Contribución al estudio del efecto hidrófobo en la proteína colagénica mediante su interacción con sustancias tensioactivas

Fernando Maldonado Millán

UNIVERSITAT DE BARCELONA
DIVISIO DE CIENCIES EXPERIMENTALS
I MATEMATIQUES

FACULTAT DE QUIMICA
DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUIMICA
I METAL-LURGIA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DEL EFECTO HIDROFOBO EN LA PROTEINA COLAGENICA MEDIANTE SU INTERACCION CON SUSTANCIAS TENSIOACTIVAS

MEMORIA
que para optar al grado de
Doctor en Ciencias Químicas,
presenta

FERNANDO MALDONADO MILLAN

Barcelona, Junio de 1990

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Llegida aquesta tesi doctoral en el dia 9
d'JULIOL de 1990 a la Facultat de
Química, davant el següent Tribunal:

PRESIDENT

VOCALS

ENRIC GRATACÓS

Mª R. MARANTE

FRANCESC CENTELLAS

JAUME GRANELL

Va obtenir la qualificació de APTE "CUM LAUDE"

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se ha realizado bajo la dirección del Dr. José Costa López del Departamento de Química Técnica de la Universidad de Barcelona a quien deseo expresar mi más profunda gratitud por su inestimable apoyo y colaboración.

Mi agradecimiento al Instituto Español del Calzado, INESCOP, que ha proporcionado los medios para llevar a cabo esta Tesis Doctoral.

Reconocimiento especial merecen mis colaboradores que más directamente me han ayudado, Antonio Otero Arias y Mariano Almela Alarcón por su profesionalidad y dedicación, y Alfredo García-Espantaleón con quien iniciamos esta andadura.

A mis antiguos compañeros del CSIC pertenecientes al Instituto de Tecnología Química y Textil, departamentos de curtidos, lana y detergentes, siempre dispuestos a facilitar la información y ayuda solicitada.

Al profesor Heidemann del Departamento de Proteínas y Cuero de la Universidad de Darmstadt por su interés y consejos.

A mi amigo y antiguo colaborador Mariano Tarí Serrano por su constante estímulo y por la revisión crítica del manuscrito.

A todos los compañeros de INESCOP que han intervenido en las labores de mecanografiado y reprografía especialmente a Isabel Soler Esquembre y Pedro Pérez Ruiz.

A las firmas Pulcra-Henkel, Marchon-Surfac, Hoechst y Goldschmidt que me han facilitado muestras de tensioactivos y completa información sobre las mismas.

Asimismo, quiero agradecer a la CAM, Caja de Ahorros del Mediterráneo, las facilidades ofrecidas para realizar las búsquedas "on line" de bibliografía en su Centro de Documentación de Alicante.

El presente trabajo ha sido parcialmente subvencionado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT).

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL DE FERNANDO MALDONADO

F. MALDONADO, A. GARCÍA-ESPANTALEÓN
"Contribución al estudio de la interacción de los agentes tensioactivos con el colágeno". Parte I
XXXV Asamblea Nacional de la Asociación Química Española de la Industria del Cuero (AQEIC). Murcia 1986
Bol. Asoc. Quím. Esp. Ind. Cuero, 37, 334 (1986)
Chemical Abstracts 106, 86581g (1987)
Técnica del Calzado, n° 113, Noviembre-Diciembre 1986

F. MALDONADO, A. GARCIA-ESPANTALEON, J. COSTA-LOPEZ
"Interacción agentes tensioactivos-colágeno"
XIX Congreso de la Unión Internacional de Químicos y Técnicos del Cuero (IULTCS). Melbourne (Australia) 1987
Przeglad Skorzany 43, 227 (1988), Revista polaca

F. MALDONADO, A. OTERO, M. ALMELA, J. COSTA-LÓPEZ
"Consideraciones sobre la adsorción de tensioactivos sobre la proteína colagénica: Importancia de las interacciones hidrófobas".
Symposium AIICA/CSIC, Barcelona, Febrero 1988
Bol. Asoc. Quím. Esp. Ind. Cuero, 39, 257 (1988)
Chemical Abstracts 109, 212669u (1988)
Mecanipel n° 153, pág. 48, Mayo 1988
Das Leder, 40, 75 (1989). (R)

M. ALMELA, F. MALDONADO, A. OTERO, J. COSTA-LÓPEZ
"Adsorción de tensioactivos sobre proteína colagénica".
XIII Reunión Ibérica de Adsorción. Murcia 1988

A. OTERO, F. MALDONADO, M. ALMELA, J. COSTA-LÓPEZ
"Adsorción secuencial de tensioactivos aniónicos y no iónicos sobre proteína colagénica"
XIII Reunión Ibérica de Adsorción. Murcia 1988

F. MALDONADO, M. ALMELA, A. OTERO, J. COSTA-LÓPEZ
"Evidence for hydrophobic interactions in the surfactant adsorption on the collagenic protein".
VII Symposium Internacional sobre Tensioactivos en Solución.
Ottawa, Canadá 1988

F. MALDONADO, A. OTERO, M. ALMELA, J. COSTA-LÓPEZ
"Contribución al conocimiento de los mecanismos que rigen la interacción entre los tensioactivos y la proteína colagénica".
Symposium AIICA/AQEIC/CSIC sobre "Productos Auxiliares en Tenería", Barcelona 1989
Bol. Asoc. Quím. Esp. Ind. Cuero, 40, 199 (1989)
Chemical Abstracts 112, 120994e (1990)

F. MALDONADO, M. ALMELA, A. OTERO, J. COSTA-LÓPEZ
"Mecanismos propuestos para la interpretación de la adsorción de tensioactivos sobre proteína colagénica".
XIV Reunión Ibérica de Adsorción. Alicante Septiembre 1989

F. MALDONADO, A. OTERO, M. ALMELA, J. COSTA-LOPEZ
"Contribución al estudio de los mecanismos que regulan la afinidad de los tensioactivos por el colágeno: Importancia de las interacciones hidrófobas".
XX Congreso de la IULTCS - Filadelfia (USA), Octubre 1989
Mecanipel n° 168, p77, Octubre 1989.
Técnica del Calzado n° 132, p36, Enero-Febrero 1990.

F. MALDONADO
"Contribución al estudio del efecto hidrófobo en la proteína colagénica mediante su interacción con sustancias tensioactivas".
Tesis doctoral. Universidad de Barcelona 1990.

F. MALDONADO, A. OTERO, M. ALMELA, J. COSTA-LÓPEZ
"The study of surfactants adsorption on collagen and chrome leather".
IX Congreso de la Scientific Society of the Leather, Shoe and Allied Industries. Budapest, Octubre 1990.
Bol. Asoc. Quím. Esp. Ind. Cuero 41, 573 (1990).
Chemical Abstracts 115, 235135e (1991).
Pzreglad Skorzany 46, 260 (1991). Revista polaca.
Mecanipel International, n° 214, pág. 51, Agosto 1993

F. MALDONADO, M. ALMELA, A. OTERO, J. COSTA-LÓPEZ
"The binding of anionic and nonionic surfactants to collagen through the hydrophobic effect".
J. Protein Chem. 10, 189 (1991).
Chemical Abstracts 115, 67006t (1991).
Cuoio Pelli Mat. Concianti 68, 277 (1992)

F. MALDONADO, A. OTERO, M. ALMELA, J. COSTA-LÓPEZ
"Eine interessante Beobachtung über die gegenseitige Beeinflussung von anionischen und nichtionischen Tensiden bei der Bindung an Hautsubstanz".
Das Leder 42, 61 (1991).
Chemical Abstracts 115, 94755t (1991).

M. ALMELA, F. MALDONADO, A. OTERO, J. COSTA-LÓPEZ
"El efecto hidrófobo y su importancia en el colágeno".
Congreso de la Unión Internacional de Sociedades de Químicos y Técnicos del Cuero (IULTCS), Barcelona Septiembre 1991.

F. MALDONADO, A. OTERO, M. ALMELA, J. COSTA-LÓPEZ
"Determinación de la capacidad máxima de fijación de tensioactivos sobre el colágeno".
Congreso de la Unión Internacional de Sociedades de Químicos y Técnicos del Cuero (IULTCS), Barcelona Septiembre 1991.

A. OTERO, F. MALDONADO, M. ALMELA, J. COSTA-LÓPEZ
"Importancia de la estructura molecular de los tensioactivos en su adsorción sobre el colágeno".
Congreso de la Unión Internacional de Sociedades de Químicos y Técnicos del Cuero (IULTCS), Barcelona Septiembre 1991.

F. MALDONADO, M. ALMELA, A. OTERO, J. COSTA-LÓPEZ
"Estudio comparativo de la adsorción de tensioactivos sobre el polvo de piel sin curtir y curtida al cromo".
Congreso de la Unión Internacional de Sociedades de Químicos y Técnicos del Cuero (IULTCS), Barcelona Septiembre 1991.

M. ALMELA, F. MALDONADO, A. OTERO, J. COSTA-LÓPEZ
"The hydrophobic effect and its importance to collagen".
J. Soc. Leather Tech. Chem., 76, 157 (1992).
Chemical Abstracts 118, 215261b (1993)

F. MALDONADO, M. ALMELA, A. OTERO, J. COSTA-LÓPEZ
"Legami di tensioattivi anionici e nonionici al collagene mediante effetto idrofobico".
Cuoio Pelli Mat. Concianti 68, 277 (1992).

A Elisabeth, y

Fernando

Gonzalo

Alberto y

Diego

ÍNDICE

página

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL 3

1.1.1. Origen y primeros planteamientos 3

1.1.2. Objetivos 6

1.2. TENSIOACTIVOS 8

1.2.1. Conceptos físico-químicos 9

1.2.1.1. Estructura de las moléculas de tensioactivos 10

1.2.1.2. Micelización 10

1.2.1.3. Solubilización 13

1.2.2. Constitución química de los tensioactivos 15

1.2.3. Aplicaciones de los tensioactivos en la industria del cuero 17

1.3. COLÁGENO 22

1.3.1. Composición y conformación de las proteínas 22

1.3.1.1. Estructura primaria 24

1.3.1.2. Estructura secundaria 25

1.3.1.3. Estructura terciaria 26

1.3.1.4. Estructura cuaternaria 28

1.3.2. Composición y estructura química del colágeno 28

1.3.3. Tipos de enlace que estabilizan la estructura de las proteínas 34

1.3.3.1. Enlaces salinos o iónicos 34
1.3.3.2. Enlaces por puente de hidrógeno 38
1.3.3.3. Interacción hidrófoba 40
1.3.4. Estructura molecular del colágeno 41
1.3.5. Morfología de la fibra de colágeno 43
1.3.6. Modificación de la proteína colagénica con sales básicas de cromo (proceso de curtición) 49

1.4. INTERACCIÓN HIDRÓFOBA 55
1.4.1. Antecedentes y origen del concepto 55
1.4.2. Fundamentos termodinámicos 57
1.4.2.1. Modelo de la estructura del agua líquida 61
1.4.2.2. Disoluciones de hidrocarburos en agua 63
1.4.2.3. Propiedades termodinámicas de la interacción hidrófoba 67
1.4.3. Diferenciación y propiedades específicas 73
1.4.4. Sistemas en los que intervienen 76
1.4.4.1. Estabilización de la estructura proteica 76
A) Interacción hidrófoba entre dos cadenas laterales aisladas 79
B) Interacciones hidrófobas en las estructuras típicas de las proteínas 81
C) Interacciones entre varias cadenas laterales: Regiones hidrófobas 82
D) Características más significativas de las interacciones hidrófobas 83

1.4.4.2. Interacciones tensioactivos-proteínas 86

A) Mecanismos de interacción 87

B) Datos experimentales sobre proteínas globulares 92

C) Datos experimentales sobre proteínas colagénicas 97

1.4.4.3. Interacciones polímeros-tensioactivos 99

Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS 101

2.1. MATERIALES, PRODUCTOS QUÍMICOS Y APARATOS 103

2.1.1. Material colagénico 103

2.1.2. Tensioactivos 104

2.1.2.1. Aniónicos 104

2.1.2.2. Catiónicos 105

2.1.2.3. Anfóteros 105

2.1.3.4. No iónicos 106

2.1.3. Material curtiente 107

2.1.4. Reactivos 110

2.1.5. Disoluciones 110

2.1.5.1. Disoluciones de tensioactivos 111

2.1.5.2. Disolución de azul de metileno 111

2.1.5.3. Disolución de púrpura de bromocresol 111

2.1.5.4. Disolución de fenoltaleína 111

2.1.5.5. Disolución de fosfato disódico 111

2.1.5.6. Disolución de iodo-ioduro 111

2.1.5.7. Disolución de hidróxido sódico 112
2.1.5.8. Disolución de ácido clorhídrico 112
2.1.5.9. Disolución de indicador ácido mixto 112
2.1.5.10 Disolución de etanol 10% (v:v) 112
2.1.5.11 Disolución de ácido sulfúrico 112
2.1.6. Aparatos 113

