Tolosa por su invalorable ayuda como tecnico en el trabajo experimental.

A mis companeros del Grupo de Biofisica; los cuales no solo me ayudaron a crecer cientificamente, sino que con su humanidad y calor crearon un clima afectivo imprescindible para la sobrevivencia cotidiana.

A todo el personal científico - tecnico - administrativo del I.F.L.Y.S.I.B., quienes brindaron su apoyo desde sus diferentes roles a mi actividad científica, y a los que humanamente senti siespre y solidariamente cerca.

INDICE

INTRODUCCION:Hidratacion general y especifica.Agua de estabilizan la estructura hidratacion.Fuerzas que proteica.Desestabilizacion conformacional de la proteina. Cambios PARTE -ISOTERMAS DE ADSÓRCION DE DISTINTOS BIOPOLIMEROS....61 -LAS ISOTERMAS DE ADSORCION Y LOS CAMBIOS -COMPARACION DE RESULTADUS CON LOS OFTENIDOS POR DISTINTAS TECNICAS DE DIFRACCION (RAYOS X Y DIFRACCION DE NEUTRONES LAS ISOTERMAS COMO TECNICAS COMPLEMENTARIAS DE

PARTE II MACROMOLECULAS EN SOLUCION(O SUSPENSION)-ADSORCION DE AGUA LIQUIDA.EFECTO DEL COSOLUTO

PARTE	III:	CONCLUSIONES FINALES	
PARTE	IV :	APENDICES	
PARTE	₽	BIBLIOGRAFIA	

INTRODUCCION

El rol del agua en los procesos biologicos, es un tema que ha sido investigado desde los tiempos de los antiguos griegos, han sido estos filosofos-científicos (1) los primeros en dividir la materia en "tierra,fuego y agua". Las investigaciones clasicos permitieron obtener el contenido de agua de plantas y animales por metodos de desecacion, pero recien en la primera mitad de nuestro siglo, biologos y bioquímicos fueron capaces de definir algunas de las propiedades del agua en las celulas gracias a las nuevas tecnicas químicas y fisicas puestas a punto.

El agua es el solvente primario en el cual los otros componentes celulares y los solutos difunden. En muchas reacciones bioquímicas el agua sirve como donor de ionos tidrogeno, la disociacion del agua contribuye a la regulacion del ph celular. A causa de su alta capacidad calorifica, el agua acumula energia metabolica y contribuye a la regulacion de la temperatura de los organismos. A traves de interacciones hidrofobicas e hidrofilicas el agua contribuye a la

ľ

estabilizacion de la estructura tridimensional de las macromoleculas y mas aun estabiliza construcciones celulares gigantes como la doble capa lipidica de membranas y microtubulos. Ademas el agua es lubricante de los tejidos y en combinacion con los polisacaridos puede contribuir a la formacion de films de baja friccion en la superficie. Por ultimo, los productos finales del camino metabolico son dioxido de carbono y agua. De modo que las celulas no solo usan agua, sino que tambien la sintetizan.

HIDRATACION GENERAL Y ESPECIFICA. AGUA DE HIDRATACION.

Para poder tener un correcto cuadro del estado del agua en los tejidos, debemos abordar la hidratacion de los diferentes componentes, sabiendo que aunque un detallado conocimiento de la hidratacion de las macromoleculas y pequenas estructuras, al final, contribuye a un mejor entendimiento de la hidratacion de los tejidos, no podemos concluir que el esquema final se obtenga simplemente de la adicion de las propiedades individuales.

El problema del estudio de la hidratacion de tejidos y de sus componentes no es meramente academico sino que responde a las demandas de las ciencias aplicadas: tecnologia de alimentos (secado, cryopreservacion y procesos de rehidratacion), industria

del papel, textil, industria de medicamentos y cuero, son algunos ejemplos de las multiples ramas de la produccion y de la medicina que requieren continuamente informacion sobre hidratacion.

Uno de los problemas fundamentales con los que uno se enfrenta cuando desea definir la hidratacion de proteinas -y otras macromoleculas- es que aunque la idea de hidratacion esta ciertamente relacionada con la cantidad de agua asociada con la macromolecula, la medicion de cuanta agua esta asociada a la misma requiere conocer que propiedades determinan tal asociacion.

Para una dada definicion de agua asociada, una dada tecnica experimental sera requerida para tener una medida de la cantidad de tal agua en concordancia con la definicion utilizada.

Es posible utilizar definiciones operativas, considerando al agua de hidratacion a aquella que no congela a cero grado, la cual no contribuye a la permitividad dielectrica a 1 GHz, etc. Obviamente la cantidad de agua de hidratacion sera diferente para cada definicion, dependiendo de las propiedades consideradas. Es decir que la expresion "agua ligada" no tendra ningun significado en el caso de no especificarse claramente que definicion y tecnica se han utilizado.

Cuando nos referimos a hidratacion podemos estar interesados en propiedades dinamicas, estructurales o termodinamicas y debemos dirigir nuestros esfuerzos al uso de la tecnica deseable para dar informacion de la propiedad requerida. Debemos tener en cuenta que a menudo existe una fuerte relacion entre ellas:ej= una tipica tecnica estructural como difraccion de Rayos X es seriamente afectada por el estado dinamico del agua. Las diferentes tecnicas dinamicas que dan informacion dentro de distintas escalas de tiempo son utiles para dar informacion en un mas o menos estrecho rango de la dinamica del agua.

A modo general debemos decir que cuando queremos hablar sobre agua de hidratacion, debemos indicar sobre que clase de propiedades estamos hablando o mejor dar una clara especificacion del estado dinamico, estructural y/o termodinamico del agua, en lugar de referirnos al mismo como "ligado", "estructural", u otra expresion similar. Por tanto concluimos que el estado de hidratacion solo puede ser obtenido mediante el cuidadoso uso de tecnicas diferentes que cubran los diferentes aspectos de la hidratacion. El uso de las diferentes tecnicas requiere un detallado conccimiento de las mismas -mas cuanto mas sofisticadas sean- y por otro lado, un profundo conocimiento del problema de hidratacion.

De acuerdo a BERENDSEN (2) los siguientes aspectos de la

hidratacion deben de ser considerados.

ASPECTOS TERMODINAMICOS: relacionados a entropias y entalpias de interaccion entre macromoleculas y agua, y que influencian los coeficientes de actividad de los solutos.

De acuerdo a este aspecto las definiciones de agua ligada serian:

i) El agua que esta ligada en equilibrio y a una cierta humedad relativa y temperatura; o la cantidad de agua que es retenida luego de un cierto proceso de secado.

 ii) El agua que llena la primer monocapa de adsorcion, en conexion con una cierta interpretacion teorica de la isoterma de adsorcion.

 iii) El agua que no esta disponible para la solvatacion de solutos, dependiendo del tipo de solutos.

iv
) El agua que no congela a una dada temperatura abrupta
de transicion (ej O C) - Depende de la tecnica de congelamiento.

ASPÉCTOS DINAMICOS: que involucran detalles de movimiento molecular y propiedades hídrodinamicas.

Las definiciones de agua ligada que cubren estas facetas son:

v) El agua que no contribuye a la permitividad electrica a

Ş

una cierta frecuencia.

vi) El agua que acompana a una macromolecula en los experimentos de sedimentacion, difusion, viscosidad, aumentando el tamano hidrodinamico de la macromolecula.

vii) El agua que produce una lenta velocidad de rotacion, medida con tecnicas de resonancia magnetica nuclear

viii) El agua que muestra una lenta velocidad de autodifusion.

ASPECTOS ESTRUCTURALES: relacionados con posiciones y orientaciones medias de las moléculas de agua, respecto de una a otras y a las macromoleculas.

Siendo las definiciones pertinentes:

ix) El agua que vista por medio de tecnicas de difraccion de Rayos X o neutrones ocupan una posicion molecular regular con respecto a una macromolecula en un cristal.

x) El agua que se desvia de la densidad normal del liquido, determinado por dispersion de luz o difraccion de RX en pequenos angulos de soluciones macromoleculares.

xi) El agua que (puede ser vista por tecnicas de espectroscopia infrarroja y Raman) esta unida por puentes de hidrogeno a la macromolecula.

En Ja Fig.1 vemos algunas de las distintas tecnicas

÷.





GEOMETRICO 10-11

CINETICO 10-1

CRISTALOGRAFIA DE R-X ESPECTROSCOPIA RAMAN ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DISPERSION DE NEUTRONES TERMODINAMILUS

R.N.M.

RELAJACION DIELECTRICA

E.S.R.

POLARIZACION FLUORESCENTE

RELAJACION ACUSTICA

DISPERSION DE NEUTRONES CUASI- ELASTICA

FIGURA 2 METODOS BIOFISICOS PARA DETECTAR AGUA

biofisicas que se aplican al estudio de los sistemas vivos, en relacion con el tiempo en el cual las propiedades fisicas del agua pueden ser medidas.

Un numero critico de esta escala de tiempos es \sum_{n}^{5} hielo a 10⁻⁵ s. Siendo \sum_{n}^{5} hielo el tiempo de correlacion difuncional o el tiempo entre "saltos" posicionales de las moleculas de agua en el sistema. En el caso del hielo \sum_{p} es lento, aproximadamente 10⁻⁵ s, mientras en el caso del agua liquida pura \sum_{p} es aproximadamente 10⁻¹⁴ s (o un millon de veces mas rapido). Muchas de las propiedades fisicas del agua pueden teoricamente relacionarse con \sum_{p} , y a menudo las ecuaciones provenientes de tecnicas biofisicas incluyen a menudo este parametro. De modo que la utilidad de una tecnica biofisica para dar informacion sobre el estado del agua depende de cuan rapido pueda realizarse.

Metodos como el de espectroscopia infrarroja o Raman y dispersion inelastica de neutrones suministra informacion sobre factores intrameleculares tales como longitud de ligaduras H-O y angulos de ligaduras de hidrogeno (factor geometrico). En el caso de tecnicas que requieren tiempos mayores de medicion que el requerido para obtener 2_D , dan un promedio sobre toda la poblacion de moleculas, con una contribucion cinetica a la difusion. En general estas tecnicas arrojan informacion sobre interacciones entre moleculas de agua y entre moleculas de agua y

su entorno (Factores cineticos). Ambos casos estan ilustrados en la Fig.2.

La confusion sobre el estado fisico del agua en sistemas biologicos es en muchos casos el resultado de una erronea separacion y/o extrapolacion de la informacion suministrada por las diversas tecnicas biofisicas aplicadas a un mismo sistema.

HIDRATACION ESPECIFICA Y GENERAL

En el caso de pequenos solutos es posible considerar diferentes esferas de hidratacion,siendo las propiedades de las moleculas de agua pertenecientes a una misma esfera muy similares (Apendice II). Aun para pequenos solutos este cuadro és una simplificacion, pero en el caso de las macromoleculas esta aproximacion es insostenible. La superficie macromolecular es suficientemente grande -respecto al diametro de la molecula de agua- para tener irregularidades de considerable importancia. Estas irregularidades significan diferentes posibilidades para la interaccion agua-macromoleculas.

Esto implica abandonar la idea de esferas de hidratacion

uniformes y utilizar un mejor criterio para caracterizar el estado de hidratacion.

Usaremos el concepto de "hidratacion especifica" para referirnos a las moleculas de agua fijadas a sitios bien definidos en la macromolecula y el de "hidratacion general" al agua que -aunque fuertemente relacionada a la macromolecula- no posee sitios especificos de ligadura, estando en la superficie o sobre otras moleculas de agua formando multicapas.

Una de las formas de determinar la hidrátacion especifica es por medio de tecnicas de difraccion (Rayos X - difraccion de neutrones), pero no es posible obtener un cuadro completo usando solo estas tecnicas.

Moleculas con un tiempo de residencia muy pequeno que pueden ser consideradas pertenecientes a la hidratacion especifica no pueden ser detectadas por difraccion de Rayos X. En casos favorables, resultados extremadamente buenos han sido obtenidos dando claramente la posicion de las diferentes moleculas de agua entre los cristales macromoleculares (particularmente en el caso de proteinas).

Mas alla de las dificultades halladas cuando moleculas de agua tienen una considerable movilidad, ya desde los primeros trabajos en cristalografia de proteinas, las imagenes de

difraccion se usaban para indicar no solo las ya mencionadas moleculas de agua fijas, sino tambien para dar indicaciones de las regiones donde preferentemente se une el agua y aun de la cantidad de la misma. Esta informacion es invalorable para la interpretacion de resultados obtenidos por resonancia magnetica nuclear (n.m.r.), relajacion dielectrica, etc. Es interesante destacar que tecnicas tan diferentes y aparentemente no relacionadas como n.m.r. e isotermas de adsorcion puedan ser altamente complementarias.

FUERZAS QUE ESTABILIZAN LA ESTRUCTURA PROTEICA

Las proteinas son polimeros naturales con peso molecular en el rango de 5000 a varios millones: Son formas policondensadas de aminoacidos, con formula general (-NHCHRCO-)n , donde R puede ser cualquiera de los 22 aminoacidos (estamos hablando de la estructura primaria).

Hay que tener en cuentá, que salvo muy pocos casos (colageno, keratina) el estado nativo corresponde a la macromolecula en solucion. Entendiendose como estado nativo aquel en el cual la proteina desarrolla su actividad biologica normal.

10

مذد

Es decir que en los niveles organizativos estructurales (estructura secundaria, terciaria, cuaternaria, de acuerdo con la nomenclatura anterior; o su equivalencia:secundaria, supersecundaria, dominios, proteina globular o fibrilar, agregados) no podemos separar a la misma del medio. De modo que debemos considerar la interaccion Proteina-Solvente y el estado

Las fuerzas que estabilizan la estructura proteica son predominantemente de naturaleza no-covalente. Las principales son:

- 1) Ligaduras de hidrogeno.
- 2) Interacciones electricas.
- 3) Interaccion hidrofobica.

Para las ligaduras de hidrogeno, el equilibrio a considerar es aquel entre ligaduras de hidrogeno internas entre grupos dentro de la molecula de proteina y ligaduras de hidrogeno entre esos grupos y las moleculas de agua. La diferencia de energia entre ambos estados finales es pequena, y se estima en general que la contribución neta de los puentes de hidrogeno a la estabilización proteica no es grande (63).

Las contribuciones electricas pueden ser de dos especies: 1) Interacción carga-carga entre grupos ionizables de los residuos

de aminoacidos. 2) Interacciones dipolares internas entre grupos peptidicos, en particular, en secciones ordenadas de una molecula de proteina (alfa-helice).

Las proteinas se encuentran normalmente en un medio de alta fuerza ionica, del orden de $\Gamma/2 \approx 0.15$, y las cadenas laterales cargadas yacen en la superficie de la molecula, expuestas al solvente. Cualquier interaccion entre cargas en la superficie esta amenudo apantallada, contribuyendo a una pequena estabilizacion. Por otra parte, la adquisicion por parte de la proteina de carga neta no nula (positiva o negativa) produce una repulsion entre los grupos, y por ende una neta desestabilizacion (64).

El tercer tipo de contribucion no-covalente a la estabilidad estructural de la proteina es el producido por la interaccion hidrofobica Este efecto da cuenta de la interaccion desfavorable entre moleculas de agua y residuos no polares de la proteina (65).

Cuando una molecula de hidrocarbono es introducida en agua, induce cambios en la estructura del agua, frecuentemente la entropia decrece. Para minimizar este desfavorable cambio entropico, las moleculas no-polares estan forzadas a juntarse, en gotas o globulos, reduciendo asi la superficie de contacto con el

agua. En el caso particular de una proteina, las cadenas laterales de aminoacidos, las cuales estan unidas por la cadena peptidica, cubren un amplio rango de polaridad, desde altamente polares (como los grupos carboxilicos de los acidos aspartico o glutamico) a altamente no polares como el anillo bencenico de la fenil alanina.

El contacto de los residuos no polares con el agua baja la entropia del sistema. Como resultado, las cadenas de la proteina estan forzadas a plegarse en una estructura micelar con la mitad de los grupos hidrocarbonados hacia el interior del globulo y los grupos polares hacia afuera (estamos, obviamente, ejemplificando el caso de proteinas globulares).Mediciones de la energia libre de transferencia de aminoacidos entre agua y solventes organicos, amen de consideraciones teoricas muestran que el remover residuos no-polares del contacto con el agua produce una mayor contribucion a la energia libre de la estabilizacion conformacional (63,65).

DESESTABILIZACION CONFORMACIONAL DE LA PROTEINA

El agregado de diversas sustancias a una solucion acuosa de

proteina produce, la mayoria de las veces, la desnaturalizacion de la misma. El producto final puede adoptar en general dos formas diferentes: 1) Puede adoptar la forma de cadena no plegada, similar a la forma al azar de los polimeros sinteticos (estamos ejemplificando en proteinas globulares). Tal desnaturalizacion se debe a urea y a sales de guanidina, a detergentes, a cambios en el ph del medio, etc, etc.

2) Puede adoptar una forma estructurada,con orden de largo alcance(ej: alfa helice).Tal desnaturalizacion ocurre con el agregado de muchos solventes organicos como acetona y alcoholes (66).

Se acepta en general que la estabilidad conformacional de una molecula de proteina nativa en una solucion acuosa es el resultado en primera instancia de la presion que ejerce el agua sobre los residuos no polares, forzando los mismos hacia el interior, de la molecula. Reciprocamente, la ruptura de la estructura nativa por los agentes desnaturalizantes esta intimamente relacionada a las interacciones con los componentes estructurales de la proteina (67),(68).

No existe en general acuerdo, sin embargo,de cual de los dos efectos (el de los desnaturalizantes en la estructura en el seno del agua o el de la interaccion de los mismos con los elementos estructurales de la proteina) juega el rol preponderante.

En un sistema en equilibrio, la interaccion entre sus diferentes componentes debe estar relacionada, a traves de los requerimientos de la ec. de Gibbs-Duhem. De modo que en el proceso de desnaturalizacion de una proteina uno debe esperar cambios simultaneos en la estructura del agua, en la conformacion de la proteina, y en la interaccion entre los componentes del solvente y las partes de la molecula de proteina.

CAMBIOS CONFORMACIONALES

La conformacion adoptada por una macromolecula (proteina o polipeptido) en un medio acuoso es el equilibrio resultante de los efectos competitivos del solvente, de las unidades peptidicas componentes de la cadena macromolecular y de la secuencia de las unidades en la misma. El numero de conformaciones que una proteina conteniendo centenares de unidades peptidicas puede adoptar es altisimo, sin embargo es posible dividirlos (con criterio amplio) en dos grupos principales: 1) Contiene las conformaciones en las cuales predomina la interaccion entre unidades peptidicas sobre la interaccion del solvente sobre las unidades peptidicas, para la mayoria de las unidades. 2) Contiene

las conformaciones para las cuales es predominante la interaccion union peptidica-solvente.

Actualmente se acepta que la primera clase corresponde a las conformaciones nativas helicoidales de las macromoleculas; en tanto la segunda clase da cuenta de las configuraciones al azar (random -coil), es decir desnaturalizadas.

Una division en dos estados es obviamente una simplificacion de una situacion compleja, pero es una herramienta util para pensar a las macromoleculas estando predominantemente en la configuracion nativa (helicoidal) o predominantemente en la configuracion desnaturalizada (random-coil) (69).

El equilibrio entre ambos estados forma parte de la base de la aproximacion de la teoria de los "dos estados" propuesta por Brands (69) en la cual un numero no especifico de diferentes conformaciones son posibles, cada una caracterizada por un valor particular de un parametro experimental observable \bullet el cual es utilizado para examinar el sistema. En general observamos valores promedios de los diferentes parametros (\bullet), los cuales varian con la temperatura, presion y composicion del solvente desde que la probabilidad de cada estado conformacional depende de la naturaleza del solvente.

El estudio de la participacion del agua en la estructura de proteinas, puede encararse mediante diferentes tecnicas. En el presente trabajo se considera las características de la hidratacion y su influencia en la estabilidad, desde el punto de vista del estudio de las isotermas de adsorcion.

Los estudios de las isotermas de adsorcion se desarrollaron inicialmente desde el punto de vista fisicoquímico (Langmuir 1918) y luego fueron aplicados a sistemas biologicos (1944).

Pese a que esta ultima aplicacion se inicia hace mas de cuarenta y cinco anos, muchos aspectos no han sido considerados adecuadamente. Por una parte el propio analisis de las isotermas se lleva a cabo generalmente mediante el uso de conceptos cineticos -tal como fuera planteado por Langmuir- lo que resulta irrelevante para un proceso de equilibrio. Este enfoque, ademas de la cuestion conceptual, no permite un adecuado analisis del proceso y, consecuentemente, disminuye el aprovechamiento de la tecnica.

Por otra parte la aplicacion a los sistemas biologicos, no siempre ha contemplado en la literatura la labilidad de los mismos y las posibles alteraciones debido a la metodologia de aplicacion de la tecnica experimental.

Asimismo el estudio de las isotermas gas-solido y liquidosolido; así como la presenci∘a de co-solutos y su efecto en proteinas mediante un tratamiento unificado y coherente no se ha informado en la literatura.

Consideramos en primer lugar la adsorcion de vapor de agua tanto desde el punto de vista teorico general, como experimentalmente para distintos biopolimeros y algunas aplicaciones. A continuacion consideramos la situacion de sistemas en solucion y suspension, y la posible formulacion de un modelo que establezca la vinculacion entre las isotermas en fase gaseosa y en fase liquida. Los aspectos experimentales de la isoterma en fase liquida, considerando la presencia de cosolutos, se abordan utilizando diferentes tecnicas experimentales.

Como aplicacion se utiliza un sistema de importancia, tanto por su relevancia conceptual como por su posible relevancia tecnologica: el sistema colageno - detergente.

"Finaímente se plantean las conclusiones generales del trabajo.

PARTE I ADSORCION DE VAPOR DE AGUA

Existe una dependencia entre la cantidad de agua tomada por una sustancia y la presion de vapor de la atmosfera a la cual esta expuesta. La relacion entre contenido de agua y presion de vapor a una cierta temperatura define la isoterma de sorcion de dicha sustancia.

El termino SORCION incluye dos procesos diferentes:

i) ADSORCION en el cual el agua es tomada por la superficie
del solido; y

ii) ABSORCION en el cual el agua penetra en el solido. No siempre es facil distinguir entre ambos procesos.

En el caso de polvo de proteina la cantidad de agua tomada a una cierta presion de vapor, no depende del tamano de la particula (5), este hecho indica que el agua no es tomada por la superficie, sino que penetra dentro de las particulas, definiendo por tanto el proceso como de absorcion, en cambio la toma de vapores de gases inertes como N por polvo de proteina depende del grado de pulverizacion, estamos ante un fenomeno de adsorcion.

Por otro lado, las moleculas de proteinas son suficientemente grandes como para considerar que las moleculas de agua son adsorbidas por las mismas en superficie.

No existe acuerdo al respecto, y en la literatura especializada se puede encontrar que se utiliza indistintamente los terminos de "ab" y "adsorcion". Como las teorias de sorcion pueden ser desarrolladas en bastante extension sin hacer ninguna diferencia entre adsorcion y absorcion, esta anarquia en la designacion del fenomeno puede ser subsanada sin cometer serios errores.

DIFERENTES ISOTERMAS DE ADSORCION

Las isotermas experimentales han sido clasificadas por Brunauer (6) en 1945 en cinco tipos distintos mostrados en la Fig.3.

Sorcion de agua por proteinas, acidos nucleicos y complejos sistemas biologicos, incluyendo a alimentos parcialmente disecados corresponden al tipo II.

FIGURA 3



CLASIFICACION DE LAS ISOTERMAS DE ADSORCION SEGUN BRUNAUER

ł

Como lo demostramos mas adelante las isotermas de tipo I y II pueden ser consideradas juntas, considerando sus diferencias solo en forma cuantitativa.

A pesar del gran numero de trabajos que existen al respecto, no existe un tipo de isoterma universalmente aceptado.

En el camino de investigar en busca de la "mejor" formula, mas de 75 isotermas han sido propuestas (7), pero la mayoria de ellas son, por lo menos formalmente, equivalentes (8).

La Tabla 1, muestra una lista de algunas de ellas. Los estudios de sorcion han mido hechom a partir de aproximacionem tecnologicam o conocimientom basicom, existiendo una superposicion de resultadom y una duplicácion de empiricam. La mayoria de las isotermam de origen tecnologico mon empiricam.

A comienzos de 1918, L'angmuir (9) considero el fenomeno de adsorcion como un proceso cinetico.

Aunque Langmuir es conocido principalmente por la llamada "isoterma de monocapa de Langmuir" (Tipo I), en el trabajo mencionado sienta las bases para las otras isotermas. La isoterma de Langmuir tipo IV corresponde a la de tipo II ("multicapas") de

Brunauer, Emmett y Teller (10), actualmente conocida como isotermas de B.E.T. Pero en ambos casos existe una interpretacion erronea del fenomeno ya que los autores utilizan argumentos cineticos para describir un problema de equilibrio como es el de sorcion.

TRATAMIENTO MECANICO ESTADISTICO

Tratamiento de Guggenheim:

Como estamos interesados en conocer como algunas moleculas son ligadas a la superficie a un acierta temperatura y a una cierta presion de vapor, el conjunto macrocanonico es el adecuado para tratar a este sistema.

El numero de moleculas fijadas, esta dado por la siguiente expresion:

$$n = \lambda \partial \ln \left[\partial \lambda \right]$$

donde λ = actividad absoluta, vinculada al potencial quimico por la siguiente expresion:

$$\lambda = \exp(\mu / RT)$$
 (2)

į.

