



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**Técnicas Instrumentales y Computacionales para la  
Caracterización de Sistemas de Macromoléculas y  
Nanopartículas. Implementación y Aplicaciones**

**Dña. Vanesa Fernández Espín  
2017**



UNIVERSIDAD DE  
**MURCIA**

D. José García de la Torre, Catedrático de Universidad del Área de Química Física en el Departamento de Química Física, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Técnicas instrumentales y computacionales para la caracterización de sistemas de macromoléculas y nanopartículas. Implementación y aplicaciones", realizada por D<sup>a</sup>. Vanesa Fernández Espín, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 18 de Septiembre de 2017



UNIVERSIDAD DE  
**MURCIA**

D. José Ginés Hernández Cifre, Profesor Titular de Universidad del Área de Química Física en el Departamento de Química Física, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Técnicas instrumentales y computacionales para la caracterización de sistemas de macromoléculas y nanopartículas. Implementación y aplicaciones", realizada por D<sup>a</sup>. Vanesa Fernández Espín, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 18 de Septiembre de 2017

# Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

A D. José García de la Torre, director de esta Tesis, por acogerme en su grupo de investigación y permitirme realizar esta Tesis Doctoral.

A D. José Ginés Hernández Cifre, director de esta Tesis, por su ayuda durante todo el tiempo que he estado en el Departamento, las aclaraciones a cada duda que me surgía, la compañía en las horas de laboratorio y sobre por todo por el tiempo empleado en los últimos momentos de redacción y papeleo para poder finalizar mi Tesis Doctoral.

A D<sup>a</sup>. María del Carmen López Martínez, por transmitirme sus conocimientos y prestarme su apoyo.

A los profesores del Departamento de Química Física: Guillermo, por permitirme entrar en el Departamento y realizar esta Tesis, a Joaquín y a Manuela. A Ángela, por sus consejos y por permitirme colaborar con su grupo de investigación. A Carmiña, directora del Departamento de Química Física, por su ayuda en los temas relacionados con la docencia y por sus consejos.

A mis compañeros del Departamento que me han acompañado durante mi Tesis: Mar, José Manuel, José María, Javier, José Pedro, Encarni y en especial a Edu, por sus consejos y ayuda prestada durante toda la Tesis. A Ana Díez, por los buenos momentos que hemos pasado juntas en el Departamento.

A Úrsula y a Pedro, por su amabilidad y charlas compartidas.

A todos mis amigos: Rocío, Cristina, M<sup>a</sup> José, Ade, Fuen, Sole, Nieves, Molina, Antonio, Papito, Jesús, Daniel y Javi, por estar siempre ahí y por todos los buenos momentos que pasamos juntos. A Ana Écija, porque durante todos estos años de Tesis, ha sido un

apoyo fundamental. Y a Nuria, por estar a mi lado en todo momento, en los malos y en tantos momentos buenos como hemos vivido, porque lo que unió la Química no habrá nada que lo separe.

A mi familia, sobre todo a mis tíos José y Juani, por el cariño y los ánimos que siempre me dan, a Consuelo y Raúl. A mis cuñados y por supuesto a mis hermanas, porque siempre me han cuidado como la pequeña de la casa dándome los mejores consejos, apoyándome en todo y animándome en cualquier situación. Lo mejor de tenerlas en mi vida es saber que pase lo que pase siempre estarán a mi lado.

A mis sobrinos, Ana, María, David y Javier, por ser el regalo más bonito que me han dado mis hermanas. Desde el primer día que os tuve en mis brazos sentí lo especial que seríais en mi vida. Gracias por todos los besos, abrazos y sonrisas que me regaláis, porque cada gesto vuestro me llena de vida y me hace inmensamente feliz. Os quiero infinito y mucho más.

A mis abuelos Alfonso y Josefa, aunque no pueden leer estas palabras, sé que siguen a mi lado, guiándome como siempre han hecho. Gracias por haberme querido tantísimo, por todos los momentos que hemos disfrutado juntos, por ser los mejores abuelos que una nieta podía tener. Gracias abuela por tu último abrazo... *“Los abuelos nunca mueren, se vuelven invisibles y duermen para siempre en lo más hondo de nuestro corazón”*.

A mi novio, porque sin duda, esta Tesis no hubiera sido posible sin él. Gracias por estar a mi lado en cada proyecto en el que me embarco. Gracias por creer en mí, por cada palabra, gesto o abrazo que me das cuando lo necesito, por lo especial que me haces sentir, porque juntos, sé que todo lo que nos propongamos, lo conseguiremos y porque la vida es mucho más bonita junto a ti.

A mis padres por ser lo que soy gracias a ellos. Por todos los valores que me han aportado y por el amor tan grande que me dan día a día. Gracias por vuestro sacrificio y esfuerzo constante para verme feliz y darme todo lo que me habéis dado. Gracias por confiar siempre en mí y apoyarme en todo lo que me he propuesto, porque sin vosotros hubiera sido imposible conseguirlo. No os podéis imaginar lo orgullosa que me siento de teneros como padres.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a todos ellos.

La autora de estas Tesis y los co-directores de la misma desean expresar su agradecimiento al Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España por la concesión de ayudas al proyecto CTQ2012-33717 (incluyendo fondos FEDER) sobre *“Estudio teórico-computacional y experimental de propiedades de macromoléculas biológicas y sintéticas en disolución diluida, sistemas densos y emulsiones”* al que fue asignada la ayuda para la Formación de Personal Investigador disfrutada por la autora de esta Tesis (BES-2013-065105). También agradecer el apoyo de la Fundación Séneca, órgano oficial para la investigación científica de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, cuya financiación proviene de la distinción como “Grupo de Excelencia Científica de la Región de Murcia,” para el proyecto 04531/GERM/06, sobre *“Metodologías para la simulación numérica y caracterización experimental de polímeros sintéticos y macromoléculas biológicas”* y del proyecto de investigación 19353/PI/14 sobre *“Propiedades en disolución de macromoléculas, nanopartículas y sus complejos. Caracterización experimental mediante técnicas instrumentales y simulación multi-escala con métodos de computación intensiva”*.



*A mis padres y a mi novio*



# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>9</b>
1.1. Preámbulo . . . . .	9
1.2. Organización de esta Tesis . . . . .	11
1.3. Propiedades en disolución . . . . .	12
<b>2. Dispersión de luz</b>	<b>17</b>
2.1. Introducción . . . . .	17
2.2. Dispersión estática de luz (SLS) . . . . .	17
2.3. Dispersión dinámica de luz (DLS) . . . . .	21
2.3.1. Sistemas monodispersos . . . . .	21
2.3.2. Sistemas polidispersos . . . . .	25
2.4. Potencial zeta . . . . .	28
2.4.1. Medida del potencial zeta . . . . .	31
2.5. Instrumentación . . . . .	34
2.5.1. Modalidad de dispersión de luz . . . . .	35
2.5.1.a. Análisis de datos en modalidad estática . . . . .	37
2.5.2. Modalidad de potencial zeta . . . . .	38
2.6. Resultados . . . . .	40
2.6.1. DLS con un patrón de tamaño: látex de poliestireno . . . . .	40
2.6.2. DLS con nanopartículas de oro . . . . .	43
2.6.3. DLS con una molécula pequeña: sacarosa . . . . .	45
2.6.3.a. SLS: determinación del peso molecular . . . . .	46
2.6.3.b. DLS: coeficiente de difusión y tamaño hidrodinámico . . . . .	47
<b>3. Viscosimetría</b>	<b>53</b>
3.1. Conceptos teóricos . . . . .	53

3.1.1.	Viscosidad de líquidos . . . . .	53
3.1.2.	Viscosidad de disoluciones . . . . .	55
3.2.	Instrumentación . . . . .	58
3.2.1.	Viscosímetro de bola rodante . . . . .	58
3.2.1.a.	Fundamentos del viscosímetro de bola . . . . .	58
3.2.1.b.	Descripción de nuestro equipo . . . . .	60
3.2.2.	Viscosímetro capilar . . . . .	60
3.2.2.a.	Fundamentos del viscosímetro capilar . . . . .	60
3.2.2.b.	Descripción de nuestro equipo . . . . .	63
3.3.	Medidas de comprobación . . . . .	64
<b>4.</b>	<b>Reología</b>	<b>75</b>
4.1.	Conceptos teóricos . . . . .	75
4.1.1.	Modelos reológicos para fluidos no newtonianos . . . . .	81
4.1.1.a.	Ecuaciones basadas en esfuerzo . . . . .	82
4.1.1.b.	Ecuaciones basadas en viscosidad . . . . .	83
4.1.2.	Viscoelasticidad . . . . .	85
4.2.	RheoFit: programa para el ajuste de curvas de viscosidad . . . . .	86
4.2.1.	Apuntes sobre el procedimiento de Marquardt . . . . .	89
4.3.	Instrumentación . . . . .	90
4.3.1.	Fundamentos del reómetro . . . . .	90
4.3.2.	Descripción de nuestro equipo . . . . .	92
4.4.	Medidas de comprobación . . . . .	94
4.4.1.	Comportamiento independiente del tiempo . . . . .	94
4.4.1.a.	Curvas de fluidez (esfuerzo) . . . . .	97
4.4.1.b.	Curvas de viscosidad . . . . .	98
4.4.2.	Comportamiento dependiente del tiempo . . . . .	104
<b>5.</b>	<b>Aplicaciones a sistemas biológicos</b>	<b>107</b>
5.1.	Interacción de ADN con moléculas pequeñas . . . . .	107
5.1.1.	Introducción . . . . .	107
5.1.2.	Conformación global y propiedades en disolución del ADN . . . . .	109
5.1.3.	Efecto en la viscosidad de disoluciones . . . . .	110
5.1.4.	Materiales y métodos . . . . .	114

5.1.4.a.	Preparación de las muestras . . . . .	114
5.1.5.	Resultados . . . . .	117
5.1.6.	Conclusiones . . . . .	120
5.2.	Determinación de la estructura de la proteína PatZ . . . . .	121
5.2.1.	Introducción . . . . .	121
5.2.2.	Metodología . . . . .	122
5.2.2.a.	Procedimiento de medida . . . . .	122
5.2.3.	Resultados . . . . .	123
5.2.3.a.	Determinación del estado de oligomerización . . . . .	123
5.2.3.b.	Validación del modelo tetramérico con HYDROPRO . . . . .	127
5.2.4.	Conclusiones . . . . .	130
5.3.	Caracterización de medios viscosos con importancia en reproducción . . . . .	131
5.3.1.	Introducción . . . . .	131
5.3.2.	Metodología . . . . .	133
5.3.2.a.	Fluidos biológicos. Toma de muestras . . . . .	133
5.3.2.b.	Fluidos artificiales. Preparación de muestras . . . . .	133
5.3.2.c.	Procedimiento de medida . . . . .	134
5.3.3.	Resultados . . . . .	135
5.3.3.a.	Implicaciones biológicas . . . . .	138
5.3.4.	Conclusiones . . . . .	140
<b>6.</b>	<b>Aplicaciones a sistemas sintéticos</b>	<b>141</b>
6.1.	Estudio de interfases polarizadas líquido-líquido . . . . .	141
6.1.1.	Introducción . . . . .	141
6.1.2.	Metodología . . . . .	143
6.1.3.	Resultados . . . . .	145
6.1.4.	Conclusiones . . . . .	148
6.2.	Estudio de un copolímero termosensible basado en PNIPAAm . . . . .	149
6.2.1.	Introducción . . . . .	149
6.2.1.a.	Análisis de la función de correlación . . . . .	152
6.2.2.	Resultados . . . . .	153
6.2.2.a.	Medidas de dispersión de luz y potencial zeta . . . . .	154
6.2.2.b.	Medidas de espectroscopía UV-vis . . . . .	167
6.2.2.c.	Medidas de ultracentrifugación analítica . . . . .	170

6.2.3. Conclusiones . . . . .	176
<b>7. Aplicación a suspensiones de nanopartículas de oro</b>	<b>177</b>
7.1. Introducción . . . . .	177
7.2. Caracterización de AuNPs en diversos medios . . . . .	179
7.2.1. Materiales y métodos . . . . .	179
7.2.2. Agregación de AuNPs en medio salino . . . . .	181
7.2.2.a. Aspectos teóricos de la cinética de la agregación . . . . .	182
7.2.2.b. Resultados . . . . .	183
7.2.2.c. Conclusiones . . . . .	196
7.2.3. Agregación de AuNPs en presencia de quitosano . . . . .	196
7.2.3.a. Consideraciones sobre el quitosano . . . . .	197
7.2.3.b. Resultados . . . . .	198
7.2.3.c. Conclusiones . . . . .	213
7.2.4. Agregación de AuNPs en presencia de PNIPAAm-co-PAMPTMA . . . . .	213
7.2.4.a. Metodología . . . . .	213
7.2.4.b. Resultados . . . . .	214
7.2.4.c. Conclusiones . . . . .	219
7.3. Análisis computacional de nanopartículas híbridas Au-ADN . . . . .	220
7.3.1. Introducción . . . . .	220
7.3.2. Metodología . . . . .	222
7.3.2.a. Programas para la predicción de propiedades de modelos de bolas . . . . .	222
7.3.2.b. Modelo de nanopartícula híbrida Au-ADN . . . . .	223
7.3.3. Resultados . . . . .	227
7.3.4. Conclusiones . . . . .	231
<b>8. Conclusiones</b>	<b>233</b>
<b>Referencias</b>	<b>237</b>

# Glosario

## Símbolos

### Griegos

- $\dot{\gamma}$ : gradiente de cizalla.
- $\eta$ : viscosidad de la disolución.
- $\eta_0$ : viscosidad del disolvente.
- $[\eta]$ : viscosidad intrínseca.
- $\kappa$ : inversa de la longitud de Debye (inverso del espesor de la doble capa eléctrica).
- $\lambda$ : longitud de onda del láser utilizado en diferentes técnicas.
- $\lambda_{max}$ : longitud de onda correspondiente al máximo de absorbancia.
- $\mu$ : movilidad electroforética.
- $\rho$ : densidad de la disolución.
- $\tau$ : esfuerzo / tiempo de relajación.
- $\tau_f$ : tiempo de relajación rápido.
- $\tau_s$ : tiempo de relajación lento.
- $\tau_{xy}$ : esfuerzo de cizalla.
- $\zeta$ : potencial zeta.

### Latinos

- $a$ : longitud de persistencia / radio de una partícula coloidal.
- $a_T$ : radio equivalente traslacional (radio de Stokes).
- $A$ : absorbancia.
- $A_2$ : segundo coeficiente del virial.
- $b$ : diámetro de bola en un modelo de bolas.
- $c$ : concentración.

- $C$ : función de correlación.
- $d_h$ : diámetro hidrodinámico.
- $D$ : coeficiente de difusión traslacional.
- $f$ : coeficiente de fricción traslacional.
- $g^{(1)}$ : función de correlación del campo eléctrico normalizada.
- $g^{(2)}$ : función de correlación de la intensidad de luz normalizada.
- $G_1$ : función de correlación del campo eléctrico no normalizada.
- $G_2$ : función de correlación de la intensidad de luz no normalizada.
- $I$ : intensidad de luz dispersada.
- $I_0$ : intensidad de luz incidente.
- $k_B$ : constante de Boltzmann.
- $L$  (o  $L_c$ ): longitud de contorno.
- $M$ : peso molecular.
- $M_L$ : peso molecular por unidad de longitud.
- $N_A$ : número de Avogadro.
- $n$ : índice de refracción.
- $q$ : vector de *scattering*.
- $r_h$ : radio hidrodinámico (radio de Stokes).
- $R$ : relación Rayleigh.
- $s$ : coeficiente de sedimentación.
- $t$ : instante de tiempo.
- $T$ : temperatura.
- $T\%$ : % de transmitancia.
- $\bar{v}$ : volumen específico parcial.
- $V$ : volumen.

## Acrónimos

- ADN: ácido desoxirribonucleico.
- AuNP: nanopartícula de oro.
- CCC: concentración crítica de coagulación.
- CS: quitosano.
- AUC: ultracentrifugación analítica.
- DLCA: agregación limitada por difusión.
- DLS: dispersión de luz dinámica.
- ITIES: interfase entre disoluciones electrolíticas inmiscibles.
- LCST: temperatura de disolución crítica inferior.
- P-46/20: copolímero con 46 monómeros de PNIPAAm y 20 monómeros de PAMPTMA.
- P-48/6: copolímero con 48 monómeros de PNIPAAm y 6 monómeros de PAMPTMA.
- PNIPAAm-co-PAMPTMA: copolímero dibloque formado poli(N-isopropilacrilamida) y poli((3-acrilamidopropil)trimetilamonio).
- RLCA: agregación limitada por reacción.
- SLS: dispersión de luz estática.
- SPR: resonancia de plasmón superficial.
- TEM: microscopía electrónica de transmisión.
- UCST: temperatura de disolución crítica superior.
- UV-vis: espectroscopía ultravioleta-visible.



# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Preámbulo

El trabajo que constituye esta Tesis Doctoral forma parte de las actividades del Grupo de Investigación de Química Física Macromolecular (“Polímeros”, E045-04) del Departamento de Química Física de la Universidad de Murcia.

Entre los objetivos del Grupo en los años recientes se ha dado gran importancia a la incorporación de líneas de trabajo experimental, dentro del campo de la química física de macromoléculas biológicas y sintéticas, y nanopartículas, en disolución o dispersión. En este campo, en los aspectos teóricos, conceptuales y metodológicos, este Grupo ha desarrollado una labor intensa durante muchos años. No entramos aquí en detalles; algunos aspectos en este sentido serán indicados en esta Tesis más adelante, cuando sea oportuno. La motivación para iniciar estas líneas experimentales fue propuesta, aceptada y financiada, por una parte, por el Ministerio de Economía y Competitividad, para los proyectos CTQ2009-08030 y CTQ2012-33717. De hecho, la concesión del CTQ2012-33717 incluyó la dotación del contrato predoctoral con el que ha contado la autora de esta Tesis para la realización de esta investigación. Y por otra, por la generosa concesión a este Grupo, por parte de la Fundación Séneca de la Región de Murcia, de la mención del mismo como Grupo de Excelencia, con la importante subvención económica (04531/GERM/06) que, según lo solicitado, se destinaba a cubrir objetivos de carácter experimental.

Gracias a las mencionadas subvenciones, se adquirió instrumentación para implementar, completamente – o parcialmente, otras que estaban implementándose – diver-

sas técnicas de caracterización de macromoléculas y nanopartículas, entre las que cabe mencionar:

- Dispersión de luz (*light scattering*, LS)
- Viscosimetría
- Densimetría
- Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis)
- Reología
- Ultracentrifugación analítica (*analytical ultracentrifugation*, AUC)
- Cromatografía de exclusión de tamaños (*size exclusion chromatography*, SEC)

Todo ello además de otras técnicas de carácter general disponibles en los laboratorios del Departamento y Servicios Centrales de la Universidad, así como de los recursos de cálculo científico de los que habitualmente disponemos.

La implementación de nuevas líneas de trabajo experimental, y las consiguientes técnicas instrumentales implica un evidente esfuerzo, que se hace más notable para un Grupo que hasta hace poco era eminentemente teórico. Ciertamente, casi todas las técnicas vienen hoy en día listas, *supuestamente*, según los fabricantes, para su utilización inmediata. Para ello, cuentan con sofisticados *softwares* mediante los cuales el ordenador al que están conectados no solamente controla el instrumento, sino que se encarga también del análisis de los datos experimentales, obtención de resultados finales, confección de informes, etc. Respecto al panorama de la instrumentación científica de hace poco – digamos, un par de décadas –, además de las evidentes mejoras propiamente instrumentales, se nota sobre todo en el diseño de *softwares* una orientación hacia usuarios finales, dedicados a una aplicación concreta, y con escasa o incluso nula formación acerca de los principios físico-químicos de la técnica. Su utilización por parte de científicos requiere que éstos desentrañen entresijos de esos programas de ordenador y protocolos de uso, para acceder a los datos instrumentales primarios.

Además, el calibrado, verificación, control y mantenimiento de toda esta instrumentación en un entorno de investigación científica, además de la subsiguiente diversidad – no una sola – de aplicaciones, requiere en dicho entorno una notable actividad. Partiendo de estos

puntos de vista, el trabajo de esta Tesis se orientó, prioritariamente, a objetivos de implementación (los susodichos calibrados, verificaciones, controles y mantenimientos) de estas técnicas. Y, naturalmente, no solamente la implementación, sino también la utilización de las técnicas en problemas relevantes, tendente a la contribución de aportaciones novedosas en los mismos. Además de algunos temas en los que nuestro propio Grupo estaba interesado, se han abordado otros motivados por colaboraciones con otros grupos, de diversas instituciones, incluida la Universidad de Murcia, según indicaremos cuando sea oportuno. Por ello, la Tesis comprende, en primer lugar, unos capítulos (del 1 al 4) de carácter general, descriptivo y metodológico sobre las diversas propiedades y técnicas que hemos utilizado, y otros capítulos (del 5 al 7) sobre las aplicaciones específicas.

## 1.2. Organización de esta Tesis

Establecidos, en la sección anterior los objetivos generales de la Tesis, indicamos a continuación cómo el desarrollo de los mismos se expone a lo largo de esta Tesis. Los primeros capítulos se dedican a la descripción de los fundamentos, implementación y verificación de diversas técnicas experimentales. Así, el Capítulo 2 se dedica a la dispersión de luz (*light scattering*) en sus diversas modalidades (estática, dinámica, electroforética). La determinación de la viscosidad de líquidos sencillos y de disoluciones diluidas (para la determinación de la viscosidad intrínseca) se trata en el Capítulo 3. La caracterización del comportamiento viscoso de fluidos complejos, dependiente del esfuerzo al que son sometidos, que pertenece a la temática genéricamente denominada Reología, se trata en el Capítulo 4. Los fundamentos concretos de cada técnica se exponen en el correspondiente capítulo. No obstante algunos conceptos muy generales, u otros que no tienen cabida en ellos, se tratan en la siguiente sección de esta Introducción. En libros de texto avanzados pueden encontrarse detalles adicionales; por ejemplo en el de Hiemenz y Lodge [1] sobre macromoléculas sintéticas, o en el de Serdyuk y col. centrado en sistemas biológicos [2].

La ultracentrifugación analítica (AUC), que hemos utilizado ocasionalmente en este trabajo, fue objeto monográfico de una Tesis Doctoral anterior de nuestro Grupo [3]. La instrumentación utilizada en las técnicas de espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis) y microscopía de transmisión de electrones (*transmission electron microscopy*, TEM), que también hemos utilizado en esta Tesis, serán descritas en los capítulos en los que aparezcan medidas realizadas con ellas.

Los siguientes tres capítulos están dedicados a mostrar aplicaciones de las técnicas instrumentales que hemos puesto a punto. Cada uno de ellos trata con un tipo genérico de sistema, por lo que el contenido de sus diferentes secciones es variopinto. Sin embargo, se ha elegido dicha distribución para que el número de capítulos y su extensión sea equilibrada. Así, el Capítulo 5 está dedicado a medidas llevadas a cabo sobre sistemas relacionados de un modo u otro con el ámbito biológico. En concreto, tres son los sistemas estudiados con los siguientes objetivos: 1) determinar el poder intercalador de moléculas pequeñas en el ADN, 2) determinar la estructura de la proteína PatZ, y 3) determinar el comportamiento viscoso de fluidos de importancia en la reproducción animal. El Capítulo 6 contiene medidas realizadas sobre sistemas que hemos denominado sintéticos porque todos sus componentes han sido creados artificialmente en el laboratorio. En concreto, dos son los sistemas estudiados: 1) emulsiones donde aparecen interfases polarizadas, y 2) disoluciones de un copolímero termosensible. El Capítulo 7 está dedicado exclusivamente a la caracterización de nanopartículas de oro en diversos medios.

Por último, el Capítulo 8 recoge las conclusiones más relevantes de esta Tesis.

### 1.3. Propiedades en disolución

Describimos aquí muy brevemente, con el propósito de presentar las necesarias definiciones y nomenclatura, las propiedades más importantes que son consideradas en esta Tesis.

Nos interesa el efecto causado por el soluto o fase dispersa, asociado a sus propiedades y estructura, en una disolución o dispersión. Las moléculas o partículas del soluto pueden ser (i) rígidas, con una geometría más o menos sencilla, pero determinada (ii) flexibles, con uno, pocos o muchos grados de libertad, de manera que pueden presentar una variedad de conformaciones.

Naturalmente, es propiedad primordial el peso o masa molecular de las partículas de soluto,  $M$ . Una magnitud que representa el tamaño global y conformación del soluto es el radio de giro,  $R_g$ . Para partículas rígidas se define como

$$R_g^2 = \frac{1}{V} \int_V s^2 d\tau, \quad (1.1)$$

donde  $s$  es la distancia desde cualquier punto de la partícula a su centro de masas. La integral (triple) se extiende sobre todo el volumen de la partícula,  $V$ , indicándose con

$d\tau$  un elemento infinitesimal de volumen. Para el tratamiento teórico o computacional, se discretiza la ecuación 1.1 suponiendo la partícula compuesta por un número  $N$  de elementos, cuyas distancias al centro de masas son  $s_i$ . Entonces, el radio de giro viene dado por

$$R_g^2 = \left\langle \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N s_i^2 \right\rangle. \quad (1.2)$$

En esta ecuación se contempla la posibilidad de que las partículas sean flexibles, indicándose mediante  $\langle \dots \rangle$  un promedio sobre las posibles conformaciones. En caso de ser rígidas, este promedio no es necesario.

Son de particular importancia las propiedades de transporte. De entre ellas, la más importante es el coeficiente de difusión traslacional,  $D$ , de las partículas de soluto que se estudiará con mayor profundidad en el Capítulo 2. Las teorías de Einstein sobre los aspectos moleculares de la difusión establecen que este coeficiente está relacionado con el coeficiente de fricción traslacional,  $f$ , que relaciona la velocidad lineal,  $v$ , que una partícula adquiere cuando actúa sobre ella una fuerza,  $F$ , siendo  $f = F/v$ . La ecuación de Einstein es

$$D = \frac{k_B T}{f}, \quad (1.3)$$

en la que  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $T$  la temperatura absoluta.

La mecánica de fluidos establece que el coeficiente de fricción es el producto de la viscosidad del fluido en que están inmersas las partículas y un término que tiene que ver con la forma y tamaño de éstas:

$$f = \eta_0[\text{forma, tamaño}]. \quad (1.4)$$

Así, para partículas esféricas de radio  $a$  tenemos la ley de Stokes

$$f = 6\pi\eta_0 a, \quad (1.5)$$

siendo  $\eta_0$  la viscosidad del disolvente. Combinando las ecs. 1.3 y 1.5 se desprende la llamada ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 a}. \quad (1.6)$$

Para partículas cualesquiera (rígidas, de cualquier forma, o flexibles), se puede definir un radio equivalente, habitualmente llamado radio de Stokes, o simplemente radio hidrodinámico,  $r_h$ , que nosotros preferimos llamar, en una notación más rigurosa [4], radio equivalente traslacional,  $a_T$ . Se define como el radio de una esfera que tuviese el mismo coeficiente de difusión en las mismas condiciones de disolvente y temperatura:

$$r_h \equiv a_T = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D}. \quad (1.7)$$

En ciertos ámbitos es frecuente utilizar el diámetro hidrodinámico,  $d_h$ , en lugar del radio

$$d_h \equiv 2r_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta_0 D}. \quad (1.8)$$

Otra propiedad que va a ser considerada en esta Tesis y cuya determinación está en íntima conexión con la medida del coeficiente de difusión es el potencial zeta,  $\zeta$ . Los fundamentos de esta técnica se desarrollarán en el Capítulo 2. El potencial zeta es el valor del potencial eléctrico en una determinada región de la doble capa eléctrica que rodea la superficie de las partículas coloidales, siendo, por tanto, una medida de la magnitud de la repulsión/atracción electrostática entre las partículas. Este potencial se determina a partir de la movilidad electroforética,  $\mu$ , que se suele medir con el mismo tipo de instrumentación que el coeficiente de difusión,

$$\zeta = \frac{3\eta\mu}{2\epsilon f(\kappa a)}, \quad (1.9)$$

donde  $\eta$  y  $\epsilon$  son la viscosidad y la constante dieléctrica del medio, respectivamente, y  $f(\kappa a)$  es la función de Henry, siendo  $\kappa$  la inversa de la longitud de Debye, que es una medida del espesor de la doble capa, y  $a$  el radio de la partícula. Es habitual que como radio de la partícula se tome el anteriormente mencionado radio hidrodinámico,  $a = r_h$ , definido por la ecuación 1.7 y determinado a partir de medidas del coeficiente de difusión.

Una propiedad hidrodinámica de gran relevancia, aunque en esta Tesis solo se determinará en unos pocos casos, es el coeficiente de sedimentación,  $s$ , para cuya determinación se utiliza la técnica de ultracentrifugación analítica en la modalidad de velocidad de sedimentación (una descripción adecuada de esta técnica se puede encontrar en el Capítulo 5 del libro de Van Holde [5]). La ultracentrifugación analítica consiste en someter a la disolución a una centrifugación a muy elevada velocidad angular de manera que se crea una fuerza centrífuga sobre las partículas en disolución que es opuesta al empuje o fuerza

de flotación y provoca la sedimentación o migración de las partículas hacia el fondo de la celda que las contiene. Se crea, así, un frente de concentración que se desplaza hacia el fondo de la celda en que está contenida la muestra. El coeficiente de sedimentación se define como el cociente entre la velocidad lineal (radial) de las partículas sedimentantes,  $u$ , y la aceleración angular a la que están sometidas,  $\omega^2 r$

$$s = \frac{u}{\omega^2 r}, \quad (1.10)$$

donde  $\omega$  es la velocidad angular del rotor y  $r$  la posición radial de la partícula (distancia al eje de giro). De la relación anterior se desprende que el coeficiente de sedimentación tiene unidades de tiempo. Como la mayoría de las partículas macromoleculares tienen un coeficiente de sedimentación del orden de  $10^{-13}$  s, dicho valor se utiliza como unidad para  $s$  y se le denomina Svedberg, S.

El coeficiente de sedimentación está relacionado con el coeficiente de fricción definido anteriormente mediante la relación,

$$s = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{N_A f}, \quad (1.11)$$

donde  $M$  es el peso molecular de la partícula,  $\bar{v}$  su volumen específico parcial,  $\rho$  la densidad de la disolución, aproximadamente igual a la del disolvente, y  $N_A$  el número de Avogadro. Combinando la ecuación 1.3 para el coeficiente de difusión y la ecuación 1.11 para el coeficiente de sedimentación se obtiene la conocida ecuación de Svedberg,

$$\frac{s}{D} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{RT}, \quad (1.12)$$

donde  $R$  es la constante de los gases perfectos y  $T$  la temperatura absoluta.

Otra manifestación del efecto del soluto en propiedades de transporte consiste en que la viscosidad de la disolución o dispersión,  $\eta$ , es mayor que la del disolvente puro,  $\eta_0$ . El aumento de viscosidad, absoluto  $\eta - \eta_0$  o relativo  $\eta/\eta_0$ , es tanto mayor cuanto mayor es la concentración  $c$  de partículas. Hay varias formas de expresar este incremento de viscosidad o efecto espesante del soluto [6]:

- Viscosidad relativa:

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0}, \quad (1.13)$$

- Viscosidad específica:

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}, \quad (1.14)$$

- Viscosidad reducida:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} = \frac{\eta - \eta_0}{c\eta_0}, \quad (1.15)$$

- Viscosidad intrínseca (o número límite de viscosidad)

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{c\eta_0}. \quad (1.16)$$

En las expresiones anteriores  $c$  es la concentración másica (no la molar). De entre todas ellas, la viscosidad intrínseca es la que mejor caracteriza al soluto. Al hacer el límite a concentración cero, se eliminan las interacciones entre moléculas de soluto y, por tanto,  $[\eta]$  representa la contribución individual de cada molécula de soluto a la viscosidad de la disolución. Los fundamentos sobre el concepto de viscosidad y su medida se desarrollarán en mayor profundidad en el Capítulo 3.

Como caso más sencillo se suele considerar el de una disolución o dispersión *ideal*, que se corresponde con un sistema suficientemente diluido. En ocasiones, sobre todo para el tratamiento de datos experimentales, hay que tener en cuenta ciertos efectos de no idealidad, asociados a la concentración. Una medida de la no idealidad de las disoluciones es el coeficiente del virial  $A_2$ . En los libros de texto se asocia este coeficiente a las medidas de propiedades coligativas, tales como la presión osmótica,  $\Pi$

$$\frac{\Pi}{RTc} = \frac{1}{M} + 2A_2c + \dots, \quad (1.17)$$

donde  $R$  es la constante de los gases perfectos. No es  $\Pi$  una propiedad de interés en nuestro contexto; no obstante, como veremos,  $A_2$  es accesible por medidas de dispersión estática de luz.

Por último, aunque en esta Tesis no se va a utilizar, cabe mencionar otra propiedad hidrodinámica de bastante relevancia y que complementa al coeficiente de difusión traslacional: el coeficiente de difusión rotacional,  $D_r$ . La dinámica rotacional de una partícula rígida o de las subunidades rígidas de una partícula flexible se caracteriza por una serie de hasta cinco tiempos de relajación,  $\tau_i$  ( $i = 1, \dots, 5$ ), cuya media armónica,  $\tau_h$ , está relacionada con el coeficiente de difusión rotacional global de la partícula,  $D_r = 1/(6\tau_h)$ , donde  $\tau_h = (1/5) \sum_{i=1}^5 (1/\tau_i)$ .

# Capítulo 2

## Dispersión de luz

### 2.1. Introducción

Tratamos en este capítulo los aspectos teóricos básicos y los instrumentales de las técnicas de dispersión de luz (*light scattering*, LS). Como se expondrá, esta técnica comprende varias versiones, de las cuales las más importantes son: la estática, la dinámica y, en menor medida, la electroforética, fundamento ésta última de la medida del potencial zeta en partículas coloidales. Evitaremos detalles, sobre todo de los aspectos más básicos, que pueden encontrarse en libros de texto. Como en todo el resto de la memoria, el sistema considerado es una disolución macromolecular o una suspensión de nanopartículas, centrándose el interés en cómo afecta el soluto a la dispersión, siendo el disolvente meramente el medio en el que está inmerso.

### 2.2. Dispersión estática de luz (SLS)

Los conceptos básicos de la dispersión de la luz por la materia fueron expuestos a finales del siglo XIX por Lord Rayleigh, y hacia 1940 – 1950, su aplicación a la caracterización de moléculas (esencialmente macromoléculas) fue establecida por P. Debye [7], y posteriormente por B.H. Zimm [8,9]. Al ser iluminada con luz visible (u otras radiaciones electromagnéticas, p. ej. rayos X), la materia dispersa una parte de la luz incidente en todas las direcciones del espacio, sin cambio en la longitud de onda, ya que el fenómeno no es propiamente espectroscópico, con cambio en niveles energéticos, sino que simplemente consiste en re-emisión de la radiación, o desvío de algunos de los fotones incidentes.

Esquemáticamente, la técnica se presenta en la Figura 2.1. La muestra (disolución o suspensión) se ilumina con luz láser de intensidad  $I$  y longitud de onda  $\lambda_0$ . En un plano, perpendicular a la dirección de polarización de la luz láser, se observa la intensidad de luz dispersada,  $I_\theta$ , a uno o más ángulos  $\theta$ , definidos por la prolongación del rayo incidente y la dirección de observación. El detector está colocado a una distancia  $r$  de la muestra.

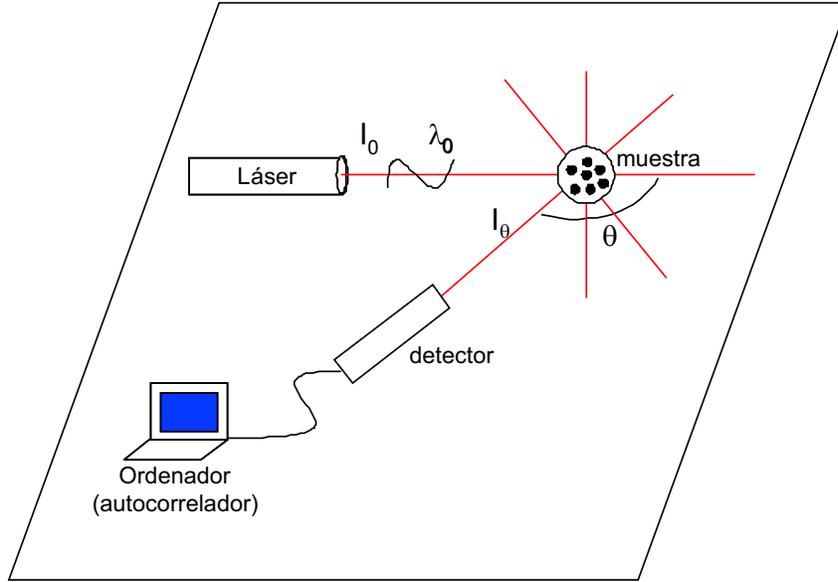


Figura 2.1: Esquema de un dispositivo para medir la dispersión de luz.

En el tratamiento de datos se obtiene la contribución del soluto, restando la del disolvente (medida en un experimento previo) de la de la disolución:

$$\Delta I_\theta = I_\theta(\text{disolución}) - I_\theta(\text{disolvente}). \quad (2.1)$$

La dependencia de la intensidad inversamente proporcional a la distancia  $r$  a la que es observada, y la obvia proporcionalidad a la intensidad incidente,  $I_0$ , se eliminan formulando la llamada relación Rayleigh

$$R_\theta = \frac{r^2 I_\theta}{I_0}, \quad (2.2)$$

pudiéndose formular el exceso de relación Rayleigh contribuido por el soluto:

$$\Delta R_\theta = R_\theta(\text{disolución}) - R_\theta(\text{disolvente}) = \frac{r^2 \Delta I_\theta}{I_0}. \quad (2.3)$$

El efecto de LS depende de ciertas características ópticas, tales como la mencionada longitud de onda de la luz en el vacío,  $\lambda_0$ , el índice de refracción del disolvente,  $n_1$ , y de cómo el índice de refracción de la disolución varía con la concentración másica del soluto,  $dn/dc$  (a baja  $c$ , el índice de refracción de la disolución es lineal en  $c$ , es decir  $n = n_1 + (dn/dc)c$ ). En la teoría, estas cantidades aparecen combinadas en la llamada constante óptica,  $K$ , dada por

$$K = \frac{4\pi^2}{N_A \lambda_0^4} n_1^2 \left( \frac{dn}{dc} \right)^2. \quad (2.4)$$

Nótese cómo  $K$  depende, además de la luz incidente, de la constitución química del disolvente y de la del soluto, pero no depende del tamaño de este último.

Los estudios de los pioneros como Debye y Zimm demostraron que las variables básicas en esta técnica son el ángulo de observación y la concentración (que expresamos como concentración másica,  $c$ , en  $\text{g}/\text{cm}^3$ ). La dependencia con estas variables está determinada por características estructurales del soluto y su interacción con el disolvente. En disoluciones de concentración moderada, el resultado teórico es

$$\frac{Kc}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{M} \frac{1}{P(\theta)} + 2A_2c + \dots \quad (2.5)$$

En la variación con la concentración interviene el segundo coeficiente del virial,  $A_2$ , positivo cuando la interacción del soluto con el disolvente es favorable. La variación con el ángulo se establece a través del llamado factor de forma,  $P(\theta)$ , que es una función monótonamente decreciente desde  $P(\theta = 0) = 1$  (caso en el que puede sacarse de la ec. 2.5) hacia valores positivos inferiores a la unidad. La variación angular de  $P(\theta)$  depende de la estructura (tamaño y conformación) de las moléculas de soluto. En la teoría, el ángulo interviene a través de la variable

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right), \quad (2.6)$$

donde  $\lambda = \lambda_0/n_1$  es la longitud de onda en el seno de la disolución, que es muy próxima a la del disolvente puro si la disolución es diluida. El factor de forma puede aproximarse por la expresión

$$\frac{1}{P(\theta)} \approx 1 + \frac{q^2 R_g^2}{3}, \quad (2.7)$$

donde  $R_g$  es el radio de giro de las partículas de soluto. Esta expresión es válida cuando el término  $q^2 R_g^2/3$  es inferior a la unidad. Teniendo en cuenta la definición de la ec. 2.6, esto implica que  $R_g$  sea no muy inferior a  $\lambda$ , que mide unos cientos de nanómetros (típicamente, que  $R_g$  sea al menos unos 20 nm). En estas condiciones, se puede escribir

$$\frac{Kc}{\Delta R} \approx \frac{1}{M} \left[ 1 + \frac{R_g^2}{3} \frac{16\pi^2}{\lambda^2} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \right] + 2A_2c + \dots \quad (2.8)$$

Cuando  $R_g \ll \lambda$ , como es frecuente con proteínas, polímeros de peso molecular moderado, nanopartículas pequeñas, etc. la dependencia angular y  $R_g$  desaparecen del tratamiento, quedando

$$\frac{Kc}{\Delta R_{\theta=0}} \approx \frac{1}{M} + 2A_2c. \quad (2.9)$$

Advertimos que es costumbre escribir  $\Delta R_{\theta=0}$ , cual si fuera a ángulo cero, cuando lo que realmente se está haciendo es aproximar a  $q \rightarrow 0$ , sea cual sea el ángulo, pues según la ec. 2.7 esto ocurre cuando  $qR_g = 4\pi(R_g/\lambda) \sin(\theta/2) \ll 1$ , sea porque  $\theta$  es muy pequeño, o porque las partículas de soluto son pequeñas y su  $R_g$  es pequeño frente a  $\lambda$ . Entonces, una representación de  $Kc/\Delta R$  frente a  $c$  suministra el peso molecular  $M$  mediante la ordenada en el origen, y el segundo coeficiente del virial  $A_2$  mediante la pendiente. Podemos formular directamente la intensidad dispersada por el soluto,

$$\Delta R \approx Kc \left[ \frac{1}{M} \frac{1}{P(\theta)} + 2A_2c \right]^{-1}, \quad \Delta I \approx (I_0/r^2) Kc \left[ \frac{1}{M} \frac{1}{P(\theta)} + 2A_2c \right]^{-1}. \quad (2.10)$$

Si ignoramos la influencia en  $\Delta I$  de  $P(\theta)$ , suponiendo  $P(\theta) \simeq 1$ , y también el efecto de no idealidad, tomando  $A_2c \approx 0$ , nos quedaría  $\Delta I \approx KcM$ . Ignorando también  $I_{disolvente}$  frente a  $I_{disolución}$  nos quedaría la relación de proporcionalidad

$$I_{disolución} \propto KcM. \quad (2.11)$$

Así, para disoluciones de igual concentración en un mismo disolvente de solutos homólogos en composición (misma  $K$ ), la intensidad de luz dispersada es  $I_{disolución} \propto cM$ , y aumenta con el (aproximadamente proporcional al) peso molecular.

En resumen, la técnica de LS estático (*static light scattering*, SLS) proporciona información sobre el peso molecular del soluto,  $M$  (en caso de muestras polidispersas, el promedio en peso,  $M_w$ ), su interacción termodinámica con el disolvente según  $A_2$  y, en el caso de ser suficientemente grande, datos estructurales de dicho soluto.

El experimento se realiza midiendo  $R_\theta$  para el soluto y la disolución a varias concentraciones, y (según la instrumentación lo permita, a más de un ángulo) para a continuación formular  $Kc/\Delta R_\theta$ , que se trataría mediante la ecuaciones 2.7, 2.8 o 2.9.

En la técnica experimental, para no tener que manejar las variables instrumentales  $r$  e  $I_0$ , la relación Rayleigh se determina en relación a una sustancia patrón estándar, habitualmente tolueno. Considerando la dependencia de la intensidad de la luz dispersada con el índice de refracción, se tiene que para una muestra cualquiera, que dispersa una intensidad  $I_\theta$ ,

$$\Delta R_\theta = \frac{\Delta I_\theta n_1^2}{\Delta I_{std,\theta} n_{std}^2} \Delta R_{std}, \quad (2.12)$$

donde  $n_{std}$  es el índice de refracción del patrón,  $R_{std}$  su relación Rayleigh (a la misma longitud de onda, e independiente del ángulo), e  $I_{std,\theta}$  la intensidad de luz dispersada por el patrón al mismo ángulo que la muestra.

## 2.3. Dispersión dinámica de luz (DLS)

### 2.3.1. Sistemas monodispersos

Si se observa con precisión la intensidad de luz dispersada,  $I$ , a un ángulo fijo, manteniendo inalterables todas las condiciones experimentales, se puede apreciar que ésta no tiene un valor constante, sino que fluctúa más o menos apreciablemente en torno a un valor medio, que es el que se ha considerado en la sección anterior. Se comprueba que esta fluctuación no es achacable a factores tales como fluctuaciones de temperatura, ruido electrónico, etc. En esta fluctuación se basa la técnica de dispersión dinámica de luz (*dynamic light scattering*, DLS).

Los pioneros de esta técnica explicaron su fundamento en el movimiento browniano de las partículas de soluto. Aún en ausencia de cualquier perturbación, las partículas están sometidas a este movimiento al azar, cuyo origen y teoría básica explicó A. Einstein en su tesis doctoral. La consolidación teórica e instrumental de la técnica se debe, sobre todo, a R. Pecora, en la década 1965 – 1975 [10–12].

Debido al movimiento browniano, en un determinado volumen  $V$  de la disolución el número de partículas fluctúa en torno a su valor medio,  $N_{part} = N_A c V / M$ . En términos relativos a  $N_{part}$ , la fluctuación es inapreciable en un volumen macroscópico. Pero el llama-

do “volumen iluminado” en LS, que es la confluencia del finísimo rayo láser con el también muy fino haz de observación, es muy pequeño, y en él, la fluctuación sobre la media es, en términos relativos, suficientemente importante. Es por ello que las características de la luz dispersada fluctúan concordantemente. Obviamente, las fluctuaciones son tanto más rápidas o más lentas según la movilidad browniana de las partículas, indicada por su coeficiente de difusión  $D$ , sea mayor o menor, respectivamente (Figura 2.2).

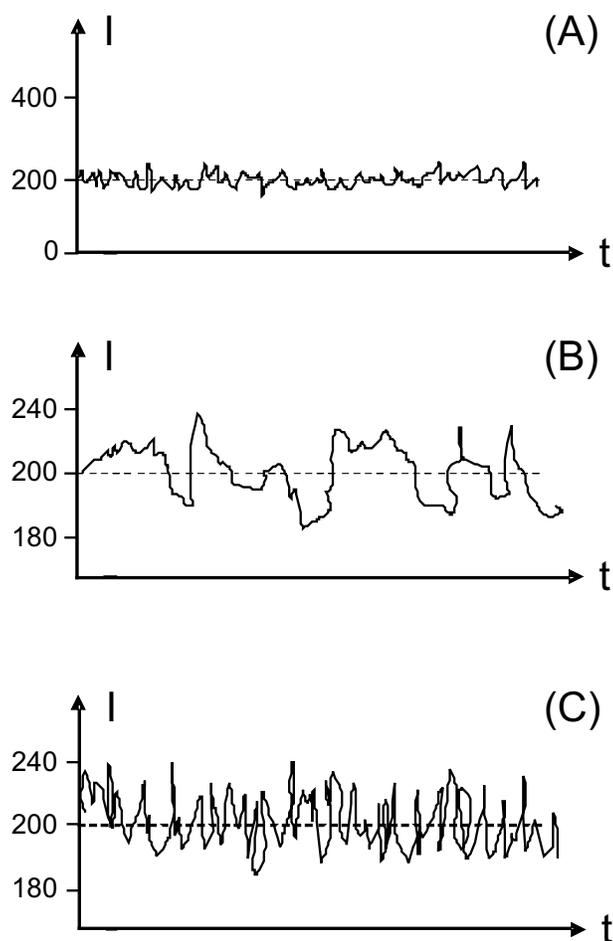


Figura 2.2: Ilustración de la fluctuación temporal de la intensidad de luz dispersada en DLS. (A) La intensidad parece mantenerse prácticamente constante con una fluctuación que parece un pequeño ruido en una escala de 200 unidades arbitrarias. (B) y (C) En una escala más amplia se aprecian las fluctuaciones, que son más rápidas (moléculas más móviles) en (C) que en (B).

El tratamiento de fluctuaciones interviene en muchos aspectos de la física estadística. Si  $A(t)$  es una cantidad que fluctúa con el tiempo en torno a un valor medio  $\langle A \rangle$ , se define la función de correlación  $C_A(t)$  como el promedio del producto de dos valores separados por un intervalo  $t$ :

$$C_A(t) = \langle A(t_0)A(t_0 + t) \rangle_{t_0}, \quad (2.13)$$

donde el promedio se hace sobre todos los posibles instantes iniciales  $t_0$ . Obviamente,  $C_A(t = 0) = \langle A(t_0)A(t_0) \rangle_{t_0} = \langle A^2 \rangle$ . Para valores muy pequeños de  $t$ ,  $A(t_0)$  y  $A(t_0 + t)$  serán muy parecidos con lo cual  $C_A(t)$  será muy próximo (ligeramente inferior) a  $\langle A^2 \rangle$ . Por otra parte, para valores muy grandes del tiempo transcurrido  $A(t_0)$  y  $A(t_0 + t)$  tendrán valores totalmente independientes (Figura 2.3(A)) y estadísticamente el promedio del producto es el producto de los promedios, con  $C_A(t \rightarrow \infty) = \langle A \rangle \langle A \rangle = \langle A \rangle^2$ . Dado que para cualquier serie de números es siempre  $\langle A^2 \rangle$  mayor que  $\langle A \rangle^2$ ,  $C_A(t)$  es una función que decrece monótonamente desde  $\langle A^2 \rangle$  hasta  $\langle A \rangle^2$  (Figura 2.3(B)). Es frecuente expresar las funciones de correlación normalizadas respecto al valor a tiempo cero,

$$c_A(t) = C_A(t)/C_A(0) = \frac{\langle A(0)A(t) \rangle}{\langle A(0) \rangle^2}. \quad (2.14)$$

Indicamos las funciones normalizadas con letra minúscula. Es también habitual simplificar la notación con “0”, haciendo referencia a cualquier tiempo inicial. En forma normalizada,  $c_A(t)$  decae a partir de  $c_A(0) = 1$ .

En DLS, la función de correlación relevante es la relacionada con las fluctuaciones del vector de campo eléctrico de la radiación (luz) dispersada,  $\mathbf{E}$ , que se indica como  $g^{(1)}(t)$ .

$$c_E(t) \equiv g^{(1)}(t) = \frac{\langle \mathbf{E}(0)\mathbf{E}^*(t) \rangle}{\langle \mathbf{E}(0) \rangle^2}. \quad (2.15)$$

La cantidad observable es la intensidad de luz dispersada,  $I$ , de la cual se obtiene su función de correlación, que en forma normalizada sería:

$$c_I(t) \equiv g^{(2)}(t) = \frac{\langle I(0)I(t) \rangle}{\langle I \rangle^2}. \quad (2.16)$$

La relación entre las funciones de correlación de campo eléctrico ( $g^{(1)}$ ) e intensidad registrada en el detector ( $g^{(2)}$ ) involucra diversos aspectos de teoría electromagnética, y se establece mediante la denominada relación de Siegert

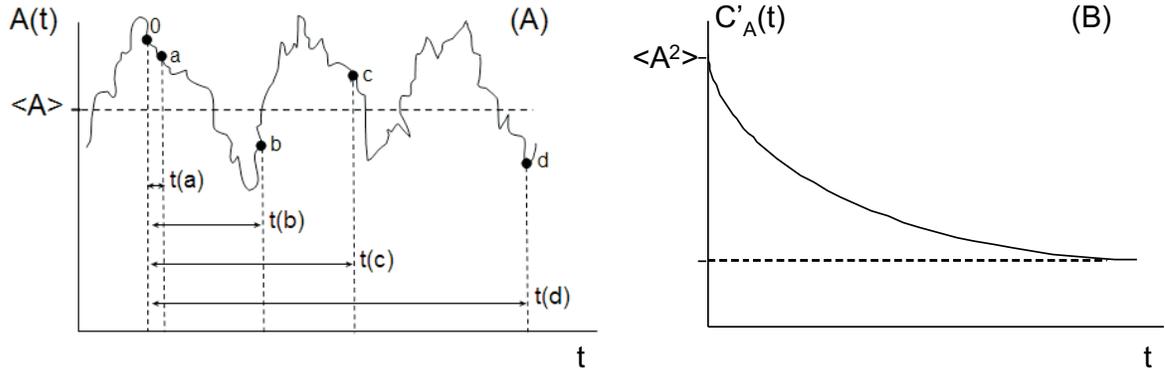


Figura 2.3: (A) Tomando como referencia un tiempo inicial  $t_0$ , el valor de  $A$  cuando ha transcurrido un tiempo  $t(a)$ ,  $A(t_0 + t(a))$  es bastante próximo a  $A(t_0)$ . Sin embargo, para tiempos transcurridos progresivamente mayores,  $A(t_0 + t(b))$ ,  $A(t_0 + t(c))$ , etc. guardan cada vez menos correlación con  $A(t_0)$ . (B) Típico aspecto de una función de autocorrelación.

$$g^{(2)}(t) = 1 + \beta[g^{(1)}(t)]^2, \quad (2.17)$$

donde  $\beta$  depende de características instrumentales y de la naturaleza (pero no tamaño, forma, etc.) de soluto y disolvente.

Como expondremos a continuación, la teoría suministra resultados primarios para  $g^{(1)}(t)$ , que obtendremos a partir de la  $g^{(2)}(t)$  experimental, como

$$g^{(1)}(t) = \sqrt{[g^{(2)}(t) - 1]/\beta}, \quad (2.18)$$

o bien, si  $Q \equiv \beta^{-1/2}$ , tenemos una función no normalizada,

$$G_1(t) \equiv \sqrt{[g^{(2)}(t) - 1]} = Qg^{(1)}(t). \quad (2.19)$$

El decaimiento de las funciones de correlación puede contener una diversidad de modos o componentes. Para solutos compuestos por un único tipo de partículas, éstos estarían asociados a los grados de libertad de movimiento (traslacional, rotacional e interno). Además, si el sistema es polidisperso, habría modos para cada una de las especies.

En un caso sencillo y bastante general, en el que el soluto fuese monodisperso, y en el que las condiciones instrumentales de longitud de onda y ángulo de observación,

que determinan la variable  $q$  de la ec. 2.6, sean adecuadas (lo serán en todos los casos; no entramos en detalles, véase p. ej. [13]), hay un único modo de decaimiento de la función de correlación. La función  $g^{(1)}(t)$  es una simple exponencial, con una constante de decaimiento  $\Gamma$ , o tiempo de relajación  $\tau$ ,

$$g^{(1)}(t) = \exp(-\Gamma t) = \exp(-t/\tau), \quad G_1(t) = Q \exp(-\Gamma t) = Q \exp(-t/\tau). \quad (2.20)$$

Tratándose de difusión browniana de una especie única de soluto de partículas con coeficiente de difusión  $D$ , se tiene

$$\Gamma = 1/\tau = q^2 D, \quad (2.21)$$

de manera que, según las ecs. 2.16, 2.17 y 2.18,

$$g^{(2)}(t) = 1 + \beta \exp(-2q^2 Dt), \quad (2.22)$$

o bien, como una monoexponencial,

$$g^{(2)}(t) - 1 = \beta \exp(-2q^2 Dt), \quad (2.23)$$

y la función de autocorrelación de la intensidad es

$$C_I(t) \equiv \langle I(0)I(t) \rangle = B + A \exp(-2q^2 Dt), \quad (2.24)$$

con línea base  $B = \langle I^2 \rangle$  y constante pre-exponencial  $A = B\beta = \beta \langle I^2 \rangle$ .

### 2.3.2. Sistemas polidispersos

En lo que precede, se ha considerado que la dinámica observada por DLS está descrita por un único modo de relajación de las correlaciones. Aunque esto puede ser así en algunos casos, o considerarse que lo es aproximadamente, en muchas situaciones hay varios modos de relajación simultáneos. Esto puede ocurrir en casos particulares, cuando el soluto es una molécula compleja, grande y flexible o anesférica. Aquí vamos a considerar otra situación habitual, y es que el soluto no conste de una única especie, monodispersa, sino que sea una sustancia polidispersa, compuesta por una diversidad de especies componentes, cada una de las cuales daría un modo de relajación.

Para un sistema polidisperso en LS, la contribución de cada componente a las propiedades observables viene determinada por la parte  $I_i$  que corresponde a ese componente en la intensidad de luz dispersada, que para una distribución de componentes de la misma naturaleza, de acuerdo con la ec. 2.11, obedece aproximadamente a la proporcionalidad  $I_i \propto c_i M_i$ . La concentración másica se puede escribir en términos de la concentración en número  $\mathcal{N}_i$ , como  $c_i = M_i \mathcal{N}_i$ , con lo cual  $I_i \propto M_i^2$ . Para partículas esféricas (o las esferas equivalentes), de radio  $r_h$ , el peso molecular  $M_i = N_A \rho 4\pi r_{h,i}^3 / 3$ , donde  $\rho$  es la densidad de las partículas (supuestas del mismo material). Por tanto resulta  $I_i \propto r_{h,i}^6 \propto D^6$ . Nótese la acusadísima dependencia (potencia sexta) del tamaño de las partículas en la contribución a la intensidad dispersada.

En el sistema polidisperso, la función de correlación  $g^{(1)}$  es una suma de exponenciales

$$g^{(1)}(t) = \sum_i A_i \exp(-\Gamma_i t) = \sum_i A_i \exp(-t/\tau_i), \quad (2.25)$$

con  $\tau_i = 1/\Gamma_i$ , siendo  $A_i$  la aportación de cada modo, tal que  $\sum A_i = 1$  por normalización de la función  $g^{(1)}(0) = 1$ . El número de parámetros de la función de correlación puede ser elevado, con dos por cada modo.

Es sabido que funciones de relajación complejas, que no están descritas por una mono-exponencial, a veces se ajustan bien a una función de Kohlrausch-Williams-Watts (KWW) denominada en inglés *stretched exponential*. En la función mono-exponencial,  $\ln g^{(1)}(t) = -\Gamma t = -(1/\tau)t$ , lineal en  $t$ , y la representación semi-logarítmica es una recta que pasa por el origen ( $\ln g^{(1)}(t) = 0$  para  $t = 0$ ) con pendiente  $-1/\tau$ . Para un comportamiento que se desvíe de la mono-exponencial, la representación semi-logarítmica no es recta sino curvada, y podría aceptarse una variación potencial,  $\ln g^{(1)}(t) \propto -t^{\beta_{se}}$ , siendo  $\beta_{se}$  un número próximo a, pero más o menos inferior que, la unidad. Poniendo la constante de proporcionalidad como  $1/\tau_{se}^{\beta_{se}}$ , la ecuación KWW queda como

$$g^{(1)}(t) = \exp[-(t/\tau_{se})^{\beta_{se}}], \quad (2.26)$$

que solo contiene dos parámetros, el tiempo  $\tau_{se}$ , y el parámetro  $\beta_{se}$ , cuya desviación de la unidad indica la desviación de la función de una mono-exponencial. El tiempo de relajación, que propiamente caracteriza el decaimiento de la correlación es

$$\tau_s = \frac{\tau_{se}}{\beta_{se}} \Gamma\left(\frac{1}{\beta_{se}}\right). \quad (2.27)$$

Advertimos que, puntualmente en esta ecuación,  $\Gamma$  es la bien conocida función Gamma de Euler, para no confundirla con el parámetro  $\Gamma$  que estamos utilizando para los decaimientos exponenciales, ec. 2.21.

Otro enfoque sencillo es el método de los cumulantes de Koppel [14]. Para  $\ln g^{(1)}(t)$ , en lugar del comportamiento lineal de los sistemas monocomponente, se podría admitir un desarrollo en serie de potencias:

$$\ln g^{(1)}(t) = -\bar{\Gamma}t + \frac{k_2}{2!}t^2 - \frac{k_3}{3!}t^3 + \dots, \quad (2.28)$$

$\bar{\Gamma}$  es un promedio de valores  $\Gamma_i$  de cada componente, siendo el peso del componente  $i$  en el promedio proporcional a  $I_i$ , de lo cual se desprende que, para componentes de la misma naturaleza, se trata del promedio  $\bar{\Gamma}_z$ , el promedio  $z$  de los valores individuales.

En términos de la función de correlación observable,  $g^{(2)}(t)$ , se encuentra fácilmente que

$$\ln[g^{(2)}(t) - B] = \ln \beta - 2\bar{\Gamma}t + k_2t^2 - \frac{k_3}{3}t^3 + \dots, \quad (2.29)$$

pudiendo ajustarse el primer miembro a un polinomio. Cortando por el término cuadrático, el ajuste de  $\ln[g^{(2)}(t) - B]$  a una ecuación de segundo grado en  $t$  suministra  $\bar{\Gamma}$  y  $k_2$ .

Alternativamente, a partir de la  $g^{(2)}$  se puede, mediante 2.18 y 2.19, obtener una  $G_1(t)$ , que se ajustaría, de acuerdo con la ec. 2.28, a

$$G_1(t) = Q \exp\left(-\bar{\Gamma}t + \frac{k_2}{2}t^2\right), \quad (2.30)$$

donde  $Q = G_1(0) = \beta^{-1/2}$ . El ajuste mas allá del término cuadrático implica excesivos parámetros, y suelen ignorarse los términos a partir de  $t^3$ . La segunda constante, que sería  $k_2 = 0$  en el caso de un sistema monodisperso, tiene relación con el grado de polidispersidad. El llamado índice de polidispersidad, PDI (*polydispersity index*), se obtiene como  $k_2/\bar{\Gamma}^2$ . Se han descrito ecuaciones algebraicamente equivalentes a la ec. 2.29 que pueden ser empleadas en ajustes más sofisticados [15].

Siendo la medida de DLS en nuestro caso conducente a la determinación de coeficientes de difusión,  $\bar{\Gamma}_z$  está simplemente relacionado con el promedio del coeficiente de difusión basado en intensidad dispersada, que en las condiciones a las que venimos aludiendo sería el promedio  $z$  del coeficiente de difusión,  $D_z$ ,

$$\bar{\Gamma}_z = q^2 D_z, \quad (2.31)$$

definido el coeficiente de difusión,  $D$ , como en la ec. 1.6. Por tanto,

$$D_z = \frac{\sum_i N_i M_i^2 D_i}{\sum_i N_i M_i^2}. \quad (2.32)$$

Un procedimiento más laborioso pero informativo consiste en determinar una distribución de constantes  $\Gamma$  o coeficientes de difusión  $D$ . Poniendo en forma continua la ec. 2.25, queda en forma de una integral de Laplace,

$$g^{(1)}(t) = \int_0^\infty A_I(\Gamma) \exp(-\Gamma t) d\Gamma. \quad (2.33)$$

La distribución  $A_I(\Gamma)$  refleja la contribución de cada especie a la intensidad dispersada; no es una distribución en número ni en masa, sino una “distribución  $z$ ”, que resulta ser extremadamente sensible a la presencia de partículas grandes, aunque las haya en pequeña cantidad. Extraer  $A_I(\Gamma)$  a partir de  $g^{(1)}(t)$  consiste en un problema de inversión de la integral de Laplace. Hay diversos métodos para ello, siendo el más popular el procedimiento CONTIN desarrollado por Provencher [16].

Usando como variable no  $\Gamma$  sino  $D$  o  $r_h$  se pueden representar distribuciones de coeficientes de difusión o de radio hidrodinámico efectivo. Las distribuciones  $A_I(\Gamma)$ ,  $A_I(D)$  o  $A_I(r_h)$  serían la contribución de cada fracción a la intensidad total, o la fracción de la misma aportada por cada especie. Por los motivos que venimos indicando, estas distribuciones enfatizan las partículas más grandes. Mediante transformaciones basadas en la llamada teoría de Mie (omitimos los detalles) se puede transformar la  $A_I$  en distribuciones en volumen,  $A_V$ , o en número,  $A_N$ . En  $A_V$  tienen más importancia las partículas más numerosas, y en  $A_N$ , más todavía (aunque éstas sean pequeñas). La distribución experimentalmente determinada, y por tanto más fiable, es  $A_I$ , mientras que  $A_V$ ,  $A_N$  se obtienen de la anterior por tratamientos teóricos y métodos matemáticos que pueden ser cuestionables. No obstante, aún tienen un valor cualitativo e informativo en el sentido de mostrar la presencia de partículas menores, o enfatizar éstas en el análisis de datos cuando las partículas pequeñas sean las que nos interesan, y las grandes meros agregados o contaminantes.

## 2.4. Potencial zeta

Es habitual que partículas coloidales dispersas en medio acuoso porten carga eléctrica en su superficie. Así, ocurre, por ejemplo, con agregados de macromoléculas de naturaleza

polielectrolítica (como alginato o pectina), con nanopartículas metálicas recubiertas de moléculas cargadas estabilizantes (como nanopartículas de oro y plata recubiertas de citrato), así como con combinaciones de nanopartículas metálicas y polímeros cargados. En el medio acuoso, además de los iones provenientes de las partículas coloidales pueden existir iones procedentes de la disolución de algún electrolito que se añada para modular la fuerza iónica. El potencial eléctrico generado por la carga de la partícula coloidal influye en la distribución que presentan esos iones en la región de líquido que rodea a la partícula, apareciendo un perfil de concentración iónica desde la superficie de la partícula hasta el seno de la disolución. A su vez, la distribución de iones influirá en la variación del potencial eléctrico con la distancia a la superficie de la partícula. En términos generales, la concentración de contra-iones (iones de carga opuesta a la carga de la partícula) en torno a la superficie de la partícula es mayor que la concentración de contra-iones en el seno de la disolución. Como ya se ha comentado, el perfil de concentración generado en concreto está íntimamente relacionado con el modo en que varía el potencial eléctrico desde la superficie de la partícula hasta el seno de la disolución. El potencial zeta no es más que el valor del potencial eléctrico a una determinada distancia de la superficie de la partícula, tal y como se detallará a continuación.

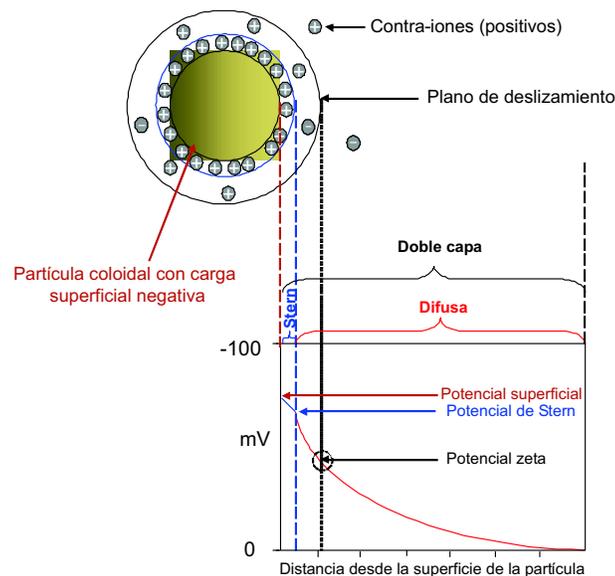


Figura 2.4: Representación de la doble capa eléctrica y el potencial zeta.

Los perfiles de concentración iónica y de potencial eléctrico mencionados anteriormente permiten la distinción de varias zonas en la región de líquido que rodea a la partícula coloidal. Así, los iones adyacentes a la partícula están fuertemente unidos (adsorbidos) a su superficie y forman la denominada capa compacta o capa de Stern, mientras que los iones que no están en contacto directo con la superficie mantienen su capa de solvatación, no están firmemente unidos a la partícula (presentan movilidad) y forman la denominada capa difusa (Figura 2.4). Esta estructura es lo que se conoce tradicionalmente como doble capa eléctrica. En la capa de Stern el potencial decrece linealmente con la distancia a la superficie de la partícula, mientras que en la capa difusa el potencial presenta un decaimiento de tipo aproximadamente exponencial. La capa difusa se puede considerar, a su vez, constituida por dos zonas o subcapas: una zona interna (más próxima a la superficie de la partícula) donde los iones forman una entidad estable con la partícula y se mueven con ella, y una zona externa (más alejada de la superficie de la partícula) donde la asociación entre los iones y la partícula es débil y ésta no los arrastra en su desplazamiento. El valor del potencial eléctrico en la frontera entre la capa de Stern y la capa difusa se denomina potencial de Stern, mientras que el valor del potencial en la frontera entre la zona interna y la zona externa de la capa difusa se denomina potencial zeta,  $\zeta$ . Esta segunda frontera, separación entre los iones que acompañan el desplazamiento de la partícula y los iones libres, no es un lugar tan bien definido como la frontera entre los iones adsorbidos y la capa difusa y se la suele denominar plano de deslizamiento (*slipping plane*) o superficie de cizalla hidrodinámica por ser la superficie de contacto efectiva entre la partícula coloidal y el disolvente, responsable de la hidrodinámica de la partícula. El potencial zeta es, por tanto, el valor del potencial eléctrico en esta superficie.

El valor del potencial zeta se utiliza como indicador de la estabilidad de una suspensión coloidal. Si todas las partículas en suspensión tienen un potencial zeta muy positivo o muy negativo tenderán a repelerse entre sí por lo que no tendrán tendencia a agregar y la suspensión será estable. Se asume que partículas con potencial zeta mayor que 30 mV o menor que -30 mV son estables, mientras que si el potencial zeta está comprendido entre ambos valores la disolución es inestable y las partículas acabarán agregando y precipitando.

El potencial zeta se ve influido por varios parámetros característicos de la disolución, siendo los principales el pH y la fuerza iónica. Así, por ejemplo, una partícula que adquiera carga negativa por la disociación de protones adquirirá más carga negativa cuanto más alcalina sea la disolución. En cambio, la adición de ácido hará disminuir dicha carga hasta

que se alcance un determinado pH para el que la carga se vea neutralizada y el potencial zeta sea cero. Es el denominado punto isoeléctrico que suele coincidir con la situación en la cual la suspensión coloidal es menos estable. Sucesiva adición de ácido provocará que la carga y el potencial zeta se vuelvan positivos. Por otro lado, la concentración de iones, es decir, la fuerza iónica del medio, influye en el espesor de la doble capa (magnitud conocida como longitud de Debye  $\kappa^{-1}$ ) y en el valor del potencial a lo largo de ella. Así, cuanto mayor es la fuerza iónica, más delgada es la doble capa y más pequeño se hace el potencial zeta. Esto es consecuencia del apantallamiento eléctrico producido por los contra-iones próximos a la superficie de la partícula que, obviamente, será mayor cuanto mayor sea la concentración. A su vez, la disminución del potencial zeta afecta a la estabilidad de la suspensión coloidal. Una adsorción suficientemente grande de contra-iones puede incluso llegar a revertir el signo del potencial zeta.

### 2.4.1. Medida del potencial zeta

Las partículas con carga en su superficie pueden interactuar con campos eléctricos produciendo diferentes tipos de efectos electrocinéticos. La técnica que se va a usar en esta Tesis para medir el potencial zeta se fundamenta en el efecto denominado electroforesis que consiste en el desplazamiento de una partícula cargada a través de un medio como consecuencia de la aplicación de un campo eléctrico. En nuestro caso, el medio es el disolvente donde la partícula se encuentra dispersa. Así, al aplicar un campo eléctrico a una disolución de partículas cargadas, éstas son atraídas hacia el electrodo de carga opuesta. En ese proceso, aparecen fuerzas viscosas o de fricción que se oponen al movimiento de las partículas hasta que se alcanza un régimen estacionario en el que las dos fuerzas se contrarrestan y la partícula se mueve a velocidad constante,  $v$ . Esta velocidad depende de la intensidad del campo eléctrico (o gradiente de potencial eléctrico),  $E$ , de la constante dieléctrica del medio,  $\epsilon$ , de la viscosidad del medio,  $\eta$ , y del potencial zeta,  $\zeta$ . La ecuación que relaciona todos esos factores con la velocidad de la partícula por unidad de campo eléctrico, la denominada movilidad electroforética  $\mu = v/E$ , se conoce como ecuación de Henry (definida en el Capítulo 1 de forma explícita para el potencial  $\zeta$  como ecuación 1.9),

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{2\epsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta}, \quad (2.34)$$

donde  $f(\kappa a)$  es la denominada función de Henry, siendo  $\kappa$  la inversa de la longitud de Debye que, como ya se ha comentado, mide el espesor de la doble capa, y  $a$  el radio

de la partícula. Por tanto  $\kappa a$  es el cociente entre el radio de la partícula y el espesor de la doble capa. En disolventes polares, como todo disolvente acuoso, con fuerza iónica moderada suele ser válido utilizar la aproximación de Smoluchowski,  $f(\kappa a) = 1.5$ , valor que es prácticamente exacto para partículas mayores de 100 nm en medios con fuerza iónica superior a 0.001 M. En disolventes no polares, como muchos disolventes orgánicos, suele funcionar bien la aproximación de Hückel,  $f(\kappa a) = 1$ , que es generalmente válida cuando se trabaja con partículas pequeñas en medios con constante dieléctrica baja.

La movilidad electroforética se obtiene midiendo la velocidad de las partículas en un experimento de electroforesis. Una posibilidad, engorrosa y lenta, para llevar a cabo dicha medida consiste en seguir el desplazamiento de las partículas por observación directa para lo cual es necesario permitir que las partículas realicen un recorrido suficientemente largo. Otra posibilidad más eficiente, ya que no es necesario esperar a que se produzca una migración macroscópica de las partículas ni hay que detectarlas individualmente, consiste en la determinación indirecta de la velocidad a través del efecto Doppler que afecta a las ondas de luz cuando ésta es dispersada (re-emitida) por partículas en movimiento respecto al observador (el detector). Lo que se mide, entonces, es el cambio en la frecuencia de la luz láser dispersada por las partículas en relación a la frecuencia original de la luz incidente. Esta técnica, denominada de forma genérica velocimetría Doppler de láser (*Laser Doppler Velocimetry*, LDV), se conoce en particular como dispersión de luz electroforética (*Electrophoretic Light Scattering*, ELS) cuando se utiliza para determinar velocidades electroforéticas [17].

En definitiva, el procedimiento consiste en: 1) introducir una dispersión coloidal en una celda que contiene dos electrodos, 2) aplicar una diferencia de potencial eléctrico a los electrodos cuya consecuencia es la migración de las partículas que tienen carga neta, o más estrictamente potencial zeta neto, hacia el electrodo de carga opuesta, 3) iluminar una zona de la disolución con luz láser y medir la velocidad de migración aprovechando el efecto Doppler en la luz dispersada, 4) transformar la velocidad en movilidad electroforética, y 5) utilizar la ec. 2.34 para calcular el potencial zeta. Un esquema de una celda para medir movilidad electroforética se ilustra en la Figura 2.5.

El cambio de frecuencia entre la luz dispersada e incidente provocado por el efecto Doppler, el cual contiene la información sobre la velocidad de las partículas, se determina mediante el análisis de la onda luminosa resultante de combinar (superponer) los rayos incidente y dispersado, es decir, el análisis de la interferencia entre ambos. La combinación de ondas electromagnéticas y el análisis de la señal resultante da lugar a una técnica de

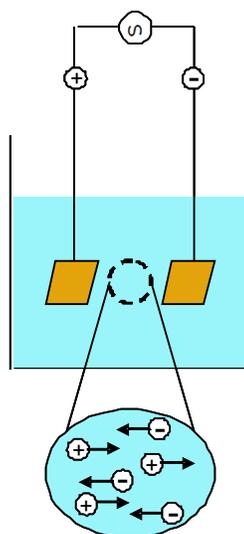


Figura 2.5: Esquema de un proceso de electroforesis para medir potencial zeta.

procesado de señales denominada heterodina (*heterodyne*), que es la que emplean los instrumentos que implementan la técnica ELS. Por otro lado, el procesado y análisis de ondas que no son combinación de otras se denomina técnica homodina (*homodyne*) que es la utilizada en la técnica DLS convencional. Por tanto, el montaje instrumental para llevar a cabo un experimento ELS, aunque similar al que se utiliza para DLS, requiere producir y analizar la interferencia entre los rayos incidente y dispersado. Para ello, el rayo láser incidente se divide en dos haces mediante un espejo semitransparente. Uno de los haces pasa a través de la muestra (contenida en una celda con dos electrodos) y es dispersado por la misma, mientras que el otro haz, que mantiene las propiedades (frecuencia) del haz inicial, es dirigido convenientemente hasta encontrarse con el haz dispersado en un módulo donde se produce la combinación de ambos. El rayo resultante de la interferencia se dirige entonces al detector que envía una señal eléctrica a un ordenador que la analiza. Un esquema de este montaje se ilustra en la Figura 2.6.

El rayo incidente redirigido se utiliza como referencia ya que su frecuencia no fluctúa como le ocurre a la frecuencia del rayo dispersado. El cambio en la frecuencia (desplazamiento Doppler),  $\delta\nu$ , está relacionado con la velocidad de las partículas,  $v$ , mediante la ecuación

$$\delta\nu = \frac{qv}{2\pi}, \quad (2.35)$$

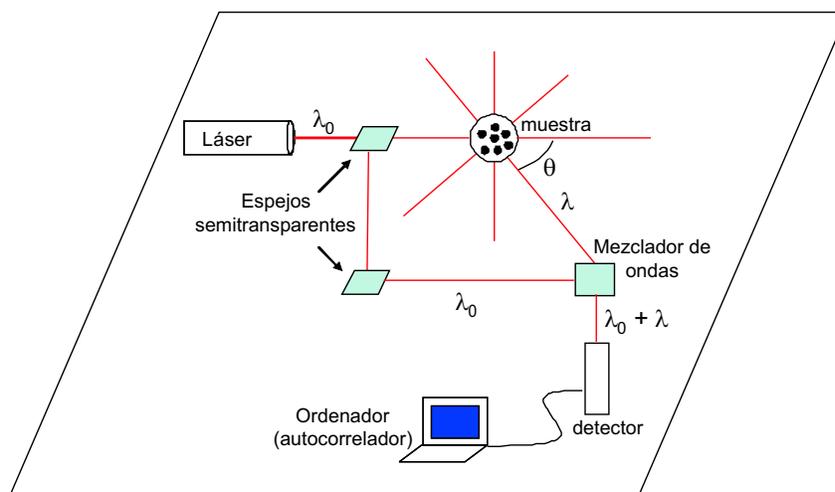


Figura 2.6: Esquema de un montaje de dispersión de luz electroforética.

donde  $q$  es el mismo vector de *scattering* descrito en secciones anteriores. La combinación de las ecuaciones 2.34 y 2.35 proporciona el potencial zeta.