2.2. MÉTODOS ANALÍTICOS 114
2.2.1. Caracterización del material colagénico 114
2.2.1.1. Determinación de humedad 114
2.2.1.2. Determinación del pH 114
2.2.1.3. Determinación de materias solubles en diclorometano 114
2.2.1.4. Determinación de cenizas totales sulfatadas 115
2.2.1.5. Determinación del contenido en nitrógeno 115
2.2.1.6. Determinación del contenido en óxido de cromo 115
2.2.2. Análisis de tensioactivos 115
2.2.2.1. Análisis de BHTA 116
2.2.2.2. Análisis de tensioactivos con grupo fenilo 116
2.2.2.3. Análisis de tensioactivos aniónicos 117
2.2.2.4. Análisis de tensioactivos no iónicos de cadena alifática 118
2.2.2.5. Análisis de tensioactivos anfóteros 119

2.3. PROCEDIMIENTO 120

2.3.1. Adsorción de tensioactivos 120
2.3.2. Adsorción en fusión del pH 121
2.3.3. Cinéticas de adsorción 121
2.3.4. Isotermas de adsorción 121
2.3.5. Influencia de la polaridad del medio en la adsorción 122
2.3.6. Influencia del electrolito en la adsorción 122
2.3.7. Adsorción secuencial de tensioactivos 122
2.3.8. Desorción de tensioactivos 123
2.3.9. Tratamiento curtiente 124

Capítulo 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 125

3.1. ADSORCIÓN DE TENSIOACTIVOS SOBRE COLÁGENO: GENERALIDADES 127

3.2. ADSORCIÓN DE TENSIOACTIVOS ANIÓNICOS 134
3.2.1. Cinéticas de adsorción 134
3.2.2. Isotermas de adsorción 137
3.2.3. Influencia de la polaridad del medio 142
3.2.4. Influencia de la temperatura 144
3.2.5. Influencia de la presencia de electrolitos 146

3.3. ADSORCIÓN DE TENSIOACTIVOS NO IÓNICOS 152
3.3.1. Adsorción de mezclas de tensioactivos 152
3.3.2. Adsorción secuencial de tensioactivos 157

3.4. INTERPRETACIÓN DE LA INTERACCIÓN TENSIOACTIVO COLÁGENO: MECANISMO PROPUESTO 170

3.5. EVIDENCIAS COMPLEMENTARIAS SOBRE EL EFECTO HIDRÓFOBO EN EL COLÁGENO 183

3.5.1. Comprobaciones experimentales sobre la adsorción secundaria: hidrofobicidadd 183

3.5.2. Importancia de la cadena hidrófoba en la interacción con la proteína colagénica 186

3.5.3. Influencia de la estructura molecular del tensioactivo en la adsorción sobre el colágeno 192

3.6. INFLUENCIA DE LA CURTICIÓN EN LA ADSORCIÓN 197

Capítulo 4. CONCLUSIONES 207

Capítulo 5. BIBLIOGRAFÍA 219

Capítulo 6. APÉNDICES 233

RECTAS DE CALIBRADO 235

DATOS EXPERIMENTALES 249

LISTADO DE FIGURAS 269

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL 277

CENTROS DE DOCUMENTACIÓN 299

1. INTRODUCCIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1.1. Origen y primeros planteamientos

La enorme utilización de los agentes tensioactivos en los procesos químicos de la fabricación del cuero, desde su actuación como meros productos auxiliares en las primeras fases, hasta llegar a formar parte de la composición del cuero en las operaciones posteriores de engrase, impregnación y acabado (O'Flaherty, 1962), llevaron al planteamiento de un estudio tendente a conseguir un mejor conocimiento de la reactividad o afinidad de estos productos hacia la piel.

Por otra parte resulta sorprendente el escaso número de trabajos de investigación presentes en la bibliografía sobre este tema, en concreto referidos a investigación básica sobre tensioactivos puros y polvo de piel o lámina de colágeno que no presentan problemas de accesibilidad de los productos que se estudian, aspecto este fundamental para realizar un análisis de esta índole. Únicamente aparecen publicaciones muy fragmentarias, o comentarios de tipo empírico muy generales sobre algún tensioactivo determinado.

Es preciso remontarse a la década de los años cuarenta para encontrar algunos trabajos básicos relativos a la influencia del dodecil sulfato sódico sobre la gelatina (Pankhurst, 1945-1953).

Teniendo en consideración el panorama existente, la presente investigación pretendía, en sus inicios, el estu-

dio de la adsorción de tensioactivos por el colágeno en forma de polvo de piel, en función de una serie de parámetros de los que se suponía dependiente, tales como pH, temperatura, concentraciones de adsorbato, polaridad del medio y fuerza iónica.

Los primeros resultados obtenidos evidenciaban una elevada afinidad de la proteína por determinados agentes tensioactivos, y que la interacción entre estos se producía a nivel atómico-molecular no como deposición sobre el sustrato, sino como un auténtico fenómeno de adsorción en interfase sólido-líquido, produciéndose en el mismo diversos tipos de interacciones fuertemente dependientes de las variables que a continuación se enumeran en orden a su influencia:

1. La propia naturaleza del agente tensioactivo
2. El pH del medio
3. La concentración salina y la polaridad del medio
4. La temperatura
5. La concentración del tensioactivo

A medida que se iban obteniendo nuevos resultados, y como suele ocurrir frecuentemente a lo largo de un proceso de investigación, surgían fenómenos de un interés suficiente como para merecer un estudio aparte, tal fue el caso de las interacciones de carácter hidrófobo que tendrían lugar entre la proteína y los tensioactivos, o entre éstos por sí solos.

De esta forma, los planteamientos iniciales, eminentemente prácticos, se fueron ampliando hacia un estudio más profundo y sistemático sobre el tipo y naturaleza de las interacciones que tienen lugar entre la proteína colagénica y los tensioactivos.

Asimismo, a tenor de la escasa información existente sobre el tema, incluso en la bibliografía más reciente (Bienkiewicz, 1983; Herfeld, 1987), nuestros esfuerzos se dirigieron hacia la consecución, en primer lugar, de un conocimiento más completo acerca de la interacción hidrófoba en la proteína colagénica. Un conocimiento más detallado de los mecanismos de este fenómeno nos facilitará en gran medida el camino para iniciar el estudio de aplicaciones de tipo práctico.

Los trabajos existentes en la bibliografía sobre este tema realizados en base a otras proteínas fibrosas (Sánchez-Leal, 1977 y 1983, y Parra, 1986), no resultan útiles para explicar los fenómenos observados en el colágeno, tanto desde el punto de vista de su comportamiento, como a nivel de las conclusiones alcanzadas. Esto resulta lógico, si se tiene en cuenta que aunque químicamente ambas proteínas, colágeno y queratina de la lana, poseen cierta similitud difieren en dos aspectos fundamentales: Las fibras de lana poseen morfológicamente una estructura más cerrada que las fibras colagénicas lo que puede dificultar el acceso de determinadas moléculas a su interior, y sobre todo la rigidez que confiere el puente disulfuro a las

proteínas queratínicas provoca que su comportamiento difiera notablemente del observado en el colágeno.

1.1.2.- Objetivos

Considerando la evolución registrada en los planteamientos comentados anteriormente, los objetivos propuestos en la presente Memoria pueden resumirse, desde un punto de vista cronológico, en los siguientes puntos:

1.- Estudio profundo y sistemático del comportamiento de los productos tensioactivos con el colágeno, con el fin de conseguir un mejor aprovechamiento de las características de estas sustancias dentro del proceso de curtición de pieles, incluso podría plantearse que este estudio detallado se tomase como punto de partida para el desarrollo de nuevos procedimientos curtientes.

2.- En segundo lugar, se plantea el estudio de los mecanismos que rigen estas interacciones; en este sentido los tensioactivos pueden tomarse como sustancias ideales -tal vez modelos- para el análisis del efecto hidrófobo en las proteínas, y su importancia en el colágeno, tanto para el estudio de su propia naturaleza, como en el de su interacción con la mayoría de los productos utilizados en la elaboración del cuero. Por su estructura química relativamente sencilla y definida, peso molecular no muy elevado y la posibilidad de trabajar

con productos puros, se podrían considerar a los tensioactivos como sustancias "modelo" para el estudio indicado.

Como consecuencia inmediata, esta investigación puede derivar en el desarrollo tecnológico de nuevas aplicaciones dentro del campo de los curtidos, con el objeto de conseguir mejorar las características de los productos acabados y manufacturados; por otro lado y ya con miras a estudiar el proceso de engrase de las pieles, tema central de un proyecto incluido en un programa BRITE, puede llegarse a un procedimiento de control de dicho proceso, a través de un manejo adecuado de las condiciones que determinan la afinidad del colágeno y piel curtida por los tensioactivos.

En el presente capítulo, se realiza una descripción de las características y propiedades de los materiales utilizados, es decir, agentes tensioactivos y colágeno. Además, se exponen los posibles tipos de interacción entre los diversos tensioactivos (aniónicos, catiónicos y no iónicos) con la proteína colagénica en medio acuoso, siendo objeto de particular atención el análisis de la interacción hidrófoba.

En el segundo capítulo se recogen conjuntamente la descripción del procedimiento experimental, y de los aparatos y materiales empleados. El tercer capítulo se ha dedicado a una discusión detallada de los resultados obtenidos, para pasar ya finalmente a una exposición de las principales conclusiones en el capítulo cuarto.

1.2.- TENSIOACTIVOS

El jabón es el agente de actividad superficial más antiguo desde el punto de vista práctico y económico.

Sin embargo, debido a varios de sus inconvenientes, como la falta de resistencia a las aguas duras y saladas, la inestabilidad en soluciones ácidas y otros medios químicos y su baja solubilidad, especialmente en frío, ha llevado al desarrollo y utilización de sustitutos sintéticos.

Fueron el profesor W. D. Harkin y el ingeniero J. Langmun quienes descubrieron casi simultáneamente, en el año 1917, la existencia de estas sustancias sintéticas equiparables a los jabones y dotadas así mismo de la propiedad de acumularse preferentemente en las superficies. Casi sin saberlo los propios investigadores, había nacido la Tensioactividad como ciencia. A estas sustancias se les dio el nombre de "agentes de superficie" y, más tarde el de "tensioactivos".

En Europa fueron los alemanes, quienes tras las dificultades del suministro de jabones en la Primera Guerra Mundial, empezaron a investigar en este campo y, como fruto de estos estudios, nacieron en 1925 los primeros representantes de los alquilaril sulfonatos y los butilnaftaleno sulfonatos sódicos.

Más tarde, en la década de los treinta, surgieron tensioactivos de otra naturaleza, como son los alcoholes grasos, los alcoholes grasos sulfonados, el cloruro de alquil dimetil benzilamonio (punto de partida de los tensioactivos de sales cuaternarias de amonio) y la familia de

los compuestos no iónicos, debido a la intervención del óxido de etileno. De esta manera se creó, lo que han denominado algunos autores, la Segunda Generación de Detergentes (García-Domínguez, 1986).

El descubrimiento de los "builders" (compuesto que en lo referente a la acción detersiva, añade sus propiedades particulares a las de los compuestos esenciales de una formulación de detergente) llevó a un gran desarrollo en el campo de los tensioactivos y detergentes, naciendo con ello la llamada Tercera Generación de Detergentes.

Como hemos podido comprobar, esta industria comenzó a dar sus primeros pasos hace bastante tiempo; sin embargo, el verdadero progreso se produce desde finales de la Primera Guerra mundial hasta la fecha, habiendo surgido una extensa variedad de nuevos productos, lo que ha llevado a su aplicación en numerosas industrias incluida la de la elaboración del cuero, durante los últimos 40 años.

1.2.1. Conceptos físico-químicos

Los agentes tensioactivos poseen, como característica principal, la capacidad de rebajar sensiblemente la tensión superficial del agua al estar presentes en concentraciones pequeñas. Esta propiedad les permite actuar como humectantes, detergentes, desengrasantes, dispersantes, emulsionantes, etc., y de ahí la gran utilidad en casi todos los procesos químicos de la fabricación del cuero.

1.2.1.1. Estructura de las moléculas de tensioactivos

Los tensioactivos se incluyen dentro del grupo de compuestos anfifílicos caracterizados por presentar en la misma molécula una parte hidrófoba (no polar) generalmente constituida por una cadena larga de ocho o más átomos de carbono, y una parte, hidrófila (polar) (fig. 1.1). La hidrofobicidad aumenta con el número de carbonos y disminuye con la presencia de ciclos y dobles enlaces.

Los tensioactivos presentan además la peculiaridad de formar micelas en disolución, aspecto que será determinante en sus propiedades.

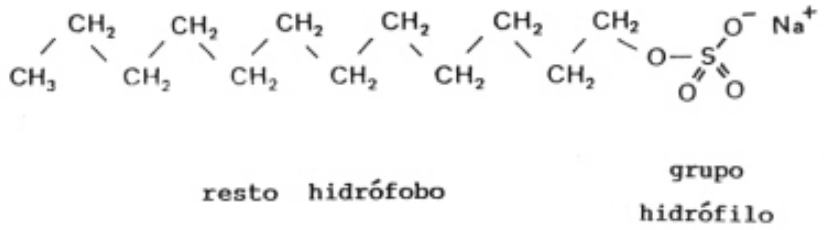


Figura 1.1.- Estructura química de una molécula de tensioactivo. En ella se muestra su parte hidrófoba y su parte hidrófila.

1.2.1.2. Micelización

Casi desde los primeros estudios de las propiedades de las soluciones de tensioactivos, se observó que la mayoría de sus propiedades eran insólitas e indicativas de la presencia de partículas coloidales en solución.