1. LANGMUIR(1918)	li/\u = C a / 1 + C a m	sltios de adsorción,idénticos,irdependientes y homogéneos.
Z. MC' GAVACK & PATRICK (1920)	ш = б ^{үү} г к (а)//л ы	ecuación de Freundlich adaptada
	🖒 = tersión superficial	
	de la fase sorbida	
3. FREUNDLICH (1926)		
APPEL (1973)	⊎ = C a ^{1/n} n > 1	scrción heterogénea, sitios diferentes
	× 3	e independientes, n≻1.
4. CESARROLLO VIRIAL	ы/ы жта + к (ка 3 +к (к к 1 = 2 = 2 = 3	а ³ ж 1 е
5. HILL & DE BOER		
(DE BOER, 1953)	884 (1/11) / (1-(11/11)) 11 2 8	פעים ((ש/ש)/ (1- (ש/ש)). m
	. exp (-K (W/W)) m 1	condensación bidimensional de Van der
	:	Weals
6. TOTH (1971)	w / w ≠ a / (A + a ^m) ^{1/m} m w w	
	₩ V E V 0	hetereogénea, parcialmente empírica

TABLA 1 . MODELOS DE SORCION EN MONOCAPA LOCALIZADA

5	Brunauer & al (1	38) W/W = C	a /(1-a) (1+(C -1)a) M M R 3	sitios de sorción idénticos e in
		Ì	1 1 1	dependientes ; infinitas capas
	(CHEL) JICCHU			sorbidas.
ъ.	BRUNAUER & AL.			
	(1940) III	Ш=Св (1-(n+1)а ^п т В ш и	+ n a ⁿ t) w	
		/ (1-a) (1+(C "		idem con número de capas restrin
				gidas (n).
ወ	. PICKETT (1945)			
	ANDERSON (1946)	W/w =Ca (1-a ⁿ)/(1- s)(1+(C-1) s)	
	ROUNSLEY (1961)	3	ti ti	capas construidas en forma ordena
				Ca
9	. ANDERSON (1946			
	GUGGENHEIM (1961) M/ C K a/	(1-Ka) (1+(L -1)Ka)	idem con correctiones por multice
	DENT (1977)			- sed

٩.

TABLA 1. SORCION HOMOGEREA (B.E.T. Y MODIFICACIONES RELACIONADAS)

siendo 🕻 la gran funcion de particion.

La clave para solucionar el problema es el poder computar la gran funcion de particion. Podemos obviar esta dificultad realizando las siguientes suposiciones: Primero consideramos N sitios primarios de adsorcion que pueden ser llenados independientemente. Si sobre cada uno de estos sitios pueden acomodarse no una sino varias moleculas, la gran funcion de particion puede ser escrita como:

donde q (i=1,2,3,...) es la funcion de particion de una i

particula sorbida en el sitio "i"; definida como:

de cualquier estado posible de la molecula.

Nos encontramos nuevamente con una dificultad, la de darle a

q una expresion con la que se pueda trabajar. Podemos salvar i

esta dificultad, si analizamos una nueva suposicion que todas las moleculas, excepto la primera de cada sitio, tienen la misma funcion de particion, proporcional a la lera de cada sitio, es decir:

De manera que:

con lo cual obtenemos finalmente la expresion;

$$n = Nc \lambda q / ((1 + (c - 1) \lambda q) (1 - \lambda q)) \quad (5)$$

Puesto que el adsorbato esta en equilibrio con el gas (agua en nuestro caso) el valor de λ es igual al del gas, y ademas proporcional a la presion p, mientras que q es independiente de p, podemos escribir:

donde p* (al ìgual que c) es caracteristico de la superficie, del gas y de la temperatura,pero independiente de la presion.

La isoterma puede ser escrita como:

0

$$n = \{N c(p/p*)\}/\{ [1 + (c - 1) p/p*][1-p/p*]\} (7)$$

Siendo esta isoterma exactamente igual a la isoterma de B.E.T. cuando p*=p , que es la suposicion de los autores. Esta

suposicion implica que las moleculas de la "multicapa" son termodinamicamente equivalentes a la del liquido, no habiendo sin embargo razones valederas para establecer esto a priori.

Para satisfacer esta condicion el espaciado de los sítios de sorcion deberian coincidir exactamente con el espaciado del liquido (11). En general p* es diferente (y mayor) que p o

Un problema de relevante importancia es el del significado de los parametros que aparecen en la isoterma. No existe ningun problema con N = al numero de sitios primarios de sorcion (expresados en las unidades correctas), pero en lo que respecta a "c" y p* la situacion debe ser estudiada cuidadosamente

Primero definamos el potencial quimico "standard" para el sitio i-esimo como:

$$\int_{i}^{e} = -RT \ln q \qquad (8)$$

donde standard se refiere a total ocupacion del sitio iesimo. Usaremos siempre como referencia el estado líquido.

Aceptando esta definicion podemos escribir:

· Ş.
o

$$\mu = \mu + RT \ln (p*/p)$$
Multicapa L o (9)
$$\mu = \mu - RT \ln (cp / p*)$$

de modo que:

$$p* = p e \times p [(\mu^{\bullet} - \mu) / RT]$$

$$p = Multicapa L (10)$$

Podemos observar que aqui p* es una medida de las propiedades termodinamicas del promedio de las moleculas en las multicapas,en tanto que "c" lo es de la monocapa.

Es interesante notar que con la suposicion de B.E.T. *

$$c = e \times p \left[- \left(\mu - \mu \right) / RT \right]$$

B.E.T. 1 L (11)

-1

Existe una relacion simple entre los parametros de Guggenheim y los de B.E.T.:

para (p*/p) entre 1 y 2 y c del orden de 10 es o

siendo valido para comuy pequeno.

SUPERIORIDAD DEL AJUSTE DE LOS DATOS EXPERIMENTALES MEDIANTE EL USO DE LA ISOTERMA DE GUGGENHEIM

En nuestro laboratorio -orientado al estudio del agua en sistemas biologicos- hemos encarado el analisis de las isotermas de adsorcion con el objetivo de aplicarlo al estudio de la interaccion agua-proteina. Entre el gran numero de isotermas existentes (cuya existencia se justifica en que ajustan un limitado numero de datos experimentales); suponíamos que para nuestro proposito la que mejor permitia interpretar los resultados experimentales desde el punto de vista termodinamico e:a la isoterma de Guggenheim. Por eso nos planteamos explorar la aplicabilidad de la mencionada isoterma a curvas experimentales de diferentes formas.

De acuerdo a un trabajo publicado a tal_rfin por nosotros (12) vemos que la isoterma de Guggenheim ajusta aceptablemente

distintas formas de curvas experimentales I, II y III y no sclamente las clasicas curvas sigmoideas presentes en la acsorcion en multicapas en el caso de proteinas y sistemas biologicos mas complejos (pertenecientes al tipo II).

RESULTADOS Y DISCUSION

La Figura 4 (curva a) muestra los datos experimentales (13) de agua adsorbida por silica gel a 25 C junto con el ajuste por minimos cuadrados de la isoterma de Guggenheim con N = 117 g agua/100 g F.S. ;c = 300 y p* = 200 p

O

Mukesh y col.(13) ajustaron sus puntos experimentales con las isotermas de B.E.T. y de Langmuir (9),infructuosamente; y lograron un ajuste de sus resultados mediante una doble isoterma de Langmuir. Hay que tener en cuenta que una doble isoterma de Langmuir implica cinco parametros ajustables, en lugar de los tres por nosotros usados.

*

Ademas del hecho de solo usar tres parametros ajustables, hay que resaltar el hecho que los mismos estan vinculados a

30

Ĵ.





ISOTERMAS DE ADSORCION:

Curva a adsorcion de agua por sílica gel Curva b adsorción de nitrógeno en Fe-Al O catalítico 2 3 Curva c agua adsorbida en poliestireno sulfonado lineal a 25 º C

En todos los casos las curvas corresponden a las isotermas de Guggenheim. Los parámetros para cada caso están dados en el texto. propiedades termodinamicas de los sitios de adsorcion.

El valor numerico dellos parametros, en el caso presente, indican que las moleculas ligadas a los sitios primarios tienen un potencial químico de 0.24 kcal./ mol "por debajo" del estado liquido, mientras que las moleculas ligadas a sitios secundarios (multicapas) tienen Δ_{μ} = 3.14 kcal/mol, es decir por encima del estado liquido. Esta situacion es la responsable del tipo cuasimonocapa de la isoterma; las moleculas de agua de la multicapa estan cercanas a las del liquido, dando curvas del tipo II.

Otro ejemplo del mismo tipo de isoterma corresponde a la referencia (10). En dicho trabajo los resultados experimentales (adsorcion de nitrogeno en Fe - Al O catalitico a - 183 C)fueron

23

hechos por los autores con una isoterma B.E.T. modificada (con tres parametros). Como muestra la Fig. 4 curva b, nosotros hicimos el ajuste con la isoterma de Guggenheim con N = 125 cm; c = 225; p* = 2984,64 mm Hg.

La curva c de la Fig. 4 muestra adsorcion de agua en resinas de intercambio ionico "polyestyrene sulfonada" lineal a 25 C y en presencia de H L'os puntos experimentales corresponden a la referencia (14), mientras que el ajuste es nuestro, mediante la formula de Guggenheim con N = 1.3 mol.agua/equiv. adsorbato;

31

*

c=8.37; p* = 1.03 p

0

En este caso nos encontramos con una isoterma del tipo III, y vemos que Guggenheim da un correcto ajuste.

En todos los casos hemos mantenido las unidades utilizadas en los trabajos de los cuales se han extraido los resultados experimentales, con el fin de simplificar las comparaciones.

Como conclusion podemos remarcar que la isoterma de Guggenheim puede ser aplicada a diferentes situaciones experimentales. En momentos en que las facilidades de computacion necesarias para el ajuste de las mismas esta aí alcance de cualquier laboratorio de Biofisica, no se justifica -como es habitual- continuar utilizando la isoterma de B.E.T. (que puede ser linealizada); teniendo en cuenta que la isoterma de Guggenheim provee una expresion convergente para la energia libre de adsorcion y no esta restringida a un angosto intervalo de presiones de vapor (como es el caso de B.E.T.).

Recientemente Timmermann (112) desarrollo una isoterma de tres etapas que describe aun mejor el comportamiento experimental. No consideramos aqui esta isoterma.

DEPENDENCIA DE LA ISOTERMA CON LA TEMPERATURA

La deduccion de la isoterma de Guggenheim se efectua en el conjunto macrocanonico, en cuyo formalismo el potencial quimico es una variable independiente.

La ecuacion (14) expresa el numero de moleculas adsorbidas en funcion de la presion de vapor a una temperatura fija T:

$$n = N c (p / p*) / \{[1 - (p / p*)] [1 + (c - 1)(p / p*)]\} (14)$$

Definiendo el potencial químico estandard (referido a total ocupacion de sitios) como

y los incrementos en el potencial químico como

33

Obtenenmos

$$\Delta \mu = -RT \ln (cp / p*) (.17),$$
m
$$\sigma$$

$$\Delta \mu = RT \ln (p* / p) (.18),$$
M
$$\sigma$$

Donde el subindice "m" esta vinculado a los sitios primarios ("monocapas") y "M" a sitios secundarios ("Multicapas").

Las ecuaciones anteriores se pueden homologar a la variacion de energia libre por mol, de modo que los parametros "c" y "p*" que aparecen en la ec. (14) estan vinculados con los incrementos de entalpia y entropia por mol a traves de:

$$p * = p exp (\Delta \mu / RT)$$
 (19)
o M

 $c = (p*/p) exp(-b \mu / RT) (20)$

 $con \delta \mu = \delta h - T \delta s$ (21)

ŧ.

Aqui evidenciamos que, aun admitiendo la igualdad entre las propiedades entre las moleculas de las multicapas y el liquido, "c" no esta relacionado directamente con la energia de adsorcion, como lo plantean Brunauer, Emmett y Teller (10); sino con el potencial químico de las moleculas fijas a sitios primarios.

APLICACION A LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES

Conociendo los valores experimentales de la cantidad de vapor de agua adsorbida por una proteina a dos temperaturas distintas, se pueden ajustar los mismos mediante la ec. (14) y obtener c, p* y N para ambas temperaturas. En posesion de estos parametros, con la suposicion que los incrementos de entalpia y entropia se mantienen constantes es posible, con el auxilio de las ecs (17) y (18), obtener:

$$\Delta = = \Delta \left(\Delta \mu \right) / \left(T - T \right) \left(22 \right)$$

35

£

·1.

$$\begin{array}{cccc} con & \Delta(\Delta \mu) = \Delta \mu & - \Delta \mu \\ m & m, T & m, T \\ 1 & 2 & 1 \end{array}$$

$$A = A (\Delta \mu) / (T - T) (23)$$

$$M M 1 2$$

$$con A (\Delta \mu) = \Delta \mu - \Delta \mu$$

$$M M, T M, T$$

$$2 1$$

y mediante las expresiones de energia libre por mol y las ecs. (22) y (23) se puede obtener Δ h y Δ h Una vez en posesion de m M

estos valores y utilizando las apropiadas relaciones es posible obtener las isotermas a las temperaturas deseadas. El rango de validez de este tratamiento depende del rango en que 🖉 s y 🖉 h pueden ser consideradas constantes.

ANALISIS DE LOS DATOS EXPERIMENTALES DE LISOZIMA

Los datos experimentales obtenidos por Hnojewyj y col(15) a T = 300 K y T = 310 K se ajustaron con la ec. (14) por minimos cuadrados, estimandose a partir de los parametros obtenidos los

incrementos de entalpia y entropia. Con estos se evaluaron las isotermas a T = 290 K y T = 320 K. Los valores de N obtenidos para 300 y 310 K no resultaron estrictamente iguales (Ver tabla 2).

2

Las diferencias pueden atribuirse a errores experimentales, sin embargo el ajuste para 290 y 320 fue mejor utilizando N=7g.agua/100 g p.s. y N=6g.agua/100 g p.s. que si se toma un **320**

promedio entre los valores obtenidos del ajuste a las otras temperaturas. Si bien la diferencia no es muy grande si se tienen cuenta las dificultades experimentales se observa យាត en tendencia decreciente de N con la temperatura. Resulta dificil establecer si se trata de errores experimentales o si se esta frente a una variacion en el numero de sitios primarios debido a cambios conformacionales en la proteina. La verificacion de esta suposicion podria, eventualmente, hacerse mediante el analisis de algun sistema mas estable con la temperatura. De cualquier manera e} metodo de prediccion de la isoterma a diferentes temperaturas pareciera ser aceptable para proteinas siempre que el rango de temperaturas estudiado no sea excesivamente amplio. En la Tabla 2 se muestran los parametros de las isotermas así como los termodinamicos á cuatro temperaturas, y en la Fig.5 las curvas obtenidas junto a los valores experimentales.

%, .



Isotermas de adsorción de vapor de agua por lisozima.Los puntos corresponden a los datos experimentales de referencia (15).Las líneas de las isotermas a 300 y 310 K corresponden al ajuste según la ecuación 14. Las correspondientes a 290 y 320 K se obtienen utilizando la dependencia con la temperatura de acuerdo a las relaciones propuestas en este.trabajo .

ı

PARAMETROS DE LA ISOTERMA DE GUGGENHEIM Y TERMODINAMICOS PARA LISOZIMA A DIFERENTES TEMPERATURAS. B) AJUSTADOS 6) CALCULADOS

TEMPI	ЕКАТИКА / К	IJ	• ם	(.e.d 600°/.ee 9) N	۳ ۳	[₩] ~/p
					cal/mol	cal/mol
с d	290	52.96	1.47	. 6	-2068.52	224.17
a	300	30.59	1.32	7.33	-1876.40	165.75
	310	18.25	1.19	5.94	-1684.27	107.31
с д	320	11.25	1.08	IJ	- 14 92 . 14	48.88
A	в = -19.213 cal/ m	K moli Ås	=5,843 ca	1/K mol; d h = - 7640.2 m	98 cal/mol	

۱

h_H =1918.642 cal/mot

• - ----

CALOR ISOSTERICO

Con el objeto de vincular las expresiones para calores o entalpias isostericas que aparecen en bibliografia (16),(17) y (18) con las respectivas entalpias de mono y multicapas, utilizadas en el tratamiento anteriormente descripto, y considerando segun Steele (17) para el calor isosterico:

2

y usando las siguientes expresiones para las isotermas:

$$n = N c \times / \{(1 - x) [1 + (c - 1) \times]\}$$
(25)
B B B B B

con B = B.E.T, y x = p/p

0

Y

obtuvimos las siguientes relaciones para los calores isostericos:

39

٩,

CALCULO PARA B.E.T.

Para evaluar las derivadas parciales se utilizo la expresion "corregida" por B.E.T., es decir aquella que surge como limite de la teoria de Guggenheim, considerando p*=p

O

Es decir que

$$c = \exp\left(-\int_{\mu} \mu / RT\right) \quad (29)$$

y no igual a un exponencial de energias internas como lo considera Steele (17).

De acuerdo a esta suposición y considerando que :

 $(\partial N / \partial T) = 0$ (30) y que $(\partial N / \partial x) = 0$ (31) B x B T

-es decir que el numero de sitios primarios de adsorcion no varia ni con la presion ni con la temperatura-, y que (c / 2 x) = 0 8 T

ec. (32) - suposicion logica ya que "c" se introdujo como un cociente de funciones de particion-; obtuvimos:

2 (dc/dT)= (c/RT)∐h (33) B B m

2 2 2 () n /) x) = N c {i + x (c - i)}/[i+(c - i)x] (1 - x) B T B B B B

ecs. (34) y (35) respectivamente.

Obteniendo finalmente para el calor isosterico de adsorcion la siguiente expresion:

$$q = - \Delta h \Gamma 1 - (p/p) J / \Gamma 1 + (p/p) (c - 1) J_{a}$$

st, B m o B

4

ec. (36).

1

CALCULO DEL CALOR ISOSTERICO PARA LA ISOTERMA DE GUGGENHEIM

Las expresiones utilizadas fueron

$$(p*/p) = exp(\Delta \mu / RT)$$
 (37) con M=Multicapa
o M
 $c = exp(-\Delta \mu / RT) (p*/p)$ (38) con m=monocapa
G m o

obteniendose

2 (dc/dT) ≈ ~ (c/RT) (Åh – Åh) (39) 6 G M m

Las expresiones para las derivadas parciales son:

$$(\partial n / \partial T) = N c \times y (\delta h y E \times y (c - 2) + 2 J + 4 h E 1 + 6 \times 6 G M G m$$

 $2 2 2$
 $+ \times y (x y - 2) J / R T E 1 + (c - 1) \times y J (1 - x y)$
 6

1

siendo esta la ec. (41); y:

con las siguientes suposiciones:

$$(\partial N / \partial T) = 0; (\partial N / \partial x) = 0; (\partial c / \partial x) = 0(43)$$

G x G T G T

por argumentos analogos a los planteados para B.E.T.; con ellos se llega a:

43

ф.

 $2 \qquad 2$ $q = - \{ \int h [i - (p/p*)] / [i + (p/p*) (c -1)] \} +$ $.st, 6 \qquad m \qquad 6$ $-2 \qquad 2 \qquad (44)$ $+ \{ \int h [(p/p*) ((p/p*) (2-c)] \}] / [i + (p/p*) (c -1)] \}$ $M \qquad 6 \qquad 6$

CONCLUSIONES

1) El calor isosterico de Guggenheim es igual(con la correspondiente relacion entre c y c) al que se obtiene con
 B G

la expresion "corregida" de B.E.T. mas un termino que da cuenta de las desviaciones respectivas al estado liquido.

2) Δh_{m} y Δh_{H} estan vinculados con magnitudes evaluadas en bibliografia (16), (17) y (18) y que se pueden medir tambien en forma independiente la cual permite establecer un vinculo entre los resultados que se obtienen y los publicados.

1

ANALÍSIS DE LA DERIVADA PARCIAL DE LA ISOTERMA CON RESPECTO A LA TEMPERATURA A HUMEDADES RELATIVAS CONSTANTES

Para ver como variaba la
$$(\partial n/\partial T)$$
 con la x

temperatura se hizo un programa en la calculadora Hewlet Packard modelo 9810 A con graficador adjunto. Se estudio la dependencia de la derivada con los diferentes parametros. Se trabajo con valores arbitrarios de N, Δ h⁻, Δ s de los encontrados experimentalmente para colageno a 25 C y 35 C (ver resultados experimentales) por nosotros medidos en nuestro laboratorio, en un rango de 51 K a 10.000 K (en la grafica se llega a 400 K; (Fig.6). Los resultados son:

La derivada presenta un solo minimo a una dada humedad
 relativa (HR) en todo el rango de temperaturas usadas.

2) Este minimo se hace mas pronunciado y se desplaza a temperaturas menores a menores presiones de vapor.

3) Las derivadas a una dada HR, en el mismo rango de T pero a distintos N (dejando fijos∆h y∆s); - y modificando el i i

numero de sitios primarios de adsorcion-siguen presentando un

solo minimo a la misma temperatura, pero haciendose mas pronunciado a N crecientes.

4) La variación de la derivada en el mismo rango de temperaturas a una misma HR no altera practicamente la ubicación ni ancho del minimo cuando se varian en forma separada $\hat{\mathbf{A}}$ s y $\hat{\mathbf{A}}$ h

5) El minimo se desplaza a temperaturas menores (en el mismo rango de temperatura y a una dada HR) y es mas profundo para valores de 🛦s mas negativos.

Μ

Μ

6) El minimo se desplaza a temperaturas mayores y es menos profundo para valores λ h_m mas negativos.

En la Tabla 3 se muestra el valor del minimo de la derivada a distintas presiones de vapor y a la temperatura en que se produce, y en la Fig.7 esta graficado el valor del minimo a distintas presiones de vapor vs. Temperatura.

De la grafica de la Fig. 7 se evidencia:

m

-7 -2

1- que entre (p/p)=10 a 10 el minimo decrece en forma

constante, produciendose tambien a intervalos regulares de temperatura.

46

÷

2- que entre (p/p)=10 a 0:4 el minimo de la derivada es

0

casi constante produciendose también a intervalos regulares de temperatura.

-1

3- que a partir de (p/p)= 0.5 a 0.9 comienza nuevamente a o

aumentar, cambiando bruscamente para 100% de HR.

CONCLUSIONES

El estudio de la dependencia de la derivada parcial de la isoterma con respecto a la temperatura a humedades constantes, nos indica que en el rango de interes biologico son validas las suposiciones utilizadas para la extrapolacion de isotermas.

্



GRAFICO DE LOS MINIMOS VALORES DE LA DERIVADA A DISTINTAS FIGURA 7

PRESIONES DE VAPOR EN FUNCION DE LA TEMPERATURA,



T & *K)	p/p ₀	(> y/ 3 r) p/40,min.
186	-7 10	-0,6552
198	10	-0.5787
213		-0,4991
230	-4 10	-0,4273
253	10-3	-0,3508
273	10-2	-0.3037
293	-2 ∹π10	~0.2712
303	10	_0,2629
304	0,11	-0,2624
314	0,20	-0,2040
322	0,30	-0,2738
329	0,40	-0,2893
335	0,50	_0,3104
341	0.60	-0,3379
349	0,70	-0,3735
358	0,80	-0,4173
370	0,90	-0,4526
374	1	-0,0820

TABLA 3

٦.

DIFERENTES ESPECIES DE SITIOS

Si consideramos que el adsorbente posee mas de una clase de sitios primarios el tratamiento de Guggenheim puede ser aplicado. En el caso simple de dos tipos de sitios en los cuales solo se puede fijar una molecula por cada uno (monocapa), la gran funcion de particion sera:

$$\sum_{i=1}^{N1} \sum_{j=1}^{N2} (1 / \lambda q) (45)$$

lo que da:

$$n = [N] p / (\lambda q + p)] + [N2 p / (\lambda q + p)] (46)$$

$$1 \qquad 2$$

expresion que puede extenderse para MULTICAPAS dando para la isoterma la siguiente expresion:

48

ł

Siendo la expresion (47) simplemente la suma de dos isotermas
Esta formula tiene cinco parametros, y puede ser util en casos muy particulares. Queda claro que aunque uno puede extender el tratamiento a cualquier numero de clases diferentes de sitios, la isoterma resultante sera de utilidad casi nula por el alto numero de parametros ajustables que requerira.

FRACCION DE AGUA LIGADA A LOS SITIOS PRIMARIOS

, **A**

Es a menudo util conocer cuantas moleculas estan ligadas a los sitios primarios en relacion a la cantidad total de agua presente. La suposicion mas elemental es la de que ninguna molecula puede pásar a la multicapa hasta que todos los sitios primarios de union estan ocupados. Esto arroja para la fraccion de agua total presente fijada a los sitios primarios:

Claramente es esta una suposicion muy simplista, pero a pesar de ello muy usada; como fue planteado por Grigera (19), este simple camino de computar la fraccion no es apropiado para muchos casos, pudiendo hacérlo mas correctamente considerando a las moleculas en diferentes estados.

Si queremos considerar la ocupación de los sitios primarios de edebrción debemos considerar que "1" es la probabilidad Telativa de encontrar un sitio vacio, mientras que

2 2 3 3 $\lambda c q \quad \lambda c q \quad \lambda c q \quad , \lambda c q \quad , \ldots$ " son proporcionales a la probabilidad relativa de encontrar un sitio llenado por una,dos,tres,...moleculas.

Si " So" es el numero de sitios vacios, tendremos So**d** 1, y:

pudiendo entonces escribir:

$$2 2$$

So/N = 1 / (1 + λ cq + λ cq +....) (50)

Como N es el numero de sitios primarios de union y "So" es el numero de los vacios; la razon de sitios ocupados a numero de sitios total, sera:

疹

$$(N - S_0) / N = 1 - (S_0 / N)$$
 (51)

÷

Podemos ahora escribir la fraccion del total de las moleculas presentes en el sistema que estan fijadas a S sitios primarios como:

$$f = (S / n) (1 - So/n)$$
 (52)

y utilizando las ecs.(7) y (50), y recordando que

$$\mathbf{y} \mathbf{d} = (\mathbf{b} \setminus \mathbf{b}_{\mathbf{x}})$$

encontramos que:

ŧ

f = (S / N) (1 - (p/p*)) (53)

51

<u>بور</u>



.....