Además del análisis de frecuencias, es posible llevar a cabo lo que se denomina análisis de fase de la luz dispersada (*Phase Analysis Light Scattering*, PALS) donde, en lugar de medir cambio en la frecuencia, se determina el cambio de fase. Esta técnica es más sensible que la medida de frecuencias convencional por lo que permite trabajar con campos eléctricos pequeños y determinar movibilidades pequeñas, lo que resulta de gran interés para evitar la aparición de fenómenos indeseados como el calentamiento por efecto Joule o la aparición de reacciones electroquímicas colaterales. A partir de la variación de fase promedio respecto al tiempo, se puede determinar la movilidad electroforética.

## 2.5. Instrumentación

Las medidas de dispersión de luz y de potencial zeta se llevaron a cabo en un equipo ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd. Malvern, Reino Unido). El equipo está controlado por el *software* Malvern ZetaSizer Software 7.03, copyright 1995-2013, instalado en un ordenador personal bajo Windows 7. En el interior del equipo, un *hardware/firmware* propio realizan la recolección de datos de  $I(t)$  y evalúan su función de correlación. El equipo se conecta con el ordenador mediante una conexión USB conven-

cional. El *software* del ordenador, además de la adquisición de datos, se encarga de su procesado final y presentación.

### 2.5.1. Modalidad de dispersión de luz

Básicamente, el aparato se describe por el esquema presentado en la Figura 2.1. La fuente de luz es un láser He/Ne de 4 mW que emite con longitud de onda  $\lambda_0 = 632.8$  nm. La detección se realiza en modo *backscattering*, con un ángulo respecto a la prolongación de la dirección incidente de  $\theta = 173^\circ$ . Con estos datos, la variable angular  $q$ , dada por la ec. 2.6, tiene el valor

$$q = \frac{4\pi n_1}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right), \quad q/\text{cm}^{-1} = 1.982 \times 10^5 \times n_1. \quad (2.36)$$

En agua, a  $25^\circ\text{C}$ , con  $n_1 = 1.332$  tenemos  $q = 2.64 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$  y  $q^2 = 6.97 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ .

El fotodetector, integrado en el aparato, mide la intensidad de luz dispersada,  $I$ , en forma de kilocuentas por segundo (kcps). Hay un componente, el atenuador que, interpuesto en el rayo dispersado, puede mitigar su intensidad por un factor pre-establecido. La denominada posición 11 corresponde a ausencia de atenuación (transmisión total), y es la que adoptamos por defecto, salvo que no se indique lo contrario. Otro dato instrumental es la posición del volumen iluminado con respecto al detector (posición que puede estar en el centro de la cubeta o próxima a la pared por donde penetra el rayo). Mantenemos la posición en el centro de la cubeta por defecto.

La muestra se deposita en cubetas de cuarzo, cristal o plástico, unas cuadradas similares a las de un espectrofotómetro, o redondas, que deben estar escrupulosamente limpias. Las cubetas tienen un recorrido óptico de 10 mm. La mayoría requieren un contenido de muestra mínimo de 1 ml (es recomendable no superar 2 ml). De este tipo de cubetas hemos utilizado los siguientes modelos (suministrados por la casa Malvern): DTS0012 (cuadrada, plástico, desechable, no apta para disolventes orgánicos), PCS8501 (redonda, cristal), PCS1115 (cuadrada, cristal, apta para medir el potencial zeta utilizando un accesorio que se adapta a la cubeta y porta unos electrodos). También disponemos de la cubeta ZEN2112 (cuadrada, cuarzo) que requiere un mínimo volumen de muestra de 12  $\mu\text{l}$ . La muestra se introduce en la cubeta mediante una jeringa a la que se ha acoplado una plaquita filtrante para eliminar el polvo. Habitualmente empleamos el filtro Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$ . Cuando en alguna circunstancia no se filtra o se emplea otro filtro, lo indicaremos. Previamente, los disolventes han sido filtrados, utilizando un matraz kitasato

acoplado a una bomba de vacío y membranas de celulosa Millipore de tamaño de poro  $0.22 \mu\text{m}$ , y almacenados en botellas opacas.

Salvo que no especifiquemos lo contrario, las medidas de DLS y SLS se realizan a  $T=25^\circ\text{C}$  (298 K), controlándose que la temperatura ambiente sea ligeramente inferior a ésta (con tan solo unos grados de diferencia se minimiza el proceso de termostatación), y que no sea superior, ya que el termostato del porta-cubetas del instrumento no enfría.

El *software* del aparato, además de la adquisición de datos y su análisis de correlación, gobierna también las condiciones instrumentales. Dispone de varios protocolos pre-establecidos de medida, siendo posible por el usuario establecer otros. Trabajamos con el protocolo *Size*, indicado para las medidas de tamaño hidrodinámico. Una medida consiste en la adquisición de datos de la intensidad fluctuante,  $I(t)$ , para su posterior análisis de correlación. Se realiza, no una, sino una serie de **n-run** (por defecto, 11) adquisiciones durante un tiempo **t-run**, para cada una de las cuales el *software* realiza un tratamiento previo conducente a detectar posibles incidencias, tales como picos de intensidad debido a partículas de polvo que atravesaran en ese momento el volumen de dispersión (espacio de la muestra definido por la intersección de los rayos incidente y observado, en el que se monitoriza la dispersión de la luz). Eventualmente el *software* descartaría alguna de estas adquisiciones cuando realiza un análisis global de todas ellas, del cual presenta (en el protocolo convencional) como resultados finales la  $A_I$  y el promedio Z del diámetro hidrodinámico ( $d_h = 2r_h$ ). Los valores de tamaño se pueden transformar en coeficientes de difusión mediante la ecuación de Stokes-Einstein, ec. 1.6. Así, a la temperatura de  $25^\circ\text{C}$ ,  $T=298 \text{ K}$ , y para agua,  $\eta_0 = 0.00890 \text{ P}$ , tenemos

$$D[\text{agua}, 25^\circ\text{C}]/(10^{-6}\text{cm}^2\text{s}^{-1}) = \frac{2.45}{r_h/nm}. \quad (2.37)$$

Adentrándonos en el *software*, es posible visualizar la curva de la función de correlación no normalizada  $G_1(t)$ , ec. 2.19. Eventualmente podemos digitalizar esta curva para hacer el tratamiento de datos por nuestra cuenta, según la ec. 2.20, o la 2.32, o como deseemos. El *software* suministra también la intensidad promediada a lo largo de todo el período de adquisiciones,  $\langle I(t) \rangle$ , que es lo que tomamos como  $I$  a efectos de la dispersión de luz estática, SLS. Obviamente, cabe la posibilidad de que el usuario realice varias medidas repetitivas, **n-med**, de las cuales, manualmente, se obtendrían resultados globales, con promedios y desviaciones estándar sobre las medidas realizadas. Esta repetición de medidas puede ser programada de manera que el aparato las realice consecutivamente sin intervención del operador.

### 2.5.1.a. Análisis de datos en modalidad estática

Como se indicó en la sección 2.2, con base en la ec. 2.12, para transformar las medidas de intensidad dispersada  $I$  en valores de relación Rayleigh,  $R$ , en lugar de utilizar datos instrumentales de  $I_0$  y  $r$ , se recurre a un patrón. A igualdad de intensidad incidente y distancia muestra-detector, tenemos la ec. 2.12. Indicando como  $X$  la muestra y  $T$  el patrón, se verifica la relación:

$$\frac{R_X}{R_T} = \frac{I_X n_{1,X}^2}{I_T n_{1,T}^2}. \quad (2.38)$$

Como patrón se utiliza habitualmente tolueno. El fabricante del instrumento indica que en las condiciones operativas del aparato, para el tolueno  $R_T = 1.35 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$ , siendo su índice de refracción  $n_T = 1.496$ .

La muestra,  $X$ , en la ec. 2.38 puede ser tanto una disolución como el disolvente puro. Para las disoluciones se puede tomar como índice de refracción la del disolvente puro, pues se trata de disoluciones diluidas. Así, para tanto el soluto como la disolución tenemos

$$R_X = \frac{I_X n_{1,X}^2}{I_T n_{1,T}^2} R_T. \quad (2.39)$$

Todo ello se realiza para el patrón y las muestras, en las mismas condiciones de  $I_0$  (láser estable y el mismo atenuador),  $r$  (posición) y ángulo  $\theta$ .

Restando al valor de  $R$  para la disolución el correspondiente al disolvente (ec. 2.3) calculamos  $\Delta R$ . La constante óptica  $K$  se obtiene según la ec. 2.4, para lo cual es necesario disponer del dato del incremento del índice de refracción,  $dn/dc$ . Con ella se determina el valor de  $Kc/\Delta R_\theta$ . Nótese que, al menos para el tolueno, por ser una molécula sencilla, no hay dependencia angular con  $\theta$ .

Esto se hace para varias disoluciones de distinta concentración. Suponiendo que las moléculas de soluto son pequeñas, estos valores se analizan según la ec. 2.5. El ajuste lineal de  $Kc/\Delta R_\theta$  vs.  $c$  suministra  $1/M$  como ordenada en el origen y  $2A_2$  como pendiente, de donde se obtienen el peso molecular y el segundo coeficiente del virial.

El *software* del instrumento (**Malvern Zetasizer Software v7.03**) incorpora una herramienta para guiar las medidas y realizar el tratamiento de datos. No obstante, preferimos realizarlo nosotros mismos. Mediante una hoja EXCEL se puede implementar toda la estructura de datos y ecuaciones. Además, podemos realizar un análisis de propagación de errores para estimar la incertidumbre de los resultados finales. Si  $\delta_{abs}$  y  $\delta_{rel}$  indican los errores absoluto y relativo, tenemos

$$\delta_{rel}\left(\frac{I_X}{I_T}\right) = \frac{\delta_{abs}(I_X)}{I_X} + \frac{\delta_{abs}(I_T)}{I_T} = \delta_{rel}(R_X), \quad (2.40)$$

obteniéndose así los errores de  $R$  para disolución y disolvente,  $\delta_{abs}(R) = R\delta_{rel}(R)$ . Por tanto,

$$\delta_{abs}(\Delta R) = \delta_{abs}(R_{disolución}) + \delta_{abs}(R_{disolvente}), \quad (2.41)$$

$$\delta_{rel}\left(\frac{Kc}{\Delta R}\right) = \delta_{rel}(\Delta R), \quad (2.42)$$

y finalmente

$$\delta_{abs}\left(\frac{Kc}{\Delta R}\right) = \frac{Kc}{\Delta R}\delta_{rel}\left(\frac{Kc}{\Delta R}\right), \quad (2.43)$$

donde estamos suponiendo que  $K$  y  $c$  no tienen error.

En la sección 2.6.3 presentamos como ejemplo detallado una descripción pormenorizada de un experimento con disolución acuosa de sacarosa.

## 2.5.2. Modalidad de potencial zeta

Como ya se ha comentado, el instrumento Zetasizer Nano de Malvern incluye, además de lo relativo a LS, la posibilidad de determinación del potencial zeta. El procedimiento implementado, que básicamente se describe en el esquema de la Figura 2.6, combina la dispersión de luz electroforética (ELS o LDV), con el análisis de fase de la luz dispersada (PALS) o, más concretamente, con una variante de la misma desarrollada por Malvern y denominada M3-PALS que minimiza el efecto colateral e indeseado de electroósmosis [18]. La electroósmosis consiste en el movimiento de un fluido (el disolvente) en relación a un sólido (las partículas en suspensión) debido a la aplicación de un campo eléctrico. En nuestro caso se produce porque las paredes de la celda presentan carga superficial y la aplicación de un campo eléctrico provoca un flujo del líquido en contacto con las mismas que a su vez arrastra a las capas de líquido adyacentes. Este flujo se superpone al movimiento electroforético de las partículas coloidales y, por tanto, afecta a la medida de la movilidad electroforética. Aunque en un sistema cerrado (la celda) existe una zona próxima a las paredes donde no hay flujo electroosmótico (denominada capa estacionaria), la medición de la movilidad electroforética en esta zona acarrea gran dificultad e imprecisión. El objetivo, por tanto, es eliminar en la medida de lo posible la electroósmosis.

Todos los sistemas que utilizan el método ELS para medir la movilidad electroforética de las partículas invierten periódicamente el campo eléctrico aplicado, es decir, invierten la polaridad de los electrodos (o, lo que es igual, emplean corriente alterna). Esta inversión tiene como objetivo reducir la polarización de los electrodos, inevitable en una disolución conductora, así como evitar que las partículas cargadas lleguen a separarse y depositarse sobre la superficie de los electrodos. La periodicidad de la inversión de campo es habitualmente de alrededor de 1 s, suficientemente elevada como para permitir medir con precisión la distribución de velocidad de las partículas. Este procedimiento se conoce como inversión de campo lenta. Sin embargo, un período de tiempo tan largo como 1 s permite que el flujo electroosmótico del fluido llegue a ser significativo y su efecto se superponga al movimiento electroforético de las partículas por lo que la medida ha de hacerse en la capa estacionaria con las dificultades que ello conlleva. Una posible solución consiste en realizar la medida de la movilidad bajo una inversión de campo rápida. En la inversión de campo rápida la periodicidad de la inversión es pequeña (el campo se invierte más rápido que 1 s) con lo que las partículas alcanzan su velocidad terminal cuando el flujo electroosmótico es aún insignificante lo que minimiza el efecto de electroósmosis y permite efectuar la medición en cualquier punto de la celda. Además de minimizar la electroósmosis, el cambio de dirección rápido y continuo de las partículas evita su contacto prolongado con los electrodos y la consiguiente posibilidad de reacciones electroquímicas. En definitiva, la movilidad medida durante la inversión de campo rápida puede ser achacada únicamente a la electroforesis sin que exista interferencia del fenómeno de electroósmosis. Sin embargo, la inversión de campo rápido tiene el inconveniente de que proporciona una pobre información de la distribución de la velocidad de las partículas ya que el muestreo de la velocidad se realiza durante períodos de tiempo muy cortos.

El instrumento Zetasizer Nano corrige todas las circunstancias adversas anteriores efectuando dos medidas del potencial zeta (o de su distribución), una con inversión de campo lenta y otra con inversión de campo rápida, y promediando y combinado adecuadamente los resultados de ambas medidas. Este procedimiento de “medida de modo mixto” (*Mixed Mode Measurement*) lo denota Malvern como M3 y es el que da nombre a la técnica mencionada anteriormente (M3-PALS). El instrumento Zetasizer Nano lleva a cabo la medida en la zona central de la celda para evitar influencias perturbadoras de las paredes y facilitar el montaje instrumental y detecta el rayo dispersado a  $12.8^\circ$ . El resultado de todo ese procedimiento es una medida del potencial zeta rápida y robusta.

## 2.6. Resultados

Presentamos en esta sección los resultados de algunas mediciones que hemos realizado con el propósito de verificar la metodología (aparato, condiciones de trabajo, tratamiento de datos, etc.). Se realizan con sistemas bien conocidos, cuyos resultados son previsibles o, incluso, como en el caso de algunas muestras empleadas como patrones, perfectamente establecidos de antemano.

### 2.6.1. DLS con un patrón de tamaño: látex de poliestireno

Con vistas a la utilización de la técnica para la determinación de tamaño de partículas coloidales, esto es, nanopartículas, de tamaños grandes (en el rango de, digamos,  $r_h = 50 - 5000$  nm) se utilizan suspensiones de partículas esféricas de poliestireno (látex), que son preparadas por diversos fabricantes en condiciones tales que resultan prácticamente monodispersas.

Se mide un estándar de microesferas de látex de poliestireno Duke Scientific 15ML (Lote 24488) con un diámetro hidrodinámico nominal  $d_{h,nom} = 220$  nm. La calibración del fabricante certifica un valor  $d_h = 220 \pm 6$  nm (radio hidrodinámico,  $r_h = 110 \pm 3$  nm). Una porción de la suspensión original suministrada por el fabricante se diluye 400 veces ( $5 \mu\text{l}$  de látex original y  $1995 \mu\text{l}$  de disolvente; volumen total 2 ml) utilizando como disolvente una disolución acuosa 10 mM de NaCl, lo que constituye un protocolo habitual para conseguir suspensiones estables de microesferas de látex suficientemente diluidas con el fin de que proporcionen una lectura adecuada de la intensidad dispersada ( $\sim 300$  kcps). Para realizar la medida, la muestra de látex diluida se introdujo en una cubeta de cristal PCS8501 y se fijó la temperatura a  $25^\circ\text{C}$ . Las distribuciones obtenidas (intensidad, volumen y número) se muestran en la Figura 2.7. Se observa que el pico de la distribución en intensidad está centrado en torno a 220 nm, como cabe esperar, y que las distribuciones en volumen y número, sobre todo la primera, se superponen perfectamente a la distribución en intensidad. Como es habitual, la distribución en número es la más desplazada a tamaños inferiores respecto a la distribución en intensidad debido a las aproximaciones realizadas para su obtención. La poca anchura de los picos y su muy buena superposición es indicativo de la monodispersidad de la muestra.

Con el fin de obtener el valor del diámetro del látex estándar a partir de nuestra medida, se ajusta la función de correlación  $G_1(t)$ , extraída del *software* del DLS, a una

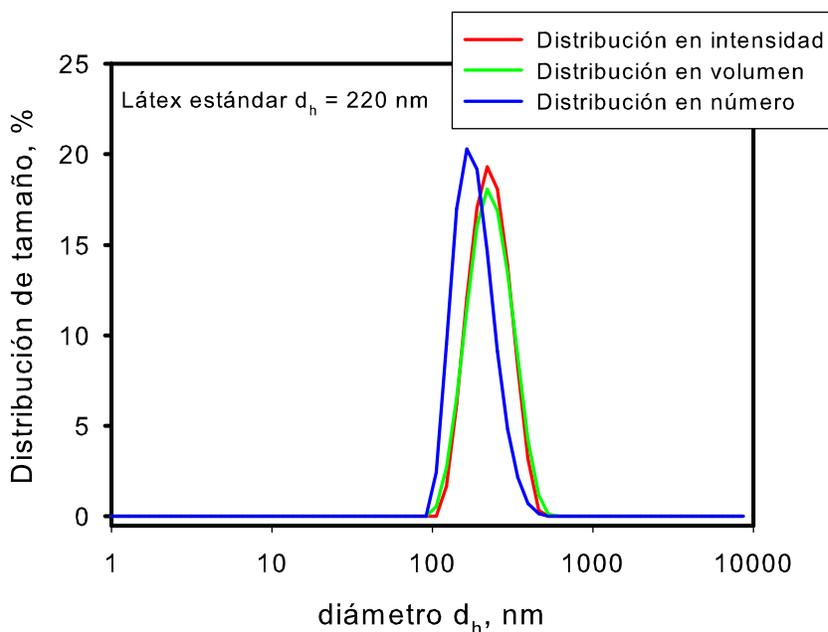


Figura 2.7: Distribuciones en intensidad, volumen y número para el estándar de poliestireno de  $d_{h,nom} = 220$  nm.

monoexponencial, ec. 2.20, mediante el programa *SigmaPlot*. La función de correlación y su ajuste para el estándar de látex se muestran en la Figura 2.8.

Del ajuste de la función de correlación se obtiene un valor para el tiempo de relajación  $\tau = 6.67 \times 10^{-4}$  s. Con este valor y con las ecuaciones anteriores obtenemos un coeficiente de difusión traslacional  $D = 2.17 \times 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s, siendo el valor proporcionado por el *software* del DLS  $D = 2.26 \times 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s. Del coeficiente de difusión procedente del ajuste de la función  $G_1(t)$  y utilizando la ecuación de Stokes-Einstein (ec. 1.6) obtenemos un diámetro para el estándar de poliestireno de 226.8 nm, siendo el valor proporcionado por el *software* del DLS (valor del pico correspondiente a la función de distribución en intensidad) de 234.9 nm. Como se aprecia, ambos valores son muy parecidos entre sí y, a su vez, perfectamente comparables con el valor suministrado por el fabricante  $d_h = 220 \pm 6$  nm.

Para comprobar que el instrumento Zetasizer Nano es fiable y tiene una buena precisión, no solo para medir tamaños de partícula por debajo de la micra (que es su principal cometido), sino también para medir tamaños de partícula relativamente grandes, cercanos al límite de detección de la técnica (en torno a 5  $\mu$ m), se procedió a medir tres muestras

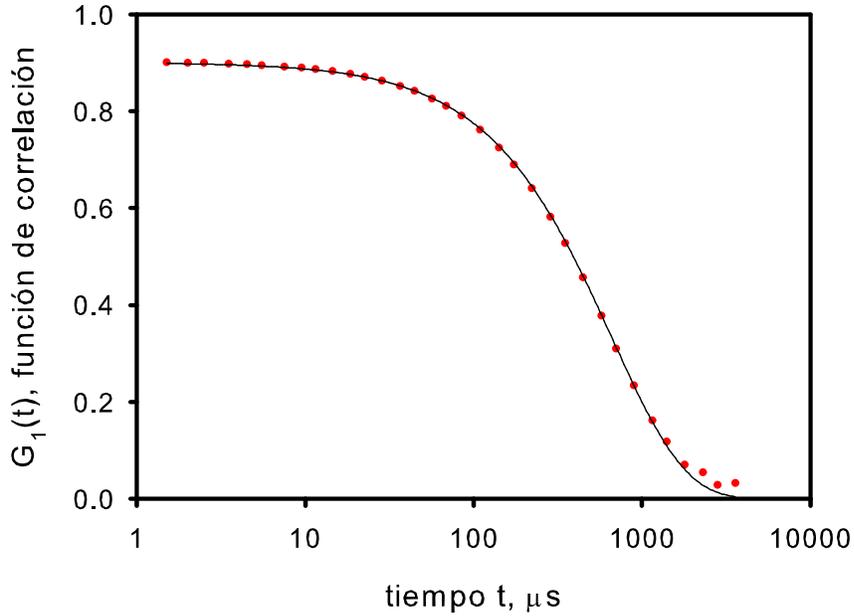


Figura 2.8: Función  $G_1(t)$  para estándar de poliestireno,  $d_{h,nom} = 220$  nm.

estándar de microesferas de látex de poliestireno compradas a la casa Sigma-Aldrich con los siguientes diámetros hidrodinámicos nominales:  $d_{h,nom} = 1.0 \mu\text{m}$  (Ref. 72938-5ML-F, Lote BCBP8072V),  $d_{h,nom} = 3.0 \mu\text{m}$  (Ref. 80304-5ML-F, Lote BCBQ1684V), y  $d_{h,nom} = 4.0 \mu\text{m}$  (Ref. 81494-5ML-F, Lote BCBQ9890V). La calibración del fabricante certifica los siguientes valores para los diámetros hidrodinámicos de las microesferas:  $d_h = 1.013 \pm 0.023$  nm,  $d_h = 3.133 \pm 0.062$  nm y  $d_h = 4.260 \pm 0.074$  nm, respectivamente. Para la preparación de las muestras a medir se utilizó el mismo protocolo descrito anteriormente para la muestra de diámetro nominal 220 nm. Las funciones de distribución en intensidad obtenidas para dichas muestras se muestran en la Figura 2.9. Como se aprecia, los picos correspondientes a cada estándar están centrados en los respectivos tamaños nominales. Para cada muestra se hicieron varias medidas para calcular una media y una desviación estándar cuyo valor corresponde a las barras de error de la Figura 2.9, todas ellas de pequeño tamaño. Las funciones de distribución de la Figura 2.9 verifican la precisión del instrumento incluso para tamaños de partícula del orden de la micra.

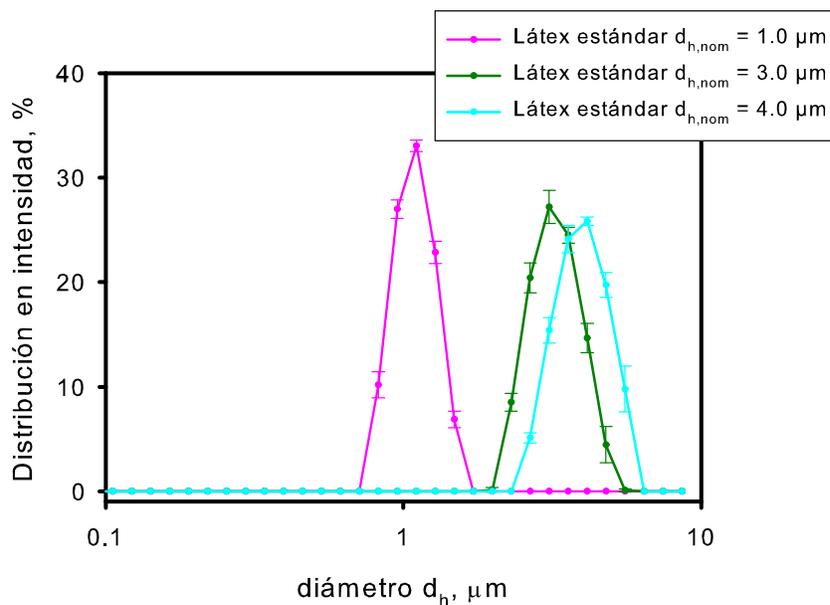


Figura 2.9: Distribuciones en intensidad para tres estándares de poliestireno de gran tamaño,  $d_{h,nom} = 1.0, 3.0, \text{ y } 4.0 \mu\text{m}$ .

### 2.6.2. DLS con nanopartículas de oro

Puesto que el Capítulo 7 de esta Tesis está dedicado a la caracterización de suspensiones de nanopartículas de oro (AuNPs) en diversas condiciones experimentales, presentamos, a modo de prueba, algunas medidas realizadas sobre nanopartículas de oro sintetizadas en nuestro laboratorio con el fin de evaluar tanto el funcionamiento del DLS para tamaños de partícula intermedios como la viabilidad de la síntesis.

Un método de preparación de AuNPs sencillo y versátil, que se utiliza tanto en demostraciones académicas [19] como en investigación [20], consiste en la reducción de tetracloroaurato,  $\text{HAuCl}_4$ , en presencia de citrato de sodio,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , molécula que, a la vez que reduce la sal de oro ( $\text{Au}^{3+}$ ) a oro metálico, estabiliza la suspensión de nanopartículas formada. Esto es debido a que el anión citrato recubre las nanopartículas conforme se generan, dotándolas de carga superficial negativa, en concreto, de un potencial zeta suficientemente negativo, lo que previene su agregación (tal y como se ha expuesto en la sección dedicada a potencial zeta de este capítulo). Éste ha sido el método utilizado por nosotros para sintetizar AuNPs, como se describe a continuación.

En primer lugar se prepara una disolución 1 mM de tetracloroaurato trihidratado,  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , comprado a Sigma-Aldrich (Ref. 520918-5G, Lote MKBS7667V), que presenta color amarillo y tiene  $\text{pH} = 3.2$ . A continuación se prepara una disolución 38.8 mM de citrato de sodio dihidratado,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , comprado a Sigma-Aldrich (Ref. W302600-1KG-K, Lote STBF-1932V) que tiene  $\text{pH} = 8.1$ . Una vez preparadas ambas disoluciones, se llevan a ebullición 20 ml de la disolución de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , agitando vigorosamente. Cuando la disolución empieza a hervir se añaden 2 ml de la disolución de citrato de sodio lo más rápido posible. Cuanto más rápida es la adición del agente reductor, más pequeñas y monodispersas son las AuNPs [21]. Puesto que la reacción química se produce en condiciones de ebullición, es necesario añadir agua miliQ para mantener el volumen inicial. Transcurrido 1 minuto, la disolución cambia de un color amarillo suave a azul oscuro. A los 2 minutos, pasa a color vino tinto y a los 3 minutos presenta el color rojo característico de las nanopartículas de oro de pequeño tamaño, color que se mantiene conforme transcurre el tiempo, lo que parece indicar que a los 3 minutos la reacción ya ha transcurrido totalmente. De todos modos, dejamos que la reacción continúe hasta los 10 minutos.

Para realizar las medidas de DLS hemos extraído porciones del medio de reacción a diferentes tiempos (3 min, 6 min y 10 min), dejando enfriar y centrifugando cada una de ellas antes de realizar la medida (en ausencia de ebullición la reacción no sigue progresando). La centrifugación es necesaria para retirar el exceso de citrato que queda sin reaccionar. Ésta se realiza a 7000 rpm durante veinte minutos en una centrífuga preparativa modelo miniSpin de la casa Eppendorf, apareciendo un precipitado formado por agregados de citrato que contienen algunas nanopartículas de oro atrapadas. El sobrenadante, que presentaba un  $\text{pH} = 6.3$ , se midió mediante dispersión de luz dinámica. Los resultados correspondientes a la distribución de tamaño en intensidad se muestran en la Figura 2.10. Como se observa en dicha figura, a los 3 minutos de reacción obtenemos nanopartículas de diámetro hidrodinámico aproximado 19 nm, pico único y estable que se mantiene a lo largo del tiempo, lo que parece confirmar que a ese tiempo ha transcurrido la reacción en su totalidad.

Parece claro que se han conseguido obtener nanopartículas de oro de tamaño pequeño y bastante monodisperso, y que el DLS es una técnica apropiada para seguir la evolución del tamaño en reacciones de formación y agregación de nanopartículas.

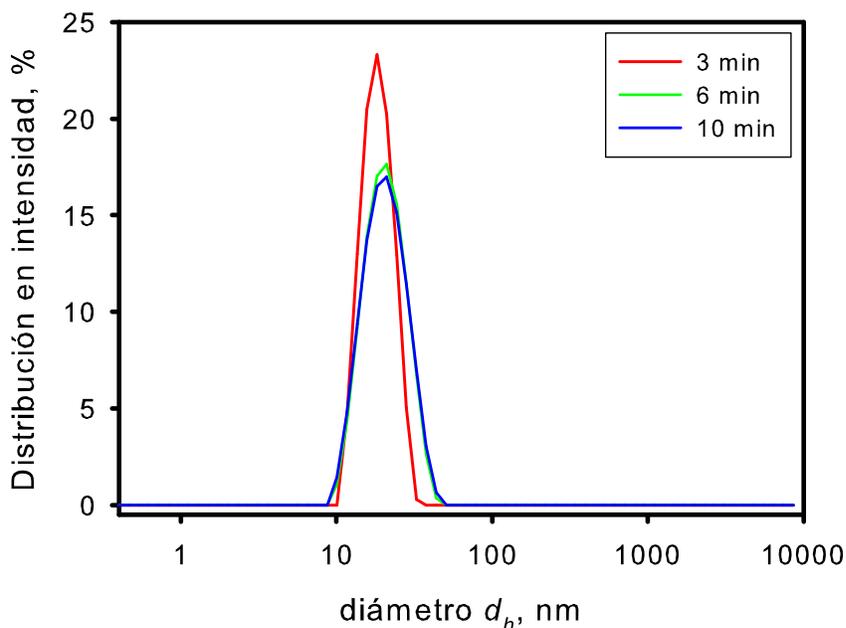


Figura 2.10: Distribuciones de tamaño (en intensidad) de AuNPs a distintos tiempos (técnica DLS). Muestras centrifugadas previo a la medición.

### 2.6.3. DLS con una molécula pequeña: sacarosa

Como caso extremo opuesto al de las grandes nanopartículas de las anteriores secciones, presentamos ahora los resultados para una molécula pequeña, la sacarosa. En cuanto a la modalidad estática, constatamos cómo SLS es aplicable a disoluciones de moléculas sencillas. Siendo el tamaño molecular unas 1000 veces menor que la longitud de onda, evidentemente el término  $P(\theta) \approx 1$  con lo que el análisis de datos para la determinación del peso molecular es viable. La sacarosa es un disacárido de peso molecular  $M = 342.3$  Da, que se comporta en disolución acuosa como un no-electrolito muy soluble, por lo que es idónea para medir su disolución en agua mediante propiedades coligativas, como lo es SLS.

En cuanto a la modalidad dinámica, la moderna tecnología DLS extiende el rango accesible de tamaño de partícula hasta valores entorno a 1 nm. La casa Malvern afirma que es posible medir el tamaño hidrodinámico de una molécula tan pequeña como la sacarosa, habiendo publicado unos resultados que así lo avalan [22].

En nuestras medidas se utilizó sacarosa de la marca LABKEM (EC: 200-334-9), de pureza superior al 99.8%. Se prepararon disoluciones en agua miliQ (pH=6.3) suministrada por el Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales (SACE) de la Universidad de Murcia. Se preparó una disolución madre de 350 mg/cm<sup>3</sup> disolviendo 35 g de sacarosa en unos 80 ml de agua. Se agitó la disolución durante una hora a temperatura ambiente, se enrasó en un matraz aforado de 100 ml y se filtró con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ . A partir de la disolución madre se prepararon 2 ml de disoluciones de diversa concentración, tomando los correspondientes volúmenes de disolución madre y agua con una micropipeta Eppendorf Research. Estas disoluciones se filtraron con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  justo antes de introducirlas en la cubeta (modelo PCS 8501), lavada con la misma disolución que va a contener.

Cada medida consta de 10 u 11 adquisiciones, cada una de duración 10 s en unos casos y 30 s en otros (no hubo diferencias significativas en los resultados). De cada medida se extrae la intensidad de luz dispersada,  $I$ , en kcps, así como la distribución  $A_I$  y promedio  $z$  del radio hidrodinámico,  $r_h$ . Las medidas se repitieron tres o cuatro veces, expresando los resultados como la media de cada medida, y evaluando las desviaciones estándar.

### 2.6.3.a. SLS: determinación del peso molecular

Además de las intensidades  $I$ , indicadas como  $I_X$  en la ec. 2.39 o  $I_{\text{disolución}}$  en la ec. 2.1 para disoluciones de diversas concentraciones, el experimento SLS requiere las intensidades dispersadas por el agua  $I_{\text{disolvente}}$ , así como la medida para el patrón, tolueno puro (Panreac, Lote 40364TJS), indicada como  $I_T$  en la ec. 2.39. Las medidas se efectuaron en las mismas condiciones que las de las disoluciones, con la salvedad de que para los líquidos puros no procede el análisis de correlación y tamaño molecular, por lo que la repetición de las medidas sucesivas se hizo manualmente.

En la Tabla 2.1 y la Figura 2.11 se indican los resultados experimentales primarios. La constante óptica  $K$  requiere los valores  $\lambda = 632.8$  nm para el láser del aparato,  $n_1=1.33$  para agua a 25°C y  $dn/dc = 0.15$  [23] para sacarosa en agua. El tratamiento de datos lo efectuamos mediante una hoja de cálculo EXCEL. Una versión simplificada de esta hoja tiene el formato de la Tabla 2.2 (en la práctica trabajamos con una hoja más extensa que contiene el tratamiento de errores). El ajuste detallado y la presentación gráfica que aparece en la Figura 2.12 los realizamos aparte. El ajuste de regresión lineal se efectúa con nuestro programa mincua4, basado en la subrutina FIT de *Numerical Recipes* [24],

que permite tener en cuenta errores en los datos y determinar el error de los parámetros del ajuste. La representación gráfica se realiza con el software `SigmaPlot`.

Tolueno puro: $\langle I \rangle = 263 \pm 5$ kcps	
$c_{sacarosa}$ (g/cm <sup>3</sup> )	$\langle I \rangle$ (kpics)
0	$25 \pm 2$
0.01	$39.5 \pm 1.4$
0.05	$76.5 \pm 1.2$
0.10	$117 \pm 2$
0.15	$150.1 \pm 1.9$
0.20	$172.6 \pm 0.5$
0.25	$189.4 \pm 0.8$
0.30	$206.0 \pm 1.8$
0.35	$209.5 \pm 1.3$

Tabla 2.1: Intensidad dispersada promedio del tolueno y de la disolución de sacarosa según su concentración.

El resultado obtenido para el peso molecular de la sacarosa  $M = 342 \pm 16$  está en muy buen acuerdo con el valor exacto, 342.3 Da, siendo la diferencia de tan solo 0.09%. En cuanto al coeficiente del virial, se obtiene  $A_2 = 0.0064 \pm 0.0003$  mol cm<sup>3</sup>g<sup>-2</sup>. Es notorio que la linealidad de la representación se extiende a concentraciones tan altas como 0.3 g/cm<sup>3</sup>, no detectándose curvatura que podría indicar la necesidad de un tercer término en el desarrollo del virial. Parece, pues, que la disolución de sacarosa en agua es moderadamente no-ideal.

### 2.6.3.b. DLS: coeficiente de difusión y tamaño hidrodinámico

Para el coeficiente de difusión y el radio hidrodinámico de sacarosa en agua hay algunos datos bibliográficos obtenidos por otras técnicas de difusión convencionales para solutos pequeños. Ribeiro y col. utilizan dispersión Taylor [25], obteniendo  $r_h=0.469$  nm. Ekezie y col. mediante un dispositivo clásico de difusión en un tubo, determinan  $r_h=0.513$  nm [26]. Cabe también mencionar valores de  $r_h$  procedentes de medidas de viscosidad intrínseca que, como sabemos, son algo superiores a los obtenidos mediante otras técnicas, típicamente un 5% más elevados que los de difusión [4]; Schultz y Solomon [27] determi-

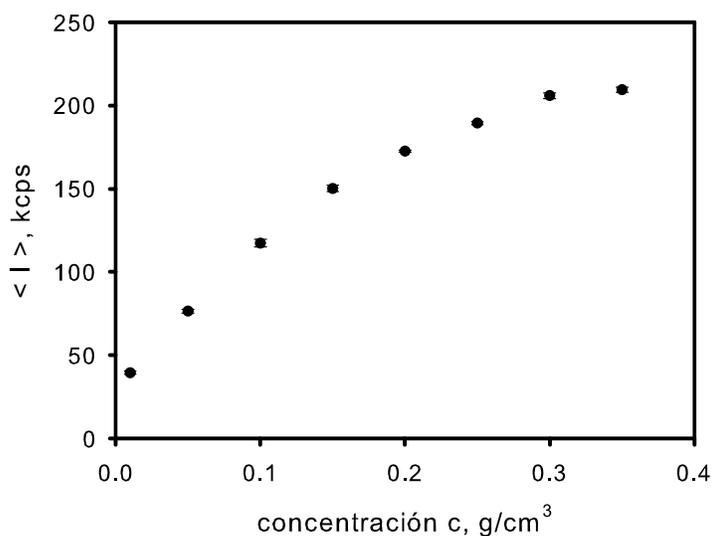


Figura 2.11: Dependencia de la intensidad dispersada promedio de la disolución de sacarosa con la concentración.

naron valores en el rango 0.50 – 0.52 nm, que en radio traslacional corresponderían a 0.48 – 0.50 nm. Como valor de referencia, podemos tomar  $r_h=0.49$  nm, que en agua a 25°C correspondería a un coeficiente de difusión  $D = 5.0 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s.

Realizamos dos serie de determinaciones, con disoluciones de concentraciones hasta 0.3 g/cm<sup>3</sup>. Una primera serie con `n-med=3` repeticiones, cada una con `n-run=10` adquisiciones de datos de duración `t-run=10` s, y otra segunda serie con condiciones diferentes, `n-med=4`, `n-run=10`, y `t-run=10` s. Los valores  $r_h$  y los correspondientes valores de  $D$  se determinan de dos formas: (a) a partir del promedio  $z$  procedente del primer cumulante, y (b) del pico en la distribución de tamaños en modo intensidad. Los resultados se presentan en las Figuras 2.13 y 2.14.

Nuestro trabajo trata de replicar los resultados antes citados de Kaszuba y col. [22]. Estos autores suministran resultados de un radio hidrodinámico obtenido utilizando un valor para la viscosidad que no es el del agua disolvente, sino el de la propia disolución de sacarosa, que ellos mismos miden. Dado que lo que realmente se obtiene en DLS es el coeficiente de difusión, transformamos sus  $r_h$  en valores de  $D$  utilizando coherentemente su viscosidad de la disolución. Sus resultados están incluidos en las Figuras 2.13 y 2.14. Además, del valor del máximo del pico, como nosotros, esos autores obtienen un promedio promediando sobre el pico, no por el método de cumulantes. Como se aprecia en las

Láser	Long. Onda	632.8	nm		
Tolueno	n =	1.496			
	R =	1.35E-05			
	$I_{\text{tolueno}} =$	263.1	Kcps		
Disolución	n1 =	1.33			
	$I_{\text{disolvente}} =$	25	Kcps		
	dn/dc =	0.15	cm <sup>3</sup> /g		
	Const. Opt. K =	1.62683E-07	C.G.S.		
c, mg/cm <sup>3</sup>	I, kpcs	R, disolución	$\Delta R$	c, g/cm <sup>3</sup>	Kc/ $\Delta R$
0.00	25	1.01E-06	0.0E+00	0.0	2.77E-03
10.00	39.5	1.60E-06	5.88E-07	1.00E-02	2.77E-03
50.00	76.5	3.10E-06	2.09E-06	5.00E-02	3.89E-03
100.00	117	4.75E-06	3.73E-06	1.00E-01	4.36E-03
150.00	150.1	6.09E-06	5.07E-06	1.50E-01	4.81E-03
200.00	172.6	7.00E-06	5.99E-06	2.00E-01	5.44E-03
250.00	189.4	7.68E-06	6.67E-06	2.50E-01	6.10E-03
300.00	206.0	8.35E-06	7.34E-06	3.00E-01	6.65E-03
350.00	209.5	8.50E-06	7.48E-06	3.50E-01	7.61E-03
Ordenada en origen:		0.002924			
Pendiente:		0.01293			
Peso molecular / Da:		341.9917			
Coefficiente A2 / mol cm <sup>3</sup> /g:		0.00646			

Tabla 2.2: Formato e información contenida en una Hoja EXCEL de trabajo simplificada (sin cálculo de errores). Los valores mostrados corresponden al caso estudiado cuyos resultados primarios están en la Tabla 2.1.

Figuras 2.13 y 2.14, nuestros resultados y los suyos siguen la misma tendencia, aunque los nuestros presentan mayores fluctuaciones. De hecho, nuestros resultados a concentraciones inferiores a 0.1 g/cm<sup>3</sup> tienen una barra de error importante, y no los hemos considerado en la extrapolación a dilución infinita.

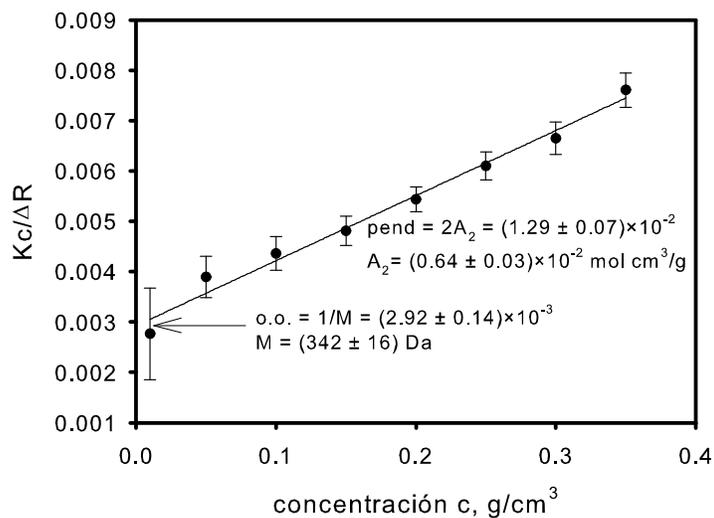


Figura 2.12: Ajuste para obtener el peso molecular de la sacarosa.

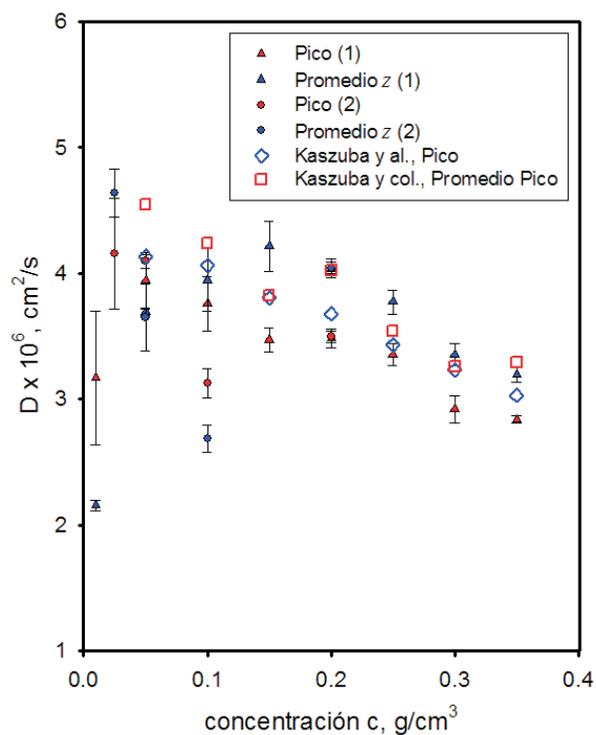


Figura 2.13: Coeficiente de difusión de sacarosa, de nuestro trabajo y de Kaszuba y col. [22] mediante distintos procedimientos. (A) Datos experimentales.

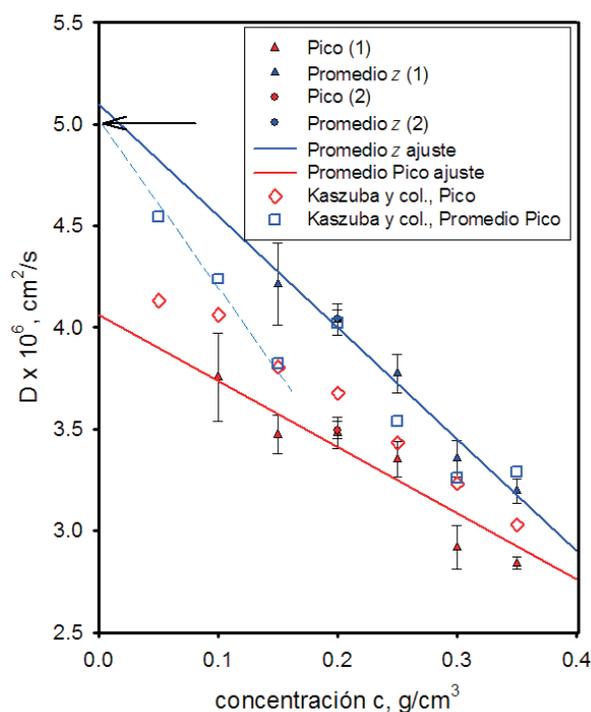


Figura 2.14: Coeficiente de difusión de sacarosa, de nuestro trabajo y de Kaszuba y col. [22] mediante distintos procedimientos. (B) De nuestros datos se toman los de concentración a partir de  $0.1 \text{ g/cm}^3$ . Se muestran las extrapolaciones a dilución infinita. La flecha señala el valor esperado.

En cuanto a los valores pico, parece evidente tanto en ese trabajo como en el nuestro, que son sistemáticamente inferiores a los valores promedio, y extrapolan hacia un valor algo inferior al esperado de  $D = 5.0 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Los valores promedios sí parecen extrapolarse bastante bien en ambos trabajos a ese valor esperado. Las diferencias entre valores pico y promedio, o entre uno y otro trabajo, son, como se aprecia en las Figuras 2.13 y 2.14 típicamente del orden de  $\pm 0.2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ , aproximadamente un  $\pm 5\%$ , que sería la precisión con la que cabe esperar que se obtengan las magnitudes hidrodinámicas, sea  $D$  o  $r_h$ , de moléculas pequeñas, mediante las medidas de DLS.



# Capítulo 3

## Viscosimetría

### 3.1. Conceptos teóricos

#### 3.1.1. Viscosidad de líquidos

La viscosidad es una propiedad de los fluidos que refleja la resistencia, debida a rozamiento, que unas partes del fluido oponen al desplazamiento relativo de otras. Es decir, la viscosidad es una medida de la resistencia a fluir.

Un fluido puede experimentar diferentes tipos de flujo (elongacional, cizalla...), cada uno de los cuales estará caracterizado por un tipo de viscosidad (ya que la resistencia a fluir será diferente para cada tipo de flujo). El tipo de flujo en el que se basa la definición clásica de viscosidad es el flujo de cizalla simple. Tanto ese tipo de flujo como el íntimamente relacionado flujo de Poiseuille son los tipos de flujo que se generan en los dispositivos de viscosimetría y reometría que utilizaremos en esta Tesis, por lo que siempre que aparezca el término viscosidad a lo largo de esta Tesis estaremos refiriéndonos, en rigor, a la viscosidad en cizalla. El flujo de cizalla simple es un flujo laminar en el que las capas o láminas del fluido se desplazan paralelamente unas con respecto a otras a diferente velocidad, siendo la variación de velocidad entre las capas lineal respecto a la separación de las mismas, lo que genera un gradiente de velocidad constante denominado gradiente de cizalla,  $\dot{\gamma}$ . A efectos prácticos es como si el fluido estuviese entre dos placas paralelas, una móvil y la otra fija, tal y como se aprecia en la Figura 3.1 donde la longitud de las flechas indica la magnitud de la velocidad del líquido en cada capa. Las láminas del fluido, paralelas a las placas, se mueven en la dirección  $x$  (dirección del flujo), cada una con una velocidad  $v_x$  diferente, velocidad que es máxima en la lámina contigua a la placa móvil. Por otro lado,

las coordenadas  $y$  y  $z$  de cualquier punto de una determinada lámina no varían. Así, si  $y$  es el eje perpendicular a las láminas, es decir, la dirección del gradiente de cizalla, éste es, por definición [6, 28],

$$\dot{\gamma} = \frac{dv_x}{dy}. \quad (3.1)$$

Por tanto, el perfil de velocidad en un flujo de cizalla, es decir las componentes  $x$ ,  $y$  y  $z$  del vector velocidad en un punto cualquiera del fluido, responde a las siguientes ecuaciones:

$$v_x = \dot{\gamma}y, \quad v_y = v_z = 0. \quad (3.2)$$

La causa de que se genere el perfil de velocidad mostrado en la Figura 3.1 está en la transferencia de cantidad de movimiento entre las distintas capas del fluido. Así, cuando un fluido se encuentra en movimiento con un gradiente de cizalla, las capas más veloces rozan con las más lentas, resultando que las primeras se ven frenadas y las segundas aceleradas. La viscosidad es, por tanto, un fenómeno de transporte.

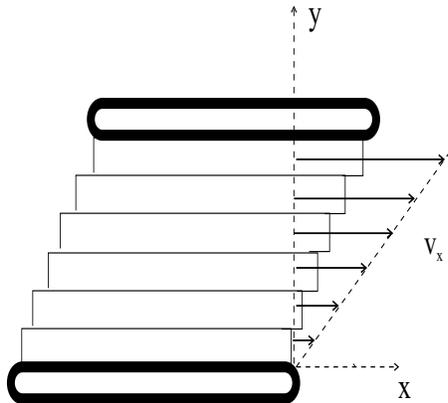


Figura 3.1: Flujo de cizalla. Tratamiento esquemático de capas planas paralelas.

Isaac Newton enunció la hipótesis de que la resistencia que oponen las capas de fluido a deslizarse unas respecto a otras es proporcional a la velocidad con que se separan entre sí, es decir, al gradiente de velocidad o gradiente de cizalla. La cuantificación de esa resistencia se hace definiendo un coeficiente de viscosidad,  $\eta$ , que expresa la proporcionalidad entre el gradiente de velocidad y la fuerza de rozamiento por unidad de área o, lo que es igual, la fuerza tangencial por unidad de área a la que hay que someter a las láminas de fluido para mantener un régimen de deformación de cizalla continuo. A la fuerza por unidad de

área se la denomina esfuerzo,  $\tau$ . La expresión matemática asociada a la anterior hipótesis es la conocida ley de Newton de la viscosidad [6, 28]:

$$\tau = \frac{F}{A} = \eta \dot{\gamma}, \quad (3.3)$$

donde  $F$  es la fuerza que se opone al desplazamiento relativo de las capas y  $A$  es el área de contacto entre dichas capas. El coeficiente de viscosidad definido por dicha relación,  $\eta$ , es la denominada viscosidad dinámica. En ocasiones puede ser útil manejar la denominada viscosidad cinemática,  $\nu$ , que está relacionada con la dinámica mediante la densidad del fluido,  $\rho$ :  $\nu = \eta/\rho$ .

Denominamos líquidos o fluidos newtonianos a los que siguen la ley de Newton de la viscosidad, ecuación 3.3, es decir, aquellos fluidos para los que la viscosidad es independiente del gradiente de velocidad ( $\eta$  constante al variar  $\dot{\gamma}$ ,  $\eta \neq f(\dot{\gamma})$ ). Los fluidos newtonianos suelen ser fluidos simples constituidos por moléculas relativamente pequeñas (agua, glicerina, disolución de sacarosa...). En cambio, los fluidos con estructura más compleja, como las disoluciones de macromoléculas, suelen ser no newtonianos, es decir, en ellos la viscosidad varía con el gradiente,  $\eta = f(\dot{\gamma})$ . También son fluidos no newtonianos aquellos fluidos cuya viscosidad varía con el tiempo de aplicación del flujo. No obstante, la ley 3.3 se suele cumplir siempre que el gradiente  $\dot{\gamma}$  sea suficientemente pequeño.

Por otro lado, si el flujo no es laminar, sino turbulento, la viscosidad no es constante. Además, la viscosidad va a ser siempre función de la temperatura (en los líquidos, la viscosidad disminuye al aumentar la temperatura) y de la presión. No obstante, no trataremos con sistemas turbulentos en esta Tesis.

Las unidades de viscosidad (dinámica) más utilizadas son:

- Sistema Internacional: Pa·s = kg m<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>
- Sistema Cegesimal: Poise (P) = g cm<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>

### 3.1.2. Viscosidad de disoluciones

Como se comentó en el Capítulo 1 de introducción, al añadir soluto a un disolvente, la viscosidad de la disolución,  $\eta$ , aumenta respecto a la que tenía el disolvente puro,  $\eta_0$ . El efecto espesante del soluto está caracterizado principalmente por la viscosidad intrínseca,  $[\eta]$ , definida por la ecuación 1.16 que escribimos de nuevo:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{c\eta_0}, \quad (3.4)$$

donde  $c$  es la concentración másica. El valor de  $[\eta]$  está íntimamente relacionado con la forma y el tamaño de las moléculas de soluto. De hecho, según la teoría de Einstein,

$$[\eta] = \nu \bar{v}, \quad (3.5)$$

donde  $\nu$  es un factor que depende de la forma de la molécula ( $\nu = 2.5$  para partículas esféricas) y  $\bar{v}$  es su volumen específico, de modo que  $[\eta]$  es una medida del volumen hidrodinámico de las moléculas de soluto [6]. Por otro lado, cuando el soluto es macromolecular, la viscosidad intrínseca permite determinar conformaciones y asignar pesos moleculares a esas macromoléculas [6]. Para ello se utiliza la ecuación viscosimétrica de Mark-Houwink-Sakurada

$$[\eta] = K M_v^a, \quad (3.6)$$

donde  $M_v$  es el peso molecular (promedio viscoso) y  $K$  y  $a$  son parámetros cuyos valores están en gran medida conectados con el tipo de interacciones que se producen entre la cadena macromolecular y las moléculas de disolvente por lo que son un indicativo de las características termodinámicas de la disolución (es decir, de la calidad del disolvente). En concreto, el valor del exponente  $a$  depende de que la conformación macromolecular sea más o menos alargada (o esférica) lo que, en caso de macromoléculas flexibles es, a su vez, un reflejo de la calidad del disolvente. Por tanto, de las diferentes expresiones que miden el incremento de viscosidad y que se definieron en el Capítulo 1,  $[\eta]$  es la que proporciona una información más detallada y valiosa sobre el soluto.

Si se escribe la dependencia de la viscosidad de la disolución con la concentración en forma del desarrollo del virial ( $\eta = a_0 + a_1c + a_2c^2 + \dots$ ), y se asume que la disolución es muy diluida ( $c \ll 1$ ), se pueden obtener expresiones que nos permiten calcular la viscosidad intrínseca a partir de medidas de la viscosidad en función de la concentración. Dos expresiones muy conocidas y utilizadas son las ecuaciones de Huggins [29],

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta](1 + k_H[\eta]c), \quad (3.7)$$

y Kraemer [30],

$$\frac{\ln \eta_r}{c} = [\eta](1 - k_K[\eta]c), \quad (3.8)$$

donde  $k_H$  y  $k_K$  son las denominadas constantes de Huggins y Kraemer respectivamente, adimensionales, que dependen de las interacciones hidrodinámicas entre el polímero y el disolvente y que cumplen la relación  $k_H + k_K = 0.5$ . El valor de  $k_H$  es característico de una serie homóloga de un polímero en un disolvente. Para cadenas lineales flexibles su valor oscila entre 0.2 y 0.8, mientras que valores mayores que la unidad suelen estar relacionados con asociaciones entre moléculas [31]. Como la dependencia de  $\eta_{sp}/c$  y  $\ln \eta_r/c$  con  $c$  es lineal para disoluciones suficientemente diluidas, la ordenada en el origen (extrapolación a concentración cero) del ajuste lineal de los puntos experimentales nos proporciona  $[\eta]$ . El Grupo de Polímeros de la Universidad de Murcia ha elaborado el programa VISFIT que realiza el ajuste simultáneo de las representaciones de Huggins y Kraemer para dar una única ordenada en el origen que se toma como el mejor valor de la viscosidad intrínseca [32]. Dicho programa se encuentra a disposición pública en la página web del Grupo [33]. En la Figura 3.2 se presenta un ejemplo de dicho procedimiento, donde puede observarse que las ordenadas en el origen de ambas regresiones son perfectamente coincidentes.

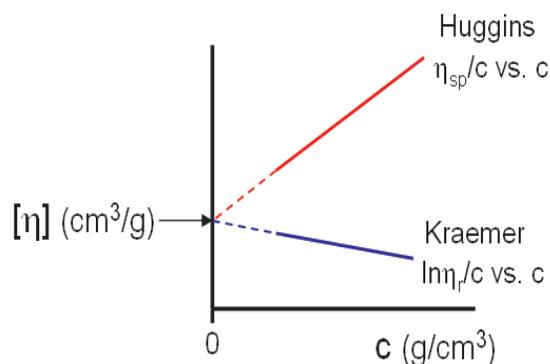


Figura 3.2: Doble extrapolación de Huggins y Kraemer.

Existen alternativas al anterior método de dilución que utilizan la medida de la viscosidad a una única concentración para determinar la viscosidad intrínseca. Es lo que se conocen como procedimientos de “punto único” de los cuales el más conocido es el que se basa en la ecuación de Solomon-Ciuta [34],

$$[\eta] = \frac{[2(\eta_{sp} - \ln \eta_r)]^{1/2}}{c} = \frac{[2(\eta_r - 1 - \ln \eta_r)]^{1/2}}{c}. \quad (3.9)$$

Dicha ecuación se puede obtener combinando las ecuaciones de Huggins (ec. 3.2) y Kraemer (ec. 3.8) y teniendo en cuenta que la relación entre sus constantes es  $k_H + k_K = 0.5$  [31]. La ecuación 3.9 es estrictamente válida si la concentración utilizada se encuentra dentro del rango en el que se cumplen simultáneamente las ecuaciones lineales de Huggins y Kraemer, lo que ocurre solo cuando la disolución es suficientemente diluida. Por ese motivo, es habitual que el valor de  $[\eta]$  calculado mediante el procedimiento de Solomon-Ciuta se desvíe del valor verdadero. No obstante es de destacar que, en el caso particular en el que  $k_H = 1/3$ , el mencionado procedimiento proporciona valores exactos para  $[\eta]$  [31].

## 3.2. Instrumentación

Diferentes instrumentos pueden ser utilizados para medir la viscosidad de un fluido. La mayoría de ellos se basan típicamente en uno de los siguientes tres fenómenos: una superficie móvil en contacto con el fluido, un objeto moviéndose a través del fluido, y un fluido fluyendo a través de algún dispositivo. El primer fenómeno es la base del instrumento denominado reómetro, el cual describiremos en el capítulo siguiente dedicado a reología, el segundo es la base del viscosímetro de bola rodante y el tercero es el fundamento del viscosímetro capilar, ambos descritos a continuación. Los gradientes de velocidad que se generan en los dos últimos son habitualmente suficientemente pequeños como para considerar que el fluido en estudio se comporta de forma newtoniana.

### 3.2.1. Viscosímetro de bola rodante

#### 3.2.1.a. Fundamentos del viscosímetro de bola

El viscosímetro de bola rodante se basa en el denominado sistema de medida Höppler que relaciona la viscosidad del fluido con el tiempo que una bola, usualmente de acero u oro, tarda en recorrer una determinada distancia a través de un capilar relleno del fluido. El capilar se encuentra inclinado un determinado ángulo respecto a la horizontal para permitir el desplazamiento de la bola por efecto de la gravedad (Figura 3.3), y está rodeado por una camisa para el control de la temperatura. Cuanto más viscoso sea el líquido, mayor resistencia opondrá al desplazamiento de la bola y más lentamente rodará ésta (para un determinado ángulo). En los viscosímetros de bola rodante propiamente dichos el ángulo de inclinación varía entre  $10^\circ$  y  $80^\circ$  (una inclinación demasiado pronunciada podría producir un indeseable flujo turbulento).

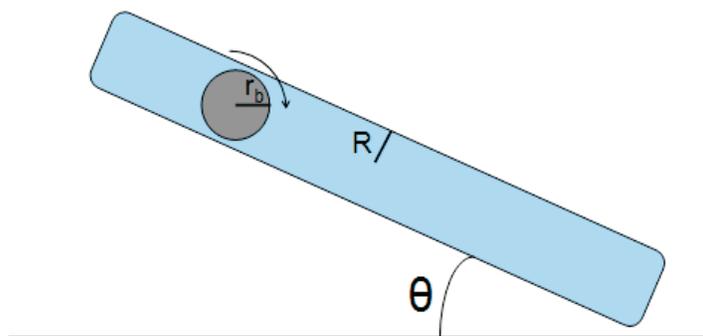


Figura 3.3: Esquema de un viscosímetro de bola rodante.

Las fuerzas que actúan sobre la bola rodante son: la componente de la gravedad en el sentido del movimiento, la componente del empuje en el sentido contrario al movimiento, y la fricción, también de sentido contrario al movimiento. La inclinación del capilar permite ajustar, por tanto, la fuerza resultante sobre la bola. En el régimen estacionario, las componentes gravitatorias y de empuje y la fuerza de fricción se compensan, y la bola se mueve a una velocidad terminal constante,  $v_b$ . Puesto que la influencia de la fuerza de gravedad sobre la bola depende de su densidad,  $\rho_b$ , y de su volumen o, equivalentemente, de su radio,  $r_b$ , y el empuje depende, además, de la densidad del líquido,  $\rho$ , será necesario conocer todas estas magnitudes para calcular la viscosidad en los viscosímetros de bola. Así, si el capilar tiene radio  $R$ , y el ángulo de inclinación del mismo respecto a la horizontal es  $\theta$ , la viscosidad,  $\eta$ , se puede calcular como [28]

$$\eta = \frac{4r_b^2(\rho_b - \rho)g \sin \theta}{15v_b} \left( \frac{R - r_b}{R} \right)^{5/2}, \quad (3.10)$$

donde  $g$  es la aceleración de la gravedad.

Puesto que  $v_b = d/t$ , donde  $d$  es la distancia recorrida por la bola y  $t$  es el tiempo que tarda en recorrer dicha distancia, la expresión anterior se puede compactar agrupando los términos relacionados con la geometría del capilar y la bola en una cierta constante  $K$ , que se determinará mediante calibrado utilizando un líquido de viscosidad conocida, y dejando la viscosidad en función de  $t$ ,

$$\eta = K(\rho_b - \rho)t. \quad (3.11)$$

### 3.2.1.b. Descripción de nuestro equipo

El viscosímetro de bola rodante disponible en nuestro laboratorio es el modelo Lovis 2000 ME que es un módulo auxiliar del densímetro DMA 5000 M de Anton Paar (ver Figura 3.4). La temperatura en estos dispositivos es controlada mediante elementos Peltier. Este aparato permite una medida muy precisa tanto de la densidad como de la viscosidad en un rango de temperatura entre 5°C y 100°C. El densímetro consiste en un tubo en forma de U que se rellena con 1 ml de muestra y se le hace vibrar a su frecuencia característica, la cual va a depender de la densidad de la muestra. Por tanto, midiendo esta frecuencia característica y con el adecuado tratamiento matemático, se puede determinar la densidad del fluido, resultando en una precisión de hasta  $\pm 0.00005$  g/cm<sup>3</sup>. La expresión matemática utilizada para calcular la densidad,  $\rho$ , es del siguiente tipo:  $\rho = K_A Q^2 f_1 - K_B f_2$ , donde  $K_A$  y  $K_B$  son constantes del aparato,  $f_1$  y  $f_2$  son factores de corrección que tienen en cuenta efectos de la temperatura y la viscosidad, y  $Q$  es el cociente entre el período de vibración del tubo en U y el período de vibración de un oscilador de referencia. Por otro lado, para la medida de la viscosidad, un capilar como el de la Figura 3.5 se rellena con 100  $\mu$ l de muestra que es introducida por un extremo mediante una jeringuilla. Posteriormente el capilar se introduce en el módulo Lovis y éste comienza a adoptar diferentes inclinaciones hasta que establece automáticamente el ángulo más adecuado para medir la viscosidad. Tres sensores inductivos miden el tiempo que la bola tarda en desplazarse entre ciertas marcas definidas a lo largo del capilar. Este tipo de sensores permite trabajar con líquidos tanto transparentes como opacos. Nuestro aparato dispone de capilares de tres diámetros diferentes que permiten medir diferentes rangos de viscosidad: 1.59 mm para un rango de 0.3 mPa·s a 90 mPa·s, 1.8 mm para un rango de 2.5 mPa·s a 1700 mPa·s, y 2.5 mm para un rango de 12 mPa·s a 10000 mPa·s. Por otro lado, las bolas de las que disponemos son de acero con un diámetro de 1.50 mm.

## 3.2.2. Viscosímetro capilar

### 3.2.2.a. Fundamentos del viscosímetro capilar

La técnica de viscosimetría capilar consiste en relacionar la viscosidad de un fluido con el tiempo que tarda en fluir a través de un capilar ya que cuanto más viscoso sea un líquido más lentamente se desplazará por el capilar. Los viscosímetros capilares consisten, esencialmente, en cinco partes: una cámara donde se deposita el fluido, un capilar de



Figura 3.4: Densímetro DMA 5000 M de Anton Paar con módulo Lovis 2000 ME.



Figura 3.5: Capilar que se introduce en el módulo Lovis 2000 ME.

diámetro conocido, una unidad de control y medida de la presión aplicada para hacer fluir el líquido, una unidad para la determinación del flujo y un termostato que controle la temperatura. Existen dos tipos principales de viscosímetros capilares: la variedad de cilindro-pistón (que no trataremos) y los viscosímetros de vidrio, que pasamos a explicar a continuación.

Existe una gran variedad de viscosímetros de vidrio en los que el control de la temperatura se ejerce introduciendo el viscosímetro en un baño termostático. Nosotros empleamos el tipo Ubbelohde [35], que es una modificación del viscosímetro capilar de Ostwald [36] y que consta de una rama de dilución, una rama central (donde se encuentra el capilar) y una tercera rama que asegura que la caída del líquido sea a la presión atmosférica (ver Figura 3.6). Este viscosímetro es muy útil para realizar diluciones *in situ* cuando la muestra es una disolución. Una vez que la muestra está en el depósito, se inyecta aire por la rama de dilución de tal forma que la disolución ascienda por la rama central; esto se

hace cerrando la tercera rama y dejando abierta la central. Después, se deja que el líquido descienda por el capilar por efecto de la gravedad (es decir, debido al propio peso de la columna de fluido) y se mide el tiempo, denominado tiempo de caída, que un determinado volumen del mismo tarda en fluir; en la práctica, el tiempo que tarda en pasar entre dos marcas que posee un bulbo situado en la parte superior de la rama central.

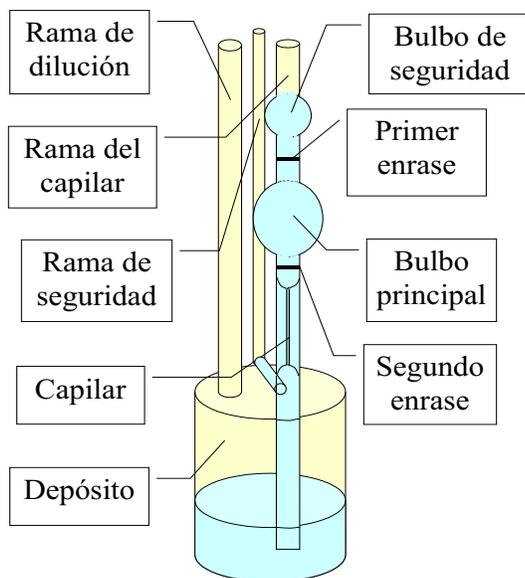


Figura 3.6: Esquema de un viscosímetro capilar tipo Ubbelohde.

La relación entre la viscosidad y el tiempo de caída no es, en general, lineal. Debido a que el flujo por el capilar no es exactamente laminar ni estacionario, es necesario introducir una serie de correcciones que afectan a dicha relación. En el caso de disoluciones diluidas (baja viscosidad), atemperadas mediante la utilización de un baño termostático, sólo la denominada corrección de los efectos de entrada y salida del capilar, asociados a la energía cinética de la corriente del fluido, debe ser tenida en cuenta. Utilizando la ley de Hagen-Poiseuille

$$Q = \frac{\pi R^4 \Delta P}{8\eta L}, \quad (3.12)$$

donde  $Q$  es el flujo volumétrico,  $\Delta P$  la diferencia de presión entre los extremos del capilar,  $R$  el radio del capilar,  $L$  su longitud y  $\eta$  la viscosidad del fluido, e introduciendo los

términos correctores apropiados, se obtiene [37]

$$\frac{\eta}{\rho} = \frac{\pi R^4 h g t}{8LV} - \xi \frac{V}{8\pi L t}, \quad (3.13)$$

donde  $h$  es la altura a la que se encuentra el líquido dentro del capilar,  $g$  la aceleración de la gravedad,  $\rho$  la densidad del fluido,  $V$  el volumen de fluido en el viscosímetro por encima del depósito,  $t$  el tiempo de caída y  $\xi$  es un factor de corrección que depende de la forma del capilar. Agrupando todos los parámetros característicos del viscosímetro que intervienen en el segundo término, dejamos como única variable el tiempo de caída y la ecuación anterior puede reescribirse como

$$\frac{\eta}{\rho} = At - \frac{B}{t}, \quad (3.14)$$

donde  $A$  y  $B$  son dos constantes características de cada viscosímetro que pueden ser determinadas mediante calibrado con líquidos de viscosidad y densidad conocidas. Por tanto, midiendo el tiempo de caída por un capilar, es posible calcular la viscosidad de un líquido de densidad conocida (fácilmente determinable con un picnómetro o un densímetro).

### 3.2.2.b. Descripción de nuestro equipo

Las medidas de viscosimetría capilar se llevaron a cabo en viscosímetros automáticos de la casa Schott Geräte (Figura 3.7) que constan básicamente de dos módulos o componentes: soportes modelo AVS/S para fijar el viscosímetro capilar y unidades para control de las medidas de las que tenemos dos modelos, AVS 310 y AVS 470. Los viscosímetros capilares utilizados en el montaje experimental son, como ya se ha mencionado, del tipo Ubbelohde, fueron también suministrados por Schott Geräte, y requieren una cantidad mínima de muestra en torno a 15 ml. Los diámetros de capilar disponibles en nuestros viscosímetros son 0.53 mm, 0.64 mm y 0.84 mm, utilizándose el diámetro menor con las muestras menos viscosas. Como ya se ha especificado, dichos viscosímetros se acoplan a soportes AVS/S, los cuales se introducen en un baño termostático para mantener constante la temperatura y se conectan a una unidad de control que lleva a cabo las operaciones de succionar el líquido, dejarlo caer y medir, mediante un sistema óptico, el tiempo que tarda en pasar entre las dos marcas que posee el viscosímetro capilar (Figura 3.6). Los dos modelos de unidades de control disponibles en nuestro laboratorio, AVS 310 (mostrado en la Figura 3.7) y AVS 470, fueron utilizados indistintamente. El baño termostático es de la casa Haake y está provisto de un cabezal modelo F3 que suministra calor y conectado

a un criostato Haake modelo DK 12 para enfriar. La mayoría de las medidas se hicieron a la temperatura de 25°C.



Figura 3.7: Viscosímetro capilar Ubbelohde en soporte AVS/S junto a módulo de control AVS 310.

### 3.3. Medidas de comprobación

A continuación se presentan una serie de medidas cuyo objetivo es comprobar el correcto funcionamiento de nuestra instrumentación.

#### 1) Medidas de sustancias patrón en el densímetro - viscosímetro de bola

##### ■ Medida de agua ultrapura

La Tabla 3.1 recoge las medidas de densidad y viscosidad para agua ultrapura a 25°C y 40°C realizadas con el densímetro DMA 5000 M - viscosímetro Lovis 2000 ME. Junto a ellas aparecen los valores de referencia. Las medidas de viscosidad se realizaron con el capilar de 1.59 mm que es el apropiado para determinar el valor de viscosidad del agua, además de ser el más comúnmente empleado.

T (°C)	$\eta$ (mPa·s)	$\eta$ (mPa·s) Ref <sup>1</sup>	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> ) Ref <sup>2</sup>
25	0.893	0.893	0.99713	0.997043
40	0.655	0.653	0.99222	0.992212

Tabla 3.1: Agua miliQ. Ref<sup>1</sup>: National Bureau of Standards. Ref<sup>2</sup>: Manual del densímetro DMA de Anton Paar; F. Spieweck and H. Bettin “Solid and liquid density determination. Technisches Messen” (1992) 59, 285-292.

Como se observa en la Tabla 3.1, el densímetro DMA 5000 M - viscosímetro Lovis 2000 ME de Anton Paar proporciona valores para el agua totalmente comparables con los de referencia con desviaciones en conjunto menores del 0.5% y que en la mayoría de los casos son despreciables.

- Medida de las sustancias patrón (20 AW y 200 AW) suministradas por Anton Paar  
La Tabla 3.2 recoge las medidas de densidad y viscosidad realizadas con el densímetro DMA 5000 M - viscosímetro Lovis 2000 ME, sobre dos sustancias patrón a 25°C y 40°C. Junto a ellas aparecen los valores de referencia. De acuerdo al valor de la viscosidad de los patrones, la viscosidad del patrón 20 AW se determinó con el capilar de 1.59 mm, que es el habitualmente utilizado en esta Tesis, y la viscosidad del 200 AW con el capilar de 2.5 mm.

Patrón	T (°C)	$\eta$ (mPa·s)	$\eta$ (mPa·s) Ref <sup>3</sup>	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> ) Ref <sup>3</sup>
20 AW	25	15.72	15.77	0.82550	0.8254
	40	9.325	9.371	0.81571	0.8156
200 AW	25	161.2	160.5	0.82743	0.8272
	40	79.43	78.54	0.81817	0.7812

Tabla 3.2: Patrones suministrados por Anton-Paar. Ref<sup>3</sup>: Documento adjunto a los patrones de Anton Paar.

Como se observa en la Tabla 3.2, los valores obtenidos para las sustancias patrón con el densímetro DMA 5000 M - viscosímetro Lovis 2000 ME de Anton Paar, aunque comparables con los de referencia, presentan, en conjunto, desviaciones algo mayores que en el caso del agua ultrapura, lo que queda patente en las medidas realizadas a 40°C sobre el patrón 200 AW (el de mayor viscosidad). Por tanto, aunque en

la mayoría de los casos las desviaciones siguen siendo despreciables (inferiores al 0.5%), solo podemos asegurar que, en general, éstas son menores del 5%. Este resultado está, de algún modo, conforme con nuestro conocimiento de que el equipo es menos preciso (el error asociado a la medida suele ser mayor) cuando se trabaja con muestras de viscosidad elevada (comunicación privada del equipo técnico de Anton Paar).

## 2) Comparación de medidas realizadas en el viscosímetro de bola con medidas realizadas en el viscosímetro capilar

- Mezcla de agua y glicerina (50% en volumen) a 25°C

Se prepara una mezcla al 50% en volumen de agua y glicerina. El viscosímetro de bola suministra automáticamente una viscosidad dinámica  $\eta = 6.713$  mPa·s. En cuanto al viscosímetro capilar, se determinan los tiempos de caída y, a partir de ellos, se calcula la viscosidad utilizando la ecuación 3.14 (previa determinación de las constantes de calibrado  $A$  y  $B$ , como se comentará en breve, y la densidad de la mezcla la cual se llevó a cabo en el densímetro DMA 5000 M de Anton Paar). Dicho procedimiento proporciona un valor  $\eta = 6.828$  mPa·s con una desviación inferior al 2%. Como se observa, ambos instrumentos, el viscosímetro Lovis 2000 ME de Anton Paar y el viscosímetro capilar tipo Ubbelohde operado automáticamente mediante las unidades suministradas por la casa Schott Geräte, proporcionan valores muy parecidos de la viscosidad. Puesto que, en principio, la medida con el viscosímetro capilar es de esperar que sea más fiable, este experimento confirma la precisión del módulo Lovis 2000 ME de Anton Paar.