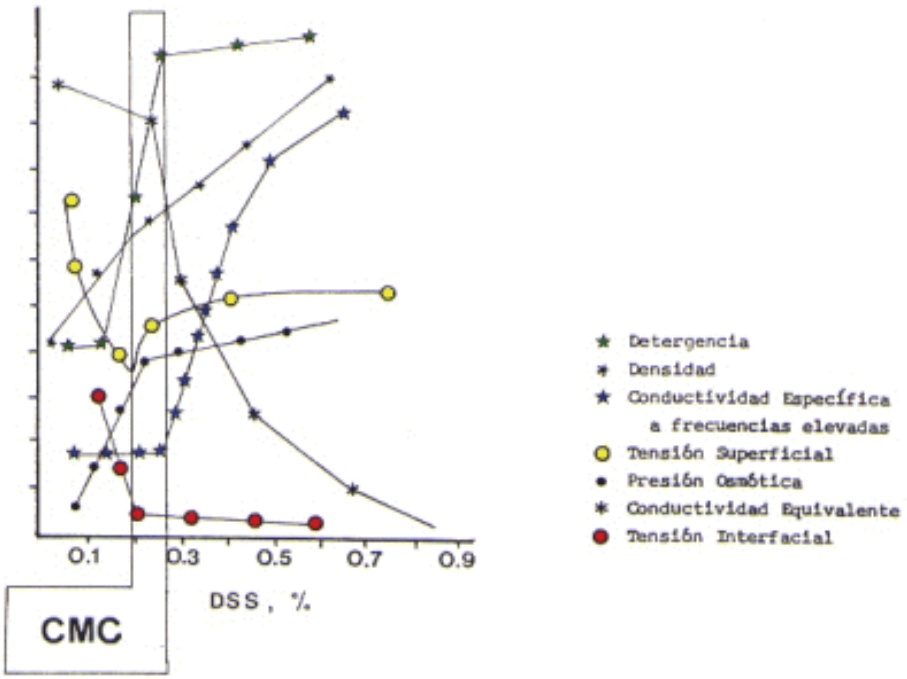


Figura 1.2.- Cambios en las propiedades físicas de una disolución acuosa de dodecil sulfato sódico (DSS), en los alrededores de la concentración micelar crítica (CMC) (Tanford, 1974).

Estudiando la evolución de algunos parámetros físico-químicos en función de su concentración, se pudo apreciar que existía un cambio brusco en el valor de los mismos para un determinado intervalo de concentración del agente tensioactivo (fig. 1.2).

La concentración a la que estos fenómenos tenían lugar fue denominada "concentración micelar crítica" (CMC), que se define como el pequeño margen de concentración por debajo del cual virtualmente no existen micelas y por encima del mismo las moléculas de tensioactivos se asocian en forma de micelas. Considerando que las micelas no presentan, en general, actividad superficial, la CMC ha sido definida asimismo como la concentración de equilibrio donde se incorpora a la química superficial la química coloidal.

Figura 1.3.- Localización en la micela de la zona de solubilización.

La formación de micelas consiste en el agrupamiento o asociación de un determinado número de moléculas de tensioactivo en forma más o menos esférica (Tanford, 1974), aunque ésta no es la única posibilidad de agrupamiento, y cuyo radio es aproximadamente igual a la longitud de la cadena hidrocarbonada hidrófoba (Tanford, 1972), situándose los grupos hidrófilos en contacto con el medio (fig. 1.3). Para los tensioactivos no iónicos polioxietilenados, la estructura es esencialmente la misma, excepto que la región exterior no contiene las "cabezas" polares, pero incluyen cadenas polioxietilenadas hidratadas.

1.2.1.3. Solubilización

Solubilización es un término introducido por McBain para describir las propiedades de los compuestos formadores de micelas al entrar en contacto con compuestos insolubles en agua.

La localización exacta, por decirlo de alguna forma, en donde ocurre la solubilización varía con la naturaleza del material a solubilizar. Si se trata de un compuesto no polar, prácticamente insoluble en agua, su solubilidad aumenta de un modo muy pronunciado cuando la concentración del agente tensioactivo sobrepasa la CMC. Ello es debido a la solubilización de dicho compuesto en el interior de las micelas, entre los grupos hidrófobos. Si el compuesto a solubilizar es de tipo anfifílico, es decir que posee grupo polar y grupo hidrófobo, puede formar lo que se denominan micelas mixtas. Por último en el caso de compuestos pola-

res, la solubilización tiene lugar en la "cabeza" de la micela, es decir, en la interfase micela-disolvente (fig. 1.4).

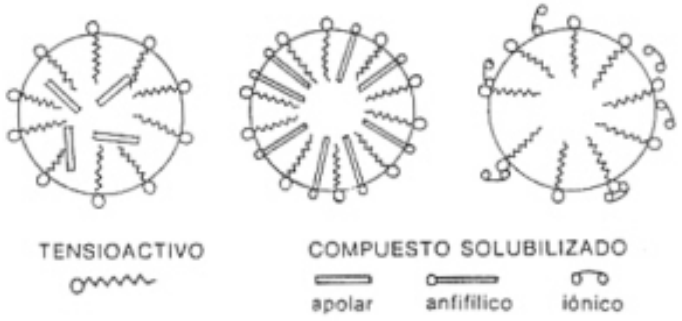


Figura 1.4.- Localización en la micela de las distintas zonas de solubilización para los diferentes compuestos: apolar, anfifílico e iónico (García-Domínguez, 1986).

Los factores que determinan la solubilidad de estos materiales son muy variados y de distintos tipos. Así, para una buena solubilización hay que tener en cuenta la naturaleza y estructura del tensioactivo y del material a solubilizar, al igual que la presencia de electrolitos, el efecto de compuestos orgánicos tanto monoméricos como poliméricos, y la temperatura. El control de todos estos factores permitirá acceder a las condiciones óptimas de solubilización de la sustancia considerada (Rosen, 1978).

1.2.2. Constitución química de los tensiaoctivos

Dependiendo de la naturaleza del grupo hidrofílico, los tensioactivos se pueden clasificar en cuatro grupos:

- Aniónicos
- Catiónicos
- No iónicos
- Anfóteros

Los tensioactivos aniónicos poseen uno o varios grupos funcionales que se ionizan en disolución acuosa originando iones con carga negativa que forman la parte activa de la molécula, responsable de la actividad superficial. En el caso de los agentes catiónicos, la parte activa de la molécula posee carga positiva. En cambio los tensioactivos no iónicos son compuestos que en disolución acuosa no originan iones, y su solubilidad en agua se debe a la presencia en su molécula de grupos funcionales (normalmente un número variable de moles de óxido de etileno) con una elevada afinidad por el medio acuoso. Por último, los tensioactivos anfóteros tienen una característica muy peculiar, y es que, dependiendo del pH de la disolución, se pueden comportar como aniónicos o como catiónicos, incluso como especies neutras en la zona del punto isoeléctrico (pH en el que la carga neta de la molécula es cero).

En la tabla 1.1. se presentan las formulaciones más típicas de los diferentes tipos de tensioactivos.

Tabla 1.1.- Ejemplos de los diferentes tipos de tensioactivos.

TENSIOACTIVOS	CARACTERISTICA DE ACTIVIDAD	FORMULACION TIPICA	
Aniónicos	Carga -	$CH_3(CH_2)_{10}CH_2-OSO_3^-Na^+$	(Alquil sulfato)
		$CH_3(CH_2)_{10}CH_2-C_6H_4-SO_3^-Na^+$	(Alquil benceno sulfonato)
Catiónicos	Carga +	$CH_3(CH_2)_{10}CH_2-N^+(CH_3)_3\ Br^-$	(Bromuro de alquiltrimetil amonio)
No iónicos	Sin carga	$CH_3(CH_2)_{10}CH_2-(OCH_2CH_2)_7-OCH_2-CH_2OH$	(Alcohol graso polioxietilenado)
Anfóteros	"Zwitterion"	$CH_3(CH_2)_{10}CH_2-NH-CH_2-CH_2-COO^-\ Na^+$	(Aminoácido graso)
		$CH_3(CH_2)_{10}CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_3-N^+(CH_3)_2-CH_2-COO^-$	(Alquil amido betaína)

1.2.3. Aplicaciones de los tensioactivos en la industria del cuero

Los productos tensioactivos se utilizan actualmente en casi todos los procesos químicos de la fabricación del cuero, desde las primeras fases del proceso hasta la tintura, es decir, remojo, desengrase y curtición, donde el tensioactivo actúa generalmente, como mero producto auxiliar que no llega a formar parte de la composición del cuero, mientras que en las posteriores operaciones de engrase, impregnación y acabado se incorpora y queda retenido en el cuero definitivamente (Filachione, 1971).

En el primer proceso en húmedo que sufre la piel, el remojo, cuya finalidad es conseguir su completa hidratación, recuperando la piel el agua perdida en el salado o secado de conservación, se utilizan tensioactivos de naturaleza no iónica, productos formados por la condensación del óxido de etileno con alcoholes grasos. Según su composición pueden presentar distintas propiedades; por una parte disminuyen la tensión superficial del agua con lo que facilitan su penetración hacia el interior de la piel y, por otro lado, son capaces de emulsionar la grasa natural de la piel (Gratacós, 1962).

En el remojo de las pieles también pueden utilizarse los tensioactivos aniónicos del tipo alcoholes grasos sulfonados, incluso los tensioactivos catiónicos se podrían utilizar en el caso de remojos ácidos, en cuyo caso se fijan poco en la piel y además presentan una cierta acción bactericida.

En la operación de desengrase de pieles con alto contenido en grasa natural, también se usan agentes tensioactivos de tipo no iónico, ya que la relación hidrofilia-lipofilia es elevada, produciéndose una mayor solubilización del tensioactivo en agua. También se pueden utilizar tensioactivos catiónicos o aniónicos (fig. 1.5), aunque estos últimos, generalmente se adsorben en grandes cantidades sobre la piel, resultando su poder emulsionante menos efectivo. Por ello, se recomiendan preferentemente los tensioactivos no iónicos y catiónicos, tanto en procesos de desengrase realizados en medio acuoso como en medio orgánico (O'Flaherty, 1956).

En la curtición al cromo se utilizan tensioactivos catiónicos y no iónicos, para eliminar grasa de la piel. Con el mismo fin se utilizan tensioactivos aniónicos en la curtición vegetal, porque además favorecen la penetración y no precipitan los extractos vegetales (Filachione, 1971).

Hasta aquí la principal aplicación de los tensioactivos ha estado centrada en su efecto humectante y detergente. Cuando se utilizan en el proceso de tintura, su misión es la de controlar la penetración del colorante, fenómeno que depende de su carga. Si se trata de conseguir penetración e igualación se utilizará un producto tensioactivo con la misma carga que el colorante, y si se desea realizar la tintura con poca penetración, se empleará un tensioactivo de carga opuesta (Otto, 1962).

A continuación, debido a la influencia que tienen los tensioactivos en el proceso de engrase y dada la impor-

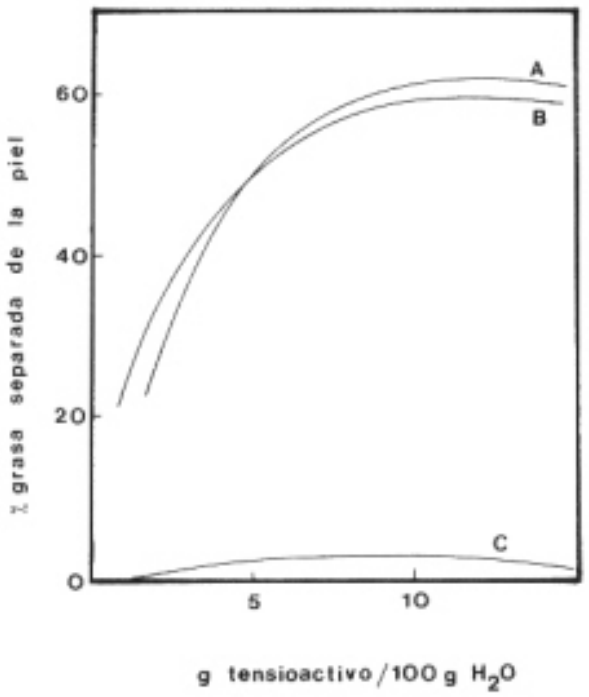


Figura 1.5.- Efecto desengrasante de los diferentes tensioactivos en solución acuosa: (A) agente no iónico, producto de condensación de una alquilfenol con óxido de etileno. (B) agente catiónico (bromuro de cetiltrimetil amonio). (C) agente aniónico (cetil sulfato sódico), (O´Flaherty, 1958).

tancia de esta operación, se ampliará algo más la descripción de la misma.

Dentro de la fabricación de curtidos es posiblemente esta operación la que influye sobre un mayor número de características de la piel acabada. El engrase tiene una influencia determinante sobre las propiedades organolépticas de los cueros, sobre sus propiedades mecánicas (desgarro, tracción, alargamiento, elasticidad de la flor, etc.), permeabilidad al aire y al vapor de agua, solidez a la luz, resistencia al sudor y a la aparición de mohos, balance hidrofilia-hidrofobia, conductividad térmica (aislamiento térmico), anclaje de la película de acabado, brillo de los antes y afelpados, aptitud a la vulcanización y al pegado en la manufactura del calzado, aparición de manchas y eflorescencias, limpieza en seco (con disolventes), lavado en húmedo (con detergentes y jabones), etc.