FIGURA 8 . COCIENTE ENTRE LA FRACCION DE OCUPACION DE SITIOS EN FUNCION DE p/p^*



FIGURA 9. RELACION ENTRE LA FRACCION DE POBLACION COMPUTADA A PARTIR DE LA ISOTER-MA (f) y ASUMIENDO TOTAL OCUPACION DE LOS SITIOS PRIMARIOS ANTES QUE LAS MULTICAPAS SE FORMEN (f') CONTRALLA PRESION DE VAPOR PARCIAL PARA COLAGEND(---) y LISOZIMA (----) LA FLECHA INDICA EL PTO N=1

En el caso particular de considerar que todos los sitios primarios son sitios de union (es decir S = N) tenemos

3.

$$f = [1 - (p / p*)]$$
 (54)

La diferencia entre considerar la total ocupacion de sitios primarios antes que se fijen moleculas 'a sitios secundarios implica que la fraccion arriba calculada es igual a (N / n) [para $n \gg N$]. En la Fig.8 se representa el cociente (N/n)/f en funcion ce (p/p*) para distintos valores de "c".

La Fig.9 muestra la razon (f/f°) para dos casos (colageno y lisozima), se puede ver que la diferencia es maxima para n = N.

En caso de usar la suposicion de B.E.T. en lugar del tratamiento de Guggenheim, los valores de f seran algo diferentes pero no afectan apreciablemente los resultados.

En el caso de dos tipos diferentes de sitios, se puede escribir la fraccion correspodiente a los sitios "1" y "2", utilizando un tratamiento similar al anterior:

f1 = (N1/n) (c1 p/p*)/[1 + (c1-1)(p/p*)]

f2 = (N2/n) (c2 p/p*)/[1 + (c2-1)(p/p*)] (55)

ENERGIA LIBRE

La energia libre necesaria para transferir una molecula desde el vapor a la superficie solida se puede escribir como:

$$\Delta F = (RT/M) \int_{0}^{x} n d x / x \qquad (56)$$

donde x ≈ presion parcial de vapor M ≈ peso molecular del adsorbato n ≈ numero de moleculas adsorbidas

La isoterma B.E.T. conduce a una integral divergente para x=1. La isoterma de Guggenheim permite obtener una expresion analitica convergente para p*>p. La diferencia de energia libre

0

puede escribirse entonces:

En la Fig. 10 se comparan las diferencias de energia libre obtenidas mediante integracion grafica (tal como útiliza Bull(20)) a partir de las isotermas de B.E.T. y de Guggenheim para diferentes valores de "x". Los datos experimentales corresponden a tendon de cola de rata (21) (esencialmente colageno) a 20 C. Los parametros de Guggenheim son N= 19,6g.agua/100g P.S.; c=11 y p*=1,65 p .Los puntos corresponden a

0

la integracion grafica y poseen un gran error, particularmente a valores cercanos a p/p =1.

o

.



FIGURA 10 . VARIACION DE LA ENERGIA LIBRE DE ADSORCION DE VAPOR DE AGUA POR COLAGENO.
DETERMINACION EXPERIMENTAL

a) METODO GRAVIMETRICO

El metodo mas difundido para obtener experimentalmente isotermas de adsorcion de proteinas es el metodo gravimetrico o de pesada. Consiste en poner muestras solidas de biopolimeros en una capsula previamente pesada, pasandola luego por atmosferas de. distintas humedades relativas (las cuales se crean poniendo cerca de la muestra un recipiente con soluciones saturadas de distintas drogas que dan la humedad deseada a la temperatura a la cual se trabaja); en estufa hasta que llegue al equilibrio. El equilibrio se determina cuando el peso de la muestra no varia, tardando generalmente en establecerse para cada humedad relativa, varias semanas. Cuando se ha pasado la muestra por las distintas humedades relativas se las deja secar en vacio con Pentoxido de Fosforo, en estufa y se determina el peso de la muestra seca. El inconveniente fundamental del metodo es el tiempo que insume realizar un ciclo completo de adsorcion-desorcion.

6) METODO DE LA BALANZA DE CUARZO

Para superar el inconveniente puntualizado, se puso en practica el sistema de la balanza de cuarzo (22).

La idea consiste en aprovechar el hecho de que un cristal de cuarzo AT plano tiene una frecuencia de resonancia característica que disminuye a medida que sobre el se deposita una masa de acuerdo a la expresion:

donde el coeficiente de sensibilidad C cumple la siguiente f

relacion:

$$C = f / N f (59)$$

$$f q$$

f = frecuencia del cristal limpio.

N = 1670 KHz mm, es la frecuencia constante para cristales de cuarzo AT planos.

-3 f = 2,65 g cm , es la densidad del cuarzo. q m = es la masa depositada. A = area del cristal.

÷

En sintesis el metodo consiste en tener el cristal conectado a un circuito resonante, y a un frecuencimetro. Medir la frecuencia del cristal limpio, cubrirlo luego con una solucion de proteina (una vez evaporado el solvente queda una capa solida. de proteina). Determinar la frecuencia del cristal con proteina seca, que en general permite hallar el peso de la masa de proteina depositada con precision al nanogramo; y luego pasar el cristal por atmosferas de distintas humedades relativas, midiendo la variacion de la frecuencia y relacionando la misma con la cantidad de vapor de agua adsorbida.

Se construyo el circuito resonante similar al dado por KENNERLEY(22), pero poniendo como fuente de tension un transformador de 12 volts estabilizado para evitar las caidas de tension y los ruidos. Para estabilizar termicamente el circuito se construyo una estufa de poliestireno (telgopor), cuya fuente

de poder es una lampara de filamento de 40 watts conectada por medio de un relay a un termometro de contacto que mantiene la temperatura fija a 25 C.

En su trabajo KENNERLEY (22) utiliza como camaras de humedad Erlemeyer de 500 ml, en cuyos tapones se conectan los cristales. Inicialmente utilizamos´este sistema (al intentar realizar isotermas de Colageno Soluble a 25 C),pero evidenciamos varios problemas:

1) Existia en la estufa un gradiente de Temperaturas que producia variaciones de 0,5 C cada 10 cm medidos desde el piso de la estufa donde esta el sistema de calefaccion.

2) Producto de este gradiente de temperatura se producia condensacion del vapor de agua en las paredes del recipiente y en los cristales que invalidaban las mediciones, produciendose en la mayoria de los casos cortocircuitos en los cristales.

Para subsanar estas dificultades, realizamos las siguientes modificaciones:

1) Para evitar las variaciones de temperatura, y con el fin de crear una corriente de conveccion, se puso en el techo de la estufa paletas de ventilador, el motor de 1/8 c.v. de potencia se lo puso hacia afuera para evitar el recalentamiento. Con la

corriente de convección creada se logro estabilizar la temperatura.

-

2) Para evitar el problema de la condensacion de agua en los cristales ideamos un sistema para las camaras de humedad distinte al descripto por KENNERLEY(22).

El dispositivo consiste en recipientes cilindricos de acrilico, en su interior hay un tripode de acrilico que sirve de sosten a un eje tambien de acrilico, en uno de sus extremos hay una pequena helice de acrilico conectada por un pequeno ruleman, en el otro extremo hay un buzo magnetico. La tapa de acrilico de cierre hermetico tiene en su interior un zocalo donde van enchufados los cristales. El objetivo de la helice que se ha colocado en cada una de las camaras de humedad es el de producir una corriente que por un lado ayude a que se estabilice mas rapido la atmosfera de humedad, y por el otro, al renovar permanentemente la superficie, evita posible desviaciones de la humedad deseada por la presencia de alguna impureza en la solucion que pueda modificar la tension superficial de la misma.

Para acelerar el proceso de medicion vimos que era conveniente hacer en forma encadenada tres experimentos, y como carecianos de tres agitadores magneticos y ante el inconveniente del costo y del recalentamiento que suscitaria poner tres motores dentro de la estufa, se construyo un agitador magnetico triple

con un sistema de tres ejes conectados por correas y un motor de tocadisco.

Con este sistema de agitacion se logro que se estabilice la atmosfera de humedad a la media hora, lo que permite realizar en 24 hs el ciclo completo de adsorcion-desorcion, dejando durante 12 hs en vacio y con Pentoxido de Fosforo los cristales con proteinas para poder medir la frecuencia (y por ende la masa) de la pelicula de proteina seca.

El frecuencimetro utilizado fue un FLUKE 1952 B. Los cristales de cuarzo AT se compraron en Curie Electronica. Las tablas de humedad relativa son las publicadas por ARAI y colaboradores (23).

A continuacion se adjunta un diagrama del circuito (Fig.11), de las camaras de humedad (Fig. 12), del agitador magnetico (Fig.13), y una reproduccion de la tabla de Humedades Relativas (23) (Tabla 4).

60







ورفعا



١

 σ

TABLA 4.

VAL	DRES DE H	IUMEDA	DES	RELAT	IVAS		
	Temp. (°C)	10.0	20,0	25.0	30.0	40.0	50.0
-	K ₁ SO ₄	98.3* 0.03* 8.5*	97.9 0.05 10.0	97.6 0.04 19.75	97.4 0.06 11.5	97.0 0.05 12.9	96.6 0.04 14.2
	KCI	86,8 0,02 23.8	85.1 0.06 25.5	84.2 0.03 26.4	81.5 , 0.04 27.1	82.1 0,0) 28,6	80,7 0,05 30,0
	NaCi	75.8 0.03% 26.31	75.6 0.06 26.38	75.4 0.02 26.43	75.2 0.07 26.50	75.0 0.0.1 26.65	74.9 0.01 26.81
•	NaNO ₂	67.4 0.04 43,1	65.4 0.08 44.9	6-1, 1 0.02 45, A	63.2 0.04 46.8	61.2 0.03 48.8	59.2 0.02 50.8
	NaBr	62, 5 0.05 46.0	59,1 0,02 47,6	57,8 0-02 48,61	56-2 -0-03 49-5	53.0 0.03 \$1.6	49.6 0.02
	ΝκιΓειΟι	57.5 0.07 63.2	54.7 0.04 64.4	53.4 0.05 65,01	52-0 0,05 65,8	49,2 0,04 68,3	46.3 0.02 70.5
	к,со,	44,5 0,01 51,9	44.1 0.06 52.5	44 0 - 0 02 57 85	43.8 0.04 53.2,	43.4 0.02 53.9	42.8 - 0-06 - 54.8
	MgC1,	33.8 0.06 34.9	33.1 0.02 35.3	32.8 0.03 35.5	32.4 0.03 35.8	31.6 0.03 36.5	30-6 0.03 37-2
	CH4COOK	24.5 0,0V 70.1	23.2 0,06 71.9	22.4 0.07	21 4 002 74.0	19.7 0.02 76.4	44 5 -4 81 77.1
`	LiCl	12.7 0.05 42.7	18-1 0.01 	11 1 0 01 45.85	11-1 -0-02 46.3	11 1 0 01 47.3	11 4) (* 6)] 48.3
•	NaOH		7.0 0.01 52.2	6,9 0,0} 53,3	6.8 0.01 54.3	6,5 0,01 56,3	5.8 0.02 59.2
	Littr	7.8 0.03 62.4	7.2 0.02 63.9	6.7 0.01 64.8	6.3 0.01 —	5.2 0.01 67.2	5.0 0.0[67 .9

a humedad relativa (%)

b desviación stándard (%)

c solubilida de sales en la saturación (wt%)

ISOTERMAS DE ADSORCION DE DISTINTOS BIOPOLIMEROS ADSORCION DE VAPOR DE AGUA EN PROTEINAS

Una molecula, de proteina contiene una o mas cadenas polipeptidicas formadas por sucesion de aminoacidos -(RCHCONH)n, constituyendo la cadena la estructura primaria de la proteina (fig. 14). Hay mas de veínte grupos laterales R, incluyendo hidrocarbonos no polares y grupos polares amino, hidroxilo y carboxilo.

Por arrollamiento la estructura primaria puede dar origen a la estructura secundaria (α' - helice, β' -helice, β' -cruzada). En la α' - helice el grupo CO esta asociado al grupo NH cada tres residuos a lo largo de la cadena por puentes de hidrogeno intramoleculares. En las proteinas las cadenas polipeptidicas se extienden paralelamente y estan unidas entre si por puentes de hidrogeno intermoleculares. Finalmente la conformacion espacial esta dada por la estructura terciaria (fibras colageno) o cuaternaria (hemoglobina).

Sponsler, Bath & Ellis (30) consideran que existen dos

FIGURA 14





Formación de un enlace peptidico.



El grupo peptidico es plano porque el enlace carbono nitrógeno tiene un carácter parcial de doble enlace.



Existe una considerable libertad de rotación alrededor de los enlaces que unen los grupos peptidicos a los átomos de carbono a.





El grupo peptidico es una unidad rigida plana. Las distancias estándar de los enlaces están indicadas en Á.

FIGURA 14



Definición de ψ y ϕ : ψ se refiere a la rotación alrededor del enlace sencillo C_a -- C; ϕ se refiere a las rotaciones de los enlaces simples C_a -- N (basado en el artículo de C. Levinthal «Edificación de modelos moleculares por medio del computador». Impreso en 1966 por Scientífic American, Inc. Todos los derechos reservados). clases de grupos hidrofilicos en una proteina: a) Los sitios polares en las cadenas laterales de los residuos de aminoacidos. b) Grupos carbonil e imido de las uniones peptidicas. Siendo b) mucho mayor que el primero, pero los grupos carbonil e imido estan fuertemente unidos unos a otros por uniones de puente hidrogeno en la configuracion N...H...O=C..., estando completamente saturados y siendo la atraccion por el agua despreciable.

Estudios de sorcion han sido realizados en numerosos biopolimeros, por distintos autores, y los resultados en la mayoria de los casos han sido analizados con la isoterma B.E.T., en la Tabla 5 se ve que para la mayoria de los biopolimeros la cantidad sorbida en la hidratacion primaria es entre 0.2 a 0.5 mol agua/100g.P.S. De los 20 aminoacidos mas comunes, 13 de ellos son polares (ARG, HIS, LYS, ASP, GLY, CYS, MET, SER, THR, TYR, TRP) y capaces por ende de fijar agua.

Entre otros autores, Pauling (31) propuso que una molecula de agua puede ser fijada por cada residuo polar. La cantidad computada de agua fija a sitios primarios de adsorcion es del mismo orden de magnitud que los experimentales, pero las cifras son alrededor de un 70% mayores que los valores reales ((32),(33)).

Gramos de agua acsorbida por 100g ce proteína seca como función de la pre-

sión de vapor de àgua relativa a 253C y 409 C.

restón de vapor relativa	-	50	-	010	a	20		01.0	đ	9	
ł	2	ę	2	ę	32 32	ę	38	3	2	\$	
emperated and arion	0.56	0.40	0.83	0.66	1.20	1.16	1.86	1.74	2.48	2.38	
furenched nyloa	8.	-19	8.	.68	1.36	1.16	1.92	1.71	2.48	2.21	
Ę	1.96	1.5	2.81	2.46	3.90	3.60	5.19	4.2	6.28	5.80	
W.cod	2:07	2.50	4.25	3.88	6.25	5.65	8.23	7.50	9.90	9.36	
DuZnia	1.78	1.51	2.59	2.46	3.82 <	3.62	4.98	4.47	5.92	£.3	TÆ
C-(Zria)	1,70	1.50	2.52	2.37	3.74	3.64	4.65	4.56	5.56	5.41	18(
ونسلعع	4.50	4.25	5.35	5.00	6.50	6.02	8.16	7.62	11.32	10.80	_A
P.T.A. VIE	4.18	3.30	4.35	3.73	5.74	5.40	7.56	7.29	10.68	9.2	5
Collagen	5.45	4.18	7.30	0.33	10.06	8.80 >	Har	11.64	15.14	14.46	
Cetatin /	5.30	3.09	6.75	5.95	8.71	8.40	11.25	10.80 [.]	13.82	13.31	
Err albumia (lyophilized)	2.54	2.20	3.70	3.36	5.25	4.97	6.96	6.53	8.70	8. 16	
Rgg albumin (unlyophilized)	2.65	2.53	3.91	3.63	6.86	5.50	7.56	7.14	9.28	8.8	
Egg albumin (congulated)	2.30	2.10	3.36	3.09	4.94	4.64	6.33	6.0	7.68	7.35	
s later hele (yophilized)	2.20	2.05	3.64	3.06	5.38	4.72	0.00	0.51	8.80	8.40	
B-Lactoglobulia (crystals)	2.50	2.20	3.62	3.33	5.82	5.30	7.08	7.08	9.52	8.8	
Jevum a lbumin ""	3.08	2.S	4.35	3.90	6.24	6.00	8.10	7.95	9.92	9.6	
🖛 and A-pseudogiobulin	3.34	2, 83	4.63	4.34	6.90	6.58	8.88	8.34	10.80	10.16	
7-Preudoglobulia	3.34	2.95	4.52	4.25	6.86	6.36	8.85	8.34	10.64	10.2	

		prest	ún de v	apor c	ie agua	relati	va a	25°C Y	, OOC.				
nresion vepor relativa	U		0.0		0.70	_	ē	9	0.0	•			
	n	7	7	ŧ	ส	\$; A	ę	2	9	1	ç	
tenertations ² C	2.3	3.16	3.96	3.90	5.04	4.68	6.24	6.00	10.3	7.65	0.7	9.03	-
Recetched avion	3.10	2.80	3.73	3.36	4.48	4.06	5.28	4.88	6.57	6.03	7.70	6.65	
L.D.	3	7.00	8.58	8.10	10.19	9.56	12.36	. 11.53	17.64	15.93	23.75	20.88	
7.4	11.43	10.00	13.47	12.06	15.61	14.70	18.05	17.16	22.54	20.97	29.15	25.75	
Duria	6.30	6.20	8.04	7.36	9.80	. 9.10	11.76	10.05	15.85	14.22	21.10	18.35	
C-(2-ja)	6.73	0.30	8.28	7.62	10.23	9.10	12.16	11.60	16.38	15.12	22.05	19.70	
Fulsie	13.40	15.00	21.00	20.52	27.60	27.20	30.40	38.80	G6.70	68.00	113.00	00.00	
l'Institution of the second seco	8.11	11.25	13.02	13.14	15.90	15.40	18.57	17.75	25.20 ·	22.90	34.20	29.80	
Collegen	N.:1	17.23	21.06	20.16	25.05	23.78	30.20	28.71	40.70	37.35	50.01	44.75	
Celatin /	16.30	15.70	18.48	17.64	21.60	20.05	20.73	25.35	40.20	36.45	57.60	49.05	
Ert albumin (lyophilized)	19.30	0.73	12.24	11.61	14.53	13.52	17.76	16.78	25.50	23.25	34.20	29.40	
Res albumin (universibilized)	10.95	10.40	12.72	12.12	15.20	14.35	18.97	18.00	27.00	24.90	36.20	32.00	
Erg albumin (cosgulated)	S.	8.80	11.01	10.20	13.23	11.07	16.77	14.32	20.46	18.00	27.60	24.30	
a Lacture of the (benchliked)	10.90	10.35	12.00	12.30	15.47	14.70	18.80	18.33	28.25	25.75	39.20	33.20	
B-Lactoglobulin (crystals)	II. 1 0	10.80	13.50	13.02	16.30	15.60	20.80	19.44	31.30	28.80	40.50	42.00	
Perum alhumin	<u>0</u> .8	11.25	13.80	13.08	16.24	14.90	20.65	18.65	28.70	26.60	35.A	33.50	
a- and B-pseudoglobulia	3.1	11.85	14.76	14.02	17.50	16.30	21.60	, 20.80	31.30	28.80	41.70	36.50	
7-Preudoglobulia	12.40	12.20	14.64	14.20	17.42	16.80	21.42	20.15	31.00	28.90	43.60	38.90	
8													

Gremos de agus edsorbida por 100g de proteína seca como función de la

TABLA 5 . (Ref. 20)

Aun considerando que el numero de sitios primarios esta subvaluado en la teoria de B.E.T., el hecho que el ajuste con la teoria de Guggerheim sea mejor, no justifica la suposicion.

Las uniones peptidicas tambien han sido consideradas como posibles sitios de hidratacion primaria; pero tambien arrojan un pobre acuerdo con los resultados experimentales: la benzoylacion de los grupos amino de las cadenas laterales de la caseina reducen la toma de agua (34). Watt y Leeder (35,36,37) han realizado estudios de sorcion por keratina, bloqueando sistematicamente grupos funcionales de las cadenas laterales. De sus estudios se deduce que el agua asociada con las uniones peptidicas tiene una baja energia de union; y que las isotermas individuales de los grupos amino, carboxilo e hidroxilo pueden ser descriptas por una isoterma tipo Langmuir hasta un 25% de H.R.

Junto con el resto de evidencias experimentales concluyen que en la keratina (como todas las otras proteinas), la sorcion en los grupos polares es el principal mecanismo para la toma de agua. La discrepancia entre la hidrátacion primaria computada con esta hipotesis y los resultados experimentales puede ser explicada por la existencia de un numero de cadenas laterales polares, confinadas en la estructura proteica y que son inaccesibles al agua; pero tambien otras posibilidades son

igualmente probables, como por ejemplo: puentes de agua entre sitios cargados, de tal manera que una molecula sola bloquee dos sitios o moleculas de agua que son compartidas por .dos macromoleculas adyacentes.

Analizando la situacion brevemente delineada anteriormente, se puede concluir (2) que asignar a determinados grupos el caracter de SITIOS PRIMARIOS solo a partir de los datos de sorcion es solo una suposicion hipotetica. Debemos tener presente que las moleculas de agua, cuando estan en el estado liquido, estan unidas entre si por puentes de hidrogeno. Para compensar la menor entropia en el estado ligado, al menos dos "buenos" puentes de hidrogeno deben formarse de manera de tener un potenciaI termodinamico favorable que justifique la union preferencial y devenir una molecula perteneciente a la hidratacion primaria. De esta manera los sitios primarios de union no son determinados solo por la mera existencia de un sitio de union hidrogeno, sino por las posibilidades que un grupo de ellos tenga una geometria favorable que permita a una molecula de agua formar varios puentes de hidrogeno.

DEPENDENCIA CON LA TEMPERATURA

÷.

Los cambios en la temperatura produce cambios en los procesos de sorcion (ver DEPENDENCIA DE LA ISOTERMA CON LA TEMPERATURA). En los materiales biologicos, la forma sigmoidea de la isoterma es mantenida y, en general, la cantidad de agua sorbida DECRECE con la temperatura (por ejemplo los estudios de Watt (38) de las isotermas de agua en lana merino a 20,35,65 y 100 C).

Resultados de Urquhart de sorcion de agua en algodon a temperaturas entre 10 y 110 C muestran que arriba de 50C aumentos en temperatura aumenta la sorcion. Esto indica un cambio en el adsorbente que producto de la temperatura se comporta (desde el punto de vista de la sorcion) como un material diferente.

ŋ

HISTERESIS

Para la mayoria de las isotermas de vapor de agua en sustancias biologicas se observa el fenomeno de Histeresis. Esto significa que la cantidad de equilibrio de agua sorbida a una dada humedad relativa depende de la historia de sorcion de la muestra.

Fig. 15 a) muestra una isoterma hipotetica La con histeresis. El ciclo de sorcion siempre es menor que el de desorcion, y la diferencia entre ambos caminos varia segun 1a sustancia. Cuando se realiza un ciclo parcial de deshidratacionhidratacion se forma un pequeno lazo, de tal manera que la isoterma total representa la evolvente de todas las posibles curvas parciales, como se muestra en la Fig. 15 b). Estas curvas son llamadas "curvas de barrido"(scanning curves). Algunos puntos comunes de las lineas superior e inferior han sido encontrados a bajas y altas humedades, pero solo son muy pocos puntos. La no coincidencia de las curvas podria deberse a un efecto cinetico, mostrando que las curvas no han llegado a su valor de equilibrio. Este no es el caso para las sustancias de interes, como ha sido demostrado, por diferentes autores para keratiná de

1



FIGURA 15 a) : ISOTERMA COMPLETA EXHIBIENDO HISTERESIS.



FIGURA 15 b) ; LA ISOTERMA COMPLETA CORRESPONDE À LA EVOLVENTE DE LOS CICLOS PARCIALES DE SORCION -DESORCION.

lana (40,41,42). Despues de varios meses de equilibracion las curvas de sorcion-desorcion no convergen, dando el lazo de histeresis como un verdadero fenomeno de equilibrio. El estado del sistema no puede ser fijado tan solo externamente, al menos una variable interna debe ser definida.

Como una posible explicacion de la histeresis, uno puede suponer que algunos grupos hidrofilicos pueden interactuar entre ellos, en ausencia de agua, llenando los sitios. Como resultado la isoterma de sorcion se produce en un material que tiene menos numero de sitios primarios. A humedades mayores la flexibilidad de la macromolecula permite al agua acceder a tales sitios, aumentando de hecho el numero de sitios primarios. Nuevamente trabajos de bloqueo de cadenas laterales han sido usados para investigar este efecto (34). La histeresis permanece aun despues de la eliminacion de las cadenas laterales como sitios primarios de sorcion, sugiriendo que la cadena principal de la proteina es la responsable de la misma.

Ninguna de las teorias de sorcion anteriormente presentadas dan cuenta de la existencia de la histeresis, y solamente un tratamiento independiente de los ciclos de sorcion y desorcion han sido realizados hasta el momento. Esta aproximacion no es del todo mala considerando que uno esta procediendo con materiales

67

distintos en uno y otro caso, si suponemos que la unica causa de la histeresis es el cambio en el numero de sitios primarios. Sin embargo el cambio en el numero de sitios no se produce subitamente a altas y bajas humedades. Esto significa un cambio continuo en el numero de sitios de sorcion, que ninguna teoria tiene en cuenta.