- Calibración del viscosímetro Ubbelohde:

El diámetro del capilar del viscosímetro Ubbelohde que se utilizó para medir la viscosidad de la mezcla de agua y glicerina al 50% en volumen era 0.63 mm. Para la calibración de dicho viscosímetro se midieron los tiempos de caída,  $t$ , de cinco disolventes puros de densidad y viscosidad conocidas (agua miliQ, acetona, tolueno, butanona y acetato de etilo, estos dos últimos con los mismos tiempos de caída) y se utilizó la ecuación 3.14 para, a partir de la representación gráfica de  $\eta t / \rho$  frente a  $t^2$ , realizar un ajuste lineal y obtener las constantes de calibrado  $A$  y  $B$ . La Figura 3.8 muestra la recta de calibrado conseguida, de donde se obtiene que los valores de las constantes de calibrado son:  $A = 0.000102$  cm<sup>2</sup>/s<sup>2</sup> y  $B = 0.02338$  cm<sup>2</sup>.

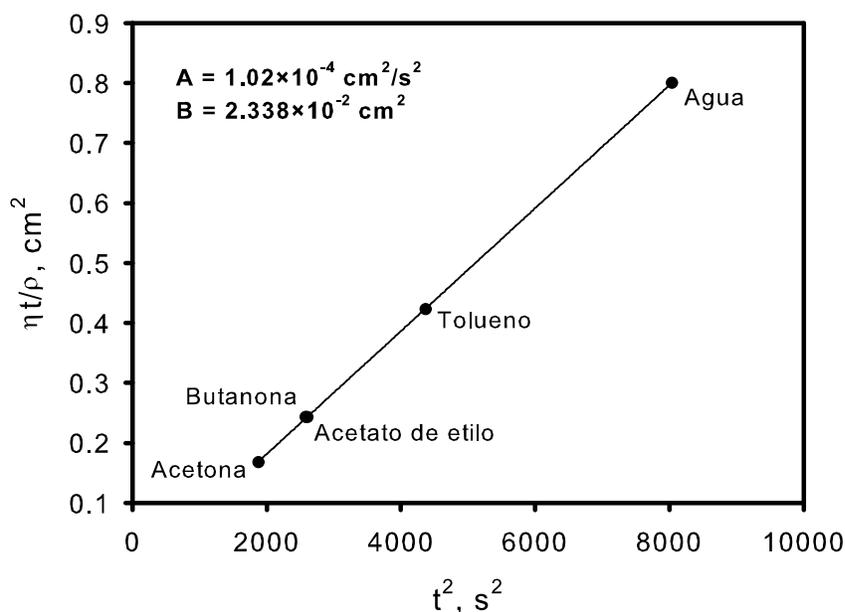


Figura 3.8: Recta de calibrado del viscosímetro capilar utilizado con la mezcla de agua y glicerina.

#### ■ Disolución de alginato a 25°C

Alginato es un término general en el que se incluye tanto al ácido algínico como a su sales monovalentes. Los alginatos son polisacáridos estructurales procedentes de las algas, solubles en agua, y con un amplio espectro de aplicaciones en campos tan dispares como la agricultura, la industria farmacéutica o la alimentaria. Por ejemplo, es muy conocido y extendido su uso como agente espesante y gelificante. En la industria farmacéutica es importante su empleo como agente encapsulador de fármacos. Desde el punto de vista químico, el ácido algínico es un polisacárido lineal formado por dos unidades monoméricas distintas, los ácidos  $\beta$ -D-manurónico (M) y  $\alpha$ -L-gulurónico (G), que se disponen formando distintas secuencias de bloques: homopoliméricas (GG) y (MM), como se ilustra en la Figura 3.9, o alternantes (MG) [38, 39]. La distribución de estos bloques tiene una gran repercusión en la flexibilidad de la cadena ya que los bloques GG son más rígidos que los MM y éstos más que los bloques heteropoliméricos [40, 41]. Por ello, una magnitud relevante para conocer las propiedades físico-químicas de los alginatos es la relación M/G.

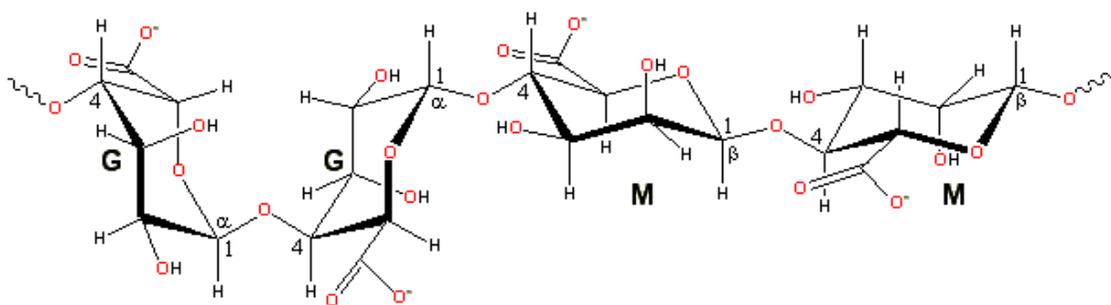


Figura 3.9:  $\beta$ -D-Guluronato y  $\alpha$ -L-Manuronato.

El objetivo de este apartado es comprobar, no solo que la viscosidad de una disolución de alginato medida con el viscosímetro de bola da los mismos resultados que la medida con el viscosímetro capilar, sino que la viscosidad intrínseca del alginato determinada mediante ambos instrumentos y utilizando los diferentes métodos descritos en la sección “Viscosidad de disoluciones” (Huggins, ec. 3.2, Kraemer, ec. 3.8, y Solomon-Ciuta, ec. 3.9) es la misma. Para ello se prepararon varias disoluciones acuosas de la sal sódica del ácido algínico, el alginato sódico, con las concentraciones de alginato recogidas en la Tabla 3.3. En todas ellas el disolvente fue, a su vez, una disolución de cloruro sódico, NaCl, en agua miliQ con una concentración de NaCl igual a 0.1 M. El motivo de usar dicha disolución salina es porque el alginato sódico disuelto en agua posee un elevado carácter de polielectrolito, es decir, presenta cargas a lo largo de la cadena, por lo que su conformación (y por consiguiente la viscosidad de la disolución) se ve fuertemente afectada por la fuerza iónica del medio. Cuando la fuerza iónica aumenta, las cargas de una cadena de polielectrolito van quedando progresivamente apantalladas, disminuyendo las repulsiones electrostáticas y generando una conformación más compacta. Por tanto es necesario fijar la fuerza iónica para medir la viscosidad. La fuerza iónica adecuada para determinar la viscosidad intrínseca de un polielectrolito es aquella que hace que se comporte como un polímero neutro, presentando una conformación de ovillo al azar. En nuestro caso, se utilizaron disoluciones diluidas (requisito necesario para medir viscosidad intrínseca, tal y como se expuso en la sección “Viscosidad de disoluciones”) en las que se fijó la fuerza iónica a 0.1 M mediante la adición de NaCl. Ésta es una fuerza iónica estándar lo suficientemente grande como para asegurar que las cargas de las cadenas de alginato están apantalladas y éste se comporta como

neutro (lo que se denomina condición de fuerza iónica infinita), siendo así factible determinar la viscosidad intrínseca con propiedad [42].

El alginato sódico empleado para este propósito es de la casa comercial Sigma-Aldrich con referencia A2033 (lote 111K0005). Dicho alginato procede del alga parda *Macrocystis pyrifera*, tiene una relación M/G=1.56 y es de viscosidad intermedia (peso molecular intermedio). A cada una de las disoluciones preparadas (incluyendo la disolución de NaCl 0.1 M utilizada como disolvente) se le midió la viscosidad (dinámica), bien directamente en el viscosímetro de bola Lovis 2000 ME o bien a partir de los tiempos de caída en un viscosímetro capilar tipo Ubbelohde que se operó con la unidad de control AVS 310. Dicho viscosímetro tenía un diámetro de capilar de 0.63 mm y se calibró mediante el procedimiento descrito anteriormente (y usando los mismos disolventes puros), obteniéndose los siguientes valores de las constantes de calibrado:  $A = 0.0000965 \text{ cm}^2/\text{s}^2$  y  $B = 0.01153 \text{ cm}^2$ .

Para que las disoluciones empleadas en los viscosímetros de bola y capilar fueran idénticas no se utilizó el procedimiento de dilución en éste último, sino que se introdujo directamente la disolución con la concentración que se deseaba medir. A cada disolución introducida se le midió cinco veces el tiempo de caída y se tomó como tiempo de caída representativo la media de los cinco. Cinco medidas fueron suficientes para obtener una buena media pues éstas eran muy reproducibles: el tiempo de caída y desviación estándar promedio (representativo) para las disoluciones de alginato fue  $t = 168.778 \pm 0.016 \text{ s}$ , siendo menor o mayor en función de la concentración (mayor concentración, mayor tiempo de caída y desviación estándar). Por otro lado, el tiempo de caída para la disolución de NaCl fue  $t_0 = 93.98 \pm 0.00 \text{ s}$ . Los tiempos de caída medios, junto con las constantes de calibrado del viscosímetro y la densidad de la disoluciones medidas en el densímetro DMA 5000 M, se utilizaron en la ec. 3.14 para calcular las viscosidades de las diferentes disoluciones proporcionadas por el viscosímetro capilar. Todas las disoluciones introducidas en ambos viscosímetros fueron filtradas utilizando filtros Millipore de tamaño de poro  $0.22 \mu\text{m}$ . Los valores de viscosidad obtenidos se encuentran recogidos en la Tabla 3.3 mencionada anteriormente.

Como se aprecia, los valores de viscosidad obtenidos mediante los dos instrumentos son muy parecidos. En todos los casos la diferencia relativa (en valor absoluto) es inferior al 2%, tendiendo a ser mayor a las concentraciones más altas. Así, para

$c_{alginato}$ (g/cm <sup>3</sup> )	$\eta$ (mPa·s) Capilar	$\eta$ (mPa·s) Lovis
0.0004	1.173	1.170
0.0006	1.307	1.305
0.00075	1.435	1.443
0.001	1.642	1.658
0.0012	1.818	1.828
0.0015	2.124	2.157

Tabla 3.3: Viscosidad de disoluciones de alginato sódico suministrado por Sigma-Aldrich (referencia A2033, M/G=1.56).

$c_{alginato}=0.0004$  g/cm<sup>3</sup>, esa diferencia es del 0.2%, sin embargo para  $c_{alginato}=0.0015$  g/cm<sup>3</sup>, la diferencia relativa alcanza el 1.6%.

Un aspecto muy importante en disoluciones macromoleculares es la determinación de la viscosidad intrínseca,  $[\eta]$ , por lo que es pertinente comprobar si la viscosidad intrínseca determinada mediante ambos viscosímetros es comparable. Para ello, como ya se ha comentado con anterioridad, primero hay que determinar las viscosidades,  $\eta$ , de una serie de disoluciones de diferente concentración (siempre suficientemente diluida) que son las que muestra la Tabla 3.3, luego, a partir de ellas, calcular las correspondientes viscosidades relativas,  $\eta_r$  (ec. 1.13), y específicas,  $\eta_{sp}$  (ec. 1.14), y finalmente, mediante la representación frente a la concentración de funciones adecuadas de  $\eta_r$  y/o  $\eta_{sp}$ , obtener por extrapolación a concentración cero la viscosidad intrínseca. Nosotros hemos utilizado tres funciones bien establecidas para la determinación de  $[\eta]$ , que dan lugar a tres procedimientos: 1) el método de Huggins, ec. 3.2, 2) el método de Kraemer, ec. 3.8, y 3) el método de Solomon-Ciuta, ec. 3.9. Las representaciones de todas esas funciones, construidas tanto a partir de los datos procedentes del viscosímetro capilar como de los datos procedentes del viscosímetro de bola, así como los correspondientes ajustes, se muestran en la Figura 3.10.

Como se aprecia, y cabe esperar, todos los métodos (Huggins, Kraemer y Solomon-Ciuta) convergen (aproximadamente) a una ordenada en el origen común que es la viscosidad intrínseca del alginato con referencia A2033. Además, y esto es lo que se pretendía verificar, para cada método, los datos procedentes del viscosímetro de bola y los procedentes del viscosímetro capilar se superponen bastante bien. Es, de

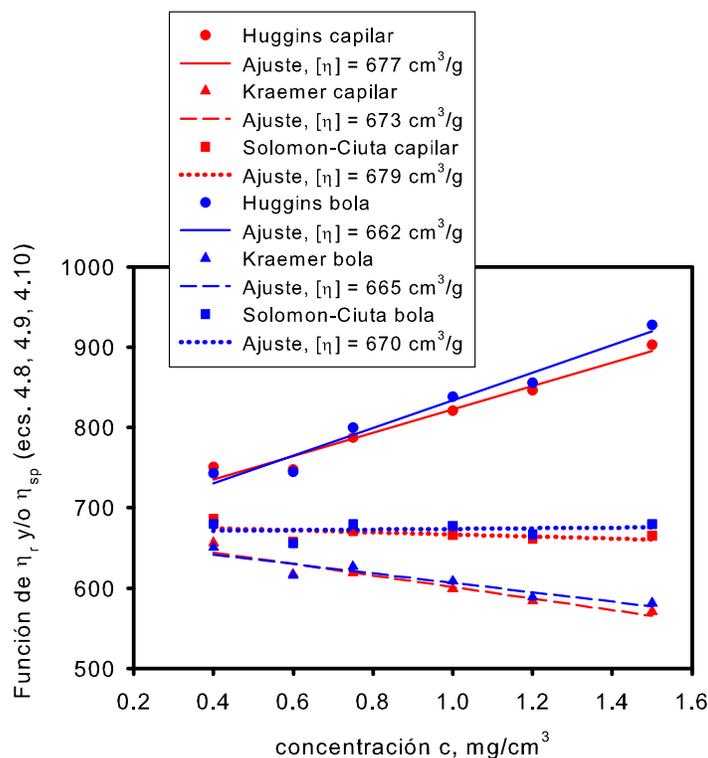


Figura 3.10: Representaciones de Huggins, Kraemer y Solomon-Ciuta para las disoluciones de alginato sódico A2033 medidas en ambos viscosímetros. La viscosidad intrínseca es la ordenada en el origen.

todos modos, interesante mencionar que para las concentraciones más elevadas los valores procedentes de las medidas con el viscosímetro de bola tienden a estar por encima de los valores procedentes del viscosímetro capilar (como también ocurría con los valores de la viscosidad de la Tabla 3.3). También cabe mencionar que los resultados pueden diferir ligeramente si para el cálculo de la viscosidad relativa a partir de los tiempos de caída en el viscosímetro capilar se utiliza el método riguroso (que tiene en cuenta la densidad de la disolución y las constantes de calibrado) o el método simplificado (que no tiene en cuenta los parámetros anteriores:  $\eta_r = t/t_0$ ). En cualquier caso, la viscosidad intrínseca obtenida por los diferentes procedimientos es muy parecida, siendo la diferencia relativa entre ellos inferior al 3%, por lo que se puede utilizar su promedio,  $[\eta] = 671 \text{ cm}^3/\text{g}$ , como valor característico de la muestra de alginato utilizada.

El método de Solomon-Ciuta es en la práctica, y si la disolución se comporta de forma adecuada, un método de punto único, es decir, su utilización permite llevar a cabo la determinación de la viscosidad intrínseca a partir de la viscosidad de la disolución medida a una única concentración. De hecho, como se aprecia en la Figura 3.10, las rectas correspondientes al método de Solomon-Ciuta tienen pendiente prácticamente cero, lo que significa que es indiferente el punto que se utilice para medir la viscosidad intrínseca (no hay que realizar ninguna extrapolación a concentración cero). Esto es una ventaja tanto por la rapidez de la medida como por la imposibilidad que existe, en ocasiones, de poder preparar varias disoluciones. Si además, como se ha comprobado, es indiferente utilizar el viscosímetro de bola o el viscosímetro capilar, la ventaja es doble, pues la medida en el viscosímetro de bola es más sencilla, rápida, directa y necesita mucha menos muestra.

Nuestro programa VISFIT [32, 33], mencionado con anterioridad, permite llevar a cabo un ajuste y extrapolación conjunta de los puntos experimentales correspondientes a los métodos de Huggins y Kraemer para obtener un valor único de la viscosidad intrínseca. Dicho programa está diseñado para trabajar con los parámetros experimentales que se controlan cuando se utiliza el procedimiento de dilución en el viscosímetro capilar (es decir, los volúmenes de disolvente añadidos). Aunque en nuestro estudio no hemos utilizado el procedimiento de dilución, se puede calcular el volumen de disolvente que habría que haber añadido para obtener la siguiente concentración de trabajo y utilizar dicho dato en VISFIT. El valor de  $[\eta]$  obtenido al aplicar dicha metodología es  $[\eta] = 671.56 \text{ cm}^3/\text{g}$ , prácticamente idéntico al promedio calculado anteriormente. Por otro lado, cabe comentar que la suma de las constantes de Huggins y Kraemer es  $K_H + K_K = 0.495$ , prácticamente igual al valor teórico 0.5 mencionado en la sección “Viscosidad de disoluciones”, siendo  $K_H = 0.344$ , próximo al valor  $1/3$  que, como se indicó en dicha sección, garantiza la fiabilidad del método de Solomon-Ciuta de punto único (circunstancia verificada en la Figura 3.10 donde la pendiente de las rectas de Solomon-Ciuta es prácticamente cero). Además de la doble extrapolación de Huggins y Kraemer, VISFIT también permite realizar la determinación de la viscosidad intrínseca mediante el método de Solomon-Ciuta de punto único para lo cual es preciso elegir una cualquiera de las concentraciones utilizadas. De nuevo, el programa está diseñado para trabajar con datos procedentes del viscosímetro capilar (constantes de calibrado, tiempo de caída...), pero no con

los datos proporcionados por el viscosímetro de bola. En este sentido, cualquier tiempo de caída de cualquiera de las disoluciones utilizadas debe proporcionar un valor similar de la viscosidad intrínseca, como pone de manifiesto la Figura 3.10 en consonancia con el hecho de que  $K_H$  sea próximo a  $1/3$ . En concreto, la disolución de mayor concentración,  $c_{\text{alginato}}=0.0015$  g/cm<sup>3</sup>, da  $[\eta] = 669.5$  cm<sup>3</sup>/g, y la de menor concentración,  $c_{\text{alginato}}=0.0004$  g/cm<sup>3</sup>, da  $[\eta] = 683.6$  cm<sup>3</sup>/g. El programa también permite introducir un valor estimado de  $K_H$  con el que corregir (mejorar) el valor de  $[\eta]$  obtenido mediante punto único. Si utilizamos como estimación para  $K_H$  el valor determinado previamente,  $K_H = 0.344$ , se obtiene  $[\eta] = 674.9$  cm<sup>3</sup>/g (para  $c_{\text{alginato}}=0.0015$  g/cm<sup>3</sup>) y  $[\eta] = 683.1$  cm<sup>3</sup>/g (para  $c_{\text{alginato}}=0.0004$  g/cm<sup>3</sup>), ligeramente más próximos al valor obtenido mediante el procedimiento conjunto de Huggins y Kraemer. Como se observa, todos los valores, independientemente del método utilizado (extrapolación o punto único) son muy semejantes, siendo la diferencia relativa entre ellos inferior al 3%, lo que está dentro del error experimental típico.

Por último cabe mencionar que el valor de viscosidad intrínseca del alginato sódico A2033 a fuerza iónica infinita determinado en un trabajo anterior fue  $[\eta] = 670 \pm 20$  cm<sup>3</sup>/g [42], valor perfectamente comparable con cualquiera de los valores encontrados en esta Tesis mediante distintos procedimientos. Esto confirma la bondad de nuestros resultados y que 0.1 M puede considerarse fuerza iónica infinita.

En cuanto a la evaluación comparativa de los dos instrumentos, concluimos que la desventaja del viscosímetro de bola Lovis frente al Ubbelohde de no poderse hacer diluciones *in situ* es intrascendente ya que permite determinaciones muy precisas de la viscosidad,  $\eta$ , que permiten una alta precisión en la viscosidad específica, lo cual posibilita medir a una sola concentración y utilizar el método de punto único de Solomon-Ciuta, ec. 3.9.



# Capítulo 4

## Reología

Una parte de esta Tesis está dedicada al estudio de las propiedades de disoluciones en flujo de cizalla, tema perteneciente al ámbito de la Reología, término acuñado por el químico norteamericano Bingham en 1926 para denominar a la ciencia que estudia la deformación de materiales sometidos a esfuerzos externos. Una deformación continua del material a lo largo del tiempo es un flujo del material y el material que experimenta esa deformación continua es un fluido. Por brevedad, no podemos pormenorizar los aspectos de esta disciplina que el lector puede encontrar en monografías especializadas [43, 44]. La denominación en castellano de los términos reológicos es, a veces, ambigua, pues en ocasiones se traducen de forma distinta palabras tomadas de otros idiomas. Por ello, el Grupo de Reología de las Reales Sociedades Españolas de Química y Física propuso una terminología [45] que procuraremos seguir en esta Tesis.

### 4.1. Conceptos teóricos

Supongamos una porción de fluido en el que unas partes se mueven en relación a otras, es decir, el fluido experimenta un flujo. Al cabo de un determinado período de tiempo, y como consecuencia de dicho movimiento, dos puntos próximos dentro de esa porción de fluido habrán sufrido un desplazamiento relativo y el vector que los une habrá cambiado. Se dice, entonces, que la porción de fluido ha sufrido una deformación. Cuando la deformación ocurre de tal manera que el fluido se puede considerar formado por láminas o capas paralelas, el flujo que tiene lugar se denomina laminar. Un caso particular es el flujo de cizalla simple representado en la Figura 3.1 del capítulo anterior, en el que capas de fluido

se desplazan con velocidades que varían de forma lineal con la separación de las mismas. Entre láminas contiguas de un fluido que experimenta un flujo de cizalla se originan fuerzas de rozamiento que se oponen al desplazamiento relativo de las láminas. Aparece así una resistencia a fluir que puede ser cuantificada mediante el coeficiente de viscosidad,  $\eta$ , definido en el capítulo anterior. Debido a ello, será necesario aplicar continuamente una fuerza sobre el fluido para mantenerlo fluyendo en régimen estacionario, es decir sometido a una deformación continua. La fuerza aplicada por unidad de superficie del fluido es lo que se denomina esfuerzo,  $\tau$ , y la variación de la deformación del fluido con el tiempo es la velocidad de deformación o, lo que es equivalente, el gradiente de velocidad. Todas las magnitudes mencionadas (deformación, esfuerzo, gradiente) son, en rigor, tensores que definen cómo cambia el vector que une dos elementos del fluido cuando éste está sometido a un flujo. Sin embargo, por simplicidad, y puesto que es suficiente para analizar y entender el tipo de experimentos reológicos que se van a realizar en esta Tesis, donde solo va a estar presente el flujo de cizalla simple, vamos a tratarlas como magnitudes escalares. La deformación que experimenta el fluido en cada instante en un flujo de cizalla se denota por  $\gamma$ , por lo que la velocidad de deformación, es decir la derivada de la deformación respecto al tiempo, se denota por  $\dot{\gamma}$ . Se puede demostrar que velocidad de deformación es equivalente a la variación de la velocidad de un elemento del fluido con la posición o gradiente de velocidad. En caso de un flujo de cizalla, podemos escribir, siguiendo la nomenclatura del capítulo anterior,  $\dot{\gamma} = d\gamma/dt = dv_x/dy$ , por lo que se pueden emplear indistintamente los términos velocidad de deformación de cizalla y gradiente de velocidad de cizalla que abreviaremos por gradiente de cizalla.

Es de gran interés, y éste es uno de los objetivos de la reología, encontrar relaciones entre el esfuerzo aplicado y la velocidad de deformación o gradiente de velocidad conseguido. Estas relaciones matemáticas se denominan ecuaciones constitutivas o ecuaciones reológicas de estado. En muchas ocasiones se obtienen de forma empírica, aunque también se pueden deducir a partir de consideraciones teóricas, tanto microscópicas (teniendo en cuenta la estructura molecular del fluido) como macroscópicas (considerando el fluido como un medio continuo). Puesto que distintos fluidos se pueden comportar de manera muy diferente bajo la aplicación de un flujo, existe una gran diversidad de ecuaciones constitutivas que definen una serie de modelos reológicos que intentan capturar el comportamiento real del fluido.

La ecuación constitutiva más sencilla es la ley de Newton de la viscosidad, definida en el capítulo anterior (ecuación 3.3). Dicha ecuación establece una relación lineal entre esfuerzo

de cizalla y gradiente de cizalla y caracteriza un comportamiento ideal del fluido. Como ya se expuso en dicho capítulo, el tipo de fluido que la cumple se denomina fluido newtoniano. El fluido newtoniano es, por tanto, el modelo reológico de fluido ideal. Asumiendo que los experimentos reológicos se realizan a temperatura y presión constantes, un fluido newtoniano en flujo de cizalla debe cumplir las siguientes características:

1. El único esfuerzo relacionado con la deformación del fluido es el denominado esfuerzo de cizalla o cortante. Esto significa que las fuerzas que aparecen en el proceso de deformación son tangentes a las láminas móviles del fluido, no existiendo componentes de las fuerzas normales a dichas superficies. Puesto que, por definición,  $x$  es la dirección del flujo e  $y$  la del gradiente, el esfuerzo de cizalla es la componente  $xy$  del tensor de esfuerzo (que es igual a la componente  $yx$  por simetría de este tensor). Para ser rigurosos en la nomenclatura, denominaremos al esfuerzo de cizalla como  $\tau_{xy}$ .
2. La viscosidad no varía con el gradiente de cizalla.
3. La viscosidad no varía durante el experimento.
4. Cuando cesa el flujo desaparece inmediatamente el esfuerzo generado o, lo que es igual, en cuanto cesa el esfuerzo, desaparece el flujo (permaneciendo la deformación). En caso de un posterior cizallamiento, la viscosidad es la misma que la medida previamente.
5. Para completar las características de los fluidos newtonianos también mencionaremos que los distintos tipos de viscosidad, correspondientes a distintos tipos de deformación (cizalla, elongacional...), están siempre en una proporción sencilla entre sí (por ejemplo la viscosidad en elongación uniaxial es tres veces la viscosidad en cizalla simple).

Cualquier fluido que no cumpla las condiciones anteriores es un fluido no newtoniano. La mayoría de fluidos son no newtonianos y se rigen por ecuaciones constitutivas no lineales. En realidad, es más correcto hablar de comportamiento newtoniano y no newtoniano, ya que un mismo fluido puede regirse por distintas leyes según las condiciones experimentales. Existen muchos tipos de comportamiento no newtoniano en función de cómo dependa la viscosidad con el gradiente de cizalla [43, 44]. Esos diferentes tipos de

comportamiento aparecen muy bien reflejados en las representaciones denominadas “curvas de fluidez” y “curvas de viscosidad”, siendo ambas representaciones equivalentes. En las primeras se representa el esfuerzo de cizalla frente al gradiente de cizalla ( $\tau_{xy}$  vs.  $\dot{\gamma}$ ) mientras que en las segundas se representa la viscosidad en función del gradiente de cizalla ( $\eta$  vs.  $\dot{\gamma}$ ). A continuación vamos a comentar los diversos tipos en los que tradicionalmente se ha clasificado el comportamiento no newtoniano, a mostrar sus curvas de fluidez y viscosidad características, y a exponer una serie de modelos reológicos y ecuaciones constitutivas que son de gran utilidad para describir algunos comportamientos no newtonianos típicos.

En primera instancia, se pueden diferenciar dos grandes clases de comportamiento no newtoniano: dependiente del tiempo e independiente del tiempo, según que el cambio en la viscosidad del fluido se produzca o no como consecuencia de la duración del experimento. Así, en la primera clase, la viscosidad varía a lo largo del tiempo durante el cual está siendo deformado el fluido (aunque la velocidad de deformación se mantenga constante). En cambio, en la segunda clase, la viscosidad no varía con el tiempo de deformación, es decir, la viscosidad se mantiene constante mientras lo haga la velocidad de deformación, cambiando solo cuando ésta también lo hace. A su vez, dentro de cada una de esas dos grandes clases de comportamiento, se pueden diferenciar varios tipos según sea la relación existente entre esfuerzo y velocidad de deformación (gradiente de cizalla), tal y como ilustran las curvas de fluidez representadas en la Figura 4.1. Cada curva de fluidez tiene una equivalente curva de viscosidad cuya forma depende del tipo de comportamiento del fluido. La Figura 4.2 muestra las formas típicas para dos de los comportamientos no newtonianos más comunes. La siguiente clasificación presenta de forma organizada los diversos comportamientos no newtonianos de los fluidos viscosos junto con una breve descripción de los mismos.

### **Tipos de comportamiento no newtoniano:**

**1. Independiente del tiempo:** para un determinado esfuerzo (o gradiente), la viscosidad no varía durante el tiempo de aplicación del mismo. Además, si se realiza un experimento de “doble barrido” en el que primero se aumenta el gradiente (o el esfuerzo) hasta un determinado valor y luego se disminuye hasta el reposo, las curvas de fluidez correspondientes a ambos barridos se superponen, es decir, no se observa el fenómeno de histéresis (ver Figura 4.1A).

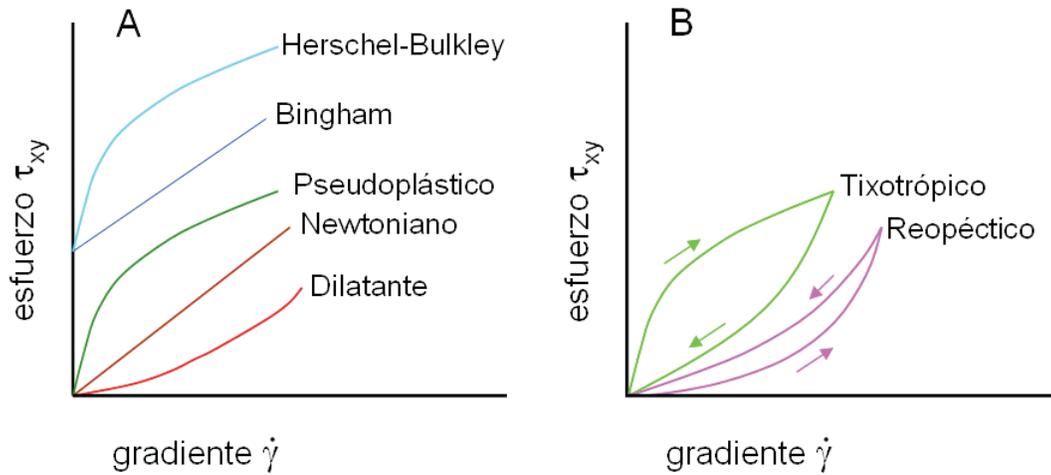


Figura 4.1: Curvas típicas de fluidez: (A) comportamiento independiente del tiempo; (B) comportamiento dependiente del tiempo.

**1.1. Sin esfuerzo umbral:** el fluido no requiere que el esfuerzo aplicado alcance un valor determinado distinto de cero para comenzar a fluir.

- **Pseudoplástico o fluidizante:** la fluidez del líquido aumenta, o lo que es lo mismo, su viscosidad disminuye, al aumentar el gradiente de cizalla al que es sometido. Es el caso más frecuente, y aparece en la mayoría de disoluciones de macromoléculas. La disminución de la viscosidad con el gradiente de cizalla se denomina “aclaramiento por cizalla” (*shear-thinning* en inglés). Es habitual que los fluidos con este comportamiento presenten, a gradiente de cizalla suficientemente bajo, un valor máximo de viscosidad que se mantiene constante al disminuir el gradiente (que denotaremos por  $\eta_0$ ) y, a gradiente de cizalla muy elevado, un valor mínimo de viscosidad que se mantiene constante al aumentar el gradiente (que denotaremos por  $\eta_\infty$ ). A estas dos regiones con viscosidad constante se las denomina regiones o “mesetas” newtonianas inferior y superior respectivamente (inferior y superior, así como los subíndices empleados para  $\eta$  anteriormente, hacen referencia al valor del gradiente no de la viscosidad). También se las denomina primera y segunda región newtoniana. Al valor de la viscosidad en la meseta inferior se le llama, por razones obvias, viscosidad a cizalla cero (*zero-shear viscosity* en inglés) y debe ser coincidente con la viscosidad medida en los viscosímetros descritos en el capítulo anterior donde ya

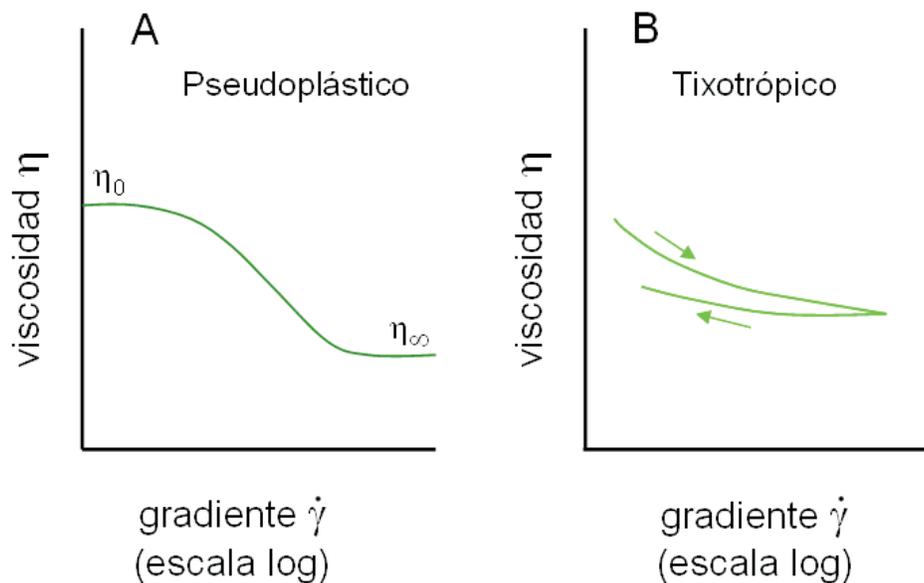


Figura 4.2: Curvas típicas de viscosidad: (A) comportamiento pseudoplástico o fluidizante; (B) comportamiento tixotrópico.

se anticipó que muchos fluidos no newtonianos se comportan como newtonianos a valores bajos del gradiente de cizalla. Su curva de viscosidad típica se muestra en la Figura 4.2A.

- **Dilatante:** la fluidez del líquido disminuye, o lo que es lo mismo, su viscosidad aumenta, al aumentar el gradiente de cizalla al que es sometido. Es menos usual que el comportamiento fluidizante y suele aparecer en suspensiones concentradas como la que se prepara con harina de maíz o el cemento. El aumento de la viscosidad con el gradiente de cizalla se denomina “espesamiento por cizalla” (*shear thickening* en inglés).

**1.2. Con esfuerzo umbral:** el fluido requiere de un esfuerzo mínimo o esfuerzo umbral para comenzar a fluir, lo que significa que su viscosidad a gradiente de cizalla nulo es infinita. Esto es lo mismo que decir que el fluido se comporta como un sólido si el esfuerzo es inferior a un determinado valor y como líquido si es superior a ese valor.

- **Plástico “ideal” (de Bingham):** una vez que el fluido comienza a fluir, la viscosidad se mantiene constante. Podríamos calificarlo de un comportamiento newtoniano con esfuerzo umbral.

- **Plástico “real” (Herschel-Bulkley):** una vez que el fluido comienza a fluir, la viscosidad disminuye con el gradiente de cizalla. Podríamos calificarlo de un comportamiento pseudoplástico o fluidizante con esfuerzo umbral.

**2. Dependiente del tiempo:** para un determinado esfuerzo (o gradiente), la viscosidad varía durante el tiempo de aplicación del mismo. Además, si se realiza un experimento de “doble barrido” en el que primero se aumenta el gradiente (o el esfuerzo) hasta un determinado valor y luego se disminuye hasta el reposo, las curvas de fluidez correspondientes a ambos barridos no se superponen, es decir, los fluidos con este tipo de comportamiento presentan histéresis, tal y como se pone de manifiesto en la Figura 4.1B.

- **Tixotrópico:** la viscosidad disminuye con el tiempo de aplicación del esfuerzo (o gradiente) de cizalla. Además, la viscosidad también disminuye con el aumento del gradiente de cizalla, pero si, en un determinado instante, comienza a disminuir el gradiente, la viscosidad aumenta adoptando valores inferiores a los anteriores, por lo que en la curva de fluidez se aprecia un ciclo de histéresis. Se podría calificar de un pseudoplástico con histéresis. Su curva de viscosidad típica se muestra en la Figura 4.2B.
- **Reopéctico o anti-tixotrópico:** la viscosidad aumenta con el tiempo de aplicación del esfuerzo (o gradiente) de cizalla. Además, la viscosidad también aumenta con el gradiente de cizalla, pero si, en un determinado instante, comienza a disminuir el gradiente, la viscosidad disminuye adoptando valores superiores a los anteriores, por lo que en la curva de fluidez se aprecia un ciclo de histéresis inverso al anterior. Se podría calificar de un dilatante con histéresis.

#### 4.1.1. Modelos reológicos para fluidos no newtonianos

A continuación comentaremos algunos de los modelos reológicos más representativos utilizados para describir el comportamiento independiente del tiempo de fluidos no newtonianos, es decir, mostraremos una serie de ecuaciones que pretenden ajustar las curvas de fluidez y viscosidad procedentes de experimentos donde el fluido se somete a un barrido simple de gradiente de cizalla. Para una mayor claridad expositiva, organizaremos estas ecuaciones en dos grupos: 1) ecuaciones basadas en el esfuerzo, que ajustan las curvas de fluidez y son las propiamente denominadas ecuaciones constitutivas, y 2) ecuaciones basadas en la viscosidad, que ajustan las curvas de viscosidad. Para cada ecuación basada

en la viscosidad existe una ecuación equivalente basada en el esfuerzo de modo que todo modelo reológico lleva asociado ambos tipos de ecuaciones. Sin embargo, las ecuaciones basadas en la viscosidad poseen mayor relevancia práctica. De hecho, los modelos más sofisticados se suelen caracterizar a través de sus ecuaciones de viscosidad. Por este motivo, hemos incluido más modelos en el apartado dedicado a ecuaciones de viscosidad que en el dedicado a ecuaciones de esfuerzo.

#### 4.1.1.a. Ecuaciones basadas en esfuerzo

Una ecuación constitutiva (o ecuación de esfuerzo) muy sencilla que describe bastante bien muchos comportamientos reológicos independientes del tiempo sin esfuerzo umbral, es decir pseudoplástico y dilatante, y que incluye al comportamiento newtoniano, es la **ecuación de Ostwald o ley de potencia**:

$$\tau_{xy} = K\dot{\gamma}^n, \quad (4.1)$$

que escrita en una forma análoga a la ley de Newton de la viscosidad, queda

$$\tau_{xy} = K\dot{\gamma}^{n-1}\dot{\gamma}, \quad (4.2)$$

donde  $K$  y  $n$  son parámetros empíricos:  $K$  es el índice de consistencia (con unidades  $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$  en el S.I.) y  $n$  es el índice de comportamiento de flujo (o índice de Ostwald) cuyo valor, adimensional, depende del comportamiento reológico del fluido. Así,  $n = 1$  corresponde al comportamiento newtoniano (en cuyo caso  $\eta = K$ ),  $n < 1$  describe un comportamiento pseudoplástico o fluidizante y  $n > 1$  un comportamiento dilatante. Cuanto más alejado esté el valor de  $n$  de la unidad, mayor será la diferencia respecto al comportamiento newtoniano. Una limitación importante de la ley de potencia de Ostwald es que es aplicable en un rango limitado (usualmente intermedio) de gradientes de cizalla.

En caso de que exista un esfuerzo umbral,  $\tau_{xy,0}$ , las ecuaciones constitutivas han de incluirlo en su formulación. Así, la ecuación constitutiva para el esfuerzo correspondientes al **modelo de Bingham** para plásticos ideales es:

$$\tau_{xy} = \tau_{xy,0} + \eta_p\dot{\gamma}, \quad (4.3)$$

donde  $\eta_p$  es la denominada viscosidad plástica que es constante. Para plásticos reales, se puede escribir una ecuación generalizada de Bingham o **ecuación de Herschel-Bulkley** que combina la ley de potencia de Ostwald y la ley de Bingham,

$$\tau_{xy} = \tau_{xy,0} + A\dot{\gamma}^n, \quad (4.4)$$

donde  $A$  y  $n$  son parámetros empíricos análogos a  $K$  y  $n$  del modelo de Ostwald (ecuación 4.1).

#### 4.1.1.b. Ecuaciones basadas en viscosidad

Un modelo bastante general, válido para rangos muy amplios del gradiente (capaz de ajustar la curva de viscosidad allí donde no se cumple la ley de potencia de Ostwald) y, sin embargo, bastante simple (solo cuatro parámetros), es el **modelo o ecuación de Cross** [43]:

$$\frac{\eta - \eta_\infty}{\eta_0 - \eta_\infty} = \frac{1}{1 + (K'\dot{\gamma})^m}, \quad (4.5)$$

o, lo que es equivalente,

$$\frac{\eta_0 - \eta}{\eta - \eta_\infty} = (K'\dot{\gamma})^m, \quad (4.6)$$

donde  $\eta_0$  y  $\eta_\infty$  son los valores asintóticos de la viscosidad a muy bajo y muy elevado gradiente de cizalla, respectivamente, y  $K'$  y  $m$  son dos constantes empíricas, la primera con dimensiones de tiempo ( $s^m$  en el S.I.) y la segunda sin dimensiones.

Muchos modelos reológicos son casos particulares del de Cross de modo que sus ecuaciones de viscosidad se deducen a partir de las ecuaciones 4.5 o 4.6 tras realizar ciertas consideraciones sobre los valores de sus parámetros [43]. Por ejemplo, si la viscosidad  $\eta$  se mide en una región intermedia de gradiente de cizalla de tal forma que  $\eta_\infty \ll \eta \ll \eta_0$ , tenemos

$$\eta = \frac{\eta_0}{(K'\dot{\gamma})^m}, \quad (4.7)$$

que, redefiniendo los parámetros, podemos reescribir como

$$\eta = K\dot{\gamma}^{n-1}, \quad (4.8)$$

que es la anteriormente mencionada **ley de potencia de Ostwald** escrita en base a la viscosidad en lugar de en base al esfuerzo. De hecho, la ecuación 4.8 se desprende fácilmente de la ecuación 4.2, si consideramos que el término  $K\dot{\gamma}^{n-1}$  de dicha ecuación es análogo a la viscosidad en la ley de Newton,  $\eta$ , solo que ahora no es una viscosidad

constante, si no que depende del gradiente. Como ya se ha mencionado,  $n = 1 - m$  es el índice de Ostwald y  $K = \eta_0/K'^m$  es la consistencia.

Para materiales con un elevado valor de  $\eta_0$  de modo que se pueda asumir  $\eta \ll \eta_0$ , la ecuación de Cross (4.5 o 4.6) se transforma en

$$\eta = \eta_\infty + \frac{\eta_0}{(K'\dot{\gamma})^m}, \quad (4.9)$$

que puede ser reescrita en forma del **modelo o ecuación de Sisko** [46],

$$\eta = \eta_\infty + K\dot{\gamma}^{n-1}. \quad (4.10)$$

$K$  y  $n$  son índices análogos a los de la ecuación de Ostwald, teniendo el primero unidades de  $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$  en el S.I. y siendo el segundo adimensional. Haciendo  $n = 0$  en la ecuación de Sisko 4.10 y redefiniendo adecuadamente sus parámetros, se obtiene el **modelo de Bingham**, definido anteriormente por la ecuación 4.3 que, escrita en forma explícita de la viscosidad queda

$$\eta = \frac{\tau_{xy,0}}{\dot{\gamma}} + \eta_p. \quad (4.11)$$

Del mismo modo, el anteriormente mencionado **modelo de Herschel-Bulkley**, definido por la ecuación 4.4, se puede escribir en forma explícita de la viscosidad como

$$\eta = \frac{\tau_{xy,0}}{\dot{\gamma}} + A\dot{\gamma}^{n-1}, \quad (4.12)$$

Como se acaba de poner de manifiesto, el modelo de Cross incluye un gran número de modelos más simples. Una alternativa bastante popular al modelo de Cross y muy similar a éste es el **modelo de Carreau**:

$$\frac{\eta - \eta_\infty}{\eta_0 - \eta_\infty} = \frac{1}{\left(1 + (K''\dot{\gamma})^2\right)^{m_2/2}}, \quad (4.13)$$

donde  $K''$  y  $m_2$  tienen un significado parecido a los anteriores  $K'$  y  $m$ .

Por último mencionar que existen otros modelos, que no vamos a tratar aquí, que sirven para describir el comportamiento de fluidos complejos con esfuerzo umbral (como el modelo de Casson que se aplica a la sangre y otros fluidos biológicos).

### 4.1.2. Viscoelasticidad

Finalmente, cabe dedicar unas palabras al concepto de viscoelasticidad, aunque no se haga un tratamiento en profundidad del mismo porque los experimentos llevados a cabo en esta Tesis no han estado orientados a caracterizar este fenómeno. En primer lugar es preciso aclarar que la anterior clasificación sobre el comportamiento no newtoniano, así como las ecuaciones constitutivas mencionadas hasta ahora, asumen que los fluidos son puramente viscosos, sin atender a su posible componente elástica. Esto significa que: i) cuando se aplica un esfuerzo constante (aunque algunos casos requieran un valor mínimo de éste), el fluido experimenta desde el instante inicial una deformación continua o flujo, y ii) cuando cesa el proceso de deformación, es decir deja de aplicarse el esfuerzo, el fluido permanece deformado, no recuperando ni total ni parcialmente la forma inicial. Pero esto, en general, no es así para todos los materiales capaces de fluir, pudiéndose definir lo que sería una nueva clase de comportamiento no newtoniano (al margen de la dependencia o no con el tiempo) que denominamos viscoelástico para indicar la existencia simultánea de propiedades viscosas y elásticas en el material.

Comencemos por definir lo que se entiende por comportamientos sólido y líquido ante una deformación. Un sólido ideal es aquel que cumple la ley de Hooke de la elasticidad: al aplicar un esfuerzo, el material adquiere una deformación “instantánea” proporcional al esfuerzo, la cual permanece mientras permanece el esfuerzo y desaparece cuando desaparece el esfuerzo, recuperando totalmente el sólido la forma original. Un líquido o fluido ideal es aquel que cumple la ley de Newton de la viscosidad: al aplicar un esfuerzo, el material adquiere una velocidad de deformación instantánea proporcional al esfuerzo, la cual permanece mientras permanece el esfuerzo, es decir, el material experimenta una deformación continua en el tiempo, y desaparece cuando desaparece el esfuerzo, no recuperando el fluido la forma original (ni ninguna forma intermedia). Pero hay materiales que, al aplicarles un esfuerzo, fluyen de forma inmediata y cuando cesa el esfuerzo recuperan parcialmente su forma (muchas disoluciones de polímero y polímeros fundidos se comportan de esta manera), hay otros que sufren una deformación instantánea y comienzan a fluir para luego recuperar totalmente su forma tras el cese del esfuerzo (por ejemplo los hilos de seda), y así sucesivamente. A estos materiales cuyo comportamiento es híbrido entre el sólido elástico y el líquido viscoso se los denomina viscoelásticos. En realidad, para ser precisos, todo material puede considerarse en cierto modo viscoelástico ya que el tipo de respuesta del material al agente deformante depende de la relación entre la escala de

tiempo característica de dicho agente (escala de tiempo impuesta por el experimento) y la escala de tiempo característica del material (lo que se denomina tiempo de relajación o de respuesta del material) [43, 44]. Así, si el experimento es lento en relación al tiempo de relajación del material, el comportamiento viscoso es más aparente que el elástico, mientras que cuando ocurre lo contrario, el comportamiento elástico es más acusado.

Existen diferentes modelos para representar diferentes tipos de comportamiento viscoelástico, cada uno de los cuales da lugar a una ecuación constitutiva y a una serie de parámetros característicos. El modelo original y más simple es el de Maxwell [43, 44], aplicable a materiales que desde el punto de vista de la viscosidad se comportan como newtonianos, y en lo referente a su elasticidad siguen la ley de Hooke. Por no ser relevantes para esta Tesis, no vamos a describir ningún modelo en particular. Simplemente mencionar los dos parámetros más representativos de un material viscoelástico: el módulo elástico o de almacenamiento,  $G'$ , que caracteriza la componente o respuesta elástica, y el módulo viscoso o de pérdida  $G''$  que caracteriza la componente o respuesta viscosa. La determinación de ambos parámetros es una tarea habitual en reología.

## 4.2. RheoFit: programa para el ajuste de curvas de viscosidad

En esta Tesis hemos construido el programa `RheoFit` que permite ajustar curvas de viscosidad experimentales tanto al modelo general de Cross (ecuación 4.5) como a dos de sus formas más simples como son el modelo de Ostwald (ecuación 4.8) y el modelo de Sisko (ecuación 4.10). Aunque muchos reómetros, entre ellos el empleado en esta Tesis, disponen de un *software* capaz de ajustar datos experimentales a modelos reológicos, hemos considerado de interés desarrollar un programa sencillo que realice el ajuste a tres modelos muy comunes de modo que pueda ser aplicado a amplios conjuntos de datos experimentales independientemente de la instrumentación utilizada.

El ajuste de datos experimentales a los modelos reológicos mencionados anteriormente involucra un procedimiento de mínimos cuadrados no lineal. Aunque los parámetros  $K$  y  $m$  del modelo de Ostwald (ecuación 4.8) se podrían estimar mediante un ajuste lineal de  $\eta$  frente a  $\dot{\gamma}$  en una representación log-log, para el propósito de nuestro programa es preferible ajustar los valores primarios de  $\eta$  y  $\dot{\gamma}$  a una ecuación general de tipo Cross, como se verá más adelante. El ajuste de mínimos cuadrados no lineal se lleva a cabo utilizando el

método de Marquardt [47] implementado en la subrutina `mrqmin` de *Numerical Recipes* [24] cuyo objetivo es la determinación del conjunto óptimo de parámetros,  $a_k$ , que forman parte de una función de una variable del tipo

$$y \equiv y(x; a_1, a_2, \dots). \quad (4.14)$$

La subrutina `mrqmin` permite que cualquiera de los parámetros  $a_k$  pueda ser fijo o ajustado durante el proceso de minimización. Por tanto, un primer paso es definir de forma explícita la función de una variable ( $\eta$  en función de  $\dot{\gamma}$ ) con la que se desea trabajar. Para ello, la ecuación de Cross 4.5 se reescribe, en primera instancia, como

$$\eta = \eta_\infty + (\eta_0 - \eta_\infty)[1 + (K'\dot{\gamma})^m]^{-1}. \quad (4.15)$$

Para el propósito de nuestro programa, que contempla conjuntamente tanto el caso más general de Cross como los casos particulares de Ostwald y Sisko, la ecuación 4.15 se reescribe como la siguiente función de  $\dot{\gamma}$  y los parámetros  $a_k$ ,  $k = 1..5$ ,

$$\eta = a_3 + (a_4 - a_3)[a_5 + (a_1\dot{\gamma})^{a_2}]^{-1}, \quad (4.16)$$

donde la equivalencia entre los parámetros  $a_k$  y los parámetros del modelo de Cross es:  $a_1 \equiv K'$ ,  $a_2 \equiv m$ ,  $a_3 \equiv \eta_\infty$ ,  $a_4 \equiv \eta_0$ , y  $a_5 = 1$  (por conveniencia, en el término  $1 + \dots$ , 1 se representa como  $a_5$ ).

Los diferentes casos particulares de la ecuación de Cross se pueden entonces representar mediante una asignación apropiada de los parámetros. Así, el modelo de Sisko corresponde a la asignación  $a_5 = 0$  y  $a_4 - a_3 = H$ , con  $a_4 \equiv \eta_0 = H - a_3 = H - \eta_\infty$ , donde  $H$  es un valor arbitrario suficientemente grande, mucho mayor que el mayor valor de viscosidad que aparece en los datos experimentales. De este modo, los valores de los parámetros en la ecuación 4.9 son  $\eta_\infty \equiv a_3$ ,  $n = 1 - m = 1 - a_2$ , y  $K = (\eta_0 - \eta_\infty)K'^{-m} = Ha_1^{-a_2}$ . A su vez, si particularizamos para el caso  $\eta_\infty \equiv a_3 = 0$ , obtenemos la ecuación de Ostwald 4.8 que tiene solo dos parámetros.

En resumen, la actual versión del programa `RheoFit` contempla el posible ajuste de datos experimentales a tres modelos reológicos: Cross, Sisko y Ostwald. Todos los ajustes se basan en la misma ecuación 4.16. El ajuste a un modelo determinado depende de la forma de utilizar y asignar los parámetros  $a_k$  tal y como se muestra a continuación:

- Modelo de Cross general:  $a_5 = 1$  fijo;  $a_1, a_2, a_3, a_4$  ajustables.

- Modelo de Sisko:  $a_5 = 0$  y  $a_4 = H - a_3$  fijos, donde  $H$  es un valor elevado de  $\eta$ , por ejemplo  $10^4 \eta_{max}$ , donde, a su vez,  $\eta_{max}$  es el mayor valor de viscosidad en el conjunto de datos;  $a_1, a_2, a_3$  ajustables.
- Modelo de Ostwald (ley de potencia):  $a_5 = 0, a_4 = H$  fijos como en el caso anterior, y, además  $a_3=0$  fijo;  $a_1, a_2$  ajustables.

Para que el programa inicie la búsqueda de los valores óptimos de los parámetros ajustables del modelo debe disponer de un conjunto de valores iniciales de esos parámetros con los cuales comenzar a trabajar. Dichos valores iniciales pueden ser suministrados por el usuario o estimados por el propio programa, siendo el único requisito que tengan sentido físico. Como resultado, el programa proporciona los valores óptimos de los parámetros del modelo empleado así como los valores de viscosidad calculados con ese modelo y las desviaciones respecto a los valores experimentales. El “modo automático” que permite la estimación de parámetros iniciales por parte del programa se basa en las siguientes ideas:

- Para el modelo general de Cross los valores mayor y menor del conjunto de datos de viscosidad se usan como valores iniciales para los parámetros  $\eta_0$  y  $\eta_\infty$ . Utilizando para el modelo de Cross la ecuación 4.6 y denominando, por simplicidad, al primer término como  $v$ , se obtiene:

$$v \equiv \frac{\eta_0 - \eta}{\eta - \eta_\infty} = (K' \dot{\gamma})^m. \quad (4.17)$$

Entonces, para dos parejas de datos experimentales,  $(\dot{\gamma}_a, \eta_a)$  y  $(\dot{\gamma}_b, \eta_b)$ , obtenemos las estimaciones

$$a_2 \equiv m = \frac{\ln(v_a/v_b)}{\ln(\dot{\gamma}_a/\dot{\gamma}_b)}, \quad a_1 \equiv K' = v_a^{1/m}/\dot{\gamma}_a = v_a^{1/a_2}/\dot{\gamma}_a. \quad (4.18)$$

- Procediendo de forma análoga, y siempre a partir de la ecuación general de Cross, para el modelo de Sisko obtenemos:

$$v \equiv \eta - \eta_\infty \quad n = 1 + \frac{\ln(v_a/v_b)}{\ln(\dot{\gamma}_a/\dot{\gamma}_b)}, \quad K = v_a/\dot{\gamma}_a^{n-1}. \quad (4.19)$$

- Y, del mismo modo, para el modelo de Ostwald (o ley de potencia) obtenemos:

$$v \equiv \eta \quad n = 1 + \frac{\ln(v_a/v_b)}{\ln(\dot{\gamma}_a/\dot{\gamma}_b)}, \quad K = v_a/\dot{\gamma}_a^{n-1}. \quad (4.20)$$

### 4.2.1. Apuntes sobre el procedimiento de Marquardt

El procedimiento de ajuste de Marquardt requiere derivar la función modelo respecto a sus parámetros. Las derivadas parciales de nuestra función modelo, definida por las ecuaciones 4.15 o 4.16, respecto a sus parámetros son las siguientes:

- Parámetro  $a_1 \equiv K'$

$$\frac{\partial \eta}{\partial K'} = -(\eta_0 - \eta_\infty)[1 + (K'\dot{\gamma})^m]^{-2} m \dot{\gamma} (K'\dot{\gamma})^{m-1} \quad (4.21)$$

$$\frac{\partial \eta}{\partial a_1} = -(a_4 - a_3)[a_5 + (a_1\dot{\gamma})^{a_2}]^{-2} a_2 \dot{\gamma} (a_1\dot{\gamma})^{a_2-1} \quad (4.22)$$

- Parámetro  $a_2 \equiv m$

$$\frac{\partial \eta}{\partial K'} = -(\eta_0 - \eta_\infty)[1 + (K'\dot{\gamma})^m]^{-2} (K'\dot{\gamma})^m \ln(K'\dot{\gamma}) \quad (4.23)$$

$$\frac{\partial \eta}{\partial a_2} = -(a_4 - a_3)[a_5 + (a_1\dot{\gamma})^{a_2}]^{-2} (a_1\dot{\gamma})^{a_2} \ln(a_1\dot{\gamma}) \quad (4.24)$$

- Parámetro  $a_3 \equiv \eta_\infty$

$$\frac{\partial \eta}{\partial \eta_\infty} = 1 - [1 + (K'\dot{\gamma})^m]^{-1} \quad (4.25)$$

$$\frac{\partial \eta}{\partial a_3} = 1 - [a_5 + (a_1\dot{\gamma})^{a_2}]^{-1} \quad (4.26)$$

- Parámetro  $a_4 \equiv \eta_0$

$$\frac{\partial \eta}{\partial \eta_0} = [1 + (K'\dot{\gamma})^m]^{-1} \quad (4.27)$$

$$\frac{\partial \eta}{\partial a_4} = [a_5 + (a_1\dot{\gamma})^{a_2}]^{-1} \quad (4.28)$$

- Parámetro  $a_5 \equiv \eta_1$  fijo: no es necesaria la derivada.

El procedimiento de Marquardt basado en expresiones explícitas de las derivadas, como es nuestro caso, converge bastante bien de modo que incluso estimaciones malas de los valores iniciales de los parámetros, es decir, valores iniciales desviados de los óptimos, conducen a resultados correctos.

### 4.3. Instrumentación

El reómetro es el instrumento de medida por excelencia en reología. Su cometido es caracterizar la respuesta de los fluidos (sean viscosos puros o viscoelásticos) en flujos de cizalla simple. Así, mediante la técnica de viscosimetría rotacional se determina cómo es la dependencia del esfuerzo con el gradiente de cizalla (o viceversa, dependiendo de cual sea la magnitud que controle el experimentador) y se obtienen las curvas de fluidez y viscosidad que se ilustraban en el apartado anterior. Además, el reómetro permite llevar a cabo experimentos orientados a caracterizar más específicamente el comportamiento viscoelástico como, por ejemplo, experimentos de fluencia y recuperación (*creep and recovery* en inglés) del que se obtiene el parámetro denominado docilidad (*compliance* en inglés), y experimentos de cizalla oscilante, donde la muestra se deforma periódicamente en dos sentidos opuestos con el fin de determinar los módulos elástico y viscoso que se han mencionado anteriormente. De los experimentos encaminados a caracterizar el comportamiento viscoelástico no vamos a tratar aquí por no haber sido utilizados en esta Tesis.

#### 4.3.1. Fundamentos del reómetro

Para crear un flujo de cizalla simple (sea éste lineal u oscilatorio) se introduce la muestra entre dos superficies, una móvil y otra fija, que pueden tener diferentes geometrías. Las más comunes, y que están disponibles en nuestro laboratorio, son las siguientes:

- Cilindros concéntricos:

Un dispositivo experimental que genera un flujo de cizalla simple y que se emplea para el estudio de fluidos de viscosidad moderada (particularmente, disoluciones de macromoléculas), es el viscosímetro o reómetro de cilindros concéntricos, también llamado de Couette (Figura 4.3). En él, el fluido ocupa la zona comprendida entre los dos cilindros, uno de los cuales se mueve (rotor) mientras que el otro permanece fijo (estátor). Por conveniencia de diseño, el cilindro interior suele ser móvil mientras que el exterior es fijo. Si consideramos el fluido dividido en capas cilíndricas concéntricas, la capa que está en contacto con el rotor se mueve con la misma velocidad y sentido que éste, mientras que la capa que está en contacto con el estátor tiene velocidad nula. Se establece así un gradiente de velocidad en la dirección perpendicular al movimiento (gradiente de cizalla). Si el espaciado entre los cilindros es bastante

inferior a sus respectivos radios,  $a_1$  para el interior y  $a_2$  para el exterior, el gradiente de cizalla es prácticamente constante en todo el fluido, siendo  $\dot{\gamma} = a_2\omega/(a_2 - a_1)$  cuando el cilindro interior es estacionario y el exterior rota a una velocidad angular  $\omega$  (rad/s) [28]. A efectos prácticos, el comportamiento del fluido es como si estuviese entre dos placas planas paralelas, una móvil y otra fija, como se ilustraba en la Figura 3.1 donde los planos del material, paralelos a esas placas, se movían en la dirección  $x$  mientras que las coordenadas  $y$  y  $z$  de cualquier punto material no variaban, generándose así el perfil de velocidad descrito por la ecuación 3.2.

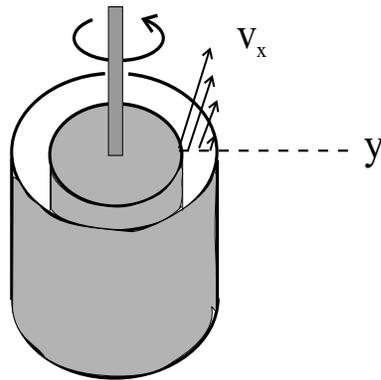


Figura 4.3: Reómetro de cilindros concéntricos de Couette.

Además del reómetro de cilindros concéntricos, que es el precursor de todos los demás, existen otros muchos dispositivos con diferentes geometrías capaces de deformar continuamente el material mediante rotación y generar un flujo de cizalla. Solo se precisa que el dispositivo conste de dos elementos (con geometrías adecuadas), uno móvil y otro fijo, que dejen un espacio entre ellos para introducir el fluido.

- Cono-Plato:

En este tipo de geometría, el fluido ocupa el espacio comprendido entre un disco plano (plato) y un cono que apoya su vértice sobre él formando un ángulo  $\theta$  (Figura 4.4A). Por razones prácticas, el cono suele ser el elemento móvil (rotor) y se coloca en la parte superior mientras que el plato es el elemento fijo que se coloca en la parte inferior y soporta la muestra. Si el ángulo que forman el cono y el plato es pequeño ( $< 4^\circ$ ), el gradiente de cizalla que se genera al hacer rotar el cono con velocidad

angular  $\omega$  (rad/s) se puede considerar constante en todo el espacio entre el cono y la placa,  $\dot{\gamma} = \omega/\theta$  (expresando  $\theta$  en radianes) [28].

■ Plato-Plato:

En este tipo de geometría, el fluido ocupa la zona comprendida entre dos discos planos (platos) paralelos que tienen un determinado radio  $a$  y están separados una distancia  $h$  (Figura 4.4B). El flujo de cizalla se genera haciendo girar uno de los platos (rotor), usualmente el superior, a una determinada velocidad angular,  $\omega$  (rad/s), mientras que el otro permanece fijo. El gradiente de cizalla no es constante a lo largo de la muestra, sino que varía desde cero, en el centro de los discos, hasta  $\dot{\gamma} = a\omega/h$  en el borde de los platos [28]. Se establecen, por tanto, perfiles de velocidad definidos por gradientes de cizalla perpendiculares a los platos pero de valor variable en la dirección perpendicular al eje de giro. En la mayoría de casos, se toma un valor medio del gradiente como representativo del experimento y con él se construyen las curvas de fluidez.

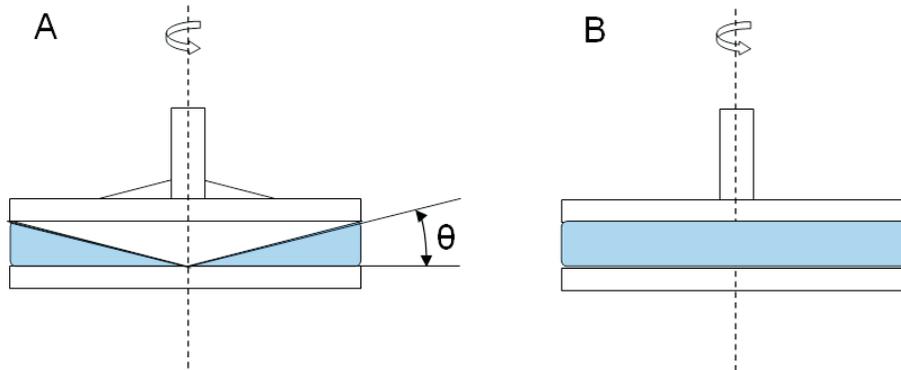


Figura 4.4: (A) Geometría Cono-Plato. (B) Geometría Plato-Plato.

### 4.3.2. Descripción de nuestro equipo

En el desarrollo de esta Tesis se ha empleado el reómetro modular compacto de Anton Paar modelo MCR 102 equipado con una unidad para el control de temperatura (plato de Peltier) que permite trabajar en un rango de temperaturas de  $-150^{\circ}\text{C}$  a  $1000^{\circ}\text{C}$ . Para dicho reómetro disponemos de dispositivos con tres geometrías, plato-plato, cono-plato, y

cilindros concéntricos, aunque hemos utilizado principalmente la configuración cono-plato. En dichas geometrías, el elemento superior es móvil (el rotor), mientras que el elemento inferior (plato en el caso de las dos primeras geometrías y cilindro hueco o copa en el caso de la última) es fijo (el estátor) y es donde se coloca la muestra. El plato inferior en las dos primeras geometrías es una placa circular de mucha mayor superficie que los rotores. Nuestro reómetro es capaz de imponer a los rotores una velocidad angular  $\omega$  en el rango de  $10^{-8}$  rad/s a 314 rad/s (el gradiente de cizalla equivalente dependerá de la geometría utilizada como se desprende de las ecuaciones definidas en el apartado anterior). El rotor es a la vez un sensor que tras insertarse en el cabezal superior del reómetro permite medir los esfuerzos (lo que se mide directamente es el torque) y los gradientes (lo que se mide directamente es la velocidad angular). Para nuestro sensor tipo plato la referencia es PP50/Q1, para nuestro sensor tipo cono la referencia es CP25/Q1 y para nuestro sensor tipo cilindro la referencia es CC27/T200/Q1. Cada tipo de sensor está preparado para trabajar en un rango de esfuerzo,  $\tau_{xy}$ , y gradiente de cizalla,  $\dot{\gamma}$ , determinado y con muestras de una viscosidad,  $\eta$ , determinada. Las características y rangos de trabajo de nuestros sensores están recogidos en la Tabla 4.1. En el caso del cono (CP25/Q1) es preciso, además, indicar que el ángulo entre el cono y el plato es de  $1^\circ$ .

Sensor	PP50/Q1	CP25/Q1	CC27/T200/Q1
Diámetro (mm)	50	25	26.66 (cilindro), 28.92 (copa)
Vol muestra (ml)	2	0.1	19.4
$\tau_{xy}$ mín (Pa)	0.01	0.0611	0.005
$\tau_{xy}$ máx (Pa)	6112	36669	2824
$\dot{\gamma}$ mín ( $s^{-1}$ )	$2.6 \times 10^{-7}$	$6.0 \times 10^{-7}$	$1.3 \times 10^{-7}$
$\dot{\gamma}$ máx ( $s^{-1}$ )	3142	7200	1549
$\eta$ mín (Pa·s)	$3.2 \times 10^{-6}$	$8.5 \times 10^{-6}$	$3.0 \times 10^{-7}$
$\eta$ máx (Pa·s)	$2.33 \times 10^7$	$6.11 \times 10^7$	$2.19 \times 10^6$

Tabla 4.1: Características de los sistemas de medida (sensores) disponibles en nuestro laboratorio para el reómetro Anton Paar MCR 102.

El software del reómetro permite controlar la distancia entre el rotor/sensor y el elemento inferior (estátor) y programar el experimento. Las partes móviles del motor descansan sobre cojines de aire que le confieren estabilidad y permiten medir torques tan

pequeños como  $0.5 \text{ nN}\cdot\text{m}$ . Para el funcionamiento de este sistema el reómetro se encuentra conectado a un compresor de aire que debe ponerse en marcha antes de comenzar a operar.



Figura 4.5: Reómetro Anton Paar MCR 102 utilizado en esta Tesis.

### 4.4. Medidas de comprobación

A continuación se presentan los resultados de una serie de medidas llevadas a cabo con nuestro reómetro para comprobar su correcto funcionamiento. Los experimentos consistieron en someter a diferentes fluidos, que presentan algunos de los comportamientos típicos descritos anteriormente, a barridos de cizalla con el fin de obtener sus curvas de fluidez y viscosidad y verificar si éstas se ajustan al comportamiento esperado. Así mismo, se pretende verificar la operatividad del programa *RheoFit* utilizándolo para analizar los datos experimentales obtenidos.

#### 4.4.1. Comportamiento independiente del tiempo

Se realizaron medidas de esfuerzo y viscosidad en experimentos en los que se sometió a la muestra a una rampa de gradiente de cizalla creciente. Esto permite averiguar y caracterizar el comportamiento reológico independiente del tiempo del fluido (newtoniano o no newtoniano). Además, en caso de que el fluido fuera no newtoniano, se procedió a

ajustar los datos experimentales a los modelos de Ostwald, Sisko y Cross con el programa RheoFit. Las condiciones y características de los experimentos fueron las siguientes en todos los casos:

- Temperatura: 25°C.
- Amplitud del barrido: desde  $\dot{\gamma} = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  a  $\dot{\gamma} = 10^3 \text{ s}^{-1}$ .
- Duración del barrido: 12 min y 1 h. Objetivo: evaluar la influencia de la duración del experimento.
- Toma de datos logarítmica: datos repartidos por igual entre todas las décadas cubiertas por el gradiente de cizalla. En la práctica 20 datos por década (seis décadas = 120 datos (puntos) en total).
- Sistema de medida: cono-plato CP25/Q1 y plato-plato PP50/Q1.

Cada experimento se realizó dos veces comprobando que la reproducibilidad de los datos era buena. En todos las medidas hubieron de descartarse un determinado número de puntos iniciales (típicamente entre 5 y 10, dependiendo del fluido utilizado) ya que sus valores eran erráticos y se desviaban de la tendencia esperada y marcada por los puntos siguientes. Lo habitual es que en esos primeros puntos, correspondientes a gradientes de cizalla pequeños, la viscosidad experimente un brusco incremento hasta alcanzar un valor estable y razonable. Este efecto es más acusado en el caso de los fluidos con menor viscosidad como la mezcla de agua y glicerina y los dos patrones de Anton Paar (todos ellos fluidos newtonianos). Es conocido que a gradientes de cizalla muy bajos (el valor exacto depende de la naturaleza del fluido), aunque dichos gradientes estén dentro del rango operativo especificado por el fabricante, los valores experimentales de esfuerzo y viscosidad no son fiables pues están afectados por la inercia de la muestra y del instrumento. De hecho, aunque se eliminara la inercia del instrumento, la muestra siempre presentará una inercia que introduce artefactos (como flujos secundarios y otros) que violan la suposición de que el flujo de cizalla con el que se trabaja es simple.

A continuación se presentan las medidas de esfuerzo y viscosidad realizadas y se comentan los resultados. Los fluidos empleados fueron una mezcla al 50% en volumen de agua y glicerina, dos líquidos patrón suministrados por la casa Anton Paar (20 AW y 200 AW), un hidrogel, disoluciones de diversa concentración de goma guar (Sigma-Aldrich

ref. G-4129, lote 47H1452) en agua, una crema de manos aloe vera de la casa Deliplus<sup>®</sup>, una pasta de dientes de la marca Binaca<sup>®</sup>, un ketchup de la marca Hacendado<sup>®</sup> y una mayonesa de la marca Chovi<sup>®</sup>.

### Influencia de la duración del experimento

Antes de analizar los datos obtenidos, hemos creído conveniente evaluar la influencia que tiene la duración del experimento en el comportamiento de los fluidos estudiados. Para ello, se realizaron sendos experimentos de 12 minutos y 1 h de duración con todos los fluidos. A modo ilustrativo, mostramos las curvas de viscosidad del hidrogel y de la crema de manos, dos fluidos no newtonianos que son representativos del comportamiento observado en el resto de fluidos en cuanto a la duración del experimento se refiere.

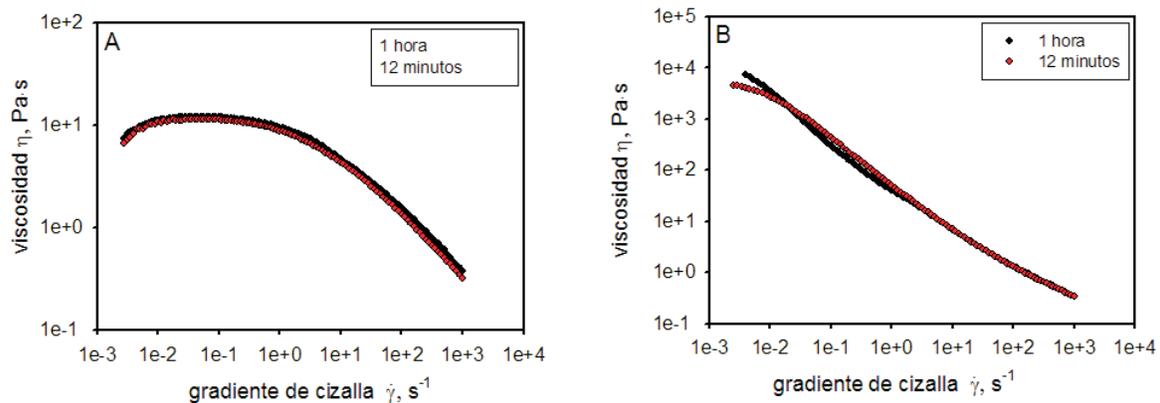


Figura 4.6: Influencia de la duración del experimento en las curvas de viscosidad: (A) Hidrogel, (B) Crema de manos.

En el caso del hidrogel (Figura 4.6A), los puntos procedentes del experimento de 12 min de duración se superponen a los del experimento de 1 h de duración. En el caso de la crema de manos (Figura 4.6B) existen ciertas discrepancias en los valores de la viscosidad a gradientes de cizalla pequeños. Ligeras discrepancias en la zona inicial de la curva de viscosidad también se han observado en otros fluidos estudiados, siendo más aparentes en aquellos más viscosos y con esfuerzo umbral como el ketchup y la mayonesa. En cualquier caso, las diferencias observadas en los valores de viscosidad son poco significativas. Por otro lado, no se aprecian diferencias importantes en las formas de las curvas de fluidez y viscosidad de los fluidos estudiados por lo que el comportamiento reológico mostrado

por estos fluidos se puede considerar independiente de la duración del experimento. En definitiva, la duración del experimento tiene escasa influencia en los resultados por lo que no ha sido un parámetro crítico a tener en cuenta en los experimentos realizados. Los datos experimentales mostrados y analizados a continuación corresponden a experimentos de 1 h de duración.

#### 4.4.1.a. Curvas de fluidez (esfuerzo)

La Figura 4.7 recoge las curvas de fluidez de todos los fluidos estudiados. Para dicha representación se ha utilizado en ambos ejes una escala lineal.

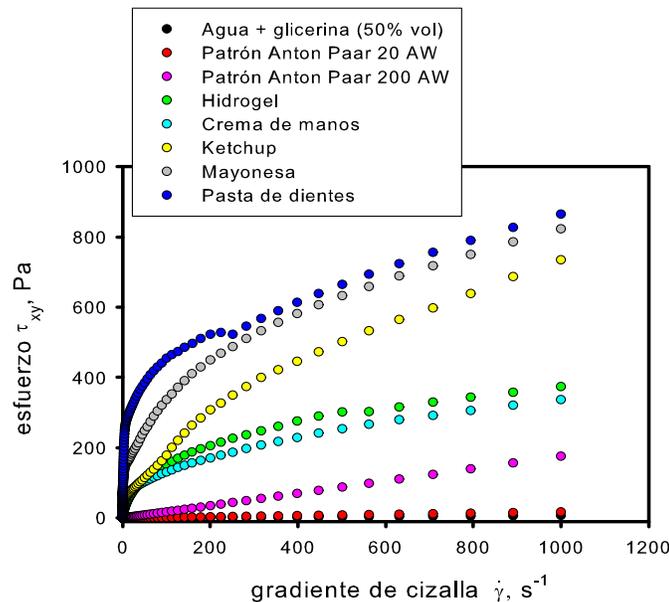


Figura 4.7: Curvas de fluidez de diversos fluidos con comportamientos reológicos típicos.

Como se aprecia en la Figura 4.7, tanto la mezcla de agua y glicerina como los dos patrones de Anton Paar (20 AW y 200 AW) son fluidos que se comportan de forma newtoniana (relación lineal entre esfuerzo y gradiente de cizalla; pendiente constante), mientras que el resto de fluidos tienen un comportamiento de tipo fluidizante (la pendiente de la curva de fluidez disminuye conforme aumenta el gradiente de cizalla). De hecho, el hidrogel es un fluido típicamente pseudoplástico o fluidizante que no requiere esfuerzo umbral para comenzar a fluir. Por otro lado, los otros fluidos no newtonianos utilizados

en este estudio, como el ketchup o la mayonesa, requieren que el esfuerzo alcance un determinado valor para comenzar a fluir.

#### 4.4.1.b. Curvas de viscosidad

A continuación mostraremos y analizaremos las curvas de viscosidad obtenidas para todos los fluidos estudiados. Por conveniencia, el tipo de representación utilizado para estas curvas será log-log.

##### Fluidos newtonianos

Las curvas de viscosidad de la mezcla de agua y glicerina y de los dos patrones de Anton Paar (Figura 4.8) ilustran que estos fluidos se comportan de forma newtoniana (viscosidad independiente del gradiente de cizalla). Los tres fluidos son más viscosos que el agua cuya viscosidad a 25°C es  $0.893 \times 10^{-3}$  Pa·s (Tabla 3.1). Como se ha comentado anteriormente, para estos fluidos se descartaron una gran cantidad de puntos iniciales (muchos más que para el resto de fluidos estudiados). En concreto fue preciso descartar los puntos correspondientes a gradientes de cizalla inferiores a  $2 \text{ s}^{-1}$  para que los valores de viscosidad tuvieran sentido físico (de otro modo resultaban valores negativos). Una vez eliminados los puntos discordantes, está claro el comportamiento newtoniano de esos fluidos.