El engrase es un proceso no fácilmente controlable debido tanto a las características del sustrato a que se aplica como a la propia estabilidad de las emulsiones utilizadas que, generalmente, son sensibles a las variaciones del medio en que se realizan: pH, temperatura, presencia de sales y concentración, sin olvidar su propia estabilidad mecánica. Todo ello provoca en muchas ocasiones distribuciones desiguales del engrase tanto en superficie como en las diferentes capas del cuero. Otro posible inconveniente de este tratamiento radica en el hecho de la poca afinidad de la grasa neutra empleada hacia la piel, lo que da lugar a que algunas de las características indicadas en

el párrafo anterior se vean desfavorablemente afectadas. No es de extrañar, por tanto, la cuestión que planteaba el profesor Herfeld en la Conferencia Inaugural del Congreso de la I.U.L.T.C.S. celebrado en Viena en 1973: "¿Sigue siendo la clásica aplicación de los licores de engrase la forma más favorable de realización de este proceso? También esta cuestión vale la pena ser meditada" (Herfeld, 1974).

El proceso de engrase está gobernado inicialmente por la carga superficial de la piel y por las características iónicas del tensioactivo empleado como emulsionante, de manera similar a lo que sucede en los procesos de tintura según la teoría expuesta por Otto (1962).

Pero en el caso del engrase interviene también, a veces de forma predominante, la estabilidad de la emulsión frente a la acidez de la piel, temperatura, presencia de sales, etc., factores que como ya se ha dicho dificultan su control y lo convierten en un proceso sumamente empírico (Poré, 1974). Además, parece no estar muy definido el mecanismo por el que se obtiene el efecto ablandante. Mientras en algunos tratados se afirma que se consigue por recubrimiento de la fibrilla de colágeno por la grasa no combinada (Poré, 1974), en otros casos, se ha comprobado que si se extrae esta grasa no fijada, el cuero mantiene prácticamente el mismo grado de blandura (Heidemann, 1983 y Marsal, 1976).

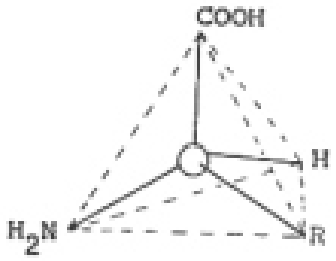
1.3.- COLÁGENO

1.3.1. Composición y conformación de las proteínas

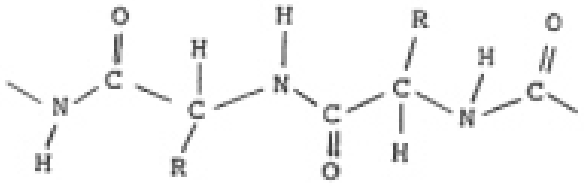
Las proteínas están constituidas por una serie de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, conocidos como α-aminoácidos (fig. 1.6a), que difieren entre sí en la estructura de sus grupos R o cadenas laterales. Estos restos o residuos aminoácidos se unen covalentemente, formando largos polímeros no ramificados, mediante uniones amida sustituidas, que se conocen con el nombre de enlaces peptídicos producidos por eliminación de agua cuando se unen el grupo carboxílico de un aminoácido y el grupo α-amino del siguiente. Estas macromoléculas, que reciben el nombre de polipéptidos (fig. 1.6b), pueden contener centenares de unidades de aminoácidos, con una composición química específica y una secuencia ordenada de sus aminoácidos.

Basándose en su composición las proteínas se dividen en dos clases principales: proteínas simples y proteínas conjugadas. Las proteínas simples son aquellas que por hidrólisis producen solamente aminoácidos. Las proteínas conjugadas son aquellas que por hidrólisis producen no solamente aminoácidos, sino también otros compuestos orgánicos o inorgánicos. La porción no aminoácida de una proteína se denomina grupo prostético.

Las proteínas se pueden clasificar en dos grupos según su forma y estructura tridimensional características: proteínas fibrosas y proteínas globulares. Las proteínas fi-



(a)



(b)

Figura 1.6.- (a) Estructura de un aminoácido. (b) Cadena polipeptídica, mostrando su enlace peptídico.

brosas, se hallan constituidas por cadenas polipeptídicas ordenadas de modo paralelo a lo largo de un eje, formando fibras o láminas alargadas. Las proteínas fibrosas constituyen los elementos básicos estructurales del tejido conjuntivo de los animales superiores, tales como el colágeno, α-queratina y elastina (Lehninger, 1984).

Las proteínas globulares están constituidas por cadenas polipeptídicas estrechamente plegadas de modo que adoptan formas esféricas o globulares compactas. La mayor parte de las proteínas globulares son solubles en sistemas acuosos y, generalmente, desempeñan una función móvil o dinámica en la célula.

Dentro de la conformación tridimensional de las proteínas, tanto fibrosas como globulares, cabe distinguir los siguientes niveles de estructura proteica:

- Estructura primaria
- Estructura secundaria
- Estructura terciaria
- Estructura cuaternaria

1.3.1.1. Estructura primaria

Se refiere al esqueleto covalente de la cadena polipeptídica, y establece de modo específico la secuencia de sus restos aminoácidos y la localización de los enlaces disulfuro, en el caso de que existan.

1.3.1.2. Estructura secundaria

Se refiere a la ordenación regular y periódica en el espacio de las cadenas polipeptídicas a lo largo de una dirección. Dicha estructura resulta de la posibilidad de formación de enlaces de hidrógeno entre el oxígeno del carbonilo y el hidrógeno del nitrógeno amídico del enlace peptídico. La estructura secundaria es sobre todo evidente en las proteínas fibrosas, en las que las cadenas polipeptídicas poseen una conformación extendida o arrollada longitudinalmente; lo mismo ocurre en segmentos de cadenas polipeptídicas de las proteínas globulares.

El estudio de las queratinas ha sido especialmente importante al revelar conformaciones que prevalecen en las cadenas polipeptídicas de las proteínas nativas, es decir, la hélice α y la conformación β, que constituyen la estructura secundaria de las proteínas.

La hélice α es la denominación que recibe la conformación regular y arrollada de las cadenas polipeptídicas alrededor y a lo largo del eje mayor. En una hélice α existen aproximadamente 3,6 restos aminoácidos por vuelta. Las cadenas laterales de los aminoácidos se proyectan hacia el exterior de la hélice, bastante compacta, formada por el esqueleto. En tal estructura la unidad repetida, que consiste en una sola hélice, se extendería cerca de 0.54 nm a lo largo del eje, en estrecha correspondencia con la periodicidad principal de 0.50 a 0.55 nm observada en el análisis por rayos X de las α-queratinas naturales. Resulta

especialmente significativo el hecho de que la ordenación α-helicoidal permite participar a cada enlace peptídico de la cadena en el establecimiento de enlaces de hidrógeno intracatenarios (fig. 1.7).

La conformación β puede obtenerse a partir de la hélice α a través de la rotura de los enlaces de hidrógeno intracatenarios, con el consiguiente alargamiento de la rígida hélice α, cuya cadena polipeptídica adopta una conformación en zig-zag, más extendida. Las cadenas polipeptídicas paralelas de la conformación están dispuestas en láminas plegadas, que se hallan unidas transversalmente por enlaces de hidrógeno intercatenarios (fig. 1.8). Todos los enlaces peptídicos participan en este enlace cruzado, y así confieren gran estabilidad a la estructura. Las cadenas laterales se sitúan por encima o por debajo de los planos en zig-zag de la lámina plegada.

1.3.1.3. Estructura terciaria

Este tipo de estructura es el resultado del repliegue de dos o más cadenas polipeptídicas, sobre sí mismas y entre sí, constituyendo una configuración espacial, perfectamente definida. Esta estructura debe su estabilidad principalmente a los enlaces o interacciones entre grupos peptídicos que se presentan tanto en la hélice α como en la conformación β (puentes de hidrógeno fundamentalmente), y además a los enlaces de hidrógeno entre otros grupos funcionales, a las interacciones hidrófobas entre grupos no

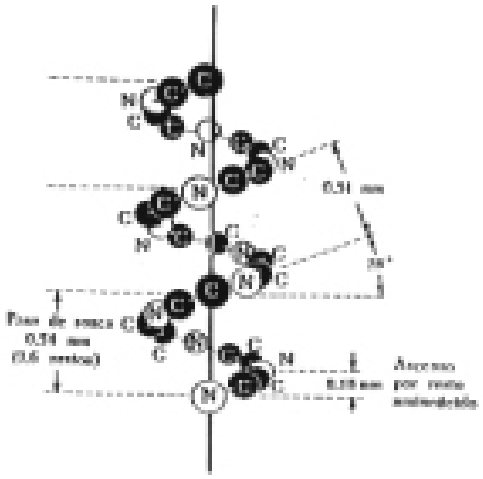


Figura 1.7.- Dimensiones medias de la hélice α . El paso de rosca y el ascenso por resto corresponden a las periodicidades mayores y menores de 0.54 y 0.15 nm, respectivamente (Pauling, 1955, vía Lehninger, 1984).

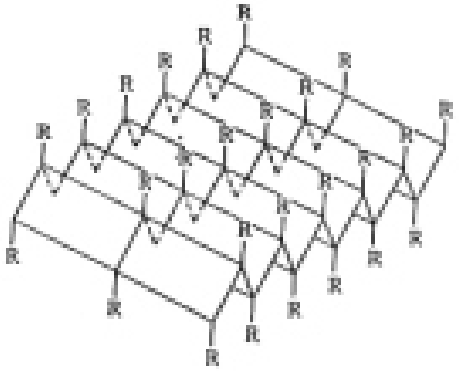


Figura 1.8.- Representación esquemática de tres cadenas paralelas en estructura β , donde aparece la disposición en lámina plegada (Bennett, 1968, vía Lehninger, 1984).

polares y a los enlaces iónicos entre grupos con cargas eléctricas de signo contrario.

1.3.1.4. Estructura cuaternaria

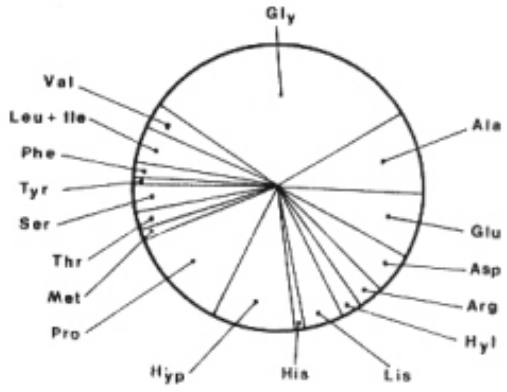
En esta estructura se pone de manifiesto la disposición espacial de las cadenas individuales polipeptídicas de una proteína, que posee más de un tipo de cadena. A este agrupamiento se le denomina oligomérico, y entre estas proteínas oligoméricas se encuentra la hemoglobina, que posee cuatro cadenas polipeptídicas, y es considerada como ejemplo de estructura cuaternaria.

1.3.2.- Composición y estructura química del colágeno

En los estudios realizados en el colágeno se ha encontrado que el 99,8% del nitrógeno total procede de los aminoácidos que lo componen, lo cual equivaldría a decir que esta proteína prácticamente sólo está constituida por unión de aminoácidos (Cassel, 1953). En la figura 1.9, se observan los aminoácidos que componen el colágeno, y cuya peculiar característica es la proporción de glicina y prolina existentes que resultan elevadas con respecto a otras proteínas. Además, el colágeno contiene dos aminoácidos muy peculiares: hidroxiprolina e hidroxilisina (Crosby, 1960). Los aminoácidos cisteína y cistina, característicos de las queratinas, y el triptófano no se presentan en la proteína colagénica (O'Flaherty, 1958).

CL no polar acíclica	CL no polar cíclica	CL con grupo hidróxilo	CL con azufre	CL con grupo carboxilo o amida.	CL con grupos básicos	Iminoácidos
glicina	fenilalanina	serina	metionina	ác. aspártico	lisina	prolina
alanina		treonina		ác. glutámico	hidroxilisina	hidroxiprolina
valina		tirosina		aspargina	arginina	
leucina				glutamina	histidina	
isoleucina						

(A)



(B)

Figura 1.9.- (A) Aminoácidos que constituyen el colágeno agrupados según la composición de la cadena lateral (CL) que presentan en la proteína. (B) Diagrama sectorial de la proporción existente de dichos aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos del colágeno es notablemente regular y periódica: uno de cada tres residuos suele ser glicina (fig. 1.10) repitiéndose con frecuencia la secuencia P-G-X-P-G-X, donde P representa la prolina o hidroxiprolina, G la glicina y X un aminoácido de los otros existentes en la proteína.

La cadena de colágeno puede considerarse como el resultado de la polimerización de tripletes de aminoácidos, ya que estos se repiten secuencialmente. La distribución de aminoácidos en el triplete Gly-X-Y en la secuencia del compuesto se muestran en la tabla 1.2 (Ramachandran, 1976). La glicina ocupa siempre la posición 1, como se requiere para la estructura de triple hélice según se vera más adelante. Las posiciones 2 y 3, generalmente no presentan una orientación hacia ningún aminoácido tan definida como en el caso de la posición 1. Para las posiciones 2 y 3, los aminoácidos generalmente muestran preferencia por una posición o la otra según el caso. También se ha demostrado (Salem y Traub, 1975) que algunas de las diferentes distribuciones están directamente relacionadas con interacciones intramoleculares que podrían estabilizar la estructura molecular.