El fenomeno de histeresis tiene una aplicacion mucho mas amplia que solo el proceso de sorcion, como por ejemplo en el campo del magnetismo y transiciones en solidos. Un tratamiento general es posible. En el Apendice IV) sintetizamos someramente las diferencias entre HISTERESIS y SUPERSATURACION, de acuerdo a la aproximacion de Everett y colaboradores (43,44,45).

No es dificultoso considerar un sistema macromolecular como compuesto por un gran numero de componentes sorbentes que difieren ligeramente en sus caracteres, teniendo un comportamiento metaestable. La histeresis (de acuerdo a la definicion dada en el Apendice IV)) seria una consecuencia natural del comportamiento total.

La extrema deshidratacion produce desnaturalizacion irreversible, en algunas sustancias puede o no afectar la isoterma de adsorcion: en el caso del DNA, por ejemplo, es conocida su critica dependencia con la hidratacion, pero no se refleja

ninguna anormalidad en su isoterma. En el caso nuestro, hemos encontrado que la adsorcion de agua por mioglobina es claramente modificada despues de un completo secado de la muestra.

Es muy importante tener en cuenta que el agua actua como plastificante. A muy bajo contenido de agua el efecto no es suficientemente intenso, de tal manera que el sistema adquiere un estado extremadamente rigido (vitrificacion) lo que «impide el reacomodamiento interno. Bajo este punto de vista el sistema, al descender su contenido de agua, requeriria tiempos inalcanzables para lograr el equilibrio.

69

¥

LAS ISOTERMAS DE ADSORCION Y LOS CAMBIOS CONFORMACIONALES CON LA HIDRATACION

Cuando iniciamos nuestros estudios de adsorcion de vapor de agua en proteinas decidimos abordar el estudio de las isotermas de Mioglobina a 30 C, ya que hasta ese momento no existia en bibliografia un estudio de las mismas.

En el Apendice IV hacemos una resena sobre la molecula de Mioglobina (hacemos mencion a estudios por medio de tecnicas estructurales: RX y difraccion de neutrones).

Nosotros trabajamos en Mioglobina de Cachalote Sigma a 30C, mediante el metodo de la balanza de cuarzo y los parametros se ajustaron de acuerdo a la isoterma de Guggenheim. Nuestros resultados (46,47,48,49,50) estan resenados en la Fig.16 y en la Tabla 6 (el unico punto que conocia de la isoterma de mioglobina, era el de 92% HR a 25 C dado por Bull (51)).



ហ	0.42	1.11	1.07
A AIM	55.27	250.88	307.41
4/	-644 . 19	- 182 . 543	-1321.75
p*/p	1.096	1.516	1.665
٨	7.56	20.01	19. 18
C	3.19	2.05	44.91
	DESDFCIDN NATIVA	ADSGRCION. PREVID SECADD	DESCRCION PREVID SECADO

TABLA 6. PARAMETROS DE LAS ISDTERMAS DE MIOGLOBINA A 30 P C

De acuerdo a nuestros resultados observamos:

 La proteina completamente deshidratada se comporta como un material distinto desde el punto de vista de la isoterma de adsorcion.

 El material deshidratado posee un comportamiento "normal", presentando ciclo de histeresis.

3) El numero de sitios primarios aumenta con el secado (lo que daria cuenta de cambios conformacionales). Tenemos 0.42 sitios por aminoacido para la proteina nativa frente a 1,066 para la que ha sido previamente secada. Registramos un comportamiento distinto a otros biopolimeros frente al proceso de secado, que en el caso de la mioglobina nos esta indicando modificaciones estructurales. Cuando una estructura proteica flexible es secada, se espera que la misma se vuelva mas hidrofobica, es decir que sus grupos polares -en el caso de una proteina globular- se localicen hacia el interior, y que de tal manera disminuyan los sitits donde el agua puede ser fijada. Nuestros resultados de adsorcion de vapor de agua en Lisozima (proteina globular) por el metoco gravimetrico a 25 C lo confirma: siendo el numero de sitits primarios por aminoacidos para la adsorcion sin secado previo de 0,5303 y para la proteina secada en Pentoxido de

Fosforo y vacio 0,4221.

De los 153 aminoacidos que componen a la Mioglobina,61,33 son polares; es una estructura plegada en ocho segmentos (de los cuales solo los extremos no tienen estructura helicoidal y corresponden a restos de Prolina). En el interior se aloja el grupo hemo. ۱

En el caso de la proteina nativa vemos que de acuerdo a la teoria de Pauling, coincidente con la de Sponsler, Bath & Ellis (anteriormente mencionada), vemos que existe una buena correlacion entre el numero de restos por aminoacidos que es de 0.422 y el numero de sitios primarios (calculado a partir de la isoterma de Guggenheim), S=0.420.

De acuerdo a Lehninger (53) en su descripcion de las propiedades de la**S d**-helices, su arreglo espacial permite que TODA union peptidica puede participar en uniones tipo puente hidrogeno intercadena. La mioglobina tiene 152 uniones peptidicas: es decir existen 152 sitios potenciales adicionales para la fijacion de agua.

Una[†] explicacion tentativa seria suponer para la proteina previo secado, que estos sitios son mas fuertes que los polarés, de modo que los contabilizamos en las "multicapas", registrando

en la "monocapa" solo los correspondientes a las uniones peptidicas, siendo su cociente 153/152 = 1 (siendo para desorcion previo secado 1.065 y para adsorcion 1.112). Comparando las isotermas de adsorcion-desorcion previo secado vemos que N es del mismo orden, o sea que es un problema energetico (distintos "c") y no un problema de sitios.

En vista de la diferencia que ofrecia el secado o no de la Micglobina en atmosferas de Pentoxido de Fosforo y vacio, nos planteamos estudiar en detalle el proceso de secado, para poder determinar hasta que orden de humedad relativa el proceso de adsorcion es reversible.

Trabajando siempre con los cristales de cuarzo y a 30 C, partimos de las humedades relativas mas altas; hicimos pasar los cristales por atmosferas de humedades relativas menores, volvimos a hidratar. Es decir que fuimos realizando lazos, que deberian (salvo que se produjese desnaturalizacion de la proteina) retornarnos a los valores iniciales. Encontramos reversibilidad hasta aproximadamente 21.6% HR, que corresponde a valores de n < 0.1g agua/g P.S.

Recien en 1982, con la aparicion del trabajo de M.Luscher-Mattli(53), quien hace un meticuloso estudio de barrido de sorcion-desorcion para otra proteina globular[.] **d**-quimotripsina;

aparece en la bibliografia especializada un tratamiento similar al nuestro.

Sus resultados coinciden totalmente con los que nosotros hallamos para la Mioglobina.

La autora realizo los ciclos de sorcion-desorcion a 298 K, encontrando reversibilidad salvo la zona n= 0.06-0.1 g agua/F.S.

Este contenido critico de agua corresponde a una fraccion muy fuerte de agua ligada, aproximadamente un 20% de la lera esfera de hidratacion. Concluyendo, que en el caso de la \checkmark quimotripsina las isotermas de desorcion partiendo de soluciones (o suspensiones) acuosas o desde rangos altos de HR (p/p >0.8) re O

presentan verdaderamente condiciones de equilibrio en el contenido de agua, para n 🍃 nº (donde nº =0.1 g agua/g P.S.)

p p

siendo posible interpretar este experimento termodinamicamente.

La otra conclusion a la que llega la autora es que el efecto de histeresis es consecuencia de la remocion completa de agua. Puesto que la deshidratacion hasta un valor critico de contenido de agua correspondiendo a una fraccion de agua fuertemente ligada

(n') no induce efecto de histeresis.

Р

De modo que a la luz de este otro experimento, podemos decir que la reversibilidad del camino adsorcion/desorcion para valores de n>0.1g.ag./g.P.S. (en el caso nativo), nos habla de ausencia de cambios estructurales. De modo que en el caso de la mioglobina con el secado se produce desnaturalizacion (transicion vitrea).

COMPARACION DE RESULTADOS CON LOS OBTENIDOS POR DISTINTAS TECNICAS DE DIFRACCION (RAYOS "X" Y DIFRACCION DE NEUTRONES)

La cristalografia de neutrones (54) es una tecnica ideal para el estudio del agua en estructuras proteicas, particularmente cuando el agua es reemplazada por D O. El factor 2

de scattering para el hidrogeno, aunque negativo, es suficientemente grande como para realizar una clara descripcion de los atomos de hidrogeno en los mapas de Fourier de alta resolucion, aunque para reducir la incoherencia de scattering, los hidrogenos comunmente son reemplazados por deuterios.

El cambio isotopico no solo suministra una gran reduccion de informacion previa, sino que distingue entre hidrogenos intercambiables y aquellos que no lo son.

El factor de scattering del deuterio es cerca de dos veces mayor que el del hidrogeno, aumenta la visibilidad de la molecula de agua en los mapas de Fourier. De tal manera en un mapa de neutrones una molecula aparece alrededor de tres veces mas fuerte que en el equivalente mapa de densidades electronicas. Ademas la ausencia de cualquier tipo de dano por radiacion elimina errores, ya que es posible utilizar un mismo cristal para una serie de estudios.

El analisis de la estructura del agua puede ser mejorada por la mezcla de H O y D O, producíendo un cambio controlado en la 2 2

densidad de scattering. La altura de los picos resultantes de las moleculas de agua puede ser cambiada de forma controlada; y puede ser usada para distinguir los picos de agua del de otras moleculas. Ademas las formas características de los picos de H O 2

y D Opermite encontrar su orientacion y la de los puentes de 2

hidrogene.

Schoenborn (55) realizo analisis por difraccion de neutrones en metemioglobina, basandose en la estructura de Rayos X de Watson & Kendrew; encontrando 106 picos de agua.

En 1977, Takano (57, 58) con una resolucion mas fina de la estructura de Rayos X de metamioglobina encontro 72 moleculas de agua y Shoenborn (56) en 1980 realizo un analisis refinado de difraccion de neutrones en CO-Mb (Carbon Monoxide Myoglobin), uncontrando 40 moleculas de agua.

Nuestros resultados de 78 moleculas de agua por molecula de Mioglobina nativa, tiene un excelente acuerdo con los resultados enunciados.
LAS ISOTERMAS COMO TECNICA COMPLEMENTARIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR Y RELAJACION DIELECTRICA

De acuerdo a Grigera (19, 59), la información obtenida por relajación dielectrica y r.m.n. es consistente con un modelo de hidratación de 2 o 3 (60) estados, cada uno de ellos con tiempos de relajación bien definidos.

En este modelo la fraccion de ocupacion f=(S/N)(1-p/p*) y en el caso que S=N, f=1-p/p* es imprescindible para el calculo de los tiempos de relajacion spin-spin, y como vimos, la obtenemos de las isotermas.

De acuerdo a este modelo, el ancho de linea observada experimentalmente esta dada por

 Obs
 b
 m

 1/T = f/T + (1 - f)T

 2
 2

 2
 2

ь

```
con T ≖ tiempo relajacion spin-spin de agua fija a un sitio
2
```

especifico

វា

- T = tiempo relajacion spin-spin del agua mas libre (asociada a 2 multicapas).
- f fraccion total de agua fija en sitios de orientacion y tiempos de relajacion diferentes del agua libre.

m

T se obtiene de mediciones de Reflectometria en Dominio del 2

tiempo (TDR) y f de las isotermas de sorcion.

En el caso de la mioglobina a 81% HR obtuvimos f=0.26 (47), b -3 y encontramos para el estado ligado T = 6.9 x 10 sg 2 m (suponiendo que la fraccion "m" rotaba isotropicamente, S = 0 y 12

S=0.038; siendo 5 los parametros de Saupe, <u>y</u> considerando T=600 .22 ij 2 ms, generalizando los resultados de relajacion dielectrica para otras proteinas.

Ŵ

La anisotropia del agua ligada, "b", seria la responsable del desdoblamiento de linea de r.m.n.

La identificacion del agua fija a sitios primarios (que causan estabilizacion) con el agua detectada por difraccion, permite considerarla no solo como el agua que liga aminoacidos percenecientes a la misma proteina sino tambien como la que produce ligaduras intermoleculares en los cristales de proteina, - (similitud del espectro de r.m.n. con fibras orientadas de colageno con un cristal de mioglobina, Grigera (19)).

80

Ь

COMPARACION CON LOS RESULTADOS DE RESONANCIA PARAMAGNETICA (EPR o ESR)

ESR (Electron Spin Resonance) o EPR (Electron Paramagnetic Pesonance) da cuenta del comportamiento de los electrones en un campo magnetico. Este comportamiento proviene del momento magnetico y del momento angular del electron (61).

Estudios realizados en metamioglobina equina liofilizada, mediante EPR, a diferentes niveles de hidratacion, por Neto y colaboradores (62), muestran que para Metamioglobina g=6, FORMA NATIVA, (correspondiente a la componente perpendicular de spin 5/2 del ion Fe(III) en simetria axial), la variacion del ancho de linea en funcion de la hidratacion evidencia una variacion monotona hasta un valor de hidratacion de 0.20 g agua/g Mb. Encima de este valor casi es una constante, hasta tomar el valor de la solucion.

La explicacion encontrada por los autores, es que tal variacion se debe a alteraciones de simetria alrededor del ion Fe(III) provocadas por cambios conformacionales inducidos por la

variacion en el contenido de agua, hasta que en hidrataciones superiores a 0.20 g agua/g Mb, se encuentra una situacion muy parecida a la de la muestra en solucion (o sea con simetria axial bien definida). Los autores encontraron comportamiento similar para mioglobina de ballena.

Estos resultados confirman lo hallado por nosotros mediante el estudio de las isotermas.

A modo de sintesis de lo anteriormente expuesto, podemos concluir que el agua juega un rol preponderante en la estabilízacion de la mioglobina; existiendo un valor critico de hidratacion que sobrepasado produce cambios conformacionales.

Por otra parte, tambien es importante resaltar el hecho que una tecnica tan simple y economica permite obtener resultados de tal precision que son compatibles con los obtenidos por tecnicas mucho mas sofisticadas y que no estan al alcance de nuestro laboratorio; lo que nos permite aseverar sobre la validez de nuestras conclusiones.

PARTE II. MACROMOLECULAS EN SOLUCION (O SUSPENSION). ADSORCION DE AGUA LIQUIDA. EFECTO DEL COSOLUTO

INTERACCION PROTEINA - SOLVENTE

Los estudios realizados en vinculacion con los cambios conformacionales producidos en proteinas por agentes desnaturalizantes y la relacion entre la interaccion de las proteinas con las componentes del solvente en mezclas de agua con sustancias organicas, indican que ambos fenomenos estan intimamente relacionados (ver Introduccion).

Una comparacion cuantitativa directa entre el grado de transicion conformacional y las interacciones totales entre la proteina y los componentes del solvente es sin embargo muy complicada debido a la dependencia del estado de referencia .con la composicion del solvente.

Esto se debe al hecho que las tecnicas termodinamicas usadas para medir las interacciones en sistemas de tres componentes sirven solo para detectar interacciones preferenciales: ejemplo: mediciones del cambio del potencial químico de las componentes agregadas al solvente, debido a la interaccion de las mismas con la proteina, relativo a sus potenciales químicos en el seno de la mezcla con el solvente en ausencia de proteina (70).

Fara entender las relaciones entre las interacciones proteina-solvente y cambios conformacionales de la proteina en solucion es necesario conocer completamente la interaccion total entre la proteina y cada componente del solvente. De modo que el problema teorico es el de encontrar una ecuacion que relacione las interacciones preferenciales y totales de las componentes del solvente con las proteinas.

DISTINTOS TRATAMIENTOS TEORICOS PARA DETERMINAR LA SOLVATACION PREFERENCIAL Y TOTAL

A) TRATAMIENTO TERMODINAMICO DEL SISTEMA AGUA-PROTEINA-COSOLUTO

Timasheff (70) utiliza la notacion de Scatchard (71) ý Stockmayer (72) = designa al agua (principal solvente) como la componente "1", la macromolecula (soluto) como componente "2" y el solvente organico agregado como componente "3".

Todas las concentraciones las expresa en unidades de gramos de componente "i" por gramo de agua.

Timasheff considera que las mediciones termodinamicas de las interacciones dadas por = dispersion de luz, volumenes especificos parciales, equilibrio isopiestico u otras tecnicas, arrojan como resultado final el cambio en el coeficiente de actividad de la componente "3" debido al agregado de la componente "2", sin especificar los mecanismos de interaccion a

nivel molecular. Las interacciones observadas representan una sumatoria sobre el espectro entero de grados de atraccion y repulsion entre las moleculas del solvente y regiones de la proteina. De este modo puede haber moleculas del solvente totalmente inmovilizadas en regiones discretas de la proteina, con sus grados de movilidad rotacional y traslacional muy restringidos; otras moleculas pueden estar parcialmente restringidas por interacciones debiles que afecten su libertad de movimiento solo momentaneamente. Por ultimo otras moleculas pueden estar totalmente excluidas del dominio de la proteina.

Puesto que los experimentos aportan solo un valor promedio de las interacciones para todas las moleculas de un dado componente del solvente, Timasheff adopta un modelo de trabajo en el cual las moleculas pueden ser consideradas como pertenecientes a una de las dos clases = a) ligadas (considerando su acepcion mas general indica solo la existencia de una atraccion neta entre las moleculas del solvente y de la proteina). b) libres.

FURMALISMÓ TEORICO

Se introduce un gramo de la componente "1" y g3 gramos de la componente "3" dentro de un saco formado por membranas impermeables a la macromolecula. Se sumerge el saco dentro de un volumen "infinito" de una mezcla de solvente de composicion constante. Se introduce dentro de la membrana una cantidad infinitesimal dg'2 de la componente "2".

Si A1 es el numero de gramos de la componente "1" que se ligan por gramo de proteina y A3 es el numero de gramos de la componente "3" que son ligados por gramo de proteina, entonces A1 dg'2 + A3 dg'2 expresa el decrecimiento de las componentes del solvente en el estado libre dentro del saco.

La concentracion de la componente libre "3" cambia de g3 a g°3, donde

g'3 = (g3 - A3 dg'2) / (1 - A1 dg'2) (1)

En el equilibrio químico entre el solvente dentro y fuera

del saco a la temperatura T y la presion p, los potenciales quimicos de la componente "3" dentro (inside) μ 3,i y fuera (outside) μ 3,o debe ser igual.

De modo que

16

RT ln g3,i + RT ln 3,i = RT ln g3,o + RT ln 3,o (2)

Si se supone que la diferencia entre los coeficientes de actividad de la componente "3" dentro y fuera del saco se debe a las interacciones con la proteina dentro del mismo

Donde f3,i es la fraccion de la componente "3" dentro del saco que no esta ligada a la proteina. De modo que

en el equilibrio la concentracion de la componente "3" no ligada dentro del saco debe ser igual a la concentracion de dicha componente fuera del saco. Para mantener esta igualdad

88

ł

gramos de la componente "3" por gramo de agua libre debe difundir dentro del saco a traves de la membrana.

Utilizando (1), se obtiene:

dg3 = (A3 - g3 A1) dg'2 / (1 - A1 dg'2) (3)

La concentracion de la componente "2" dentro del saco, en el equilibrio es:

dg2 = dg'2 / (1 - A1 dg'2) (4)

De modo que el parametro interaccion preferencial es 💦 💡

En el caso que el grado absoluto de hidratacion de la proteina (A1) fuese conocido; la ec. (5) hace posible el calculo

de la cantidad total de solvente organico ligada a la proteína: A3.

$$A3 = (2g3/2g2) + g3A1$$
 (6)
T,p, u3

Como lo hemos desarrollado en la Introduccion, el "grado de hidratacion" de una proteina es un concepto biunivocamente vinculado a la tecnica experimental que se utilice para su determinacion. Timasheff (70) utiliza para sus calculos, como valor de A1, los resultados dados por Bull & Breese de vapor de agua ligada en equilibrio isopiestico (51), por considerar que los mismos estan cerca del valor medio arrojado por tecnicas diferentes.

B) ADSORCION SOLIDO - LIQUIDO

Ya vimos en la Parte I que en el caso de la adsorcion solido - gas, la isoterma de adsorcion de un gas simple por un solido, representa la cantidad (peso, volumen, en las condiciones standard seleccionadas) de gas adsorbidas por unidad de peso del solido.

La medida experimental de adsorcion de una solucion es el CAMBIO EN CONCENTRACION de la solucion. Segun Kipling (73), cuando un peso "m" de un solido es puesto en contacto con "no" moles de un liquido, la fraccion molar de este decrecera en un Δ x respecto a la componente "1". Este cambio de concentracion se produce porque "n1,s" moles de la componente "1" y "n2,s" moles de la componente "2" han sido transferidos a la superficie del solido, por unidad de peso del mismo. En el equilibrio quedan en la fase liquida "n1" y "n2" moles de las componentes "1" y " 2 dando una fraccion molar "x" respecto a la componente "1" (siendo la fraccion molar inicial "xo").

Es decir que:

 $no = n1 + n2 + n1, s m + n2, s m \quad (7)$ $xo = n1 + n1, s m / no \qquad (8)$ $xx = n1 / n1 + n2 \qquad (9)$ $1 - x = n2 / n1 + n2 \qquad (10)$

Como $\Delta x = x_0 - x_0$, y utilizando las ecs. (7) y (8) obtenemos:

1

y por las ecs. (9) y (10) :

 $no \Delta \times / m = n1, s (1 - x) - n2, s \times (11)$

O

 $no b \times / m = ni, s \times 2 - n2, s \times 1$ (12)

Donde "x1" y "x2" se refieren a las fracciones molares de las componentes "1" y "2" en la fase liquida.

De nodo que fundamentalmente es encontrar un metodo experimental que permita determinar "n1,s" y "n2,s".

Expresando la isoterma compuesta ", ec. (12), en funcion de las fracciones en peso,tenemos:

 $wc \Delta c / m = w1, s (1 - c) - w2, s c$ (13)

con wo = peso inicial del liquido puesto en contacto con un peso m del adsorbente.

c = iraccion en peso de equilibrio de la solucion.

wi,s ≖ peso de la componente i adsorbida por unidad de peso del acsorbente.

VINCULACION ENTRE LA ADSORCION DE AGUA ÈN FASE LIQUIDA Y GASEOSA

Bull (20) en su trabajo sobre adsorcion de agua en proteinas plantea polemicamente si existe o no vinculacion entre lo adsorbido por una proteina solida en un medio saturado en vapor de agua y la cantidad de agua "ligada" por una proteina en solucion; planteando que dicha cuestion es de fundamental importancia para el calculo de la viscosidad de las soluciones proteicas, y para la difusion de moleculas de proteina. Segun el autor no existiria ninguna relacion entre estos dos tipos de água ligada; a la primera la considera como agua de "cristalizacion" y dependeria fundamentalmente del arreglo de la estructura proteica en un estado no disuelto; la segunda dependeria fundamentalmente de la extension de la superficie total hidrofilica expuesta al agua.

En esta sección nos proponemos buscar un modelo que vincule

la adsorcion de agua en fase liquida y gaseosa.

Usando el metodo isopiestico, Bull & Breese encuentran que a partir de 80% HR las curvas de adsorcion - desorcion coinciden, en tanto que debajo de la misma se presenta un ciclo de histeresis (51).

Ellos trabajaron con albumina de huevo a 25 C, a partir de la presion de hinchamiento como funcion del volumen de la proteina hidratada, calcularon el coeficiente de compresibilidad de la proteina hidratada como funcion del contenido de agua.

Observaron que en las proximidades de 0.7 g.agua/g.p.s. la solucion cambia (en la medida que se le quita agua y la viscosidad aumenta), tomando un aspecto vitreo que se vuelve cada vez mas duro y quebradizo, a medida que la misma se seca.

Una transicion ocurre alrededor de 0.3 g.ag./g.p.s., correspondiendo dicho valor a una HR de 92 %. Cuando el contenido de agua es reducido por debajo de 0.2 g.ag./g.p.s. (correspondiendo para la albumina a una HR de 80%), la estructura vitrea comienza a quebrarse y a desmenuzarse= es en este punto que segun los autores aparece el ciclo de histeresis de adsorcion indicando la presencia de capilaridad microscopica en la proteina.

95

Los autores concluyen que el agua ligada por la proteina por encima de 92 % HR es facilmente eliminable, que se ubica entre las moleculas de proteina y que tiene el mismo calor especifico y densidad que el agua liquida; en cambio el agua ligada por debajo de 92 % HR esta mas fuertemente unida a los grupos polares de la proteina que estan dispuestos (en las proteinas solidas) en planos de tal manera que el agua se adsorba en estos grupos hidrofilicos.

Los trabajos de Bull (20,51,74 - 78) y de Chattoraj & Mitra (79 - 82) sobre hidratación de proteinas, en ausencia y presencia de solutos, estan basados en el metodo isopiestico. Pero de una lectura cuidadosa no se puede inferir con certeza si estan trabajando con proteinas en solución, determinando el agua de hidratación o si determinan la adsorción de vapor de agua por proteinas solidas.

De modo que nuestra idea fue la de determinar el agua ligada por una proteina en solucion por tecnicas diferentes, que nos permitiesen verificar si es o no posible utilizar el modelo de Guggenheim tambien a la fase liquida.

Despues de una intensa busqueda bibligrafica encontramos varios trabajos de Myers & Sircar (83 - 88) quienes plantean en los mismos la posibilidad de obtener la isoterma de adsorcion de

vapor saturado de cada uno de las componentes en el mismo solido.

De acuerdo a Myers la isoterma de una mezcla binaria puede calcularse a partir del conocimiento de las isotermas de vapor saturado de cada una de las componentes:

$$\int_{x1=0}^{1} \operatorname{ni}_{e} \sqrt{\frac{1}{x1 \times 2}} d(\sqrt{\frac{1}{x1} \times 1}) = -(\frac{1}{x1}) - \frac{1}{x2} + RT$$

Siendo esta la ec. (14), con

n1, e = n' (x'1 - x1)

x'1 = fraccion molar de la componente 1 en la fase adsorbida.

n' ≖ numero total de moles de adsorbato en la fase adsorbida. ∳s = energia libre de inmersion.