Para estos fluidos newtonianos hemos considerado de interés comparar los valores de viscosidad obtenidos por reometría con los valores de viscosidad obtenidos mediante viscosimetría. Así, la Tabla 4.2 muestra los valores de viscosidad obtenidos con el reómetro MCR 102 junto a los valores obtenidos anteriormente con el viscosímetro de bola Lovis 2000 ME. Además, para el caso de los dos patrones, también se muestran los valores de referencia suministrados por Anton Paar.

Fluido	$\eta \times 10^3$ (Pa·s) Reómetro	$\eta \times 10^3$ (Pa·s) Lovis	$\eta \times 10^3$ (Pa·s) Ref <sup>1</sup>
Agua + Glicerina (50 % vol)	7.52	6.713	—
Patrón 20 AW	17.3	15.72	15.77
Patrón 200 AW	177	161.2	160.5

Tabla 4.2: Viscosidad de fluidos newtonianos obtenidas mediante el viscosímetro de bola y el reómetro. Ref<sup>1</sup>: Documento adjunto a los patrones de Anton Paar.

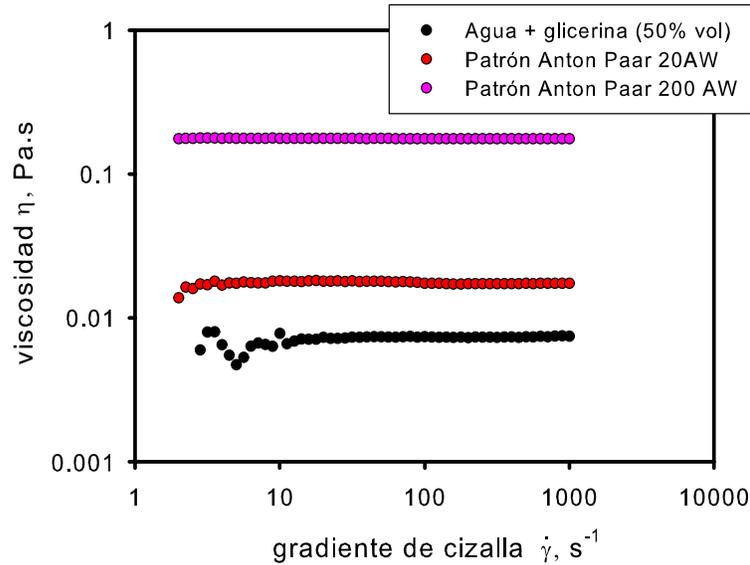


Figura 4.8: Curvas de viscosidad de fluidos newtonianos.

Como ya se ha comentado en el capítulo anterior, las medidas de viscosidad suministradas por el viscosímetro de bola Lovis 2000 ME reproducen bastante bien los valores de referencia. El objetivo ahora es comprobar si el valor de viscosidad obtenido con el reómetro, más concretamente la anteriormente denominada viscosidad a cizalla cero (*zero-shear viscosity*) que para un fluido newtoniano es simplemente la viscosidad a cualquier gradiente, es comparable al valor de viscosidad obtenido mediante el viscosímetro de bola, como cabe esperar. Como se observa en la Tabla 4.2, aunque los dos instrumentos proporcionan valores similares de viscosidad, los valores derivados de las medidas reométricas son siempre superiores a los obtenidos con el Lovis presentando, para los tres casos estudiados, una desviación en torno al 10% (aunque los datos parecen sugerir que la desviación disminuye ligeramente al aumentar la viscosidad). Parece claro, por tanto, que nuestro reómetro sobreestima (en un 10% en promedio) el valor de la viscosidad “newtoniana” de los fluidos.

### Fluidos no newtonianos

Las curvas de viscosidad experimentales de los fluidos no newtonianos estudiados (puntos), junto con sus ajustes a los modelos reológicos anteriormente descritos (líneas), están recogidas en varias figuras para una mayor claridad. Así, la Figura 4.9 contiene los datos

experimentales y los ajustes correspondientes al hidrogel. Análogamente, las gráficas con los datos experimentales y los ajustes para la crema de manos, la pasta de dientes, el ketchup y la mayonesa se encuentran recogidas en las Figuras 4.10A y 4.10B, 4.11A y 4.11B, respectivamente. Por último, para ilustrar la dependencia del comportamiento viscoso con la concentración de las disoluciones poliméricas, la Figura 4.12 recoge las gráficas correspondientes a tres disoluciones de goma guar en agua cuyas concentraciones son 0.5 %, 0.75 % y 1 % (en peso).

En todas las gráficas se pone de manifiesto el comportamiento fluidizante de esos fluidos, disminuyendo su viscosidad cuando el gradiente de cizalla pasa de  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  a  $10^3 \text{ s}^{-1}$ . De hecho, este es el tipo de comportamiento reológico deseable para muchos de ellos. Por ejemplo, la crema de manos, cuya viscosidad disminuye cuatro órdenes de magnitud en el rango de gradientes de cizalla estudiado, debe tener consistencia (elevada viscosidad) cuando está envasada pero adquirir la fluidez necesaria cuando se cizalla mediante el frotamiento de las manos para extenderla por la piel (lo que puede generar gradientes de  $10^4 \text{ s}^{-1}$  [28]). En los casos del hidrogel y la goma guar se aprecia claramente, además de la zona final de decaimiento de la viscosidad a gradientes de cizalla elevados (región de *shear thinning*), la existencia de la meseta newtoniana inicial a gradientes de cizalla pequeños. Como se observa, todos los fluidos no newtonianos estudiados son varios órdenes de magnitud más viscosos que el agua ( $0.893 \times 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ ).

Como ya se ha comentado, se procedió a ajustar los datos experimentales de viscosidad a los modelos de Ostwald, Sisko y Cross con el programa **RheoFit** (líneas continuas de las Figuras 4.9, 4.10, 4.11 y 4.12). Los resultados de los ajustes con **RheoFit** para los distintos fluidos, es decir, los valores óptimos de los parámetros de los distintos modelos encontrados por **RheoFit**, están recogidos en la Tabla 4.3.

El modelo de Cross es el que mejor ajusta todos los casos en el rango de gradientes de cizalla utilizado. Esto se hace especialmente evidente en las Figuras 4.9 y la 4.12 donde la meseta newtoniana abarca una zona importante de las curvas de viscosidad. El modelo de Ostwald es válido para ajustar el decaimiento lineal de la viscosidad que se suele producir a valores de gradiente de cizalla intermedios. El modelo de Sisko se puede considerar intermedio entre los modelos de Ostwald y Cross. Por tanto, aquellos fluidos para los que se produce un decaimiento lineal en la mayor parte de la región de gradiente de cizalla estudiada, se pueden ajustar razonablemente bien a las ecuaciones de Ostwald y Sisko (Figuras 4.10 y 4.11), mientras que aquellos fluidos que presentan una amplia meseta newtoniana solo pueden ser adecuadamente ajustados por el modelo de Cross (Figuras

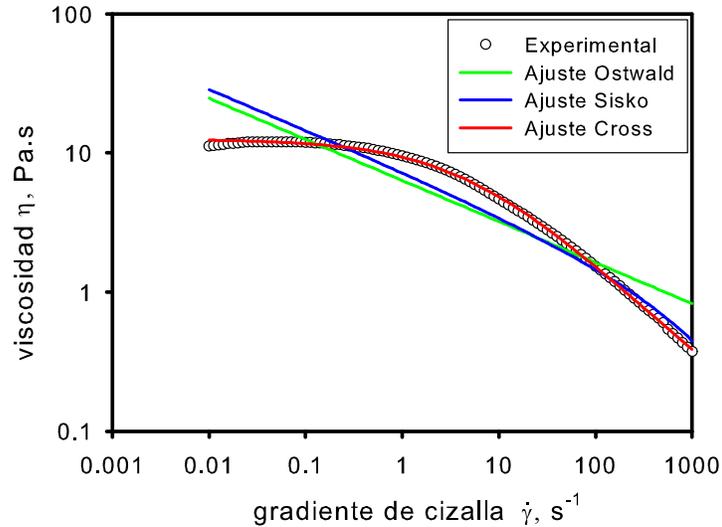


Figura 4.9: Curva de viscosidad del hidrogel y ajustes con RheoFit.

4.9 y 4.12). Evidentemente, la mayor generalidad del modelo de Cross respecto de los otros modelos se aprecia mejor conforme la zona de decaimiento de la viscosidad con el gradiente de cizalla es más reducida en relación a la curva global como ocurre en los casos del hidrogel (Figura 4.9) y la goma guar (Figura 4.12). En esta última figura se ha prescindido de los ajustes de Ostwald y Sisko correspondientes a las disoluciones de 0.5% y 0.75% (en peso) puesto que son igual de malos que para la disolución de 1% en peso y dificultan la legibilidad de la gráfica. En cualquier caso, los análisis mostrados ilustran la validez del programa RheoFit.

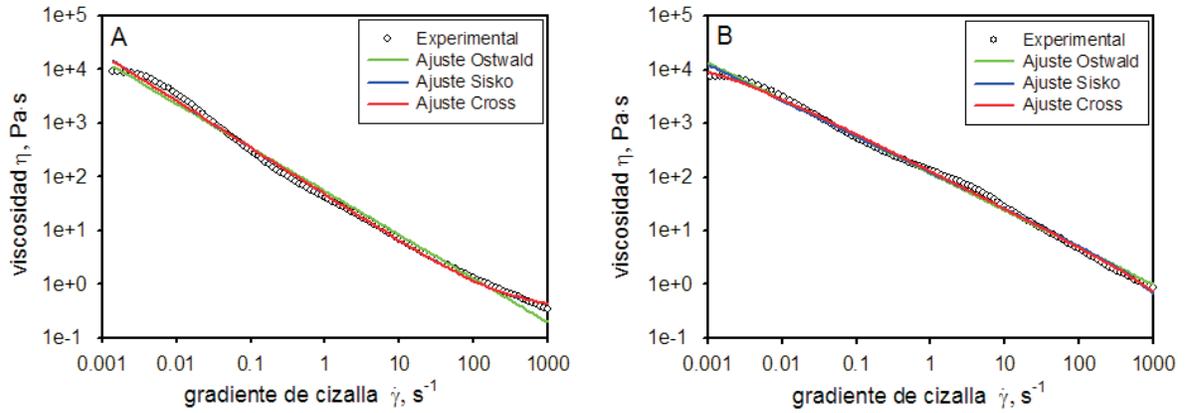


Figura 4.10: Curvas de viscosidad de la crema de manos (A) y la pasta de dientes (B) y ajustes con RheoFit.

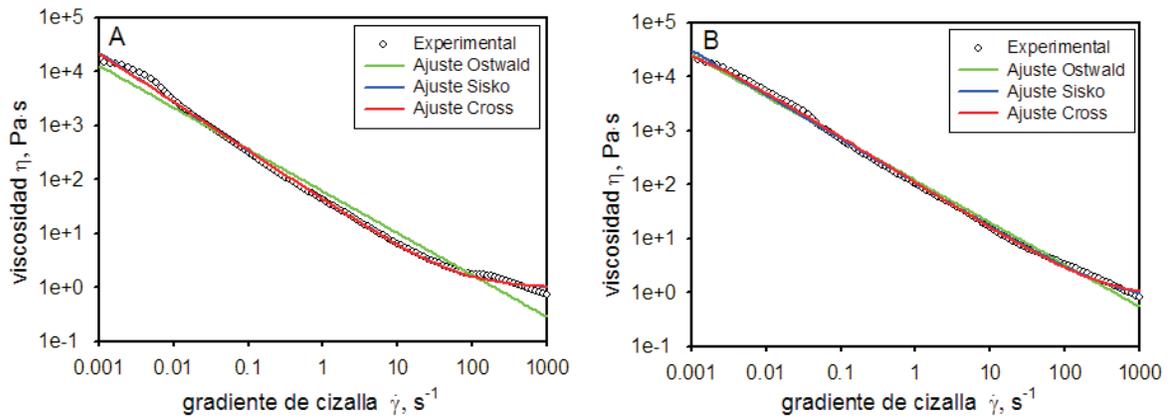


Figura 4.11: Curvas de viscosidad del ketchup (A) y la mayonesa (B) y ajustes con RheoFit.

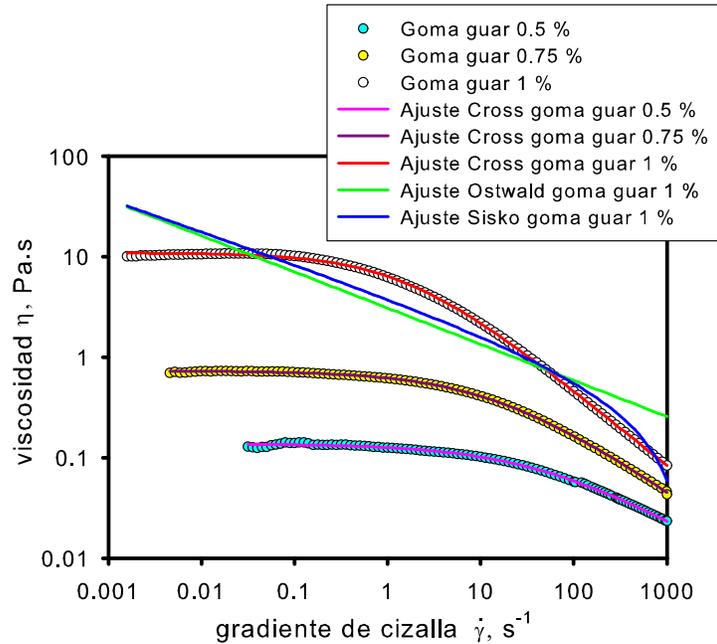


Figura 4.12: Curvas de viscosidad de tres disoluciones de goma guar de distinta concentración (% en peso) y ajustes con RheoFit.

Modelo →	Oswald		Sisko			Cross			
Fluido	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n	$\eta_{\infty}$ (Pa·s)	K' (s <sup>m</sup> )	m	$\eta_0$ (Pa·s)	$\eta_{\infty}$ (Pa·s)
Goma guar 0.5%	0.177	0.638	1.332	0.69	-0.153	0.0175	0.580	0.138	0.00148
Goma guar 0.75%	0.492	0.658	1.573	0.692	-0.176	0.0688	0.645	0.7307	0.00061
Goma guar 1.0%	3.089	0.64	4.112	0.679	-0.389	0.6362	0.755	0.1096	0.00018
Hidrogel	6.352	0.705	7.785	0.713	-0.624	0.203	0.666	12.54	0.0337
Crema de manos	54.10	0.186	46.62	0.127	0.320	$1.5 \times 10^4$	0.877	$2.13 \times 10^5$	0.326
Ketchup	60.85	0.224	42.81	0.095	0.946	$2.59 \times 10^4$	0.907	$4.31 \times 10^5$	0.952
Mayonesa	119.7	0.219	107.5	0.180	0.605	1771	0.849	$6.25 \times 10^4$	0.742
Pasta de dientes	117.1	0.311	123.5	0.332	-0.546	$1.45 \times 10^3$	0.699	$2.10 \times 10^4$	-0.297

Tabla 4.3: Valores óptimos de los parámetros de diferentes modelos reológicos para los fluidos no newtonianos estudiados, obtenidos mediante el ajuste de los datos experimentales con el programa RheoFit en “modo automático” (nota: en este modo, debido a la forma de estimar los parámetros iniciales, es necesario que el primer valor de viscosidad de la curva sea mayor que el valor en un punto intermedio). En aquellos casos en los que el ajuste no es bueno los valores de los parámetros pueden carecer de significado físico (especialmente notables son los casos  $\eta_{\infty} < 0$ ).

### 4.4.2. Comportamiento dependiente del tiempo

Para ilustrar un caso de fluido con comportamiento tixotrópico se procedió a realizar un experimento de doble barrido de gradiente de cizalla, primero en sentido creciente, de  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  a  $50 \text{ s}^{-1}$ , y luego decreciente, de  $50 \text{ s}^{-1}$  a  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , utilizando como muestra la pasta dentífrica Binaca<sup>®</sup>. Las Figuras 4.13 y 4.14 muestran las curvas de fluidez y viscosidad obtenidas en dicho experimento donde se puede apreciar la presencia de histéresis característica de un comportamiento no newtoniano dependiente del tiempo (tramos de ida y vuelta de la curva no se superponen). Las flechas indican el sentido del barrido correspondiente a cada tramo de la curva. Como ya se ha comentado anteriormente, las medidas se realizaron a  $25^\circ\text{C}$  y con la geometría cono-plato.

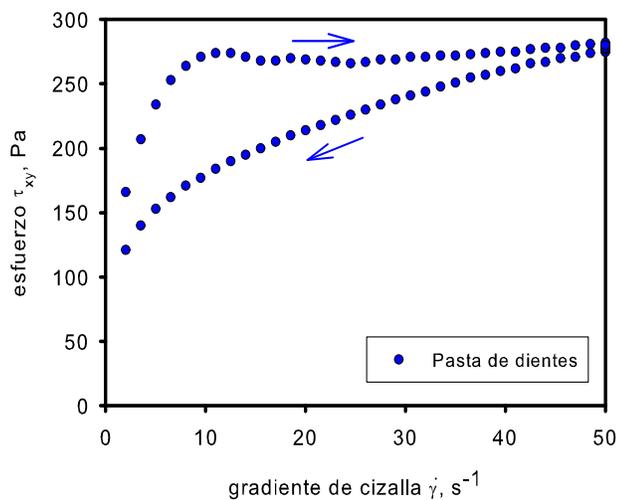


Figura 4.13: Curva de fluidez de pasta dentífrica en un barrido de ida y vuelta.

En la Figura 4.13 se aprecia claramente la presencia del ciclo de histéresis para el esfuerzo que denota el comportamiento tixotrópico de la pasta de dientes consecuencia de su compleja estructura. Además del comportamiento tixotrópico, la pasta de dientes es un fluido con esfuerzo umbral, lo que es de esperar puesto que ésta debe fluir solo como consecuencia del esfuerzo impuesto al presionar el tubo y no por simple acción de la gravedad. La Figura 4.14 refleja cómo el valor de la viscosidad para un mismo gradiente

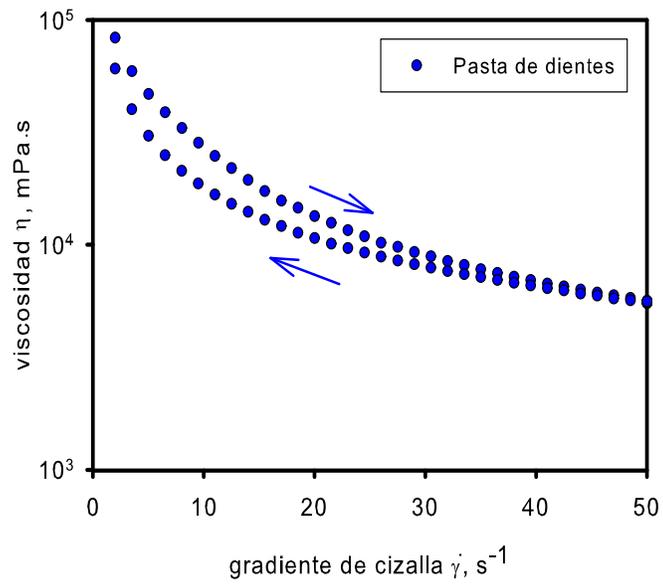


Figura 4.14: Curva de viscosidad de pasta dentífrica en un barrido de ida y vuelta.

es diferente para los barridos de cizalla creciente y decreciente, siendo en el primer caso mayor que en el segundo, como corresponde a un fluido tixotrópico.



# Capítulo 5

## Aplicaciones a sistemas biológicos

En este capítulo se van a mostrar los resultados procedentes de la aplicación de diversas técnicas instrumentales a sistemas biológicos proporcionados por otros grupos de investigación de la Universidad de Murcia con los que se ha colaborado. Las técnicas principales utilizadas para ello han sido viscosimetría, reometría y ultracentrifugación analítica.

### 5.1. Interacción de ADN con moléculas pequeñas

#### 5.1.1. Introducción

Este trabajo es el resultado de una colaboración con el profesor José Ruiz del Grupo de Metalofármacos del Departamento de Inorgánica de la Universidad de Murcia. Nuestra aportación consistió en caracterizar mediante viscosimetría el cambio conformacional experimentado por la cadena de ADN cuando interacciona con determinados ligandos.

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es la causa más importante de muerte en Europa. Un elevado porcentaje de las terapias del cáncer incluye agentes que son capaces de interactuar directamente con el ADN, ya que éste es generalmente la diana intracelular primaria de los fármacos antitumorales, de tal forma que su interacción con pequeñas moléculas puede provocar daños en las células tumorales, bloqueando su división, lo que conduce a la muerte celular [48, 49].

El ADN posee una estructura de doble hélice enrollada compuesta por cadenas de nucleótidos antiparalelas y complementarias que dejan las bases dentro de la estructura formando parejas. Cada cierto número de nucleótidos se produce una vuelta completa de la hélice permitiendo la formación de hendiduras o huecos denominados surcos, uno de

menor tamaño y otro mayor. Éste último permite el acceso a las bases nitrogenadas que se encuentran en el interior por parte de las proteínas encargadas de la transcripción. La estructura tridimensional del ADN es sensible a numerosos factores, tanto internos como externos, lo que determina un marcado polimorfismo estructural. De hecho, la doble hélice del ADN existe en diversas formas, siendo las más comunes A, B, y Z (Figura 5.1). En disolución acuosa y en la célula, el ADN se encuentra esencialmente en su forma B.

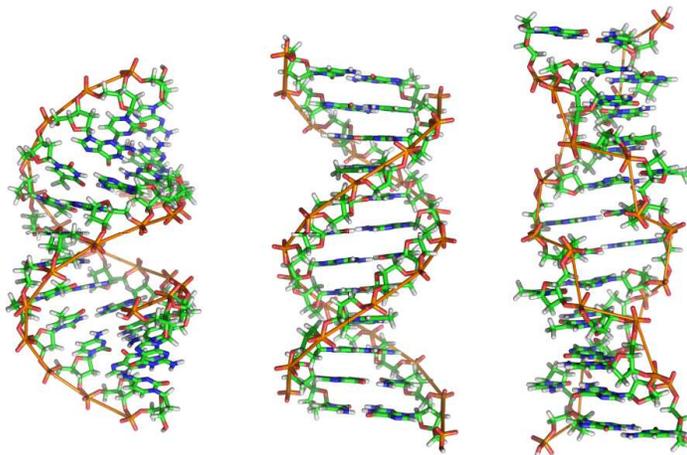


Figura 5.1: Estructuras A, B y Z del ADN [50].

Los compuestos antitumorales pueden interactuar con diversas formas del ADN bicatenario a través de interacciones tanto de tipo covalente (por coordinación a las bases nitrogenadas) como no covalentes a través de interacciones con los esqueletos fosfato de los azúcares. La unión covalente con el ADN (Figura 5.2a) es irreversible e invariablemente conduce a una inhibición completa de los procesos del ADN y subsecuentemente a la muerte celular. El inconveniente de este tipo de unión es que si ésta se produce en sitios no deseados del ADN, por falta de especificidad del compuesto coordinado, éste puede permanecer en dicha posición indefinidamente generando efectos colaterales. En cambio, la unión no covalente con el ADN es reversible y por tanto preferible a la covalente. Las interacciones de tipo no covalente con el ADN se subdividen, a su vez, en dos grandes grupos: intercalación (Figura 5.2b) y unión al surco (Figura 5.2c) [51, 52].

La unión al surco tiene lugar principalmente a través de una interacción de tipo Van der Waals y electrostático entre los grupos funcionales del compuesto y las paredes de los surcos formadas por el esqueleto negativo de grupos fosfato [56]. Este tipo de interacción

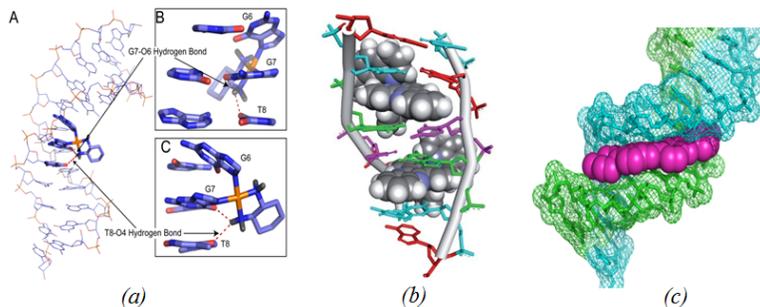


Figura 5.2: Tipos de interacciones ADN-ligando: (a) interacción covalente [53], (b) intercalación [54], y (c) unión al surco (en este caso menor) [55].

no provoca cambios conformacionales en el ADN y puede ser considerada similar a los modelos estándar “llave-cerradura”.

Por otro lado, la intercalación consiste en la inserción de una molécula policíclica aromática plana, cargada positivamente, entre dos pares de bases adyacentes. Este efecto da lugar al alargamiento y desenrollamiento de la cadena de ADN, destruyendo la estructura regular de la doble hélice y, por tanto, provocando cambios conformacionales importantes. La intercalación se estabiliza por la combinación de enlaces electrostáticos, puentes de hidrógeno, factores entrópicos, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas [56]. Muchos intercalantes son compuestos catiónicos que interactúan con el ADN en un proceso en dos etapas: primeramente hay una interacción electrostática con los centros de carga negativa (grupos fosfato) y luego el intercalante se desliza a lo largo de la hélice hasta que encuentra un lugar abierto, provocado por el movimiento térmico de los pares de bases, para que se produzca la intercalación. Una manera de introducir carga positiva en un intercalante es incorporar un metal de transición lo que da lugar a un metal-intercalante, que es el tipo de compuesto caracterizado en esta Tesis.

### 5.1.2. Conformación global y propiedades en disolución del ADN

Las intensas interacciones intramoleculares que originan la estructura local doble-helicoidal del ADN bicatenario le dotan de una elevada rigidez. Prescindiendo del detalle helicoidal, el ADN puede considerarse globalmente en términos del llamando modelo vermiforme [57, 58] como un filamento con sección circular de diámetro  $d$  y longitud de contorno  $L$ . Esta longitud ha de ser proporcional al peso molecular del ADN,  $M$ , siendo la

relación de proporcionalidad  $M = M_L L$ , donde  $M_L = M/L$  es el parámetro denominado masa por unidad de longitud que, lógicamente, depende de los detalles estructurales (peso molecular de las bases del ADN y espaciado entre pares de bases). Para el ADN en su forma B este parámetro vale  $M_L = 1950 \text{ Da/nm}$  y el diámetro es  $d \approx 2.2 \text{ nm}$ .

El grado de rigidez del filamento está representado por otro parámetro del modelo, la llamada longitud de persistencia,  $a$ , en cuya descripción detallada no vamos a entrar, bastándonos con indicar que es tanto mayor cuanto mayor es la rigidez local del filamento vermiforme. El aspecto global del filamento se asemeja a un “gusano” más o menos curvado (de ahí el término “vermiforme”), dependiendo de la relación entre la longitud de contorno y la de persistencia. Para valores  $L/a$  grandes, con  $L \gg a$ , el largo contorno posibilita la curvatura y el filamento aparece como un ovillo al azar, notablemente retorcido sobre sí mismo. Este es el caso para los ADN nativos, que tienen un elevado  $M$ . Por otra parte, para ADN de bajo peso molecular, tal como el de oligonucleótidos o los fragmentos obtenidos por degradación con ultrasonidos, cizalladura, etc. con  $L \leq a$  y  $L/a$  pequeño, la rigidez local predomina, y el aspecto global es el de una varilla rígida o muy ligeramente curvada. Para el ADN en su forma B la longitud de persistencia es  $a \approx 55 \text{ nm}$  [57].

Así, las propiedades en disolución de un ADN pueden indicarse en la forma

$$\text{prop}(M; L, a, d), \quad (5.1)$$

o bien

$$\text{prop}(M; M_L, a, d), \quad (5.2)$$

dándose a entender que dependen del peso molecular de la muestra, estando la dependencia determinada por los valores de los tres parámetros estructurales del modelo vermiforme.

### 5.1.3. Efecto en la viscosidad de disoluciones

Según se ha indicado en el Capítulo 3, la viscosidad de disoluciones es una de las propiedades macromoleculares más sensibles al tamaño y conformación de las macromoléculas. Allí indicábamos que el efecto del soluto macromolecular en la viscosidad de la disolución,  $\eta$ , está regulado por la viscosidad intrínseca,  $[\eta]$ , de manera que a concentraciones del soluto macromolecular  $c$  suficientemente bajas, el aumento de viscosidad respecto a la del disolvente,  $\eta_0$ , viene dado (ec. 3.4) por:

$$\eta = \eta_0 + \eta_0[\eta]c, \quad (5.3)$$

o bien

$$\Delta\eta \equiv \eta - \eta_0 = \eta_0[\eta]c. \quad (5.4)$$

Como propiedad característica de la macromolécula en disolución,  $[\eta]$  del ADN depende de los parámetros estructurales en la forma indicada en la ec. 5.2. Tras un cambio conformacional,  $\eta$  cambiará en mayor o menor grado dependiendo de las características de este cambio. Así, una molécula que se une covalentemente al ADN puede producir un desenrollamiento de los dos cabos de la hélice. Por separado, éstos tienen una rigidez  $a$  bastante menor y están más plegados. Esto ha de reflejarse en una notable disminución de  $[\eta]$ , disminuyendo así, de manera notable, la viscosidad  $\eta$  de la disolución.

Por otro lado, la interacción no covalente puede producir dos efectos diferentes dependiendo del tipo de unión.

- Unión al surco. En el caso de que un compuesto se una a uno de los surcos del ADN se puede producir un ligero aumento local en el diámetro  $d$  (que influye poco en las propiedades en disolución), y una pequeña doblez o curvatura local, todo ello sin variar la longitud de contorno  $L$ , que es el dato más influyente. El cambio en  $[\eta]$  y por tanto en  $\eta$ , sería insignificante.
- Intercalación. Al intercalarse una molécula (plana en toda o buena parte de su extensión) entre los planos de dos pares de bases consecutivos, se produce un aumento en la longitud de contorno,  $L$ . Los cambios en  $d$  y  $a$  son pequeños o de escasa influencia. El aumento en longitud de contorno trae consigo un aumento en el tamaño global de la molécula de ADN, y  $[\eta]$ , y por tanto  $\eta$ , deben aumentar, tanto más cuanto mayor sea el número de moléculas intercaladas.

Un apreciable incremento de viscosidad constituye una evidencia decisiva para confirmar la existencia de intercalación de determinadas moléculas, a las que denominaremos ligandos, en el ADN. La intercalación como mecanismo de interacción entre sistemas aromáticos policíclicos, planos, catiónicos y de tamaño adecuado, fue propuesta por primera vez por Leonard Lerman, quien observó un alargamiento de la molécula de ADN cuando los pares de bases se separan para albergar el compuesto intercalador [59–61]. Actualmente, estos conceptos se emplean para detectar y explicar el mecanismo de unión al ADN de diversos compuestos químicos, incluyendo los actualmente considerados anti-tumorales [62, 63].

El tratamiento de los datos de incremento de viscosidad causado por intercalación que se viene utilizando se centra en una ecuación que relaciona el incremento de viscosidad de la disolución respecto al disolvente puro,  $\Delta\eta$  (ec. 5.4), medida para la disolución del complejo ADN-ligando,  $\Delta\eta_{ADN+lig}$ , formado en presencia de una concentración de ligando  $c_{lig}$ , con el de la disolución de ADN original  $\Delta\eta_{ADN}$ , correspondiente a  $c_{lig} = 0$  (se emplean fragmentos de ADN de degradación ultrasónica). Dicha ecuación se formula como:

$$\left(\frac{\Delta\eta_{ADN+lig}}{\Delta\eta_{ADN}}\right)^{1/3} \equiv \left(\frac{\eta_{ADN+lig} - \eta_0}{\eta_{ADN} - \eta_0}\right)^{1/3} = 1 + Qc_{lig}, \quad (5.5)$$

de manera que la raíz cúbica del cociente de incrementos aumentaría linealmente con  $c_{lig}$ , presentando una pendiente positiva,  $Q$ . Por el contrario, obviamente, para unión no-covalente, pero no intercalante, esto es, exterior en los surcos, el ligando no produciría ningún efecto, siendo

$$\left(\frac{\Delta\eta_{ADN+lig}}{\Delta\eta_{ADN}}\right)^{1/3} \equiv \left(\frac{\eta_{ADN+lig} - \eta_0}{\eta_{ADN} - \eta_0}\right)^{1/3} \approx 1, \quad (5.6)$$

a cualquier concentración  $c_{lig}$ .

Esta ecuación ha sido profusamente utilizada para estudiar la interacción de moléculas, con posible efecto cancerígeno (mutagénico) o anticancerígeno (citotóxico), con el ADN. En la bibliografía reciente se pueden encontrar numerosos ejemplos [64–66]. Y en algunos casos apreciamos errores de terminología (si no de cálculo) tales como referirse a la viscosidad  $\eta$  en lugar de al incremento  $\eta - \eta_0$  (ver por ejemplo [67]). Además, no se suele hacer adecuada referencia al origen de esta ecuación, mencionándose si acaso el trabajo de Cohen y Eisenberg [68] donde este efecto se explica sin suficiente detalle teórico.

Con base en la química física de macromoléculas en disolución, y particularmente en la teoría para macromoléculas rígidas, explicamos el origen de las ecs. 5.5 y 5.6 como sigue.

Los fragmentos de ADN obtenidos por degradación ultrasónica son bastante más cortos que el ADN nativo; tienen una longitud de contorno  $L$  que no es mucho mayor que la longitud de persistencia  $a$ , de manera que  $L/a$  es pequeño y, según lo antedicho, la conformación de estos fragmentos es como una varilla casi recta, muy poco curvada. La teoría para partículas con forma de varilla establece que la viscosidad intrínseca viene dada por [69, 70]

$$[\eta] = \frac{q_1 N_A L^3}{q_2 M (\ln(L/d) + q_3)}, \quad (5.7)$$

donde  $q_1$ ,  $q_2$  y  $q_3$  son constantes numéricas, próximas a la unidad. Para estos fragmentos, aunque corta, la longitud de contorno es aún bastante mayor que el diámetro, por lo que  $q_3$  puede ser ignorado frente a  $\ln(L/d)$ . Comparemos la forma que toma la ec. 5.7 para un fragmento cuasirígido de ADN de peso molecular  $M$ , con y sin ligando. La diferencia estriba en las longitudes de contorno,  $L_{ADN+lig}$  y  $L_{ADN}$ . La dependencia principal es con  $L^3$ . En cuanto a la dependencia logarítmica, debida al término  $\ln(L/d)$ , para un cambio moderado en  $L$ , en  $\ln L$  el cambio es mucho menos acusado, y puede aceptarse que  $\ln L_{ADN+lig}/d \approx \ln L_{ADN}/d$ . De todo ello se desprende que la relación de viscosidades intrínsecas es

$$\frac{[\eta]_{ADN+lig}}{[\eta]_{ADN}} = \frac{L_{ADN+lig}^3}{L_{ADN}^3}, \quad (5.8)$$

y, según la ec. 5.4

$$\left( \frac{\Delta\eta_{ADN+lig}}{\Delta\eta_{ADN}} \right)^{1/3} \equiv \left( \frac{\eta_{ADN+lig} - \eta_0}{\eta_{ADN} - \eta_0} \right)^{1/3} \approx \frac{L_{ADN+lig}}{L_{ADN}}. \quad (5.9)$$

La longitud de contorno del ADN con  $N_{bp}$  pares de base es la longitud de la “escalera de caracol” que forma la doble hélice, con  $N_{bp}$  “escalones” de espaciado  $\delta_{bp}=0.34$  nm, uno por cada par de bases, es decir  $L_{ADN} = N_{bp}\delta_{bp}$ . Como resultado de la intercalación se forman nuevos escalones, tantos como moléculas intercaladas. Si  $r_{bound}$  es el número de moléculas intercaladas por cada par de bases, el incremento de longitud debido a la intercalación será

$$L_{ADN+lig} - L_{ADN} = r_{bound}N_{bp}\delta_{lig}, \quad (5.10)$$

siendo  $\delta_{lig}$  el aumento en longitud por cada molécula intercalada que, como  $\delta_{bp}$ , es otro parámetro estructural fijo. De aquí se desprende que el aumento relativo de longitud de contorno es

$$\frac{L_{ADN+lig}}{L_{ADN}} = 1 + r_{bound}\delta_{lig}/\delta_{bp}. \quad (5.11)$$

Así, el aumento relativo en  $L$ , que aparece en la ec. 5.9 es, según la ec. 5.11, proporcional a  $r_{bound}$ . Un simple análisis del equilibrio de unión ADN-ligando conduce a que esta fracción es proporcional a la concentración de ligando en el sistema,  $r_{bound} = qC_{lig}$ , estando  $q$  determinada por la constante de equilibrio. Resulta entonces que

$$\frac{L_{ADN+lig}}{L_{ADN}} = 1 + Qc_{lig}, \quad (5.12)$$

donde la constante global es  $Q = q\delta_{lig}/\delta_{bp}$ . Sustituyendo la ec. 5.12 en la ec. 5.9 se obtiene la ec. 5.5.

#### 5.1.4. Materiales y métodos

El ADN empleado en este trabajo procede del timo de ternera y fue comprado a Sigma Aldrich (referencia D1501). Las moléculas intercalantes o ligandos estudiados en este trabajo son complejos organometálicos de platino sintetizados por el Grupo de Metalofármacos del Departamento de Inorgánica de la Universidad de Murcia a los que denominaron MA3, MA9 y MA15 (Figura 5.3). Además, como intercalantes de referencia se han utilizado bromuro de etidio (EtBr) y Hoechst 33258 (Figura 5.4).

Para una correcta caracterización, el comportamiento de los ligandos de platino se compara con el comportamiento de dos ligandos estándar, bromuro de etidio (EtBr) y Hoechst 33258, ambos comprados a Sigma Aldrich (referencias E1510 y 94403 respectivamente). El primero es un intercalador que produce un apreciable aumento en la viscosidad de la disolución de ADN, mientras que el segundo se une a los surcos menores por lo que no ocasiona variación apreciable en la viscosidad.

Las medidas de viscosidad,  $\eta$ , que se llevaron a cabo para caracterizar el fenómeno de la intercalación se realizaron con el densímetro DMA 5000 M de Anton Paar que incluye el módulo Lovis 2000 ME, cuyas características están descritas en el Capítulo 3 en el apartado correspondiente a viscosimetría-densimetría.

##### 5.1.4.a. Preparación de las muestras

###### 1) Preparación de la disolución de ADN

Primero se prepara una disolución acuosa de ADN con concentración de nucleótidos 2 mM, esto es, con 2 milimoles de nucleótido por litro, utilizando el tampón TRIS (Tris-HCl 5 mM y NaCl 50 mM) que proporciona un  $\text{pH} = 7$ . Para ello, se pesan aproximadamente 52 mg de ADN con material estéril (pinzas y tijeras previamente mojadas en alcohol y flameadas con mechero Bunsen) y se introducen en aproximadamente 80 ml del tampón TRIS (con un peso molecular promedio por nucleótido de  $M_{nuc} = 330$  Da, 52 mg de ADN

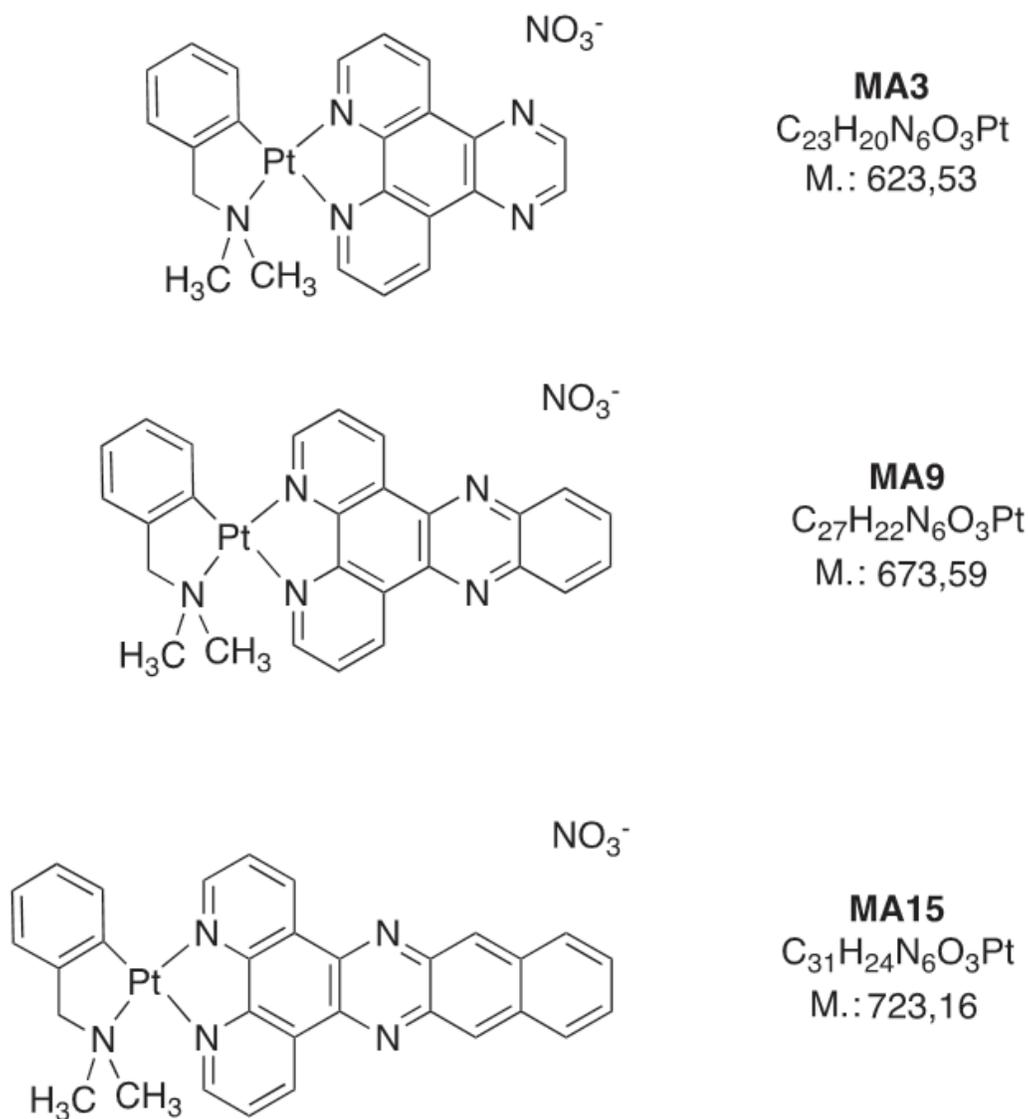


Figura 5.3: Ligandos sintetizados (complejos organometálicos de platino).

contienen 0.16 milimoles de nucleótido que, disueltos en 0.08 l, dan 2 milimoles por litro). El ADN tarda unos dos días en disolverse por completo (sin agitación y refrigerado). Una vez disuelto, se filtra y se sonica mediante un aparato de ultrasonidos con el objetivo de romper las cadenas en fragmentos cortos y facilitar la intercalación. Para dicho propósito, hemos utilizado un sonicador Branson 450D (Emmerson Ultrasonic Corporation) de 400 W durante 12.5 minutos al 30 % de su potencia máxima y aplicando períodos de 25

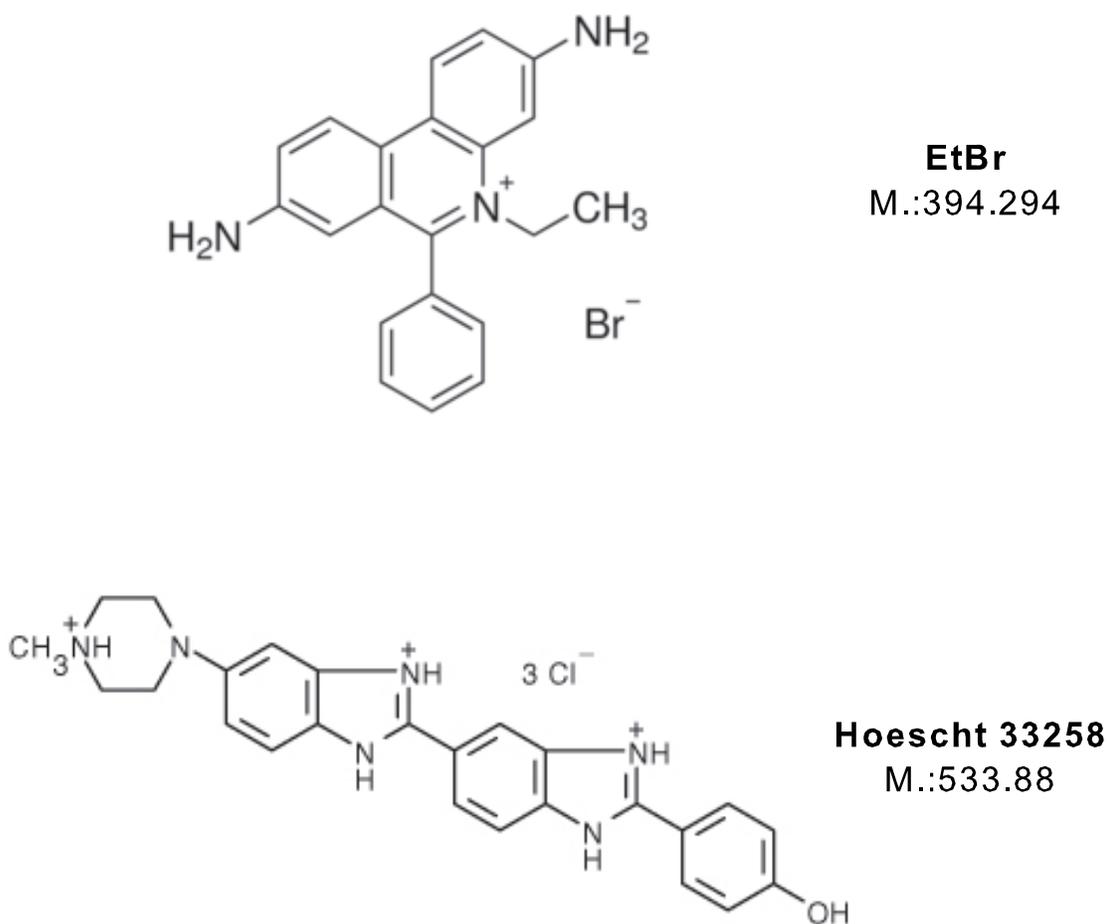


Figura 5.4: Ligandos de referencia (EtBr y Hoechst 33258).

ciclos de 30 s. Durante la sonicación, el recipiente que contiene la disolución de ADN se introduce en hielo para que disipe el calor generado.

Tras la sonicación se procede a determinar la concentración exacta de la disolución de ADN preparada. Para ello, se hace una dilución 1:100 de la disolución de concentración nominal 2 mM y se mide su absorbancia mediante espectroscopía ultravioleta-visible. Conociendo el coeficiente de extinción molar por nucleótido a la longitud de onda de 260 nm (característica para la absorbancia del ADN),  $\epsilon_{260} = 6600 M^{-1} \text{cm}^{-1}$ , y el camino óptico, se obtiene la concentración de la dilución preparada mediante la ley de Lambert-Beer.

A partir de esa disolución original de ADN (de concentración nominal de nucleótido 2 mM), y una vez conocida su concentración exacta, se prepara una disolución diluida de concentración de nucleótido 800  $\mu\text{M}$  utilizando como disolvente tampón TRIS. Esta disolución es la que posteriormente se utilizará para preparar las muestras a medir.

## 2) Preparación de las muestras con distinta relación Ligando/ADN

Se pretende preparar muestras de 4 ml de disoluciones con distinta proporción de concentraciones (globales) de ADN,  $c_{ADN}$ , y ligando,  $c_{lig}$ . Para preparar esas disoluciones, se mezclan:

a) 2 ml de la disolución de ADN 800  $\mu\text{M}$  (por lo que la concentración de ADN en la muestra de 4 ml será 400  $\mu\text{M}$ ).

b) 2 ml del resto de componentes, que estarán constituidos por el volumen de disolución de ligando adecuado para que la muestra posea la relación ligando/ADN requerida, y por disolvente hasta completar los 2 ml. En todos los casos dicho disolvente es el tampón TRIS descrito anteriormente, excepto para la muestra con ligando MA15 a cuyo disolvente anterior se le añade un 2% de DMSO para facilitar su disolución.

La cantidad de ligando (en  $\mu\text{g}$ ),  $m_c$ , contenido en cada una de las muestras se calcula a partir de la relación  $r = c_{lig}/c_{ADN}$  deseada, y viene dada por la ecuación

$$m_c = \frac{r \times c_{ADN} \times M_{lig} \times V_{muestra}}{M_{nuc}}. \quad (5.13)$$

En este trabajo,  $V_{muestra} = 4$  ml y  $c_{ADN} = 400$   $\mu\text{M} = 132$   $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ . Con esos valores, y conociendo que el peso molecular de un nucleótido es  $M_{nuc} = 330$  Da (g/mol), resulta  $m_c = 1.6 \times M_{complejo} \times r$ . Los pesos moleculares (en g/mol) de los ligandos utilizados son los siguientes:  $M_{EtBr} = 394$ ,  $M_{Hoechst} = 533.88$ ,  $M_{MA3} = 623.53$ ,  $M_{MA9} = 673.23$ , y  $M_{MA15} = 723.16$ .

Una vez mezclados los componentes y tras una suave agitación, sin dejar transcurrir ningún período de incubación, se procede a la medida de la viscosidad.

### 5.1.5. Resultados

Para cada tipo de ligando (EtBr, Hoechst, MA3, MA9, MA15) se prepararon una serie de muestras con diferente relación entre la concentración de ligando y la concentración de ADN,  $r = c_{lig}/c_{ADN}$ , tal y como se recoge en las Tablas 5.1 y 5.2. A dichas

muestras, así como a la disolución de ADN solo, se les midió la viscosidad en el densímetro-viscosímetro a una temperatura de 25°C. La viscosidad de la disolución de ADN resultó ser  $\eta_{ADN} = 0.947$  mPa·s mientras que los valores de las viscosidades de las diferentes muestras aparecen recogidos en la Tabla 5.1. A partir de esos valores de viscosidad se calcularon las relaciones de incrementos de viscosidad  $(\Delta\eta_{ADN+lig}/\Delta\eta_{ADN})^{1/3}$  que aparecen en la Tabla 5.2. Además, también se midieron las viscosidades de los disolventes empleados, que resultaron ser  $\eta_{TRIS} = 0.916$  mPa·s y  $\eta_{TRIS+2\%DMSO} = 0.967$  mPa·s.

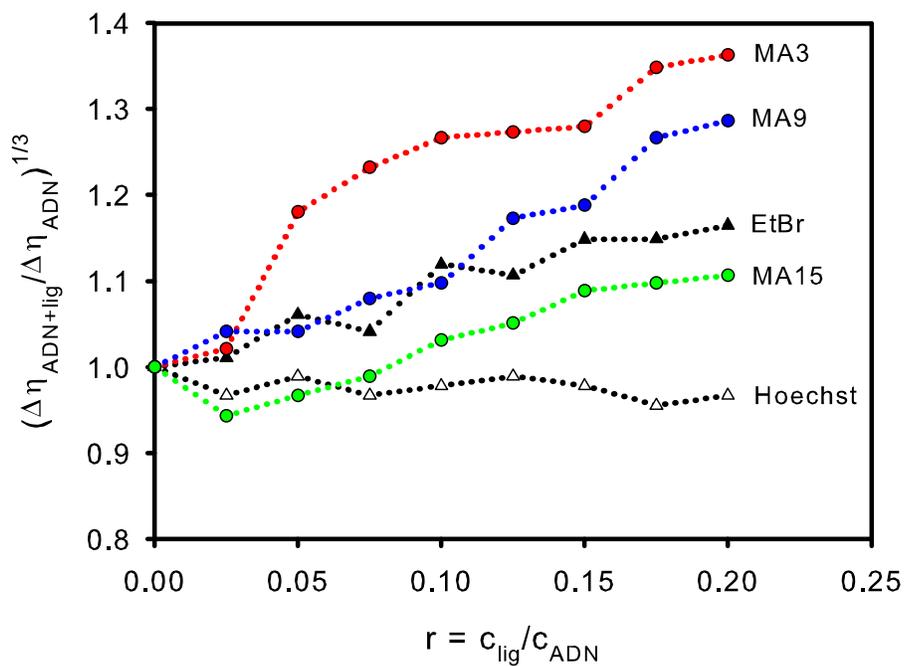
Relación $r$	$\eta_{ADN+lig}$ (mPa·s)				
	EtBr	Hoechst	MA3	MA9	MA15
0.025	0.947	0.944	0.949	0.951	0.993
0.05	0.946	0.946	0.967	0.951	0.995
0.075	0.956	0.944	0.974	0.955	0.997
0.1	0.949	0.945	0.979	0.957	1.001
0.125	0.959	0.946	0.980	0.966	1.003
0.15	0.955	0.945	0.981	0.968	1.007
0.175	0.963	0.943	0.992	0.979	1.008
0.2	0.962	0.944	0.994	0.982	1.009

Tabla 5.1: Viscosidad de las muestras estudiadas.

En la Figura 5.5 se representa la dependencia de  $(\Delta\eta_{ADN+lig}/\Delta\eta_{ADN})^{1/3}$  con la relación  $r$  para las diferentes muestras estudiadas. Como se observa, los tres ligandos de platino estudiados poseen propiedades intercalantes ya que para todos ellos se detecta un aumento de la viscosidad de la disolución. En particular, los ligandos MA3 y MA9 son especialmente buenos intercaladores ya que presentan un incremento de  $(\Delta\eta_{muestra}/\Delta\eta_{ADN})^{1/3}$  con  $r$  mucho más acusado que el estándar EtBr.

Relación $r$	$(\Delta\eta_{ADN+lig}/\Delta\eta_{ADN})^{1/3}$				
	EtBr	Hoechst	MA3	MA9	MA15
0	1	1	1	1	1
0.025	1.0104	0.9666	1.0211	1.0413	0.9431
0.05	1.0608	0.9891	1.15805	1.0413	0.9666
0.075	1.0413	0.9666	1.2322	1.0795	0.9891
0.1	1.1195	0.9780	1.2667	1.0977	1.0313
0.125	1.1065	0.9891	1.2733	1.1727	1.0511
0.15	1.1486	0.9780	1.2799	1.1882	1.0887
0.175	1.1488	0.9550	1.3484	1.2667	1.0977
0.2	1.1649	0.9666	1.3630	1.2864	1.1065

Tabla 5.2: Relación de incrementos de viscosidad de las muestras estudiadas.


 Figura 5.5: Evolución de la relación de incrementos de viscosidad de las muestras estudiadas con la relación  $r = c_{lig}/c_{ADN}$ . Símbolos:  $\triangle$  ligandos estándar,  $\circ$  ligandos organometálicos sintetizados.

### 5.1.6. Conclusiones

Se ha estudiado la interacción con el ADN y la posible actividad antitumoral de diferentes complejos organometálicos de Pt(II). Los estudios de viscosimetría llevados a cabo por nuestro Grupo confirman que los ligandos utilizados son capaces de intercalarse en la cadena de ADN, modificando la conformación de dicha cadena y, por tanto, la viscosidad de sus disoluciones. La configuración planar de dichos ligandos, tal y como lo revelan estudios de la estructura cristalina, favorecen su capacidad intercalante. De todos los ligandos estudiados, los ligandos MA3 y MA9 son particularmente buenos intercaladores como lo demuestra el aumento en la “relación de incrementos de viscosidad” que presentan sus disoluciones, aumento que es claramente mayor que el producido por el ligando estándar EtBr. La viscosimetría se muestra como la técnica más adecuada para estudiar el poder intercalador de moléculas pequeñas en la cadena de ADN.

## 5.2. Determinación de la estructura de la proteína PatZ

### 5.2.1. Introducción

Este trabajo es el resultado de una colaboración con los profesores Manuel Cánovas y Teresa de Diego del Grupo de Biotecnología del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología de la Universidad de Murcia. Nuestra aportación consistió en caracterizar la proteína PatZ, aislada por dicho Grupo de *Escherichia coli*, mediante las técnicas de dispersión de luz dinámica (DLS) y ultracentrifugación analítica (AUC). Además, llevamos a cabo el análisis hidrodinámico de un modelo de bolas tridimensional de la proteína mediante nuestro programa HYDROPRO, con el fin de validar la estructura propuesta por dicho Grupo para el tetrámero de la proteína.

La proteína PatZ es una acetiltransferasa perteneciente a la superfamilia GNAT de acetiltransferasas. Las acetiltransferasas son enzimas responsables de la acetilación de otras proteínas tras la síntesis de éstas en el ribosoma. A las modificaciones de las proteínas tras su síntesis ribosómica se les denomina modificaciones postraduccionales (PTM). Por tanto, la acetilación de proteínas mediatizada por PatZ es una PTM. Este tipo de acetilación es de gran importancia en la regulación metabólica de las células tanto procariotas como eucariotas. En *Escherichia coli*, PatZ es la única acetiltransferasa conocida y produce la acetilación del aminoácido lisina de la enzima acetil-CoA sintetasa (Acs). Aunque la modificación postraducciona l de las proteínas por acetilación de lisina se ha asociado tradicionalmente con organismos eucariotas, el interés en PTM en organismos procariotas, como la *E. coli*, ha aumentado enormemente [71]. Así, se sabe que muchas enzimas metabólicas están acetiladas en *Escherichia coli* [72].

Como ya se ha mencionado, PatZ es la única enzima conocida en *E. coli* implicada en la acetilación postraducciona l de proteínas y su función es catalizar la transferencia de un grupo acetilo de acetil-CoA a una amina primaria [73]. Uno de los sustratos de PatZ más conocidos es la Acs, una enzima clave en el metabolismo procariótico y eucariótico y que está regulada por acetilación en bacterias tales como *Salmonella enterica*, *Rhodopseudomonas palustris* o la propia *Escherichia coli* [74–76]. Recientemente se ha descrito que en *E. coli* PatZ se autoacetila [72,77], aunque no se conocen bien las consecuencias de esta autoacetilación. En cuanto a sus características estructurales, PatZ es una proteína mul-

tidominio con 886 residuos (98 kDa). Como muchos miembros de la superfamilia GNAT es una proteína oligomérica [78].

El objetivo del estudio fue determinar las características cinéticas, bioquímicas y estructurales de PatZ y su efecto sobre la regulación de Acs por acetilación de lisina. Nuestro Grupo se centró en la caracterización estructural mediante las técnicas mencionadas anteriormente.

### 5.2.2. Metodología

La obtención y purificación de la proteína para los estudios realizados están descritos en el trabajo [79]. La concentración de la proteína fue  $10 \mu\text{M}$  en tampón fosfato de potasio 50 mM,  $\text{pH} = 7.5$ , que contenía NaCl 100 mM. La proteína se conservó a una temperatura de  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso.

#### 5.2.2.a. Procedimiento de medida

Como ya se ha comentado en la introducción, las medidas llevadas a cabo por nuestro Grupo de Investigación fueron de DLS y de AUC. Las primeras se realizaron en el instrumento Zetasizer Nano (Malvern Instruments) cuyas características fueron descritas en el Capítulo 2, y las segundas en la ultracentrífuga analítica Optima XL-I (Beckman Coulter).

- Experimentos de DLS: temperatura de trabajo,  $20^\circ\text{C}$ . El procedimiento de medida consistió en 12 medidas de 11 *runs* cada una, con un tiempo de duración de cada *run* de 30 s, por lo que el tiempo de adquisición de los datos fue de 11 minutos. Los datos experimentales fueron analizados por el propio software del aparato que utiliza el procedimiento de análisis para funciones de correlación CONTIN [16]. Como ya se expuso en el Capítulo 2, se obtienen dos tipos de función de distribución que expresan la cantidad de soluto de un tamaño (radio hidrodinámico) dado en términos bien de contribución a la intensidad de luz dispersada o bien como fracción de masa. La primera es particularmente sensible a la presencia de grandes partículas incluso si su población es muy pequeña, mientras que la segunda detecta las principales especies de la muestra. Una limitación de las distribuciones derivadas de DLS es la representación en escala logarítmica para los picos ya que si sus tamaños no difieren notablemente, los componentes de una muestra paucidispersa no pueden ser

diferenciados. Sin embargo, el modo de trabajo de proteínas en el software Zetasizer, específico para muestras de proteínas, fue útil para nuestros propósitos.

- Experimentos de AUC: los experimentos se llevaron a cabo en el mismo tampón y temperatura mencionados anteriormente con una concentración de proteína PatZ de  $10 \mu\text{M}$ . El volumen de muestra utilizado para rellenar los sectores de las celdas de la ultracentrífuga (de 12 mm de camino óptico) fue  $400 \mu\text{l}$ . El tipo de experimento fue de velocidad de sedimentación utilizando una velocidad del rotor de 40000 rpm (rotor del tipo An50 Ti de ocho posiciones). El sistema de detección fue absorbancia, utilizando una longitud de onda de 280 nm. La duración del experimento fue 8 h y se obtuvieron 400 *scans*, es decir, 400 registros del perfil de concentración en la celda. Para obtener las distribuciones de coeficientes de sedimentación se utilizó el método de distribución continua  $c(s)$  [80] implementado en el *software* SEDFIT [81]. Como las mediciones se realizaron a  $20^\circ\text{C}$ , los coeficientes de sedimentación determinados,  $s$ , son prácticamente idénticos al coeficiente estándar,  $s_{20,w}$ . A diferencia de DLS, AUC tiene una excelente resolución, permitiendo la diferenciación de los componentes de la muestra (picos en la distribución  $c(s)$ ). Además de coeficientes de sedimentación bastante fiables, el procedimiento de velocidad de sedimentación de AUC también proporciona estimaciones aproximadas de los pesos moleculares.

### 5.2.3. Resultados

Los resultados que se presentan a continuación han sido publicados en el trabajo mencionado anteriormente [79]. Dicho trabajo abarca varios aspectos del mecanismo de autoacetilación de la proteína PatZ, siendo uno de ellos la caracterización de los cambios estructurales experimentados por PatZ tras la acetilación. Para ese propósito se llevaron a cabo diversos estudios, una parte de los cuales, basados en las técnicas de DLS y AUC así como en el análisis computacional de modelos hidrodinámicos, fueron realizados por nuestro Grupo de Investigación.

#### 5.2.3.a. Determinación del estado de oligomerización

En primer lugar cabe mencionar que el Grupo de Biotecnología determinó el peso molecular de la proteína nativa mediante cromatografía de permeación en gel (GPC o SEC). En ausencia de acetyl-CoA, el cromatograma de la proteína purificada presentaba

un pico principal a un tiempo de elución de 8.2 min y un pico secundario (“hombro”) a 7.3 min a los que se les asoció unos pesos moleculares aparentes  $M = 410 \pm 20$  kDa y  $M = 798 \pm 40$  kDa, respectivamente, que se corresponden con las formas tetramérica y octamérica de la proteína. Por contra, a una concentración saturada de acetyl-CoA (1.5 mM), el pico principal aparecía a un tiempo de elución de 7.3 min (octámero) y el pico secundario (“hombro”) a 8.2 min (tetramero), lo que indica un predominio de la forma octamérica.

La proteína purificada se analizó también mediante DLS y AUC. Tanto el coeficiente de difusión,  $D$ , procedente de DLS, como el coeficiente de sedimentación,  $s$ , procedente de AUC permiten extraer información estructural de la proteína. Ambos coeficientes están relacionados con el coeficiente de fricción,  $f$ , mediante las ecuaciones 1.3 ( $k_B T/f = RT/(N_A f)$ ) y 1.11 ( $M(1 - \bar{v}\rho)/(N_A f)$ ) que se combinan para dar lugar a la conocida ecuación de Svedberg 1.12 ( $s/D = M(1 - \bar{v}\rho)/RT$ ), todas ellas descritas en el Capítulo 1. Recordemos que  $R$  es la constante de los gases perfectos,  $T$  la temperatura absoluta,  $N_A$  el número de Avogadro,  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $M$  el peso molecular de la proteína,  $\bar{v}$  su volumen específico parcial, y  $\rho$  la densidad del disolvente tampón. Es costumbre expresar el coeficiente de fricción a través del radio hidrodinámico equivalente,  $r_h = f/(6\pi\eta_0)$ , donde  $\eta_0$  es la viscosidad del disolvente tampón. El *software* SEDNTERP [81] se utilizó para estimar  $\eta_0 = 1.00$  cP y  $\rho = 1.01$  g/cm<sup>3</sup> a partir de la composición del disolvente, así como para estimar  $M$  y  $\bar{v}$  de la proteína monomérica a partir de la secuencia de aminoácidos del monómero de PatZ:  $M = 98.0$  kDa y  $\bar{v} = 0.742$  cm<sup>3</sup>/g.

La Figura 5.6 muestra los resultados de las medidas de DLS. La distribución en intensidad (Figura 5.6A), muestra un pico principal en torno a  $r_h = 10$  nm y una serie de picos a tamaños mucho mayores (más de 100 nm) que corresponden a la aparición de agregados. En cambio, la distribución en volumen o masa (Figura 5.6B) presenta un único pico en torno a  $r_h = 10$  nm, lo que indica que la cantidad de agregados es pequeña y se puede obviar. El pico significativo en torno a  $r_h = 10$  nm corresponde a la proteína en forma oligomérica. El análisis del pico mediante el *software* del Zetasizer mostraba su correspondencia con material polidisperso con  $M = 420 \pm 150$  kDa y  $r_h = 8 \pm 2$  nm. Un análisis con el modo “Protein workshop” que posee el instrumento indicaba la existencia de varios oligómeros.

La Figura 5.7 muestra los resultados obtenidos mediante AUC. La evolución temporal de los perfiles de concentración (Figura 5.7A) indica que las 8 h que duró el experimento fueron suficientes para que la proteína sedimentara completamente. Por otro lado, el

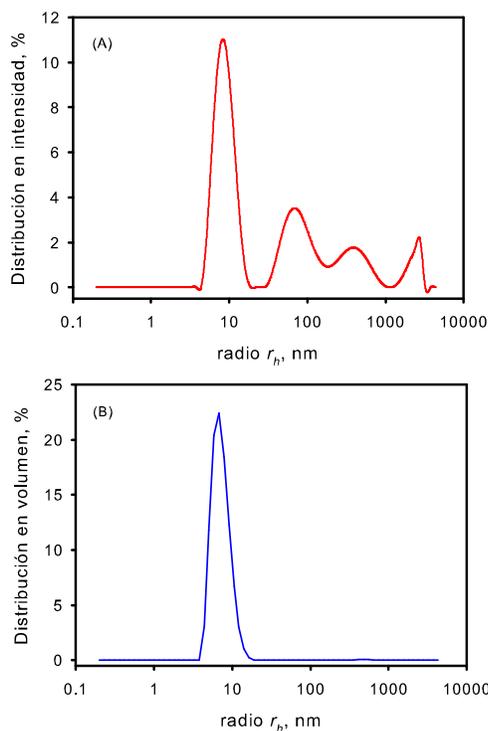


Figura 5.6: Distribuciones de tamaño obtenidos por DLS: (A) Distribución en intensidad y (B) Distribución en masa.

pequeño y bastante uniforme valor de los residuales (Figura 5.7B), sin desviaciones significativas, indica la buena calidad del ajuste realizado por el programa SEDFIT para obtener la distribución de coeficientes de sedimentación. Por último, la Figura 5.7C muestra la distribución de coeficientes de sedimentación. Su principal característica es el pico de la función de distribución  $c(s)$  correspondiente a  $s = 12.4$  S y  $M \simeq 446$  kDa. Los resultados también muestran otros dos picos menores, pero significativos, uno con  $s = 18.0$  S y  $M \simeq 800$  kDa y el otro con  $s = 4.6$  S y  $M \simeq 97$  kDa.

Las distribuciones en intensidad y volumen del radio hidrodinámico obtenidas mediante DLS indican la existencia de algunos agregados de la proteína que, de acuerdo al *software* del Zetasizer no representan más de un 2% de fracción en peso. De hecho, dicho material no aparece en la distribución en volumen. Los resultados de las medidas de AUC confirman que la cantidad de dichos agregados es despreciable, no apareciendo picos significativos a valores de  $s$  elevados en la distribución  $c(s)$ . En definitiva, la proteína tetramérica PatZ oligomeriza a una forma octamérica mediante acetilación.

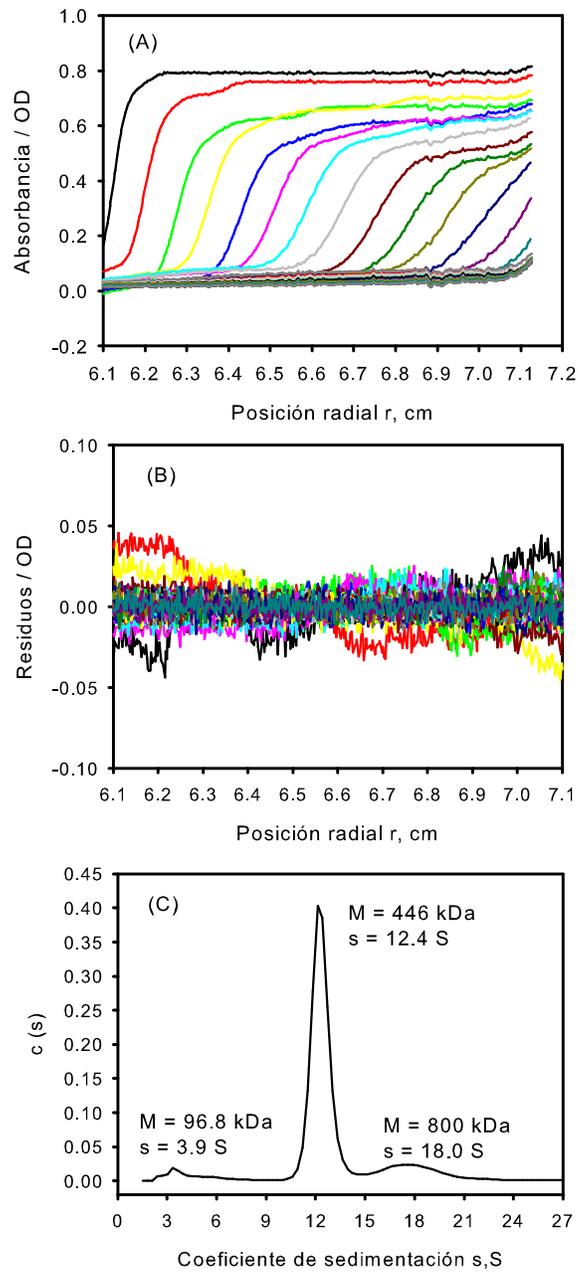


Figura 5.7: Resultados obtenidos de AUC.

### 5.2.3.b. Validación del modelo tetramérico con HYDROPRO

La hidrodinámica proporciona información esencial sobre la estructura de las proteínas. Durante muchos años, se han utilizado coeficientes hidrodinámicos para conocer la conformación global (por ejemplo, globular, fibrosa, desnaturalizada, etc.) de proteínas en disolución. En los últimos años, se han desarrollado metodologías y herramientas computacionales para calcular las propiedades de la disolución a partir de la estructura detallada de las proteínas (a nivel de residuos e incluso átomos) [82–84]. Para ello, aparte de los datos de las propiedades del soluto y del disolvente, es necesario un archivo con formato PDB de las coordenadas atómicas a partir de las cuales construir un modelo de bolas sobre el que efectuar los cálculos. Estas herramientas computacionales son ahora ampliamente utilizadas para validar estructuras obtenidas mediante cristalografía, RMN o métodos *in silico*, comparando los resultados determinados experimentalmente con los obtenidos computacionalmente. Para la predicción de coeficientes hidrodinámicos simples (coeficientes de difusión y sedimentación, viscosidad intrínseca, etc.), como en el caso presente, la herramienta más utilizada es HYDROPRO [82, 84]. El cálculo de los coeficientes de sedimentación requiere que se conozcan los valores de la densidad y viscosidad del disolvente,  $\rho$  y  $\eta_0$ , la temperatura absoluta,  $T$ , el volumen específico parcial del soluto,  $\bar{v}$  y el peso molecular del soluto,  $M$ , todos los cuales están disponibles en nuestro caso. El resultado para el radio hidrodinámico,  $r_h$ , es independiente de estas cantidades y se calcula directamente a partir del conjunto de coordenadas.

Para proponer un modelo para el monómero y el tetramero de PatZ, el Grupo de Biotecnología utilizó, respectivamente, los programas **Phyre2**, que realiza *foldings* de proteínas, y **ClusPro 2.0** [85], que realiza *docking* de proteínas, en base a las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas de la proteína. Dichos programas son gratuitos y se ejecutan a través de las páginas web <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> y <http://nrc.bu.edu/cluster>, respectivamente. A partir de los modelos para el monómero y el tetramero así generados (ver la Figura 5.8) y utilizando la versión 10 de HYDROPRO [84], se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 5.3. El acuerdo entre el valor experimental y el calculado para los coeficientes de sedimentación y el radio hidrodinámico fue excelente con diferencias menores del 5%. Considerando la diversidad de aspectos involucrados en (i) la predicción de la estructura *in silico* de las formas oligoméricas de PatZ, (ii) los experimentos de DLS y especialmente de AUC y (iii) el procesamiento de datos, se puede afirmar que los experimentos y cálculos hidrodinámicos validan comple-

tamente los estudios de modelado molecular y acoplamiento (*docking*) realizados *in silico* para la unidad monomérica de PatZ y su ensamblado tetramérico.

Con una metodología aproximada aún más simple, se calculó el radio hidrodinámico del modelo tetramérico utilizando el *software* de visualización molecular **Protein workshop viewer** [86] y teniendo en cuenta la superficie macromolecular [87]. El radio medio calculado fue  $7.03 \pm 0.5$  nm, que está de acuerdo con los resultados obtenidos mediante DLS (Figura 5.6) y AUC (Figura 5.7), así como con el cálculo más preciso de HYDROPRO.

Propiedad	Técnica	Tetramero	Monómero	Octámero
Masa (KDa)	DLS	$<420^a$		
	AUC	$\sim 446^b$	$\sim 97^b$	$\sim 800^b$
	Secuencia	392	98	784
s (S)	AUC	12.4	4.6	18.0
	HYDROPRO	12.9	5.2	
$r_h$ (nm)	DLS	$<7.7^a$		
	AUC	7.3	4.1	9.9
	HYDROPRO	6.9	4.3	

Tabla 5.3: Propiedades experimentales y calculadas a partir del modelado hidrodinámico. <sup>a</sup> Promedio sobre oligómeros (el valor real debe ser ligeramente menor); <sup>b</sup> valores aproximados procedentes de AUC.

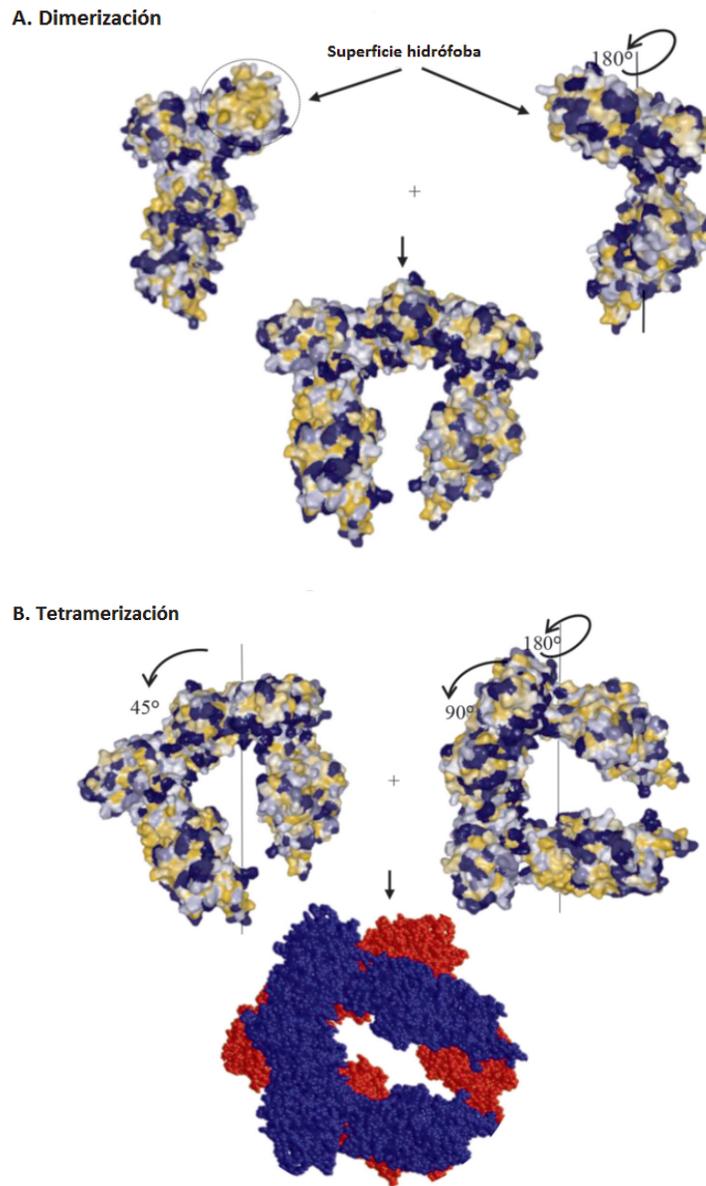


Figura 5.8: Ensamblaje de los números de PatZ y estructura tetramérica final.