Las protofibrillas están formadas por tres cadenas polipeptídicas en una conformación helicoidal (fig. 1.11) y los tres filamentos se unen entre sí mediante puentes de hidrógeno, donde actuarían como dadores los grupos NH peptídicos de los residuos de glicina, y los aceptores del hidrógeno serían los grupos CO peptídicos de los residuos

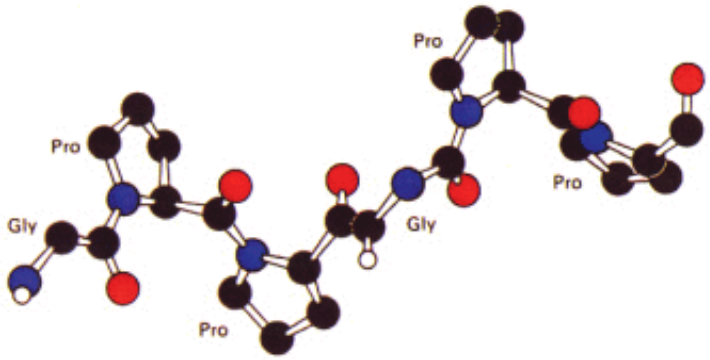


Figura 1.10.- Conformación de un solo filamento de la triple hélice del colágeno. La secuencia que se muestra es -Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro (Stryer, 1985).

Tabla 1.2.- Distribución de los aminoácidos entre las posiciones del triplete del colágeno Gly-X-Y (a) (Ramachandran, 1976).

	Posición 1	Posición 2	Posición 3	TOTAL
4-Hidroxiprolina		1 (b)	113	114
Ácido Aspártico		16	15	31
Asparagina		7	5	12
Treonina		3	13	16
Serina		17	18	35
Ácido Glutámico		41	6	47
Glutamina		8	19	27
Prolina		116	3	119
Glicina	337	1		338
Alanina		60	61	121
Valina		9	8	17
Metionina		2	5	7
Isoleucina		3	4	7
Leucina		18	1	19
Fenilalanina		12		12
Hidroxilisina			4	4
Lisina		12	20	32
Histidina		2		2
Arginina		9	42	51
TOTALES	337	337	337	1011

(a).- Partiendo de la secuencia de α1 (I) de la rata, ternero y pollo.

(b).- 3-Hidroxiprolina.

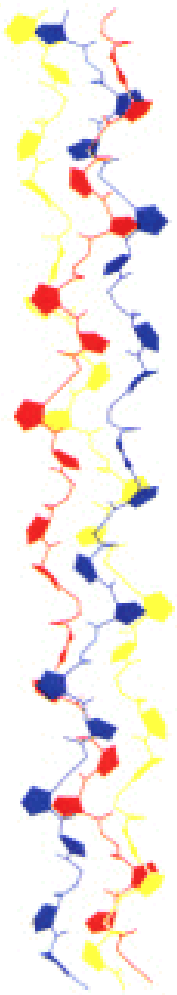


Figura 1.11.- Modelo en esqueleto de la triple hélice del colágeno. La secuencia repetitiva que se muestra es: -Gly-Pro-Pro (Stryer, 1985).

de las otras cadenas. Los grupos hidroxílicos de los residuos de hidroxiprolina y las moléculas de agua también participan en los enlaces de hidrógeno, aportando una mayor estabilidad a la triple hélice (Ramachandran, 1968).

1.3.3. Tipos de enlaces que estabilizan la estructura de las proteínas

La estructura nativa de las proteínas se encuentra estabilizada por un gran número de interacciones que contribuyen a mantener su configuración original. Las uniones salinas y los puentes de hidrógeno son los enlaces más fuertes que se forman, aunque las interacciones hidrófobas también son muy importantes en este sentido, pues a pesar de que son más débiles se producen en un gran número (Yon, 1969).

1.3.3.1. Enlaces salinos o iónicos

Es un hecho experimental sobradamente conocido la toma o cesión de iones H realizado por las proteínas cuando se sumergen en soluciones ácidas o alcalinas respectivamente. Este comportamiento anfótero nos recuerda al de los aminoácidos que las constituyen.

En el colágeno existen grupos iónicos positivos (lisina, arginina e histidina) y grupos negativos (ácidos aspartico y glutámico), que son capaces de ligarse electrostáticamente, desde cadenas polipeptídicas adyacentes, creando enlaces de carácter electrovalente (fig. 1.12).

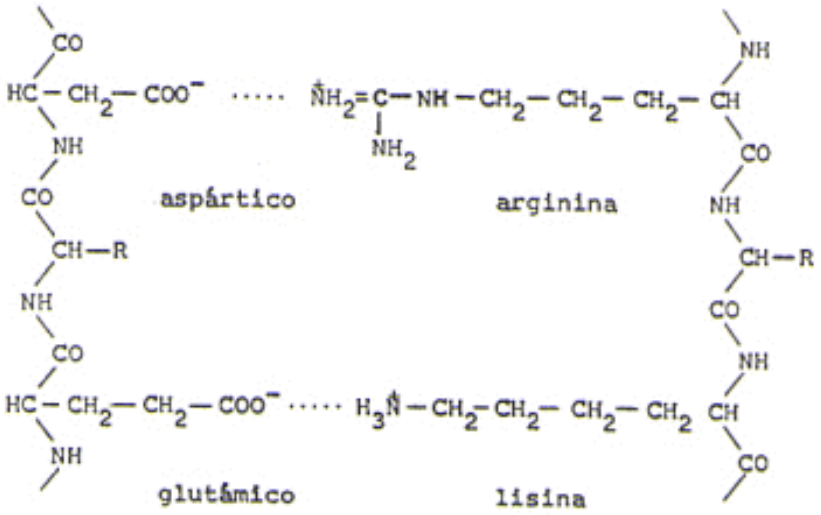


Figura 1.12.- Representación esquemática de los enlaces iónicos que tienen lugar entre los residuos de ácido aspártico y arginina, y entre los residuos de ácido glutámico y lisina.

La energía y fuerza de estos enlaces dependen de la distancia entre los grupos cargados y de las características dieléctricas del medio.

Este tipo de enlaces fueron puestos en evidencia en los trabajos de Speackman y Hirst (1931) que encontraron, que la cantidad de energía requerida para alargar las fibras de lana se reduce en soluciones ácidas, respecto al agua, y en proporción directa a la concentración del ácido.

Esto mismo ocurre en el colágeno. Este efecto se atribuye a la ruptura de los enlaces electrostáticos por descarga de los Iones carboxílicos.

Por la acción de disolventes de baja constante dieléctrica, como los alcoholes, las fuerzas dipolares se debilitan, facilitando la descarga de los grupos por el pase del protón desde el grupo catiónico al grupo aniónico. El resultado final es la creación de un enlace por puente de hidrógeno, que explicaría el sensible aumento de la temperatura de contracción, y en consecuencia estabilización de la molécula colagénica, que se observa en medio acuoso a partir de un determinado contenido en alcohol (Gustavson, 1956).

La unión iónica se puede romper por ácidos y bases o por cualquier agente que interaccione con una de las dos cadenas laterales que intervienen en su formación. Así, los ácidos descargan los grupos carboxilo, disminuyendo las fuerzas cohesivas de la proteína, y los álcalis ejercen un efecto similar por descarga de los iones amonio.

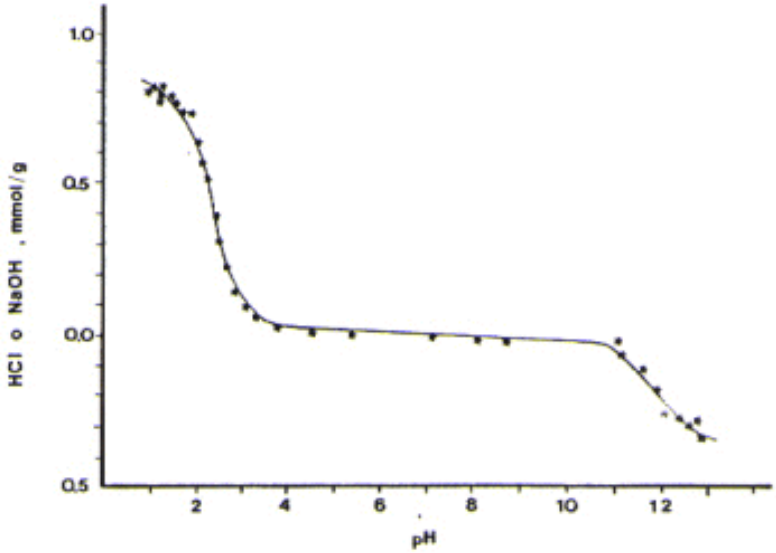


Figura 1.13.- Curva de valoración del colágeno (Bowes, 1948).

Como consecuencia del carácter anfótero que tiene el colágeno, la carga global varía con el pH del medio en que se encuentra. En disoluciones muy ácidas los grupos carboxílicos se encuentran en su forma no disociada, y la carga total es fuertemente positiva; por el contrario, en disoluciones muy básicas los grupos carboxílicos están disociados, y la carga global es negativa. En consecuencia debe existir un valor de pH intermedio donde la carga global sea nula, que se denomina punto isoeléctrico de la proteína (PI).

La representación gráfica de los miliequivalentes de ácido o base combinados por gramo de proteína en función de los valores de pH, da lugar a las llamadas "curvas de valoración de las proteínas" (Bowes, 1948) (fig. 1.13).

1.3.3.2. Enlace por puente de hidrógeno

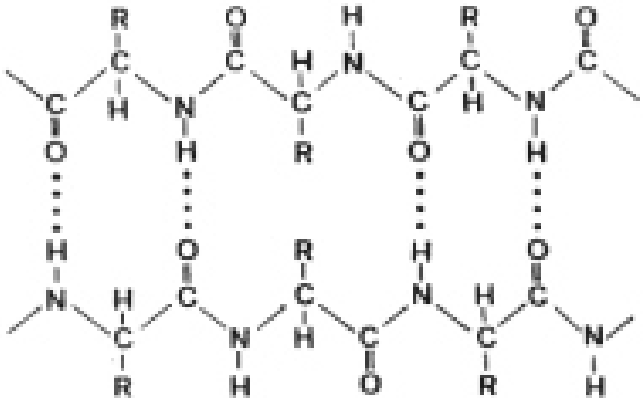
Las cadenas polipeptídicas de las moléculas proteicas se disponen espacialmente de una forma precisa, siendo fundamental la participación de los enlaces de hidrógeno en las configuraciones de estas moléculas. Los enlaces de hidrógeno N-H...O=C pueden formarse entre grupos peptídicos de las cadenas o entre las cadenas laterales de los residuos aminoácidos (Pauling, 1960).

La estabilidad estructural del colágeno se debe en un elevado porcentaje a este tipo de enlace. Individualmente su fuerza es pequeña pero al actuar simultáneamente un gran número de ellos a lo largo de las cadenas polipeptídicas confieren gran estabilidad a la estructura colagénica (Yon, 1969).

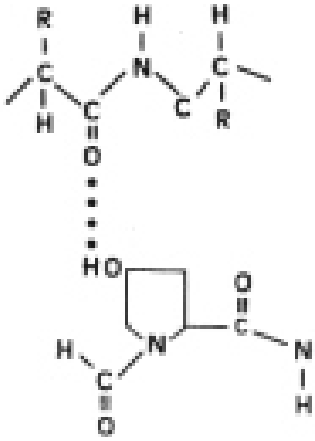
En un enlace por puente de hidrógeno, un átomo de hidrógeno queda compartido por otros dos átomos. El átomo al que está unido covalentemente el hidrógeno se denomina átomo dador, mientras que el otro átomo es el llamado aceptor de hidrógeno. Este último posee una carga negativa parcial que atrae al átomo de hidrógeno.

En el colágeno se presentan uniones de este tipo entre cadenas polipeptídicas y dentro de la misma cadena, entre el grupo amino y el grupo carboxilo (fig. 1.14a) y de manera especial entre el grupo carbonilo y el grupo hidroxilo de la hidroxiprolina (fig. 1.14b) (Gustavson, 1956).

Un importante aspecto de los enlaces por puente de hidrógeno es que son direccionales. El enlace de hidrógeno



(a)



(b)

Figura 1.14.- Enlaces por puente de hidrógeno. (a) Enlaces múltiples entre grupos carbonilo y grupos amino. (b) Enlace entre un grupo carbonilo y el grupo hidroxilo de la hidroxiprolina (Gustavson, 1956).

más fuerte es aquel en el que los átomos dador, de hidrógeno y aceptor están alineados.

De la misma manera que en el enlace iónico, el agua debilita las interacciones por puente de hidrógeno. El agua que posee una alta cohesividad conseguida precisamente por enlaces de puente hidrógeno, compite en la proteína con este enlace. Por el contrario, el medio orgánico favorecerá el enlace por puente de hidrógeno.

Se atribuye una gran importancia a la intervención del enlace de hidrógeno en la fijación de ciertas sustancias en el cuero, como los curtientes vegetales (Gustavson, 1956). Sin embargo, recientemente se ha publicado algún trabajo (Oh y co., 1980) donde se presentan evidencias de la importante participación de las interacciones de tipo hidrófobo en la adsorción de estas sustancias curtientes por la proteína colagénica.