De modo que se puede calcular n1,e de los datos experimentales para mezclas de vapor no saturados:

$$n1,e = \lim_{n \to \infty} n^{2}(x^{2} + x^{1})]$$
 (15)
 p^{-}, p^{-}, s

De acuerdo a lo planteado por Myers, la isoterma de adsorcion liquido - solido depende de la bondad del modelo elegido para la fase gaseosa. Los autores analizan el modelo de Langmuir para monocapa y el de B.E.T. para multicapas, planteando la necesidad de buscar un modelo de isoterma mas realistico, ya que la isoterma de B.E.T. diverge a la presion de saturacion.

CALCULO DE LA ISOTERMA COMPUESTA DE ACUERDO AL MODELO DE GUGGENHEIM

Consideremos un adsorbente no - volatil y una mezcla binaria, y utilicemos las siguientes hipotesis:

 Las fases adsorbidas y la liquida obedecen la ley de Raoult.

FASE LIQUIDA =

$$Ps y2 = P2, s x2$$

FASE ADSORBIDA =
$$\begin{cases} P \ y1 = P1, o \ x'1 \\ \\ P \ y2 = P2, o \ x'2 \end{cases}$$

2) Los valores de la presion de los sorbatos puros (pi,o)son medidos a igual "presion de esparcimiento"

$$\begin{cases} P1, 0 & P2, 0 \\ (n1, 0 / P) dP = \int_{P=0}^{P2, 0} (n2, 0 / P) dP \\ P=0 & P=0 \end{cases}$$

\$

3) La cantidad adsorbida (n') para una solucion ideal es

$$1 / n^{2} = [x^{1} / n^{1}, o] + [x^{2} / n^{2}, o]$$

4) Que la cantidad adsorbida en monocapa es la misma para los dos adsorbatos.

5) que x'' 1 + x'' 2 = 1 y x 1 + x 2 = 1

Con estas suposiciones y utilizando para las isotermas el modelo de Guggenheim:

 $ni = {Nici(p/pi*)}/{[1+(p/pi*)][1+(c-1)(p/pi*)]} (16)$

1

con pi* = pi,s pi**

Encontramos que:

Myers obtiene, utilizando el modelo B.E.T. que

 $\lim (x^{1} - x^{1}) = 0$

p-≯⊃s

y vemos que si en la expresion anterior hacemos

lim $(x^{1} - x^{1})$] = 0 p=ps G

pi **->1

For otro lado:

n' = Nici pi,o / ps yi{pi,o/pi,s(ci-1)(i/p2** -i/pi**)+
p=ps

+(p1**/p2** +1)3+(p1,в p1**+p1,o(c1-i)).(1-1/p2**)

y comprehamos que

lim [n'] = **00** p=ps G p1**-→1

que es la incerteza que obtiene Myers al utilizar el módelo de B.E.T.

De modo que:

n1, e = lim n' (x'1 - x1)

p-**}**ps

sera de acuerdo al modelo de Guggenheim

ne={N1: ix2pi**p2**[c2(1-pi**)~c1(1-p2**)]}/

ec. 17)

CALCULO DE LA ISOTERMA INDIVÍDUAL

Si de alguna manera podemos medir experimentalmente la isoterma de adsorcion de una componente liquida en un adsorbente solido (digamos la componente "1"), y trabajamos en el sistema Macrocanonico, suponiendo:

que el adsorbente tiene N sitios independientes,
 localizados e indistinguibles.

2) que "qi" es la funcion de particion de una unica molecula en el sitio "i".

3) que q2=q3=q4=...=q=qL, donde qL es la funcion de particion del estado liquido.

4) q1=cq para la monocapa.

5) $\lambda q=Ww/s / p**$ $\lambda = actividad del agua y Ww/s es la fraccion en peso de agua libre en la solucion una vez restablecido el equilibrio.$

Tendremos que la isoterma individual sera:

w1,s ={N1c1(Ww/s /p1**)}/{[1+(c1-1)(Ww/s/p1**)][1-(Ww/s/p1**)]}

a la cual denominaremos ecuacion (18).

Lo cual nos permite ajustar los datos experimentales con un modelo teorico, coincidente al de Guggenheim, ya que como

÷.

ps/pi* = ps/p1,s pi** entonces 'ps/p1,s=Ww/s

Por otro lado x1=ps y1/p1,s, por lo tanto (1/p1**) tiene dimensiones de un coeficiente de actividad.

De acuerdo a esto:

 $\Delta \mu m, liq = -RTln(c/p1**) \quad (19)$

۸ / M,lig= RTln(p1**) (20)

De modo que ahora estamos en condiciones de calcular la isoterma compuesta(ec.(13)), bajo la suposicion que la componente "2" no se adsorba

w1,e = w1,s(1-c) (21)

DETERMINACION EXPERIMENTAL DE LA ISOTERMA INDIVIDUAL DE AGUA LIGADA POR SUSPENSIONES DE COLAGENO EN SOLUCIONES AGUA-DIOXANO A 300

MATERIALES

-Se utilizo polvo de piel bovina depilada y desengrasada suministrada por el CENTRO DE INVESTIGACIONES DE TECNOLOGIA DEL CUERO.

-Como cosoluto se utilizo Dioxano Dorwil Ind. Arg. Pro Analisis, P.M. 88.108g.

-Las muestras se termostatizaron en una estufa Ionomex Ind.Arg. a 30C.

METODO

Utilizamos la tecnica propuesta por Cartensen y colaboradores en sus trabajos sobre Sephadex y Hemoglobina (87),(88), con algunas modificaciones. Utilizando la acepcion para agua ligada como aquella que no se mezcla con el dioxano:

-Se pusieron cantidades conocidas de colageno bovino en polvo (previamente se determino para la misma muestra el p.s., secando en estufa y vacio), en pequeños sobres hechos con sacos de dialisis.

-Se colocaron a dichos sobres en pesa-filtros conteniendo soluciones de distintas concentraciones de agua-dioxano.

-Se dejo equilibrar 48 hs en estufa a 30 C.

-Una vez que se logro el equilibrio se retiraron los sacos de dialisis de las soluciones, posteriormente se los peso nuevamente, y se determino el contenido de agua total por la tecnica de Karl Fisher (Ver Apendice V).

-Como conociamos el peso total de la muestra (colageno seco + agua + dioxano), el del colageno y el agua total en la misma, pudimos determinar la fraccion en peso de dioxano en la muestra.

-Tomamos una alicuota de cada una de las soluciones que estuvieron en equilibrio con los sobresitos y por aplicacion del metodo de Karl Fisher determinamos la relacion (Ww/Wd)sol.

-Cono la relacion en fracciones en peso de agua-dioxano en la solucion debe ser la misma a la de agua libre-dioxano en la muestra:

Wfw = Wd (Ww/Wd) sol.

-Conociendo la Ww total en la muestra y habiendo calculado Wfw se puede determinar la fraccion en peso de agua ligada:

Wbw = Ww - Wfw

De esta manera obtenemos la cantidad de agua ligada en gramos por 100g de colageno seco.

Para corroborar nuestra hipotesis de que el dioxano no se fija al colageno, estudiaremos el efecto del dioxano sobre la estabilidad termica de fibras de tendon de Aquiles bovino, ya que la temperatura de desnaturalizacion esta vinculada a la temperatura

de contraccion.

De acuerdo a la Tabla VII, los valores de Ts (Temperatura de contraccion en solucion agua-dioxano) fueron del mismo orden que Ts,o (temperatura en agua pura). Estos resultados nos permiten suponer que en primera aproximacion la adsorcion de agua es preferencial frente a la de dioxano.

AJUSTE DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

Los datos experimentales (Figura 17) fueron ajustados con el modelo de Guggenheim arrojando los siguientes valores:

с	N	p**	m.ر ک	Ajim	S
6,086	373,057	1,058	-1054,963	339,956	20,73

ENJ=(g.ag./100g.p.s.) $A_{\mu i} = (cal/mol) i=m,M$

ioa

TABLA VII

TEMPERATURA DE CONTRACCION DE FIBRAS DE COLAGENO DE TENDON DE AQUILES BOVINO SUMERGIDAS EN SOLUCIONES DE AGUA - DIOXANO.

CONCENTRACION (molal)

TEMPERATURA DE CONTRACCION (9 C)

0,25	63,93
0,50	62,62
1,00	60,10
2,00	58,92
4,00	62,21

TEMPERATURA DE CONTRACCION EN AGUA PURA: T = 63,26 P C.



FIGURA 17 ISOTERMA DE ADSORCION DEL AGUA LIGADA POR SUSPENSIONES DE COLAGENO EN SOLUCIONES DE AGUA - DIOXANO A 30º C.

CONCLUSIONES

Los resultados de las isotermas de adsorcion de vapor de agua en fibras de colageno a 25 C y 35 C hechas por el metodo gravimetrico arroja los siguientes valores:

CULAGENU A 25 C:	COLAGENO	A	25	C:	
------------------	----------	---	----	----	--

с С	N	р*/po	∆j⊥m	۸	S
21,10	13,65	1,37	-1648,80	189,92	0,76
COLAGEN	0 A 35 C				₩
26,94	11,14	1,26	-1846,53	139,35	0,62
		r ny ne es es de ne es n n		، هه الله هـ. هـ. هـ. هـ خد جو جو هـ ه	

[N]=(g.ag./100g.p.s.) [4]ui] = (cal/mol) i=m,M

÷

109

-

¥.

Comparando con los datos de la isoterma en la fase liquida vemos que:

I) La adsorcion en la monocapa es preferencial en el caso de la adsorcion en fase liquida. Resultado previsible ya que la macromolecula posee mas grados de libertad y ofrece mas sitios hidrofilicos capaces de fijar agua.

II) El alto valor de N para la isoterma en fase liquida respecto a los valores en fase gaseosa, podrian confirmar las afirmaciones de Bienkiewicz (89) de que el contenido de agua en piel o cuero determinado por el metodo de Karl Fisher siempre da los valores superiores a los determinados por otros metodos (el autor los compara con los resultados arrojados por mediciones de Resonancia Nuclear Magnetica- RMN).

III) Esta situacion plantea la necesidad de utilizar otras tecnicas (por ejemplo RMN) para poder determinar el error introducido por el metodo de Karl Fisher.

IV) Se puso a punto una tecnica experimental que permite determinar la isoterma en fase liquida de una proteina (hasta el momento no figura en bibliografia ninguna mencion al respecto).

Se encontro que el modelo de Guggenheim ofrece una buena

posibilidad de ajuste para los datos experimentales, ya que su planteo teorico para suspensiones resulta aceptable.

Es importante notar que los errores experimentales son altos, en particular a baja actividad de agua. Esto se debe en parte a la compleja operatoria experimental, pero probablemente mas aun a que la suposicion de que el dioxano no interactua con la proteina no es totalmente cierta a altos contenidos de dioxano.
SISTEMA COLAGENO-AGUA-SURFACTANTE = EL PORQUE DE SU ESTUDIO

De acuerdo a nuestro interes de que nuestro trabajo de investigacion este vinculado a las necesidades de la industria nacional y latinoamericana abordamos el estudio basico de la proteina mas importante del angulo de la tecnologia del cuero= el colageno.

En estrecha relación con el C.I.T.E.C., (Centro de Investigaciones de Tecnologia del Cuero (CIC-INTI)), tratamos de dar una respuesta basica a las problematicas que por su intermedio nos planteaban los curtidores.

Desde el punto de vista fisicoquímico el cuero es colageno curtido; en el proceso de curticion son utilizados los surfactantes (tantos ionicos como no ionicos) para conseguir mayor apertura de la trama, entrando en juego los siguientes mecanismos:

a) Descenso de la tension interfacial en sistemas acuosos.

b) Actividad liotropica sobre el colageno : hinchamiento, solubilizacion y descenso de la temperatura de contraccion, apertura de la trama fibrosa para la preparacion de la curtiente.

c) Neutralizacion de cargas aŭmento de la interaccion reactiva (piquelado), igualacion (tintura).

d) Accion en los grupos hidrofobicos especial efecto en solubilizacion de grasas y secado.

Mas alla de las razones de uso del surfactante, la interacción colageno-surfactante es compleja, no esta claramente entendida y es de dificil control. Su acción depende del estado del colageno (ej: nativo, parcialmente modificado o curtido), del tipo de surfactante y de las exactas condiciones en que este ha sido usado (ej: temperatura, ph, concentración salina).

De acuerdo a nuestros trabajos sobre el tema (90,91,92), entendimos que debiamos profundizar el estudio del sistema Agua-Colageno-Surfactante.

Nosotros habiamos trabajado con tendon de Aquiles bovino y con tiras de corium bovino; midiendo como parametro de estabilidad la Temperatura de contraccion (91) (ver Apendice VI). Previamente habiamos encontrado el rango de concentracion

adecuado para las soluciones, siendo las utilizadas 0,0314 M y 0,0628 M. Trabajamos a ph = 2, 7, 13 (que son los requeridos por la industria).

De la Figura 18 podemos concluir que los surfactantes ionicos (SDS, Hyamina) son mas activos en decrecer Tc al ph al cual la proteina tiene la misma carga que el surfactante.

En el caso de surfactantes no-ionicos (Triton X - 100, polietilenglicol), es un concepto generalizado que tienen un ligero o casi nulo efecto sobre la temperatura de contraccion. Nuestros resultados coinciden con esto, salvo a ph 13, donde hay un brusco descenso de la temperatura de contraccion. Un efecto similar obtuvimos para polietilenglicol 200.

En la Figura 19 observamos que el punto de enturbamiento (ver Apendice VII) para soluciones de Triton X-100 baja fuertemente a ph básico.

Estos resultados preliminares nuestros se contraponian a los citados en bibliografia; en rasgos generales, los autores plantean que en el caso de surfactantes ionicos es de esperar que el mayor efecto desnaturalizante se produzca cuando los detergentes son fuertemente adsorbidos por la proteina (es decir cuando ambos tienen cargas distintas) (93-105); de modo que nos

114

ين-







FIGURA	19.	PUNTO	DE	ENTURBAMIENTO	DE	TRITON	X 100	(T	vs.	ph)
						•				

	D.0314M	D.D62	BM
ph	PE a TQC	ph	PE a TQC
1.80	65	1.82	65.5
7.10	67.6	б. 84	68.8
8.42	69.6	8.97	71.9
11.52	61	11.35	62.5

planteamos el estudio mas exhaustivo del sistema para dilucidar los mecanismos que entran en juego.

DETERMINACION EXPERIMENTAL DE LA HIDRATACION PREFERENCIAL EN LOS SISTEMAS COLAGENO-AGUA-SURFACTANTÉ A 30 C

MATERIALES

-Se utilizo polvo de piel bovina depilada y desengrasada suministrada por el C.I.T.E.C.

-COSOLUTOS: Surfactante no-ionico: Triton X-100. Rohm & Haas, FM=647g.

Surfactante anionico: SDS. Sintorgan, PM=288,4g. Surfactante cationico: Hyamina 1622. Fluka A.G., PM=466,09g (ver Apendice VII).

-Se prepararon soluciones de detergentes 0,0628 M y 0,0314 M con agua previamente ajustada al ph indicado, 2, neutro y 13; él mismo se ajusto mediante acido sulfurico puro (1,2 ml en 21 de agua bidestilada) y con soluciones saturadas de hidroxido de

115

sodio (29,2 ml de HONa 50% P/V en 21 de agua bidestilada).

- Se controlo la calidad del agua bidestilada, pasada posteriormente por columna de intercambio de resina ionica, garantizando $0=0.65 \ \mu$ S a ph neutro.

-El ph fue medido en un equipo Orion Research Microprocessor ph/milivolt meter 811; y la conductividad en un Conductivity Meter CDM 3 Radiometer Copenhagen.

-Las densidades de todas las soluciones se determinaron en un Densimetro Digital Anton Paar DMA 46 a 20 C.

-Las medidas de Absorbancia fueron realizadas (a las longitudes de onda requeridas) en un Espectrofotometro UV-Vis de doble haz Metrolab 2500 que tiene adosado un Registrador grafico Soltec 1242.

-Las muestras se termostatizaron en una estufa Ionomex Ind.Arg. a 30C, y fueron centrifugadas en una centrifuga Rolco a 6000 RPM durante 15 minutos.

METODO

-Previo lavado en agua bidestilada, el polvo de piel se dejo secar en heladera a 4C durante 24 hs.

,- Este polvo de piel hidratado se puso en tubos de centrifuga con la solucion en estudio (datos = peso colageno hidratado, peso de la solucion de surfactante).

- Estos tubos de centrifuga perfectamente tapados se dejaron por 48 hs en estufa a 30 C.

- Para determinar el P.S. del colageno mencionado, se dejo con silica gel y vacio a la muestra, durante 48 hs.

- Una vez logrado el equilibrio del sistema Agua-Detergente-Colageno, se centrifugaron las muestras. Se separo el sobrenadante.

- Se midio la densidad del sobrenadante a 20 C.

- Mediante el Espectrofotometro de doble haz^o se midio la

absorbancia del mismo para poder determinar la concentracion final (mediante curva standard de Absorbancia vs. Concentracion, para cada uno de los detergentes, en la zona donde se cumple la ley de Beer).

En el caso del Triton X-100, el rango de diluciones -4 -3 usada fue de 5 10 M a 10 M, λ = 285 nm.

En el caso de Hyamina 1622, el rango fue de 5×10 M a 10 M, λ = 225 nm.

Se eligio la longitud de onda a la cual se realizo la medicion como la de la maxima pendiente (ver Figuras 20 - 23).

En el caso del SDS, las mediciones se realizaron en forma indirecta, utilizando el metodo de Mukerjee (106) para poder determinar la presencia de iones sulfatos (ver Apendice VIII). Las mediciones se realizaron en el visible a λ = 621 nm.

Mediante el conocimiento de la concentracion final y la densidad del sobrenadante, junto con los datos iniciales del peso del colageno hidratado y de la solucion y del peso seco, se podía determinar la hidratacion preferencial.







FIGURA 22. TRITON X-100 75 x10⁻⁴ M



- En todos los casos trabajamos a los tres ph-mencionados y <mark>a las</mark> dos concentraciones indicadas.

RESULTADOS OBTENIDOS

En la Tabla VIII tenemos resenados los resultados de una de las tantas experiencias (totalmente reproducibles) para Triton X-100 a 0.0314 M y 0.0628 M y a los tres ph. Presentamos en forma detallada el tratamiento estadistico que hemos realizado para los valores de la hidratación preferencial; que nos indica que el diseno experimental es correcto. Utilizamos el Diseno Factorial (107,108).

Para la hidratacion preferencial utilizamos la siguiente expresion:

$$(\partial g_1 / \partial g_2) = - 1 / g_3 (\partial g_3 / \partial g_2)$$

T, μ^1, μ^3 T, μ^1, μ^3

vinculada a traves de la derivada del segundo miembro (ecs. 5 y 6) a los valores medidos experimentalmente.

En las Tablas IX y X estan los resultados para Hyamina 1622 y SDS respectivamente.

······································	IKI	TON X-	100				
	ACIDO	x ij	NEUTRO	x ij	BASICO	x ij	x 1j
	X 111= 28,01	x 11	x ; 211 ⁼ 22,23'	x 21	x `311 ^{=31,87}	x 31	x T
0.0314 M	X ≈ 25,93 112	26,12	X = 21,74 212	20,55	X =40,35 3 12	39,29	28,65
	X = 24,41. 113		X = 17,68 213		X = 45,6 313	3	
	X = 16, 10 121 X = 24.48	x 12 20.92	X = 4,51 221 X = 25,65	x 22 5 15,65	X = 42, 321 X = 27,	33 X 32 57 31,68	x 2 22,75
0.0628 M	122	,	222		322	·	ŗ
	X = 22,18 123		X = 16,5 223	79	X ≔ 25 323	o , 16	
<u> </u>		x 1		x z		× _3	x
	2	3 52		18, 10		35.41	3 25.7

ANALISIS ESTADISTICO DE LA HIDRATACION PREFERENCIAL

A = PH, P NIVELES (1 VARIACION DE A, P=3)

B = CONCENTRACION, m NIVELES (j VARIACION DE B , j= 2)

k = Nº DE REPETICIONES k = 3

TABLA VIII

$$(SC) = m.n \sum_{i=1}^{k} (\bar{x} - \bar{x})^{2}$$

$$A \qquad i_{i=1} 1$$

$$(SC) = p.n. \sum_{j=1}^{m} (\bar{x} - \bar{x})^{2}$$

$$(SC) = n \sum_{i=1}^{k} \sum_{j=1}^{m} (\bar{x} - \bar{x} - \bar{x} + \bar{x})^{2}$$

$$AB \qquad i_{i=1} \int_{j=1}^{k} \frac{m}{j_{i}} (\bar{x} - \bar{x})^{2}$$

$$B \qquad i_{i=1} \int_{j=1}^{m} \int_{j=1}^{0} (x - \bar{x})^{2}$$

$$B \qquad i_{i=1} \int_{j=1}^{m} \int_{j=1}^{0} (x - \bar{x})^{2}$$

$$F = ((SC) / (p - 1)) / ((SC) / (p m (n-1))) = 10, 34 \neq 9,41 \text{ slq.} 10\%$$

$$F = ((SC) / (m-1)) / ((SC) / (pm (n-1))) = 3,4120 \checkmark \text{ val.tab. ND sig.}$$

$$F = ((SC) / (m-1)) / ((SC) / (p-1)(m-1)) = 6,8463 \geq \text{val.tab. pare 0.025}$$

$$B \qquad \text{error} \qquad AB$$

F = ((S C) / (pmn - 1)) / ((S C) / pm(n-1)) = 2,1315> val tab 0.10 total error

concent.							
والمستعد والمس							
x 11 ⁻ 112 112 113 113	=-19,01 =-14,40 =-12,33	x 11 -15,25	x =-20,59 211 x =-22,71 212 x =-20,21 213	× 21,10 -21,10	X =-17,86 311 X =-16,49 312 X =-20,20 313	x 31 -18,18	× - 18, 18
x 121 121 122 X123	=-13,76 =-13,49 2 =-12,02	× 12 -13,06	X =-25,71 221 X =-24,57 222 X ₂₂₃ =-26,63	× 22 -25,64	X =-20,85 321 20,85 X =-20,83 322 X ₃₂ ₹-23,02	x 32 -21,57	× 2 -20,10
Ŧx	- 14 , 1	× ۲		x2 _. -23,37	ς.	x3 - 19, 61	X 7 -19,14

							_
		Ū.55		81.54		76 05	
tt tx		150 . 15 7		103.41		126.78	
BASICO		X = 164.65 311	X = 135.64 312	X = 100.88 321	X = 105.95 322		
۲:۲		50.81		1.50		26.16	
NEUTRO		X = 46.71 211	X = 54.91 212	x = 0.72 221	X = 2.23. 222		
X1 j		10.69		139.70		75.20	
ACIDO		x ₁ 1,16.52	x = 2.86 112	x = 147.96 121	X =131.43 122		
듐	conc .	0.0314 M).)_"'.(,(×	

1



por lo indirecto del metodo.

HIDRATACION PREFERENCIAL PARA SOLUCIONES DE SDS

For otra parte, como una prueba adicional consideramos valido analizar nuestros resultados para el sistema aguacolageno-surfactante con el tratamiento propuesto por Chattoraj & Mitra (79,80). Los autores analizan ambos casos utilizando como metodo experimental el isopiestico , y consideran (a partir de la ley de Rault) que la humedad relativa p/po es igual a la actividad al del agua en una escala de fraccion molar. El potencial químico µ1 del agua ligada de actividad al es

$$\mu$$
i = μ i, b + RT in ai

siendo µ1,b = potencial quimico standard del agua ligada, cuando la actividad (o p/po) deviæne la unidad.

Euando p/po = 1, el agua en el seno de la solucion (bulk) permanece en equilibrio con el agua ligada, de modo que μ 1 permanece constante a traves de las fases ligada y libre, entonces μ 1,b = μ 1,f. De modo que μ 1,b y μ 1,f a p/po = 1 deviene un conveniente potencial químico standard de referencia para expresar el cambio de energia libre debido a la interaccion agua-proteina (y/o soluto).

los autores analizan el exceso superficial de Gibbs dado por

las siguientes expresiones:

$$\int 1 = A n 1 - (n1, f / n2, f) A n2$$

$$\int 2 = A n2 - (n2, f / n1, f) A n1$$

para el agua y el cosoluto respectivamente. Ellos trabajan con una proteina globular (albumina de huevo), y como cosoluto urea (desestabilizador de la estructura proteica) y estabilizadores como cloruro de cesio, cloruro de sodio, etc.

Fncontrando que en el caso de cloruro de cesio

$$\Gamma_1 \circ \gamma \Gamma_2 \circ$$

En el caso de la urea

$$\Gamma_1 \circ \gamma \Gamma_2 \circ$$

De modo que los autores concluyen que en el caso de un estabilizador, el agua fuertemente ligada posiblemente pierda su capacidad de disolver grandes cantidades de soluto en la region interfacial, de modo que el agua adsorbida produce un exceso superficial positivo. En estas condiciones la ecuación de Gibbs

predice aumento de concentracion de soluto en el seno de la solucion.

Por el otro lado, ante la presencia de un desestabilizador, la debilmente ligada agua interfacial puede permanecer asociada con una importante cantidad de cosoluto fuertemente unido en la region interfacial,de modo que en este caso el soluto devenga el exceso superficial; y de acuerdo a la ec. de Gibbs, la energia superficial de exceso baje significativamente.

Los autores concluyen que esperan que las proteinas (siempre en el caso de las globulares) liguen excesos de moleculas de alcohol y detergentes a partir de soluciones acuosas, siendo fuertes desestabilizadores para la proteina.