### 5.2.4. Conclusiones

En contraste con las enzimas eucariotas, las acetiltransferasas procariotas adoptan varias estructuras cuaternarias. Se ha encontrado que una serie de miembros de la superfamilia GNAT son estructuralmente multiméricos, oligomerizando de un monómero a una forma tetramérica en presencia de acetil-CoA. Sin embargo, el hecho de que PatZ estuviera principalmente en forma tetramérica estable en ausencia de acetil-CoA demostró que el proceso de tetramerización era independiente de la unión al ligando acetil-CoA. Al contrario, la presencia de acetil-CoA fue necesaria para la formación del estado octamérico como se desprende de las Figuras 5.6 y 5.7. Los experimentos hidrodinámicos de DLS y AUC confirman la naturaleza oligomérica y la composición de la proteína, que es predominantemente tetramérica, con algunos octámeros, y una cantidad aún menor pero todavía detectable de monómeros observada por AUC. Como se observa en la tabla 5.3, los pesos moleculares aproximados obtenidos mediante AUC están en una proporción de 1:4:8. El valor proporcionado por DLS (420 kDa), que corresponde a un promedio, es ligeramente superior al del tetrámero obtenido de la secuencia (392 kDa) porque hay más octámero que monómero, en comparación con las otras dos especies.

En cuanto al radio hidrodinámico,  $r_h$ , los valores de cada especie se determinaron a partir del coeficiente de sedimentación, utilizando los valores exactos de  $M$ ,  $\bar{v}$ ,  $\rho$ ,  $T$  y  $\eta_0$  (Tabla 5.3). De nuevo, el  $r_h$  obtenido por DLS para el tetrámero fue ligeramente superior al del tetrámero obtenido de la secuencia. Por lo tanto, los resultados de las dos técnicas hidrodinámicas son consistentes. Además, es importante resaltar que los resultados hidrodinámicos coinciden con los del análisis de cromatografía de filtración en gel. Como ya se ha mencionado, esta técnica mostró que, en ausencia de acetil-CoA, la PatZ purificada eluyó principalmente como un tetrámero con cierta presencia de octámeros y un peso molecular aparente de  $410 \pm 20$  kDa y  $798 \pm 40$  kDa, respectivamente.

El estudio llevado a cabo por el Grupo de Biotecnología demuestra por vez primera la regulación estructural de una acetiltransferasa por autoacetilación en un organismo procariota, un fenómeno postraduccional común en organismos eucariotas. La autoacetilación de PatZ se correlaciona con su estado de oligomerización y su estabilidad estructural, así como con su actividad. De la caracterización estructural llevada a cabo por nuestro Grupo mediante técnicas físico-químicas (DLS y AUC), se desprende que PatZ es un homotetrámero que forma un octámero termoestable mediante autoacetilación.

## 5.3. Caracterización de medios viscosos con importancia en reproducción

### 5.3.1. Introducción

El trabajo que se presenta a continuación es parte de una colaboración con el Grupo de Fisiología de la Reproducción de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia dirigido por los profesores María Pilar Coy y Joaquín Gadea. Nuestra aportación consistió en caracterizar mediante medidas reológicas el comportamiento viscoso de fluidos biológicos extraídos del aparato reproductor femenino de la especie porcina, así como de fluidos artificiales preparados en el laboratorio y con características similares a los fluidos biológicos.

En los últimos años se han desarrollado muchos estudios para investigar la forma en que los espermatozoides se orientan dentro del tracto genital femenino y encuentran el camino hacia los ovocitos. Se han reconocido al menos, tres mecanismos diferentes de guía del esperma: termotaxis, reotaxis y quimiotaxis [88]. Específicamente, el papel de la reotaxis se ha vuelto relevante debido a los resultados mostrados en estudios recientes [89–91]. Estos estudios revelan cómo la reotaxis conduce a la orientación del esperma dentro de un gradiente de flujo de fluido, de modo que en el tracto reproductivo femenino, los espermatozoides nadan contra el flujo del fluido genital femenino [91, 92].

El comportamiento reotáctico de los espermatozoides es influenciado por varias características del líquido genital. La viscosidad del líquido genital femenino cambia durante el ciclo estral y es modulada por factores como la concentración hormonal, especialmente la progesterona, las células muertas y otros factores como el pH [92–96]. Las mucinas y los glicosaminoglicanos (GAG) son componentes importantes del fluido oviductal. Las mucinas, que son las principales glicoproteínas que componen el líquido genital, son moléculas lineales largas y flexibles y tienen un papel esencial en la confección de la viscosidad, participando así en el establecimiento de la orientación espermática [93, 97]. Además, la viscosidad del líquido genital también se debe al gran tamaño de los GAGs, mientras que la elasticidad resulta del enmarañamiento de las moléculas [93].

Algunos autores han sugerido que la viscosidad del fluido en el tracto reproductor femenino también podría ayudar a seleccionar los espermatozoides de mejor calidad que llegan al oviducto en la proximidad del óvulo [89, 98, 99]. Los espermatozoides nadan en

el flujo, se distribuyen en subpoblaciones heterogéneas y permanecen dentro de algunas regiones de bajo cizallamiento para evitar ser arrastrados por la resistencia al flujo [89].

En el cerdo, no hay información relacionada con el uso de medios de alta viscosidad. Además, se desconoce la viscosidad de los biofluidos claves, como los fluidos uterinos u oviductales que entran en contacto con los gametos, y son los medios naturales donde se producen acontecimientos reproductivos relevantes. Sin embargo, para imitar las condiciones *in vivo* con el fin de mejorar la investigación y las técnicas de reproducción, algunos estudios *in vitro* han incorporado un factor viscoso en los medios de incubación, que suelen ser de una viscosidad baja cercana a la del agua [100]. En este sentido se han utilizado acrilamida, extractos de plantas en polvo, ácido hialurónico, carboximetilcelulosa o metilcelulosas para aumentar la viscosidad de los medios para estudios *in vitro* en diferentes especies [100–104]. El Grupo de Fisiología de la Reproducción de la Universidad de Murcia, utilizando un extracto vegetal en polvo para aumentar la viscosidad de los medios de comunicación, concluyó que el aumento de la viscosidad es deseable para mejorar la capacidad de los espermatozoides para moverse, unirse y penetrar el ovocito *in vitro* [100]. Entre las macromoléculas mencionadas que se pueden usar para aumentar la viscosidad, las propiedades de la metilcelulosa son únicas, haciendo de esta sustancia el aditivo apropiado para aumentar la viscosidad. La metilcelulosa es celulosa sustituida de cadena larga con aproximadamente un 30 % de sus grupos hidroxilo en forma de éter metílico. Esta sustitución de celulosa por grupos hidroxilo confiere una mayor resistencia de los medios al ataque microbiano. Además, la metilcelulosa es esencialmente inodora y sin sabor, tiene una calidad y consistencia uniformes, es estable durante largos períodos de tiempo, fácil de obtener y barata. Por este motivo, esta sustancia no tóxica es ampliamente utilizada en las industrias farmacéutica y de alimentos, y ya ha sido probada con diluyentes de esperma en estudios humanos *in vitro* [103,105]. Cabe mencionar que los estudios realizados con espermatozoides humanos y ovocitos han confirmado la seguridad de la utilización de metilcelulosa en los procedimientos de ICSI (técnica de fecundación *in vitro* de última generación) [106], lo que demuestra que no produce daño en el ADN del esperma.

Los objetivos de este trabajo fueron medir las viscosidades de los fluidos oviductales en el momento de la fertilización, como medios fisiológicos donde se produce la fertilización y el desarrollo temprano del embrión, y desarrollar un medio artificial mediante la adición de metilcelulosa que se asemeje al fluido natural. Con este enfoque evaluamos el uso de metilcelulosa como una sustancia potenciadora de la viscosidad para su uso en medios para la fertilización de espermatozoides porcinos.

### 5.3.2. Metodología

La medida de la viscosidad de los fluidos biológicos se llevó a cabo sobre once muestras de fase folicular tardía (A2) y sobre veinticuatro muestras de fase lútea temprana (A3). Las medidas de fluidos artificiales preparados por el Grupo de Fisiología de la Reproducción de la Universidad de Murcia, se repitieron tres veces.

#### 5.3.2.a. Fluidos biológicos. Toma de muestras

El fluido oviductal porcino fue obtenido de la fase folicular tardía (fase preovulatoria A2) y la fase lútea temprana (fase postovulatoria A3) extraídos de cerdas jóvenes recuperadas en matadero (CEFUSA, Pliego, Murcia) de acuerdo al método descrito previamente por Carrasco y col. (2008) [107].

Introducimos la punta de una pipeta de 50  $\mu\text{l}$  en el interior de la ampolla, parte del aparato reproductor de la cerda de donde se extrae el fluido medido en este trabajo (véase Figura 5.9), y succionamos dicho fluido como puede observarse en la Figura 5.10. Esta extracción tiene que hacerse lentamente para evitar la rotura de las paredes interiores de la ampolla y por consiguiente que la parte del fluido importante para medir se contamine con células. A medida que se va extrayendo, el fluido se va depositando en un vial *ependorf* que se encuentra en hielo, para mantener el fluido frío. Una vez aspirado todo el fluido, éste se centrifuga a 7000 rpm durante 10 minutos y a una temperatura de 4°C con una centrifuga modelo 5810 R. En esta etapa de centrifugación, se eliminan los restos celulares que pudieran encontrarse en el fluido oviductal. Tras ello, se realizan las medidas de viscosidad de la muestra de fluido oviductal limpia en el reómetro o se congela a -80°C hasta su uso para las mediciones de viscosidad. Un esquema del protocolo de medida puede observarse en la Figura 5.11.

#### 5.3.2.b. Fluidos artificiales. Preparación de muestras

Para las medidas de viscosidad de fluidos artificiales, se prepararon los siguientes medios:

1. Medio Tyrode, el cual se utilizó como control, que consistía en NaCl 116 mM, KCl 3.1 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.4 mM, NaH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.3 mM, glucosa 5 mM, lactato sódico 21.7 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 20 mM, canamicina 582.6 mM y fenol 334.38

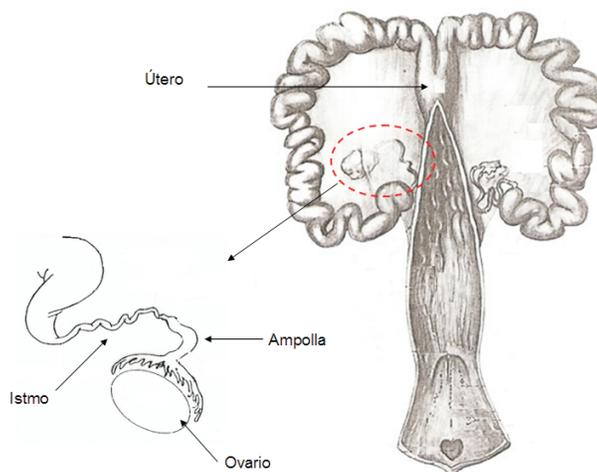


Figura 5.9: Partes del aparato reproductor femenino de la especie porcina [108].

mM rojo. Antes del uso, el medio de Tyrode se suplementó con 3 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) y 1 mM de EGTA. El pH del medio fue de 7.4.

2. Al medio Tyrode se le añadió 0.5 % w/v de metilcelulosa (w/v significa peso/volumen).
3. Al medio Tyrode se le añadió 1 % w/v de metilcelulosa.

Todos los productos químicos fueron adquiridos a Sigma-Aldrich a menos que se indique lo contrario.

### 5.3.2.c. Procedimiento de medida

Para la medidas de la viscosidad tanto de los medios biológicos como de los artificiales se utilizó el Reómetro MCR 102 de Anton Paar cuyas características están descritas en el Capítulo 4 de Reología. La geometría utilizada fue la cono-plato con el sensor cónico CP25-1 (diámetro 25 mm y ángulo 1°). De este modo, se ajusta la temperatura del plato (estátor) a 38°C y se deposita la muestra. Una vez que se coloca el sensor (cono rotor) a la posición de medida, se recubre con silicona para evitar que la muestra se evapore. Tras ello, realizamos una única medida sobre las muestras de fluidos oviductales y tres medidas sobre las muestras de medios artificiales. En los experimentos se varió el gradiente de cizalla de 0.1 s<sup>-1</sup> a 500 s<sup>-1</sup>.



Figura 5.10: Extracción del fluido oviductal.

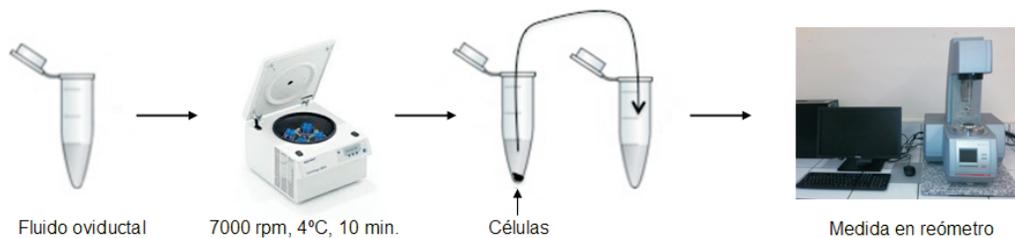


Figura 5.11: Método de extracción del fluido oviductal para su medición en el reómetro.

### 5.3.3. Resultados

Los resultados que se presentan a continuación forman parte de la publicación a la que dio lugar la colaboración con el Grupo de Fisiología de la Reproducción [109].

La Figura 5.12 muestra las curvas de viscosidad de los medios artificiales suplementados con metilcelulosa (0% (control), 0.5% y 1%) y de los fluidos oviductales de la fase folicular tardía (A2) y la fase lútea temprana (A3) del ciclo reproductivo de la cerda. Como se observa, la viscosidad del medio Tyrode se mantiene relativamente constante a medida que aumenta el gradiente de cizalla aplicado, a diferencia de la viscosidad de los fluidos oviductales y los medios Tyrode suplementados con metilcelulosa, la cual va disminuyendo conforme aumenta el gradiente de cizalla. Es decir, mientras que el medio Tyrode tiende a ser newtoniano (excepto a gradientes de cizalla muy pequeños), los otros

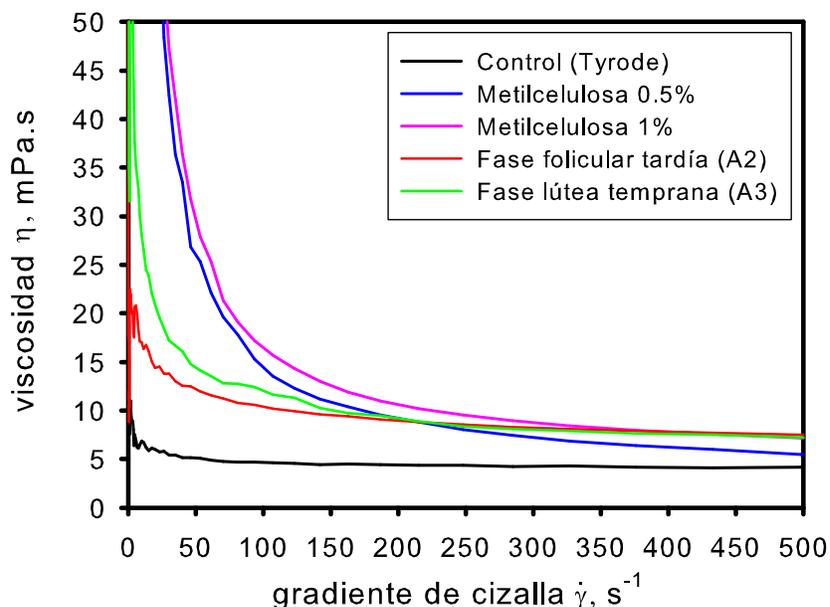


Figura 5.12: Curvas de viscosidad obtenidas de las medidas reométricas de los diferentes fluidos biológicos y artificiales (representación lineal).

fluidos presentan un marcado comportamiento fluidizante. A bajos gradiente de cizalla ( $<10 \text{ s}^{-1}$ ) se observa una diferencia significativa de la viscosidad en las muestras analizadas. El medio Tyrode suplementado con 0.5% y 1% con metilcelulosa muestra una viscosidad mucho mayor que el medio de control (Tyrode) y que los fluidos oviductales A2 y A3. Sin embargo, a gradientes de cizalla altos ( $>10 \text{ s}^{-1}$ ), estas diferencias entre valores de viscosidad tienden a minimizarse. Como también puede observarse en la Figura 5.12, la viscosidad del fluido oviductal de la fase lútea temprana (A3) era mucho mayor que el fluido de la fase folicular tardía (A2).

Las características de las curvas anteriores se aprecian mejor en las representaciones doble-logarítmicas de las Figuras 5.13 y 5.14 en donde, para un mejor análisis, se han separado las curvas correspondientes a los fluidos artificiales (Figura 5.13) de las correspondientes a los fluidos biológicos (Figura 5.13). La primera característica a destacar es la elevada irregularidad de todas las curvas, dentro de la tendencia general a disminuir la viscosidad con el gradiente de cizalla. Llama la atención, en las curvas correspondientes a los fluidos biológicos, el brusco incremento en el valor de la viscosidad que se produce a  $\dot{\gamma} = 1 \text{ s}^{-1}$ , para luego continuar con la evolución descendente que tenía anteriormente y

### 5.3. CARACTERIZACIÓN DE MEDIOS VISCOSOS CON IMPORTANCIA EN REPRODUCCIÓN

---

que es típica del comportamiento fluidizante. En los fluidos artificiales de metilcelulosa, este salto en torno a  $\dot{\gamma} = 1 \text{ s}^{-1}$  también parece producirse, aunque es muy pequeño y poco apreciable en la escala en la que están representadas las curvas. Para estos fluidos existe inicialmente (a gradientes pequeños) una meseta newtoniana. Por el contrario, los fluidos biológicos se comportan de forma claramente fluidizante en todo el rango de gradientes de cizalla estudiados por lo que son buenos candidatos a cumplir la ley de Ostwald. En cuanto al medio de control Tyrode, como ya se comentó con anterioridad, es solo ligeramente fluidizante y a gradientes mayores que  $\dot{\gamma} = 1 \text{ s}^{-1}$  tiende a presentar un comportamiento prácticamente newtoniano. Obviando las irregularidades encontradas, hemos procedido a ajustar las curvas experimentales mediante el programa **RheoFit**. Las Figuras 5.13 y 5.14 recogen, junto a las curvas experimentales, las curvas correspondientes a los ajustes. En el caso de los fluidos artificiales, el modelo de Cross es el único capaz de ajustar de forma razonable su comportamiento (Figura 5.13). En el caso de los fluidos biológicos, hemos elegido el modelo de Ostwald ya que éste los ajusta aceptablemente bien y, por su sencillez, es el preferido cuando se dan las condiciones adecuadas. Evidentemente, como ya se puso de manifiesto en el Capítulo 4, el modelo que va a ajustar mejor todas las curvas es el de Cross, puesto que es el que tiene un mayor número de parámetros. La Tabla 5.4 recoge los valores de los parámetros de los modelos de Cross y Ostwald obtenidos del ajuste con **RheoFit** de los fluidos artificiales y biológicos respectivamente.

Modelo $\rightarrow$	Ostwald		Cross			
Fluido	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n	K' (s <sup>m</sup> )	m	$\eta_0$ (Pa·s)	$\eta_\infty$ (Pa·s)
Control (Tyrodes) 0.5 %	–	–	241	1.481	$6.27 \times 10^3$	5.527
Metilcelulosa 0.5 %	–	–	3.841	1.334	$1.787 \times 10^4$	5.430
Metilcelulosa 1.0 %	–	–	3.126	1.421	$2.291 \times 10^4$	7.157
Fase folicular tardía (A2)	36.84	0.687	–	–	–	–
Fase lútea temprana (A3)	78.93	0.575	–	–	–	–

Tabla 5.4: Valores óptimos de los parámetros de los modelos de Cross y Ostwald para los fluidos artificiales y biológicos, respectivamente, obtenidos mediante el ajuste de los datos experimentales con el programa **RheoFit** en “modo automático”.

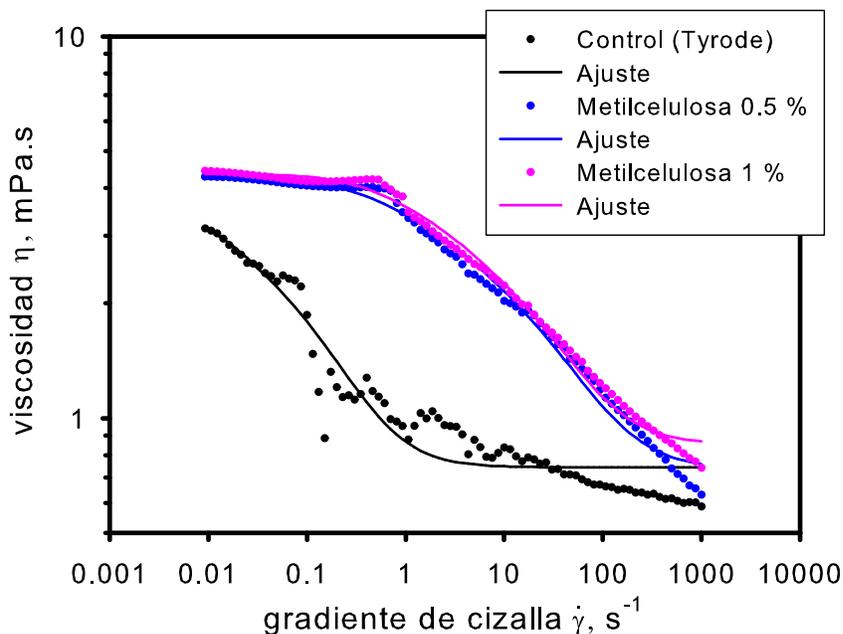


Figura 5.13: Ajuste con RheoFit mediante el modelo de Cross de las curvas de viscosidad de los diferentes fluidos artificiales (representación log-log).

### 5.3.3.a. Implicaciones biológicas

Bajo condiciones *in vivo*, tenemos que tomar en consideración al menos, el movimiento ciliar de las células epiteliales del oviducto, la contracción del músculo liso en la pared oviductal y el movimiento de los espermatozoides para modificar el esfuerzo [94]. Se espera que el esfuerzo en el oviducto sea bajo y modulado por pequeños cambios en la temperatura [110,111]. Nosotros observamos que la viscosidad de los fluidos oviductales durante la fase folicular tardía era más baja que la de la fase lútea temprana. Este hecho está en concordancia con el incremento del contenido de proteína detectado en la fase postovulatoria [107] y el incremento en el volumen de fluido en el oviducto durante la fase folicular [112]. Además, otras circunstancias, como el hecho de que haya fertilización, influirán indudablemente en la viscosidad del fluido resultante.

Nuestros resultados revelan un efecto beneficioso de elevar la viscosidad en un medio no capacitante (es decir, aquel medio que no presenta las condiciones óptimas para la fertilización). Estudios previos [98,103], describen cómo el comportamiento de la movilidad del espermatozoide humano cambia por incubación en un medio viscoso comparado con el medio

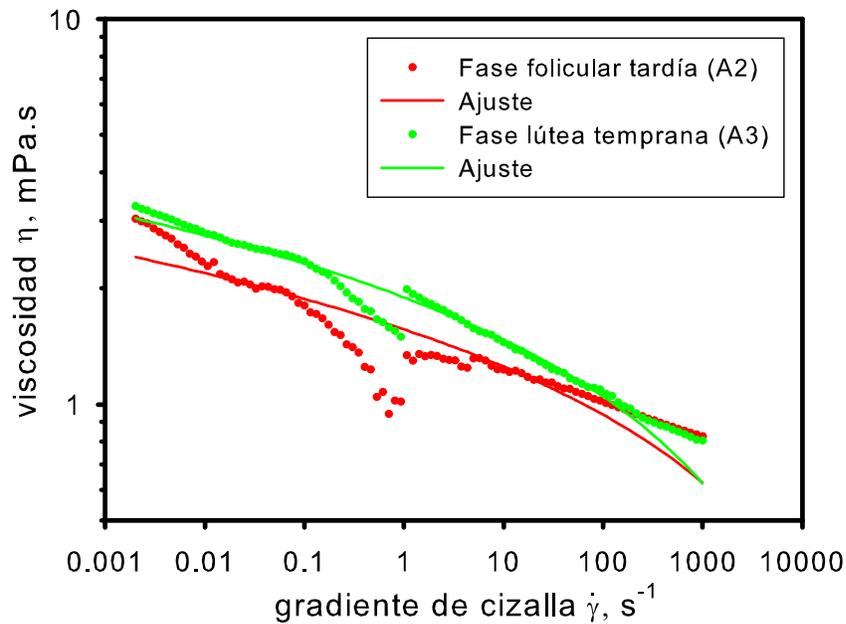


Figura 5.14: Ajuste con RheoFit mediante el modelo de Ostwald de las curvas de viscosidad de los diferentes fluidos biológicos (representación log-log).

de control, aumentando el movimiento de los espermatozoides en el medio con una viscosidad mayor. También, el espermatozoide de ratón incubado en un medio de baja capacitancia al que se le añade una concentración de 1.8 % de metilcelulosa también experimenta un incremento en la velocidad de los espermatozoides [113]. Según estos autores, la modificación del comportamiento de los espermatozoides puede deberse al incremento de moléculas de cadena larga del medio extracelular que actúan suavizando el movimiento vigoroso, rápido y progresivo del espermatozoide, proporcionando propulsión y direccionalidad al mismo.

En general, mediciones anteriores de velocidad de espermatozoides de jabalí, realizadas en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Murcia, indican que el avance de éstos es más rápido a través de medios viscosos que a través de medios no viscosos y, por lo tanto, pueden ser más eficaces en la penetración en el moco oviductal y en la matriz. Varios autores han destacado la importancia de los parámetros del movimiento de los espermatozoides en la capacidad del espermatozoide para la fertilización. El uso de medios viscosos da lugar a una progresión más larga del espermatozoide como se informó previamente en un ensayo de migración de espermatozoides con 1 % de metilcelulosa [103].

La diferencia en el movimiento observado en el presente estudio demostró que la optimización de la viscosidad de los medios de cultivo es importante para asegurar un mayor porcentaje de espermatozoides con un movimiento lineal rápido lo que podría estar relacionado con una mayor capacidad de fertilización [114, 115]. Varios estudios han demostrado que la incubación de espermatozoides de verraco en medios viscosos [100], almacenamiento de caprinos [116] y espermatozoides de porcino [117] induce un efecto positivo sobre los parámetros de funcionalidad en términos de espermatozoides viables, que son consistentes con nuestros resultados.

### 5.3.4. Conclusiones

Toda la información derivada de este estudio sugiere la importancia de la viscosidad en los medios tanto *in vitro* como *in vivo* para una fertilización óptima de los espermatozoides y abre nuevas vías para explorar la aplicación práctica de medios viscosos para mejorar la calidad del esperma.

La metilcelulosa es un espesante ampliamente empleado y ha sido utilizado para estudios de andrología en varias especies en concentraciones similares a la de nuestros experimentos [103, 113, 118]. Sin embargo, la viscosidad del medio suplementado con metilcelulosa (0.5% y 1%) utilizado en estos estudios fue superior a los valores observados en los fluidos oviductales. Además, estas diferencias son más altas a valores de gradiente de cizalla más bajos debido a las propiedades no newtonianas de estas muestras. Solo un pequeño número de estudios han evaluado la viscosidad del fluido oviductal de cerdos [100]. Los resultados obtenidos para este fluido en las fases folicular y lútea podrían ayudar a diseñar nuevos medios viscosos que presenten una mayor eficacia en aplicaciones reproductivas. Algunas alternativas posibles para imitar la viscosidad periovulatoria oviductal serían fluidos con una menor concentración de la misma metilcelulosa empleada anteriormente, es decir metilcelulosa de viscosidad 4000 mPa·s, el uso de otro tipo de metilcelulosa con menor viscosidad (15 mPa·s o 100 mPa·s) [100, 118], o el uso de otros compuestos como polivinilpirrolidona (PVP), acrilamida, extractos de plantas o ácido hialurónico [100, 101, 118]. Un punto importante es la utilización de un compuesto o mezclas de compuestos que mantengan la característica no newtoniana del fluido.

# Capítulo 6

## Aplicaciones a sistemas sintéticos

En este capítulo se va a utilizar principalmente la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) para caracterizar el tamaño de: i) gotas constituyentes de una emulsión y cargadas eléctricamente sobre la que se estudiarán interacciones en interfases polarizadas líquido-líquido, y ii) unímeros y agregados de un copolímero termosensible que será utilizado posteriormente para recubrir nanopartículas metálicas.

### 6.1. Estudio de interfases polarizadas líquido-líquido

#### 6.1.1. Introducción

El presente trabajo forma parte de una colaboración con el Grupo de Electroquímica Teórica y Aplicada de la Universidad de Murcia, dirigido por la profesora Ángela Molina. Nuestra aportación consistió en caracterizar mediante medidas de dispersión dinámica de luz el tamaño de partículas blandas (gotas en una emulsión) con carga iónica.

Se define una interfase como la superficie de contacto entre dos o más fases. Cuando dos fases electrolíticas líquidas de diferente polaridad e inmiscibles se ponen en contacto se forma una interfase cargada entre ellas debido a la diferencia de potencial electroquímico de las especies cargadas (iones). La distribución de estas especies en la región de contacto da lugar a lo que se denomina una interfase entre dos disoluciones electrolíticas inmiscibles (*Interface of Two Immiscible Electrolytic Solutions*, ITIES) [119].

El estudio de las ITIES se inició con los trabajos de Nernst y Riesenfeld [120] quienes estudiaron la conducción de corriente en la interfase formada por agua y fenol. Sin embargo, el mayor impulso a la investigación de estos sistemas se dio en la década de 1970

cuando Gavach [121] demostró que las ITIES podían ser polarizadas, produciéndose la transferencia de iones de una fase a otra al aplicarse un potencial. En el sistema ITIES la distribución de iones a través de la interfase se puede controlar por medio de un potencial eléctrico impuesto por una fuente externa, generalmente un potencióstato/galvanostato. El potencial eléctrico de las fases se manipula a través de dos electrodos de platino, uno en cada fase, mientras que el potencial que se manifiesta en la interfase se monitoriza a través de dos electrodos de referencia, también colocados uno en cada fase. Así, la colisión con la interfase de una determinada especie cargada, y el consiguiente tránsito a través de ella, genera una corriente eléctrica entre las dos fases que se detecta por medio del potencióstato/galvanostato [122].

Durante la última década, el estudio de eventos de colisión a través de interfases (tanto líquido-sólido como líquido-líquido) ha despertado un gran interés pues permite una mejor comprensión de los fenómenos estocásticos en electroquímica así como la posibilidad de obtener información acerca de las partículas que colisionan como, por ejemplo, su tamaño. De hecho, el estudio electroquímico de eventos de colisión entre partículas duras capaces de participar en reacciones redox con electrodos se ha aplicado a una amplia gama de nanopartículas como oro, plata, níquel, óxido de titanio, etc. Recientemente, se han investigado colisiones de partículas blandas con cierta carga iónica, como liposomas, con interfases líquido-líquido [123]. Para este tipo de partículas blandas podemos hablar de eventos de fusión con la interfase ya que la partícula no rebota, sino que se une a la interfase liberando su contenido iónico.

El objetivo del trabajo es desarrollar un método electroquímico para la detección individual y determinación de tamaño de partículas blandas con carga iónica que no requiera que se produzcan reacciones redox. Las partículas con las que se va a trabajar son gotas de tamaño microscópico y nanoscópico que forman la fase dispersa de una emulsión y que contienen iones de un determinado electrolito. Para que el método sea útil se requiere que no se produzcan impactos tipo avalancha, es decir, que no se produzca la colisión (o fusión) de muchas partículas a la vez en un determinado instante o evento, para lo cual la concentración de partículas ha de ser suficientemente pequeña. Tanto para verificar que las colisiones de las partículas con la interfase son de tipo individual y no colectivo como para comprobar que el tamaño de partícula determinado electroquímicamente es correcto se ha utilizado la técnica de DLS descrita en el Capítulo 2 y que es nuestra aportación a este proyecto. Así, comparando el tamaño de la entidad que colisiona con la interfase obtenido electroquímicamente con el tamaño de las gotas individuales obtenido

mediante dispersión de luz, se puede dilucidar si la entidad detectada electroquímicamente corresponde a una gota individual. Obviamente, si ambos tamaños coinciden (en realidad lo que se comparan son distribuciones de tamaño), se puede concluir que las entidades que colisionan son gotas individuales y que el método electroquímico es adecuado para determinar el tamaño de las gotas.

### 6.1.2. Metodología

Como ya se ha comentado, para el estudio que vamos a llevar a cabo se preparó una emulsión cuyas gotas contienen los iones que van a impactar contra la interfase. Para ello se mezclan dos disoluciones electrolíticas inmiscibles entre sí. Una de ellas, de naturaleza orgánica, está en minoría y forma la fase dispersa (gotas), y la otra, de naturaleza acuosa, está en mayoría y forma la fase dispersante, continua o matriz. En concreto, la emulsión se preparó añadiendo 50  $\mu\text{l}$  de una disolución formada por 1,2-dicloroetano (DCE) que contiene 0.35 M del electrolito cloruro de tetradodecilamonio (TDDA) a 2 ml de una disolución formada por agua que contiene 0.2 M del electrolito LiCl. El TDDA porta la carga iónica de las gotitas, necesaria para que haya señal electroquímica. A su vez, actúa como surfactante ayudando a que se forme la emulsión DCE/agua.

Tras mezclar y agitar ambas fases, se sonica la emulsión resultante en un baño sonicador (J.P. Selecta, 110 W) durante tres minutos para asegurar un tamaño de gota pequeño y estable. Esta emulsión mantiene el tamaño y número de gotitas de la fase dispersa (DCE) en la fase continua (agua) durante el tiempo adecuado para poder llevar a cabo todo el estudio. De todos modos, la estabilidad de la emulsión no es muy grande y las gotas tienden a fusionarse para formar gotas más grandes. Para asegurarse que las características de la emulsión medida mediante DLS y el método electroquímico son las mismas, se realizaron ambas medidas simultáneamente (utilizando sendas alícuotas de una emulsión original). La duración total de una determinada medida fue de cuarenta minutos (de forma que las gotas no tuvieran tiempo de crecer en exceso).

Tal y como se acaba de exponer, en este trabajo se utilizan dos técnicas, una electroquímica y otra de dispersión de luz. La técnica DLS y el instrumento utilizado (Zetasizer Nano ZS de Malvern Ltd.) ya han sido descritos en el Capítulo 2. Para llevar a cabo las medidas de las emulsiones en DLS, éstas se diluyeron diez veces en una disolución acuosa de LiCl 0.2 M (que es la fase continua de la emulsión). Además, cada medida se realizó utilizando un tiempo de adquisición de datos de 300 s. Este tiempo se consideró adecuado

en base a un estudio previo que se hizo midiendo tamaño de diversos estándares de látex de poliestireno (ver Capítulo 2). Dicho estudio también sirvió para verificar que nuestro instrumento DLS es capaz de medir de forma fiable partículas de  $1 \mu\text{m}$  a  $4 \mu\text{m}$ , que es el tamaño en torno al cual están las gotas de las emulsiones preparadas.

En el método electroquímico se necesita generar una interfase entre dos líquidos. Para ello, se utiliza un tubo cilíndrico en forma de U, fabricado en el servicio técnico de la Universidad de Murcia, con un área interfacial de  $(0.24 \pm 0.02) \text{ mm}^2$  en el que se introducen por un extremo  $150 \mu\text{l}$  de la emulsión preparada y por el otro  $150 \mu\text{l}$  de una disolución de DCE que contiene una sal (TDDA TCIPB) cuyos iones son muy lipófilos de forma que ayudan a polarizar la interfase y así, provocar y controlar un voltaje en ésta. Tenemos así un sistema compuesto de una fase formada por una matriz acuosa y gotas dispersas, la emulsión, y otra fase de naturaleza orgánica que son inmiscibles y forman una interfase líquido-líquido. En ambos extremos del tubo cilíndrico se introducen dos electrodos, uno de platino que actúa como contraelectrodo y uno de plata que actúa como electrodo de referencia. El esquema de la célula electroquímica así generada es:  $\text{Ag} - 0.02 \text{ M TDDACl (DCE)} - 0.2 \text{ M LiCl (W)} - \text{Ag}'$ . Para evitar interferencias del exterior, dicha célula se aloja dentro de una jaula Faraday conectada a tierra. En la Figura 6.1 podemos observar un esquema del montaje utilizado para este estudio.

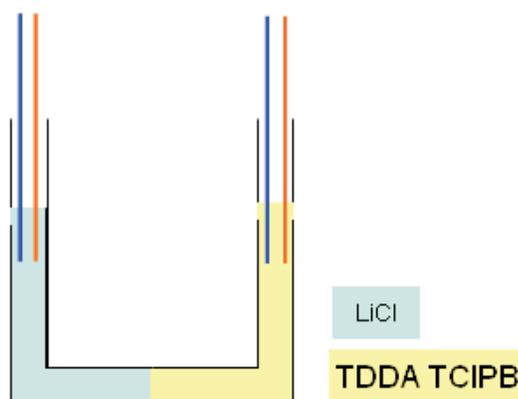


Figura 6.1: Tubo en U utilizado para la medida electroquímica.

Mediante el montaje esquematizado en la Figura 6.1, y aplicando potenciales adecuados a los electrodos que están conectados a un potenciostato SP-200, se puede detectar el impacto de las gotitas con la interfase. Estos impactos generan una variación en la

intensidad de corriente registrada por el dispositivo electroquímico, lo que se manifiesta como picos de corriente en un diagrama de intensidad frente a tiempo. El área del pico es proporcional al tamaño de la entidad que impacta que, si se trata de una gota, será el tamaño de gota. La Figura 6.2 muestra una ampliación de la región de la interfase generada en el dispositivo en U que se ilustra en la Figura 6.1. En ella se aprecia el impacto de una gota de la emulsión con la interfase, los electrodos de medida y un ejemplo de la señal electroquímica producida (pico de corriente). La respuesta eléctrica se muestrea con una frecuencia de 1 ms y proporciona picos de corriente bien definidos.

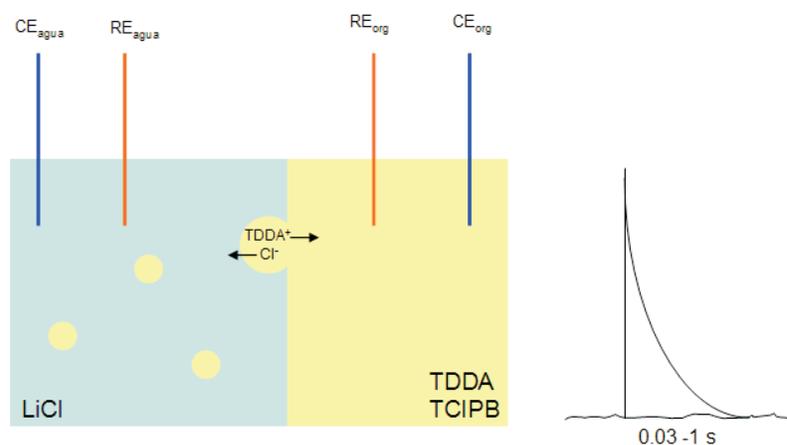


Figura 6.2: Representación del mecanismo de colisión de las gotitas sobre la interfase y señal electroquímica producida.

### 6.1.3. Resultados

Los resultados de este trabajo se encuentran recogidos en la publicación Laborda y col. [124]. En la Figura 6.3 se comparan las funciones de distribución de tamaño de gota obtenidas mediante los dos métodos: DLS (línea roja) y electroquímico (histograma). En el caso de la técnica de DLS cada medida se repitió seis veces para obtener la correspondiente barra de error. En el DLS se observan dos poblaciones de partículas: la primera de ellas, que corresponde al pico principal, tiene una distribución de tamaño comprendido entre 1.2 y 4  $\mu\text{m}$  y la segunda, que corresponde al pico pequeño, tiene un tamaño en torno a 5.5  $\mu\text{m}$ . Estos resultados, se ajustan perfectamente a los obtenidos mediante el análisis electroquímico (obsérvese la excelente superposición entre la línea roja y el histograma),

donde también obtenemos una mayor población de partículas de tamaño comprendidos entre 1.2 y 4  $\mu\text{m}$  y una menor población de partículas con tamaños superior a 4  $\mu\text{m}$ . Esto lleva a la conclusión de que la técnica electroquímica está, efectivamente, detectando el tamaño de gotas individuales.

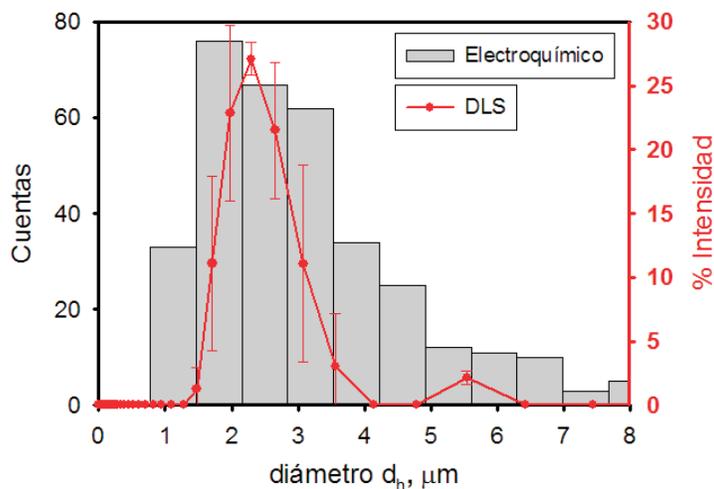


Figura 6.3: Distribuciones de tamaño de gota obtenidas electroquímicamente y mediante DLS (distribución en intensidad).

Por supuesto, las distribuciones de tamaño obtenidas no son exactamente iguales en todas las experimentos realizados, ya que cada emulsión preparada presentará gotas de tamaño ligeramente diferente. Lo importante es que la característica de esas distribuciones es independiente de la técnica utilizada, DLS o electroquímica, como se muestra en la Figura 6.4. Más aún, la técnica electroquímica diseñada no es capaz de detectar gotas por debajo de la micra por lo que es conveniente asegurarse, mediante DLS, de que la emulsión no contiene gotas inferiores a ese tamaño. Como ya se ha comentado en el Capítulo 2, las distribuciones en número son más sensibles a partículas pequeñas que las distribuciones en intensidad. Así, se quiso comprobar que la emulsión solamente contenía partículas grandes, descartando la presencia de pequeñas poblaciones de partículas de tamaño submicrométrico que pasarían desapercibidas en la distribución en intensidad. La perfecta coincidencia de las distribuciones en intensidad y número reflejada en la Figura 6.4 pone de manifiesto que no existen gotas inferiores a la micra.

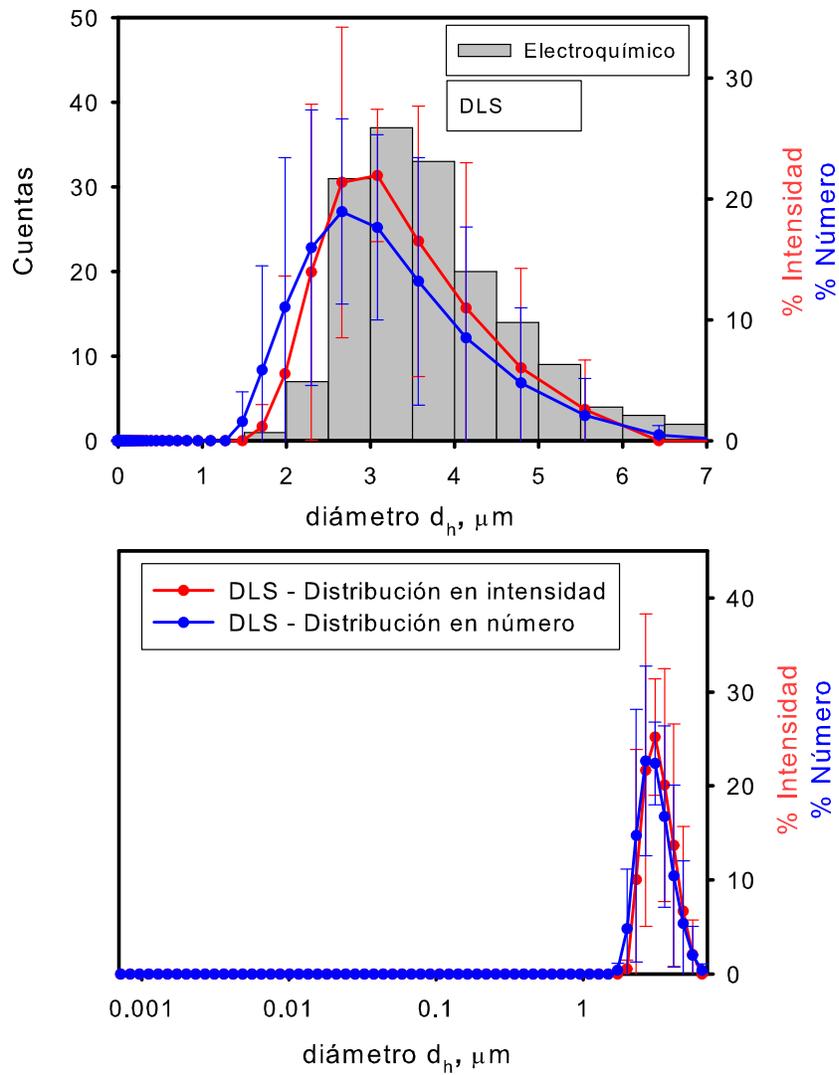


Figura 6.4: Distribución de tamaño en intensidad y número de DLS y comparación con el método electroquímico.

#### 6.1.4. Conclusiones

Las emulsiones preparadas para el estudio fueron estables durante (e incluso algo después) de los experimentos. Tras la comparación realizada entre las medidas proporcionadas por la técnica DLS y la técnica electroquímica se puede concluir que ésta última es de gran utilidad para la determinación del tamaño de partículas con carga iónica. Además, la comparación de ambas técnicas indican que los picos de corriente obtenidos en las medidas electroquímicas están asociados a colisiones individuales de gotas de la emulsión con la interfase. Este trabajo abre un nuevo marco para el estudio de los eventos de fusión individual en la micro y nanoescala y para el estudio del transporte de iones a través de interfases.

## 6.2. Estudio de un copolímero termosensible basado en PNIPAAM

### 6.2.1. Introducción

La conformación en disolución de los polímeros termosensibles o con respuesta térmica depende fuertemente de la temperatura, existiendo una temperatura crítica a la cual estos polímeros cambian bruscamente su conformación produciéndose así un cambio de fase. Lo habitual es que a un lado de la temperatura crítica las interacciones polímero-disolvente sean favorables, por lo que el polímero estará solvatado y presentará una conformación de ovillo al azar, mientras que al otro lado de la temperatura crítica las interacciones polímero-polímero son favorables, por lo que el polímero se desprende de las moléculas del disolvente que lo solvatan, colapsa y adquiere una conformación globular. En este último caso también puede ocurrir, en caso de que la disolución sea suficientemente concentrada, que diferentes moléculas de polímero interactúen entre sí para formar agregados. En definitiva, para una cadena individual de polímero, a la temperatura crítica se produce una transición ovillo-glóbulo. Cuando a temperaturas inferiores a la crítica se produce la disolución del polímero, y por tanto éste adquiere la conformación de ovillo al azar, mientras que a temperaturas superiores se produce el colapso del polímero, a dicha temperatura crítica se la denomina temperatura de disolución crítica inferior o LCST (*Lower Critical Solution Temperature*). En caso contrario, dicha temperatura crítica se denomina temperatura de disolución crítica superior o UCST (*Upper Critical Solution Temperature*).

La poli(N-isopropilacrilamida) o PNIPAAM es un polímero termosensible que presenta una LCST en disolución acuosa y que posee en su estructura grupos amida, de carácter hidrofílico, e isopropilo, de carácter hidrofóbico, tal y como se muestra en la Figura 6.5 (donde “n” es el número de monómeros).

En disolución acuosa experimenta una transición de fase en función de la temperatura pues según el valor de ésta predomina el carácter hidrofílico (cadena solvatada con conformación de ovillo al azar) o hidrofóbico (cadena colapsada con conformación globular). Así, existe una temperatura de disolución crítica inferior, LCST  $\sim 32^{\circ}\text{C}$  [125], por debajo de la cual predomina el carácter hidrofílico en el PNIPAAM, éste se encuentra muy solvatado, y las cadenas están en condiciones de buen disolvente, mientras que por encima de dicha temperatura, predomina el carácter hidrofóbico, dando lugar al colapso de las cadenas y la formación de glóbulos. Dependiendo de la longitud de las cadenas y su concentración, las

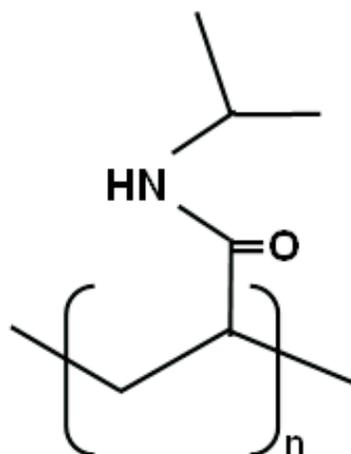


Figura 6.5: Estructura del polímero PNIPAAm.

interacciones hidrofóbicas pueden dar lugar a la formación de agregados intermoleculares lo que, en el caso de que la concentración sea elevada, provoca la aparición de turbidez.

En realidad, los grupos hidrofóbicos e hidrofílicos así como sus interacciones están siempre presentes, independientemente de la temperatura. Lo que sucede al aumentar la temperatura por encima de la LCST es que se produce un cambio en el entorno local de los grupos hidrofóbicos que pasan de estar solvatados a dejar de estarlo [126]. Esto es debido a que los puentes de hidrógeno que forma el grupo amida con el agua dejan de ser estables con lo que la cadena expulsa el agua de solvatación y se favorecen las interacciones hidrofóbicas así como la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares, todo lo cual produce el colapso de la cadena. Esta competencia entre interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno modulada por la temperatura es responsable de que el comportamiento del PNIPAAm varíe con la temperatura [127]. La persistencia, a temperaturas inferiores a la LCST, de las estructuras intramoleculares formadas a temperaturas superiores a la LCST es responsable de la existencia de histéresis térmica cuando la disolución de PNIPAAm se somete a un ciclo de calentamiento y enfriamiento [127, 128].

El PNIPAAm en disolución acuosa es un sistema ampliamente estudiado [129–131] y de gran interés en multitud de aplicaciones como, por ejemplo, transportador de fármacos [132] debido a que su LCST se sitúa en torno a la temperatura del cuerpo humano.

## 6.2. ESTUDIO DE UN COPOLÍMERO TERMOSENSIBLE BASADO EN PNIPAAM

Pero el PNIPAAM puede ser modificado para formar copolímeros que presenten nuevas propiedades según sean las características del polímero acompañante. En este trabajo vamos a caracterizar algunas variantes del copolímero catiónico dibloque PNIPAAM-co-PAMPTMA(+) (poli(N-isopropilacrilamida)-co-poli((3-acrilamidopropil)trimetilamonio)), sintetizado en el laboratorio del profesor Nyström de la Universidad de Oslo donde ya se caracterizaron algunas otras variantes del mismo [133]. La estructura química del PNIPAAM-co-PAMPTMA(+) se muestra en la Figura 6.6, donde “n” es el número de unidades o grado de polimerización del segmento PNIPAAM y “m” el número de unidades o grado de polimerización del segmento PAMPTMA(+).

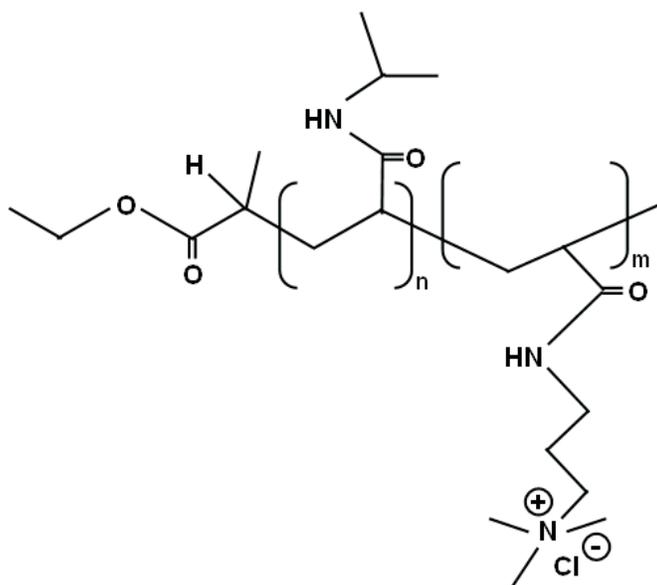


Figura 6.6: Estructura del copolímero PNIPAAM-co-PAMPTMA(+).

Al ser un copolímero cargado positivamente es de esperar que reaccione con nanopartículas de oro recubiertas con citrato de carga negativa para formar estructuras tipo núcleo-capa (*core-shell*) que es el tipo de sistema que se pretende estudiar posteriormente en esta Tesis. En este capítulo vamos a centrarnos en la caracterización del comportamiento de las disoluciones del copolímero. Para ello hemos determinado la dependencia del radio hidrodinámico,  $r_h$ , y del potencial zeta,  $\zeta$ , con la temperatura y con la fuerza iónica utilizando el instrumento Nano Zetasizer de Malvern y la metodología descrita en

el Capítulo 2. Hemos trabajado con dos versiones del copolímero entre las que varían las longitudes de las cadenas de PNIPAAm y PAMPTMA(+) y por tanto la importancia de cada polímero en el copolímero. En una versión, la longitud de la cadena de PNIPAAm es  $n = 48$  y la longitud de la cadena de PAMPTMA(+) es  $m = 6$ , por lo que lo denominaremos copolímero P-48/6 cuyo peso molecular promedio en peso es  $M_{P-48/6} = 8190$  Da. En la otra versión, la longitud de la cadena de PNIPAAm es  $n = 46$  y la longitud de la cadena de PAMPTMA(+) es  $m = 20$ , por lo que lo denominaremos copolímero P-46/20 cuyo peso molecular promedio en peso es  $M_{P-46/20} = 10820$  Da. En ambos casos el índice de polidispersidad fue  $PDI = M_w/M_n = 1.05$ . Como se aprecia, ambas muestras son bastante monodispersas, habiéndose determinado el peso molecular y el índice de polidispersidad en el laboratorio del profesor Nyström mediante la técnica de fraccionamiento por campo de flujo en flujo asimétrico o AFFFF (*Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation*) [133], no descrita ni utilizada en esta Tesis. Por último, comentar que, tal y como se verá a lo largo del capítulo, las muestras de ambos copolímeros, estudiadas bajo diversas condiciones, presentaron un valor LCST entre 40°C y 50°C, valor claramente superior a los 32°C característicos del polímero PNIPAAm lo que es de esperar debido al carácter hidrofílico, presente a cualquier temperatura, asociado al segmento cargado PAMPTMA(+). Por tanto, es necesario una temperatura mayor para que el carácter hidrofóbico que adquiere el segmento de PNIPAAm al aumentar la temperatura alcance suficiente intensidad, se imponga sobre el carácter hidrofílico, y el proceso de agregación se vuelva dominante.

### 6.2.1.a. Análisis de la función de correlación

Recordamos aquí brevemente lo explicado en el Capítulo 2 sobre el modo de analizar la función de correlación temporal  $g^{(1)}$  (ver las ecs. 2.25 y 2.26). Dicha función se ajusta, bien a la suma de una exponencial *single* (típica monoexponencial) más una exponencial *stretched*,

$$g^{(1)} = A_f \exp[-t/\tau_f] + A_s \exp[-(t/\tau_{se})^\beta], \quad (6.1)$$

donde  $A_f + A_s = 1$ , o bien a una única exponencial *stretched*

$$g^{(1)} = A_s \exp[-(t/\tau_{se})^\beta]. \quad (6.2)$$

El tiempo de relajación rápido  $\tau_f$  corresponde a la relajación de las cadenas de copolímero individual (unímeros) y el tiempo de relajación lento,  $\tau_{se}$ , a la relajación de los agregados.

En realidad,  $\tau_{se}$  es un tiempo efectivo (tiempo extraído de la *stretched exponential*) del que se obtiene el verdadero tiempo de relajación,  $\tau_s$ , mediante la expresión

$$\tau_s = \frac{\tau_{se}}{\beta} \Gamma\left(\frac{1}{\beta}\right). \quad (6.3)$$

A partir de  $\tau_f$  y  $\tau_s$  se calculan los radios hidrodinámicos  $r_{h,f}$  y  $r_{h,s}$  mediante el mismo procedimiento. Utilizando, por simplicidad, el término  $\tau$  para ambos tiempos de relajación, y  $r_h$  para ambos radios hidrodinámicos, la ecuación para obtener  $r_h$ , procedente de la ecuación de Stokes-Einstein, puede escribirse de la siguiente manera,

$$r_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D} = \frac{k_B T q^2 \tau}{6\pi\eta_0}, \quad (6.4)$$

donde  $q$  es el módulo del vector de *scattering* ( $q = 4\pi n/\lambda_0 \sin(\theta/2)$ , ver Capítulo 2), y donde se asume que  $Dq^2 = \tau^{-1}$ .

### 6.2.2. Resultados

A continuación se presentan y discuten los resultados obtenidos para los dos copolímeros descritos anteriormente. Los resultados se obtuvieron utilizando disoluciones de diferente concentración y fuerza iónica así como varias técnicas de caracterización. La técnica principal y mayoritariamente utilizada fue la dispersión dinámica de luz (DLS) y la íntimamente relacionada medida del potencial zeta, ambas descritas en el Capítulo 2 y llevadas a cabo en el instrumento Zetasizer Nano ZS de Malvern Instrument. Como complemento a estas medidas también se realizaron medidas de espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis) con el espectrofotómetro T92+ de PG Instruments. Esas tres técnicas permiten determinar la temperatura crítica (LCST) a partir de la cual se forman agregados de forma apreciable y la disolución se vuelve turbia. Así, mediante espectroscopía UV-vis, a través de la transmitancia, es fácil determinar la turbidez de la disolución mientras que la técnica DLS permite seguir la evolución del tamaño de las partículas y agregados con la temperatura. Por último, y a modo más bien ilustrativo, también se hicieron algunos experimentos de ultracentrifugación analítica con la ultracentrífuga Proteomelab XL-I de Beckman Coulter, disponible en el servicio de instrumentación científica de la Universidad de Murcia, con el fin de comprobar la idoneidad de esta técnica para determinar coeficientes de sedimentación en un tipo de sistemas en el que las moléculas de soluto primarias (unímeros) son de bajo peso molecular. El concepto de coeficiente de sedimentación se introdujo en el Capítulo 1 de esta Tesis (ecuaciones 1.10, 1.11 y 1.12).

### 6.2.2.a. Medidas de dispersión de luz y potencial zeta

#### Caso 1: copolímero P-48/6, concentración 0.01 % en peso

En primer lugar se ha estudiado el copolímero P-48/6 en disolución acuosa a una concentración 0.01 % en peso. El disolvente fue tanto agua miliQ (fuerza iónica 0) como una disolución de NaCl de concentración 0.05 M (fuerza iónica 0.05 M). Mediante DLS se obtuvo el radio hidrodinámico,  $r_h$ , de las estructuras en disolución, tal y como se ha explicado anteriormente. Debido a que se han realizado medidas a diferentes temperaturas, previamente se realizó un estudio de la evolución de  $r_h$  con el tiempo en el disolvente agua miliQ a unas cuantas de las temperaturas estudiadas para determinar el tiempo de atemperación adecuado (Figura 6.7). Se concluyó que diez minutos de atemperación es suficiente para que la muestra se estabilice y el tamaño de las estructuras formadas por el copolímero no varíe significativamente. A continuación se llevó a cabo un estudio de la evolución del tamaño de las estructuras poliméricas con la temperatura, para lo que se programó una rampa de temperaturas en el rango de 25°C a 70°C en incrementos de 5°C. Tras alcanzar cada nueva temperatura se esperaba 10 minutos antes de comenzar la medida, la cual constaba típicamente de 10 submedidas (*runs*) de 10 s cada una. Este protocolo de medida se repetía tres veces para hallar la media y la desviación estándar.

La Figura 6.8 muestra, para unas cuantas de las temperaturas utilizadas, las gráficas de la función de correlación  $g^{(1)}$ , tal y como la proporciona el software de Malvern, así como el ajuste de dicha función a las exponenciales descritas en el apartado anterior. A partir de las exponenciales se extraen los valores de  $r_h$  característicos de las distintas muestras como se comentará a continuación.

Hay que hacer notar que el valor de la ordenada en el origen de la función de correlación, si ésta está debidamente normalizada, debería ser teóricamente 1. Valores inferiores son debidos a una deficiente relación señal/ruido, encontrándose habitualmente valores entre 0.6 y 1 y admitiéndose como apropiado el análisis de dichas funciones. Sin embargo, en la Figura 6.8 se observa que la ordenada en el origen de las funciones de correlación correspondientes a temperaturas inferiores a la LCST ( $\simeq 45^\circ\text{C}$  como veremos después) es excesivamente pequeña. Esto es debido a que las muestras son muy diluidas y la intensidad de luz dispersada es pequeña. A temperaturas superiores a la LCST, el valor de la ordenada en el origen crece como consecuencia de la mayor dispersión producida por la formación importante de agregados. De todos modos, se ha procedido al análisis de

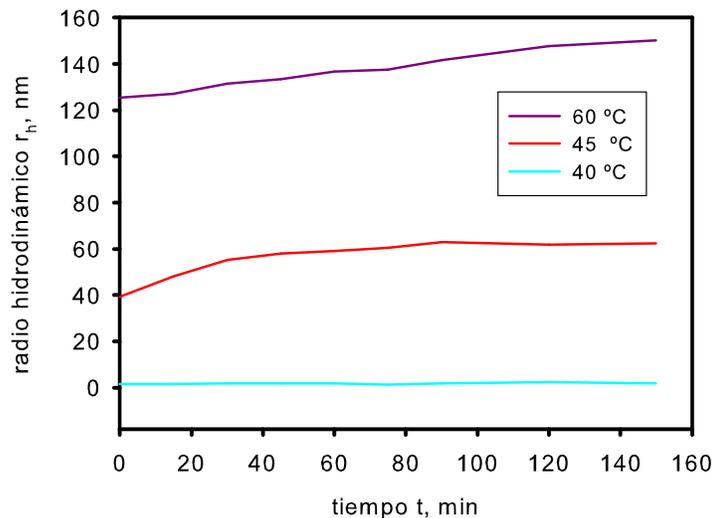


Figura 6.7: Evolución temporal del tamaño de las estructuras del copolímero P-48/6 en agua miliQ.

todas las funciones de correlación ya que pensamos que las conclusiones que se obtienen siguen siendo válidas. Como ya se comentó en el Capítulo 2 y en la sección anterior, la función  $g^{(1)}$  suele poder ajustarse bien a una suma de una exponencial *single* y una exponencial *stretched* o bien a una única exponencial *stretched*. A temperaturas inferiores a la LCST es de esperar que coexisten cadenas individuales (unímeros) con algunos agregados (la disolución nunca va a ser suficientemente diluida como para que no se forme ningún agregado a temperatura inferior a la LCST), por lo  $g^{(1)}$  tiende a ser bimodal y se ajusta a la suma de una exponencial *single* (relacionada con el modo de relajación de los unímeros, rápido) y una exponencial *stretched* (relacionada con el modo de relajación de los agregados, lento). Por otra parte, a temperaturas superiores a la LCST todas las cadenas individuales se han consumido para formar parte de agregados por lo que  $g^{(1)}$  es monomodal y se ajusta a una única exponencial *stretched*. A partir de los valores de los tiempos de relajación obtenidos de los exponentes de las exponenciales ( $\tau_f$  y  $\tau_s$ ) se pueden obtener los radios hidrodinámicos característicos de los unímeros,  $r_{h,f}$ , y de los agregados,  $r_{h,s}$ , tal y como se explicó anteriormente. Además, la exponencial *stretched* proporciona un valor del exponente  $\beta$  que depende en cierta medida de la temperatura. Nosotros obtenemos que a temperaturas inferiores a la LCST (cuando el ajuste es una suma de exponenciales),  $\beta$  adquiere valores en torno a 0.5, mientras que a temperaturas

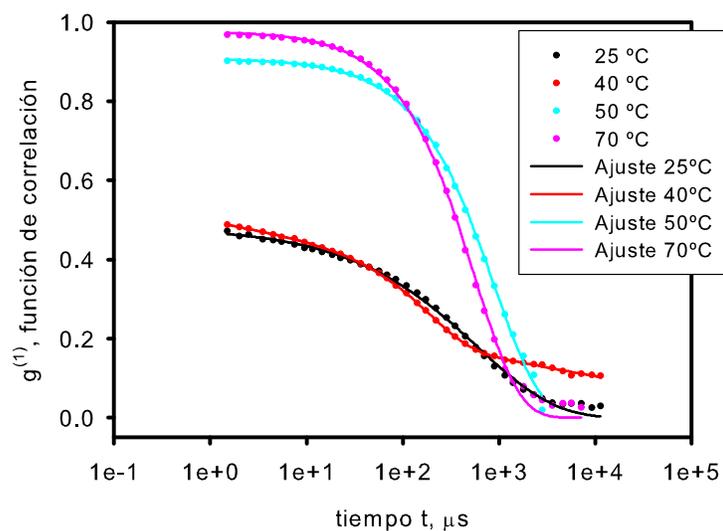


Figura 6.8: Funciones de correlación para el copolímero P-48/6 en agua miliQ.

superiores a la LCST (cuando la población de agregados es dominante)  $\beta$  adquiere valores entre 0.9 y 1, lo que está de acuerdo con trabajos anteriores [133]. El valor de  $\beta$  está relacionado con la anchura de la distribución o polidispersidad de la muestra, siendo la muestra más monodispersa cuanto más cerca de 1 esté  $\beta$ .

## 6.2. ESTUDIO DE UN COPOLÍMERO TERMOSENSIBLE BASADO EN PNIPAAm

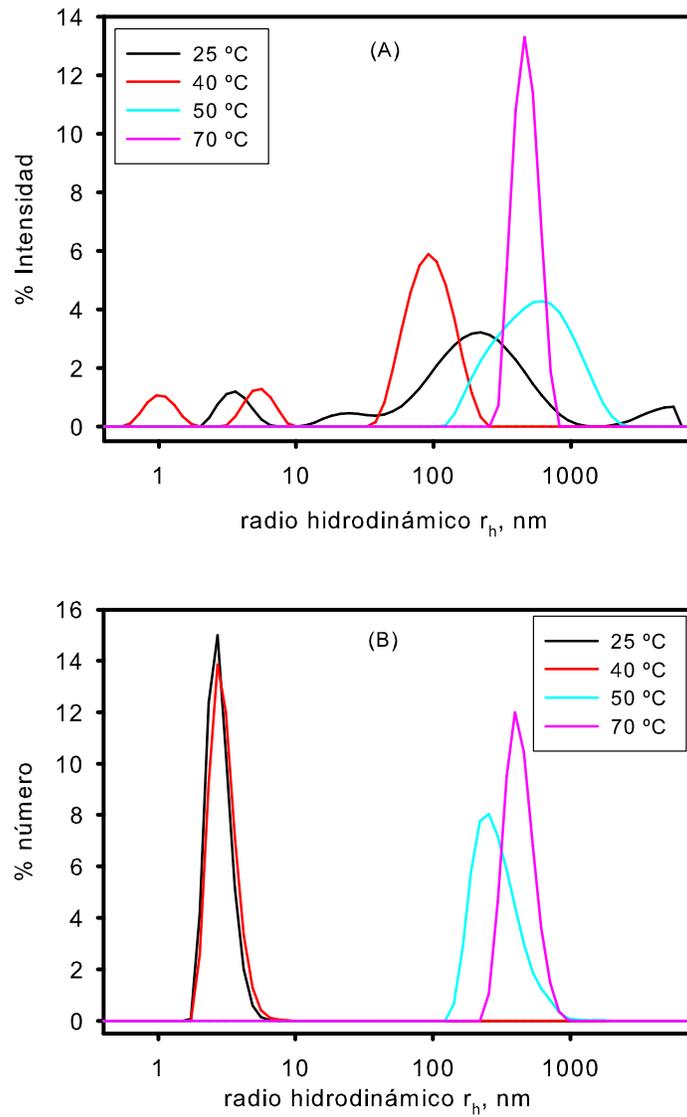


Figura 6.9: Distribución de tamaños (A) por intensidad y (B) por número, para el copolímero P-48/6 en agua miliQ.

La coexistencia de unímeros y agregados (y así, la mayor o menor polidispersidad) se aprecia en las funciones de distribución de tamaño proporcionadas por el propio software de Malvern. A temperaturas inferiores a la LCST ( $\simeq 45^\circ\text{C}$ ) aparecen, básicamente, dos poblaciones, unímeros y agregados, tal y como refleja la función de distribución de tamaño por intensidad de la Figura 6.9A. Por tanto, para esas temperaturas es correcto obtener dos valores de  $r_h$  del ajuste exponencial ( $r_{h,f}$  y  $r_{h,s}$ ). Sin embargo, la población de unímero es mucho más relevante que la de agregados, tal y como muestra la función de distribución de tamaño por número de la Figura 6.9B, por lo que el valor  $r_{h,f}$  es el escogido como representativo para ser representado en las gráficas de  $r_h$  frente a temperatura que se mostrarán a continuación. Por otro lado, a temperaturas superiores a la LCST ( $\simeq 45^\circ\text{C}$ ) la población está formada prácticamente por agregados, por lo que el valor de  $r_h$  representado en las gráficas es simplemente el valor  $r_{h,s}$  obtenido del ajuste a una única exponencial *stretched*.

La Figura 6.10 muestra la evolución de  $r_h$  con la temperatura tanto para la disolución en agua miliQ como a fuerza iónica 0.05 M. Lo que se aprecia, independientemente del valor de la fuerza iónica, es un incremento más o menos súbito del tamaño a partir de cierta temperatura. Podemos considerar como valor aproximado de la temperatura crítica de transición, la anteriormente denominada LCST, un valor al que  $r_h$  se despega de la línea base. El efecto de la fuerza iónica parece ser disminuir la LCST de modo que a fuerza iónica cero la LCST  $\simeq 45^\circ\text{C}$  y a fuerza iónica 0.05 M la LCST  $\simeq 42^\circ\text{C}$ . Esto es de esperar, ya que el apantallamiento de las cargas que porta el segmento PAMPTMA(+) hace que su carácter hidrofílico disminuya con lo que el carácter hidrofóbico del copolímero empieza a ser preponderante a menor temperatura. Por el mismo motivo de apantallamiento, los agregados alcanzan mayor tamaño a fuerza iónica 0.05 M. Está claro que pueden formarse agregados más grandes tanto por la disminución de la repulsión entre las cargas positivas del segmento PAMPTMA(+) como por el aumento del carácter hidrofóbico global.

En general, la explicación para la existencia de una LCST (al margen de la fuerza iónica) es que por debajo de dicha temperatura las interacciones del copolímero con el disolvente están favorecidas: en ambos segmentos, PNIPAAm y PAMPTMA(+), predomina el carácter hidrofílico debido tanto a los puentes de hidrógeno que el grupo amida del segmento de PNIPAAm forma con el agua como a la solvatación del grupo cargado del segmento de PAMPTMA(+), por lo que el copolímero se encuentra totalmente disuelto. Sin embargo, a temperaturas superiores a la LCST, aunque el segmento de PAMPTMA(+) sigue teniendo un carácter fuertemente hidrofílico, en el segmento de PNIPAAm predo-

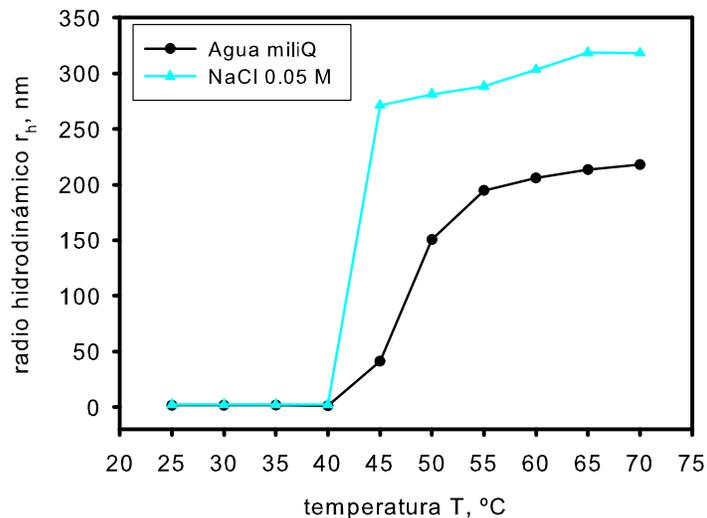


Figura 6.10: Evolución de  $r_h$  con el incremento de temperatura para el copolímero P-48/6.

minan las interacciones hidrofóbicas tanto intramoleculares como intermoleculares. Al ser estas últimas las más relevantes en nuestro sistema, se forman agregados y el tamaño de las estructuras en disolución aumenta. Si los agregados hubieran alcanzado el máximo tamaño posible, se observaría que su tamaño comienza a disminuir ligeramente debido a que las interacciones hidrofóbicas, una vez que los agregados ya no crecen más, actúan en el interior de los mismos, por los que éstos empiezan a contraerse (como ya comentábamos que les ocurría a las cadenas de PNIPAAAM individuales).

Tras el experimento anterior, en el que se establece una rampa de temperatura ascendente, se procedió a realizar el experimento inverso, es decir, a llevar a cabo una rampa de temperatura descendente con el fin de comprobar si se recuperaban las estructuras iniciales y evaluar la reversibilidad del fenómeno de agregación. El protocolo experimental fue idéntico al anterior, es decir, se disminuyó la temperatura en intervalos de 5°C desde 70°C a 25°C dejando un tiempo de atemperación de 10 minutos para cada temperatura.

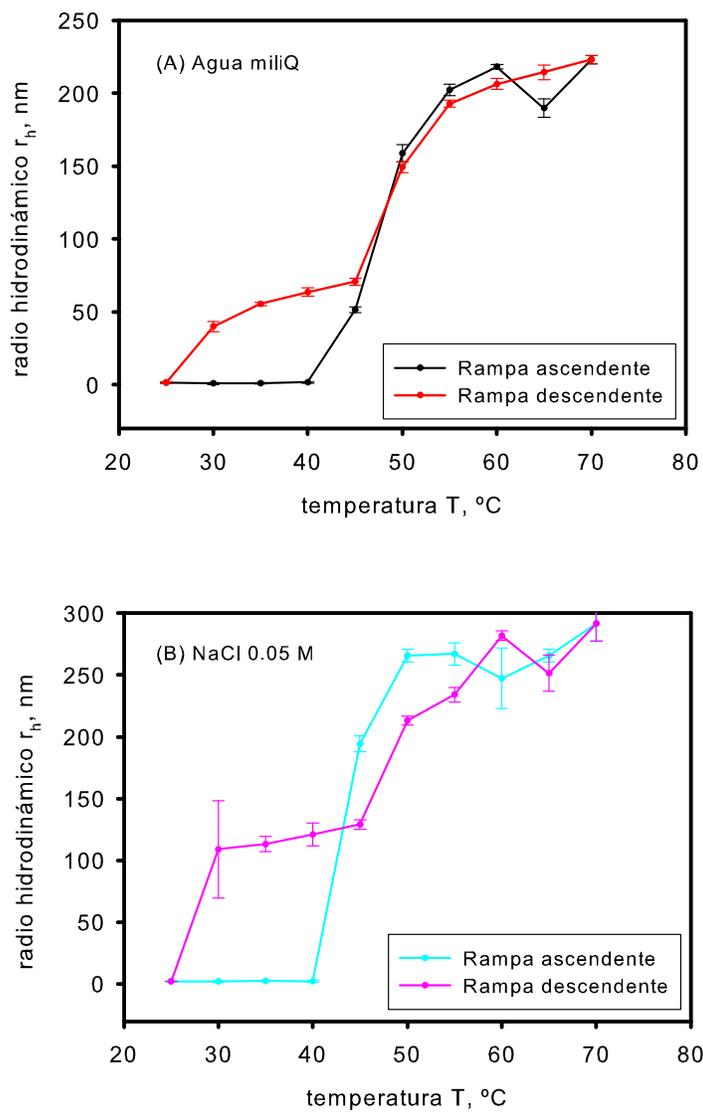


Figura 6.11: Evolución de  $r_h$  en un ciclo de ascenso y descenso de temperatura para el copolímero P-48/6: (A) en agua miliQ, (B) en NaCl 0.05 M.

## 6.2. ESTUDIO DE UN COPOLÍMERO TERMOSENSIBLE BASADO EN PNIPAAM

---

Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas de la Figura 6.11. La Figura 6.11A corresponde a la disolución en agua miliQ y la Figura 6.11B a la disolución de fuerza iónica 0.05 M. Lo que se observa es que el proceso de agregación es reversible, existiendo una cierta histéresis que comienza cuando la temperatura se aproxima a la LCST y los agregados comienzan a disgregarse e incluso desaparecer para dar lugar a las cadenas individuales. Así, el tamaño durante la rampa descendente, sobre todo a partir de la LCST, aunque disminuye con el descenso de la temperatura, se mantiene superior al tamaño durante la rampa ascendente, es decir, los agregados persisten durante cierto tiempo. Esto es coherente con lo que comentábamos en la introducción sobre la existencia de histéresis térmica: las estructuras hidrofóbicas formadas no se destruyen fácilmente y persisten al bajar la temperatura. En cualquier caso, cuando ha transcurrido un tiempo suficientemente largo a una temperatura inferior a la LCST, la mayoría de los agregados desaparecen quedando el copolímero en forma de unímero (como se observa a la temperatura 25°C).