1.3.3.3. Interacción hidrófoba

La mayoría de las proteínas, incluido el colágeno, contienen una proporción relativamente elevada de aminoácidos con cadenas laterales de naturaleza no polar. Como la interacción de estos grupos no polares con el agua es muy desfavorable, tiende a producirse, al estar favorecida termodinámicamente, la interacción entre los mismos con grupos no polares vecinos, formando el denominado enlace hidrófobo, o más correctamente interacción hidrófoba.

Por su gran aplicación al estudio de las interacciones tensioactivo-proteína el enlace hidrófobo será objeto de un particular y completo análisis más adelante (apartado 1.4).

1.3.4. Estructura molecular del colágeno

El colágeno se encuentra bien dotado para sus varias funciones estructurales y mecánicas, por ser una molécula con una conformación única en forma de triple hélice altamente ordenada, de sus propiedades de agregación y de una composición en aminoácidos inusual expresada en una secuencia cuasipolimérica. Las interacciones entre los residuos vecinos en la secuencia juegan un papel determinante en la definición de los aspectos conformacionales del colágeno.

Las características conformacionales del colágeno están propiciadas, al menos en parte, por la contribución estereoquímica de los residuos de prolina e hidroxiprolina presentes en una concentración elevada en esta proteína, y también por la presencia de glicina cada tres posiciones en la secuencia. Muchos modelos de colágeno se basan en secuencias que contienen prolina, glicina y un tercer residuo que usualmente es un aminoácido asimétrico (Rapaka y col. 1977).

Cada cadena en la triple hélice puede considerarse como constituida por tripletes iniciados en glicina o sea, que podría contemplarse como un polímero (Gly-2-3)n. En aproximadamente un cuarto de los tripletes aparecerá la prolina en segunda posición, en un quinto de estos tendría-

mos hidroxiprolina en tercera posición, y una décima parte de los tripletes serían del tipo (-GlY-Pro-Hyp-). La ubicación de estos residuos imino en relación con los residuos α-amino en un triplete afecta profundamente a las propiedades conformacionales de la secuencia (Bhatnagar y Rapaka, 1977).

El superenrollamiento de las tres cadenas peptídicas dentro de la triple hélice está facilitada por la presencia de glicina cada tres posiciones en la secuencia. Los residuos de glicina permiten el máximo acercamiento de los ejes de la triple hélice, la cual estará estabilizada por los enlaces de hidrógeno intercadenada, en los que intervienen los grupos -NH de la glicina y otros α-aminoácidos en la secuencia.

Otros factores además de los enlaces de hidrógeno juegan un papel importante en la estabilidad de la hélice de colágeno, ya que los residuos imino constituyen aproximadamente una cuarta parte del total, y carecen de grupos -NH libres por lo que no pueden participar en enlaces de hidrógeno. A diferencia de otras formas helicoidales que están estabilizadas en una amplia extensión por enlaces de hidrógeno, las hélices de colágeno deben su estabilidad conformacional a las propiedades estereoquímicas de los enlaces imino-peptídicos y a las interacciones de los anillos imino con los residuos vecinos.

En un enlace peptídico que incluye un residuo imino, el enlace N-C está formando parte de un anillo rígido de cinco miembros, y entonces no tiene ninguna libertad de

rotación. La consecuencia principal de esto es el incremento en rigidez que se produce en la vecindad inmediata de un residuo imino. Esta restricción estabiliza la conformación de la triple hélice del colágeno, de esta forma la situación de residuos imino en relación con residuos α-aminoácidos ópticamente activos en la secuencia de tripletes puede tener un profundo efecto sobre la estabilidad conformacional.

Mediante estudios sobre modelos polipeptídicos de colágeno (Bhatnagar y Rapaka, 1977) se demuestra que la presencia de residuos imino, y de glicina cada tres posiciones en la secuencia permiten la generación de triples hélices, pero la estabilidad de éstas depende de la posición del residuo α-amino en relación al residuo de prolina. También se sugiere que los agregados de triple hélice se estabilizan por enlaces de hidrógeno (-NH----O=C). Por otro lado se encuentra que las interacciones no enlazantes (de naturaleza todavía no determinada) del enlace imino-peptídico pueden jugar un papel importante en la estabilidad de la triple hélice.

1.3.5. Morfología de la fibra de colágeno

Las fibras de colágeno se dan en toda la extensión de la dermis, muy finas por el lado flor (capa hialina) y más gruesas en el córium, donde van paralelamente formando un tejido característico a modo de fieltro.

Estos haces pueden subdividirse en elementos intermedios llamados fibras, y éstas a su vez, pueden dividirse en los elementos fibrosos más pequeños observables al microscopio electrónico, denominados fibrillas (O'Flaherty, 1958 y Gratacós, 1962) (fig. 1.15).

Los haces de fibras, con un diámetro aproximado de 20 µm son los elementos de mayor tamaño de la estructura fibrosa del colágeno. Los cortes transversales de estos haces, dejan ver que poseen diferentes formas y tamaños, a diferencia de las fibras elementales cuyas secciones transversales son muy uniformes; el diámetro de estas es de aproximadamente 5 µm.

Mediante desfibración se llega a las siguientes sub-unidades, las fibrillas, que tienen un diámetro aproximado de 100 nm. A su vez las fibrillas están formadas por 700-800 protofibrillas. El estudio en el microscopio electrónico de estas fibrillas llevó a observar unas débiles estrías transversales en su eje, formadas por una sucesión de bandas alternadas claras (interbanda) y oscuras (banda). Se encontró que el intervalo de repetición es de unos 67-70 nm (fig. 1.16).

Los residuos fuertemente polares se localizan, en general, en las regiones "banda" y los residuos con cadenas laterales menos polares se sitúan en las regiones interbanda.

Las regiones que contienen predominantemente grupos laterales polares se presentan como zonas amorfas o poco ordenadas, por poseer los restos laterales más voluminosos

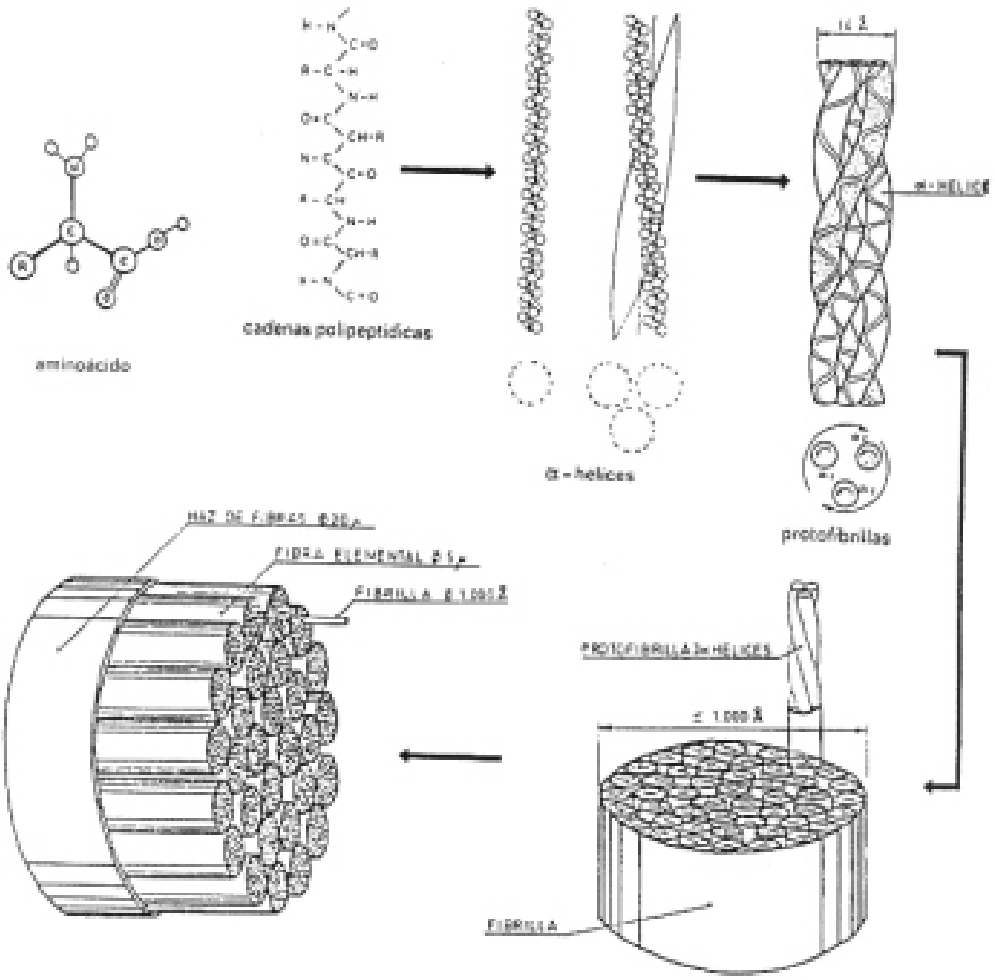


Figura 1.15.- Disposición morfológica de una fibra de colágeno a todos los niveles de organización.

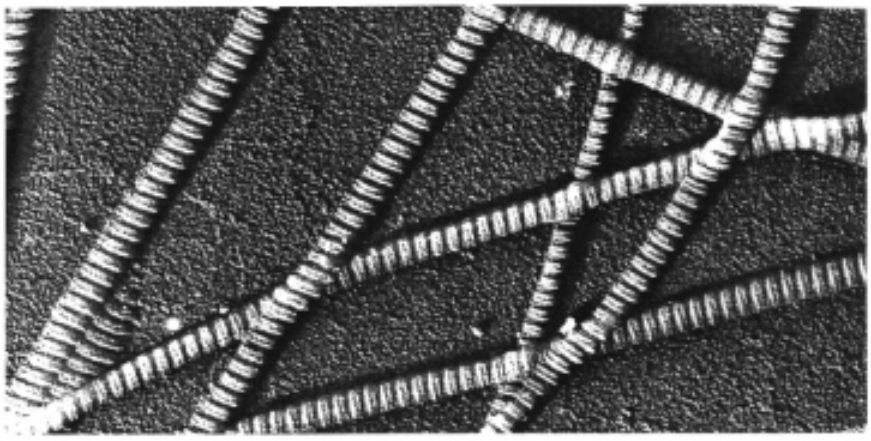


Figura 1.16.- Micrografía electrónica de fibrillas intactas de colágeno, obtenidas de la piel. La preparación fue sombreada con cromo. El período a lo largo del eje de la fibrilla es de 64 nm. (Stryer, 1985).

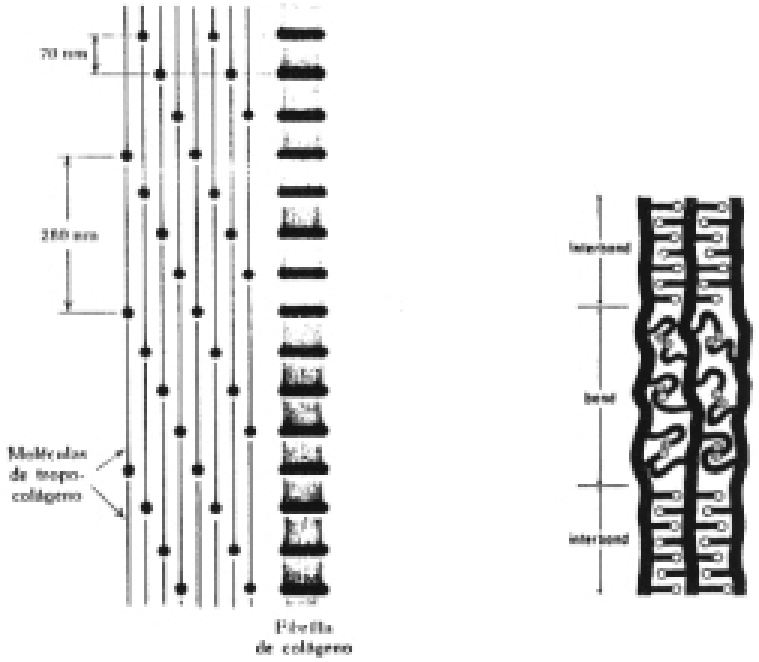


Figura 1.17.- (a) Esquema de una fibrilla, donde se muestra su estriación y alineación alternada (Lehninger, 1984). (b) Esquema de una protofibrilla mostrando el posible origen de las bandas e interbandas (Bear, 1952).

y más fuertemente polares. La reacción de estos grupos polares con determinados reactivos origina la coloración oscura característica de las bandas observadas en el microscopio electrónico. Las zonas donde predominan los grupos no polares o débilmente polares que generalmente poseen cadenas laterales más cortas, corresponden a las interbandas de color claro (fig. 1.17).

La protofibrilla está formada por tres cadenas polipeptídicas en forma de hélices α, las cuales contienen aproximadamente 1000 aminoácidos por cadena. Estas tres cadenas se enrollan entre sí, con 22 giros por molécula, para formar la triple hélice, característica de la molécula de colágeno.

La molécula de colágeno tiene una longitud y un diámetro aproximado de 300 y 1,4 nm respectivamente; sus tres cadenas están unidas entre sí por uniones químicas estables de tipo éster y por enlaces tipo puente de hidrógeno entre un átomo de hidrógeno de una cadena con un átomo de oxígeno de otra cadena vecina (Stryer, 1985).