Analizando nuestros resultados para Triton X - 100 a los tres ph, para el sistema agua-colageno-Triton X - 100, encontramos

$$\Gamma_1 \quad o \quad \gamma \quad \Gamma_2 \quad o$$

de modo que por ser el colageno una proteina fibrilar, corroboramos que la misma al adoptar la forma globular (mas estable) se desnaturaliza.

. جەر Por otro lado abordamos el analisis de los resultados experimentales del sistema agua-dioxano-colageno (que habiamos analizado desde el punto de vista del analisis de la hidratacion preferencial (Tapla XI), encontrando que:

y que

es decir que el dioxano es un desestabilizador de la estructura colagenica para molalidades mayores de 17 molal; de modo que para el estudio de la isoterma de adsorcion, es correcta la suposicion realizada de considerar al agua ligada como aquella que no se mezcla con el dioxano.

TABLA XI. HIDRATACION PREFERENCIAL DEL SISTEMA AGUA-COLAGENO-DIOXAND A 309C

سئنا/s	g ag/100g ps	(Jg1/ Jg2) T,µ1,µ3	m3,1
0,184	-372,2302	-1,9111	98,0316
0,262	-176,6529	-14,5479	44,0541
D , 352	-192,7168	- 1,5537	26,2527
0,40	0,32	D	17,0191
0,5141	31,5493	0,3310	10,2796
0,638	52,195	0,5183	6,2699
0,778	51,8881	0,5219	3,1859
0,889	93,5345	0,9883	1,3612

CONCLUSIONES

De acuerdo a la teoria de Timasheff para proteinas globulares (109,110), la hidratacion preferencial (ec.5) es una simple medida del exceso de agua y deficiencia del cosoluto en la region de la superficie de la proteina.

autor concluye que en el caso de las E1 proteinas globulares, un detallado analísis de la interaccion preferencial entre las mismas y las componentes de un sistema agua-cosoluto estabilizador de estructura; indica que la estabilizacion estructural es debida a la separacion de una micro fase del solvente en la superficie de la proteina, con acumulacion de moleculas de agua en dicha superficie. Este exceso de agua no lo interpreta sin embargo en terminos de una capa de hidratacion consistente en moleculas de agua ordenadas en la superfície proteica. Las interacciones del solvente observadas estan [°]relacionadas a la estructura del solvente y a la interaccion desfavorable entre la superficie proteica y las moleculas de cosoluto. De acuerdo a este enfoque una hidratacion medida en tales sistemas puede ser una accidental consecuencia de las

interacciones complejas entre las moleculas de agua, cosoluto y proteina; y no juegan dichas capas de aparente hidratacion ningun rol especial en la estabilizacion de la estructura proteica.

Finalmente, la separacion de la micro-fase en la superficie de la proteina puede ser interpretada como un aumento de la energia libre superficial del agua (o tension superficial) producida por el cosoluto. Una consecuencia de esto, dada necesariamente por la isoterma de adsorcion de Gibbs, seria un alejamiento de las moleculas de cosoluto de las interfases, produciendo, en consecuencia, un exceso de agua o aparente hidratacion.

En el caso del colageno, proteina fibrilar (ver Apendice VI), el efecto del cosoluto (detergentes) produciria el efecto inverso: la proteina al adoptar la forma globular (mas estable) se desnaturaliza, de modo que el detergente actua como un desestabilizador de la estructura proteica.

En el caso del Triton X - 100 ,(Apendice VIIa)), vimos en la Figura 18, que a ph basico tenia un marcado efecto desestabilizante (marcado descenso de la Tc) y de acuerdo a la Figura 19 vemos que al mencionado ph el surfactante es menos hidrofilico a ph basico. Esto coincide con nuestros resultados dados en la Tabla VIII, en la que vemos:

125

i)
$$(\partial g_1/\partial g_2)$$
 y en consecuencia $(\partial \mu 3/\partial m_2)$
T, μ_1,μ_3 T,p,m3

varian levemente en el rango de las concentraciones usadas.

ii) La hidratacion preferencial varia con el ph, siendo la misma para ph acido mayor que a ph neutro y menor que a ph basico

BASICO ACIDO NEUTRO

 iii) La formacion de una nueva fase (agua "no-solvente") es termodinamicamente desfavorable. El plegamiento del colageno (desnaturalizacion) seria la respuesta termodinamica del sistema.

En el caso de la Hyamina 1622, detergente cationico (ver Apendice VIIb)), vimos en la Figura 18 que su accion desestabilizadora es acentuadisima a phacido (donde existe mas concentracion [H+] a temperatura ambiente. De acuerdo a nuestros resultados (Tabla IX), vemos analizando los valores encontrados para la hidratacion preferencial que esta es mayor para phacido; cumpliendose la relacion siguiente para la hidratacion preferencial: ACIDA BASICA NEUTRA y si lo analizamos en funcion de las molalidades iniciales y finales vemos que se cumple la misma relacion, lo que esta indicando que hay mayor concentracion de detergente en el sobrenadante final, es decir

que hay una exclusion del cosoluto. El hecho que los valores de hidratacion preferencial sean en los tres ph negativos, indicaria que el efecto es menos favorable que en el caso de los detergentes no-ionicos. Ya que en el caso de los surfactantes ionicos tambien existe, probablemente, una interaccion de los grupos polares del colageno con los grupos ionicos de los mismos.

En el caso del SDS (detergente anionico), de acuerdo a la Figura 18 vemos que desnaturaliza el colageno a ph basico (donde existe mayor concentracion de [OH-]) a temperatura ambiente.

Los resultados de la Tabla X parecerian mostrar esta tendencia, aunque no asi para el caso de phacido y neutro. Creemos que esta falta de precision es debida a los distintos artificios quimicos que tuvimos que utilizar para poder determinar la concentracion final, y que obviamente introducen un grosero error. Cosa que no ha ocurrido con el Triton X-100 y la Hyamina 1622 donde la medicion es directa.

PARTE III. CONCLUSIONES FINALES

Lo expuesto en el presente trabajo se puède sintétizar basicamente en lo siguiente:

El modelo teorico elegido para el estudio de la adsorcion de agua por proteinas puede ser considerado valido tanto para agua en fase liquida como gaseosa.

La dependencia de la adsorcion de vapor de agua por biopolimeros, tal como fue analizada, brinda -ademas de una racionalizacion de la variacion de los parametros de la isoterma con la temperatura- la posibilidad de predecir (dentro de ciertos rangos y con las restricciones enunciadas) isotermas a diferentes temperaturas a partir del conocimiento de dos de ellas.

Los ciclos de adsorcion - desorcion de vapor de agua por mioglobina muestran que una pronunciada deshidratacion produce una desnaturalizacion de la proteina. Esto, que resulto ser valido en otras proteinas, pone un toque de atencion sobre la metodologia utilizada en el estudio de la adsorcion; alertando

sobre todo aquel resultado que se obtenga partiendo del secado total de la muestra -como es comun.

La valoracion del agua fija a sitios primarios mediante la isoterma, brinda resultados sorprendentemente coincidentes con los obtenidos mediante tecnicas mas sofisticadas. Esto abre un campo importante al permitir tal estimacion mediante una tecnologia de bajo costo.

El estudio del sistema colageno – agua – surfactante para diferentes surfactantes y distintos pH mediante el analisis de la hidratacion preferencial, permitio dar una explicacion al aparentemente paradojico efecto de desnaturalizacion a diferentes pH. La evidencia que la hidratacion preferencial se correlaciona con el efecto desnaturalizante en colageno, permite proponer una explicacion al efecto del ph; imposible con las propuestas existentes hasta el momento.

El estudio de las isotermas bajo diferentes condiciones resulta un aporte al conocimiento de la relacion entre hidratacion y estabilidad proteica.

APENDICE I: MOLECULA DE AGUA

El vapor de agua consiste de moleculas separadas de agua. Cada una de ellas es una molecula curvada H-O-H con un angulo de 105 (Fig.A). En el estado gaseoso el atomo de oxigeno tiene 6 electrones en la 2da capa (dos electrones 2s y cuatro electrones 2p).

Cuando los atomos de oxigeno entran a interaccionar con los atomos de hidrogeno, hay una sobreposicion entre los electrones s y p. Los 6 electrones provenientes del oxigeno y los 2 electrones provenientes del hidrogeno interactuan formando orbitales a lo largo de las direcciones que unen al atomo de oxigeno con los vertices de un tetraedro (Fig.B).

Los 8 electrones alrededor del oxigeno 3

no son ni s ni p, forman el orbital hibrido sp. De los 4 electrones orbitales, 2 son usados para la union D-H, y los dos restantes permanecen como orbitales libres para el par desapareado de electrones. A causa de la repulsion de los pares de electrones, el angulo H-O-H no es exactamente el angulo tetraedral(109 28'), pero un poco menor.

Los orbitales libres en los cuales se ubican los pares de electrones desapareados confieren una interesante propiedad a la molecula de agua (Fig C). El centro de gravedad de la carga negativa de la molecula de agua, no coincide con el centro de gravedad de la carga positiva: la molecula neutra de agua puede ser considerada como un dipolo electrico. Siendo su -18

momento dipolar en la fase gaseosa de 1.87x10 e.s.u.

La existencia de orbitales libres en el atomo de oxigeno no solo contribuyen al caracter dipolar de la molecula de agua sino que tiene otras importantes consecuencias.

Los dos pares aislados pueden unir electrostaticamente a otros 2 atomos de hidrogeno: Es lo que ocurre en el caso de cristales de hielo (3).

Los atomos de oxigeno yacen en capas, cada una de ellas consiste en una red abierta, formada por anillos hexagonales plegados (Fig.D). Cada atomo de oxigeno esta tetraedricamente rodeado por otros 4 atomos de oxigeno (Fig.E).

Entre cada dos atomos de oxigeno hay un atomo de hidrogeno el cual provee las ligaduras de hidrogeno (Fig.F).

i31

En cualquier instante, los atomos de hidrogeno no estan situados exactamente a mitad de camino entre los dos oxigenos. Cada atomo de oxigeno tiene dos atomos de hidrogeno cerca de el (los dos atomos de hidrogeno de la molecula de agua), a una distancia 1.75 A.

Esta estructura de red que forman las moleculas asociadas de agua, contiene regiones intersticiales del tamano de una molecula de agua. De manera que una molecula de agua libre puede ocupar estos sitios, con una pequena disrupcion de la estructura de red (Fig.G).

Resultados de R.X. y de otras tecnicas evidencian que en el agua existe un grado de orden de corto alcance caracteristico de la estructura tetraedral de las ligaduras del hielo.

En el agua liquida ademas de las moleculas de agua que forman la red, existe una cierta fraccion de agua estructuralmente libre, no asociada, que ocupa los intersticios de la red (Fig. H).

Cuando una molecula de agua pertenenciente a la red rompe sus puentes de hidrogeno con la misma, puede ocupar un sitio intersticial y rotar libremente. De modo que la clasificacion de

las moleculas de agua en pertenecientes a la red o libre (intersticial) no es estatica, sino dinamica -clusters o racimos de moleculas de agua cooperan para formar la red, y al mismo tiempo, la estructura de red puede romperse- Una molecula de agua puede estar libre en un instante, en una posicion intersticial, y en el instante siguiente unirse a la red. Este modelo propuesto por Frank Wen y cuyos calculos mecanicos estadisticos fueron desarrollados por Nemethy y Sheraga, consiste en cumulos cuyas moleculas poseen uno, dos, tres y cuatro enlaces de hidrogeno, segun sea su ubicacion en el -10 -11

mismo. Estos cumulos cuya vida media es de 10 a 10 sg se encuentran sumergidos en un "mar" de moleculas libres. La formacion y destruccion de los clusters esta relacionada a la fluctuacion local de energia.

DEFINICION DE ESTRUCTURA

De acuerdo al analisis de Grigera (4) para definir una estructura debemos:

 Poder definir ciertas unidades estructurales mediante distancias, angulos de enlaces, etc.

2) Que exista un numero finito de dichas entidades.

3) Que el tiempo de vida de las mismas sea al menos de un orden de magnitud superior al periodo de vibracion molecular

Los solidos cumplen los tres items, el vidrio no cumple el item 2. En el caso del agua se ha observado mediante R.X. y difraccion de neutrones, regularidades que confirman la existencia de estructuras que poseen un tiempo de vida del orden -12

de 10 sg (determinado por tecnicas de relajacion dielectrica),

mientras que el periodo de vibracion molecular es del orden de 10 sg. De este modo podemos hablar de estructura del agua y considerarla como un liquido estructurado o asociado.

De los datos necesarios para determinar una estructura: distancias y angulos, las tecnicas que en solido tienen buen resultado (difraccion de neutros y R.X.) solo pueden en el caso de los liquidos describir la funcion de distribucion radial (distancia de una molecula a otra), pero queda pendiente la distribucion angular. Esto, unido a lo complejo que resultan las 'teorias sobre el estado liquido, hace dificil una descripcion de ellos, a lo que se suma las características peculiares de las

moleculas de agua. Existen varios modelos que intentan explicar la estructura del agua, ninguno de ellos aceptado universalmente. Cada modelo fue hecho teniendo en cuenta un modelo experimental diferente (R.X., parametros termodinamicos, etc.). La aplicacion del modelo a otras tecnicas no da el acuerdo deseado.

Los modelos estructurales pueden clasificarse globalmente en modelos continuos o modelos de mezcla.

Los primeros son aquellos en que las moleculas estan interconectadas mediante puentes de hidrogeno siendo indistinguibles unas de otras. En los modelos de mezcla existen ciertas moleculas que forman parte de una de las especies y otras de diferentes especies, aunque pueden intercambiarse entre si. Entre los modelos de mezcla se encuentran los de "dos estados', "intersticiales", de "cumulos", etc.
LAS SIGUIENTES FIGURAS SON REPRODUCIDAS DEL LIBRO DE BOCKRIS (Ref 3)



FIGURA A. LA MOLECULA DE AGUA ES NO LINEAL



FIGURA R. ARBITALES HINRIDOG DE UN ATUMU DE OXIGENU

molecula de agua dipolo electrico centro de centro de carga positiva H o H H qd • µ • 1 87 debyes centro de los nucleos de oxigeno FIGURA G. LA MOLECULA DE AGUA PUEDE SER CONSIDERADA FEECTRICAMENTE EQUIVALENTE A UN DIPOLO.



enillo hexagonal plegado

FIGURA D. LOS ATUMOS DE OXIGENO EN EL HIELU,LOS CUALES ESTAN LOCALIZADOS EN LAS INTERSECCIONES DE LAS LINEAS DEL DIAGRAMA: YACEN EN UNA RED ABIERTA, DE ANILLOS HEXAGONALES PLEGADOS



oxigeno central

FIGURA E : CADA ATOMO DE OXIGENO EN EL HIELO ESTA TETRAEDRICAMENTE COORDINADO POR CUATRO ATOMLO DE OXIGENO DIFERENTES. LUS ATUMUS DE HIDRUGENO NU SE VEN EN EL DIAGRAMA.

♀}0.96-1.02 Å puente de hidrogeno

FIGURA F. PUENTES DE HIDROGENO ENTRE DOS ATOMOS DE OXIGENO.

- # ATOMOS DE HIDROGENO
- = ATPHOS DE DXIGENO.



molecula de agua intersticial

malla de moleculas de agua

FIGURA G. ESTRUCTURA DEL HIELU CUN SUFICIENTE ESPACIU INTERSTICIAL PARA ACOMODAR UNA MOLECULA DE AGUA LIBRE.



moleculas de agua no asociadas

FIGURA H . DIAGRAMA ESQUEMATICO QUE MUESTRA QUE EN EL AGUA LIQUIDA ,HAY UNA RED - DE MULECULAS DE AGUA ASOCIADAS Y CIERTA FRACCION DE AGUA LIBRE.

APENDICE II: ESTRUCTURA DEL AGUA CERCA DE UN ION

Considerando al ion como una carga puntual, y a las moleculas de solvente como dipolos electricos, la interaccion ion -solvente puede ser descripta por las fuerzas ion-dipolo.

Sinteticamente podemos referirnos a la estructura del agua en las cercanias de un ion, consideramos tres zonas (Fig.I).

ZONA PRIMARIA: es una zona altamente estructurada, en las cercanias del ion, las moleculas estan inmovilizadas y orientadas por el campo electrico, se mueven solidariamente con el ion. Se la conoce como PRIMERA ESFERA DE HIDRATACION.

SEGUNDA ESFERA DE HIDRATACION: es una zona donde se ha perdido parte de la estructura del agua liquida, las moleculas de agua no acompanan al ion, es una region de transicion.

Finalmente, a suficiente distancia del ion, el agua no se ve afectada por la presencia del mismo, y se mantiene la estructura de red ligada tetraedricamente característica del agua liquida. A

esta region se la llama "Bulk" o "seno del liquido".

A igualdad de cargas un ion de menor diametro ejercera una mayor atraccion electrostatica que otro de diametro mayor, esto produce que los iones pequenos tengan una esfera de hidratacion rigida. Lo que sucede en la segunda esfera de hidratacion no es tan simple, ya que su estructura dependera no solo de la interaccion electrostatica sino de factores estericos que determinan si la transicion entre la primera esfera y el liquido se realiza a costa de un gran desorden o de estructuras mas o menos regulares.

De acuerdo a Grigera (4), una descripcion adecuada del estado de hidratacion de iones consiste en tener en cuenta el tiempo de vida del agua de hidratacion. Si Z es el tiempo medio en el cual una molecula permanece en posicion de equilibrio puro y \mathcal{Z}_{i} es el tiempo medio en que una molecula permanece en equilibrio junto a un ion, se caracteriza el estado de hidratacion por el cociente $\mathcal{Z}_{i}/\mathcal{Z}$

si $\frac{c}{2}$ 1 HIDRATACION POSITIVA (el ion induce una restriccion en el movimiento del agua).

si Ci/Z < 1 HIDRATACION NEGATIVA

Los terminos de hidratacion positiva y negativa equivalen a los de PRÒ y ANTIESTRUCTURALES, pero no mencionamos el termino "estructura", porque esta definicion de hidratacion esta en termino de propiedades dinamicas y no estructurales.

Los tiempos \mathcal{L} y \mathcal{L}_{i} pueden ser medidos experimentalmente porque estan conectados con propiedades macroscopicas como la viscosidad y la difusion, así como con fehomenos de resonancia magnetica nuclear (r.m.n.) y relajacion dielectrica.



REGION PRIMERA CON AGUA COMPLETAMENTE

ORIENTADA REGION SECUNDARIA CON AGUA PARCIALMENTE ORIENTADA

SEND DE LA REGION CON AGUA DESORIENTADA

, FIGURA I.

APENDICE III MIOGLOBINA

En los vertebrados los transportadores de oxigeno son las moleculas de hemoglobina y mioglobina.

La hemoglobina que esta contenida en los globulos rojos de la sangre sirve como transportador de oxigeno, al igual que de dioxido de carbono y del ion hidrogeno. La mioglobina que se localiza en los musculos sirve como suministro de reserva de oxigeno y facilita su transporte en los mismos.

La capacidad de la mioglobina y de la hemoglobina para captar oxigeno depende de la presencia de una unidad no polipeptidica: el grupo hemo, el cual da a las mencionadas proteinas su color distintivo. El grupo hemo es el grupo prostetico, el resto de la proteina constituye la apoproteina (24).

Fl estudio de la estructura tridimensional de la mioglobina hecha con rayos X se debe a John Kendrew (25); estos estudios arrojaron la primera informacion sobre esta molecula de peso molecular 17.000, cuyas dimensiones totales son 45×35×25 A,

alrededor del 75% de la cadena principal esta plegada en una alfa helice (dextrogira), existiendo ocho segmentos helicoidales mayoritarios. La molecula es muy compacta, consistiendo el interior casi enteramente de residuos no-polares (24-26-27) (leucina, valina, etc.). Los residuos que tienen una parte polar y otra no-polar(tirosina, treonina, etc) se orientan de tal forma que las porciones apolares apuntan hacia el interior. Los unicos residuos polares en el interior de la mioglobina son dos histidinas que juegan un rol especifico en el centro activo. E1 hemo consta de una parte organica (Protoporfirina) y un atomo de hierro. La protoporfirina IX esta constituida por cuatro grupos pirrolicos. El atomo de hierro en el hemo esta ligado a 105 cuatro nítrogenos del anillo de la protoporfirina, los dos enlaces restantes, conocidos como 5ta. y 6ta. posicion de coordinacion) estan unidos de la siguiente manera: la 5ta. posicion de coordinacion a una histidina "proximal" (F8), en tanto que la 6ta. es el sitio de enlace para el oxigeno, proxima a la misma, pero no unida al hemo se encuentra un 2do. residuo de histidina (E7).

El atomo de hierro en el grupo hemo puede estar en estado de oxidacion ferroso (+2) o ferrico (+3). Las formas correspondientes se resenan a continuacion:

FORMA	ESTADO OXI.FE	OCUP/	OCUPANTE	
		Sta.pos.	6ta.pos.	
DESOXIMIOGLOBINA	+2	His. F8	Vacia	
DX1MIOGLOBINA	+2	Hi⊊. F8	02	
FERRIMIOGLOBINA	+3	His. F8	H20	

Es cecir que del angulo fisiologico existen 3 formas distintas de mioglobina. De modo que el lugar de enlace con el oxigeno supone solo una pequena fraccion del volumen de la mioglobina. La porcion peptidica se pliega alrededor del grupo de manera que las cadenas laterales hidrofobicas (termodinamicamente mas estatle cuando quedan agrupadas en el interior que cuando

141

<u>.</u>

estan en presencia de un medio acuoso) crean una especie de "microclima apolar" al hemo ferroso, para evitar la oxidacion del hierro a la forma ferrica incapaz de transportar oxigeno.

Aparte del estudio con Rayos X de la mioglobina, se ⁱhan realizados analisis con difraccion de neutrones (28), no existiendo en bibliografia ningun estudio de sus isotermas de adsorcion (si se conocen las de la hemoglobina, (29)).

ĺ



APENDICE IV HISTERESIS

Si un sistema definido para un conjunto de variables externas es movido desde el estado A al B a lo largo de un dado camino, las variables independientes adoptaran una serie de valores. Si llevamos ahora al sistema desde B a A, y las variables independientes vuelven a lo largo del mismo camino, el proceso es llamado REVERSIBLE o PROCESO DE EQUILIBRIO.

Normalmente para obtener'el comportamiento anteriormente mencionado, el proceso debe ser efectuado muy lentamente. Sin embargo en algunos casos aun cuando los cambios se realicen en forma excesivamente lenta, un camino distinto es tomado por las variables independientes. Procesos de esta naturaleza corresponden a una clase muy importante, llamados comunmente "histeresis".

Es ilustrativo distinguir entre procesos en los cuales variables DEPENDIENTES, toman valores ESTABLES y REPRODUCIBLES y aquellos en los cuales toman valores no estacionarios.

El termino "Histeresis" es resevado para el primero, mientras que "Supersaturacion" o "Metaestabilidad" es usado para el ultimo. Aunque diferentes, ambos procesos estan estrechamente relacionados, como lo veremos mediante una analogia mecanica, que nos puede ayudar a comprender una posible interpretacion molecular (45).

La Fig. A a) muestra un circuito electrico en el cual una tira bimetalica cierra el circuito en los punto P y Q, cercano a estos puntos, dos imanes pequenos han sido ubicados. Cuando la temperatura aumenta, la distancia entre los puntos de contacto disminuye, y cuando alcanza un valor critico, la atraccion entre los imanes produce el contacto a la Temperatura T1. La disminución de la temperatura producira la separación del circuito pero a una temperatura T2, menor que T1. La Fig.A b) muestra la corriente (variable dependiente) vs. Temperatura (variable independiente)para el sistema descripto.

Ambos segmentos DB y FG son inestables, ademas podemos clasificar el proceso viendo la metaestabilidad o la supersaturacion.

Un comportamiento diferente es mostrado para un sistema compuesto por una coleccion de pequenos sistemas como el mencionado anteriormente.

Asumamos que no todos los sub-sistemas sean exactamente iguales, pero que las temperaturas de contacto y apertura varien ligeramente unas de otras, de tal manera que esten distribuidas alrededor de valores comunes. Las curvas de corriente-temperatura son mostradas en la Fig A, y se asemejan a nuestras curvas familiares de sorcion-desorcion.

la diferencia mas importante entre este sistema y el mostrado previamente, es que aunque las componentes individuales exhiben metaestabilidad: el sistema como un todo sigue un paso estable y reproducible el cual es característico de la Histeresis. La "irreversibilidad" es interna y no puede ser eliminada por factores externos.





FIGLIRA A b)

ţ.



FIGURA A

APENDICE V: METODO DE KARL FISHER

En 1935 Karl Fisher (111) describio un reactivo conteniendo yodo y dioxido de azufre, el cual fue desarrollado primeramente para la determinacion de agua en dioxido de sulfuro y que luego fue aplicado a los analisis de agua en general.

La especificidad del reactivo y la simplicidad de uso fue rapidamente reconocida por los químicos. El nombre de "Reactivo de Karl Fisher" se ha difundido y hoy es de uso generalizado.

En sus experimentos iniciales, Fisher consideraba diferentes tecnicas para averiguar el alcance de la reaccion, usando benceno como solvente para el yodo y el dióxido de azufre.

Los intentos de utilizar el punto final con celulosa fue insatisfactorio a causa que ese indicador no funciona en medio -nhidrido.

La remoción por destilación del exceso de SG y HI formado 2 en la reacción, seguida por la titulación del acido sulfurico

producido, fue insatisfactorio; debido a las reacciones previas del acído sulfurico con el benceno y a la reduccion del producto por HI.