Para la disolución en agua miliQ también se estudió la evolución del potencial zeta,  $\zeta$ , y la movilidad electroforética,  $\mu$ , en un ciclo de temperatura (rampa ascendente y descendente). Este estudio no se pudo llevar a cabo con la disolución de fuerza iónica 0.05 M porque la elevada conductividad de la misma (5 mS) provocaba efectos indeseados en la disolución (de hecho se deterioraba la superficie del electrodo). Además, el apantallamiento de las cargas del segmento PAMPTMA(+) no permite una adecuada medida del potencial zeta. La Figura 6.12A representa la evolución de la movilidad electroforética, que es el dato instrumental primario, y la Figura 6.12B, la evolución del potencial zeta que se obtiene a partir de la movilidad electroforética aplicando la ecuación de Henry,  $\zeta = (3\mu\eta)/(2\epsilon f(\kappa a))$  (ver Capítulo 2), y asumiendo la aproximación de Smoluchowski,  $f(\kappa a) = 1.5$ , aplicable a medios acuosos y concentración de electrolito moderada.

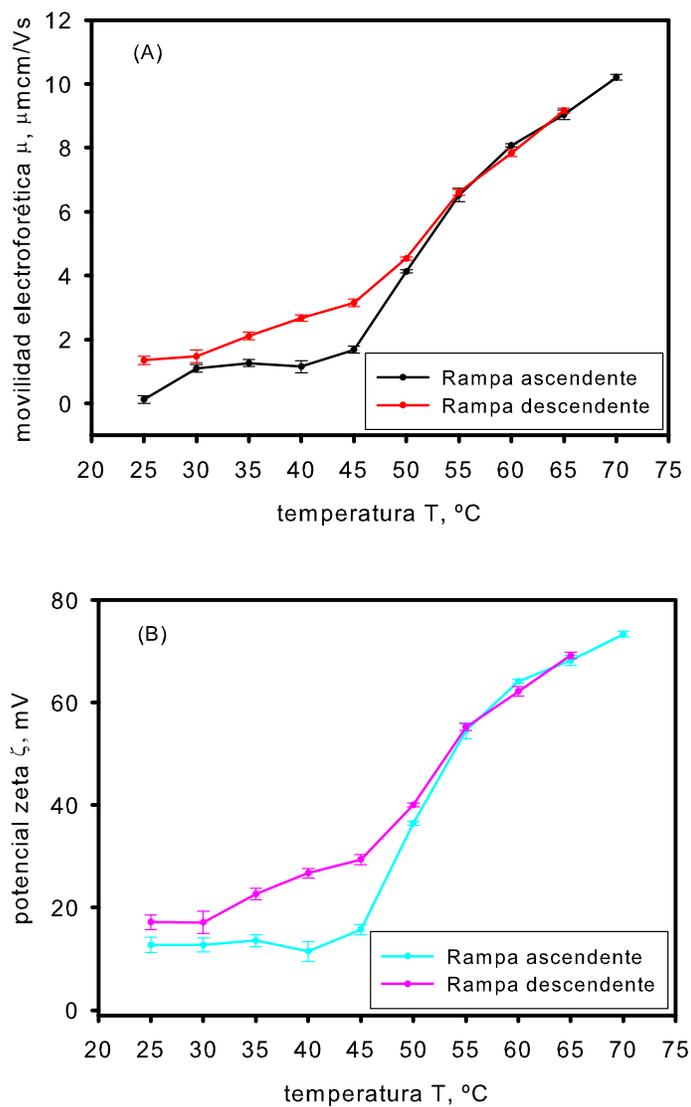


Figura 6.12: Evolución de (A) movilidad electroforética  $\mu$ , y (B) potencial zeta  $\zeta$ , en un ciclo de ascenso y descenso de temperatura para el copolímero P-48/6 en agua miliQ.

Lo primero a destacar es que el potencial zeta es siempre positivo, como cabe esperar pues el copolímero presenta carga positiva. Dicho potencial aumenta bruscamente tras la LCST coincidiendo con la formación masiva de agregados consecuencia del aumento del carácter hidrofóbico del segmento de PNIPAAM. El aumento de las interacciones hidrofóbicas en el segmento de PNIPAAM hace que segmentos correspondientes a distintas cadenas se unan formando el núcleo central del agregado, mientras que los extremos de PAMPTMA(+), hidrofílicos, se proyecten hacia afuera permaneciendo en contacto con el disolvente acuoso. El correspondiente aumento de la densidad de carga superficial que ello conlleva hace que aumente el potencial zeta. Este efecto será más pronunciado si se produce cierta contracción del núcleo hidrofóbico como consecuencia del aumento de las interacciones hidrofóbicas intra-agregado. Por último, comentar que tanto en la gráfica del potencial zeta como de la movilidad electroforética se aprecia la existencia de la histéresis térmica puesta de manifiesto en las gráficas de evolución del radio hidrodinámico. Debido a que los agregados tardan en destruirse por la persistencia de las estructuras construidas por las interacciones hidrofóbicas, el potencial zeta en la rampa de temperatura descendente, a temperaturas próximas a la LCST y menores, permanece mayor que los valores correspondientes a las mismas temperaturas en la rampa ascendente.

Como hemos comentado, las funciones de correlación correspondientes a concentración 0.01 % en peso y temperatura inferior a LCST no son óptimas para analizar debido a la poca dispersión de luz de la muestra (ordenada en el origen menor de 0.6). Por ello, se procedió a repetir las medidas, esta vez para las dos versiones del copolímero (P-48/6 y P-46/20), utilizando una concentración de 0.2 % en peso. El problema entonces se produce a temperaturas en torno y superiores a la LCST ya que, como cabe esperar, se forman muchos agregados de gran tamaño que vuelven turbia la disolución (las disoluciones a concentración 0.01 % en peso eran transparentes). La turbidez puede producir el efecto indeseado de dispersión de luz múltiple (*multiple scattering*) y, además, hace que no sean factibles las medidas de potencial zeta.

### **Caso 2: copolímeros P-48/6 y P-46/20, concentración 0.2 % en peso**

En este caso solo se estudiaron disoluciones de copolímero en agua miliQ, sin sal añadida (es decir a fuerza iónica cero). El protocolo de medida fue el mismo que para el caso de concentración 0.01 % en peso (10 minutos de equilibrado de la temperatura, tres medidas de diez submedidas cada una, etc.).

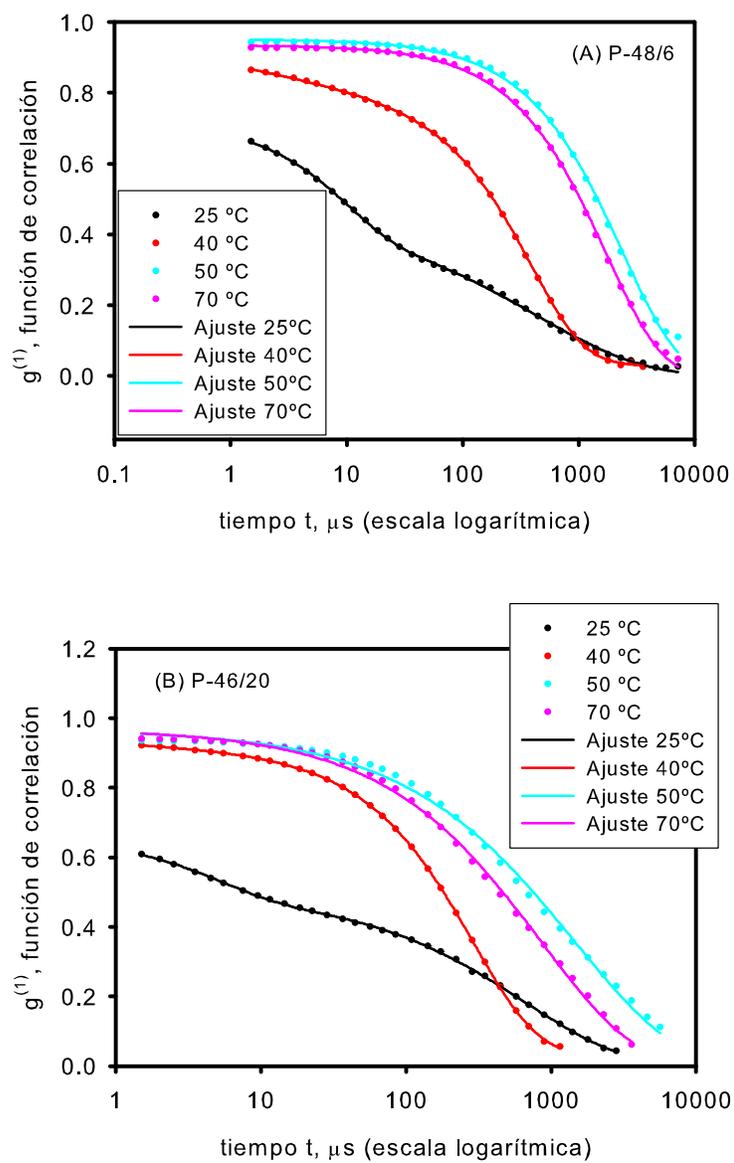


Figura 6.13: Funciones de correlación para los copolímeros P-48/6 (A) y P-46/20 (B) en agua miliQ y concentración 0.2% en peso.

La Figura 6.13A contiene algunas funciones de correlación correspondientes al copolímero P-48/6 y la Figura 6.13B algunas correspondientes al copolímero P-46/20. Como se observa, todas las funciones de correlación presentan una ordenada en el origen mayor de 0.6 (incluso a temperaturas inferiores a la LCST) ya que al ser más concentradas la cantidad de luz dispersada es mayor. Al igual que para el caso de concentración 0.01 % en peso, a temperaturas inferiores a la LCST, la función de correlación tiende a ser bimodal, reflejando la existencia de dos poblaciones, unímeros y agregados, y se ajusta bien a una suma de una exponencial *single* y una exponencial *stretched*, mientras que a temperaturas superiores a la LCST, donde solo existe población de agregados, la función de correlación es claramente monomodal y se ajusta bien a una única exponencial *stretched*. Como en el caso de concentración 0.01 % en peso, el valor del exponente  $\beta$  presenta valores en torno a 0.5 para los ajustes de las funciones de correlación correspondientes a temperaturas inferiores a la LCST, y entre 0.9 y 1 para los ajustes correspondientes a temperaturas superiores a la LCST, lo que no es inusual [133].

A partir de los tiempos de relajación obtenidos del ajuste exponencial se obtienen radios hidrodinámicos que se representan frente a la temperatura, siguiendo el mismo protocolo descrito para el caso de concentración 0.01 % en peso. La Figura 6.14 contiene la evolución de  $r_h$  de los dos copolímeros en un ciclo de ascenso y descenso de la temperatura. Lo primero a destacar es la fuerte irregularidad de las gráficas, sobre todo a elevada temperatura. Incluso las rampas de ascenso y descenso se cruzan, estando en ocasiones la de descenso (sobre todo en el copolímero P-46/20) por debajo de la de ascenso. Todo ello es achacable a artefactos ocasionados por la excesiva turbidez a elevada temperatura. Evidentemente la zona de temperatura superior a la LCST no es significativa desde un punto de vista cuantitativo. De todos modos, se pueden extraer ciertas conclusiones cualitativas que están de acuerdo con lo expuesto para el caso de concentración 0.01 % en peso y que pasamos a exponer a continuación.

Como se observa, para ambos copolímeros existe una LCST en torno a 40°C, como se deduce de las gráficas correspondientes a las rampas de temperatura ascendente (líneas continuas), a partir de la cual  $r_h$  aumenta como consecuencia de la preponderancia de las interacciones hidrofóbicas sobre las hidrofílicas y la consiguiente formación de agregados. La LCST para el copolímero P-46/20 parece inferior a la del copolímero P-48/6 y, lo que es más significativo, el aumento de  $r_h$  a partir de la LCST es mucho más acusado para éste último. De hecho, a simple vista se aprecia que la disolución del copolímero P-48/6 (a temperaturas superiores a la LCST) es más turbia que la del copolímero P-46/20, lo que

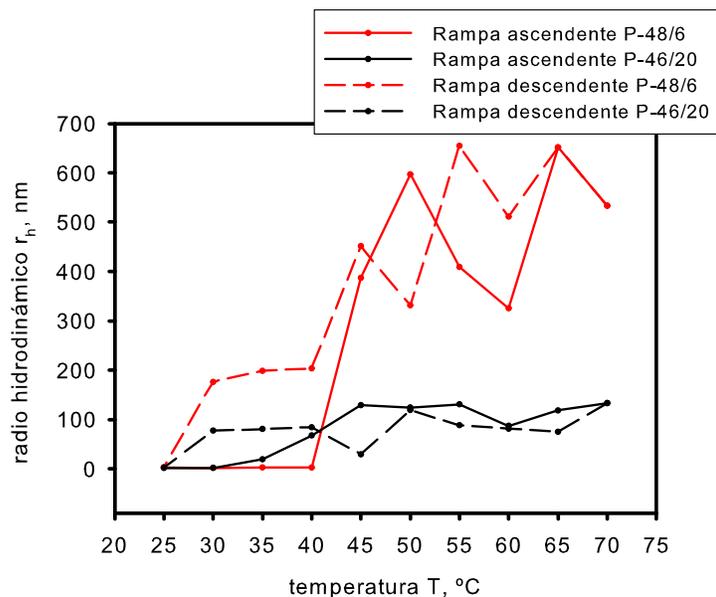


Figura 6.14: Evolución de  $r_h$  en un ciclo de ascenso y descenso de temperatura para los copolímeros P-48/6 y P-48/20 en agua miliQ.

se corresponde con la presencia de agregados de mayor tamaño. En ambos copolímeros el segmento de PNIPAAm es aproximadamente de la misma longitud, sin embargo el segmento de PAMPTMA(+), que es hidrofílico a cualquier temperatura, es mucho mayor en el copolímero P-46/20. Es decir, la relación de longitudes entre el segmento potencialmente hidrofóbico y el segmento permanentemente hidrofílico es mayor en el caso P-48/6 que en el caso P-46/20 por lo que se puede considerar que el primer copolímero es “más hidrofóbico” que el segundo. Esto hace que P-48/6 tenga más capacidad para formar agregados por interacciones hidrofóbicas que P-46/20. De hecho, al alcanzar la LCST, el segmento hidrofílico de PAMPTMA(+) tenderá a recubrir al segmento “hidrofóbico” de PNIPAAm. Puesto que el tamaño del segmento de PAMPTMA(+) es, en relación al tamaño total de cadena, muy grande en el caso P-46/20, su efecto protector será muy efectivo con lo que este copolímero tendrá facilidad para permanecer disuelto y presentará menos tendencia a agregar que P-48/6. Por el contrario, el segmento de PAMPTMA(+) en P-48/6 es insignificante en proporción a su tamaño global por lo que los segmentos “hidrofóbicos” de PNIPAAm de diferentes cadenas permanecen sin recubrir en la disolución y tenderán a interactuar entre sí para formar agregados. El importante carácter

hidrofílico de P-46/20 también hace que el aumento de  $r_h$ , además de pequeño, sea muy suave en comparación con el brusco incremento de  $r_h$  de P-48/6.

Por otro lado, a temperaturas inferiores a la LCST ( $\simeq 40^\circ\text{C}$ ) se puede apreciar la existencia de histéresis en ambos copolímeros. Ambos ciclos de histéresis poseen las mismas características que presentaba el caso con concentración 0.01 % en peso, es decir, el tamaño asociado a la rampa descendente es superior al asociado a la rampa ascendente. Este efecto es mucho más pronunciado para el copolímero P-48/6, lo que es de esperar debido a su mayor “hidrofobicidad” y, por tanto, la mayor dificultad con que se rompen las interacciones hidrofóbicas que forman sus agregados (además de que éstos son mucho más grandes que en P-46/20). Como ya se ha comentado, lo que ocurre a temperaturas superiores a la LCST no se le puede dar una interpretación cuantitativa debido al efecto de la turbidez. Precisamente, la turbidez de las disoluciones tampoco permitió determinar de forma fiable el potencial zeta.

Por último comentar que al aumentar la concentración parece disminuir ligeramente la LCST así como aumentar claramente el tamaño de los agregados, como se observa al comparar las gráficas correspondientes al caso P-48/6 de las Figuras 6.11A y 6.14. El hecho de que se formen agregados más grandes es de esperar simplemente por la mayor concentración de copolímero. Por otro lado, un descenso en la LCST al aumentar la concentración puede ser razonable pues otros trabajos han verificado la existencia de un descenso en el punto de turbidez (*cloud point*) con la concentración [133], lo que parece ser una característica general de los polímeros que contienen PNIPAAM [134]. En cualquier caso, ambos aspectos están relacionados con el hecho de que una mayor concentración de copolímero favorece la frecuencia de colisión entre los segmentos hidrofóbicos con lo que se forman agregados más fácilmente.

### 6.2.2.b. Medidas de espectroscopía UV-vis

Las Figuras 6.15 y 6.16 muestran una serie de espectros en modo de medida transmitancia (T % vs.  $\lambda$ ) realizados sobre disoluciones acuosas de los copolímeros P-48/6 y P-46/20 respectivamente. La concentración de dichas disoluciones fue 0.05 % en peso. Los espectros se restringieron al rango del visible, desde  $\lambda = 400$  nm a  $\lambda = 700$  nm, que es el rango donde se produce dispersión de luz Rayleigh por la partículas de soluto, responsable del fenómeno de turbidez. De los espectros de la disolución de P-48/6 se intuye claramente la existencia de una temperatura crítica, aproximadamente  $43^\circ\text{C}$ , por encima de la cual la

transmitancia cae bruscamente para llegar a ser prácticamente cero. Así, las gráficas de la Figura 6.15 se pueden agrupar en dos grandes conjuntos: por debajo de 43°C la disolución es prácticamente transparente y transmite casi el 100 % de la luz incidente mientras que por encima de esa temperatura la disolución se vuelve turbia y la transmitancia cae a cero. Esa temperatura se puede identificar con el anteriormente mencionado punto de turbidez (*cloud point*) y está en consonancia con el comportamiento reflejado en las Figuras 6.11 y 6.14 para el copolímero P-48/6 en donde la temperatura crítica (LCST) era 45°C y 40°C para unas concentraciones de 0.01 % en peso y 0.2 % en peso, respectivamente. Obsérvese que, como ya se comentó, el valor de la LCST depende ligeramente de la concentración. Así, para la concentración 0.05 % en peso la LCST tiene un valor intermedio, 43°C, entre los valores de las LCST's correspondientes a las concentraciones 0.01 % en peso y 0.2 % en peso. En cualquier caso, por encima de la temperatura el tamaño de las estructuras disueltas experimenta un brusco incremento debido a la intensa formación y crecimiento de agregados. Puesto que la transmitancia a una determinada temperatura se mantiene prácticamente constante en un amplio rango de longitudes de onda (Figura 6.15), el punto de turbidez (*cloud point*) del copolímero P-48/6 se puede determinar bastante bien a cualquier longitud de onda.

En la Figura 6.17 se representa la variación de la transmitancia con la temperatura a  $\lambda = 638$  nm. Hemos seleccionado dicha longitud de onda porque es la misma utilizada en los experimentos de dispersión dinámica de luz y potencial zeta. En cualquier caso, las conclusiones que se obtienen a nivel cualitativo van a ser independientes de la longitud de onda seleccionada, en particular para el copolímero P-48/6. En dicha figura, y para dicho copolímero, se aprecia claramente una brusca disminución en la transmitancia a una temperatura en torno a 43°C, lo que está en perfecta correspondencia con el brusco incremento del radio hidrodinámico que, en torno a esa temperatura, se aprecia en la Figura 6.14 para ese copolímero.

Para el caso del copolímero P-46/20 (Figura 6.16), no se aprecian disminuciones muy bruscas de la transmitancia con la temperatura (aunque el valor exacto de la transmitancia y, por tanto, la magnitud del salto dependen ligeramente de la longitud de onda). Así, la existencia de una temperatura crítica bien definida es menos evidente que para el caso anterior, como ya quedaba de manifiesto en la Figura 6.14 donde el aumento con la temperatura del tamaño de las estructuras en disolución era muy suave y pequeño. Esto es achacable a la poca hidrofobicidad del copolímero P-46/20 (la longitud del segmento hidrofílico de PAMPTMA(+) es relativamente grande) y la consiguiente menor

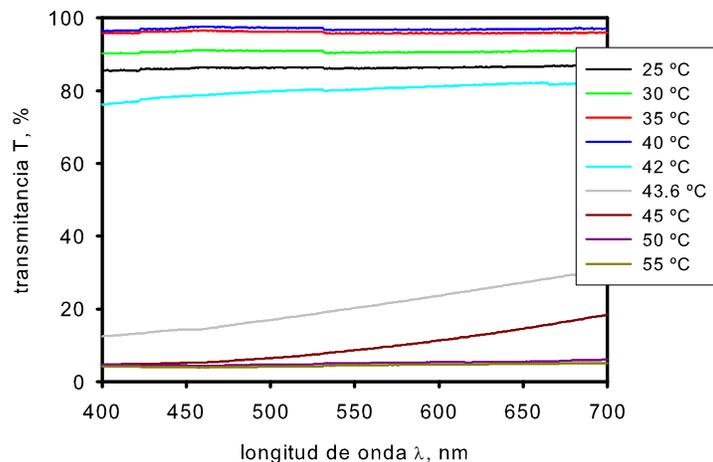


Figura 6.15: Espectros ( $T\%$ ) a varias temperaturas del copolímero P-48/6 en agua miliQ a concentración 0.05% en peso.

tendencia a la formación de agregados. De hecho, la disolución de P-46/20 es bastante transparente a todas las temperaturas estudiadas y nunca se vuelve tan turbia como la del copolímero P-48/6. Aunque parece claro que a partir de 55°C hay una persistente disminución de la transmitancia, no hay un criterio claro para asignar una temperatura crítica. A partir de 55°C el valor de la transmitancia comienza a depender de la longitud de onda, disminuyendo su valor al disminuir la longitud de onda, como también le ocurría al copolímero P-48/6 a temperaturas en torno a la crítica (Figura 6.15), aunque en este caso, la variación de  $T\%$  con  $\lambda$  parece más pronunciada. Por tanto, dependiendo de la longitud de onda seleccionada se puede obtener una disminución más o menos apreciable de la transmitancia con la temperatura. De todos modos, esta disminución nunca es tan dramática como en el caso del copolímero P-48/6.

En la Figura 6.17 se observa la variación de la transmitancia con la temperatura para el copolímero P-46/20 a  $\lambda = 638$  nm. Para la selección de esa longitud de onda hemos respetado el mismo criterio comentado anteriormente al hablar del copolímero P-48/6. Como se aprecia, la transmitancia varía muy débilmente con la temperatura (casi no se forman agregados y los pocos que se forman son pequeños), aunque a partir de 50°C hay una persistente tendencia a disminuir. Esto está en consonancia con el comportamiento

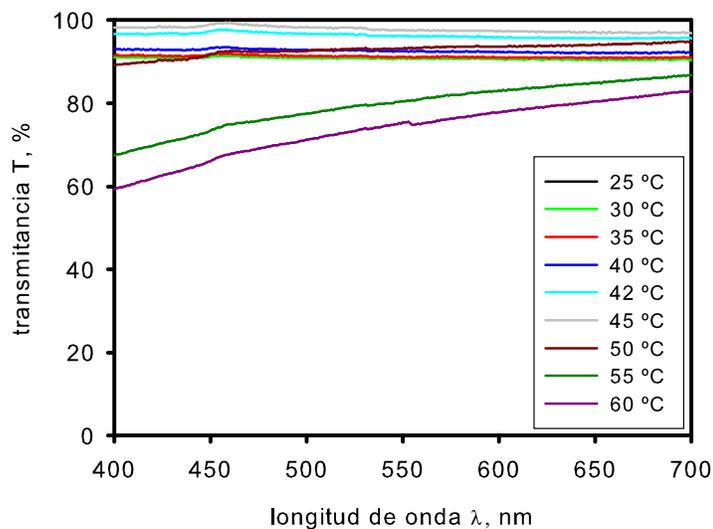


Figura 6.16: Espectros (T %) a varias temperaturas del copolímero P-46/20 en agua miliQ a concentración 0.05 % en peso.

mostrado por este copolímero en la Figura 6.14 donde el ligero aumento del tamaño de los agregados quedaba bien definido en torno a esa temperatura. Es evidente que si se hubiera seleccionado una longitud de onda menor (por ejemplo, 400 nm), la disminución en transmitancia a partir de 50°C hubiera sido más apreciable. De todos modos, esa disminución seguiría siendo muy pequeña en comparación con la brusca disminución en transmitancia experimentada por el copolímero P-48/6, como se pone de manifiesto en la Figura 6.17. Esto hace que para el copolímero P-48/6 se pueda definir una verdadera temperatura crítica a la que la disolución cambia radicalmente de carácter pasando de existir una sola fase a existir dos fases, mientras que ello no es posible para el copolímero P-46/20.

### 6.2.2.c. Medidas de ultracentrifugación analítica

Por último, tal y como se ha comentado anteriormente, también se han medido las disoluciones de los dos copolímeros mediante ultracentrifugación analítica. Para ello se utilizaron disoluciones acuosas (sin sal añadida para evitar en lo posible la formación de

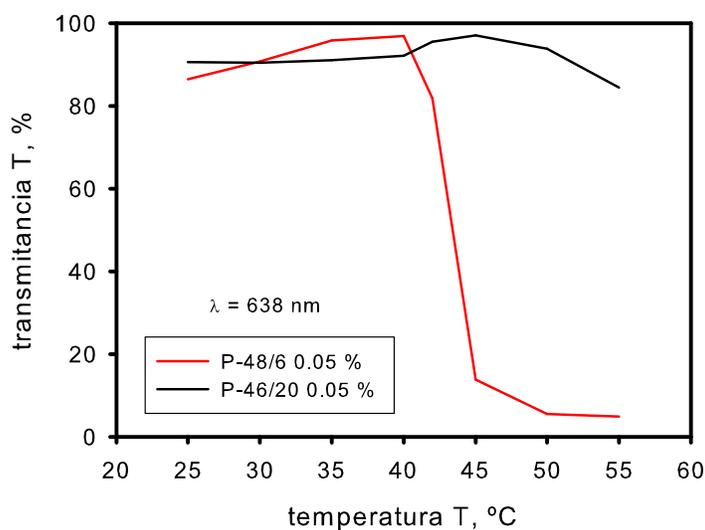


Figura 6.17: Variación de la transmitancia ( $T\%$ ) con la temperatura a  $\lambda = 638$  nm para los dos copolímeros estudiados.

agregados) de concentración 0.05 % en peso. El modo de detección fue interferencia (IF), ya que el copolímero no absorbe, y el tipo de experimento fue de velocidad, estableciendo la velocidad del rotor en 40000 rpm (debido al bajo peso molecular del polímero es conveniente que ésta sea lo mayor posible para que se produzca una sedimentación apreciable). El experimento se realizó a 25°C (temperatura claramente inferior a la temperatura crítica). Es de esperar que a esos valores de temperatura y concentración, ambos relativamente bajos, la disolución esté formada mayoritariamente por unímeros (como ya se puso de manifiesto en las medidas de DLS y UV-vis), aunque siempre persista la formación de agregados (como indica la función de distribución 6.9). Los unímeros deberían poder detectarse a la velocidad de rotación anteriormente citada. Las disoluciones de los dos copolímeros introducidas en la ultracentrífuga fueron previamente medidas en DLS, apreciándose, en las distribuciones en intensidad de ambos, un pico en torno a 1 nm, tamaño correspondiente al unímero, y varios picos más grandes y anchos a tamaños superiores a 50 nm que deben corresponder a agregados. Sin embargo, estos picos a tamaños grandes desaparecerían en las distribuciones en volumen y número, permaneciendo solo el pico del unímero. Todo ello es indicativo de que existen agregados en cantidad despreciable en comparación al unímero.

Puesto que la ultracentrífuga Proteomaelab XL-I de Beckman Coulter puede alcanzar un máximo de 40°C, también intentamos realizar experimentos a esa temperatura ya que, por ser cercana a la crítica, es de esperar la aparición de una población importante de agregados, detectables siempre que la velocidad de rotación sea lo suficientemente baja como para que no sedimenten en tiempos muy cortos. Sin embargo, no pudimos llevar a cabo tales experimentos porque a esa temperatura la óptica se empañaba y no se obtenían *fringes* bien definidos.

Las Figuras 6.18 y 6.19 muestran las gráficas de la distribución del coeficiente de sedimentación  $s$  en las condiciones de trabajo, correspondientes a los copolímeros P-48/6 y P-46/20 respectivamente. El análisis de los datos experimentales para obtener dichas gráficas se realizó con el programa SEDFIT de P. Schuck y col. [81, 135, 136] utilizando el modo de distribución continua  $c(s)$  [81], adecuado para el análisis de experimentos de sedimentación de especies no interactuantes o que interaccionan tan lentamente que son estables durante el proceso de sedimentación. Una de las aplicaciones más relevantes de este método es identificar el número de especies que hay en la muestra y las cantidades relativas en las que éstas se encuentran. A partir del análisis de la distribución continua  $c(s)$  se obtienen básicamente los coeficientes de sedimentación de las especies sedimentantes (tanto en las condiciones de trabajo como referidos a 20°C y disolvente agua). Además, se puede obtener una estimación grosera de los pesos moleculares de dichas especies y un valor promedio de la relación de coeficientes de fricción (*frictional ratio*),  $f/f_0$ , característica de las especies sedimentantes en su conjunto (aunque cada especie puede tener un  $f/f_0$  diferente, el análisis proporciona un único valor). La relación de coeficientes de fricción es el cociente entre el coeficiente de fricción traslacional de la partícula,  $f$ , y el coeficiente de fricción traslacional de la esfera que tuviera el mismo peso molecular ( $M$ ) y volumen específico parcial ( $\bar{v}$ ) que la partícula (sin tener en cuenta la hidratación). Un valor  $f/f_0 = 1$  es indicativo de partículas esféricas mientras que cuanto más alejado esté dicho valor de la unidad más elongada es la partícula sedimentante.

Para realizar dicho análisis se requiere introducir los valores de viscosidad,  $\eta$ , y densidad,  $\rho$ , del disolvente, en este caso agua a 25°C, que se midieron en nuestro densímetro DMA 5000 M de Anton Paar y su módulo auxiliar para medidas de viscosidad Lovis 2000 ME, siendo  $\eta = 0.922$  mPa·s y  $\rho = 0.9972$  g/cm<sup>3</sup>, así como el valor del volumen específico parcial del copolímero, para el cual se tomó  $\bar{v} = 0.84$  cm<sup>3</sup>/g siguiendo trabajos anteriores sobre copolímeros parecidos [137]. Respecto al volumen específico parcial del soluto hay que tener en cuenta dos aspectos: i) el valor que se introduce es único para todas

## 6.2. ESTUDIO DE UN COPOLÍMERO TERMOSENSIBLE BASADO EN PNIPAAAM

las especies en disolución, aunque cada una de ellas pueda tener valores de  $\bar{v}$  diferentes, lo que puede influir en la precisión de los resultados obtenidos, y ii) el peso molecular estimado por SEDFIT es muy sensible al valor  $\bar{v}$  por lo que el hecho de no suministrar un valor exacto puede proporcionar valores del peso molecular relativamente alejados del verdadero.

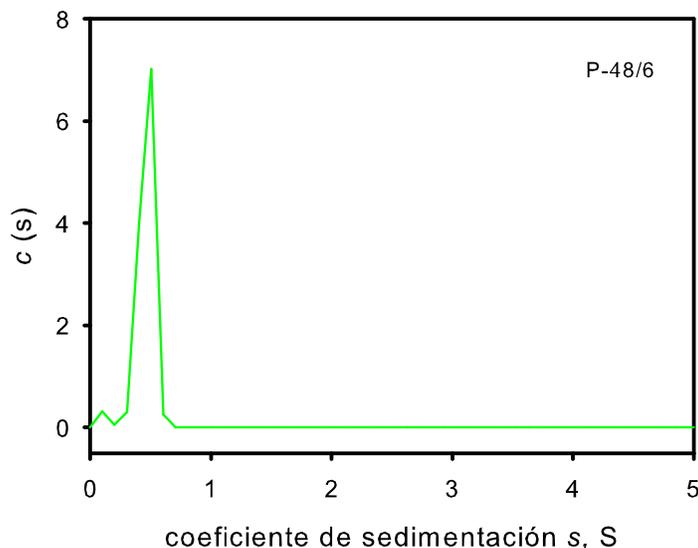


Figura 6.18: Distribución del coeficiente de sedimentación para el copolímero P-48/6 en agua miliQ a concentración 0.05% en peso. Características del experimento:  $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $\omega = 40000$  rpm, modo de detección IF.

Para ambos copolímeros aparece un gran pico a valores de coeficiente de sedimentación pequeños (inferior a 1 S) que debe corresponder a los unímeros. Además de ese pico principal, el análisis de SEDFIT asignaba algunos otros picos a valores de  $s$  elevados a los que asociaba un peso molecular más elevado que el de los unímeros. Estos picos son de tamaño despreciable (invisibles) en las escalas de las Figuras 6.18 y 6.19 y deben corresponder a los pocos agregados que siempre se forman a pesar de trabajar a concentración y temperaturas bajas. Son, además, agregados de pequeño tamaño (agregados muy grandes, si los hubiera, sedimentan muy rápido a 40000 rpm y no son detectables). Por otro lado, estos picos secundarios son más abundantes en el caso del copolímero P-48/6 que en el del copolímero P-46/20, en consonancia con el hecho de que el primero es más hidrófobo y tendente a formar agregados.

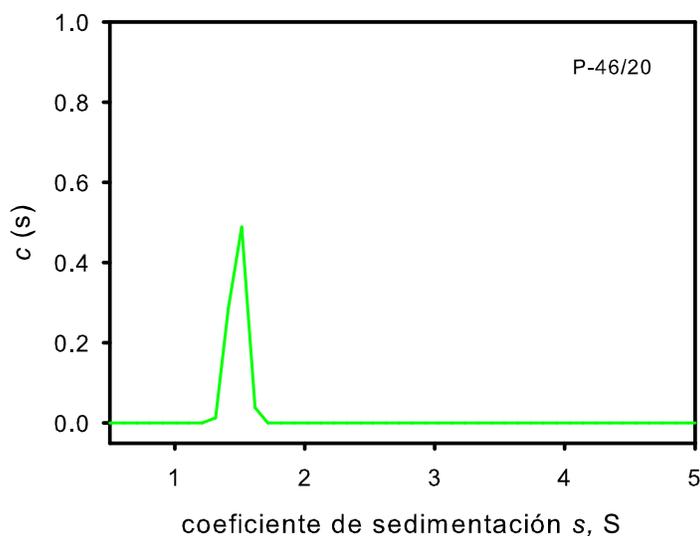


Figura 6.19: Distribución del coeficiente de sedimentación para el copolímero P-46/20 en agua miliQ a concentración 0.05% en peso. Características del experimento:  $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $\omega = 40000$  rpm, modo de detección IF.

Los valores de  $M$ ,  $f/f_0$  y  $s_{20,w}$  ( $s$  convertido a las condiciones estándar de  $20^{\circ}\text{C}$  y disolvente agua), así como la raíz de la desviación cuadrática media (*rmsd*, *root mean squared deviation*) se recogen en la Tabla 6.1. La desviación *rmsd* es una medida de la discrepancia entre los valores experimentales y los calculados tras el análisis es decir, un indicativo de la bondad del ajuste.

Copolímero	<i>rmsd</i>	$f/f_0$	$s_{20,w} / S$	$M / \text{kDa}$
P-48/6	0.005	1.72	0.424	6.64
P-46/20	0.005	1.13	1.35	20.4

Tabla 6.1: Valores de  $f/f_0$ ,  $s_{20,w}$  y  $M$  determinados mediante el análisis con SEDFIT de los perfiles experimentales de ultracentrifugación analítica obtenidos para las disoluciones de los copolímeros P-48/6 y P-46/20. También se muestra el valor de la desviación *rmsd* de cada análisis. Condiciones experimentales:  $c(\text{copolímeros}) = 0.05\%$  en peso,  $T = 25^{\circ}\text{C}$ ,  $\omega = 40000$  rpm.

Estos resultados hay que tomarlos con precaución ya que es complicado estudiar mediante ultracentrifugación analítica sistemas donde los unímeros tienen un bajo peso mole-

cular (inferior a 10000 kDa) ya que se requiere una alta velocidad de rotación, no siempre alcanzable por la instrumentación. Además, si se forman agregados de diverso tamaño, aunque sean escasos en número, la disolución se torna a un sistema polidisperso con un espectro de tamaños amplio, lo que implica la imposibilidad de detectar simultáneamente las estructuras de pequeño tamaño y las estructuras de gran tamaño para las que se requiere una muy baja velocidad de rotación. Por otro lado, el modo de detección de interferencia, aunque muy sensible, está sujeto a un elevado nivel de ruido. Con todo, los resultados son muy razonables para el copolímero P-48/6. Así, el peso molecular proporcionado por SEDFIT para este copolímero ( $M = 6.64$  kDa) no está muy alejado del peso molecular obtenido mediante AFFFF referido anteriormente  $M_{P-48/6} = 8.19$  kDa, más aún teniendo en cuenta que el valor de  $M$  proporcionado por SEDFIT a partir de experimentos de velocidad de sedimentación es solo estimativo (pues la técnica adecuada para obtener pesos moleculares es la de equilibrio de sedimentación) y que el valor del volumen específico parcial utilizado es muy probable que no sea exacto. Además, el coeficiente de sedimentación  $s_{20,w} = 0.424$  S está dentro del rango obtenido para otros copolímeros de semejante naturaleza y peso molecular cuyo  $s_{20,w}$  está comprendido entre 0.4 S y 0.5 S [137]. Por último, el valor  $f/f_0 = 1.72$  indica una estructura algo alejada de la esfericidad (valores entre 1.5 y 1.8 son típicos de estructuras elongadas). Esto puede ser razonable, teniendo en cuenta que  $f/f_0$  es un valor aproximado y representativo de todo el conjunto de estructuras presentes en la disolución. Los unímeros de este copolímero que es lineal y flexible, aunque pequeño, deben de tener una conformación semejante a un ovillo al azar extendido en las condiciones de trabajo (agua a 25°C, temperatura muy inferior a la crítica, son condiciones de buen disolvente). Por otro lado, los pocos agregados que se forman pueden tener cierta asimetría que los aleja de la esfericidad.

El análisis de los datos experimentales para el copolímero P-46/20 fue problemático por lo que los valores obtenidos no son muy buenos. Aún así, presentan cierta coherencia. Curiosamente, las medidas de DLS y UV-vis fueron también conflictivas para este copolímero, obteniéndose, como se ha puesto de manifiesto en secciones anteriores, resultados menos precisos que para el copolímero P-48/6. Así, el valor  $M = 20.4$  kDa es el doble del valor obtenido mediante AFFFF referido anteriormente,  $M_{P-46/20} = 10.82$  kDa, lo que se puede achacar a la ya comentada inexactitud inherente al método de velocidad de sedimentación, la utilización de un volumen específico parcial inexacto y el elevado ruido experimental obtenido. Por otro lado, el valor del coeficiente de sedimentación,  $s_{20,w} = 1.35$  S, parece bastante razonable, teniendo en cuenta que este copolímero tiene

un peso molecular superior al P-48/6. Por último, el valor  $f/f_0 = 1.13$  indicativo de una conformación relativamente esférica (valores entre 1.2 y 1.3 son característicos de estructuras globulares) puede ser razonable puesto que P-46/20 es un copolímero lineal y flexible de mayor longitud que P-48/6 con lo que tenderá a adquirir más fácilmente conformaciones de ovillo al azar. Además, el valor de  $f/f_0$  no se verá tan afectado por la presencia de agregados como en el caso anterior ya que éstos son prácticamente inexistentes en esta muestra.

### 6.2.3. Conclusiones

El copolímero PNIPAAM-co-PAMPTMA(+) presenta en disolución acuosa una temperatura crítica inferior de disolución (LCST) en torno a 40°C, aunque su valor exacto depende de la fuerza iónica de la disolución y de las longitudes relativas entre los segmentos de PNIPAAM y PAMPTMA que constituyen la cadena polimérica. A temperaturas inferiores a la LCST las cadenas se encuentran mayoritariamente disueltas de forma individual, aunque se forman algunos pequeños agregados, debido a que ambos segmentos del copolímero tienen un carácter hidrofílico. A temperaturas superiores a la LCST, las cadenas forman grandes agregados debido a que el segmento de PNIPAAM se vuelve hidrofóbico. La importancia de la agregación depende de las longitudes relativas de los segmentos de PNIPAAM y PAMPTMA. Así, la modalidad P-48/6 es claramente termosensible, experimentando una fuerte agregación por encima de la LCST debido a que en dicho copolímero predomina el efecto del segmento de PNIPAAM. Por el contrario, en la modalidad P-46/20 el comportamiento termosensible es poco apreciable debido a que el segmento hidrofílico de PAMPTMA es de gran longitud y enmascara el carácter hidrofóbico que adquiere el segmento de PNIPAAM al aumentar la temperatura. En ambos casos se ha comprobado que el proceso de agregación es reversible y presenta cierta histéresis. La técnica de dispersión dinámica de luz se ha mostrado muy eficaz para estudiar el fenómeno de agregación e identificar el valor de la LCST. En cambio la técnica de ultracentrifugación analítica se ha revelado poco útil para estudiar este tipo de polímeros.

# Capítulo 7

## Aplicación a suspensiones de nanopartículas de oro

### 7.1. Introducción

Las nanopartículas de metales nobles (principalmente plata y oro) exhiben unas excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, que son intrínsecas a su tamaño nanométrico. En las últimas décadas, han incrementado su interés debido a la biocompatibilidad y baja toxicidad de algunas de ellas. Especialmente las nanopartículas de oro (AuNPs) presentan excelentes propiedades químicas y ópticas. Una propiedad óptica de gran relevancia es la estrecha relación entre el tamaño de las nanopartículas (o de agregados de las mismas) y el valor de la longitud de onda a la que presentan su máxima absorbanza [138, 139]. También son de gran interés las peculiares propiedades fototérmicas por las que al ser activadas en presencia de luz láser desprenden calor, lo que les permite actuar como auténticos “nano-calefactores”. En este sentido, una aplicación prometedora de las AuNPs es su uso como biosensores calorimétricos [140]. Además, las AuNPs pueden ser producidas de forma controlada con distintos tamaños y formas y pueden ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, fármacos, etc.) por lo que es cada vez mayor su utilización en diferentes ámbitos entre los que destaca el biomédico. Así, las AuNPs presentan un extraordinario potencial como agentes fototerapéuticos en el tratamiento del cáncer y para la elaboración de nanoestructuras útiles para el transporte y la vectorización selectiva de fármacos y macromoléculas

## CAPÍTULO 7. APLICACIÓN A SUSPENSIONES DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

terapéuticas [141, 142]. También son muy empleadas en terapia génica (vehiculización de plásmidos, ADN, ARN, etc.) [143–145], diagnóstico [146] e imagen [147].

Las AuNPs se pueden preparar fácilmente, obteniéndose sistemas coloidales monodispersos estables con un tamaño entre 1 nm y 150 nm. Nanoesferas de oro de 2-100 nm de diámetro se pueden obtener por reducción controlada de cloruro de oro ( $\text{AuCl}_3$ ) usando distintos agentes reductores y condiciones. Faraday fue el primero en preparar oro coloidal en 1857 por reducción del cloruro de oro con fósforo [148], atribuyendo el color rojo resultante a la obtención de partículas de tamaño muy pequeño. Años después, Mie corroboró que el color del oro coloidal es dependiente del tamaño [149].

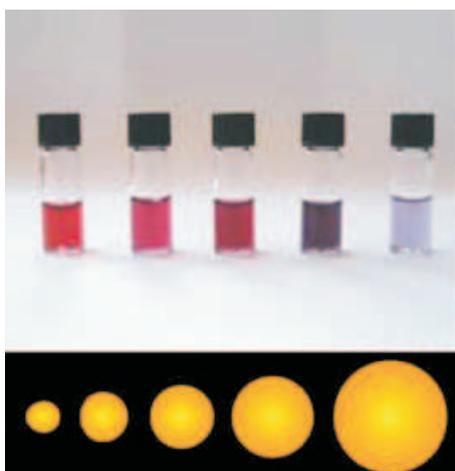


Figura 7.1: Color de las suspensiones de AuNPs en función del tamaño de las nanopartículas [150].

Desde entonces, y especialmente durante los últimos años, se han dirigido importantes esfuerzos a la preparación de AuNPs prácticamente monodispersas y de tamaño controlado por reducción de sales de oro, utilizando generalmente citrato como agente reductor y en presencia de agentes estabilizantes que previenen la aglomeración [151–153]. La relación entre las concentraciones de sal de oro y de agente reductor, así como la velocidad de adición de este último, influyen en el tamaño de las AuNPs obtenidas. Como ya se comentó en el Capítulo 2, cuanto más rápida es la adición del agente reductor, más pequeñas y monodispersas son las AuNPs [21]. En dicho capítulo exponíamos un método sintético probado por nosotros con el que obteníamos AuNPs bastante monodispersas en torno a 19 nm.

Pero no solo la síntesis, sino también la caracterización de las propiedades físico-químicas de este tipo de nanopartículas en diversos medios, principalmente el estudio de la formación de agregados y cómo prevenirlos, es de gran interés para dilucidar su aplicabilidad en condiciones reales. A este estudio dedicamos principalmente este capítulo, para lo cual hemos utilizado nanopartículas comerciales con características bien definidas, lo que resulta más eficiente y barato que realizar la síntesis en nuestro laboratorio.

## 7.2. Caracterización de AuNPs en diversos medios

A continuación se va a estudiar el comportamiento de nanopartículas de oro comerciales en diversos medios acuosos tanto en presencia como en ausencia de sal (estudio del efecto de la fuerza iónica,  $I$ ). Los sistemas a estudiar son: 1) AuNPs en ausencia de polímeros aditivos, 2) AuNPs en presencia del polisacárido quitosano, 3) AuNPs en presencia del copolímero termosensible PNIPAAm-co-PAMPTMA(+).

### 7.2.1. Materiales y métodos

Se utilizaron suspensiones comerciales de nanopartículas de oro con diámetro hidrodinámico nominal  $d_{h,nom} = 10$  nm de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las nanopartículas fueron compradas tanto a Ted Pella, Inc. (Ref. 15703-1, Lote 16536, concentración  $5.7 \times 10^{12}$  partículas/cm<sup>3</sup>) como a Sigma-Aldrich (Ref. 741957-25ML, Lote MKBN5746V, concentración  $\simeq 6 \times 10^{12}$  partículas/cm<sup>3</sup>). Todas ellas se almacenaron a 4°C. Estas nanopartículas están recubiertas de una capa de citrato (cargado negativamente), el cual evita que se produzca la agregación de las nanopartículas.

El quitosano de peso molecular medio fue suministrado por Sigma-Aldrich (Ref. 448877-250G, Lote MKBC3804). De acuerdo con las especificaciones del fabricante, el intervalo de peso molecular es de 190000 Da hasta 300000 Da y la desacetilación es del 75% al 85%.

El PNIPAAm-co-PAMPTMA(+) fue sintetizado en los laboratorios del Grupo de Investigación del profesor Nyström de la Universidad de Oslo.

Para la correcta disolución del quitosano (que requiere un pH ligeramente ácido) se utilizó ácido acético glacial que se compró a la casa Panreac (Cod. 141008.1611, Lote 8247555P). Para bajar el pH de algunas disoluciones y estudiar su comportamiento en

medio muy ácido se utilizó ácido clorhídrico, HCl, del 37 % en peso adquirido también a Panreac (Cod. 141020.1611, Lote 0000210632).

Para variar la fuerza iónica de la suspensión, se prepararon disoluciones de nitrato de sodio,  $\text{NaNO}_3$ , en agua miliQ. El  $\text{NaNO}_3$  fue comprado a Acros Organics (Cod. 205960010, Lote A-0301681) y tenía un 99 % de pureza según las especificaciones del fabricante.

Todas las disoluciones fueron filtradas con un filtro Millipore de  $0.45 \mu\text{m}$  antes de las medidas.

Las técnicas de medida utilizadas para caracterizar las nanopartículas fueron las siguientes:

- **DLS.** La caracterización del tamaño hidrodinámico (coeficiente de difusión, radio hidrodinámico) de las partículas fue llevada a cabo mediante dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando el equipo Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments Ltd. Las características de la técnica y del equipo están descritas en el Capítulo 2.
- **Potencial zeta.** El equipo Zetasizer Nano ZS también es apto para medir potencial zeta,  $\zeta$ , el cual nos aporta información de la carga en la superficie de la partícula coloidal y de la estabilidad de la suspensión. La técnica de potencial zeta está descrita en el Capítulo 2.
- **UV-vis.** Se realizaron espectros de absorción de las suspensiones coloidales con un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-vis) T92+ de PG Instruments Ltd. El rango de longitud de onda de barrido fue de 450-900 nm siendo el intervalo de barrido de 1 nm. El objetivo es estudiar la resonancia de plasmón superficial (*surface plasmon resonance*, SPR) que exhiben las partículas coloidales metálicas en respuesta a una excitación óptica y que, en las AuNPs, se manifiesta como una banda de absorción en la región del visible comprendida entre el verde y el rojo. La SPR es debida a la oscilación resonante y colectiva de los electrones de conducción en la interfase de dos materiales con permitividad de diferente signo, en este caso los electrones de la superficie de la nanopartícula, oscilación que es estimulada por la luz cuya frecuencia coincida con la frecuencia propia de esos electrones (resonancia), los cuales absorben la luz y adquieren la energía suficiente para desplazarse en contra de la fuerza restauradora de los núcleos positivos [154, 155]. Los resultados del espectrofotómetro se presentan en términos de absorbancia.

- **TEM.** Se realizaron análisis por microscopía de transmisión electrónica (*transmission electron microscopy*, TEM) para visualizar la estructura de los agregados de nanopartículas. Estos análisis se llevaron a cabo con un equipo Philips Technai-12 de 120 kV usando una cámara Megaview II para la adquisición de las imágenes. Para la medida, se depositó una gota de unos 10  $\mu\text{l}$  de una disolución de nanopartículas en una malla de resina recubierta de carbono y una rejilla de cobre y níquel dejándola secar a temperatura ambiente. El exceso se elimina por capilaridad con un papel absorbente.

### 7.2.2. Agregación de AuNPs en medio salino

Las suspensiones coloidales son termodinámicamente inestables y tienden a flocular por lo que el control de la agregación de las nanopartículas es de gran importancia para determinar sus aplicaciones prácticas. Un procedimiento habitual para evitar la agregación de las nanopartículas es el recubrimiento de éstas con pequeñas moléculas cargadas (positiva o negativamente), que inducen una estabilización electrostática. Sin embargo, si el medio acuoso que contiene a las nanopartículas tiene una fuerza iónica suficiente, como ocurre en muchos sistemas biológicos, el apantallamiento de la repulsión electrostática podría resultar en agregación (la agregación inducida por una sal es un proceso bien conocido en las suspensiones de nanopartículas metálicas). Este proceso no es instantáneo y la información sobre la cinética de agregación puede ser obtenida mediante las técnicas de DLS y espectroscopía UV-vis. La comprensión de la estabilidad y la cinética de agregación de suspensiones de AuNPs es esencial para resolver cuestiones con respecto a su aplicabilidad, por lo que muchos autores se han dedicado a abordar este asunto [156–158].

El objetivo de este trabajo es entender los mecanismos que gobiernan la floculación de las nanopartículas de oro recubiertas de citrato bajo varias condiciones de fuerza iónica. Así, se pretende caracterizar la influencia de la fuerza iónica (concentración de sal) en la cinética de agregación de las AuNPs y determinar la estructura de los agregados formados.

Se emplearán los resultados del modelo Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (o modelo DLVO) [159] para analizar la estabilidad coloidal e identificar dos regímenes de agregación que definen el modo en que los coloides agregan para formar dos tipos de agrupación (*cluster*): agregación limitada por difusión (*diffusion-limited cluster aggregation*, DLCA) y agregación limitada por cinética (*reaction-limited cluster aggregation*, RLCA). Nosotros mostramos cómo ambos mecanismos de agregación pueden ser detectados y caracteriza-

dos por las técnicas de DLS y espectroscopía UV-vis. Lo más novedoso de este trabajo es la determinación de la concentración crítica de coagulación (CCC) analizando la evolución temporal del tamaño de partícula y la evolución temporal del pico del plasmón que aparece en el espectro UV-vis. Además, se muestra información detallada del crecimiento y estabilización de los tamaños de las nanopartículas en función de la concentración de sal y del tiempo transcurrido.

Para este trabajo se utilizó la suspensión de AuNPs comprada a Ted Pella, Inc. (Ref. 15703-1, Lote 16536). El tamaño de nanopartícula de la suspensión comercial fue caracterizado mediante DLS antes de su utilización, obteniéndose un diámetro hidrodinámico  $d_h = 13$  nm (en lugar del valor nominal de 10 nm). Todas las medidas fueron realizadas a 25°C.

### 7.2.2.a. Aspectos teóricos de la cinética de la agregación

En el marco de la teoría DLVO [159], hay dos posibles mecanismos asociados a la floculación inducida por la presencia de sal: la agregación limitada por difusión (DLCA) que da lugar a cinéticas de agregación rápidas, y la agregación limitada por reacción (RLCA) que da lugar a cinéticas de agregación lentas. Si la barrera energética de las partículas al acercarse es menor que la energía térmica, las partículas que chocan se asociarán tras la primera colisión de modo que experimentan una rápida agregación ya que la única limitación a la velocidad de asociación es el proceso de difusión que tienen que experimentar las partículas antes de encontrarse (mecanismo DLCA) [160]. Por el contrario, si la barrera energética es del orden o superior a la energía térmica, no todas las colisiones son favorables para el proceso de agregación y el sistema experimenta una agregación mucho más lenta (mecanismo RLCA) [161]. En general, las diferentes partículas de una muestra tendrán diferentes radios hidrodinámicos, es decir, tendremos una distribución de tamaños. Sin embargo, la información sobre la cinética de agregación puede ser obtenida mediante la evolución temporal del radio hidrodinámico promedio definido por la ecuación 1.7 de la sección Introducción.

La siguiente ley de potencia describe la evolución de  $r_h$  durante un tiempo suficientemente largo [162]:

$$r_h(t) \propto r_h(0)t^\alpha, \quad (7.1)$$

donde  $r_h(0)$  es el valor del radio hidrodinámico de las nanopartículas de oro en la suspensión acuosa original (fuerza iónica cero). El exponente  $\alpha$  está relacionado con la eficacia de la colisión, es decir, con la probabilidad de que se produzca una asociación irreversible de dos partículas coloidales tras su colisión. Así, cuanto mayor es  $\alpha$ , la eficacia de la colisión es mayor y la cinética de agregación es más rápida. Además, el parámetro  $\alpha$  puede ser definido como [163]:

$$\alpha \equiv z/d_f, \quad (7.2)$$

donde  $z$  es un parámetro directamente relacionado con el mecanismo de agregación y  $d_f$  es la dimensión fractal del agregado formado. La dimensión fractal de un objeto está relacionada con la “capacidad de llenado” del espacio y por lo tanto es una medida de la densidad del agregado formado. Valores de  $d_f$  de aproximadamente 1.8 están relacionados con agregados abiertos (producidos normalmente por el mecanismo DLCA), mientras que valores de  $d_f$  cercanos a 2.1 corresponden a estructuras más compactas (normalmente producidas por el mecanismo RLCA) [163, 164].

### 7.2.2.b. Resultados

Cuando se añade sal a una suspensión de AuNPs, el recubrimiento negativo que protege a las AuNPs es apantallado y las nanopartículas flocculan. Estudiamos este fenómeno mediante dispersión dinámica de luz y espectroscopía ultravioleta-visible. Las medidas se realizaron a una temperatura de 25°C y a un pH = 7. Para seguir la evolución en la agregación de las nanopartículas de oro a diferentes fuerzas iónicas, se tomaron medidas durante dos horas. Se realizaron análisis para determinar la presencia de los mecanismos de agregación DLCA y RLCA. Como se ha explicado en el Capítulo 2, las funciones de correlación en DLS se construyen a partir de medidas experimentales de las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada. A partir de dichas funciones de correlación, el *software* del equipo Nano ZS proporciona las distribuciones del tamaño hidrodinámico de las partículas coloidales. En este trabajo vamos a trabajar con las distribuciones en intensidad. Los resultados que aquí se presentan constituyen un trabajo que ya ha sido publicado [165].

La Figura 7.2 muestra, en escala logarítmica, una serie de gráficas con la distribución de tamaños para una fuerza iónica de 0.08 M. Cada distribución corresponde a medidas realizadas en diferentes instantes de tiempo. Se aprecia que conforme aumenta el

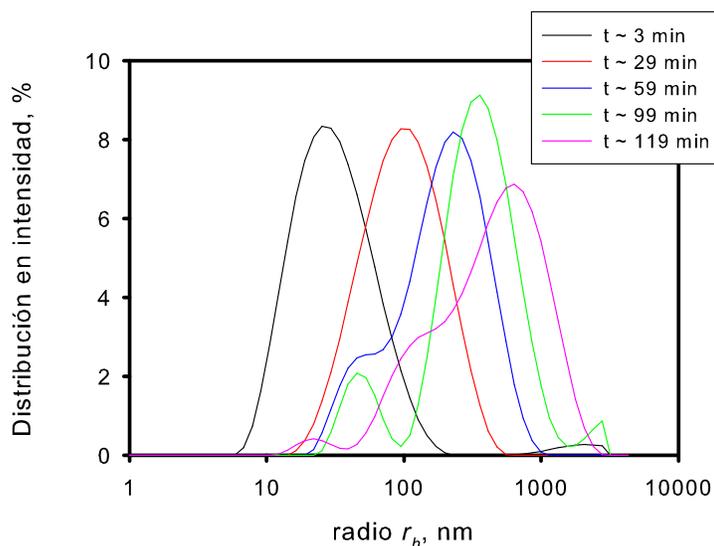


Figura 7.2: Evolución del tamaño hidrodinámico de las nanopartículas a fuerza iónica de 0.08 M.

tiempo, el pico principal de la distribución de tamaño se desplaza a un mayor tamaño hidrodinámico debido a la agregación de las AuNPs. Una vez que se llega a cierto límite de agregación, ésta no prosigue y los agregados comienzan a precipitar. Por otro lado, la distribución se hace más ancha debido al incremento de la polidispersidad con el tiempo de agregación. Algunas distribuciones presentan un hombro que llega a convertirse en pico conforme transcurre el tiempo, lo que indica la coexistencia de pequeños y grandes agregados. Cuando aumentamos la fuerza iónica en la suspensión coloidal por adición de un electrolito, las cargas negativas de la superficie de las nanopartículas de oro se apantallan por lo que las interacciones atractivas entre las nanopartículas de oro se ven favorecidas con la consecuente agregación.

En la Figura 7.3 se observan unas gráficas semilogarítmicas de distribución de tamaño correspondientes a diferentes fuerzas iónicas en un rango de 0 a 1 M y un tiempo de medida similar correspondiente a la etapa inicial de cada experimento. En la gráfica se pueden observar dos regiones claramente diferentes: una región con un valor de fuerza iónica baja hasta 0.07 M y otra con un valor de fuerza iónica alta a partir de 0.1 M. En cada región, las gráficas tienden a superponerse para diferentes valores de fuerza iónica. Entre ambas regiones, existe una región de transición para valores de fuerza iónica intermedias en torno a 0.08 M. En la región de fuerza iónica baja, el proceso de agregación es lento y

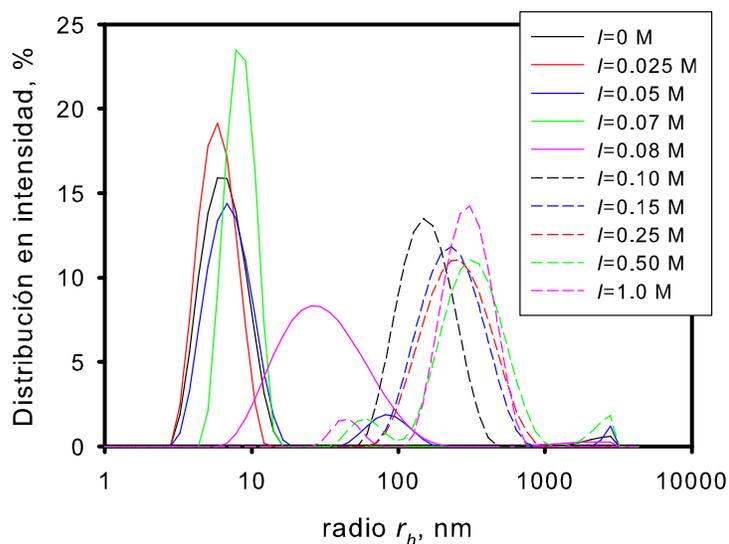


Figura 7.3: Distribución de tamaño de la suspensión de nanopartículas de oro a diferentes fuerzas iónicas a un tiempo de medición de dos minutos.

el tamaño medio de las estructuras formadas es similar al tamaño nominal de las AuNPs originales tal y como fue determinado por nosotros ( $d_h = 13$  nm,  $r_h = 6.5$  nm); la función de distribución solo se desplaza ligeramente a valores de tamaño algo mayores (de hecho, la suspensión coloidal sigue siendo estable a largo plazo). En la región intermedia, el tamaño de las AuNPs es unas pocas veces mayor que su tamaño nominal y la suspensión llega a ser inestable a largo plazo. Finalmente, en la región de fuerza iónica alta, el tamaño medio de los agregados que se forman es cientos de veces superior al tamaño nominal de las AuNPs y la polidispersidad es mucho mayor que a fuerza iónica baja. Es interesante poner de manifiesto que a esas fuerzas iónicas tan altas, aparece claramente visible un pico a  $r_h = 70$  nm (es decir, se observan agregados pequeños). Esto es debido a que, en general, cuando se alcanza una fuerza iónica de 0.1 M, la suspensión se vuelve inestable incluso en las primeras etapas del experimento y se produce una rápida e intensa precipitación de agregados grandes.

La Figura 7.4 muestra la evolución temporal variando la fuerza iónica para las dos propiedades que básicamente caracterizan la estabilidad y el proceso de agregación de la suspensión coloidal: el tamaño coloidal y el potencial zeta. En la Figura 7.4a, se representa la dependencia del promedio de  $r_h$  frente al tiempo para diferentes valores de fuerza iónica

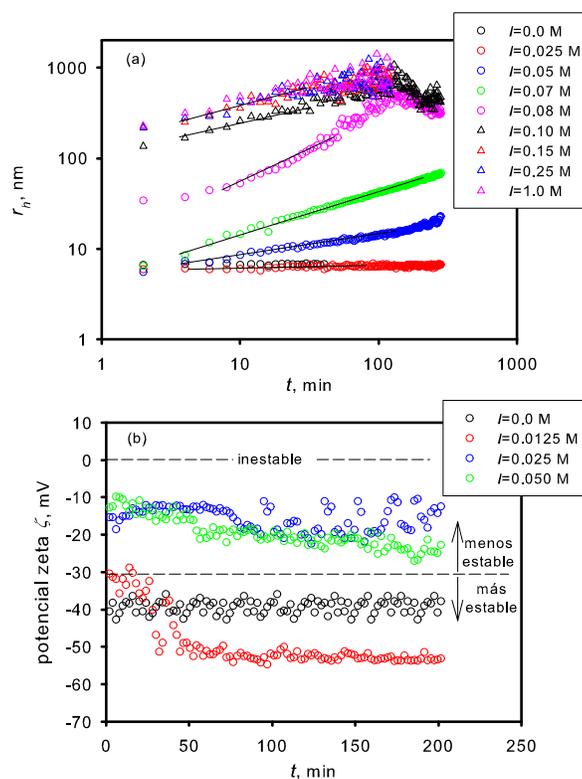


Figura 7.4: (a) Cinética de agregación de las AuNPs a diferentes valores de fuerza iónica. (b) Evolución temporal del potencial zeta de las AuNPs a diferentes fuerzas iónicas.

en escala doble-logarítmica (los valores iniciales de  $r_h$  de la gráfica 7.4a se obtuvieron de las distribuciones de la Figura 7.3). Consistente con la Figura 7.3, las curvas de la gráfica 7.4a se pueden dividir en dos grandes grupos. Hay un grupo para valores de fuerza iónica inferior a 0.07 M y otro para valores de fuerza iónica superior a 0.1 M. Las curvas en el primer grupo indican que inicialmente (en los primeros instantes del experimento), los tamaños de las nanopartículas son cercanos al valor nominal  $r_h = 6.5$  nm. Por otro lado, las gráficas en el segundo grupo indican la presencia de grandes agregados desde el mismo comienzo de la medida debido a la rápida agregación que ocurre inmediatamente después de la adición de la disolución salina a la suspensión coloidal. Justo en el instante inicial de la mezcla, los valores deben corresponder al tamaño nominal de las AuNPs y luego experimentan un incremento abrupto llegando a valores que se muestran en la Figura 7.4. Entre los dos grupos de curvas, es decir, en el rango de 0.07 M a 0.1 M, aparece

un régimen de transición como se muestra para el caso de 0.08 M. Para este rango de fuerza iónica, los agregados iniciales son solo ligeramente más grandes que el tamaño nominal de las nanopartículas pero, conforme avanza el tiempo de reacción experimentan un fuerte crecimiento hasta alcanzar el tamaño característico de los agregados que se forman rápidamente a fuerza iónica mayor que 0.1 M. Por lo tanto este rango de fuerza iónica intermedia es adecuado para apreciar la transición de la suspensión de estable a inestable.

Para valores bajos de concentración de sal (por ejemplo hasta 0.02 M), no hay ninguna variación significativa del tamaño de las nanopartículas a medida que transcurre el tiempo. Obviamente, la concentración de la sal no es suficiente para apantallar la carga de la superficie de las nanopartículas y la suspensión coloidal es estable a largo plazo. Con el aumento de la concentración de la sal, se produce un aumento gradual de la agregación con el tiempo y el promedio del tamaño aumenta casi linealmente desde su valor nominal hasta unas veces ese valor. La velocidad de agregación (evaluada a través de las pendientes de las gráficas) es más elevada conforme la fuerza iónica aumenta. Para las suspensiones con valores de fuerza iónica superiores a 0.1 M se observan agregados cien veces más grandes que el tamaño nominal de las nanopartículas debido al rápido proceso de agregación que se produce inicialmente. De acuerdo con la Figura 7.3, las gráficas con valores de fuerza iónica alta prácticamente se superponen porque una vez alcanzado un valor de fuerza iónica crítico una nueva adición de sal no tiene ningún efecto sobre el proceso de agregación. Los grandes agregados ya formados desde el inicio del experimento crecen lentamente a lo largo del tiempo según las pendientes que se muestran en la Figura 7.4a, hasta alcanzar un tamaño crítico en el que se produce su precipitación. Entonces, los grupos más pequeños que permanecen en suspensión provocan una disminución en el radio hidrodinámico promedio medido como se observa en la Figura 7.4a para las curvas correspondientes a una fuerza iónica superior a 0.1 M. Cuando la fuerza iónica es lo suficientemente alta se produce la precipitación incluso en las etapas iniciales del experimento. De hecho, se puede observar un precipitado en la parte inferior de la celda de medida. Se debe mencionar de nuevo, que para fuerza iónica alta existe una pequeña población de agregados estables de un tamaño entre  $r_h=60$  nm y  $r_h=80$  nm que da lugar a los pequeños picos que aparecen en la Figura 7.3 para valores de fuerza iónica superiores a 0.1 M. Estos agregados se forman en la fase inicial del experimento y mantienen su tamaño durante todo el experimento. La contribución de estas pequeñas entidades a la luz dispersada es mucho menor a la contribución de los grandes agregados formados que

conlleven una falta de precisión en los datos correspondientes. Por lo tanto, la cinética de agregación de estos pequeños agregados es difícil de evaluar y no se muestra.

Para caracterizar la estabilidad de las suspensiones de AuNPs a diferentes fuerzas iónicas se recurre al potencial zeta,  $\zeta$ . Las partículas coloidales electrostáticamente estabilizadas por una densidad de carga negativa pueden considerarse estables a largo plazo cuando el potencial zeta es inferior a -30 mV. Por tanto, conforme el potencial zeta se aproxime a cero, la suspensión coloidal se hará menos estable. Para  $\zeta \simeq 0$ , la suspensión llega a ser totalmente inestable formándose grandes agregados y observándose su precipitación. La Figura 7.4b muestra la evolución con el tiempo del potencial zeta a diferentes fuerzas iónicas. No se pueden obtener conclusiones cuantitativas importantes de la figura porque los valores de potencial zeta no se midieron con precisión pero nos suministra una buena comprensión cualitativa de la estabilidad de la suspensión. Como se aprecia, la suspensión acuosa de las nanopartículas de oro ( $I = 0$ ), al igual que las suspensiones a fuerza iónica muy baja, presenta un valor  $\zeta < -30$  mV durante todo el transcurso del experimento, y por lo tanto las AuNPs son bastante estables (en consonancia con la Figura 7.4a). Para una fuerza iónica superior, todavía dentro de la región de fuerza iónica baja,  $\zeta$  llega a ser superior a -30 mV manteniendo un valor negativo. Por lo tanto la estabilidad de la suspensión disminuye, siendo estable solo a corto plazo. Una vez más, esto es consistente con la Figura 7.4a donde se observa una velocidad de agregación pequeña para  $0.025 \text{ M} < I < 0.05 \text{ M}$ . Para  $I \geq 0.07 \text{ M}$ , el valor de  $\zeta$  fluctúa fuertemente alrededor de cero, y el instrumento no fue capaz de realizar mediciones significativas y fiables. Finalmente, a fuerzas iónicas altas, la suspensión es inestable y ocurre una fuerte floculación: se forman grandes agregados incluso al inicio del experimento, como se muestra en la Figura 7.4a.

El exponente  $\alpha$  que aparece en la ecuación 7.1 puede obtenerse, para una fuerza iónica dada, de la pendiente de la correspondiente gráfica de la Figura 7.4a. Para ello se realiza un ajuste por mínimos cuadrados de los datos pertenecientes a la parte lineal de la gráfica que se esté evaluando (líneas continuas de la Figura 7.4a).

La Figura 7.5 muestra la variación de  $\alpha$  con la fuerza iónica. Para una fuerza iónica por debajo de 0.07 M,  $\alpha$  es pequeña y aumenta bruscamente con  $I$  alcanzando un valor máximo de 0.5. Entonces,  $\alpha$  decrece ligeramente con  $I$  y tiende a presentar un comportamiento de tipo meseta. Este perfil está de acuerdo con la teoría DLVO que predice dos regímenes de agregación, uno lento y otro rápido, en función de la fuerza iónica. Una concentración de sal cercana a 0.07 M parece delimitar estos dos regímenes en nuestro sistema coloidal (las líneas discontinuas ajustan los puntos pertenecientes a cada régimen). En el régimen lento

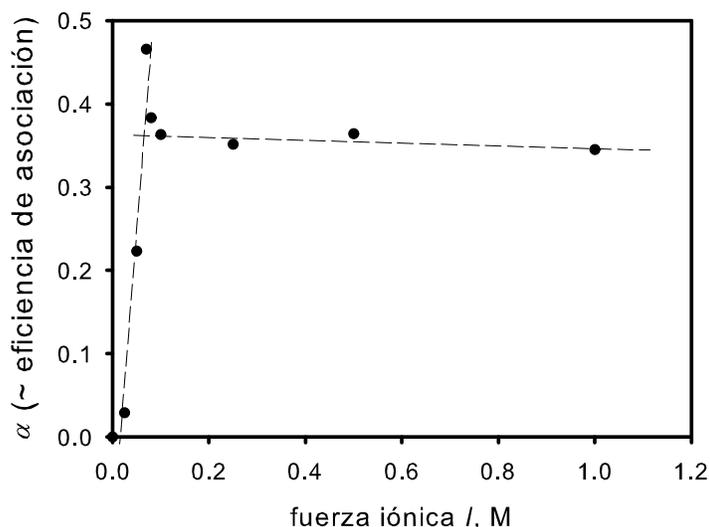


Figura 7.5: Efecto de la fuerza iónica en el parámetro  $\alpha$ .

o RLCA (fuerza iónica y  $\alpha$  pequeñas), las AuNPs son cinéticamente estables mientras que en el régimen rápido o DLCA, su carga superficial es fuertemente apantallada debido a la elevada fuerza iónica, así que el proceso de agregación está gobernado por la difusión y el valor de  $\alpha$  es elevado y prácticamente constante.

Usando la ecuación 7.2, podemos estimar un valor típico para  $\alpha$  en el mecanismo DLCA. Por lo tanto, teniendo en cuenta que  $d_f \approx 1.8$  y  $z = 1$  para un proceso de agregación puramente gobernado por el mecanismo DLCA [163], entonces  $\alpha = 1/1.8 \approx 0.55$ . De hecho, se ha obtenido  $\alpha = 0.53$  para suspensiones de oro a altas concentraciones de sal [164] lo cual está cercano al valor encontrado en este trabajo para  $I = 0.07$  M y no muy alejado de los valores encontrados para una mayor fuerza iónica. Dado que los valores de  $\alpha$  que corresponden al comportamiento tipo meseta en este trabajo son más pequeños que 0.53, podríamos afirmar que en nuestro sistema coloidal existe una prevalencia del mecanismo DLCA para  $I \geq 0.07$  M pero, aún así, el mecanismo RLCA está de alguna manera presente. Por otra parte, teniendo en cuenta que  $z = \alpha d_f$ , podemos estimar el valor máximo del parámetro cinético  $z$  encontrado en nuestros experimentos que corresponde al caso de  $I = 0.07$  M para el cual  $\alpha \approx 0.47$ . Asumiendo que el mecanismo DLCA prevalece bajo estas condiciones de salinidad,  $d_f \approx 1.8$  da lugar a  $\zeta \approx 0.85$ . En cualquier caso, el valor de  $z$  es menor que 1 para todo valor de la fuerza iónica, lo que significa que la asociación de pequeños agregados gobierna el mecanismo de agregación [163].

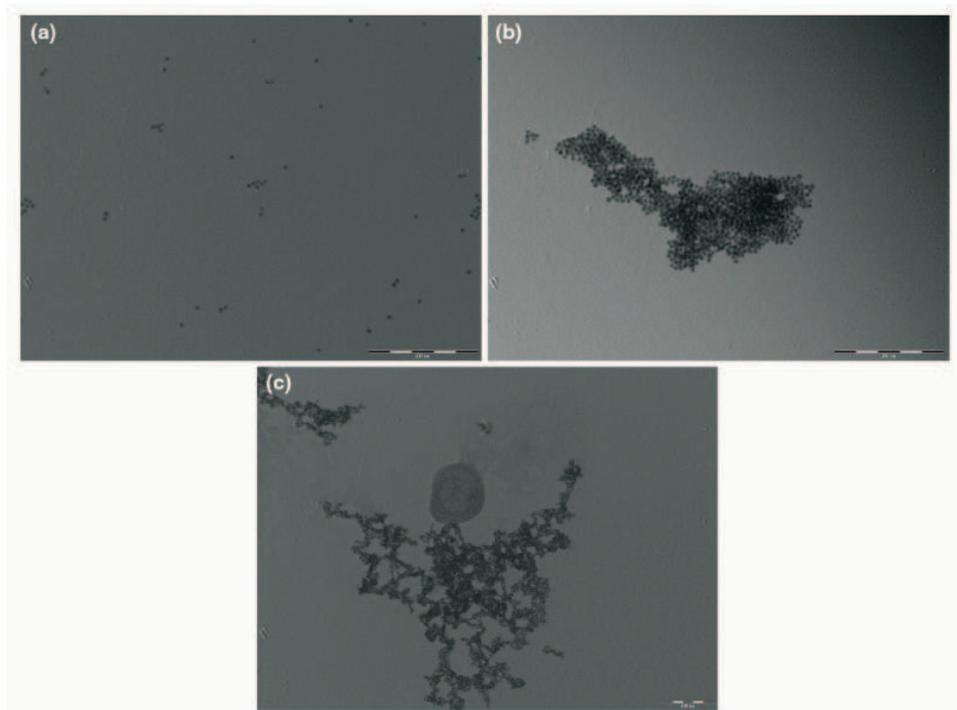


Figura 7.6: Imágenes de TEM de suspensiones de AuNPs tomadas aproximadamente una hora después de ser preparadas: (a)  $I = 0$ , (b)  $I = 0.08$  M, (c)  $I = 0.17$  M. En los tres casos, la escala de la esquina inferior derecha representa 200 nm.

El tipo de proceso de agregación que emerge de los datos de DLS queda confirmado por las imágenes de microscopía TEM mostradas en la Figura 7.6, correspondientes a suspensiones de AuNPs a tres fuerzas iónicas diferentes. La Figura 7.6a ilustra el caso para  $I = 0$ , es decir, para la suspensión acuosa original de nanopartículas de oro recubiertas con tampón citrato. Puede observarse cómo las nanopartículas individuales (o grupos de algunas de ellas) se encuentran dispersas en el medio acuoso. La Figura 7.6b corresponde al caso intermedio  $I = 0.08$  M. Se observa claramente la presencia de un agregado inducido por la adición sal. Además, puesto que la foto fue tomada tras una hora de la adición de la sal, la estructura del agregado está bien desarrollada, presentando un tamaño mayor de 100 nm (como se esperaba según la Figura 7.4a). Este agregado es relativamente compacto indicando que el mecanismo RLCA está de alguna manera presente a esa fuerza iónica, lo que está de acuerdo con la hipótesis planteada en el párrafo anterior. Por último, en la Figura 7.6c se muestra el caso para una fuerza iónica elevada,  $I = 0.17$  M, mayor que el valor umbral donde se observa un cambio en el mecanismo de la cinética de agregación.

Así, aparecen agregados grandes y abiertos (no compactos) con un tamaño mucho mayor de 200 nm (en consonancia con la Figura 7.4a). Esto también está de acuerdo con la suposición hecha anteriormente de que, para este régimen de fuerza iónica, el proceso de agregación está gobernado por el mecanismo DLCA, de modo que las estructuras son menos compactas.