1.3.6. Modificación de la proteína colagénica con sales básicas de cromo (proceso de curtición)

El proceso de curtición involucra la reacción del colágeno con sustancias (agentes curtientes) que confieren a la piel en bruto una serie de características como son, resistencia a microorganismos, resistencia hidrotérmica, resistencia enzimática, etc. Esta mejora general de propiedades constituye el primer paso importante para conseguir la transformación de la piel en un material de utilidad práctica.

La curtición implica un proceso de estabilización de la proteína colagénica de la piel, gracias a la formación de enlaces transversales (reticulación) entre grupos reactivos de residuos aminoácidos de cadenas vecinas del colágeno.

Según sea la naturaleza del producto curtiente su fijación en la proteína tiene lugar de acuerdo con alguno de los siguientes mecanismos de enlace o interacción:

1) enlace covalente, que se presenta en la curtición con aldehídos que reaccionan con los grupos aminos libres de las cadenas laterales del colágeno.
2) enlace covalente coordinado, que se presenta en las denominadas curticiones inorgánicas o minerales con sales de cromo, aluminio, circonio, etc., que se fijan preferentemente en los grupos carboxilos libres de la proteína.

puede acomodar hasta un máximo de seis ligandos (valencias secundarias). Si el ligando es un anión reducirá en una unidad la carga positiva del complejo y satisfará al mismo tiempo una valencia primaria y una valencia secundaria del átomo de cromo.

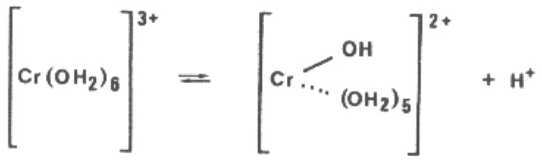
En orden de menor a mayor estabilidad del enlace coordinado los ligandos que pueden acceder a la esfera de coordinación del cromo son los siguientes:

1. Moléculas de agua (grupos aquo, aq)
2. Restos ácidos (grupos sulfato y carboxilatos)
3. Grupos hidroxilo

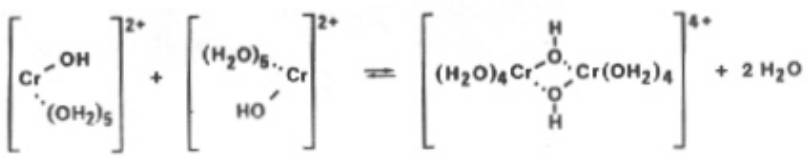
A gran dilución y en frío las sales de cromo (III) presentan seis ligandos aquo en el complejo de cromo:

$$[Cr\ (OH_2)_6]^{3+}$$

En este complejo la unión (coordinación) de la molécula de agua al átomo de cromo tiene lugar por medio del átomo de oxígeno, que suministra los dos electrones que son compartidos entre el grupo aquo y el cromo. Según esto el átomo de oxígeno adquiere una cierta carga positiva que facilitará la liberación de un protón de la molécula de agua (protólisis):



El hidroxi compuesto que se forma se estabiliza por el denominado proceso de olación (Gustavson, 1956), que consiste en la formación de un doble enlace coordinado entre dos átomos de cromo, a través de los grupos hidroxilo (enlace ol):



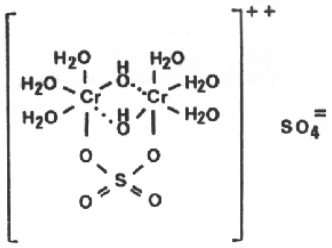
De acuerdo con la ecuación de la protólisis del catión hexaquocromo, se deduce que la adición de álcali a la solución desplazará el equilibrio hacia la derecha, ocasionando en consecuencia la formación de mayor número de complejos binucleados.

Si se prosigue la alcalinización se llegarán a formar compuestos con mayor número de átomos de cromo en la molécula porque varios átomos estarán unidos por los enlaces ol (OH). El punto final de este proceso se alcanza cuando los grandes complejos no pueden ser acomodados por el solvente, teniendo lugar la precipitación de los compuestos de cromo insolubles.

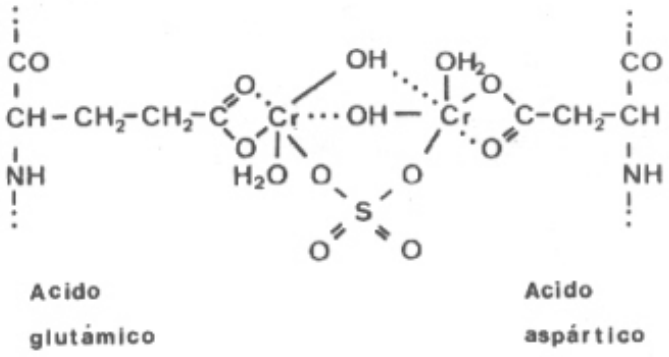
El porcentaje de valencias primarias del cromo en solución satisfechas por grupos hidroxilo se denomina grado de basicidad de la solución curtiente. Las sales de cromo utilizadas habitualmente en la curtición poseen basicidades comprendidas entre el 33 y el 40%.

Las sales de cromo más importantes con propiedades curtientes son los sulfatos y cloruros básicos, aunque industrialmente sólo se utilizan los sulfatos básicos de cromo por su mayor poder estabilizante del colágeno.

Se ha comprobado que en los sulfatos básicos de cromo siempre se encuentra presente el grupo sulfato en la esfera de coordinación del cromo, que confiere un efecto óptimo a la facultad coordinadora del átomo de cromo, según se deduce del poder curtiente de sus complejos (Gustavson, 1962). Además se ha podido demostrar que las soluciones de cromo curtientes, diluidas y moderadamente concentradas, están formadas mayoritariamente por complejo binucleados del tipo siguiente:



Este complejo de cromo binucleado se coordina con los grupos carboxílicos de las cadenas laterales de los residuos de ácido aspártico y ácido glutámico, dando lugar a cierto número de enlaces intercadenas en la proteína, que son los principales responsables de la acción curtiente y en definitiva del proceso de estabilización de la estructura colagénica:



Resumiendo se puede decir que el excelente poder curtiente de las sales básicas de cromo, se debe principalmente a la conjunción de dos factores:

1) la fuerte unión por enlace coordinado que se establece entre el átomo de cromo del complejo curtiente y los grupos carboxílicos de la proteína, y
2) la formación de complejos polinucleados, relativamente estables, y con tamaño adecuado para formar los enlaces intercadenas con el colágeno.

1.4.- INTERACCIÓN HIDRÓFOBA

1.4.1. Antecedentes y origen del concepto

El verdadero origen del efecto hidrófobo fue entendido de una forma intuitiva por Traube (1891) sobre la base de los fenómenos de actividad superficial de moléculas de hidrocarburos con grupos polares en disolución acuosa, provocados por la diferencia de afinidades entre las moléculas con cadenas hidrocarbonadas y el agua.

El concepto de interacción hidrófoba, fue originalmente introducido por Kauzmann (1959) cuando estudiaba los procesos de desnaturalización de las proteínas, al considerar la naturaleza y características de los enlaces intramoleculares que estabilizan la forma nativa de la proteína.

La interacción hidrófoba actuaba de forma conjunta con otros factores tales como las fuerzas de van der Waals, uniones por puente de hidrógeno y enlaces electrostáticos. Dicha interacción se incluyó como un factor adicional en procesos complejos tales como las uniones enzima-sustrato, formación de multisubunidades enzimáticas, formación de membranas biológicas y organización de moléculas que forman parte de unidades funcionales dentro de un ser vivo.

Se considera que se produce una interacción hidrófoba cuando dos o más grupos no polares entran en contacto, disminuyendo consecuentemente sus interacciones con las moléculas de agua circundantes. De hecho, la atracción entre grupos no polares -tales como las cadenas hidrocarbonadas- juega un papel minoritario en el efecto hidrófobo.

Dicho efecto se produce primariamente a consecuencia de las alteraciones que se pueden producir en la estructura del agua líquida cuando cualquier soluto se disuelve en ella. Si el soluto es iónico o fuertemente polar, puede formar enlaces fuertes con las moléculas de agua que compensan sobradamente la distorsión producida en el agua pura, y de ahí que estas sustancias tiendan a ser fácilmente solubles en el agua. Tal compensación no se produce con grupos no polares, y su disolución en el agua es por tanto dificultosa. Resulta lógico suponer que los cambios que se producen en la estructura de las moléculas de agua circundantes a los grupos no polares deben jugar un importante papel en la formación del enlace hidrófobo y en la determinación de los cambios de energía libre que tienen lugar en el proceso.

La interacción de los grupos no polares con el agua es desfavorable, así que, existe una tendencia termodinámica en éstos grupos no polares para interaccionar los unos con los otros -disminuyendo consecuentemente sus interacciones con el agua- en lugar de mantenerse distanciados entre ellos. Las alteraciones producidas en la estructura del agua líquida inicialmente sugeridas por Hartley, 1936, y Frank y Evans, 1945, ha sido posteriormente utilizada para interpretar el efecto hidrófobo (Kauzmann, 1959; Nemethy y Scheraga, 1962a).

Existe otro grupo de autores (van Oss, 1980; Giles, 1982; Privalov, 1989) que basándose en razonamientos termodinámicos aplicados al comportamiento de solutos o restos apolares en medio acuoso, llegan a la conclusión de que el

denominado efecto hidrófobo no puede ser considerado como un nuevo tipo de enlace en sentido estricto, sino más bien como una interacción de van der Waals (van Oss, 1980), o incluso como el resultado de combinar interacciones de van der Waals con efectos de hidratación (Privalov, 1989), aunque como reconoce este último autor, dicho razonamiento supone una vuelta a los planteamientos de la segunda década de este siglo en los que se consideraba a la interacción hidrófoba entre solutos apolares como una atracción de semejante a semejante.

1.4.2. Fundamentos termodinámicos

Desde un punto de vista termodinámico el proceso de interacción hidrófoba podría visualizarse como sigue (fig. 1.18): considerar dos esferas simples representativas de moléculas del soluto S en cualquier disolvente -que puede ser un componente puro o una mezcla de cualquier número de componentes-. En un primer momento los dos solutos se sitúan en posiciones fijas R_1 y R_2 pero a una separación infinita:

$$\mathbf{R}_{12} = |\mathbf{R}_2 - \mathbf{R}_1| = \infty \qquad (1.1)$$

-por infinito se entiende que R_{12} es tan grande que no existe posibilidad de interacción entre las dos moléculas-.

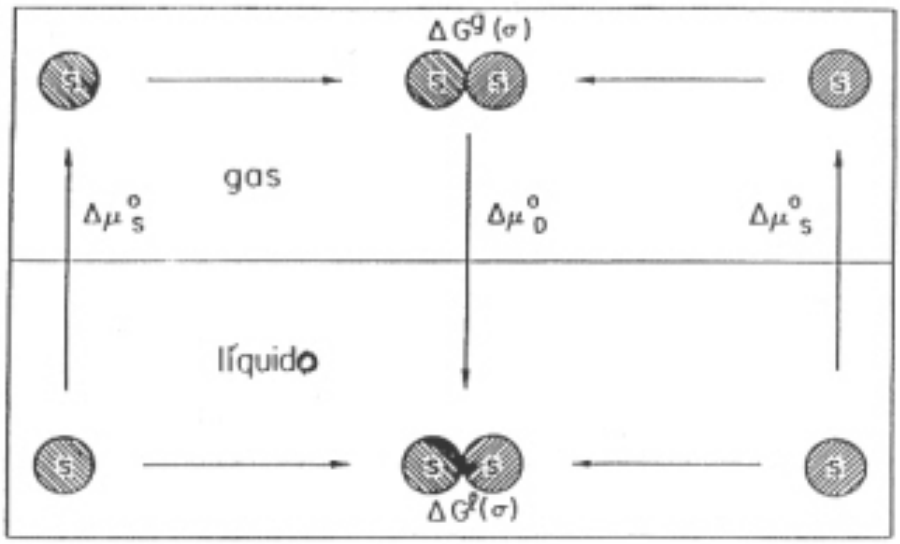


Figura 1.18.- Proceso cíclico correspondiente a la ecuación (1.3). Dos solutos S se llevan desde separación infinita a una pequeña distancia σ dentro del líquido. El correspondiente cambio de energía libre es $\Delta G^{\ell}(\sigma)$. La segunda ruta consta de una primera transferencia a la fase gaseosa de los dos solutos, luego se llevan desde separación infinita a la separación σ, y finalmente el "dímero" pasa de fase gas a fase líquida (Ben-Naim, 1980).

A partir de este estado inicial los dos solutos se aproximan hasta una distancia entre ellos $R_{12} = \sigma$, siendo σ el diámetro de las moléculas de soluto. El proceso se lleva a cabo dentro del disolvente, manteniendo constantes la presión y la temperatura. El cambio de energía libre correspondiente a este proceso sería el siguiente:

$$\Delta G\ (\infty - \sigma) = G\ (T,P,disolv.,\ R_{12} = \sigma) - G\ (T,P,disolv.,\ R_{12} = \infty) \qquad (1.2)$$

donde $\Delta G\ (\infty - \sigma)$ se expresa explícitamente como diferencia entre la energía libre de los estados inicial y final.

La relación anterior puede expresarse en términos de magnitudes experimentales medibles, haciendo uso de un ciclo en el que el proceso de la interacción hidrófoba se supone que tiene lugar mediante el paso de los dos solutos de la fase líquida a la fase gaseosa, luego se llevan a la distancia $R_{12} = \sigma$ en la fase gaseosa, y posteriormente el "dímero" formado se lleva a la fase líquida (Ben-Naim, 1980) (fig. 1.18).