La titulazación del reactivo con la muestra a analizar para determinar agua, hasta que la solución se decolore era erratica, dependiendo de la concentración del reactivo. Se encontro que cuando la concentración de productos acidos aumentaba, la reacción se volvia reversible; para evitar esta reversibilidad era necesario descomponer los productos acidos o introducir algun material que se combine con ellos.

Se encontro que el ultimo metodo era el mas deseable, contrandose a partir del estudio de aminas organicas debiles que la piridina era la mas indicada para ese proposito.

Se encontro que tenia la ventaja adicional de combinacion con dioxido de azufre, reduciendose ademas la presion de vapor. De esta manera la amina terciaria deviene una componente esencial del reactivo.

Razonando por analogia a sistemas complatamente inorganicos. Fisher sugirio que la reaccion era la siguiente:

I + 2 H O + (C H N) .SO + 2 C H N----- (C H N) .H SO + 2 2 55 2 2 55 55 2 2 4 + 2 C H N HI 55

La adicion de una base organica hacia menos promisoria la titulacion del aparente acido sulfurico producido en la reaccion.

Ademas de formar sales con los productos acidos, la piridina se compina irreversiblemente con dioxido de azufre y HI en caliente.

Titulando con el reactivo conteniendo piridina hasta que el yodo no cambie mas de color, Fisher fue capaz de encontrar un punto finel agudo y reproducible.

Con el objeto de asignar un exceso de reactivo mas que de yodo, el uso tres veces mas las cantidades calculadas de SO ý un 2

exceso adicional de piridina.

Su reactivo consiste de 720 g (10 moles) de piridina, 192 g (3 moles) de SO y 254 g (1 mol) de yodo disuelto en 5 litros de

148

solvente anhidrido (metanol).

Esto fue calculado como equivalente a 36 g (2 moles) de agua o 7.2 mg.ag./ml de reactivo.

METODO DE TITULACION DEL REACTIVO

Karl Fisher fue el primero en sugerir que un proceso de calibracion electrico podía ser aplicado al analisis de agua liquida.

La tecnica usada es mucho mas precisa y reproducible que la de seguir visualmente el cambio de color de la reaccion.

Una titulacion de este tipo requiere un milivoltimetro sensible capaz de exhibir una fuerte y positiva deflexion para un aumento total de 20 mv en el punto final de la reaccion. Cualquier modelo de ph-imetro puede ser utilizado a tal efecto.

En la Fig.1 se observa el cambio de potencial durante la calibración del Reactivo de Karl Fisher con agua en metanol. Dos aspectos deten ser rigurosamente tenidos en cuenta:

1) Garantizar mediante el uso de buretas automaticas, y la

puesta de trampas con silica gel y P O la no influencia de la

25

húmedad ambiente.

 \mathbf{N}

2) Evitar el contacto del reactivo con la luz (para ello utilizamos material de vidrio color caramelo). En la Fig.2 vemos las vasijas similares a las que usamos, y en la Fig.3 una imagen del conjunto del aparato para la calibracion.

METODO DE CALIBRACION

PRIMERA STANDARIZACIÓN DEL REACTIVO

- Se pone alrededor de 36 ml de metanol en la vasija de calibracion, y se agrega suficiente cantidad de Reactivo de Karl Fisher (RKF) hasta lograr el caracteristico punto final.

- Rapidamente se agrega 150 a 350 mg de tartrato de sodio (Na E -H O .2H O), perfectamente pesado, y se calibra el punto 2 4 4 6 2

final.

El factor de equivalencia "F" para el agua, en mg de agua

por ml de reactivo, esta dado por la formula F \approx 0,1566 W/V, en la cual "W" es el peso en mg del tartrato de sodio y "V" es el volumen en ml del reactivo requerido.

SEGUNDA STANDARIZACION DEL REACTIVO

Alternativamente, el reactivo puede ser standarizado cada dia que se use contra soluciones de agua-metanol, de la siguiente forma:

- Se agregan 2 ml de agua a 1000 ml de metanol

- Se retiene una porcion de metanol para la determinacion del blanco.

- Se ponen 25 ml perfectamente medidos de la solucion de agua - metanol en la vasija de calibracion, y se calibra con RKF.

- Simultaneamente se realiza la calibración del blanco, con 25 ml del metanol usado y se realiza la corrección necesaria.

- El contenido de agua en mg por ml de la solucion de agua metanol esta dado por la formula V°F/25, en la cual "V°" es el volumen del RKF corregido por el blanco de la calibración de

metanol; y "F" es el factor de equivalencia de agua del reactivo determindo contra tartrato de sodio (como se especifica en la Primera standarizacion).

PROCEDIMIENTO

- Se agregan alrededor de 25 ml de metanol a la vasija de calibracion y se calibra hasta el punto final con el RKF, no hace falta tener en cuenta el volumen ya que no entrá en los calculos.

- Se pesa la muestra a determinar el contenido de agua y se transfiere rapidamente a la vasija.

- Se agita (con agitador magnetico) rapidamente y se calibra con RKF.

- El contenido de agua en mg de la muestra, es el productó SF, en el cual "S" es el volumen de reactivo usado para calibrar la muestra, y "F" es el factor de equivalencia para el agua definido anteriormente.

MATERIALES USADOS

- Buretas Automaticas METROHM AG. HERESAN
- Tartrato de Sodio MALLINCKRODT
- Metanol MERCK
- Reactivo de Karl Fisher SINTORGAN



FIGURA 1 . CAMBIO DE POTENCIAL DURANTE LA CALIBRACION DEL RKF CON AGUA EN METANOL (Ref 111)



FIGURA 2 VASIDAS DE CALIBRACION (Ref. 111) SIMILARES A LAS UTILIZADAS EN ESTE TRABADO.



FIGURA 3 SISTEMA DE CALIBRACION DE KARL FISHER

APENDICE VI COLAGENO

ESTRUCTURA

La molecula de colageno - TROPDCOLAGENO - (3000 A) esta formada por tres cadenas polipeptidicas individuales, las cuales estan alineadas a traves de la molecula. Se pueden considerar tres regiones distintas en la molecula; a) Una region no heicoidal (region NH) remanente de la molecula de

2

procolageno, comprende un 2% de la longitud de la molecula, zona may importante ya que contiene los sitios donde se originan los "cross-links"; b) La zona central helicoidal que abarca un 95% de la longitud de la molecula. En esta zona las cadenas individuales adoptan la forma de una helice de paso izquierdo (eje menor) de prolina, las cuales acomodan aproximadamente tres residuos por vuelta de helice a una distancia de 9 A. Las tres helices a su vez estan plegadas alrededor de un eje comun central para formar una helice de paso derecho (eje mayor) con un paso de 100 A. En esta zona las cadenas polipeptidicas presentan en su estructura

<u>,</u>†

J

primaria la secuencia Gly-X-Y en forma repetitiva, siendo X e Y Prolina y 4-Hidroxiprolina.

Los acoplamientos estereoquimicos debidos a la estructura ciclica de la prolina y de la hidroxiprolina, y la naturaleza compacta de la glicina, proporcionan rigidez a la triple helice. Por otra parte el grupo hidroxilo de la hidroxiprolina permite establecer "enlaces hidrogenados" (enlaces quimicos debiles) entre las cadenas que constituyen la triple helice, de modo que la estabilidad del colageno se debe en gran parte al grupo hidroxilo de la prolina.

En casos menos frecuentes las componentes X e Y son otros aminoacidos, en caso de ser lisina, esta puede ser hidroxilada permitiendo que se unan a la molecula de colageno moleculas de azucares (glucosa,galactosa) mediante enlaces covalentes. Son las moleculas de azucares las que permiten establecer enlaces entre las distintas moleculas de colageno.

Las funciones aldehidicas de la lisina y de la hidroxilisina son las fundamentales responsables de la solidez de la trama formada por las moleculas de colageno.

 c) La tercer region de la molecula de colageno nativo es una zona no-helicoidal COOH- que comprende el 3% de la longitud

de la molecula, del mismo origen que la region NH , que contiene al igual que la anterior sitios de origen de "cross-links". Es conocida como TELEOPEPTIDOS.

En condiciones apropiadas de temperatura y/o solventes desnaturalizantes, la molecula de colageno nativo puede ser desnaturalizada y sus cadenas constituyentes adoptar una forma plegada ("random - coil"), a estas ultimas se las denomina cadenas alfà, conteniendo cada una alrededor de 1050 residuos de aminoacidos. Diferentes tipos de cadenas de han sido caracterizacas como producto de la desnaturalizacion de diferentes tipos de colagenos.

En un dismo organismo distintos tipos geneticos de colageno estan presentes segun los tejidos. El mas abundante , tipo I, compone exclusivamente tendones y huesos; mientras que en otros tejidos como piel, sistema vascular, tejido reticular, encontraremos colageno I y pequenas cantidades de tipo III.

El tipo II es el mayor constituyente de los cartilagos. Estos tres tipos de colageno intersticiales (tipo I, II, III) forman fitrillas periodicas y se presentan como fibras en las matrices extracelulares. Los otros tipos geneticos como el IV en las membratas basales y V en membranas basales y organos internos; no presentan forma fibrilar tipica.

En el colageno tipo I hay dos tipos distintos de cadenas A(I) y A(II) en una proporcion uno a dos respectivamente. Los colagenos tipo II y III tienen una secuencia de aminoacidos muy similar a la de tipo I, presentando tambien glicina cada 3 residuos y un alto contenido de aminoacidos.

INTERACCIONES INTER E INTRAMOLECULARES

Despues de la conversion del procolageno en colageno, se produce la organizacion en fibrillas y fibras tisulares. Las fibrillas inmaduras no poseen la suficiente fuerza tensora hasta, que no se formen enlaces covalentes "dentro" y "entre" las mismas.

El "cross - linking" del colageno en fibrillas ocurre en dos o tres etapas:

a) Deaminización oxidativa de los grupos $\boldsymbol{\epsilon}$ - aminos de algunos de los residuos de lisil e hidroxilisil. Los productos de la reacción (catalizada por la enzima lisiloxidasa) son: alisina e hidroxilisina, las cuales producen nuevas interacciones.

b) Los aldehidos de dos cadenas alfa adyacentes de una

misma molecula de colageno, reaccionan espontaneamente a traves de un producto de condensacion del aldol para formar el enlace cruzado intramolecular.

c) Los enlaces cruzados intramoleculares se forman inicialmente como bases de Schiff de uno de los aldehidos (incluyendo el producto de condensacion del aldol) con los grupos
E - amino de los residuos de lisina e hidroxilisina de una segunda molecula de colageno.

Estos enlaces inestables se estabilizan por reduccion o reordenamiento de la doble union, o constituyen enlaces mas complejos por ulterior interaccion con histidina y/o residuos de glucosa y galactosa del colageno.

De los modelos mas propuestos para la estabilización de la triple helice de la molecula de colageno, el mas corroborado por los datos experimentales es el de la escuela de Madras.

Ramachandran y Chandrasekaran (1968), propusieron una estructura conocida como "the water - bridge structure", que reconcilia los modelos de Ramchandran y Karta (1955) y de Rich y Crick (1961) conocidos como estructuras "doblemente" y "simplemente" ligadas, respectivamente.

De acuerdo al modelo de Ramachandran y Chandrasekaran, basados en estudios de Rayos X, una molecula de agua forma un puente de hidrogeno entre dos oxigenos de los grupos carbonil de las uniones peptidicas de dos cadenas distintas de la triple helice.

Otra molecula de agua puede formar puentes de hidrogeno entre el grupo peptidico N-H y un oxigeno carbonilico de dos cadenas Biferentes. Este modelo considera una molecula de agua cada tres residuos aminoacidos.

ESTABILIDAD HIDROTERMICA

Cuando el colageno es sometido, en un medio acuoso, a una temperatura creciente, se produce un fenomeno de desnaturalización termica de las fibras de colageno, que morfologicamente se manifiesta en una contracción de un 35% de su longitud original.

La temperatura de contraccion varia segun la procedencia del colageno (para el estado nativo), siendo el rango entre 60 y 70 C en el caso de mamiferos.

En el caso de fibrillas sueltas la temperatura de contraccion es de 50 a 55 C; y en el caso de fibrillas de colageno renaturalizadas el fenomeno se inicia alrededor de los 50C.

En esta divergencia de temperaturas de contraccion (tambien variable en funcion del ph y del medio), puede apreciarse que el orden estructural es de gran importancia para la estabilidad hidrotermica.

El fenomeno de la contraccion del colageno en agua caliente se produce por la rotura de los enlaces internos de las tres cadenas de la molecula de colageno, principalmente de las uniones por puentes de hidrogeno. Este fenomeno es conocido como Proceso de Fusion Intermolecular.

En este proceso de desmoronamiento estructural las tres cadenas no se separan necesariamente entre si, sino que quedan entremezcladas unas con otras, al disminuir la temperatura pueden volver a unirse por medio de puentes de hidrogeno, obviamente de una manera desordenada.

De mudo que la Temperatura de Contraccion puede ser considerada como una medida de las fuerzas que mantienen el orden

estructural del colageno, "al mismo contribuyen diferentes tipos de uniones:

•....

a) ENLACES SALINOS: entre un residuo polar negativo de una
cadena lateral y un residuo polar positivo de otra cadena vecina
(ej: resto de acido glutamico y un resto de lisina).

b) ENLACES POR PUENTES DE HIDROGENO: pueden formarse entre un prupo -CO- de una cadena polipetidica y el grupo -OH- del anillo pirrolico de la hidroxiprolina correspondiente a la cadena vecina.

c) INTERACCIONES HIDROFOBICAS: se originan como consecuencia de acumulaciones de cadenas apolares laterales que escapar al medio acuoso.

d) ENLACES POR "PUENTES DE AGUA": en los cuales una molecula de agua forma puente entre diferentes cadenas de la triple belice mediante puentes de hidrogeno.

HIDRATACION

Tanto en los sistemas vivos como en el caso de la manufactura del cuero el colageno se encuentra en continua interacción con el agua. Existen importantes razones tanto del punto de vista de la biologia, la medicina como la industria, para estudiar el sistema agua - colageno.

El primero en observar experimentalmente el comportamiento de las moleculas de agua (protones de las mismas) y diferenciarlas de los protones del colageno fue Berendsen, en 1962, usando tecnicas de r.m.n. de banda ancha. Encontrando que para el espectro de las moleculas de agua orientadas existe un desdoblamiento de la línea de resonancía que indica una fuerte dependencia angular. Esto estaria indicando una anisotropia de rotacion de las moleculas de agua.

En 1973 Migchelsen y Berendsen encontraron los parametros que expresan dicha anisotropia en terminos de la orientacion molecular promedio (parametros de Saupe), usando para ello datos de protones y deuterones. En ambos trabajos los autores plantean
que un modelo como el propuesto por Ramachandran y Chandrasekaran puede ser consistente con la anisotropia hallada experimentalmente.

En 1979, Grigera y Berendsen encuentran que el modelo de hidratacion de colageno propuesto por Ramachandran y Y Chandrasekaran es consistente con los resultados obtenidos por r.m.n. y medidas dielectricas (incluyendo tecnicas de espectroscopia en dominio del tiempo -TDS-). Tambien encontraron que los resultados de sorcion eran compatibles con el modelo, pero que por ellos mismos no bastaban para seleccionar un modelo. Los resultados de sorcion indican la existencia de un tercer sitio de union o de varios sítios debiles. Como los datos de r.m.n. son consistentes con los dos sitios propuestos por Ramachandran, se supondria que las moleculas de agua en los otros sitios no estan rigidamente orientados y se encuentran probablemente relacionados a cadenas laterales flexibles.

Esto es consistente con los resultados de los ciclos de adsorcion - desorcion de colageno, que presenta un citlo de histeresis. Seria posible que el tercer sitio de union sea reemplazado por un puente salino en el colageno deshidratado, y que no represente un sitio de union entre las cadenas de colageno.

Las dos moleculas de agua especificamente ligadas cada tres aminoacidos forman puentes entre diferentes cadenas de la -triple helice de colageno. El tiempo rotacional de correlacion de las -7

moleculas ligadas (1-5 10 s) debe ser interpretado como el tiempo de residencia de las moleculas de agua, puesto que el movimiento no rotacional sobre angulos apreciables es posible en las posiciones ligadas. Por la misma razon los autores no esperan que las moleculas de agua ligadas contribuyan à la constante dielectrica del colageno hidratado.

En conclusion, Grigera y Berendsen plantean que las propiedades de hidratacion de colageno parcialmente seco pueden ser descriptas de la siguiente manera:

Cada tres aminoacidos hay dos moleculas de agua firmemente ligadas, con posiciones bien definidas, unidas por puentes de hidrogeno a la estructura molecular. Estas moleculas tienen un tiempo de residencia de 0.1 us. El resto del agua, que consiste en la mayor parte del agua presente, esta en debil interacción con el resto de los sitios, formando "multicapas" y con propiedades bastantes similares a la del agua liquida. Estas moleculas de agua comparativamente "libres" estan en rapido intercambio y poseen un tiempo rotacional de correlación del

urden de 10 s, que es un orden de magnitud menor que el del agua libre.

BIBLIOGRAFIA

ESTRUCTURA

Gay, S.; Miller, E.J.; Fisher, G.:"Collagen in the Physiology and Pathology of [©] Connective Tissue", Verlag — Sttutgart, New York, (1978).

Trelstad, R.: "La Colagena", Mundo Cientifico, N 3, pp. 284-295, (1981).

Bear, R.S.: Advances in Protein Chemistry, 7, 72, (1952).

INTERACCIONES INTER E INTRAMOLÉCULARES

Remachandran, G.N.; Ramakrishman, C.: "Molecular Structure", Biochemistry of Collagen ,Plenum, pp.45-81, (1980).

165

-10

Gratacos, E.: "Accion de reactivos clorometilados sobre colagene", Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona, (1968).

Ramachandran y Chandrasekaran Biopolymers, 6, pp.1649-1658, (1968).

leager, M.L.: Science (USA), 180, pp.561-566, (1973).

ESTABILIDAD HIDROTERMICA

Gratacos, E.: "Transiciones del colageno, con especial referencia a los procesos de desnturalización «y renaturalización", Holetin de la Asociación Química Espanola de la Industria del Cuero, N 8, agosto, (1965).

HIDRATACION

Grigera, J.R.; Berendsen, H.J.C.: "The molecular Details of

Collagen Hydration", Biopolymers, 18, pp.47-57, (1979).

Bienkiewicz, K.: "Physical Chemical of Leather Making" -Chap.5: "Skin components and water", R.E. Kriegger Publishing Company, Malabar, Florida, (1983).

Ramachandran, G.N.; Chandrasekaran, R.: "Interchain Hydrogen Bonds via bound water molecules in the collagen, triple helix", Biopolymers, 6, pp.1649 - 1658 (1968).

TABLA I

Distintos tipos de colágeno

	Composición en cadenas	Características	Forma fibrosa y distribución en los principales tejidos
Tipo I	[a ¹ (1)] ³ a ³	Compuesta por dos cadenas 1(I) y una cadena más básica e hidrofóbica 2	Fibras largas y bien estruc turadas Piel,huesos,tendones, ligamentos,dentina y casi to do otro tejido conectivo.
Tipo I trímero	[αι(τ)] ³	Similar al tipo I pero de cadenas ho mólogas 1(I)	Forma fibrosa desconocida.Al gunas líneas de fibroblastos, tumores inducidos por virus en ratones.
Tipo II	[α ₁ (11)] ₃	Altos niveles de h <u>i</u> droxilisina e hidrox <u>i</u> lisina glicosilada	Pequeñas fibras o fibrillas Cartílagos,cuerpo vitreo.
Tipo III	[α _ι (ш)] ₃	Relativamente altos niveles de 4-hidroxi prolina y glicina. Dos cisteinil resi- duos por cadepa.	Telldos reticulares finos. Dermis,pared uterina,vasos sanguíneos.
Tipo IV	[α ₁ (𝒴)], ?	ſ	Membranas basales
Tipo V	$[\alpha_{1}(v)]_{2} \alpha_{2}(v)$		Membranas basales, Organos internos.



FIGURA 1. ESQUEMA DEL PRECURSOR DE COLAGENO (PRO-COLAGENO).

(NAJGL-NACETILGLUCOSAMINA)



Fig. 2. El colágeno desde su secuencia de aminoácidos hasta llegar a su estado funcional.



Fig. 3. Sitios de unión intermolecular más importantes del colágeno.



Fig.4. Los puentes de agua en la molécula de colágeno. a) detalle de los enlaces. Nótese que las moléculas actuan como puente entre cadenas.
b) esquema idealizado que indica el estado dinámico de la hidrata-Ción. Las moléculas de sitios primarios (indicados en a) se intercam bian con las de hidratación superficial inespecífica.



Fig. 4 b)

APENDICE VII

a) TRITON X - 100

Dos series de agentes surfactantes no ~ionicos son preparados por la reaccion de octylfenol o nonylfenol con oxido de etileno. Los productos son los comunmente descriptos como alquil - aril - polieter alcoholes; teniendo la formula estructural que se indica en la figura; en la cual el C del 9

grupo alquil es una mezcla de isomeros de las ramificaciones de cadena; y indica el numero medio de unidades de oxido de etileno en el lado eter de la cadena.

Ambas sèries consisten en los productos listados, dados en la figura, en orden de aumentar la longitud de la cadena de polyoxyetileno.

los productos son mezcla con respecto a la longitud de la cadena de polyoxyetileno, el valor de "x" representa el numero promedio de unidades de oxido de etileno en el lado eter de la

cadena de cada producto. La distribucion de longitudes de cadenas de varios polyoxyetileno en cada surfactante sigue una distribucion de Poisson.

El principal uso de estos surfactantes es industrial y en detergentes de uso hogareno. Siendo tambien ingredientes importantes en la manufactura de emulsion de polimeros. El Triton X - 100 es biodegradable.

TEMPERATURA DE ENTURBAMIENTO (CLOUD TEMPERATURE)

En el caso de ciertos surfactantes no - ionicos: la temperatura alrededor de la cual soluciones acuosas devienen heterogeneas, con la formacion de dos fases liquidas.

TEMPERATURA DE CLARIFICACION (CLOUD POINT)

En el caso de surfactantes no - ionicos que exhiben temperatura de enturbamiento: La temperatura a la cual la mezcla

de dos fases líquidas deviene homogenea al ser enfriada.

DATOS EXTRAIDOS DEL FOLLETO SUMINISTRADO POR ROHM & HAAS COMPANY

 ${\mathfrak S}^{\mathbb C}$

b) HYAMINA 1622

La Hyamin'a 1622 es di - isobutil - fenoxi - etoxi - etil dimetil - bencil - amonio cloruro. Es un monohidrato. Es una sal cuatern'aria de amonio de peso molecular 466.09 g. (ver figura)

Es un germicida, efectivo en una amplia gama de microorganismos en muy bajas concentraciones. Diluido es inodoro, incoloro, no venenoso y no irritante.

Los cristales de Hyamina 1622 son solubles en agua y en

aumerosos solventes no - acuosos,

Se usa para desinfeccion industrial y veterinaria, así como de hogares, granjas, restorantes, etc.

INFORMACION EXTRAIDA DEL MANUAL DE ROHM & HAAS COMPANY.

c) S.D.S.

Dodecil Sulfato de Sodio: C <u>H</u> Na D S 12 25 4

> CH (CH) CHOSO Na 3 210 3

PREPARACION: por sulfatacion de alcoholes lauriticos, seguida por neutralización con carbonato de sodio. El articulo comercial es una mezcla de alkyl sulfatos con sodio lauril sulfatos (estos ultimos en preponderancia).

Pedacitos, polvo o cristales blancos o color crema. Suave al

tacto.

Un gramo se disuelve en diez mililitros de agua, dando una solucion opalescente. Produce el descenso de la tension superficial de soluciones acuosas. Emulsifica las grasas.

US5: agente humectante, detergente, especialmente en la industria textil. Puede ser usado con agua pesada. Ingrediente de las pastas dentifricas.

INFORMACION EXTRAIDA DE "THE MERCK INDEX". NINTH EDITION (1976).



OCTYLPHENOL SERIES

THILON	X 15		(x		1)	
TRITON	X-35		(x	=	3)	
TRITON	X-45		(x	Ξ	5)	
TRITON	X-114	€	(x	=	7-8)	
TRITON	X-100		(x	ŧ	9-10)	
TRITON	X-102		(x	=	12-13	J)
TRITON	X-165		(x	=	16)	
TRITON	X-305		(x	=	30)	
TRITON	X-405		(x	Ξ	40)	
TRITON	X-705-	50%	(x	Ξ	70)	
TRITON	X-705-	100%	(x	÷	70)	

NONYLPHENOL SERIES

TRITON N-42	(x = 4)
TRITON N-57	(x = 5)
TRITON N 60	(x 6)
TRITON N-101	(x 910)
TRITON N-111	(x = 11)
TRITON N-150	(x = 15)
TRITON N-401	(x = 40)

Compasilion

Bynamiae 1622 is di-isolarly) phenoxy ethoxy ethyl dimethyl benzyl annonium thluride, monohydrate. It is a pure quaternary annonium salt with a molecular weight of 460.09



APENDICE VIII: USO DE TINTURAS IONICAS EN EL ANALISIS DE SURFACTANTES IONICOS

La base del metodo propuesto por Mukerjee (106) es la siguiente:

Liquidos organicos como el cloroformo o bromobenceno no son buenos solventes para la mayoria de las tinturas ionicas, como el azul de metileno (cationico) o el azul de bromofenol (anionico).

En un sistema de dos fases, cuando alguno de esos solventes inmiscibles está presente con una solución de tintura en agua, muy pocoícolor se registra en la fase organica.

En el caso de encontrarse presente un detergente junto con un exceso de la tintura indicada con carga opuesta, la sal tintura – surfactante que se forma, generalmente es mas soluble en el solvente organico que en el agua.

De calibraciones previas o del conocimiento de la absorbancia de la tintura en el solvente organico, se puede

determinar la concentracion de la tintura en el solvente.