La concentración crítica de electrolito para la coagulación (y precipitación) de las nanopartículas (llamada simplemente concentración crítica de coagulación o CCC) está relacionada con el valor de la fuerza iónica a la que un sistema coloidal cambia de ser estable a largo plazo a inestable. Para ello, determinamos el valor de  $I$  al que se produce la intersección de los regímenes de agregación (lento y rápido) observados en la Figura 7.5 [166]. Debido a la brusca transición, es fácil conseguir la intersección de las dos líneas y establecer  $CCC = 0.075$  M como una buena estimación para nuestro sistema coloidal.

Finalmente, la resonancia de plasmón de superficie (SPR) se estudia usando el espectrofotómetro ultravioleta-visible.

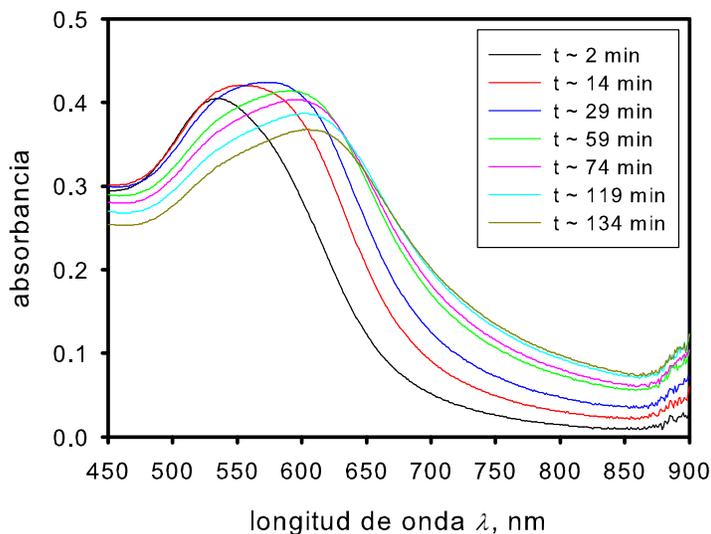


Figura 7.7: Evolución en el tiempo del espectro UV-vis de la suspensión de nanopartículas de oro para  $I = 0.075$  M.

La Figura 7.7 muestra los espectros de absorción ultravioleta-visible registrados a diferentes instantes de tiempo para una suspensión de AuNPs con fuerza iónica  $I = 0.075$  M (un estudio análogo al de la Figura 7.2). Como se observa, la longitud de onda correspondiente al máximo absoluto de la absorbancia,  $\lambda_{max}$ , llamado pico de plasmón

o pico SPR, se desplaza a valores mayores conforme pasa el tiempo, es decir, conforme se produce la agregación. Así, las AuNPs con radio  $r_h = 6.5$  nm de la suspensión inicial presentan un máximo de absorción en torno a  $\lambda_{max} = 520$  nm durante los primeros instantes de la agregación (hasta aproximadamente 25 minutos). Posteriormente  $\lambda_{max}$  aumenta levemente y toma valores en la región de luz verde-amarilla. Finalmente, cuando se forman grandes agregados,  $\lambda_{max}$  se desplaza a valores en torno a 600 nm, lo que significa que la suspensión absorbe mayoritariamente luz roja. Además, la absorbancia a longitudes de onda menores o iguales  $\lambda_{max}$  disminuye con el tiempo (hasta aproximadamente los 30 minutos cuando el tamaño promedio de los agregados  $r_h > 80$  nm como se deduce de las Figuras 7.2 y 7.4a). Al mismo tiempo, aumenta la anchura del pico de plasmón, así como la absorbancia a longitudes de onda mayores que  $\lambda_{max}$ . En general, conforme los agregados crecen, la absorbancia correspondiente a la región de longitud de onda pequeña se vuelve menos relevante en comparación con la absorbancia correspondiente a la región de longitud de onda grande. Todo esto hace que cambie el color de la suspensión de rojo-rubí a violeta.

Cuando el tamaño de la nanopartícula es mucho más pequeño que la longitud de onda de la luz incidente, se absorbe energía a través de los siguientes mecanismos [167]: (1) excitaciones colectivas de los electrones “libres” que inducen resonancias de plasmón de superficie, (2) transiciones electrónicas de bandas ocupadas a bandas de mayor energía y (3) dispersión o esparcimiento superficial de los electrones “libres”. El efecto de dispersión o esparcimiento (3) gana en importancia a los efectos de absorción (1) y (2) conforme aumenta el tamaño de partícula [167]. Como resultado, el valor de absorbancia del pico de plasmón decrece y el pico se hace más ancho y se desplaza a valores del rojo [168, 169]. Este resultado es consistente con la teoría de Mie y otros enfoques teóricos basados en las ecuaciones de Maxwell [170]. Es de esperar que cuando se haya producido la unión de un gran conjunto de agregados, el pico de plasmón superficial prácticamente desaparezca.

La Figura 7.8 muestra el espectro UV-vis dependiendo de la fuerza iónica a un tiempo inicial de aproximadamente dos minutos. En ese tiempo de medida, se observa que el pico de absorción del plasmón se desplaza hacia el rojo, se hace más ancho y presenta un mayor valor de absorbancia al aumentar la concentración de la sal. Este efecto en la SPR se explica por la agregación de las nanopartículas inducida por la sal. Como era de esperar, el efecto se incrementa conforme lo hace la concentración de la sal. El experimento de resonancia de plasmón superficial está totalmente de acuerdo con los resultados obtenidos con el DLS (ver Figuras 7.3 y 7.4a) donde las suspensiones de nanopartículas con  $I < 0.05$

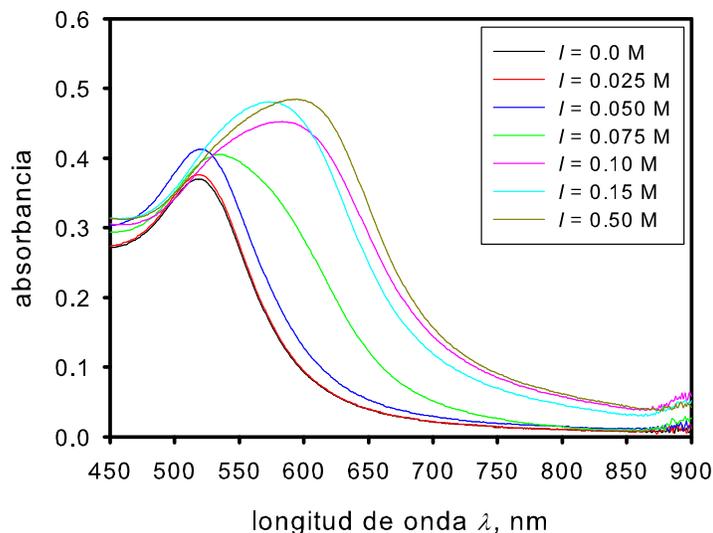


Figura 7.8: Espectro UV-vis de la suspensión de AuNPs a diferentes fuerzas iónicas a un tiempo inicial de 2 minutos.

M se comportan prácticamente como suspensiones libres de sal mientras que para valores mayores de  $I$  se observan grandes agregados desde el mismo comienzo de los experimentos. De hecho, las gráficas de absorción se pueden clasificar en dos grandes grupos: 1) aquellas a  $I < 0.07$  M, que tienden a mantener el pico de plasmón a una longitud de onda de alrededor de 520 nm, y 2) aquellas a  $I > 0.1$  M, que presentan un desplazamiento del pico de plasmón hacia longitudes de onda mayores de 600 nm. Además, existe una región de fuerza iónica intermedia, representada en la Figura 7.8 por la gráfica correspondiente a  $I = 0.075$  M, donde el pico de plasmón empieza a desplazarse apreciablemente hacia longitudes de onda mayores sin dejar la región de luz verde. Por lo tanto, existe una correspondencia entre las curvas de absorbancia y las gráficas de distribución de tamaño que se muestran en la Figura 7.3. De nuevo, puede observarse la correlación entre el pico de plasmón desplazado hacia el rojo y la formación de grandes agregados a través de las imágenes de TEM mostradas en la Figura 7.6.

Como resumen del efecto del tiempo y la concentración de sal en la suspensión de AuNPs, la Figura 7.9a muestra la evolución temporal del pico de plasmón (su longitud de onda) para diferentes fuerzas iónicas. Para ello,  $\lambda_{max}$  se ha extraído y representado para diferentes valores de  $I$  y del tiempo. Los datos se representan en escala semilogarítmica con el fin de conseguir una cierta linealidad y analizarlos de la misma manera que las

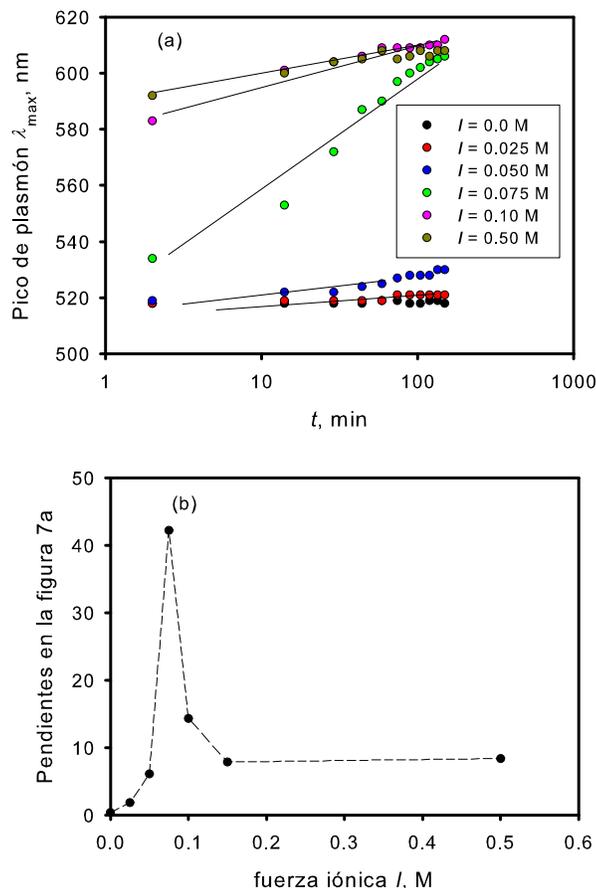


Figura 7.9: (a) Gráficas semilogarítmicas que representan el desplazamiento de  $\lambda_{max}$  para diferentes valores de fuerza iónica conforme pasa el tiempo. (b) Pendientes de las gráficas semilogarítmicas anteriores frente a la fuerza iónica.

gráficas de la Figura 7.4a. Análogamente a la Figura 7.4a, las gráficas de la Figura 7.9a forman dos grandes grupos: un grupo para una fuerza iónica baja hasta aproximadamente 0.07 M y un grupo para una fuerza iónica alta a partir de 0.1 M. El valor de  $\lambda_{max}$  en el primer grupo permanece constante o aumenta linealmente y de forma muy ligera con el tiempo, empezando en  $\lambda_{max} = 520$  nm que, como antes se comentaba, es el pico de plasmón correspondiente a las AuNPs con  $r_h = 6.5$  nm. En el segundo grupo,  $\lambda_{max}$  también parece aumentar lineal y ligeramente con el tiempo aunque empezando a una  $\lambda_{max}$  mayor. Como ocurrió con la cantidad  $r_h$  representada en la Figura 7.4a, la apariencia es engañosa y de hecho  $\lambda_{max}$  sufre un rápido incremento inicial desde 520 nm hasta 600 nm dentro del primer minuto de reacción. Este incremento no se observa porque esos

datos no pudieron ser registrados como consecuencia de la rápida cinética de agregación inicial. En la representación lineal correspondiente a la Figura 7.9a (no se muestra aquí), el abrupto incremento inicial de  $\lambda_{max}$  fue de alguna manera menos intuitivo. En acuerdo con la evolución de  $r_h$  representada en la Figura 7.4a,  $\lambda_{max}$  varía lentamente tras el abrupto incremento inicial para posteriormente tender a una meseta que se aprecia mejor en la representación lineal que se acaba de mencionar. El valor de la meseta corresponde a la formación de grandes agregados estables a lo largo del tiempo. El cambio abrupto detectado de  $\lambda_{max}$  hacia valores más altos y más tarde su tendencia a valores constantes cuando la fuerza iónica es suficientemente grande están de acuerdo con otros trabajos experimentales realizados con AuNPs [169].

Además, aparece la misma región de fuerza iónica intermedia (entre 0.07 M y 0.1 M) observada en la Figura 7.4a donde la propiedad medida aumenta de forma rápida y bastante monótona con el tiempo. En este caso,  $\lambda_{max}$  varía desde 520 nm hasta los valores de longitud de onda a los que absorben los grandes agregados que se forman. Ese comportamiento, se observa claramente en la gráfica correspondiente a  $I = 0.075$  M. Por lo tanto, una fuerza iónica intermedia permite monitorizar toda la cinética de agregación, pudiéndose observar cómo varía una determinada propiedad desde su valor característico para pequeños agregados hasta el valor representativo de los grandes agregados. Por otro lado, esa concentración de sal intermedia, tan claramente detectable, resultó ser una buena estimación del valor de la CCC tal y como dedujimos anteriormente mediante DLS. Por lo tanto, mediante una técnica tan simple como la espectroscopía UV-vis se puede determinar el valor de la CCC.

Obviamente, la cinética de agregación se refleja por el desplazamiento en la longitud de onda del pico de plasmón y, por lo tanto, los dos mecanismos de agregación, RLCA y DLCA, deben manifestarse de alguna manera en la evolución temporal de dicho pico. Como ya se comentó, existe una similitud entre las Figuras 7.4a y 7.9a. Por lo tanto, por analogía con el análisis efectuado sobre la Figura 7.4a, hicimos un ajuste lineal de las gráficas semilogarítmicas representadas en la Figura 7.9a (líneas continuas) y representamos el valor de las pendientes frente a la fuerza iónica. Estas pendientes, en principio, no tienen ningún significado físico pero se pueden utilizar como indicadores del cambio en el mecanismo de agregación y, por lo tanto, para estimar el valor de la CCC. De esta manera obtenemos la Figura 7.9b, la cual es cualitativamente similar a la Figura 7.5a: un fuerte aumento en la pendiente desde  $I = 0$  hasta  $I = 0.075$  M y luego un decrecimiento a valores que se mantienen por encima de aquellos a fuerza iónica baja y que tienden a

formar una meseta. De nuevo, aparecen dos regímenes que pueden ser asociados a los dos mecanismos de agregación, RLCA hasta  $I = 0.075$  M y DLCA para  $I > 0.075$  M, cuya confluencia proporciona una medida de la CCC.

### 7.2.2.c. Conclusiones

La estabilidad de las suspensiones acuosas de las nanopartículas de oro coloidales recubiertas por citrato disminuye por la adición de sal al medio debido al apantallamiento de las cargas superficiales de las nanopartículas. Cuanto más elevada es la fuerza iónica del medio, la estabilidad de la suspensión es menor. La comprensión de la cinética de agregación inducida por la adición de sal es de gran importancia para determinar la aplicabilidad de las nanopartículas de oro. Tanto la dispersión dinámica de luz como la espectroscopía UV-vis son técnicas adecuadas para seguir el proceso de agregación con el tiempo. Por encima de  $I = 0.1$  M, la floculación de las nanopartículas de oro sucede rápidamente y se forman grandes agregados (100 veces más grandes que el tamaño nominal de las partículas), los cuales son fácilmente monitorizados por DLS. Las estructuras más grandes que se forman precipitan después de un cierto tiempo produciendo una disminución en el radio hidrodinámico promedio detectado. Por otro lado, el característico pico de plasmón que aparece en el espectro UV-vis de las nanopartículas metálicas se desplaza hacia una longitud de onda mayor conforme el tamaño de partícula aumenta debido a la formación de agregados por la adición de sal. La concentración crítica de coagulación se determinó que era aproximadamente 0.075 M cuando se utiliza  $\text{NaNO}_3$  como electrolito añadido. Ese valor pudo ser determinado tanto por DLS como por espectroscopía UV-vis. La técnica DLS nos da información a través del análisis de la evolución temporal del radio hidrodinámico y la espectroscopía UV-vis a través de la evolución temporal del pico de plasmón. Las imágenes TEM corroboran la presencia de los mecanismos de agregación RLCA y DLCA a bajas y altas fuerzas iónicas respectivamente y, están en total acuerdo con los resultados procedentes de las técnicas de DLS y espectroscopía UV-vis.

### 7.2.3. Agregación de AuNPs en presencia de quitosano

Las nanopartículas sin recubrir en general no son estables en agua a pH neutro o en fluidos fisiológicos, en donde tienden a aglomerarse y precipitar. Por ello es necesario estabilizar estas nanopartículas, ya sea mediante estabilización estérica o electrostática. La estabilización y solubilización de las nanopartículas generalmente se realiza por recu-

brimiento con moléculas orgánicas, tensioactivos, polímeros, biomoléculas, recubrimientos inorgánicos, etc. La funcionalización con polímeros permite mejorar la estabilidad de las nanopartículas en medios acuosos, además de modificar convenientemente su toxicidad y biocompatibilidad, a la vez que se proporciona una unión fuerte y duradera entre el recubrimiento y el núcleo de la nanopartícula. A continuación presentamos un trabajo sobre recubrimiento de nanopartículas de oro con quitosano cuyos resultados ya han sido publicados [171].

### 7.2.3.a. Consideraciones sobre el quitosano

El quitosano (*chitosan*, CS) es un polisacárido lineal y biocompatible que en disolución acuosa adquiere carga positiva por lo que se puede utilizar como agente de recubrimiento para nanopartículas cargadas negativamente. El quitosano está formado por unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina (por lo que pertenece a la familia de los aminopolisacárido) y se obtiene por desacetilación de la quitina (cuyas unidades monoméricas son casi exclusivamente N-acetil-D-glucosamina). Los distintos monómeros están unidos por enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1-4). En cuanto a su función, se trata de un polisacárido estructural que forma parte de la pared celular de hongos, del exoesqueleto de muchos crustáceos e insectos, así como de algunos órganos de otros animales. La Figura 7.10 ilustra la estructura química genérica de un monómero de quitosano: cuando X=H el monómero es D-glucosamina y cuando X=CH<sub>3</sub>-CO el monómero es N-acetil-D-glucosamina (cuanto mayor sea el grado de desacetilación del quitosano, más unidades de D-glucosamina posee y más soluble es en medio ácido). En disolución acuosa se convierte en uno de los pocos polisacáridos cargados positivamente y por lo tanto, capaz de interactuar con las AuNPs recubiertas por citrato con carga negativa. El CS ha sido empleado ampliamente para la reducción y estabilización de nanopartículas de oro [172–174] y como agente de recubrimiento para diseñar sistemas de nanopartículas capaces de actuar como sensores o portadores de fármacos [174–176]. Debido a que el CS solamente es soluble en disoluciones ácidas, en primer lugar se evaluó cómo la acidez afecta a la suspensión de AuNPs. Además, se determinó cómo las condiciones de trabajo influyen en una disolución de CS. De esa manera, seremos finalmente capaces de entender los datos suministrados por las técnicas de caracterización cuando una suspensión de AuNPs y una disolución de CS se mezclan bajo condiciones límite de fuerza iónica: sin sal añadida (fuerza iónica cero) y con elevada fuerza iónica.

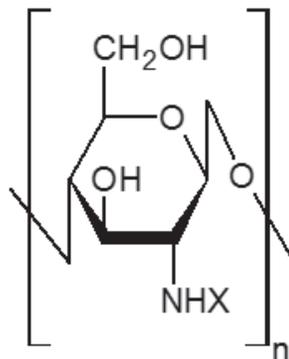


Figura 7.10: Estructura química genérica de un monómero de quitosano: X = H (D-glucosamina) o X = CH<sub>3</sub>-CO (N-acetil-D-glucosamina).

### 7.2.3.b. Resultados

Todos los experimentos se llevaron a cabo a pH = 4, midiéndose éste con un pH-metro después de la adición controlada de ácido acético, y a una temperatura de 25°C. Se estudió el comportamiento de tres sistemas:

- Suspensión de AuNPs nativas
- Disolución de CS original
- Mezcla de la suspensión de AuNPs y la disolución de CS (que tenderá a formar estructuras mixtas que denominaremos con el término inglés habitual de *nanocomposite*)

La concentración de trabajo de AuNPs fue de  $2.85 \times 10^{12}$  partículas/cm<sup>3</sup> y la de CS fue de 0.001 g/cm<sup>3</sup>, en todos los casos. Como se explica más adelante, esa concentración de CS corresponde a una disolución no diluida de manera que es de esperar que las cadenas de CS interactúen entre sí para formar algún tipo de estructura enmarañada (la concentración de solapamiento crítica de CS se especificará más adelante). El objetivo es estudiar cómo las AuNPs interactúan con esas estructuras de CS tanto en ausencia como en presencia de sal. Para este último propósito, hemos establecido una elevada fuerza iónica de 0.225 M por adición de NaNO<sub>3</sub>. Esta fuerza iónica corresponde a un caso extremo ya que provoca una rápida agregación de las AuNPs [165], como se ha comprobado en la sección anterior. La gran mayoría de los experimentos se llevaron a cabo a pH = 4 mediante la adición de

ácido acético (HAc). La razón de elegir ese pH es que es el pH más bajo que pueden tolerar las AuNPs sin agregar (al menos en la escala de tiempo con la que trabajamos en nuestros experimentos), a la vez que el CS de peso molecular medio con el que trabajamos puede ser fácilmente disuelto. Por otro lado, usamos ácido acético en vez de tampón acetato ya que el incremento no despreciable en la fuerza iónica debida al acetato provoca la agregación de las AuNPs. Para completar el trabajo, también se llevó a cabo una serie de experimentos a  $\text{pH} = 2$  por adición de ácido clorhídrico (HCl) para estudiar la capacidad del CS de evitar la agregación de las AuNPs a pH tan bajo. También realizamos experimentos a  $\text{pH} > 4$  (hasta pH aproximadamente 9), pero a estos pH las AuNPs no agregan por lo que su estudio no se considera de gran importancia en este trabajo.

### **Influencia del pH en la suspensión de AuNPs nativas**

La Figura 7.11 muestra la distribución de tamaño en intensidad obtenida a través de las medidas de DLS para AuNPs bajo diferentes condiciones de fuerza iónica y pH. Las medidas se llevaron a cabo a los dos minutos de la preparación de la muestra para apreciar mejor cómo de rápido ocurre la agregación bajo los valores de pH y fuerza iónica que se impondrán después a la mezcla de AuNPs y CS. A  $\text{pH} = 4$  (Figura 7.11) encontramos prácticamente la misma distribución que a  $\text{pH} = 7$  (Figura 7.3), presentando un único pico estrecho y un promedio del radio hidrodinámico de aproximadamente 13 nm. Así, el posible proceso de agregación debido al  $\text{pH} = 4$  tiene que ser extremadamente lento y no afecta a las condiciones de este trabajo (podemos considerar las AuNPs estables a ese valor de pH). Sin embargo, bajo ese mismo valor de pH pero a una elevada fuerza iónica,  $I = 0.25 \text{ M}$ , ocurre una fuerte y rápida agregación (el promedio del radio hidrodinámico se desplaza aproximadamente a 500 nm). Ese proceso de agregación continúa en el tiempo dando lugar a grandes agregados de tamaño micrométrico observándose la sedimentación en el fondo de la celda de medición. Por otro lado, si el pH de la suspensión nativa se reduce a 2 por la adición de HCl, de nuevo ocurre una clara y rápida agregación con la aparición de agregados de AuNP de tamaño hidrodinámico promedio de alrededor de 100 nm.

El comportamiento que se acaba de describir, se confirma mediante el espectro UV-vis en la Figura 7.12. Aunque el valor de la absorbancia y la anchura del pico de plasmón dependerán de la concentración de nanopartículas y de la anchura de la distribución en tamaño, la posición del pico de plasmón es solamente determinada por el tamaño de partícula. En la Figura 7.12, el pico de plasmón correspondiente a la suspensión de las

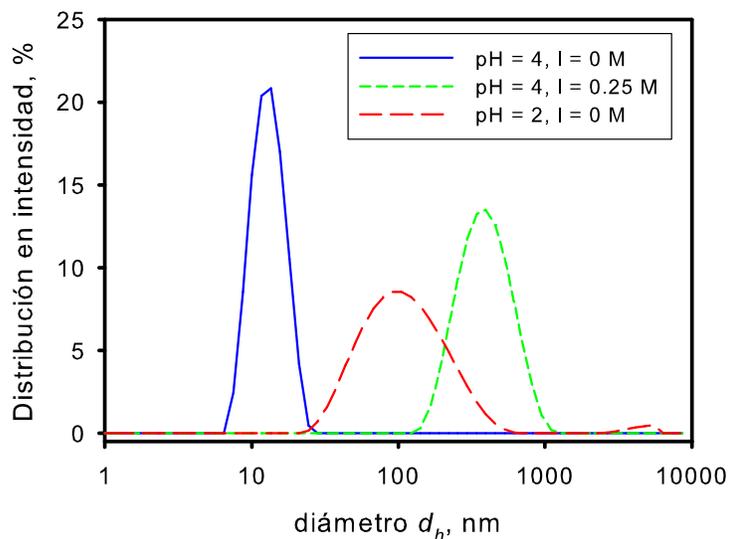


Figura 7.11: Distribución en tamaño de AuNPs bajo tres condiciones diferentes después de 2 minutos de la preparación de la muestra.

AuNPs a  $\text{pH} = 4$  y fuerza iónica nula,  $I = 0$ , aparece en el valor característico de las AuNPs con  $d_h = 13$  nm, es decir  $\lambda_{max} \approx 520$  nm (línea continua). Después de la adición de sal para conseguir  $I = 0.25$  M, hay un desplazamiento del pico hacia  $\lambda_{max} \approx 590$  nm (línea a trazos) que se debe a la formación rápida de grandes agregados como se observa en la Figura 7.11. Esta fuerte agregación y el desplazamiento del pico de plasmón cuando  $I > 0.08$  M ya se puso de manifiesto en la sección anterior (Figura 7.8). Por otro lado, para una suspensión en ausencia de sal y a  $\text{pH} = 2$  (línea discontinua), se observa un desplazamiento del pico hacia  $\lambda_{max} \approx 535$  nm que corresponde a los agregados de tamaño en torno a 100 nm observados en la Figura 7.11.

En conclusión, las AuNPs forman grandes agregados con la disminución del pH y el incremento de la fuerza iónica. Sin embargo, el valor de pH moderado de 4, que se emplea en este trabajo para disolver el CS, no provoca la suficiente agregación como para interferir en los procesos de agregación que pudieran surgir en el sistema formado por AuNPs y CS cuando se trabaja a condiciones severas de pH y fuerza iónica.

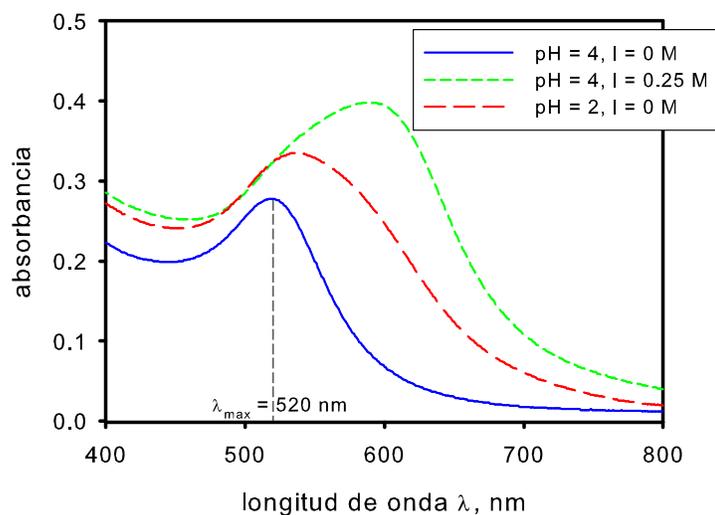


Figura 7.12: Espectro UV-vis de AuNPs bajo tres condiciones diferentes después de 2 minutos de la preparación de la muestra.

### Influencia del pH y de la fuerza iónica en la disolución de CS

CS es un polisacárido común con un comportamiento complejo que es soluble en medio ácido [177,178]. Preparamos una disolución de CS a  $\text{pH} = 4$  con la concentración de  $0.002 \text{ g/cm}^3$  que se convierte en una concentración de  $0.001 \text{ g/cm}^3$  en las condiciones de trabajo (al mezclar medio volumen de la suspensión de AuNPs nativas con medio volumen de la disolución de CS). Esta concentración, que ya se utilizó en un trabajo anterior [179], resulta estar en torno a la concentración de solapamiento crítica,  $c^*$ , para el caso de nuestra disolución de CS [180,181]. En cualquier caso, se puede estimar  $c^*$  a partir del producto  $c^* [\eta] \simeq 1$  [180], siendo  $\eta$  la viscosidad intrínseca del polímero. Tras tomar valores de  $[\eta]$  procedentes de la literatura [182] y correspondientes a cadenas de CS con características similares a las nuestras (grado de acetilación 20 % y peso molecular 260000 Da) y disueltas en las mismas condiciones ( $\text{pH} = 4.3$ ,  $I = 0.2 \text{ M}$ ), obtuvimos  $c^* \simeq 0.0008 \text{ g/cm}^3$ . Por lo tanto nuestras disoluciones (tanto en condiciones salinas como en ausencia de sal) no se pueden considerar diluidas: las cadenas de CS forman agregados de varios tamaños cuyas características dependerán tanto de las características intrínsecas del CS como de las condiciones ambientales [183–185].

La Figura 7.13 muestra las distribuciones de tamaño (en intensidad, volumen y número) de las estructuras de CS formadas en disoluciones de concentración  $0.001 \text{ g/cm}^3$  y  $\text{pH} =$

4, tanto en condiciones de ausencia de sal ( $I = 0$ ) como a fuerza iónica elevada ( $I = 0.25$  M). La distribución en intensidad para el caso de ausencia de sal abarca de 100 a 8000 nm aunque tamaños superiores a 5000 nm no deben tenerse en cuenta porque están en el límite de resolución de nuestro equipo de DLS y las curvas están afectadas por diferentes artefactos. Claramente, hay agregados de tamaño micrométrico como indica el enorme pico alrededor de 3000 nm. También, hay una población importante de agregados entre 200 y 500 nm. Sin embargo, para el caso de  $I = 0.25$  M no se detecta intensidad dispersada por partículas mayores de 1000 nm. En ese caso, la distribución de tamaño abarca diámetros hidrodinámicos más pequeños (desde 10 nm hasta 1000 nm) y presenta dos picos bien definidos, uno alrededor de 40 nm y otro alrededor de 300 nm. Curiosamente, se encontraron distribuciones bimodales parecidas para disoluciones acuosas de CS de bajo peso molecular en otros trabajos [185,186].

En conclusión, en presencia de sal todos los agregados de CS tienen tamaño submicrométrico; además, hay una importante población de agregados con un tamaño menor a 100 nm. Obviamente, las cadenas de CS, ya sean libres o agregados de éstas, tienen que estar menos extendidas en disolución salina debido al efecto de apantallamiento ejercido por los iones nitrato que hay en torno a las cadenas de CS cargadas positivamente. Por lo tanto, por un lado, es muy probable que las moléculas de CS tengan menos tendencia a formar agregados (estructuras enmarañadas) en presencia de sal y, por otro lado, los posibles agregados de CS que se formen estarán contraídos en comparación con los formados en ausencia de sal.

En cuanto a la distribución en volumen, nuestros resultados muestran que, en ausencia de sal, la mayoría de la masa de CS está formando agregados mayores de 1000 nm, mientras que en presencia de sal la mayoría del CS se encuentra formando estructuras (moléculas o agregados) de entre 20 nm y 40 nm. Esta distribución también detecta una importante porción de masa con un tamaño menor de 10 nm que debe de corresponder (si no es un artefacto) a moléculas degradadas de CS. Las distribuciones en número correspondientes a la ausencia de sal informan de la existencia de unas cuantas estructuras en el rango de 20 nm a 40 nm, estando la mayoría alrededor de 100 nm. En cambio, la situación cambia completamente cuando se añade sal al medio. Entonces, la mayoría de las estructuras están en un rango entre 10 nm y 30 nm con un pequeño pico para tamaños muy pequeños (entre 2 nm y 4 nm) que, como se sugería anteriormente, tienen que corresponder a pequeñas

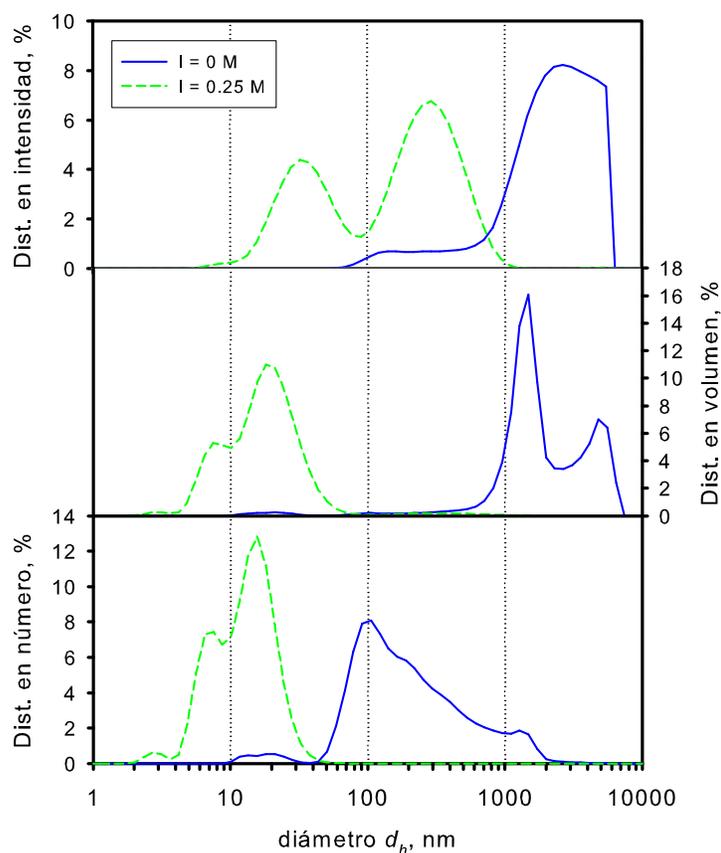


Figura 7.13: Distribuciones en tamaño para disoluciones de CS 0.001 g/cm<sup>3</sup> a pH = 4 y dos condiciones diferentes de fuerza iónica.

porciones de moléculas de CS. Con respecto a esto, existen evidencias de que las cadenas de CS pueden ser degradadas en condiciones ácidas [187,188].

Se puede estimar un rango para el diámetro hidrodinámico que deberían tener nuestras cadenas libres de CS en disolución usando la relación  $d_h = 2 \times (3[\eta]M/10\pi N_A)^{1/3}$ , donde  $M$  es el peso molecular y  $N_A$  es el número de Avogadro. Tal y como se hizo para calcular  $c^*$ , tomamos de la bibliografía [182] valores de  $[\eta]$  y  $M$  para cadenas de CS con las mismas características y disueltas en las mismas condiciones que nuestras cadenas y, de esta forma, obtuvimos valores de  $d_h$  entre 50 nm y 80 nm. Por tanto, para el caso de  $I = 0.25$  M, el pico alrededor de 40 nm podría corresponder perfectamente a cadenas libres de CS próximas a la conformación de ovillo al azar. Esa conformación es la razón de encontrar una gran población de cadenas libres, ya que no interaccionan fácilmente para formar

agregados. Sin embargo, el pico sobre 300 nm tiene que corresponder sin ninguna duda a agregados.

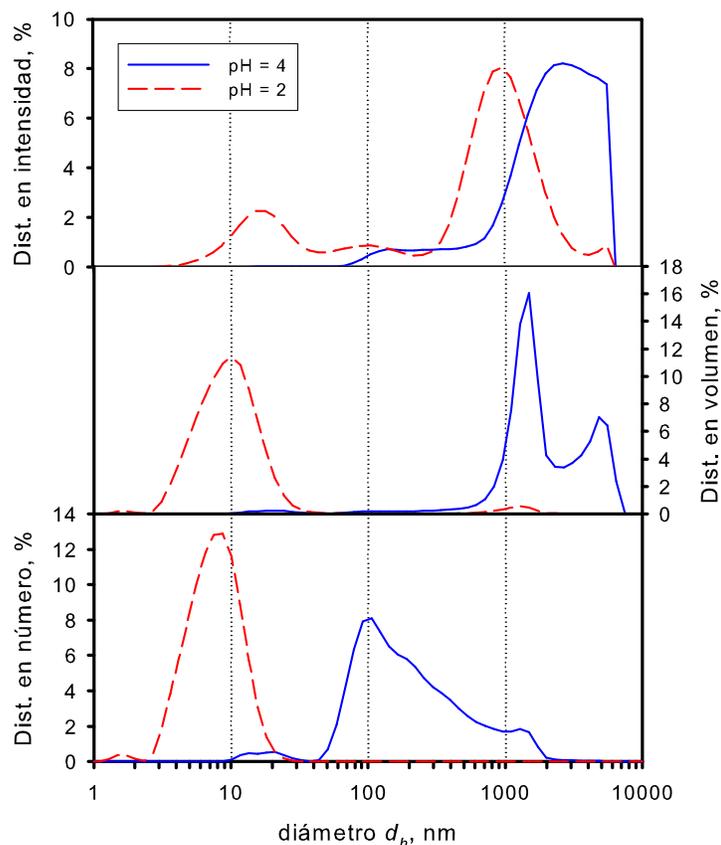


Figura 7.14: Distribución en tamaño para una disolución de CS 0.001 g/cm<sup>3</sup> en ausencia de sal y dos valores diferentes de pH.

La Figura 7.14 muestra distribuciones en tamaño para disoluciones de CS 0.001 g/cm<sup>3</sup> en condiciones de ausencia de sal para valores de pH = 4 y pH = 2. La distribución en intensidad muestra que una disminución en el pH provoca una disminución en el tamaño de los agregados de CS. Incluso se observa un pico significativo alrededor de 20 nm. Obviamente, a pH = 2 las cadenas de CS tienen que estar más protonadas que a pH = 4 lo cual incrementa su carga y, como consecuencia, disminuye su tendencia a formar agregados. Las distribuciones en volumen y en número muestran que la cantidad de masa en los agregados es muy pequeña: casi todo el CS está formando estructuras del tamaño de una sola molécula. Por otro lado, la existencia de especies de tamaño inferior a 10 nm

podría ser consecuencia de la degradación de las cadenas de CS mencionada anteriormente, la cual tiene que ser mucho más relevante a pH bajo.

### Influencia del pH y la fuerza iónica en la suspensión AuNPs + CS

A continuación, evaluamos el comportamiento de AuNPs en presencia de CS. Para ello mezclamos la suspensión nativa de AuNP con una disolución de CS  $0.002 \text{ g/cm}^3$  a  $\text{pH} = 4$ . La disolución de CS puede corresponder a ausencia de sal o a condiciones salinas con  $I = 0.25 \text{ M}$ .

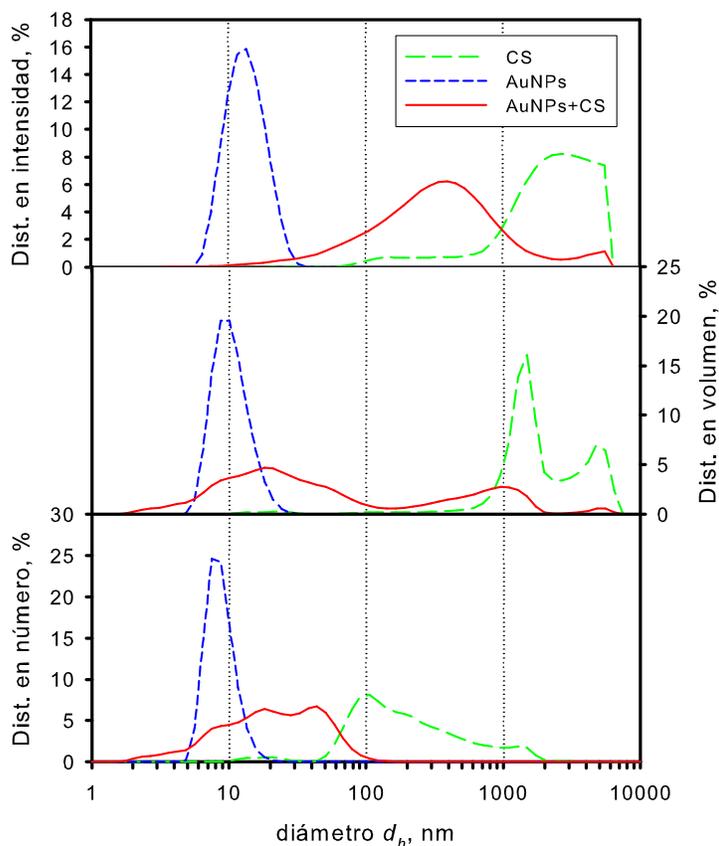


Figura 7.15: Comparación de distribuciones en tamaño para AuNPs, disolución de CS y *nanocomposite* (AuNPs + CS) en condiciones de ausencia de sal y  $\text{pH} = 4$ .

La Figura 7.15 muestra la interacción de AuNPs con CS a  $\text{pH} = 4$  bajo condiciones de ausencia de sal. Con ese propósito, se han representado conjuntamente las distribuciones de tamaño para los tres sistemas (suspensión de AuNPs, disolución de CS y *nanocomposite*

AuNP + CS ). La distribución en intensidad muestra claramente que la interacción entre AuNPs y CS provoca una disminución de tamaño de los agregados detectados: el pico alrededor de 3000 nm (línea discontinua) se desplaza en torno a 500 nm (línea continua). Los agregados con tamaño 500 nm se atribuyen a estructuras de CS que se hacen más pequeñas en presencia de AuNPs porque la carga negativa de la AuNPs apantallan las cargas de las cadenas de CS. A su vez, el pico característico de AuNPs sobre 13 nm (línea de trazo discontinuo corto) ha desaparecido. Además, todo indica que la mayoría de las AuNPs se adhieren a los agregados de CS que se convierten así en una red o malla que atrapa las nanopartículas. En las distribuciones en volumen y número, se observa que la mayoría de la masa está formando estructuras de pequeño tamaño de alrededor de 20 nm (como ya ocurría en la disolución salina de CS, Figura 7.14). Además, una parte significativa se encuentra formando agregados de tamaño micrométrico y una pequeña parte en estructuras por debajo de 10 nm. Como mencionábamos anteriormente, lo más probable es que éstas últimas correspondan a estructuras de CS que han sido degradadas por el medio ácido en lugar de AuNPs libres [187].

En la Figura 7.16, se representa la comparación entre la distribución en tamaño correspondiente al *nanocomposite* en presencia (línea discontinua de trazo corto) y en ausencia (línea continua) de sal. Como se mencionó anteriormente, primero preparamos una disolución de CS con una fuerza iónica de  $I = 0.25$  M y después se añadió la suspensión de nanopartículas. La distribución en intensidad revela que el efecto de la fuerza iónica es reducir el tamaño del *nanocomposite* que debe de formarse rápidamente entre las estructuras de CS y las AuNPs. Como se explicó previamente, los iones nitrato apantallan las cargas positivas de las cadenas de CS (mucho más eficientemente que las AuNPs), por lo que llegan a estar menos extendidas en promedio. Claramente, cuando se añaden las nanopartículas a la disolución de CS en condiciones de fuerza iónica elevada, aparecen dos opciones: las nanopartículas interaccionan unas con otras para dar lugar a agregados o las nanopartículas se adhieren a las estructuras de CS ya formadas. Nuestro resultado indica que la última opción es la preferida así que los agregados de CS son una red que atrapa muy eficientemente a las AuNPs. Si llegaran a formarse agregados de AuNPs, ésto ocurriría rápida y masivamente bajo una fuerza iónica tan elevada como  $I = 0.25$  M (ver Figura 7.11), y se observaría la sedimentación de partículas de tamaño superior al micrométrico en el fondo de la celda. No se observa ninguno de estos fenómenos. La distribución en volumen y número son más estrechas que en ausencia de sal e indican que la mayoría de la masa esta formando estructuras por debajo de 100 nm.

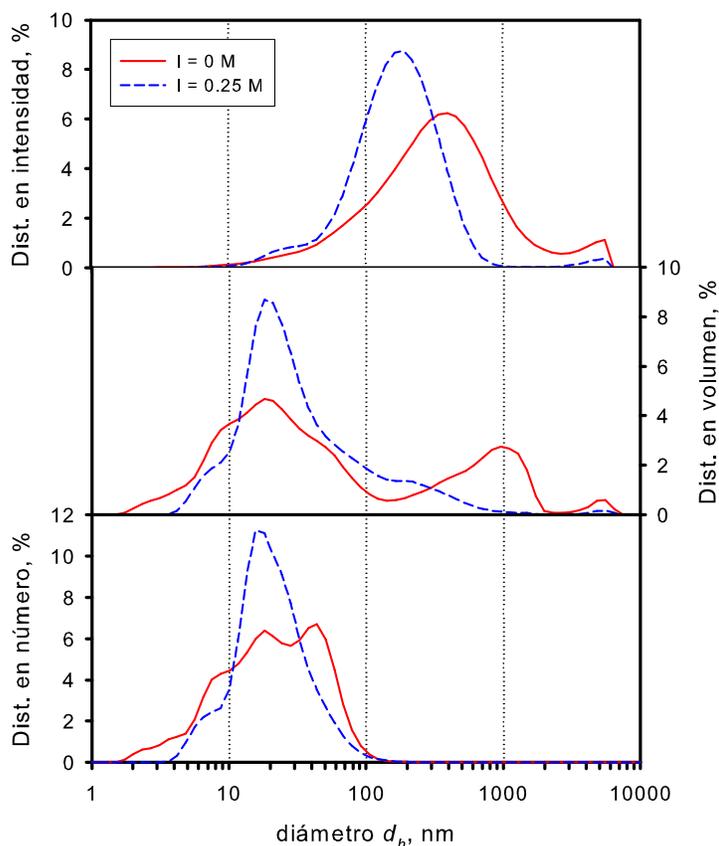


Figura 7.16: Distribución de tamaño para una disolución de *nanocomposite* (AuNPs + CS) a pH = 4 tanto en ausencia de sal ( $I = 0$ ) como en presencia de sal ( $I = 0.25$  M).

Finalmente, en la Figura 7.17 se muestra el efecto de reducir el pH en la disolución del *nanocomposite* libre de sal mediante la adición de HCl. La distribución en intensidad muestra que el efecto del cambio de pH es pequeño una vez que ya está formado el *nanocomposite*. Las distribuciones en volumen y en número indican que una disminución en el pH incrementa la cantidad de masa organizada en pequeñas estructuras (moléculas individuales o fracciones de moléculas individuales).

En suma, lo que parece claro es que cuando las AuNPs se añaden sobre una disolución de CS en condiciones favorables para su fuerte y rápida agregación, tal agregación no ocurre. La única explicación es que las AuNPs son rápidamente atrapadas por las estructuras de CS por lo que no pueden agregarse.

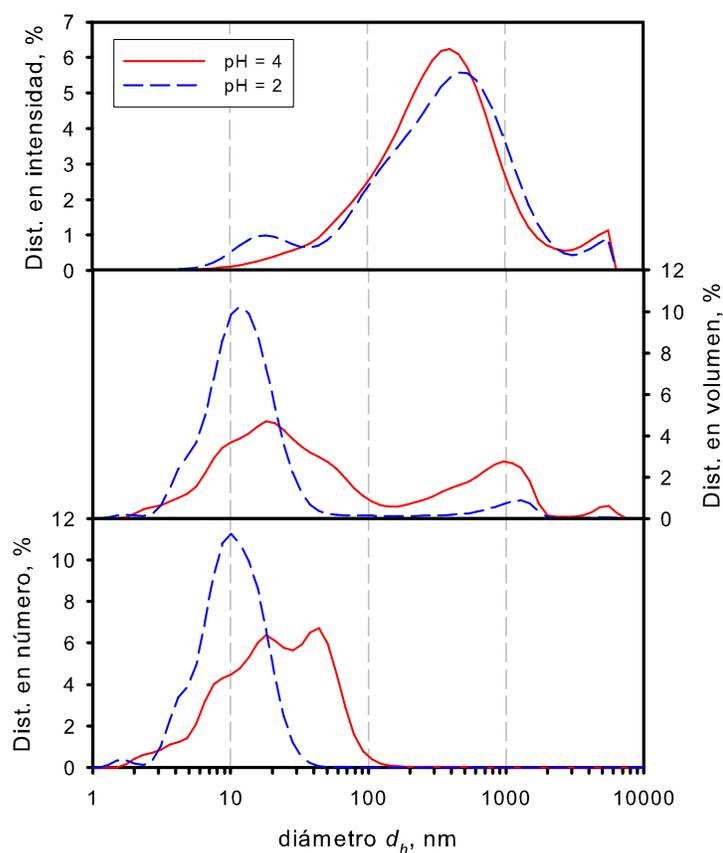


Figura 7.17: Distribución en tamaño para una disolución de *nanocomposite* (AuNPs + CS) en ausencia de sal a dos valores diferentes de pH.

Los resultados anteriores se confirman mediante mediciones de ultravioleta-visible llevadas a cabo en una región de longitud de onda en la que se puede sondear el tamaño de las AuNPs sin que interfiera la presencia de CS. La Figura 7.18 muestra los espectros UV-vis correspondientes a los diferentes sistemas evaluados que involucran AuNPs. Como ya se ha comentado, el aspecto más relevante de los espectros para dilucidar la presencia de agregados de AuNPs y sus tamaños es la posición del pico de plasmón. Como se observa en la Figura 7.18, el valor  $\lambda_{max} \approx 520$  nm aparece tanto en la curva correspondiente a la disolución de AuNPs a pH = 4 (línea azul continua), la cual corresponde a las partículas de diámetro 13 nm, y en las curvas correspondientes a los *nanocomposites* formados tras mezclar la AuNPs iniciales y la disolución de CS bajo diferentes condiciones de pH y fuerza iónica (líneas rojas). Más aún, las dos curvas correspondientes al *nanocomposite* a pH =

4 se superponen casi perfectamente, independientemente de la fuerza iónica. Todas estas evidencias demuestran que ni un valor bajo de pH ni una fuerza iónica elevada provocan agregación de AuNPs – como sí que ocurre en ausencia de CS (líneas azules discontinuas) – porque la formación del *nanocomposite* es muy rápida y estable.

Sin embargo, una inspección más cercana del pico de plasmón de los *nanocomposites* revela que su posición,  $\lambda_{max}$ , está ligeramente desplazada hacia valores más altos ( $\lambda_{max} \approx 524$  nm) que el correspondiente a la suspensión inicial de AuNPs (ver línea de puntos de la Figura 7.18).

Nuestra suposición de que la mayoría de las AuNPs están atrapadas en los agregados de CS explica las características de cada espectro y distribución de tamaño de los *nanocomposites*. Primeramente, la posición del pico de plasmón indica claramente que los tamaños de la mayoría de las AuNPs en el *nanocomposite* están cercanos a 13 nm (es decir, no hay grandes agregados de AuNPs); sin embargo, no se detectan AuNPs con ese tamaño por DLS. La razón es que éstas no pueden moverse libremente porque están atrapadas en el interior de los agregados de CS (la técnica de DLS se basa en el movimiento browniano de las partículas de soluto). En segundo lugar, el ligero desplazamiento hacia el rojo del pico de plasmón de los *nanocomposites* con respecto al valor de la suspensión de AuNPs inicial se explica si las AuNPs están muy cerca en promedio [189] pero evitando el contacto necesario para formar los grandes agregados esperados cuando  $I = 0.25$  M o pH = 2, lo que provocaría un gran desplazamiento hacia el rojo. Eso podría ocurrir si muchas AuNPs individuales (o pequeñas agrupaciones de AuNPs) quedan atrapadas dentro de las estructuras de CS. Finalmente, la buena superposición de las curvas de absorbancia tanto para  $I = 0$  como para  $I = 0.25$  M (al mismo pH) confirma aún más la rápida y fuerte inmovilización de muchas AuNPs individuales (o pequeñas agrupaciones de éstas) en las redes de CS, independientemente de las condiciones ambientales.

Las conclusiones anteriores son apoyadas por imágenes de TEM, las cuales arrojan más luz sobre la estructura de los *nanocomposites* (AuNPs + CS). La Figura 7.19 es una imagen de TEM correspondiente a una disolución libre de sal a pH = 4. En ella se pueden apreciar asociaciones de AuNPs en diferentes regiones de la disolución que preservan la individualidad de las nanopartículas. El tamaño de las regiones con asociaciones de AuNPs depende del tamaño de los agregados de CS subyacentes. Esa imagen es consistente con la presencia del pico de plasmón a  $\lambda_{max} \approx 524$  nm ya que las AuNPs parecen formar asociaciones de partículas individuales la cuales están lo suficientemente cerca como para provocar el desplazamiento hacia el rojo del pico de plasmón.

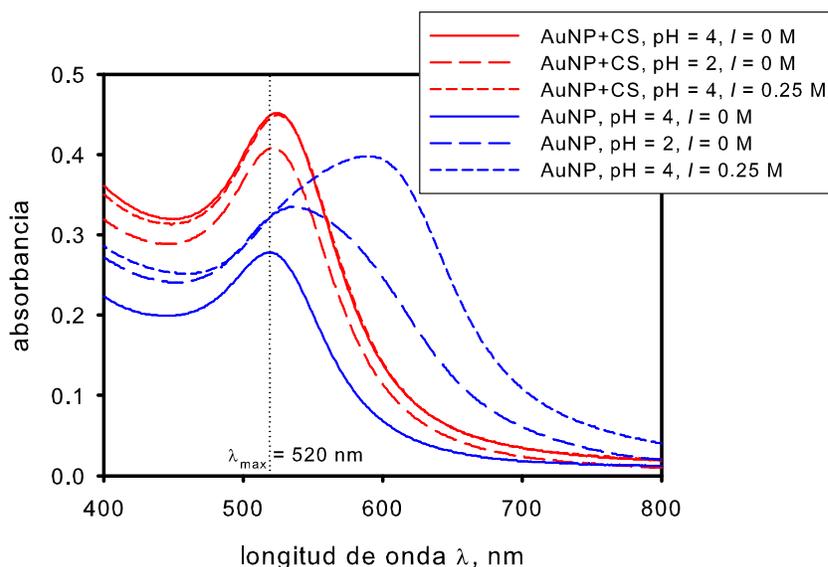


Figura 7.18: Espectro UV-vis para controlar la presencia de agregados de AuNPs bajo diferentes condiciones. Las líneas verticales señalan el pico de plasmón de la suspensión de AuNPs inicial.

De hecho, si comparamos con imágenes de TEM de AuNPs comerciales sin agregación (ver Figura 7.6a), encontramos que son similares porque no hay grandes estructuras formadas por AuNPs en contacto entre sí, aunque en la suspensión de solo nanopartículas, la distribución de nanopartículas aparece más homogénea sin áreas de alta densidad de AuNPs (como las que se observan en la Figura 7.19) y, como consecuencia, una mayor distancia promedio entre ellas. La Figura 7.20 muestra una imagen de TEM de la suspensión de AuNPs a pH = 4 y fuerza iónica  $I = 0.25 \text{ M}$ . En esa figura, se observa claramente un gran agregado de AuNPs. La estructura de tamaño micrométrico consiste en un gran número de AuNPs tangentes, lo que explica claramente el incremento muy significativo en el valor de la longitud de onda a la que aparece el pico de plasmón.

Cuando la fuerza iónica del sistema es  $I = 0.25 \text{ M}$ , obtenemos imágenes de TEM como las de la Figura 7.21 donde se pueden apreciar estructuras de CS a las que se han adherido AuNPs. La diferencia con la Figura 7.20 en cuanto a la organización de las AuNPs es muy clara, organización que es debida a cómo interactúan las AuNPs con el CS. De igual manera, son muy claras las similitudes con la Figura 7.19 que muestra el efecto casi despreciable de la adición de sal cuando el *nanocomposite* ya se ha formado. Las imágenes de TEM apoyan los resultados mostrados en las Figuras 7.11, 7.12 y 7.18.

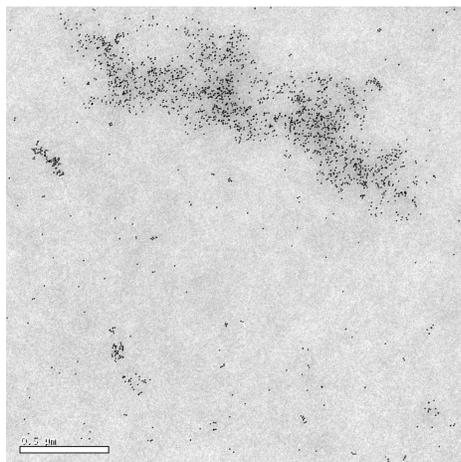


Figura 7.19: Imagen TEM del *nanocomposite* (AuNPs + CS) en ausencia de sal y pH = 4. La barra blanca en la esquina inferior izquierda representa 5  $\mu\text{m}$ .

Finalmente, las imágenes TEM sugieren que la mayoría de las AuNPs atrapadas están pegadas sobre la superficie de los agregados de CS. De lo contrario, si las AuNPs pudieran penetrar fácilmente dentro de las redes de CS, la mayoría de las imágenes mostrarían regiones con una alta densidad de AuNPs y no se podría apreciar la individualidad de las AuNPs.

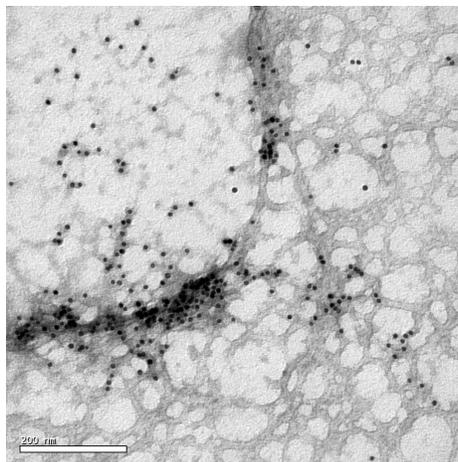


Figura 7.20: Imagen TEM de AuNPs a  $I=0.25$  M y  $\text{pH} = 4$ . La barra de la esquina inferior izquierda representa  $0.2 \mu\text{m}$ .

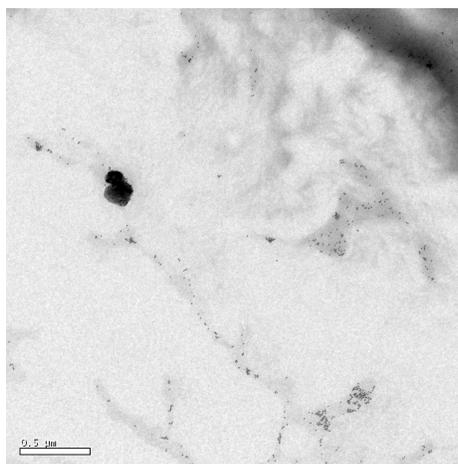


Figura 7.21: Imagen TEM de una disolución de *nanocomposite* (AuNPs + CS) a  $I = 0.25$  M y  $\text{pH} = 4$ . La barra de la esquina inferior izquierda representa  $0.5 \mu\text{m}$ .

### 7.2.3.c. Conclusiones

El quitosano (CS) es un polisacárido cargado positivamente que después de disolverse en medio ácido forma agregados. Cuando una suspensión de AuNPs es añadida a una disolución de CS (de hecho una suspensión de agregados de CS), las nanopartículas metálicas se aproximan a los agregados de CS debido a la atracción electrostática y se adhieren principalmente a su superficie donde se mantienen inmovilizadas. Aunque los *nanocomposites* formados por el quitosano y las nanopartículas tienen una forma y tamaño variables que dependen de parámetros como el pH y la fuerza iónica, estructuras de más de 1000 nm aparecen muy escasamente.

Aunque las nanopartículas de oro individuales pueden agregar cuando la concentración de sal aumenta o el pH disminuye, este proceso no ocurre en presencia de CS. La razón es que la velocidad a la que las AuNPs se pegan a los agregados de CS es muy rápida y una vez que las AuNPs son atrapadas, no pueden agregar.

Las AuNPs se distribuyen principalmente sobre la superficie de las estructuras de CS de tal manera que están bastante cerca pero sin que se produzca el contacto necesario para formar grandes agregados de AuNPs, lo que explica el ligero desplazamiento del pico de plasmón desde  $\lambda_{max} \simeq 520$  nm (característico de las AuNPs individuales de 13 nm de tamaño) a  $\lambda_{max} \simeq 524$  nm. En conclusión, el CS impide la agregación de las AuNPs.

### 7.2.4. Agregación de AuNPs en presencia de PNIPAAm-co-PAMPTMA

Como complemento a la caracterización de suspensiones de nanopartículas de oro en presencia de polímero, vamos a mostrar algunos resultados preliminares obtenidos cuando a la suspensión de AuNPs se le añade PNIPAAm-co-PAMPTMA(+), copolímero descrito y estudiado en el Capítulo 6.

#### 7.2.4.a. Metodología

La suspensión original de AuNPs procede de la casa Sigma-Aldrich (Ref. 741957-25ML, Lote MKBN5746V, concentración  $\simeq 6 \times 10^{12}$  partículas/cm<sup>3</sup>). El diámetro hidrodinámico nominal de las nanopartículas era 10 nm, pero debido a que este trabajo se realizó más de un año después de su compra, el diámetro real de las nanopartículas en suspensión resultó ser 20 nm, medido mediante DLS en nuestro instrumento Zetasizer Nano ZS de

Malvern Instruments Ltd. Con el fin de intentar recubrir dichas AuNPs con el copolímero PNIPAAm-co-PAMPTMA(+) se mezcló un volumen de suspensión original de AuNPs con dos volúmenes diferentes de disoluciones de PNIPAAm-co-PAMPTMA(+) de concentración 0.1 % en peso, de tal manera que tuviéramos dos concentraciones diferentes de dicho copolímero en las disoluciones resultantes. Dichas disoluciones se midieron mediante las técnicas de DLS, con el fin de dilucidar si se produce la unión de nanopartícula y polímero y conocer su tamaño, y UV-vis con el fin de comprobar si se produce desplazamiento del pico de plasmón como consecuencia de la agregación de las nanopartículas. Se utilizaron los dos tipos de copolímero PNIPAAm-co-PAMPTMA(+) descritos en el Capítulo 6, P-48/6 y P-46/20, para estudiar si la diferente relación entre las longitudes de los segmentos de PNIPAAm y PAMPTMA(+) afectaba a la interacción del copolímero con las nanopartículas. En este estudio no se obtuvieron imágenes con la técnica TEM.

Como ya se ha indicado, los copolímeros P-48/6 y P-46/20 fueron disueltos inicialmente en agua con el fin de obtener disoluciones de concentración 0.1 % en peso, cuyas características aparecen en la segunda sección del Capítulo 6. Estas disoluciones se mezclaron con suspensiones de oro en diferentes proporciones para preparar las disoluciones de trabajo que se relacionan a continuación :

- A) 1 ml de AuNP de 20 nm + 1 ml de P-48/6 0.1 % en peso
- B) 0.5 ml de AuNP de 20 nm + 1.5 ml de P-48/6 0.1 % en peso
- C) 1 ml de AuNP de 20 nm + 1 ml de P-46/20 0.1 % en peso
- D) 0.5 ml de AuNP de 20 nm + 1.5 ml de P-46/20 0.1 % en peso

De tal manera que en las disoluciones A y C, la concentración de copolímero era 0.05 % en peso y en las disoluciones B y D, la concentración de copolímero era 0.075 % en peso.

### 7.2.4.b. Resultados

#### **Casos A y B: disoluciones de AuNP + copolímero P-48/6**

Los resultados obtenidos mediante DLS y UV-vis de la disolución A ( $c(\text{P-48/6}) = 0.05\%$  en peso), se muestran en las Figuras 7.22 y 7.23. En la Figura 7.22 se representan las distribuciones de tamaño (en intensidad) obtenidas de las disoluciones de AuNPs y

copolímero por separado, así como las distribuciones obtenidas tras la mezcla de ambas a distintos tiempos tras la mezcla. Los dos picos de la distribución del copolímero se corresponden con cadenas más o menos individuales (pico en torno a 5 nm) y a agregados (pico en torno a 100 nm) que ya hemos visto que se forman con facilidad en este tipo de copolímero (Capítulo 6). Se observa claramente que tras la mezcla se forman estructuras de tamaño superior a las AuNPs individuales y a las estructuras que aparecen en la disolución del copolímero individual. Además, el tamaño de dichas estructuras aumenta con el tiempo, alcanzado un tamaño estable a partir de 5 h. Las medidas de absorbancia UV-vis (Figura 7.23) muestran un desplazamiento del pico de plasmón a longitudes de onda mayores tras la mezcla. Puesto que el pico es debido solo a las AuNPs, el desplazamiento indica la agregación de éstas. Por tanto, las estructuras de gran tamaño observadas mediante DLS se corresponderían, además de con agregados de copolímero (con posibles nanopartículas atrapadas), con verdaderos agregados de nanopartículas. De hecho, en este tipo de mezcla se observa la formación de un precipitado rojizo en el fondo de la cubeta que debe corresponder a los agregados más grandes de AuNPs formados. De todo ello deducimos que la cantidad de copolímero utilizada no es suficiente para recubrir o atrapar todas las nanopartículas de la suspensión original, con lo que las nanopartículas en exceso comienzan a agregar al encontrarse en un ambiente en donde se ha aumentado la fuerza iónica (recordemos que el copolímero es una sal que está dissociada en disolución: PNIPAAm-co-PAMPTMA(+) + Cl(-)).

Debido a que observamos la formación de precipitado a una concentración de copolímero de 0.05 % en peso, consideramos oportuno aumentar la concentración de éste en la mezcla con el fin de tratar de evitar que las AuNPs estuvieran en exceso. Para ello, preparamos la disolución B ( $c(\text{P-48/6}) = 0.075\%$  en peso) y procedimos a repetir las medidas. Los resultados aparecen en las Figuras 7.24 y 7.25.

Con esta nueva concentración de copolímero no observamos formación de precipitado en el fondo de la cubeta. Por otro lado, la distribución de tamaños (Figura 7.24) muestra que tras la mezcla aparecen, desde el mismo instante inicial, estructuras de tamaño parecido a los agregados de copolímero que no aumentan de tamaño, lo que parece indicar que se mantienen los agregados de la disolución inicial de copolímero, quizás algo encogidos por la acción apantalladora de nanopartículas que, como veremos seguidamente, deben quedar atrapadas en dichos agregados (como también pasaba con el quitosano). La ausencia de desplazamiento del pico de plasmón en UV-vis (Figura 7.25) es claramente indicativa de que las AuNPs mantienen su tamaño tras la mezcla. Por tanto, podemos

concluir que todas las AuNPs quedan atrapadas (inmovilizadas) en la malla formada por los agregados de copolímero preservando su individualidad, por lo que no pueden sufrir agregación, una situación similar a la que hemos descrito anteriormente para las mezclas de AuNPs y quitosano. Podemos asegurar que la cantidad de copolímero presente en la mezcla cuya concentración es 0.075 % en peso de copolímero está en exceso respecto a las nanopartículas.

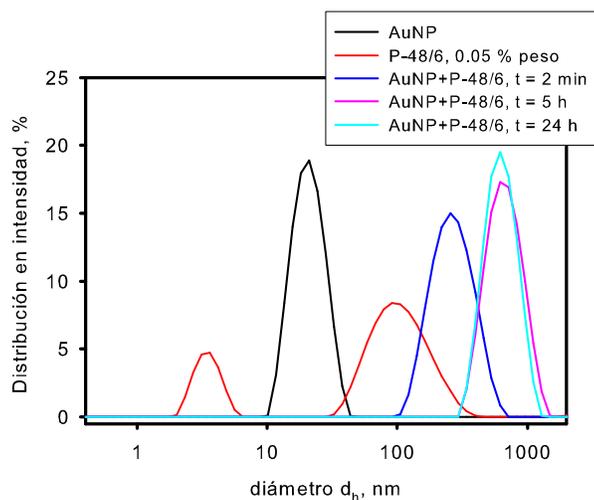


Figura 7.22: Distribución de tamaño de la disolución A ( $c(\text{P-48/6}) = 0.05\%$  en peso).

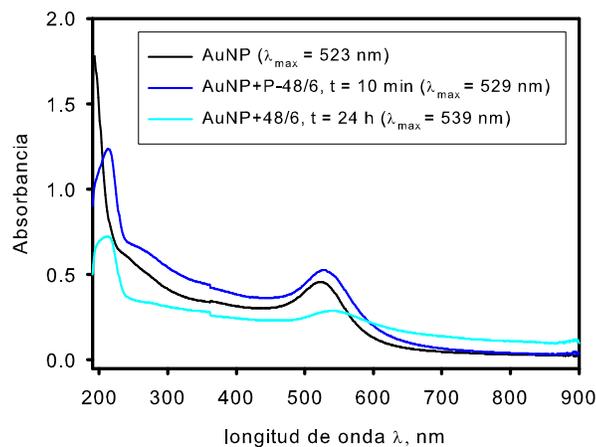


Figura 7.23: Espectro UV-vis de la disolución A ( $c(\text{P-48/6}) = 0.05\%$  en peso).

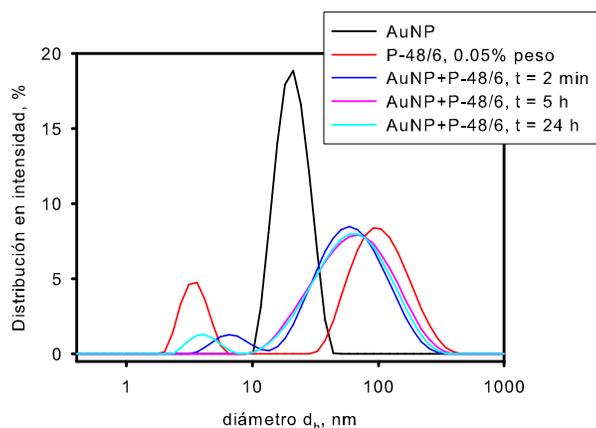


Figura 7.24: Distribución de tamaño de la disolución B ( $c(\text{P-48/6}) = 0.075\%$  en peso).

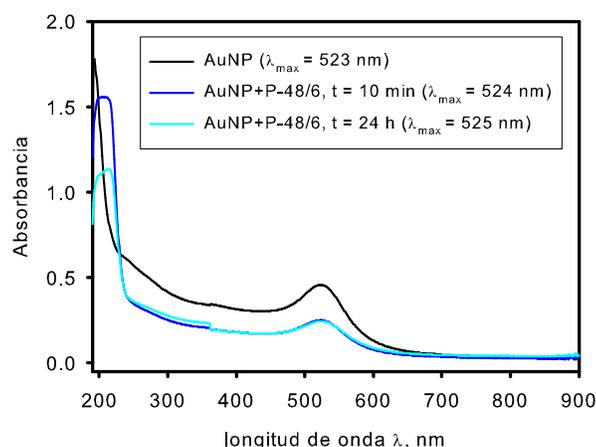


Figura 7.25: Espectro UV-vis de la disolución B ( $c(\text{P-48/6}) = 0.075\%$  en peso).

### Casos C y D: disoluciones de AuNP + copolímero P-46/20

Los resultados obtenidos para el copolímero P-46/20 son muy parecidos a los anteriores, por lo que la longitud del segmento hidrofílico no tiene gran influencia en el comportamiento de la mezcla y toda la argumentación anterior puede aplicarse a las mezclas con este copolímero. De nuevo, primero se procedió a trabajar con una mezcla en la que la concentración de copolímero era  $0.05\%$  en peso. La distribución en tamaño (Figura 7.26) muestra un comportamiento parecido al caso anterior: un pico para las AuNPs individuales (en torno a 20 nm), dos picos para la disolución de copolímero individual (en torno a 2 nm y 100 nm correspondientes al copolímero individual y a agregados), y un

pico (en torno a 100 nm) para las mezclas, cuya posición evoluciona con el tiempo hasta alcanzar un valor estable a partir de 5 h y que debe corresponder, además de a agregados de copolímero con AuNPs atrapadas, a auténticos agregados de AuNPs. Como el pico de plasmón (Figura 7.27) se desplaza ligeramente a longitudes de onda mayores tras la mezcla, se puede concluir que se produce cierta agregación de las nanopartículas y que la cantidad de copolímero en la mezcla de concentración 0.05 % en peso no está en exceso respecto a la cantidad de nanopartículas. De hecho, en este tipo de mezclas, también se observa un precipitado rojizo en el fondo de la cubeta correspondiente a la formación de grandes agregados de AuNPs.

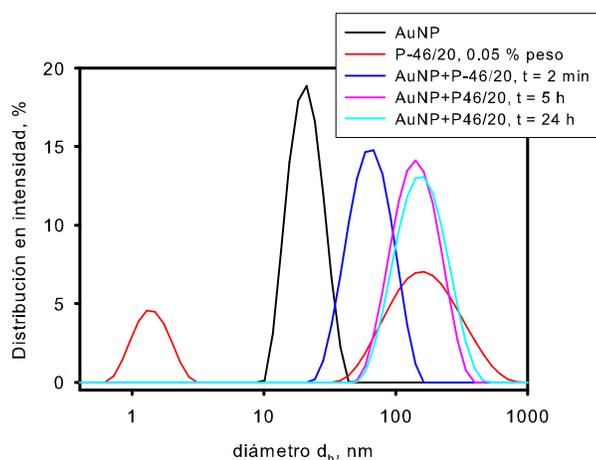


Figura 7.26: Distribución de tamaño de la disolución C ( $c(\text{P-46/20}) = 0.05\%$  en peso).

Como en el caso del copolímero P-48/6, se procedió a trabajar con una mezcla en la que la concentración de copolímero resultara mayor, en concreto 0.075 % en peso (disolución D). Ahora, la distribución de tamaño obtenida tras la mezcla (Figura 7.28) presenta, como en el caso anterior, un pico que se mantiene estable en el tiempo y que aparece a un tamaño ligeramente menor que el correspondiente a los agregados de copolímero individual. De nuevo, la explicación debe estar en que los agregados presentes en la disolución inicial de copolímero, que ahora está en exceso, atrapan las AuNPs y, como consecuencia del apantallamiento electrostático producido por éstas, se encogen. Por otro lado, el pico de plasmón (Figura 7.29) no sufre ningún desplazamiento, lo que es indicativo de que las AuNPs mantienen su individualidad. Esto solo puede significar que las AuNPs quedan atrapadas rápidamente en los agregados de copolímero y que, dentro de esos agregados se

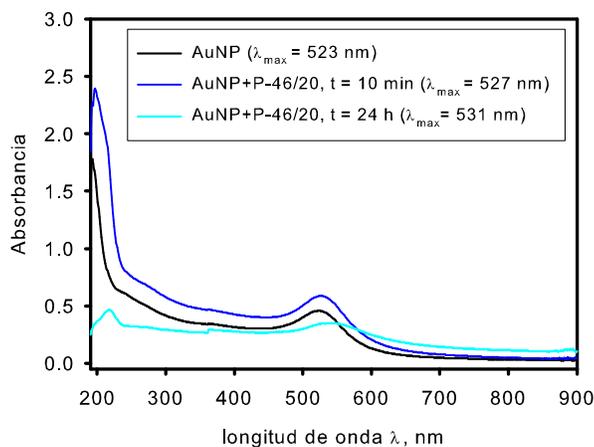


Figura 7.27: Espectro UV-vis de la disolución C ( $c(\text{P-46/20}) = 0.05\%$  en peso).

encuentran los suficientemente separadas como para que no se produzca desplazamiento en el pico de plasmón.

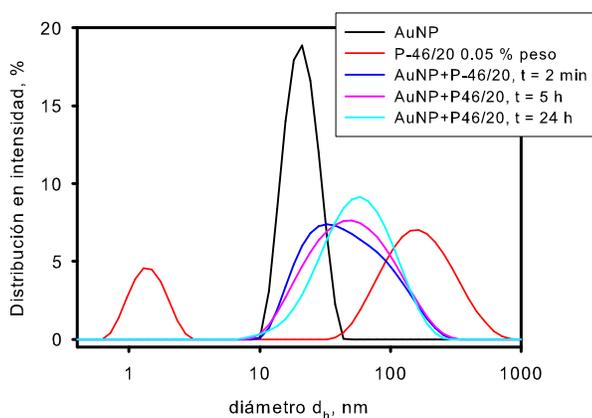


Figura 7.28: Distribución de tamaño de la disolución D ( $c(\text{P-46/20}) = 0.075\%$  en peso).

#### 7.2.4.c. Conclusiones

La carga positiva del copolímero PNIPAAm-co-PAMPTMA(+) le permite interactuar fácilmente con nanopartículas de oro recubiertas de citrato. Al igual que en el caso del quitosano, este copolímero parece formar agregados que atrapan las nanopartículas de oro impidiendo que éstas agreguen.

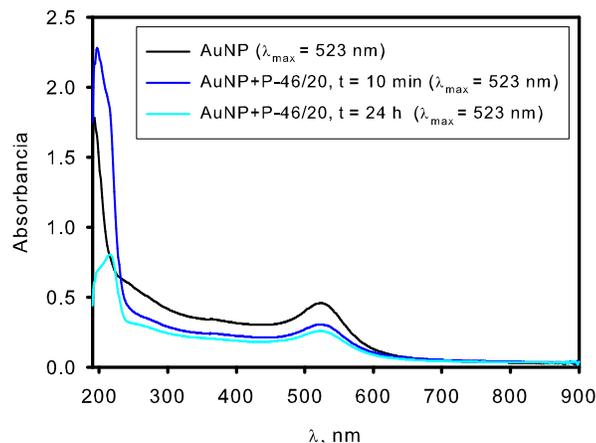


Figura 7.29: Espectro UV-vis de la disolución D ( $c(\text{P-46/20}) = 0.075\%$  en peso).