Como la tintura esta presente como una sal tintura surfactante, se puede determinar la concentracion del surfactante en la fase acuosa, a partir de experimentos de particion en equilibrio. Cualquier contribucion de la tintura puede ser sustraida como blanco de correccion. La sensibilidad del metodo puede ser incrementada en un gran factor aumentando la relacion de fase acuosa a fase organica.

En el caso del SDS los autores proponen dos posibilidades:

1) Tintura cationica: Azul de metileno 0.01 M-en ClH, 8 mg por litro. Solvente organico: Cloroformo. Absorbancia medida a' $\lambda = 655$ nc.

2) Consideran que es un 20% mas sensible el usar como tintura cationica Pinacyanol (Smg por litro), y Bromobenceno como solvente organico. Absorbancia medida a $\lambda = 621$ nm. La tintura de Pinacyanol se disuelve en una solucion buffer 'Acido Boríco -Borax ph 9

MATERIALES USADOS

Cloruro de Pinacyanol marca Sigma, solucion 8 mg/l en buffer borax - acido borico.

Acido Borico 0.1 M marca Mallinckrodtt; P.M. = 61.84 g,

Tetraborato de sodio (Borax) marca Fluka; Å.M. = 201.22 g; 0.01 M.

METODO

En un recipiente se ponen 35 ml de una solucion acuosa de detergentes, se le agregan 5 ml de solvente organico inmiscible y 5ml de la tintura. Se agita con un shaker y se mide la absorbancia de la fase organica.

BIBLIOGRAFIA

1) BEAUL, P.T.; Cryobiology, 20,pp.324-334, (1983)

2) BERENDSEN H.J.C. "Water. A Comprehensive Treatise"- Ed. F. Franks, Tomo 5, Pienum Press, 1975- Chap.6= "Specific Interaction of Water with Biopolymers"

3) BOCKRIS, J.B. & REDDY, A.K.N.; "Modern Electrochemistry", Plenum / Rosetta, New York, 1973

4) GRIGERA, J.R.; "Introduccion a la Biofisica del Agua"; Ed. Eudeba, 1976

5) BENGON, S.W.; J. Am. Chem. Soc., 72,p.2102, (1950)

6) BRUNAUER, S.; "The adsorption of gases and wapors", Princeton University Press, New Jersey, 1945

7) VAN DER BERG C. & BRUIN, S.; "Water activity and its

el 2do Simposio Internacional sobre propiedades del agua en relacion con calidad y estabilidad de alimentos. Osaka, 1978

8) BOQUET, R.; CHIRIFE, J. & IGLESIAS, H.A.; J. FD. TECHNOL., 15,pp.245-249, (1980)

9) LANGMUIR, I.; J. Am. Chem. Soc., 40, pp.1361-1377, (1918)

10) BRUNAUER, S., EMMETT, P.H. TELLER, E.; J. Am. Chem. Soc., 60, pp.309-319, (1938)

11) GUGGENHEIM, E.A.; "Application of Statistical Mechanics, Claredon, Dxford, (1966)

12) GRIGERA, J.R. & MOGILNER, I.G.; Indian Chem.Eng., 22, pp.42-43, (1980)

13) MUKESH, D. & SIVAPRASADA RAO, C.; Indian Chem.Eng., 17,p29 (1975)

14) WAXMAN, M.H.; Sundheim, B.R & GREGOR, H.P., J. Phys. Chem; 57, p.909, (1953)

15) HNOJEWYJ, W.S. & REYERSON, L.H.; J. Phys. Chem, 65, p.1694,

177

. مەنبەر : (1961)

16) ROSS, S.& OLIVERI, J.P.; "On Physical Adsorption" -Interscience Publishers - New York, (1964)

17) STEELE, W.A.; "The interaction of gases with Solid Surfaces". The International Encyclopedia of Physical Chemistry and Physics. Vol 3., Pergamon Press Oxford, (1974)

18) HILL, T.L.; The Journal of Chem. Phys., 18, pp. 246-256, (1950)

17) GRIGERA, J.R.; J. Phys. Chem., 83, pp.2145-2147, (1979)
 20) BULL, H.B.; J. Am. Soc., 66, pp.1499-1507, (1944)

21) GRIGERA, J.R.; TESIS, U.N.L.P., (1972)

22) KENNERLEY, M.G.; Polymer 10, pp.833-840, (1969)

23) ARAI CHIKAB & Col.; J. of Chem.Engineering of Japan, 9, N4, (1976)

24) STRYER, L.; Bioquímica, Ed. Reverte, S. A., (1976). Capitulo 3

25) KENDREW, J.C. & Col.; Nature, 185, 13, pp.422-427, (1960)

26) EDMUNSON, A.B. & HERS, C.H.W.; Nature, 190, pp.663-669, . (1961)

27) WATSON, H.C. & KENDREW, J.C.; Nature, 190, pp.670-672, (1961)

28) SCHOENBORN, B.P.; Nature, 224, pp.143-146, (1969)

29) ELEY, D.D & LESLIE, R.B.; Adv. in Chem.Phys., 7, pp.238-258, "(1964)

30) SPONSLER, BATH, ELLIS; J.Phys. Chem., 44, p.996, (1940)

31) PAULING, L.; J. Am. Chem. Soc., 67, p.555, (1945)

32) GREEN, R.W.; Trans. Roy. Soc., N.Z., 77, p.313, (1948)

33) CARDEW, M.H. & ELEY, D.D., Soc. Chem. Industry, pp.24-29, (1958)

34) MELLON, E.F.; KORN, A.H. & HOOVER, S.R.; J. Am. Chem. Soc., 70, pp 3040, (1948

35) LEEDER, J.D. & WATT, I.C.; J. Phys. Chem., 69, p.3280, (1965)

37) WATT, I.C. & LEEDER, J.D.; J. Text. Inst., 59, p.353, (1968 B)

38) WATT, I.C.; J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem., C 18, pp.169-245, (1980)

١

39) URQUHART, A.R.; J. Textile Inst., 15, p.1559, (1924)

40) MORRISEN, J. L. & HANLAN, J.F.; Nature, 179, p.528, (1957)

41) JEFFEREON, R.J.; Tex. Inst., 51, p.339, (1960)

42) CHABERT, J. & DIEMUNSCH, J.; Bull. Inst. Text., F.R., 99, p.205, (19a2)

43) EVERETT, D.H.; Trans. Faraday Soc., 50, pp.1077-1096, (1954)

44) EVERETT, D.H.. & SMITH, F.W.; Trans. Faraday Soc., 50, pp.187-196,(1954)

45) EVERETT, D.H. & WHITTON, W.I.; Trans. Faraday Soc., 48, pp.749-757. (1952)

46) "Adsorcion de vapor de Agua en Mioglobina; I.G. Mogilner; J.R. Grigera. 7ma Reunion SAB - B. Blanca, Argentina, 1978

180

<u>1</u>

47) Estudio de Hidratacion de Mioglobina en Monocristales, Grigera, J.R.; Mogilner, I.G.. IX Reunion Anual SAB Mendoza,(1980)

48) "Water Bridges in Myoglobin" ,J.R. Grigera e I.G.Mogilner, "Biophysics of Water: a working Conference", Girton. Cambridge, Inglaterra, 29/ 6-3/7/81

49) "Water Bridge in Myoglobin", J.R. Grigera; I.G. Mogilner. F. Franks Editor. Academic Press, pp.39-41, (1982)

50) "Funcion del agua den la estabilizacion de estructuras proteicas. Isotermas de Adsorcion de agua por Mioglobina". I.G. Mogilner; J.R. Grigera. XI Reunion Anual de la SAB, XVIII Reunion de la SAIB. Cordoba, 1982. Resumen 218

51) Bull, H.B. & Breese, K.; Archives of Biochemistry & Biophysics, 128, pp.488-496, (1948)

52) Luscher - Mattli, M; Biopolymers, 21, pp.403-418, (1982)

53) Lehninger, A.L.; "Biochemistry", 2cond Edition, Worth Publishers, Inc 1977

54) Moore, P.B.; Physics Today, Jan, pp.63-70, (1985)

55) Schoenborn, B.P.; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36, pp.569-573, (1971)

56) Schoenborn, B.P. & Hanson, J.C., ACS Symposium Series, N 127, Water in Biopolymers, Stanley P. Rowland, Editor, 12, pp.215-224, (1980)

57) Takano, T.; J. Mol. Biol, 110, pp.537-568, (1977)

58) idem, idem 110, pp.569-584, (1977)

57) Grigera, J.R & Berendsen, H.C., Biopolymers, 18, p.47, (1979)

60) Grigera, J.R. & Mascarenhas, S; Studia Biophysica, 73, p.19,(1978)

61) "Structural and Resonance Technique in Biological Research",
Ed. by D.L. Rousseau, Academic Press, Inc (1984), Chap 2, pp.90238, "Electron Spin Resonance", D.J. Kosman

62) "The role of Water in Myoglobin Conformation: an ESR study"; Neto, L.M. & col; Bulltin Mag. Res., 8, (1986)

63) TANFORD, C.; J. Am. Chem. Soc., 84, p.4240, (1962)

64) TANFORD, C.; "Physical Chemistry of Macromolecules", John & Sens, Inc., New York, Chap. 7, (1961)

35) NEMETHY, G. & SHERAGA, H.A.; J. Phys. Chem., 36, p.3382, (1962)

66) TIMASHEFF, S.N. & col; J. Biol. Chem., 241, p.1863, (1966)

67) TANFORD, C.; Advan. Protein. Chem., 23, p.121, (1968)

68) TIMASHEFF, S.N. & INDUE, H.; Biochemistry, 7, p.2501, (1968)

69) "Water - A Comprehensive Treatise". Ed. F. Franks, Tomo 4, Plenum Press, Cap. 5, "Nucleic Acids, Peptides and Proteins"; D. 'Eagland, pp.305-518, (1975)

70) INDUE, H. & TIMASHEFF, S.N.; Biopolymers, 11, pp.737-743, (1972)

71) SCATCHARD, G.; J. Am. Chem. Soc., 68, p.2315, (1946)

72) STOCKMAYER, W.H.; J. Chem. Phys., 18, p.58, (1950)

73) KIPLING, J. J.; "Adsorption from solutions of non -

electrolyts". Academic Press Inc. London, (1965)

74) BULL, H. B. & BREESE, K.; Archives of Biochemistry & Biophysic, 137, pp.299-305, (1970)

ŧ.

ţ

[

75) idem, idem, 139, pp.93-96, (1970)

76) idem, idem, 149, pp.164-168, (1972)

77) idem, idem, 128, pp.497-502, (1968)

78) BULL, H.B. & COOPER; "Surface Chemistry", Am. Ass. Adv. Sci. Fub., 21, p.150, (1943)

79) CHATTORAJ, D.K. & MITRA, S.P.; Indian Journal of Biochemistry and Biophysic; 14, pp.1-6, (1977)

80) idem, cb. cit., 14, pp.7-13, (1977)

81) idem, idem; 14, pp.101-107, (1977)

82) idem, idem, 15, pp.153-158, (1978)

83) MYERS, A. L. & PRAUNITZ; AICHE. J., pp.121-127, (1965)

84) SIRCAR, S. & MYERS, A.L.; "The Journal of Physical Chemistry", 74, pp.2828-2834, (1970)

85) MYERS, A.L. & SIRCAR, S; "The Journal of Physical Chemistry", 76, pp.3412-3419, (1972)

86) SIRCAR, S. & MYERS, A.L.; AIChE J., 19, pp.159-166, (1973)

87) KOIDE, G.T. CARTENSEN, E.L.; J. Phys. Chem., 80, pp.55~59, (1976)

88) idem, 80, pp.2526-2529, (1976)

87) BIENKIEWICI, K.J.; "UNTERSUCHUNGEN DES KOLLAGEN -WASSERSYSTEMS WASSERGERHALT IM KOLLAGEN, BESTIMMT NACA KARL FISHER"; XII Congreso Internacional de la Union de Sociedades de Quimicos del Cuero - Praga - Setiembre, (1971)

90) BRIGERA, J.R. & MOGILNER, I.G.; "Thermal Stability of Collagen as studied by length versus temperature behaviour of collagen film". XVIII Congress of International Union of Leather Technologist and Chemist Societies, 15 - 17 Sep. 1983, Venecia, Italia, pp.44 - 49

71) MOGILNER, ...G. & GRIGERA, J.R.; Fisicoquimica del colageno.

Una investigacion de Potencial Importancia Tecnologica. Revista de la G.E.A. (en prensa)

92) MDGILNER, I.G.; GRIGERA, J.R. y otros; "Surface Active Agent. Collagen Interaction = effect on shirinkage temperature", Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists, 71, pp.153-154, (1987)

93) ADKI, K. & HORI, J.; Bull. Chem. Soc. Japan, 29, pp.104-110, (1956)

94) ABKI,K.; Bull. Chem. Soc. Japan, 29, pp.369-372, (1952)

95) idem, pp.758-761, (1956).

96) PUTNAM, F. & NEURATH, H.; The Journal of Am. Chem. Soc., 66, pp.692-697, (1944)

97) idem, idem, 159, pp.195-209, (1945)

98) idem, J. Biol. Chem., 150, pp.263-264, (1943)

99) KLBTZ, I.M. & col; J. Am. Chem. Soc., 68, pp.1486-1490, (1946)

186

100) ISEMURA, T. & TOKIWA, F.; Bull. Chem. Soc. Japan, 35, pp.240-244, (1962)

. 74

101) TAMAKI, K. & TAMAMUSHI, B.;Bull. Chem. Soc. Japan, 28, pp.555-559, (1955)

102) PANKHURST, K.; Discussions of the Faraday Soc., 6, pp.52-62, (1949)

103) HARRAP E.S. & SCHULMAN, J.H.; Discussion of the Faraday Soc., 13, pp.197-205, (1953)

104) FOSTER, J.F. & YANG, J.T.; The Journal of Am. Chem. Soc., 76, pp.1015-1019, (1954)

105) KNDX, W.J. & WRIGHT, J.F.; Journal of Colloid Science, 20, pp.177-186, 1955)

106) MUKERJEE, P.; Analytical Chemistry, 28, pp.870-873, (1956)

107) GRIGERA, J. R.;"Introduccion a la Estadistica y Diseno de Experimentos" Ed. Trabuco, (1982)

108) FISHER, R.A. & YATES, F.; "Tablas Estadisticas para investigadores Científicos". Aguilar S.A. Ediciones. Madrid,

(1954)

109) PITTZ, E.P. & TIMASHEFF, S.N.; Biochemistry, 17, pp.615-623, (1978)

110) TIMASHEFF, S.N.; "Preferential interactions in protein water - cosolvent systems" in "Biophysics of Water", F. Franks Editor, Academic Press, pp.70-72, (1982)

111) MITCHELL, J.; "Aquametry", Part III, J. Wiley, (1980)

112) TIMMERMANN, E.O.; J. Chem. Faraday Trans. 1, (en prensa)

ESTABILIDAD , CONFORMACION E HIDRATACION DE PROTEINAS.

ADSORCION DE AGUA EN FASE LIQUIDA Y GASEOSA

INES GRACIELA MOGILNER

ANEXO TABLAS

ISOTERMA DE ADSORCION DE MIOGLOBINA A 30 C PREVIAMENTE SECADA

HR	g.ag/100g.p.s	S	INTERVALO CONFIANZA
6.8	4.098	4.066	(-0.957;9.153)
11.1	4.632	2.591	(1.412;7.853)
21.6	9.146	3.725	(4.514;13.177)
32.4	9.220	1.694	(7.113;11.326)
43.8	11.719	2.353	(8.793;14.645)
52.0	18.240	7.919	(8.395;28.085)
56.2	15.623	1.863	(13.307;17.939)
63.2	17.850	2.072	(15.273;20.426)
75.2	23.080	3.888	(18.246;27.914)
83.5	34.629	1.305	(24.413;47.844)
97.4	43.275	1.874	(26.448;60.103)

intervalo de confianza : $x + t_{a} S / n \qquad \alpha = 0.025$

Los valores de la isoterma son valores promediados y pesados
N	HR	Yex	Ycal	RESIDUO
1	0	0	Q	0
2	6.8	4.098	1.841	2.257
3	11.1	4.632	3.011	1.621
4	21.6	9.146	5,932	3.214
5	32.4	9.220	9.111	0.109
6	43.8	11.719	12.793	-1.074
7	52.0	18.240	15.751	2.489
8	56.2	15.623	17.400	-1.777
9	63.2	17.850	20,404	-2.554
10	75.2	23.080	26.556	-3.476
11	83.5	34.629	31.875	2.754
12	97.4	43.275	44.031	-0.756

c = 2.052 N = 20.008 p** = 1.516 po

Y = g.ag./100g. ps Valores promediados y pesados

MIDGLOBINA 30 C. DESORCION NATIVA

HR	g.ag./100 g.p.s.	5	intervalo de confianza
97.4	49, 349	15.398	(-88.929;187.627)
83.5	30,026	1.334	(24.292; 35.760)
75.2	19.548	6.084	(8.237; 27.582)
63.2	12.977	1.191	(11.083; 14.872)
56.2	11.506	1.426	(9.239; 13.773)
52.0	15.904	6,226	(5.957; 25.851)
43.8	9.036	1.314	(6.946; 11.125)
32.4	7.033	7,881	(5.780; 8.286)
21.6	11.099	4.652	(3.702; 18.496)
11.1	2.373	1.104	(0.617; 4.129)
6.8	2.067	2.461	(-1.846; 5.980)

Valores de la isoterma pesados y promediados.

N puntos	HR	Yex	Ycal	RESIDUO
1	97.4	49.349	65.367	-1.133
2	83.5	30.026	28,919	0.916
3	75.2	19.548	21.070	-0.276
4	63.2	12.977	14.519	-1.429
5	56.2	11,506	11,958	-0.350
6	52.0	15.904	10.679	0.920
7	43.8	9.036	8,562	0.398
8	32.4	7.033	6.145	0.126
9	21.6	11.099	4,136	1.648
10	11.1	2,373	2.225	0.148
11	6.8	2,067	1.405	0.297
12	0	0	0	0

c = 3.190 N = 7.561 p** = 1.096 po

Y = g.ag. / 100 g. p.s. Valores promediados y pesados.

MIOGLOBINA 30C.DESORCION PREVIO SECADO

HR	g.ag./100g.p.s.	S	INTERVALO CONFIANZA
07 4	47 275	1 074	(24 448-40 107)
7/.4	43.273	1.0/4	(28.448;80.1037
83.5	39.916	2.650	(16.122;63.709)
75.2	30,309	8.188	(9.983;50.635)
63.2	22.279	8,641	(8.540;36.017)
56.2	20.300	7.875	(7.779;32.820)
52.0	19.048	8.124	(6.130;31.965)
43.8	16.369	7.708	(4.114;28.625)
32.4	15.900	5.773	(6.721;25.079)
21.6	16.933	5.905	(7.543;26.323)
11.1	11.587	6.678	(0.968;22.205)
6.8	10.181	5.791	(0.973;19.389)

Valores de la isoterma pesados y promediados.

N puntos	HR	Yex	Ycal	RESIDUO
	07 4	47 075		0.070
1	77.4	43.2/3	44.113	-0.838
2	83.5	39.916	36,070	2.719
3	75.2	30.309	32.344	-0.464
4	63.2	22.279	27.861	-1.210
5	56.2	20.300	25.586	-1.262
6	52.0	19.048	24.303	-1.210
7	43.8	16.369	21.911	-1.346
8	32.4	15.900	18.641	-0,889
9	21.6	16.933	15.201	0.550
10	11.1	11.587	10.599	0.278
11	6.8	10.181	7.765	0.783
12	0	o	0	0

c = 14.908 N = 19.183 p** = 1.665 po

Y = g.ag. / 100g.p.s. Valorespromediados y pesados

N puntos	(P/P0)	Yex	Ycal	RESIDUO
1	0	0	0	0
2	0.05	6.250	5.357	0.893
3	0.10	8.800	8.905	-0.105
4	0.15	11.200	11.552	-0.352
5	0.20	13.200	13.699	-0 .499
6	0.25	15.500	15.554	-0.054
7	0.30	17.300	17.235	0.065
8	0.35	18.700	18.818	-0.118
9	0.40	20.000	20.356	-0.356
10	0.45	21.900	21.886	0.014
11	0.50	25,200	23.440	1.760
12	0.60	26,000	26.728	-0.728
13	0.70	30,000	30.432	-0.432
14	0.80	35,000	34.794	0.206

ISOTERMA DE ADSORCION COLAGENO DE COLA DE RATA A 200. METODO GRAVIMETRICO

1

⊂ ≠	1	1		5
------------	---	---	--	---

352 N = 19.616 p** = 1.653 po

Y = g.ag. /100g.p.s.

ISOTERMA ADSORCION COLAGENO TENDON DE AQUILES BOVINO 25C. METODO GRAVIMETRICO

N puntos	(p/po)	Yex	Ycal	RESIDUO
1	0	0	0	0
2	0.06	6. 360	7.023	-0.663
3	0.11	7,900	9.628	-1.727
4	0.17	12.940	11.686	1.254
5	0.31	17.580	15.194	2.386
6	0.43	18.560	18.046	0.515
7	0.51	19.480	20.160	0.680
8	0.57	24,260	21.949	2.311
9	0.75	26.810	29.089	2.279
10	0.81	29.840	32.419	2.579
11	0.85	33,730	35.052	1.322
12	0.88	39.090	37.302	1.788
13	0.93	43.010	41.725	1.285

}

c = 21.100 N = 13.650 p** = 1.368 po

Y = g.ag. / 100g.p.s.

ISOTERMA ADSORCION COLAGENO 35C TENDON AQUILES BOVINO. METODO GRAVIMETRICO

N puntos	(p/po)	Yex	Ycal	RESIDUO
1	0	0	Ö.	0
2	0.06	7.280	6.701	0.579
3	0.11	8.190	8.780	-0.590
4	0.31	13.070	13.244	-0.174
5	0.43	12.700	15.746	-3.046
6	0.51	19.910	17,699	2.211
7	0.57	22.150	19.406	2.744
8	0.75	26.110	26.702	-0,592
9	0.81	28.640	30,365	-1.725
10	0.85	33.02 0	33.385	-0,365
11	0.88	36.790	36.057	0.733
12	0.93	41.880	41.565	0.315

~	=	26 937	N ==	1 1
L		20.73/	IN —	1 1

l1.140 p** = 1.264 pc

Y = g.ag. / 100g.p.s.

ISOTERMA ADSORCION LISOZIMA 25C. METODO GRAVIMETRICO

N puntos	(p/po)	Yex	Ycal	RESIDUO
1	0	0	0	0
2	0.17	5.030	4.897	0.133
3	0.31	6.650	7.243	-0.593
4	0.43	9.950	9.165	0.785
5	0.51	10.760	10,578	0,182
6	0.57	11.900	11.770	0.130
7	0.71	14.230	15.302	1.072
8	0.81	17.580	18,934	-1.354
9	0.88	25.380	22.463	2.917
10	0.94	25.410	26.569	-1.159

c = 8.486 N = 7.560 p** = 1.292 po

Y = g.ag. / 100g.p.s.

DESORCION LISOZIMA 25C. METODO GRAVIMETRICO. SECADO CON PENTOXIDO Y VACIO

N puntos	(p/po)	Yex	Ycal	RESIDUO
1	0.88	25.540	24.812	0.728
2	0.81	19.420	20.797	1.377
3	0.71	16,950	16.812	0.138
4	0.57	13.410	13.108	0,302
5	0.51	12.230	11.907	0.323
6	0.43	10.730	10.528	0.202
7	0.31	8,700	8,738	0.038
8	0.17	6.440	6.642	0.202
9	0	0	0	0

c = 19.797 N = 7.598 p** = 1.257

Y = g.ag. / 100g.p.s.

CÍCLOS DE HISTERESIS DE MIOGLOBINA A 30C. METODO DE LA BALANZA DE CUARZO

EXPERIENCIA PRIMERA

DESORCION I			ADSORCION I		
HR (%)	HR(%) g.ag/100gps		HR (%)	g.ag∕100ç	3be
		punto			punto
56.2	14.286	1	48.3	17.007	
52.0	21.088	2	52.0	10.204	4
48.3	17.007		56.2	25.170	5
DESORCION II			ADSORCION II		
56.2	25.170		21.6	16.327	
52.0	18.367	6	32.4	20.408	10
48.3	23,129	7	48.3	22.449	11
32.4	20,408	8			
21.6	16.327	9			
DESORCION	III		ADSORCION	III	
48.3	22.449		11.1	18.367	
32.4	13,605	12	21.6	19.048	15

21.6	21.088	13
11.1	18.367	14

DESORCION IV

21.6	19,048	
11.1	17.007	16
6.8	14.966	17

ADSORCION(PREVIO SECADO)

6.8	17.770	18
11.1	22.890	19
21.6	21.660	20

EXPERIENCIA II

DESORCION I

11.1 28.890 14

15

6.8 27.290

ADSORCION I

HR (%)	g.a g/100)gps	HR (%)	g.ag/100g	os
		punto			punto.
56.2	25.625	1	48.3	20,000	partida
52.0	19,375	2	52.0	19,480	4
48.3	20.000	3	56.2	24.840	5
DESORCION II ADSORCION II		CION II			
56.2	24.840		21.6	22,490	
52.0	27.500	6	32.4	21.550	10
48.3	28.75	7	48.3	30.30	11
32,4	25.625	8			
21.6	22.490	9			
DESORCION III		ADSORC	ION (PREVIO	SECADO)	
48.3	30.300		6.8	28.890	16
32.4	27,000	12	11.1	30.770	17
21.6	30.310	13	21.6	33.870	18

733 Antré en Billioten en la frebr 21 de peris de 1991 CIENCIAS EXACTAS BUBLIOTECA DEL DEPARTAMENT BE FISICA ADIELA N. SABORIDO RIGLICT DEATIN