## 7.3. Análisis computacional de nanopartículas híbridas Au-ADN

### 7.3.1. Introducción

En esta última sección del capítulo dedicado a nanopartículas se recoge el análisis computacional realizado por nuestro Grupo para determinar la forma de partículas híbridas constituidas por nanopartículas de oro y ADN. Este estudio forma parte de un trabajo realizado en colaboración con el Grupo de Investigación del profesor Helmut Cölfen de la Universidad de Constanza (Alemania) y que ha sido publicado recientemente [190].

Muchas aplicaciones de las nanopartículas, tales como el transporte de fármacos, requieren la unión de éstas entre sí para formar una estructura determinada. Los ensamblajes de nanopartículas tienen interesantes propiedades, pero la caracterización y purificación de tales ensamblajes es complicado y, en muchos casos, es un factor limitante para el desarrollo de estructuras complejas. Para realizar el ensamblaje de nanoestructuras de manera controlada, el ADN es un material muy adecuado ya que permite la generación de estructuras con el tamaño y forma deseado [191]. Por ejemplo, las estructuras de ADN pueden ser auto-ensambladas en formas complejas que pueden servir como plantillas para la alineación de nanopartículas [192,193]. Las estructuras pueden ser tan simples como dímeros y trímeros cuyos conectores son cadenas de ADN [194], o tan complejas como hélices [195] y agrupaciones bidimensionales de nanopartículas [196]. El ADN es un bloque de cons-

trucción especialmente adecuado en los ensamblajes a nanoescala debido a su tamaño, variabilidad conformacional y capacidad de autoensamblaje a través del emparejamiento de bases [197].

Sin embargo, estos procedimientos generan mezclas de productos que tienen que ser analizados y purificados para obtener muestras homogéneas. La asignación de especies individuales en tales mezclas de productos ha resultado ser hasta ahora muy complicada. La ultracentrifugación analítica permite la separación y análisis de las distintas especies formadas en una disolución en un solo experimento. Por tanto, puede utilizarse para el desarrollo de procedimientos de purificación. La sedimentación y la difusión de las distintas especies durante la centrifugación dependen fuertemente del tamaño y forma geométrica de las mismas, lo que permite extraer información de dichas especies. Así, las partículas anisótropas presentan menores coeficientes de sedimentación y fricción que sus análogas esféricas. Ambos coeficientes están relacionados a través del cociente de coeficientes de fricción  $f/f_0$ , es decir, el coeficiente de fricción real de la partícula dividido por el coeficiente de fricción de la esfera que tiene el mismo volumen y densidad que la partícula. Si la partícula es esférica, dicho cociente es la unidad, mientras que éste se aleja de la unidad cuanto más anisótropa sea la partícula. El cociente  $f/f_0$  proporciona, por tanto, información importante sobre el sistema en estudio. Los desarrollos recientes en el campo de la ultracentrifugación analítica, principalmente en lo que se refiere al análisis de datos, permiten el cálculo simultáneo de los coeficientes de sedimentación y difusión, así como del cociente  $f/f_0$ , de todas las especies presentes en la mezcla.

La dilucidación de las características estructurales a partir de la información hidrodinámica extraída de la ultracentrifugación analítica se puede hacer mediante cálculos computacionales basados en modelos de bolas en el que las propiedades en disolución se calculan para modelos compuestos por elementos esféricos. Esta técnica, que tiene sus raíces en las teorías clásicas de los modelos de polímeros flexibles, es ampliamente utilizada en biofísica y se está convirtiendo en una herramienta útil para interpretar la estructura y dinámica de nanopartículas complejas. Nuestro Grupo de Investigación es un referente en el desarrollo de algoritmos computacionales para la predicción de propiedades hidrodinámicas de macromoléculas y nanopartículas. El objetivo del presente trabajo es utilizar algunos de esos algoritmos para calcular coeficientes de sedimentación y difusión, así como cocientes de coeficientes de fricción, de estructuras constituidas por AuNPs conectadas mediante cadenas de ADN y compararlos con los resultados obtenidos mediante ultracentrifugación analítica en el Grupo del profesor Cölfen.

## 7.3.2. Metodología

### 7.3.2.a. Programas para la predicción de propiedades de modelos de bolas

Las macromoléculas y nanopartículas se pueden representar de forma más o menos detallada utilizando modelos de bolas, a partir de los cuales se predicen sus propiedades hidrodinámicas y así, mediante la comparación con los resultados experimentales, se puede dilucidar su estructura. Nuestro Grupo de Investigación viene desarrollando una serie de programas que emplean la metodología del modelo de bolas para hacer sencillo y rápido el cálculo de esas propiedades. Estos programas están a disposición pública en la página web <http://leonardo.inf.um.es/macromol>.

La estrategia del modelo de bolas y los protocolos computacionales han sido ampliamente descritos en la literatura [198]. En concreto, para el cálculo de propiedades de partículas rígidas de topología arbitraria en disolución se ha desarrollado el conjunto de programas HYDRO [199]. En una de las estrategias, las partículas pueden ser modeladas mediante bolas tangentes (o casi tangentes) que reproducen el tamaño y forma de la partícula. El programa HYDRO++ [199, 200] está destinado a ese fin y permite el cálculo de un gran número de propiedades hidrodinámicas así como aquellas derivadas de medidas de dispersión estática de luz. Otros programas de la serie HYDRO permiten utilizar diferentes tipos de estrategia de modelado. Así, el programa HYDROPRO [82, 84] permite construir un modelo de bolas a partir de las coordenadas atómicas obtenidas mediante técnicas como la cristalografía de rayos X o la espectroscopia de RMN. Con la información de la estructura atómica de la macromolécula, el programa HYDROPRO construye un modelo de concha (variante del modelo de bolas que modela solo la superficie de la partícula con pequeñas esferas) a partir del cual se calculan las propiedades. Otro programa de interés es HYDROSUB [201, 202] que permite modelar estructuras complicadas, por ejemplo aquellas que contienen subunidades no esféricas, utilizando composiciones de modelos geométricos sencillos como elipsoides (que incluye el caso de la esfera) y cilindros. El programa crea un modelo de concha de la estructura formada por estas subunidades y calcula las propiedades en disolución.

Existe la posibilidad de representar una estructura no rígida o flexible mediante un modelo de esferas, al que se añaden conectores, de flexibilidad variable, y una diversidad de interacciones intramoleculares, representadas por los correspondientes potenciales o fuerzas. Para el cálculo de propiedades de partículas flexibles se considera válido el enfoque de cuerpo rígido. En este procedimiento, se genera, mediante un algoritmo adecuado,

un número estadísticamente significativo de conformaciones de la estructura de acuerdo a ciertos criterios en cuanto al tipo y grado de flexibilidad. A continuación, las propiedades se calculan promediando los valores obtenidos para cada conformación como si ésta fuera instantáneamente rígida. El programa MULTHYDRO [203], está destinado a tales escaneos conformacionales, generando los archivos estructurales necesarios para ser procesados por HYDRO++ que a su vez produce un archivo de salida con el conjunto de propiedades de cada conformación que puede ser a su vez procesado mediante cualquier hoja de cálculo. Otros programas destinados a la predicción de propiedades de estructuras flexibles son MONTEHYDRO [203], que implementa una simulación de Monte Carlo (generación de conformaciones al azar) y SIMUFLEX [204] que implementa una simulación dinámica browniana (resolución de la ecuación diferencial estocástica que rige el movimiento de las partículas de soluto). En cualquier caso, las propiedades conformacionales, y algunas propiedades hidrodinámicas globales, se calculan como promedios conformacionales sobre los valores calculados para cada conformación como si fuese rígida (empleando para ello alguno de los programas de la serie HYDRO).

### 7.3.2.b. Modelo de nanopartícula híbrida Au-ADN

La nanopartícula de oro, que incluye tanto el núcleo de Au como su recubrimiento con moléculas estabilizadoras (como citrato o trifenilfosfina) se puede modelar mediante una única esfera de radio  $r_{Au}$ . Mediante medidas de TEM se ha determinado que un valor adecuado para este radio es  $r_{Au} = 3.2$  nm.

Los fragmentos cortos de ADN de doble cadena (dsADN) que forman los conectores en las nanopartículas híbridas Au-ADN, son hidrodinámicamente equivalente a varillas cilíndricas rígidas de longitud  $L = 0.34n_{bp}$  nm [205], donde  $n_{bp}$  es el número de pares de bases y 0.34 nm es el aumento de longitud por par de bases en la forma B del dsADN. Para que una macromolécula pueda ser considerada rígida, su longitud de contorno debe ser menor que la longitud de persistencia, que en el caso del B-ADN está en torno a 55 nm. Las cadenas de ADN utilizadas en este trabajo tienen 68 pares de bases, es decir una  $L = 23$  nm, por lo que se cumple dicha condición. Por otro lado, el diámetro hidrodinámico asignado al cilindro que representa el fragmento de ADN es  $d = 2.3$  nm (igual al diámetro hidrodinámico del dsADN) [57]. Así, las nanopartículas híbridas Au-ADN pueden ser representadas por un modelo de bolas y varillas, cuyas propiedades pueden ser evaluadas con el modelo de concha implementado en HYDROSUB. Este procedimiento supone

un importante coste computacional debido al elevado número de “minibolas” requeridas para modelar la superficie de la estructura (aproximadamente 2000). Una aproximación más eficiente consiste en reemplazar la varilla cilíndrica por una cadena lineal de bolas tangentes que tenga la misma longitud y volumen que el cilindro del modelo anterior (en nuestro caso las bolas son casi tangentes para ajustar la longitud). Esta condición se satisface si se utiliza para las bolas un diámetro (distancia entre centros de dos bolas consecutivas)  $b = 1.22d$  nm, lo que, en nuestro caso supone  $b = 2.8$  nm. El número de bolas en la cadena sería el número entero más cercano a  $L/b$ , que en nuestro caso equivale a ocho bolas en la varilla. Este modelo de bolas puede ser evaluado entonces por HYDRO++ para obtener sus propiedades hidrodinámicas. Para comprobar que ambos procedimientos dan idénticos resultados, hemos probado el modelo de concha y el modelo de bolas para: i) una sola esfera, ii) una esfera con una varilla unida (“*lollipop*”), y iii) dos esferas unidas por una varilla (“*dumbbell*”; Figura 7.30). Las diferencias en las propiedades obtenidas fue siempre inferior al 2%.

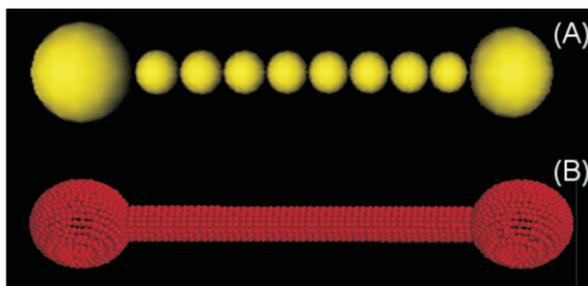


Figura 7.30: Modelo de concha (A) y modelo de bolas (B) de un *dumbbell* Au-ADN-Au. Los radios hidrodinámicos calculados,  $a_T$ , son 7.14 nm y 7.08 nm, respectivamente.

Para partículas con dos o más varillas de ADN unidas a la misma bola de Au, se pueden presentar una variedad de conformaciones. Para estos casos, se generó un número suficientemente grande de conformaciones (100), determinado por la orientación de las varillas de ADN, estableciendo las orientaciones de acuerdo con una distribución aleatoria y uniforme. Los ángulos polares ( $\theta$ ,  $\phi$ ) que definen la orientación se generan con un número aleatorio uniforme en el intervalo (-1, +1) para  $\cos(\theta)$  y un número aleatorio uniforme para  $\phi$  en el intervalo (0,  $2\pi$ ), con la única restricción de evitar el solapamiento entre elementos del modelo. Por lo tanto, para tales partículas con variabilidad conformacional, no obtenemos un solo valor de la propiedad hidrodinámica sino un conjunto de ellos. En este esquema computacional, MULTIHYDRO demostró su utilidad: incluyendo líneas de

código para la generación de estructuras de bolas y varillas de forma aleatoria, produce los archivos estructurales necesarios para un posterior cálculo con HYDRO++ el cual, a su vez, proporciona las propiedades hidrodinámicas para cada conformación en un archivo de salida que se puede procesar fácilmente con una hoja de cálculo para el cálculo estadístico final. Para todos estos casos con variabilidad conformacional, los resultados se presentarán en un intervalo tomado como la media más/menos el doble de la desviación estándar.

Hemos incluido un caso especial (referido como partícula 2-1/2, *dumbbell* flexible) en el cual el conector es una cadena de ADN de cadena sencilla (ssADN) de 68 pares de base. El ssADN es más flexible que el dsADN, por lo que se puede representar mediante el modelo de cadena vermiforme cuyos parámetros son la longitud de contorno,  $L_c$  (longitud de la cadena totalmente extendida), y la longitud de persistencia que mide la rigidez. De acuerdo a Smith y col. [206] la longitud de contorno de una cadena de ssADN debe ser de 0.56 nm por nucleótido, lo que, en nuestro caso, equivale a  $L_c = 68 \times 0.56 = 38$  nm. En cuanto a la rigidez de una cadena de ssADN hay discrepancias entre autores. Un valor comúnmente citado es  $a \simeq 0.8$  nm [206, 207]. Sin embargo, este parámetro es algo dudoso porque factores como el emparejamiento de bases intramolecular puede afectar a la estadística conformacional. Un factor importante que influye en la longitud de persistencia es el efecto polielectrolito en la cadena de nucleótidos cargada. El valor antes mencionado es el usual en condiciones de salinidad alta (caso “A”), mientras que  $a$  puede tener valores tan grandes como 5 nm para concentraciones de sal muy bajas [208] (caso “B”).

Debido a que la simulación completa de la variabilidad conformacional es bastante laboriosa, decidimos reemplazar el conector flexible por uno rígido de longitud fija  $L \simeq \langle r^2 \rangle^{1/2}$ , donde  $\langle r^2 \rangle$  es la distancia extremo-extremo cuadrática media de la cadena conectora de ssADN, que para una cadena vermiforme podemos calcular fácilmente a partir de  $L_c$  (38 nm como se ha indicado en el párrafo anterior) y  $a$  usando la ecuación de Kratky-Porod [209]. De esta manera, obtenemos  $L = 7.8$  nm con  $a = 0.8$  nm en condiciones de concentración de sal elevada (caso “A”) y  $L = 19$  nm con  $a = 5$  nm en condiciones de concentración de sal baja (caso “B”). Este conector rígido “equivalente” se modela, como en el caso del *dumbbell* rígido, como una cadena de bolas casi tangentes cuyo radio se elige igualando el volumen de la cadena de bolas con el de la cadena de ssADN de 68 nucleótidos ( $M \simeq 21000$  Da). Esto conduce a los siguientes datos: i) caso “A”, 4 bolas de radio 1.0 nm, ii) caso “B”, 12 bolas de radio 0.8 nm. A continuación, se evalúan las propiedades del modelo de bolas rígido equivalente mediante el programa HYDRO++.

Una manera rigurosa de modelar macromoléculas vermiformes para obtener propiedades hidrodinámicas es el modelo vermiforme discreto, donde la macromolécula se representa por una cadena de  $N$  bolas tangentes de diámetro  $d$ , longitud de segmento  $b = d$ , de modo que su longitud de contorno es  $L_c = Nb$  y la flexibilidad angular está representada por un potencial cuadrático en el ángulo de flexión local con una constante de fuerza  $Q = K_bTP/b$ . Este esquema se ha aplicado con gran éxito a la predicción de las propiedades hidrodinámicas de una variedad de macromoléculas vermiformes [57]. En el presente caso, el modelo incluiría, en ambos extremos de la cadena de ADN, dos bolas adicionales que representan a las nanopartículas de Au. El modelo se puede implementar en el programa MONTEHYDRO, que trabaja con el denominado método Monte Carlo, prediciendo conformaciones plausibles de la entidad flexible y obteniendo una estimación de las propiedades como promedios conformacionales. Respecto a los parámetros, se puede estimar que el diámetro hidrodinámico de una cadena de ADN es  $d \simeq 1$  nm.

El resultado primario obtenido de los cálculos hidrodinámicos de los programas HYDRO es el radio hidrodinámico. Para la fricción traslacional, sedimentación y difusión, el radio hidrodinámico propio es el radio de Stokes,  $a_T$ , definido como el radio de la esfera con el mismo coeficiente de fricción que la partícula considerada. Es importante resaltar que  $a_T$  depende únicamente de la geometría (tamaño, forma o conformación) de la partícula (en un modelo de bolas, la posición y los tamaños de las bolas). Las propiedades hidrodinámicas traslacionales (coeficientes de fricción,  $f$ , sedimentación,  $s$ , y difusión,  $D$ ) se calculan a partir de  $a_T$  y datos adicionales sobre la composición del soluto (masa,  $M$ , volumen específico parcial,  $\bar{v}$ ) y del disolvente (viscosidad,  $\eta_0$ , y densidad,  $\rho$ ). Así, el coeficiente de fricción se obtiene de  $a_T$  y de la viscosidad del disolvente  $\eta_0$ :  $a_T = f/(6\pi\eta_0)$  (ecuación 1.5). A partir de  $f$ , el coeficiente de sedimentación puede ser evaluado como  $s = M(1 - \bar{v}\rho)/(N_A f)$  (ecuación 1.11). La interpretación de las distribuciones del coeficiente de sedimentación obtenidas de las medidas de la ultracentrifugación analítica requiere el conocimiento del cociente  $f/f_0$ , el cual puede ser estimado a partir de  $a_T$  y de datos adicionales para  $M$  y  $\bar{v}$ :

$$\frac{f}{f_0} = a_T \left( \frac{4\pi N_A}{3M\bar{v}} \right)^{1/3}. \quad (7.3)$$

El volumen específico parcial de las nanopartículas híbridas Au-ADN se puede estimar como el promedio de los volúmenes específicos de los dos componentes, ponderado con la

masa de cada componente, ya que no es posible obtenerlo mediante métodos experimentales:

$$\bar{v} = \frac{n_{Au}M_{Au}\bar{v}_{Au} + n_{ADN}M_{ADN}\bar{v}_{ADN}}{n_{Au}M_{Au} + n_{ADN}M_{ADN}}, \quad (7.4)$$

donde  $n_{Au}$ ,  $M_{Au}$  y  $\bar{v}_{Au}$  son el número de partículas de Au, su peso molecular y su volumen específico parcial, respectivamente, y  $n_{ADN}$ ,  $M_{ADN}$  y  $\bar{v}_{ADN}$  son el número de subunidades de ADN, su peso molecular y su volumen específico parcial, respectivamente.

El peso molecular de las nanopartículas de Au se puede estimar a partir del radio de la partícula desnuda, 2.7 nm, y la densidad del oro, 19.3 g/cm<sup>3</sup>, lo que conduce a  $M_{Au} = 9.6 \times 10^5$  Da. Debe tenerse en cuenta que la densidad o el volumen específico de la partícula de Au debe incluir la contribución apreciable del recubrimiento de ligando estabilizador (en nuestro caso trifenilfosfina) al volumen de la misma. La densidad estimada para la partícula de Au recubierta con una capa de trifenilfosfina de 0.6 nm de espesor es 12.5 g/cm<sup>3</sup> (menor que la densidad de la nanopartícula desnuda) con lo que  $\bar{v}_{Au} = 0.083$  cm<sup>3</sup>/g para las subunidades de Au. La influencia de la capa de trifenilfosfina sobre el peso molecular de las nanopartículas de Au se puede despreciar debido a la gran masa molar del núcleo de Au.

El peso molecular del dsADN, tal como se evaluó de la secuencia, fue  $M_{dsADN} = 42215$  Da, el cual da un peso molecular medio por par de bases de aproximadamente 620 Da, de acuerdo con el valor esperado (sin contribución catiónica). Asumimos que el peso molecular del ssADN (ADN monocatenario) es la mitad del dsADN (para el mismo número de pares de base). El volumen específico parcial del ADN está en el intervalo de  $\bar{v}_{dsADN} = 0.55 - 0.60$  cm<sup>3</sup>/g (aquí tomamos el mismo para dsADN y ssADN). Optamos por el volumen más grande con el fin de dar cuenta de una ligera expansión de volumen atribuible a la hidratación.

Por último, mencionar que en nuestros cálculos hemos considerado  $\eta_0 = 0.01$  Poise y  $T = 293$  K.

### 7.3.3. Resultados

Las nanopartículas híbridas Au-ADN se representan mediante los modelos de bolas y varillas descritos en la sección anterior. La notación utilizada para la identificación de las partículas cuyas varillas representan segmentos de dsADN es “n-m”, donde “n” es el número de esferas de oro y “m” es el número de conectores de dsADN (como hemos

mencionado con anterioridad, para el caso de ssADN utilizamos una ligera modificación de esta nomenclatura). En la Tabla 7.1, la partícula 1-0 es la nanopartícula de oro individual (recubierta de trifenílfosfina). Las partículas 1-1 y 2-1, también llamadas *lollipop* y *dumbbell*, son los casos que presentan una única conformación recta rígida (R).

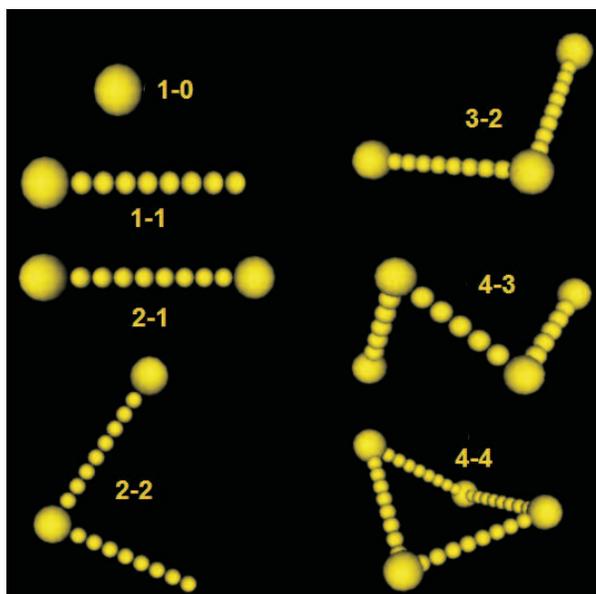


Figura 7.31: Imágenes de diversas conformaciones de los modelos de bolas para las nanopartículas híbridas Au-ADN.

Excepto las estructuras 1-0 y 1-1, todas las demás se espera que presenten variabilidad conformacional. En este caso es importante distinguir dos posibilidades: i) partículas con flexibilidad intrínseca (cambian continuamente de conformación), y ii) partículas rígidas con variedad conformacional (presentan una variedad de “flexiones” diferentes como el caso del *trumbbell*). En ambos casos debemos calcular las propiedades para un conjunto de posibles conformaciones, pero en el primer caso el resultado final para coeficiente hidrodinámico sería un promedio conformacional y en el segundo un rango de valores.

La partícula 2-1/2 es el *dumbbell* con un ADN de cadena sencilla y flexible (ssADN). La partícula 2-2 es un *dumbbell* con una cadena de dsADN adicional unida a una de las bolas con una orientación variable. La partícula 3-2, *trumbbell*, tiene tres bolas de Au y dos conectores de dsADN. Se recogen los resultados para una conformación rígida y recta aunque, probablemente, en un sistema real puede existir una variedad de conformaciones con ángulos diferentes entre los dos brazos. De manera similar, la partícula 4-3, el

tetrámero o *tetrambell*, tiene cuatro partículas Au y tres conectores de dsADN; de nuevo, se recoge el resultado para una disposición recta y el intervalo para una variedad de conformaciones con diferente disposición de los conectores. También hemos considerado otra disposición para el tetrámero, partícula 4-4, con topología circular en lugar de lineal, que puede presentar estructuras diferentes, no necesariamente planas, con el aspecto de un romboide curvado. Como en todos los casos con variabilidad conformacional, se muestra la media y un rango de valores plausibles. Los resultados de los cálculos hidrodinámicos se presentan en la Tabla 7.1 y las estructuras de bolas correspondientes en la Figura 7.31.

Tipo de Estructura		Au	ADN	$M \times 10^{-6}$ , Da	$\bar{v}$ , cm <sup>3</sup> /g	$s$ , S	$a_T$ , nm	$f/f_0$
1-0, esfera	R	1	0	0.958	0.083	271	3.17	0.99
1-1, <i>lollipop</i>	R	1	1	1.00	0.105	150	5.82	1.65
2-1, <i>dumbbell</i>	R	2	1	1.96	0.094	243	7.14	1.68
2-1/2flex, <i>dumbbell</i> ssADN	A	2	1/2	1.94	0.089	288	5.4	1.31
2-1/2flex, <i>dumbbell</i> ssADN	B	2	1/2	1.94	0.089	233	6.5	1.57
2-2(M) <i>dumbbell</i> +ADN	V	2	2	2.00	0.105	186-200 (193)	7.8-8.5 (8.18)	1.76-1.92 (1.85)
3-2, <i>trumbbell</i>	R	3	2	2.96	0.098	253	10.3	2.09
3-2, <i>trumbbell</i>	V	3	2	2.96	0.098	246-266 (256)	8.8-9.5 (9.18)	1.78-1.93 (1.86)
4-3, <i>tetrumbbell</i>	R	4	3	3.96	0.100	261	13.4	2.45
4-3, <i>tetrumbbell</i>	V	4	3	3.96	0.100	259-2985 (277)	10.7-12.1 (11.4)	1.96-2.21 (2.09)
4-4, tetrámero cíclico	F	4	2	4.00	0.105	268	11.8	2.12
4-4, tetrámero cíclico	V	4	2	4.00	0.105	240-300 (268)	10.7-12.7 (11.8)	1.85-2.30 (2.12)

Tabla 7.1: Parámetros hidrodinámicos calculados a partir del modelo de bolas para diferentes estructuras de Au-ADN. Nota: R = conformación recta; V = variabilidad conformacional (valor medio representativo y rango de valores plausibles); F = flexibilidad intrínseca (valor medio representativo); *dumbbell* flexible de ssADN, alta salinidad (A) y baja salinidad (B).

Los coeficientes de sedimentación obtenidos mediante los modelos computacionales están en buen acuerdo con los resultados experimentales de ultracentrifugación analítica (Tabla 7.2). Para el análisis de los datos experimentales de sedimentación se utilizó tanto el modo de ajuste  $ls-g^*(s)$  del programa SEDFIT de P. Schuck y col. [81, 135], que ignora la contribución de la difusión y conduce a un coeficiente de sedimentación aparente que puede ser calculado sin necesidad de conocer  $\bar{v}$ , como el algoritmo bidimensional de análisis espectral (*2D spectrum analysis*) 2DSA del programa Ultrascan de B. Demeler y col. [210], que tiene en cuenta la difusión en términos de  $f/f_0$  para cuyo cálculo es necesario realizar una estimación de  $\bar{v}$  de las partículas híbridas Au-ADN a través de la ecuación 7.4, lo que lleva aparejado un cierto error.

Tipo de Estructura	$s, S$ Simulación	$s, S$ Experimental	$f/f_0$ Simulación	$f/f_0$ Experimental	$M \times 10^6, Da$ Simulación	$M \times 10^6, Da$ Experimental
Esfera	271	240-340	1	1	0.958	1.2
<i>Lollipop</i>	150	130-220	1.65	1.2-1.7	1	0.9-1.1
<i>Dumbbell</i>	243	170-280	1.68	1.9-2.2	1.96	1.9-3.2
<i>Dumbbell + dsADN</i>	186-200		1.76-1.92		2.00	
<i>Trumbbell</i>	246-266		1.78-1.93		2.96	

Tabla 7.2: Comparación entre parámetros experimentales y calculados (simulación).

### 7.3.4. Conclusiones

La ultracentrifugación analítica (AUC) es un método adecuado para la caracterización de mezclas complejas de productos de reacción. La obtención simultánea de coeficientes de sedimentación y difusión a partir de un único experimento de velocidad de sedimentación es capaz de separar e identificar una multitud de especies presentes en la disolución. Por ejemplo, la formación de partículas híbridas Au-ADN puede dar lugar a multitud de estructuras (partículas aisladas de Au, *lollipops*, *dumbbells*, *trumbbells*, etc.), dependiendo de las características del ADN (como su funcionalización con tioles) y las concentraciones utilizadas, que pueden ser resueltas mediante AUC. Así, por ejemplo la estructura tipo *lollipop* sedimenta más lentamente que las AuNPs desnudas debido a la mayor fricción y menor densidad de las partículas híbridas. La anisotropía de las estructuras se refleja en un incremento de los cocientes de fricción  $f/f_0$ . El modelado de bolas de estructuras tipo permite predecir sus propiedades hidrodinámicas y evaluar los picos que aparecen en las distribuciones de coeficientes de sedimentación obtenidos a partir de los datos experimen-

tales. Es de prever que mejoras en el procedimiento basado en la técnica AUC permita obtener a gran escala diferentes tipos de ensamblaje de partículas de bastante pureza para distintas aplicaciones. Una ventaja adicional de este método es que las muestras producidas pueden ser caracterizadas directamente tras su síntesis sin un posterior tratamiento, lo que permite un acceso rápido a los resultados de la síntesis.

# Capítulo 8

## Conclusiones

**Primera.** Las técnicas instrumentales adquiridas recientemente en nuestro laboratorio han resultado de gran utilidad para la caracterización físico-química de diversos sistemas macromoleculares y coloidales. Sin embargo, la implementación de dichas técnicas y el control y delimitación de sus posibilidades ha supuesto un esfuerzo considerable, sobre todo para desentrañar los entresijos de los *softwares* instrumentales con el fin de acceder y manipular los datos primarios proporcionados por los instrumentos.

**Segunda.** La técnica de dispersión dinámica de luz implementada en el Zetasizer Nano ZS de Malvern es capaz de determinar con una buena resolución el diámetro hidrodinámico de partículas en un amplio rango de tamaños que abarca desde 1 nm a 4  $\mu\text{m}$ , como hemos podido comprobar tras medir sacarosa y gotas de una emulsión. Además, la modalidad de dispersión de luz estática a un solo ángulo que implementa el instrumento ha demostrado ser muy eficaz para la determinación del peso molecular de moléculas pequeñas.

**Tercera.** La técnica de viscosimetría implementada en el viscosímetro de bola rodante de Anton Paar proporciona determinaciones muy precisas de la viscosidad, lo que permite una alta precisión en el cálculo de la viscosidad específica. Como consecuencia, la viscosidad intrínseca puede ser determinada de forma muy aceptable mediante el método de punto único, lo que evita tener que utilizar el procedimiento de dilución, mucho más lento y complejo, con la ventaja adicional de que requiere muy poca cantidad de muestra.

**Cuarta.** Hemos desarrollado el programa *RheoFit* que permite ajustar fácilmente curvas de viscosidad de fluidos no newtonianos a tres modelos, Ostwald, Sisko y Cross, a partir de los datos primarios de gradiente de cizalla y viscosidad obtenidos de cualquier reómetro. La bondad de dicho programa ha sido verificada mediante el ajuste de curvas de

viscosidad de diversos fluidos estándar obtenidas experimentalmente mediante el reómetro MCR 102 de Anton Paar, que proporciona una excelente precisión con muy poca cantidad de muestra.

**Quinta.** La viscosimetría ha demostrado ser una técnica ideal para determinar el poder intercalador de moléculas pequeñas en la cadena de ADN debido a que los cambios conformacionales producidos en ésta por la intercalación influyen de forma importante en la viscosidad de sus disoluciones. Así, hemos verificado y cuantificado el poder intercalador de diversos complejos de Pt(II), pudiendo dilucidar cual interacciona más fácilmente con el ADN.

**Sexta.** Los experimentos de dispersión dinámica de luz y ultracentrifugación analítica han demostrado que la proteína PatZ de *E. coli* tiene una naturaleza oligomérica. En concreto, se ha verificado que tras su autoacetilación es predominantemente tetramérica, con algunos octámeros y una cantidad menor de monómeros. Las propiedades hidrodinámicas obtenidas mediante nuestro programa HYDROPRO para un modelo de bolas del tetrámero de la proteína están en excelente acuerdo con los valores experimentales y validan el modelo tetramérico propuesto para la proteína mediante cálculos computacionales de acoplamiento (*docking*) molecular.

**Séptima.** La reometría nos permitió conocer el comportamiento viscoso de los fluidos oviductales de la especie porcina y de fluidos artificiales con gran interés para la reproducción. La importancia del estudio radica en que la viscosidad de los fluidos implicados en la reproducción animal influye en la capacidad reproductiva. Todos los fluidos estudiados (biológicos y artificiales), presentaban comportamiento fluidizante, siendo éste más pronunciado para fluidos oviductales. Además, se ha establecido cómo la viscosidad de éstos variaba en función de la fase ovulatoria. Se comprobó que la metilcelulosa es un buen aditivo espesante y que variando su concentración se puede obtener un valor adecuado de viscosidad que mejore la capacidad reproductiva. Por otro lado, con nuestro programa RheoFit realizamos el ajuste de las curvas experimentales, obteniendo buenos resultados con el modelo de Cross para fluidos artificiales y con el modelo de Ostwald para fluidos oviductales.

**Octava.** La determinación del tamaño de gota en una emulsión de naturaleza electroquímica mediante la técnica de dispersión dinámica de luz y su comparación con los resultados obtenidos mediante un método electroquímico basado en detectar eventos de colisión a través de interfases polarizadas, permitió comprobar que la técnica electroquímica es capaz de determinar el tamaño de partículas con carga iónica y que los picos

---

de corriente obtenidos en las medidas electroquímicas están asociados a colisiones individuales de gotas de la emulsión con la interfase.

**Novena.** El copolímero PNIPAAm-co-PAMPTMA(+) presenta en disolución acuosa una temperatura crítica inferior de disolución (LCST) en torno a 40°C. A temperaturas inferiores a la LCST las cadenas se encuentran mayoritariamente disueltas de forma individual. A temperaturas superiores a la LCST, las cadenas forman agregados debido a que el segmento de PNIPAAm se vuelve hidrofóbico. La importancia de la agregación depende de las longitudes relativas de los segmentos de PNIPAAm y PAMPTMA. El proceso de agregación es reversible y presenta cierta histéresis.

**Décima.** La estabilidad de las suspensiones de nanopartículas de oro disminuye al aumentar la fuerza iónica y al disminuir el pH debido al apantallamiento de las cargas superficiales. Tanto la dispersión dinámica de luz como la espectroscopía UV-vis son técnicas adecuadas para seguir la cinética de agregación pues tanto el desplazamiento de los picos de la distribución de tamaño como el desplazamiento del pico de plasmón son fácilmente detectables. La concentración de sal crítica para que las nanopartículas agreguen de forma apreciable resultó ser 0.075 M. Por encima de esa concentración las nanopartículas agregan rápidamente mediante el mecanismo DLCA. A concentraciones de sal inferiores las nanopartículas agregan muy lentamente mediante el mecanismo RLCA.

**Undécima.** La adición de quitosano a una suspensión de nanopartículas de oro evita la agregación de éstas en medio salino. Las cadenas de quitosano forman marañas que atrapan rápidamente las nanopartículas individuales e impiden su agregación, como lo confirma la ausencia de desplazamiento del pico de plasmón. Las imágenes de microscopía electrónica parecen indicar que las nanopartículas quedan inmovilizadas sobre la superficie de los agregados de quitosano, formando un *nanocomposite* de oro y quitosano.

**Duodécima.** La carga positiva del copolímero PNIPAAm-co-PAMPTMA(+) favorece sus interacciones con nanopartículas de oro recubiertas de citrato. Al igual que en el caso del quitosano, este copolímero parece formar agregados que atrapan las nanopartículas de oro impidiendo que éstas agreguen.

**Décimotercera.** La ultracentrifugación analítica es una técnica muy adecuada para separar y caracterizar las distintas especies presentes en una mezcla compleja. Utilizada junto a los programas de predicción de propiedades hidrodinámicas basados en modelos de bolas creados por nuestro Grupo de Investigación, permite identificar con bastante exactitud las diferentes estructuras a las que da lugar la síntesis de nanopartículas híbridas de oro y ADN.



# Referencias

- [1] P.C. Hiemenz and T.P. Lodge. *Polymer Chemistry, 2nd Edition*. CRC Press, Boca Raton, 2007.
- [2] I.N. Serdyuk, N.R. Zaccai, and J. Zaccai. *Methods in Molecular Biophysics. Structure, Dynamics, Function*. Cambridge University Press, New York, 2007.
- [3] A.I. Díez Peña. *Simulación Numérica Y Estudios Experimentales sobre Ultracentrifugación Analítica de Macromoléculas*. PhD thesis, Fac. de Química, Univ. de Murcia, 2014.
- [4] A. Ortega and J. García de la Torre. Equivalent radii and ratios of radii from solution properties as indicators of macromolecular conformation, shape, and flexibility. *Biomacromolecules*, 8:2464–2475, 2007.
- [5] K.E. van Holde, W. Johnson, and P. Ho. *Principles of Physical Biochemistry, 2nd Edition*. Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J., 1998.
- [6] F.G. Díaz (Coordinador) y col. *Experimentación en Química Física Avanzada*. Diego Marín, Murcia, 2004.
- [7] P. Debye. Molecular-weight determination by light scattering. *J. Phys. Chem.*, 51:18–32, 1947.
- [8] B.H. Zimm. The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. *J. Chem. Phys.*, 16:1093–1099, 1948.
- [9] B.H. Zimm. Apparatus and methods for measurement and interpretation of the angular variation of light scattering; preliminary results on polystyrene solutions. *J. Chem. Phys.*, 16:1099–1116, 1948.

- [10] R. Pecora. Doppler shifts in light scattering from pure liquids and polymer solutions. *J. Chem. Phys.*, 40:1604–1613, 1964.
- [11] R. Pecora. Quasi-elastic light scattering from macromolecules. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1:257–276, 1972.
- [12] B.J. Berne and R. Pecora. *Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics*. John Wiley and Sons, New York, 1975.
- [13] S.E. Harding. *Proteins: a comprehensive treatise, vol. 2*, chapter Protein hydrodynamics, pages 271–305. JAI Press, Greenwich CT, 1999.
- [14] D.E. Koppel. Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: the method of cumulants. *J. Chem. Phys.*, 57:4814–4820, 1972.
- [15] B.J. Frisken. Revisiting the method of cumulants for the analysis of light-scattering data. *Appl. Optics*, 24:4087–4091, 2001.
- [16] S.W. Provencher. CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Comput. Phys. Commun.*, 27:229–242, 1982.
- [17] B.R. Ware. Electrophoretic light scattering. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 4:1–44, 1974.
- [18] Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire WR14 1XZ, United Kingdom. *Zetasizer nano series user manual*, man0485 issue 1.1 edition, 2013.
- [19] A.D. McFarland, C.L. Haynes, C.A. Mirkin, R.P. Van Duyne, and H.A. Godwin. Color my nanoworld. *J. Chem. Ed.*, 81:544A–544B, 2004.
- [20] X. Ji, X. Song, J. Li, Y. Bai, W. Yang, and X. Peng. Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: the third role of citrate. *J. Am. Chem. Soc.*, 129:13939–13948, 2007.
- [21] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin, and R. Whyman. Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a 2 phase liquid-liquid system. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 7:801–802, 1994.

- 
- [22] M. Kaszuba, D. McKight, and U. Nobbman M.T. Connah, F. K. McNeil-Watson. Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *J. Nanopart. Res.*, 10:823–329, 2008.
- [23] T. Tumolo, L. Angnes, and M.S. Baptista. Determination of refractive index increment ( $dn/dc$ ) of molecule and macromolecule solutions by surface plasmon resonance. *Anal. Biochem.*, 333:273–279, 2004.
- [24] W.H. Press, B.P. Flannery, S.A. Teukolsky, and M.T.Vetterling. *Numerical Recipes: The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, Cambridge, 1986.
- [25] A. C. F. Ribeiro, O. Ortona, and P. M. R. A. Prazeres S. M.N. Simoes, C. I. A. V. Santos. Binary mutual diffusion coefficients of aqueous solutions of sucrose, lactose, glucose, and fructose in the temperature range from (298.15 to 328.15) K. *J. Chem. Eng. Data*, 51:1836–1840, 2006.
- [26] P. N. Ekemezie, J. O. Nwadiogbu, and E. E. Enekwechi. Determination of the diffusion coefficient of sucrose in water and its hydrodynamic radius. *Der Pharma Chemica*, 7:1–7, 2015.
- [27] S.G.Schultz and A.K. Solomon. Determination of the effective hydrodynamic radii of small molecules by viscometry. *J. Gen. Physiol.*, 44:1189–1199, 1961.
- [28] H.A. Barnes. *A handbook of elementary rheology*. The University of Wales, Aberystwyth, 2000.
- [29] M.L. Huggins. The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules IV. Dependence on concentration. *J. Am. Chem. Soc.*, 64:2716–2720, 1942.
- [30] E.O. Kraemer. Molecular weights of cellulose and cellulose derivatives. *Ind. Eng. Chem.*, 30:1200–1203, 1938.
- [31] R. Pamies, J.G. Hernández Cifre, M.C. López Martínez, and J. García de la Torre. Determination of intrinsic viscosities of macromolecules and nanoparticles. Comparison of single-point and dilution procedures. *Colloid Polym. Sci.*, 286:1223–1231, 2008.
- [32] M.C. López Martínez, F.G. Díaz, A. Ortega, and J. García de la Torre. Multiple linear least-squares fits with a common intercept. application to the determination

- of the intrinsic viscosity of macromolecules in solution. *J. Chem. Ed.*, 80:1036–1038, 2003.
- [33] Grupo de Polímeros de la Universidad de Murcia. Web site: <http://leonardo.inf.um.es/macromol>.
- [34] O.F. Solomon and B.S. Gotesman. Calculation of viscosity number from a single measurement. *Makromol. Chem.*, 104:177–184, 1967.
- [35] L. Ubbelohde. *Oel und Kohle*, 49:949–974, 1936.
- [36] W. Ostwald and H. Malss. *Kolloid Z. Z. Polym.*, 63:61–77, 1933.
- [37] R. Lapasin and S. Pricl. *Rheology of industrial polysaccharides: theory and applications*. Aspen, Gaithersburg, Maryland, 1st edition, 1999.
- [38] W.J. Sime. *Food Gels*. Elsevier Applied Science, Barkin, UK., 1990.
- [39] A. Hyreand and C. Leonard. Structural characterization of alginates by liquid chromatographies. *Food Hydrocoll.*, 4:59–68, 1990.
- [40] O. Smidsrød. Solution properties of alginate. *Carbohydr. Res.*, 13:359–372, 1970.
- [41] W. Mackie, R. Noy, and D.B. Sellen. Solution properties of sodium alginates. *Biopolymers*, 19:1839–1860, 1980.
- [42] R. Pamies, R. Rodríguez Schmidt, M.C. López Martínez, and J. García de la Torre. The influence of mono and divalent cations on dilute and non-dilute aqueous solutions of sodium alginates. *Carbohydr. Polym.*, 80:248–253, 2010.
- [43] H.A. Barnes, J.F. Hutton, and K. Walters. *An Introduction to the Rheology*. Elsevier Science Publishing Company, Amsterdam, 1989.
- [44] C.W. Macosko. *Rheology. Principles, measurements and applications*. VCH Publishers, New York, 1994.
- [45] AENOR. *Plásticos. Definición de términos reológicos Norma española UNE 53-418-87*. Asociación Española de Normalización y Certificación, 1987.
- [46] A.W. Sisko. The flow of lubricating greases. *Ind. Eng. Chem.*, 50:1789–1792, 1958.

- 
- [47] D.W. Marquardt. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Indust. Appl. Math.*, 11:431–441, 1963.
- [48] G. Zuber, J.C. Quada, and S.M. Hecht Jr. Sequence selective cleavage of a DNA octanucleotide by chlorinated bithiazoles and bleomycins. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:9368–9369, 1998.
- [49] S.M. Hecht. Bleomycin: New perspectives on the mechanism of action. *J. Nat. Prod.*, 63:158–168, 2000.
- [50] Wikipedia. [https://es.wikipedia.org/wiki/Ácido\\_desoxirribonucleico](https://es.wikipedia.org/wiki/Ácido_desoxirribonucleico) (accedido 19/09/2016).
- [51] A.C. Komor and J. K. Barton. The path for metal complexes to a DNA target. *Chem. Commun.*, 49:3617–3630, 2013.
- [52] D. Ma, H. He, K. Leung, D. Shiu-Hin Chan, and C. Leung. Bioactive luminescent transition-metal complexes for biomedical applications. *Angew. Chem.*, 52:7666–7682, 2013.
- [53] D. Bhattacharyya, S. Ramachandran, S. Sharma, W. Pathmasiri, C.L. King, I. Baskerville-Abraham, G. Boysen, J.A. Swenberg, S.L. Campbell, N.V. Dokholyan, and S.G. Chaney. Flanking bases influence the nature of DNA distortion by platinum 1,2-intrastrand (GG) cross-links. *PLoS ONE*, 6:e23582–13, 2011.
- [54] J.C. García-Ramos, R. Galindo-Murillo, F. Cortés-Guzmán, and L. Ruiz-Azuara. Metal-based drug DNA interactions. *J. Mex. Chem. Soc.*, 57:245–259, 2013.
- [55] Wikipedia. [https://es.wikipedia.org/wiki/Hoechst\\_\(colorante\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Hoechst_(colorante)) (accedido 19/09/2016).
- [56] B.J. Pages, D.L. Ang, E.P. Wright, and J.R. Aldrich-Wright. Metal complex interactions with DNA. *Dalton Trans.*, 44:3505–3526, 2015.
- [57] D. Amorós, A. Ortega, and J. García de la Torre. Hydrodynamic properties of wormlike macromolecules: Monte Carlo simulation and global analysis of experimental data. *Macromolecules*, 44:5788–5797, 2011.

- [58] J. García de la Torre. Hydrodynamics of Nucleic Acids: Modeling Overall Conformation and Dynamics. In *Encyclopedia of Biophysics*, pages 1024–1029. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 2013.
- [59] L.S. Lerman. Structural considerations in the interactions of DNA and acridines. *J. Mol. Biol.*, 3:18–30, 1961.
- [60] V.Luzzati, F Masson, and L.S. Lerman. Interaction of DNA and proflavine: A small-angle x-ray scattering study. *J. Mol. Biol.*, 3:634–639, 1961.
- [61] L.S. Lerman. The structure of the DNA-acridine complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 49:94–102, 1963.
- [62] D. Suh and J.B.Chaires. Criteria for the mode of binding of DNA binding agents. *Bioorg. Med. Chem.*, 3:723–728, 1995.
- [63] X-B. Fu, D-D. Liu, Y.Lin, W. Hu, Z-W Mao, and X-Y Le. Water-soluble DNA minor groove binders as potential chemotherapeutic agents: synthesis, characterization, DNA binding and cleavage, antioxidation, cytotoxicity and HSA interactions. *Dalton Trans.*, 43:8721–8737, 2014.
- [64] N. Shahabadi, S. Kashanian, and F. Darabi. DNA binding and DNA cleavage studies of a water soluble cobalt(II) complex containing dinitrogen schiff base ligand: The effect of metal on the mode of binding. *Eur. J. Med. Chem.*, 45:4239–4245, 2010.
- [65] J.L. García-Giménez, J. Hernández-Gil, A. Martínez-Ruiz, A. Casti neiras, M. Liu-González, F.V. Pallardó, J. Borrás, and G. ALzuet Pi na. DNA binding, nuclease activity, DNA photocleavage and cytotoxic properties of Cu(II) complexes of N-substituted sulfonamides. *J. Inorg. Biochem.*, 121:167–178, 2013.
- [66] S.A. Pérez, C. de Haro, C. Vicente, A. Donaire, A. Zamora, J. Zajac, H. Kostrhunova, V. Brabec, D. Bautista, and J. Ruiz. New acridine thiourea gold(I) anticancer agents: Targeting the nucleus and inhibiting vasculogenic mimicry. *ACS Chem. Biol.*, 12:1524–1537, 2017.
- [67] H. Chao, W.-J. Mei, Q.W. Huang, and L-N. Ji. DNA binding studies of ruthenium(II) complexes containing asymmetric tridentate ligands. *J. Inorg. Biochem.*, 92:165–170, 2002.

- 
- [68] G. Cohen and H. Eisenberg. Viscosity and sedimentation study of sonicated DNA-proflavine complexes. *Biopolymers*, 8:45–55, 1969.
- [69] J. Riseman and J.G. Kirkwood. The intrinsic viscosity, translational and rotatory diffusion constants of rod-like macromolecules in solution. *J. Chem. Phys.*, 18:512–516, 1950.
- [70] J. García de la Torre, M.C. López Martínez, M.M. Tirado, and J.J. Freire. Approximate methods for calculating hydrodynamic properties of macromolecules in dilute solution. Theory and application to rigid structures. *Macromolecules*, 16:1121–1127, 1983.
- [71] T. Pisithkul, N. M. Patel, and D. Amadornoguez. Post-translational modifications as key regulators of bacterial metabolic fluxes. *Curr. Opin. Microbiol.*, 24:29–37, 2015.
- [72] B. T. Weinert, V. Iesmantavicius, S. A. Wagner, C. Schölz, B. Gummesson, P. Beli, T. Nyström, and C. Choudhary. Acetyl phosphate is a critical determinant of lysine acetylation in *Escherichia coli*. *Mol. Cell.*, 51:265–267, 2013.
- [73] F. Dyda, D.C. Klein, and A.B. Hickman. GCN5-related N-acetyltransferases: A structural overview. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 29:81–103, 2000.
- [74] V.J. Starai and J.C. Escalante-Semerena. Identification of the protein acetyltransferase (Pat) enzyme that acetylates Acetyl-CoA synthetase in *Salmonella enterica*. *J. Mol. Biol.*, 340:1005–1012, 2004.
- [75] H.A. Crosby, E.K. Heiniger, C.S. Harwood, and J.C. Escalante-Semerena. Reversible N-lysine acetylation regulates the activity of Acyl-CoA synthetases involved in anaerobic benzoate catabolism in *Rhodospirillum rubrum*. *Mol. Microbiol.*, 76:874–888, 2010.
- [76] S. Castaño Cerezo, V. Bernal, J. Blanco-Catalá, J.L. Iborra, and M. Cánovas. cAMP-CRP coordinates the expression of the protein acetylation pathway with central metabolism in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 82:1110–1128, 2011.
- [77] S. Castaño Cerezo, V. Bernal, H. Post, T. Fuhrer, S. Cappadona, N. Sánchez-Díaz, V. Sauer, A.J.R. Heck, A.F.M. Alterlaar, and M. Cánovas. Protein acetylation

- affects acetate metabolism, motility and acid stress response in *escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.*, 762:1–16, 2014.
- [78] D.L. Burk, N. Ghuman, L.E. Wybenga-Groot, and A.M. Berghuis. X-ray structure of the AAC(6′)-Ii antibiotic resistance enzyme at 1.8 a resolution; examination of oligomeric arrangements in GNAT superfamily members. *Protein Sci.*, 12:426–437, 2003.
- [79] T. de Diego Puente, J. Gallego-Jara, S. Casta no Cerezo, V. Bernal Sánchez, V. Fernández Espín, J. García de la Torre, A. Manjón Rubio, and M. Cánovas Díaz. The protein acetyltransferase PatZ from *escherichia coli* is regulated by autoacetylation-induced oligomerization. *J. Biol. Chem.*, 38:23077–23093, 2015.
- [80] T. M. Laue, B. D. Shah, T. M. Ridgeway, and S. L. Pelletier. Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*, pages 90–125. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1992.
- [81] P. Schuck. Size distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. *Biophys. J.*, 78:1606–1619, 2000.
- [82] J. García de la Torre, M.L. Huertas, and B. Carrasco. Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structures. *Biophys. J.*, 78:719–730, 2000.
- [83] J. García de la Torre, M.L. Huertas, and B. Carrasco. HYDRONMR: Prediction of NMR relaxation of globular proteins from atomic-level structures and hydrodynamic calculations. *J. Magn. Reson.*, 147:138–146, 2000.
- [84] A. Ortega, D. Amorós, and J. García de la Torre. Prediction of hydrodynamic and other solution properties of rigid proteins from atomic- and residue-level models. *Biophys. J.*, 101:892–898, 2011.
- [85] S.R. Comeau, D.W. Gatchell, S. Vadja, and C.J. Camacho. ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Research*, 32 (Web server issue):W96–W99, 2004.

- 
- [86] J.L. Moreland, A. Gramada, O.V. Buzko, Q. Zhang, and P.E. Bourne. The molecular biology toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications. *BMC Bioinformatics*, 6:21 (7 pages), 2005.
- [87] D. Xu and Y. Zhang. Generating triangulated macromolecular surfaces by euclidean distance transform. *PLoS ONE*, 4:e8140 (11 pages), 2009.
- [88] S. Pérez-Cárceles, S. Boryshpolets, and M. Eisenbach. Behavioral mechanisms of mammalian sperm guidance. *Asian J. Androl.*, 17:628–632, 2015.
- [89] K. Ishimoto and E.A. Gaffney. Fluid flow and sperm guidance: a simulation study of hydrodynamic sperm rheotaxis. *J. R. Soc. Interface.*, 12:0172(1)–0172(10), 2015.
- [90] T.M. El-Sherry, M. Elsayed, H.K. Abdelhafez, and M. Abdelgawad. Characterization of rheotaxis of bull sperm using microfluidics. *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano. Macro.*, 6:1111–1121, 2014.
- [91] V. Kantsler, J. Dunkel, M. Blayney, and R.E. Goldstein. Rheotaxis facilitates upstream navigation of mammalian sperm cells. *eLife*, 3:02403(1)–02403(12), 2014.
- [92] K. Miki and D.E. Clapham. Rheotaxis guides mammalian sperm. *Curr. Biol.*, 23:443–452, 2013.
- [93] S.S. Suarez and A.A. Pacey. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum. Reprod. Update*, 12:23–37, 2006.
- [94] R.P. Jansen. Cyclic changes in the human fallopian tube isthmus and their functional importance. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 136:292–308, 1980.
- [95] D.F. Katz, E.Z. Drobnis, and J.W. Overstreet. Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete Res.*, 22:443–469, 1989.
- [96] X.Y. Wang, S.K. Lai, L.M. Ensign, W. Zhong, R. Cone, and J. Hanes. The microstructure and bulk rheology of human cervicovaginal mucus are remarkably resistant to changes in pH. *Biomacromolecules*, 14:4429–4435, 2013.
- [97] H. Rodríguez-Martínez. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*, 68:138–146, 2007.

- [98] J.C. Kirkman-Brown and D.J. Smith. Sperm motility: is viscosity fundamental to progress? *Mol. Hum. Reprod.*, 17:539–544, 2011.
- [99] R.H.F. Hunter, P. Coy, J. Gadea, and D. Rath. Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilisation. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 28:191–197, 2011.
- [100] P. Coy, J. Gadea, D. Rath, and R.H. Hunter. Differing sperm ability to penetrate the oocyte in vivo and in vitro as revealed using colloidal preparations. *Theriogenology*, 72:1171–1179, 2009.
- [101] C. Martinez-Rodriguez, M. Alvarez, L. Ordas, C.A. Chamorro, F. Martinez-Pastor, and L. Anel. Evaluation of ram semen quality using polyacrylamide gel instead of cervical mucus in the sperm penetration test. *Theriogenology*, 77:1575–1586, 2012.
- [102] L. Eamer, R. Nosrati, M. Vollmer, A. Zini, and D. Sinton. Microfluidic assessment of swimming media for motility-based sperm selection. *Biomicrofluidics*, 9:044113(1)–044113(12), 2015.
- [103] A. Ivic, H. Onyeaka, A. Girling, I.A. Brewis, B. Ola, and N. Hammadieh. Critical evaluation of methylcellulose as an alternative medium in sperm migration tests. *Hum. Reprod.*, 17:143–149, 2002.
- [104] R. Rikmenspoel. Movements and active moments of bull sperm flagella as a function of temperature and viscosity. *J. Exp. Biol.*, 108:205–230, 1984.
- [105] D.J. Smith, E.A. Gaffney, H. Gadelha, N. Kapur, and J.C. Kirkman-Brown. Bend propagation in the flagella of migrating human sperm, and its modulation by viscosity. *Cell. Motil. Cytoskelet.*, 66:220–236, 2009.
- [106] B.D. Ray, R.T. Howell, A. McDermott, and M.G. Hull. Testing the mutagenic potential of polyvinylpyrrolidone and methyl cellulose by sister chromatid exchange analysis prior to use in intracytoplasmic sperm injection procedures. *Hum. Reprod.*, 10:436–438, 1995.
- [107] L.C. Carrasco, R. Romar, M. Avilés, J. Gadea, and P. Coy. Determination of glycosidase activity in porcine oviductal fluid at the different phases of the estrous cycle. *Reproduction*, 136:833–842, 2008.

- 
- [108] Web. <http://med.se-todo.com/biolog/30907/index.html> (accedido 17/03/2017).
- [109] D. González-Abreu, S. García-Martínez, V. Fernández-Espín, R. Romar, and J. Gadea. Incubation of boar spermatozoa in viscous media by addition of methylcellulose improves sperm quality and penetration rates during in vitro fertilization. *Theriogenology*, 92:14–23, 2017.
- [110] J.Y. Foo. Modelling of energy expended by free swimming spermatozoa in temperature-dependent viscous semen. *J. Med. Eng. Technol.*, 34:78–84, 2010.
- [111] M.M. Norton, R.J. Robinson, and S. J. Weinstein. Model of ciliary clearance and the role of mucus rheology. *Phys. Rev. E.*, 83:011921(1)–011921(12), 2011.
- [112] R.H.F. Hunter. Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 87:244–255, 2012.
- [113] S.S. Suárez and X. Dai. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol. Reprod.*, 46:686–691, 1992.
- [114] W.V. Holt, J. O’Brien, and T. Abaigar. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reprod. Fertil. Dev.*, 19:709–718, 2007.
- [115] F. Martínez-Pastor, E.J. Tizado, J.J. Garde, L. Anel, and P. de Paz. Statistical series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology*, 75:783–795, 2011.
- [116] I. Salvador, J. Yaniz, M.P. Viudes de Castro, E.A. Gómez, and M.A. Silvestre. Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5 degrees c. *Theriogenology*, 66:974–981, 2006.
- [117] C.D. Corcini, F. Moreira, R. Pigozzo, A.S. Varela, N.U. Torres, and T. Lucía. Semen quality and reproductive performance after artificial insemination with boar sperm stored in a gelatin-supplemented extender. *Livest. Sci.*, 138:289–292, 2011.
- [118] T. Hyakutake, H. Suzuki, and S. Yamamoto. Effect of non-newtonian fluid properties on bovine sperm motility. *J. Biomech.*, 48:2941–2947, 2015.

- [119] V. Marecek, Z. Samec, and J. Koryta. Charge transfer across the interface of two immiscible electrolyte solutions. *Adv. Colloid Int. Sci.*, 29:1–78, 1988.
- [120] W. Nernst and E.H. Riesenfeld. Ueber elektrolytische erscheinungen an der grenzfläche zweier lösungsmittel. *Ann. Phys.*, 8:600–608, 1902.
- [121] C. Gavach. Biological aspects of electrochemistry. *Experientia Suppl.*, 18:321–331, 1971.
- [122] M. Velázquez-Manzanares and J. Amador-Hernández. Kinetics of facilitated proton transfer by polyether 18-crown-6 across the water 1,2-dichloroethane interface. *Russian Journal of Electrochemistry*, 41:182–188, 2005.
- [123] J.E. Dicka, A.T. Hilterbrandb, A. Boikaa, J.W. Uptonb, and A.J. Barda. Electrochemical detection of a single cytomegalovirus at an ultramicroelectrode and its antibody anchoring. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112:5303–5308, 2015.
- [124] E. Laborda, A. Molina, V. Fernández Espín, F. Martínez-Ortiz, J. García de la Torre, and R.G. Compton. Single fusion events at polarized liquid-liquid interfaces. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56:782–785, 2017.
- [125] H.G. Schild. Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Prog. Polym. Sci.*, 17:163–249, 1992.
- [126] R. Pelton. Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) is never hydrophobic. *J. Colloid Interface Sci.*, 348:673–674, 2010.
- [127] Y. Lu, K. Zhou, Y. Ding, G. Zhang, and C. Wu. Origin of hysteresis observed in association and dissociation of polymer chains in water. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12:3188–3194, 2010.
- [128] C. Wu and X. Wang. Globule-to-coil transition of a single homopolymer chain in solution. *Phys. Re. Lett.*, 80:4092–4094, 1998.
- [129] K. Kubota, K. Hamano, N. Kuwahara, S. Fujishige, and I. Ando. Characterization of poly(N-isopropylmethacrylamide) in water. *Polymer Journal*, 22:1051–1057, 1990.
- [130] C. Wu and S.Q. Zhou. Laser-light scattering study of the phase-transition of poly(N-isopropylacrylamide) in water. 1. Single-chain. *Macromolecules*, 28:8381–8387, 1995.

- 
- [131] R. Pamies, K. Zhu, A.-L. Kjøniksen, and B. Nyström. Thermal response of low molecular weight poly-(N-isopropylacrylamide) polymers in aqueous solution. *Polym. Bull.*, 62:487–502, 2009.
- [132] A.-L. Kjøniksen, M.T. Calejo, K. Zhu, A.M.S. Cardoso, M.C.P. de Lima, A.S. Jurado, B. Nyström, and S.A. Sande. Sustained release of naltrexone from poly(N-isopropylacrylamide) microgels. *J. Pharm. Sci.*, 103:227–234, 2014.
- [133] S. Bayati, K. Zhu, L.T.T. Trinh, A.-L. Kjøniksen, and B. Nyström. Effects of temperature and salt addition on the association behavior of charged amphiphilic diblock copolymers in aqueous solution. *J. Phys. Chem. B*, 116:11386–11395, 2012.
- [134] J. Chen, M. Liu, H. Gong, Y. Huang, and C. Chen. Synthesis and self-assembly of thermoresponsive PEG-b-PNIPAM-b-PCL ABC triblock copolymer through the combination of atom transfer radical polymerization, ring-opening polymerization, and click chemistry. *J. Phys. Chem. B*, 115:14947–14955, 2011.
- [135] P. Schuck. Sedimentation patterns of rapidly reversible protein interactions. *Biophys. J.*, 98:2005–2013, 2010.
- [136] P. Schuck. Diffusion of the reaction boundary of rapidly interacting macromolecules in sedimentation velocity. *Biophys. J.*, 98:2741–2751, 2010.
- [137] A. Ortega, R. Pamies, K. Zhu, A. L. Kjøniksen, B. Nyström, and J. García de la Torre. Characterization of low molecular mass thermosensitive diblock copolymers and their self-assembly by means of analytical ultracentrifugation. *Colloid Polym. Sci.*, 290:297–306, 2012.
- [138] J. Storhoff, A. Lazarides, C. Mucic, C. Mirkin, R. Lestinger, and G. Shatz. What controls the optical properties of DNA linked gold nanoparticle assemblies? *J. Am. Chem. Soc.*, 122:4640–4650, 2000.
- [139] E. Hutter and J.H. Fendler. Exploitation of localized surface plasmon resonance. *Adv. Mat.*, 16:1685–1706, 2004.
- [140] S.K. Dondapati, T.K. Sau, C. Hrelescu, T.A. Klar, F.D. Stefani, and J. Feldmann. Label-free biosensing based on single gold nanostars as plasmonic transducers. *ACS Nano*, 4:6318–6322, 2010.

- [141] M.S. Yavuz, Y. Chen, J. Chen, C.M. Cobley, Q. Zhang, M. Rycenga, J. Xie, C. Kim, K.H. Song, A.G. Schwartz, L.V. Wang, and Y. Xia. Gold nanocages covered by smart polymers for controlled release with near-infrared light. *Nat. Mater.*, 8:935–939, 2009.
- [142] L. Rastogi, A.J. Kora, and J. Arunachalam. Highly stable, protein capped gold nanoparticles as effective drug delivery vehicles for amino-glycosidic antibiotics. *Mater. Sci. Eng. C: Mater. Biol. Appl.*, 3:1571–1577, 2012.
- [143] R. Bhattacharya and P. Mukherjee. Biological properties of «naked» metal nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 60:1289–1306, 2008.
- [144] P.C. Chen, S.C. Mwakwari, and A.K. Oyelere. Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. *Nanotechnology, Science and Applications*, 1:45–66, 2008.
- [145] P.K. Jain, X. El-Sayed, and M.A. El-Sayed. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology and medicine. *Acc. Chem. Res.*, 41:1578–1586, 2008.
- [146] M. Larginho and P.V. Baptista. Gold and silver nanoparticles for clinical diagnostics – from genomics to proteomics. *J. Proteomics*, 75:2811–2823, 2012.
- [147] A.A. Sousa, J. T Morgan, P.H. Brown, A. Adams, M.P.S. Jayasekara, G. Zhang, C.J. Ackerson, M.J. Kruhlak, and R.D. Leapman. Synthesis, characterization, and direct intracellular imaging of ultrasmall and uniform glutathione-coated gold nanoparticles. *Small*, 8:2277–2286, 2012.
- [148] M. Faraday. The bakerian lecture: Experimental relations of gold (and other metal) to light. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 147:145–181, 1857.
- [149] G. Mie. Beiträge zur optik trüber medien, speziell kolloidaler metallösungen. *Ann. Phys.*, 25:377–445, 1908.
- [150] Wikipedia. [https://en.wikipedia.org/wiki/Colloidal\\_gold](https://en.wikipedia.org/wiki/Colloidal_gold) (accedido 19/12/2016).
- [151] J. Turkevich, P.C. Stevenson, and J. Hillier. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, discuss. *Faraday Soc.*, 11:55–75, 1951.

- 
- [152] G. Frens. Controlled nucleation for regulation of particle-size in monodisperse gold suspensions. *Nature Phys. Sci.*, 241:20–22, 1973.
- [153] G. Schmid. Large clusters and colloids metals in the embryonic state. *Chem. Rev.*, 92:1709–1727, 1992.
- [154] U. Kreibig and M. Vollmer, editors. *Optical properties of metal clusters*. Springer-Verlag, Berlin, 1995.
- [155] S. Suarasan, M. Focsan, D. Maniu, and S. Astilean. Gelatin nano gold bioconjugates as effective plasmonic platforms for SERS detection and tagging. *Colloids Surf. B*, 103:475–481, 2013.
- [156] T. Laaksonen, P. Ahonen, C. Johans, and K. Kontturi. Stability and electrostatics of mercaptoundecanoic acid-capped gold nanoparticles with varying counterion size. *ChemPhysChem*, 7:2143–2149, 2006.
- [157] T. Kim, C.H. Lee, S.W. Joo, and K. Lee. Kinetics of gold nanoparticle aggregation: Experiments and modeling. *J. Colloid Interface Sci.*, 318:238–243, 2008.
- [158] A.M. Keene and K.M. Tyner. Analytical characterization of gold nanoparticle primary particles, aggregates agglomerates, and agglomerated aggregates. *J. Nanopart. Res.*, 13:3465–3481, 2011.
- [159] E.J.W. Verwey and JTG Overbeek, editors. *Theory of the stability of lyophobic colloids*. Elsevier, New York, USA, 1948.
- [160] P. Meakin. Formation of fractal clusters and networks by irreversible diffusion-limited aggregation. *Phys. Rev. Lett.*, 51:1119–1122, 1983.
- [161] M. Kolb and R. Jullien. Chemically limited versus diffusion limited aggregation. *J. Physique Lett.*, 45:L977–L981, 1984.
- [162] D.A. Weitz, J.S. Huang, M.Y. Lin, and J. Sung. Dynamics of diffusion-limited kinetic aggregation. *Phys. Rev. Lett.*, 53:1657–1660, 1984.
- [163] L.T.T. Trinh, A.-L. Kjøniksen, K. Zhu, K. Knudsen, S. Volden, W.R. Glomm, and B. Nyström. Slow salt-induced aggregation of citrate-covered silver particles in aqueous solutions of cellulose derivatives. *Colloid Polym. Sci.*, 287:1391–1404, 2009.

- [164] M.Y. Lin, H.M. Lindsay, D.A. Weitz, R.C. Ball, R. Klein, and P. Meakin. Universality in colloid aggregation. *Nature*, 339:360–362, 1989.
- [165] R. Pamies, J.G. Hernández Cifre, V. Fernández Espín, M. Collado-González, F.G. Díaz Baños, and J. García de la Torre. Aggregation behavior of gold nanoparticles in saline aqueous media. *J. Nanopart. Res.*, 16:2376–11, 2014.
- [166] A.M. El Badawy, K.G. Scheckel, M. Suidan, and T. Tolaymat. The impact of stabilization mechanism on the aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Sci. Total Environ.*, 429:325–331, 2012.
- [167] C. Noguez. Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment. *J. Phys. Chem. C*, 111:3806–3819, 2007.
- [168] C. Noguez. Optical properties of isolated and supported metal nanoparticles. *Op. Mater.*, 27:1204–1211, 2005.
- [169] S.K. Ghosk and T. Pal. Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: From theory to applications. *Chem. Rev.*, 107:4797–4862, 2007.
- [170] K.L. Kelly, E. Coronado, L.L. Zhao, and G.C. Schatz. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *J. Phys. Chem. B*, 107:668–677, 2003.
- [171] M. Collado-González, V. Fernández Espín, M.G. Montalbán, R. Pamiés, J.G. Hernández Cifre, F.G. Díaz Baños, G. Villora, and J. García de la Torre. Aggregation behaviour of gold nanoparticles in presence of chitosan. *J. Nanopart. Res.*, 17:268–10, 2015.
- [172] H. Huang and X. Yang. Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles in the absence/presence of tripolyphosphate. *Biomacromolecules*, 5:2340–2346, 2004.
- [173] L. Wu, C. Shi, and J. Zhu. A one-pot method to prepare gold nanoparticle chains with chitosan. *J. Phys. Chem. C*, 112:319–323, 2008.
- [174] A. Regiel, S. Irusta, A. Kyziol, M. Arruebo, and J. Santamaria. Preparation and characterization of chitosan-silver nanocomposite films and their antibacterial activity against staphylococcus aureus. *Nanotechnology*, 24:1–13, 2013.

- 
- [175] S.R. Bhattarai, R. Bahadur, S. Aryal and N. Bhattarai, and S.Y. Kim. Hydrophobically modified chitosan/gold nanoparticles for DNA delivery. *J. Nanopart. Res.*, 10:151–162, 2008.
- [176] R. Prado-Gotor, G. López-Pérez, M.J. Martín, F. Cabrera-EScribano, and A. Franconetti. Use of gold nanoparticles as crosslink agent to form chitosan nanocapsules: Study of the direct interaction in aqueous solutions. *J. Inorg. Biochem.*, 135:77–85, 2014.
- [177] M. Rinaudo. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym. Sci.*, 31:603–632, 2006.
- [178] A. Domard. A perspective on 30 years research on chitin and chitosan. *Carbohydr. Polym.*, 84:696–703, 2011.
- [179] R. Pamies, S. Volden, A.-L. Kjøniksen, K. Zhu, W.R. Glomm, and B. Nyström. Adsorption of cationic hydroxyethylcellulose derivatives onto planar and curved gold surfaces. *Langmuir*, 26:15925–15932, 2010.
- [180] J. Cho, M.C. Heuzey, A. Bégin, and P.J. Carreau. Viscoelastic properties of chitosan solutions: effect of concentration and ionic strength. *J. Food Eng.*, 74:500–515, 2006.
- [181] S. Morariu, C.E. Brunchi, and M. Bercea. The behaviour of chitosan in solvents with different ionic strength. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 51:12959–12966, 2012.
- [182] G.A. Morris, J. Castile, A. Smith, G.G. Adams, and S.E. Harding. Macromolecular conformation of chitosan in dilute solution: a new global hydrodynamic approach. *Carbohydr. Polym.*, 76:616–621, 2009.
- [183] C. Schatz, C. Viton, T. Delair, C. Pichot, and A. Domard. Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution. *Biomacromolecules*, 4:641–648, 2003.
- [184] S. Popa-Nita, P. Alcouffe, C. Rochas, L. David, and A. Domard. Continuum of structural organization from chitosan solutions to derived physical forms. *Biomacromolecules*, 11:6–12, 2010.
- [185] E.V. Korchagina and O.E. Philippova. Multichain aggregates in dilute solution of associating polyelectrolyte keeping a constant size at the increase in the chain length of individual macromolecules. *Biomacromolecules*, 11:3457–3466, 2010.

- [186] D.P. Chattopadhyay and M.S. Inamdar. Aqueous behaviour of chitosan. *Int. J. Polym. Sci.*, Article ID 939536:7 pages, 2010.
- [187] A.V. Mironov, G.A. Vikhoreva, N.R. kildeeva, and S.A. Uspenskii. Reasons for unstable viscous properties of chitosan solutions in acetic acid. *Polym. Sci. Ser. B*, 49:15–17, 2007.
- [188] C. Sun, R. Qu, H. Chen, C. Ji, C. Wang, Y. Sun, and B. Wang. Degradation behavior of chitosan chains in the green synthesis of gold nanoparticles. *Carbohydr. Res.*, 343:2595–2599, 2008.
- [189] C. Sönnichsen, B.M. Reinhard, J. Liphardt, and A. Alivisatos. A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles. *Nat. Biotechnol.*, 23:741–745, 2005.
- [190] M.J. Urban, I.T. Holder, M. Schmid, V. Fernández Espín, J. García de la Torre, J.S. Hartig, and H. Cölfen. Shape analysis of DNA-Au hybrid particles by analytical ultracentrifugation. *ACS Nano*, 10:7418–7427, 2016.
- [191] C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, R.C. Mucic, and J.J. Storhoff. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 382:607–609, 1996.
- [192] Y.Y. Pinto, J.D. Le, N.C. Seeman, K. Musier-Forsyth, T.A. Taton, and R.A. Kiehl. Sequence-encoded self-assembly of multiple-nanocomponent arrays by 2D DNA scaffolding. *Nano Lett.*, 5:2399–2402, 2005.
- [193] P.W. Rothemund. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 440:297–302, 2006.
- [194] S. Sheikholeslami, Y.-W. Jun, P.K. Jain, and A.P. Alivisatos. Coupling of optical resonances in a compositionally asymmetric plasmonic nanoparticle dimer. *Nano Lett.*, 10:2655–2660, 2010.
- [195] A. Kuzyk, R. Schreiber, Z. Fan, G. Pardatscher, E.M. Roller, A. Hogege, F.C. Simmel, A.O. Govorov, and T. Liedl. DNA-based self-assembly of chiral plasmonic nanostructures with tailored optical response. *Nature*, 483:311–314, 2012.

- 
- [196] J. Zheng, P.E. Constantinou, C. Micheel, A.P. Alivisatos, R.A. Kiehl, and N.C. Seeman. Two-dimensional nanoparticle arrays show the organizational power of robust DNA motifs. *Nano Lett.*, 6:1502–1505, 2006.
- [197] M.M. Maye, M.T. Kumara, D. Nykypanchuk, W.B. Sherman, and O. Gang. Switching binary states of nanoparticle superlattices and dimer clusters by DNA strands. *Nat. Nanotechnol.*, 5:116–120, 2010.
- [198] B. Carrasco and J. García de la Torre. Hydrodynamic properties of rigid particles. Comparison of different modelling and computational procedures. *Biophys. J.*, 76:3044–3057, 1999.
- [199] J. García de la Torre, S. Navarro, M.C. López Martínez, F.G. Díaz, and J.J. López Cascales. HYDRO: a computer software for the prediction of hydrodynamic properties of macromolecules. *Biophys. J.*, 67:530–531, 1994.
- [200] J. García de la Torre, G. Del Río Echenique, and A. Ortega. Improved calculation of rotational diffusion and intrinsic viscosity of bead models for macromolecules and nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 111:955–961, 2007.
- [201] J. García de la Torre and B. Carrasco. Hydrodynamic properties of rigid macromolecules composed of ellipsoidal and cylindrical subunits. *Biopolymers*, 63:163–167, 2002.
- [202] J. García de la Torre, H.E. Pérez Sánchez, A. Ortega, J.G. Hernández Cifre, M.X. Fernandes, F.G. Díaz Baños, and M.C. López Martínez. Calculation of the solution properties of flexible macromolecules: methods and applications. *Eur. Biophys. J.*, 32:477–486, 2003.
- [203] J. García de la Torre, A. Ortega, H.E. Pérez Sánchez, and J.G. Hernández Cifre. MULTIHIDRO and MONTEHYDRO: Conformational search and Monte Carlo calculation of solution properties of rigid and flexible macromolecular models. *Biophys. Chem.*, 116:121–128, 2005.
- [204] J. García de la Torre, J.G. Hernández Cifre, A. Ortega, R. Rodríguez Schmidt, M.X. Fernandes, H. E. Pérez Sánchez, and R. Pamies. SIMUFLEX: Algorithms and tools for simulation of the conformation and dynamics of flexible molecules and nanoparticles in solution. *J. Chem. Theor. Comput.*, 5:2606–2618, 2009.

- [205] M.X. Fernandes, A. Ortega, M.C. López Martínez, and J. García de la Torre. Calculation of hydrodynamic properties of small nucleic acids from their atomic structures. *Nucleic Acids Res.*, 30:1782–1788, 2002.
- [206] S.B. Smith, Y. Cui, and C. Burtamante. Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science*, 271:795–799, 1996.
- [207] S.X. Cui, Y. Yu, and Z.B. Lin. Modeling single chain elasticity of single-stranded DNA: A comparison of three models. *Polymer*, 50:930–935, 2009.
- [208] B. Tinland, A. Pluen, J. Sturm, and G. Weill. Persistence length of single-stranded DNA. *Macromolecules*, 30:5763–5765, 1997.
- [209] V.A. Bloomfield, D.M. Crothers, and I. Tinoco, editors. *Nucleic acids: Structure, properties and function*. University Science Books, Sausalito, 1999.
- [210] E. Brookes, W. Cao, and B. Demeler. A two-dimensional spectrum analysis for sedimentation velocity experiments of mixtures with heterogeneity in molecular weight and shape. *Eur. Biophys. J.*, 39:405–414, 2010.