Como el cambio de energía libre a lo largo de las dos rutas del sistema debe ser la misma, tenemos la expresión siguiente para la variación de energía libre:

$$\Delta G\ (\sigma) = \Delta\bar{\mu}_D - 2\Delta\bar{\mu}_S + U_{SS}\ (R_{12} = \sigma) \qquad (1.3)$$

donde $\Delta\bar{\mu}_S$ es la energía libre estándar generalizada de solubilización de S, $\Delta\bar{\mu}_D$ tiene el mismo significado que cuando el "dímero" se contempla como una entidad molecular

simple y U_{SS} ($R_{12} = \sigma$) es el potencial intermolecular directo para las moléculas del soluto a la separación indicada $R_{12} = \sigma$.

Un caso límite particular de la expresión 1.3, que puede ser de mayor utilidad para el cálculo de las magnitudes termodinámicas involucradas, tiene lugar cuando la densidad de S (o concentración) en el disolvente es muy pequeña. Desde un punto de vista formal se pueden considerar únicamente dos moléculas de S en el disolvente, en cuyo caso la expresión 1.3 podría ponerse como sigue:

$$\Delta G\ (\sigma) = \Delta\mu_D^\circ - 2\Delta\mu_S^\circ + U_{SS}\ (R_{12} = \sigma) \qquad (1.4)$$

en la que se han empleado las energías libres estándar de disolución convencionales del soluto monómero S y el "dímero" D, o sea, $\Delta\mu_D^\bullet$ y $\Delta\mu_S^\bullet$, que son independientes de la concentración de S.

Una vez que se ha definido la interacción hidrófoba como un proceso fuertemente dependiente del medio -disolvente- y teniendo en cuenta que en la práctica este fenómeno únicamente se produce en medio acuoso, podemos de una forma sistemática aproximarnos al entendimiento del mismo a través del análisis de sistemas tales como las disoluciones acuosas diluidas de hidrocarburos, planteando previamente un modelo de la estructura de la molécula de agua que nos permita seguir al menos de una forma semicuantitativa las modificaciones que van a tener lugar.

1.4.2.1. Modelo de la estructura del agua líquida

Una molécula de agua puede participar en cuatro enlaces de hidrógeno, dos de los cuales incluyen los dos hidrógenos de la molécula, y los otros dos tienen lugar entre el par de electrones del oxígeno y los hidrógenos de moléculas vecinas.

Existen más de doce modelos propuestos para interpretar la estructura del agua líquida, quizás los más simples sean los que suponen distorsiones de los enlaces de hidrógeno (Pople, 1951; Bernal, 1964; Eisenberg, 1969) o los que consideran que se producen verdaderas roturas de estos enlaces (Nemethy y Scheraga, 1962a). Realmente es difícil llegar a una cuantificación precisa en estos modelos, por lo que se tratará de dar una visión general del fenómeno basándose en el planteamiento de Nemethy y Scheraga, que resulta ser el más simple de todos ellos.

Este modelo supone la formación de "clusters" de moléculas de agua unidas por puentes de hidrógeno a semejanza de pequeños polímeros de vida corta. Estos "clusters" se formarán y desaparecerán como consecuencia de fluctuaciones locales de energía, y estarán en equilibrio con las moléculas de agua monoméricas -no enlazadas- que no participan en enlaces de hidrógeno pero sí pueden actuar como dipolos interviniendo en interacciones del tipo de London con las moléculas vecinas.

A una temperatura dada, el número total de enlaces de hidrógeno existentes en el líquido, y el equilibrio entre clusters y moléculas aisladas está determinado por el re-

querimiento de que la energía libre del sistema tienda a un mínimo.

La naturaleza cooperativa del enlace de hidrógeno, determina que los clusters sean "compactos" y estén formados por tantas moléculas tetracoordinadas como sea posible. Teniendo en cuenta estas consideraciones, las moléculas de agua por ellas mismas pueden clasificarse en cinco clases según el número de enlaces de hidrógeno en que toman parte, es decir, 4, 3, 2, 1 ó ninguno, correspondiendo a cada una de ellas un nivel energético, quedando entonces una configuración sobre la estructura y distribución específica de las moléculas de agua como se indica en la fig. 1.19.

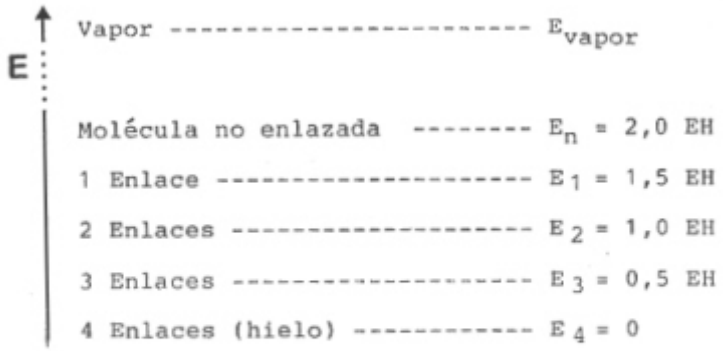


Figura 1.19.- Niveles energéticos en el agua líquida.

Más allá de los resultados obtenidos para el agua pura, la importancia de este modelo reside en su aplicación para analizar las propiedades de disoluciones de sustancias no polares en agua.

Recientemente Ben-Naim (1980) ha propuesto un método cuantitativo para definir la estructura del agua -nivel de ordenamiento de la estructura- basándose en la función de potencial de las moléculas de agua. Siguiendo este procedimiento se pueden dar valores para el grado de estructuración del agua líquida, determinando así los cambios que puedan producirse en la misma. En definitiva los resultados obtenidos de esta forma han sido muy útiles para confirmar las conclusiones cualitativas a las que se llega aplicando modelos más sencillos como el de Nemethy y Scheraga.

Nemethy y Scheraga (1962b) también han propuesto una extensión de su modelo para el agua pura, al caso de las disoluciones de hidrocarburos, cuyos planteamientos básicos se presentan a continuación.

1.4.2.2. Disoluciones de hidrocarburos en agua

El modelo propuesto para la estructura de las disoluciones acuosas de hidrocarburos es similar al caso del agua pura. La principal diferencia, en lo que a las moléculas de agua se refiere, es que los niveles de energía y de ahí la distribución de moléculas de agua en la capa próxima al hidrocarburo, cambian debido a las diferentes interacciones entre las moléculas de agua e hidrocarburo.

La suposición básica del modelo consiste en el requerimiento de que la probabilidad de encontrar un "cluster" sea algo mayor cerca de las moléculas del soluto -hidrocarburo- que en un punto del seno de la fase de agua pura. Así

que las moléculas del soluto estarán rodeadas por cadenas de moléculas de agua mayoritariamente enlazadas por puentes de hidrógeno.

Una molécula de agua con sus cuatro vecinas enlazadas por puentes de hidrógeno, puede tener además una molécula de soluto lo suficientemente próxima como para interaccionar con ella. Esta situación es comparable al caso de una molécula de agua en la estructura del hielo que además de sus cuatro uniones por puente de hidrógeno, tenga moléculas de soluto ocupando las cavidades como vecinos más próximos; éste es el caso de los llamados gases hidratos, que son complejos cristalinos del agua con moléculas no polares de pequeño tamaño formados cuando el agua cristaliza en presencia de tales sustancias (Eisenberg, 1969).

En el caso de las moléculas de agua tetraenlazadas, las interacciones de van der Waals entre el soluto y las moléculas de agua disminuyen su energía. De ahí que el nivel de energía de la molécula en estas condiciones sea inferior con respecto al caso del agua pura. Por otro lado, una molécula monomérica -no enlazada- que ya tiene de por sí un alto número de coordinación en agua pura, puede interaccionar con una molécula de hidrocarburo, sólo si ésta reemplaza a alguna de sus moléculas de agua vecinas; y este proceso supondría la sustitución de una interacción fuerte dipolo-dipolo -entre moléculas de agua- por otra mucho más débil entre el agua y el soluto dominada por fuerzas de dispersión. Como consecuencia la energía de estas moléculas aumenta con respecto a su valor en el agua

pura; algo similar, pero progresivamente en menor medida, sucede con las moléculas que poseen de 1 a 3 enlaces de hidrógeno. Esta situación se encuentra representada en el esquema de la figura 1.20.

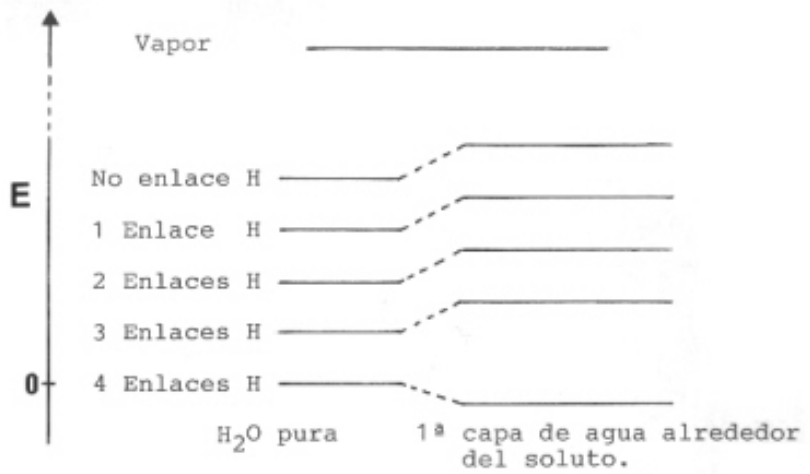


Fig. 1.20.- Niveles energéticos en disoluciones diluidas de hidrocarburos en agua.

Conviene insistir en el hecho de que estos cambios en los niveles energéticos tienen lugar únicamente en las moléculas de agua situadas en la primera capa alrededor del hidrocarburo.

Estos cambios de energía provocarán una transición global de moléculas de agua desde los niveles superiores hacia los inferiores de acuerdo con la ley de distribución de Boltzmann.

Cualitativamente, esto se corresponde con un incremento del número total de moléculas de agua tetraenlazadas, próximas a la superficie del hidrocarburo, constituyéndose alrededor de éste una especie de envolvente parcial cuya

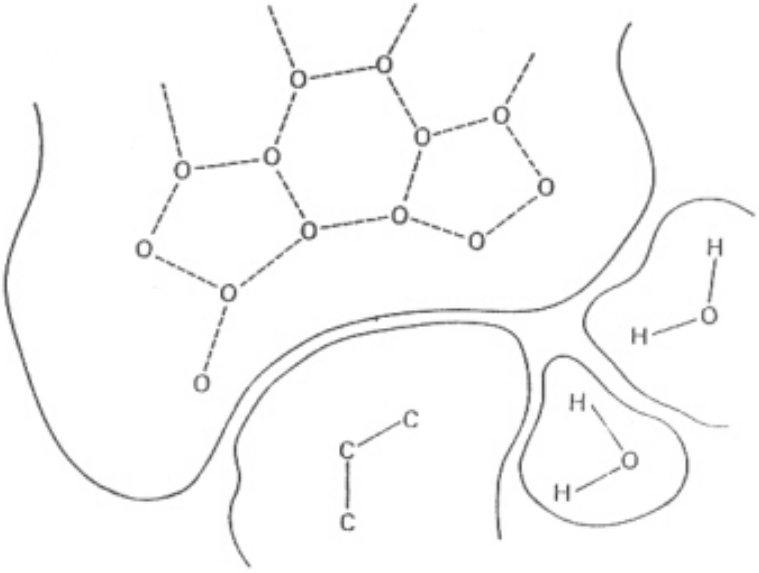


Figura 1.21.- Estructura del agua en la envolvente parcial de un hidrocarburo (Nemethy y Scheraga, 1962b).

extensión depende tanto del tamaño de la molécula de soluto, que determina el número total de moléculas de agua en la primera capa alrededor del soluto, como de la temperatura que gobierna la distribución de moléculas sobre los distintos niveles de energía. En la figura se presenta una visión esquemática de esta envolvente parcial (fig. 1.21).

1.4.2.3. Propiedades termodinámicas de la interacción hidrófoba

El efecto de la temperatura sobre la energía libre de cualquier proceso permite determinar por separado las contribuciones de la energía -o entalpía-, y la entropía, a la misma.

Suponiendo la interacción hidrófoba propiamente dicha, la relación entre la variación de energía libre (μ°_{HC} - μ°_{W}) y las correspondientes entropías y entalpías molares parciales es:

$$\mu^{\circ}_{HC} - \mu^{\circ}_{W} = (\bar{H}^{\circ}_{HC} - \bar{H}^{\circ}_{W}) - T\ (\bar{S}^{\circ}_{HC} - \bar{S}^{\circ}_{W}) \qquad (1.5)$$

indicando los subíndices HC y W respectivamente que las propiedades se refieren al soluto en el hidrocarburo y en el agua.

Determinando la diferencia de energía libre como una función de la temperatura, pueden evaluarse por separado todas las contribuciones, así tenemos:

$$\frac{d\ [(\mu^{\circ}_{HC} - \mu^{\circ}_{W})/T]}{d\ (1/T)} = \bar{H}^{\circ}_{HC} - \bar{H}^{\circ}_{W} \qquad (1.6)$$

La diferencia de entalpías puede determinarse directamente usando la técnica calorimétrica; y por diferencia con la ecuación (1.5) se obtiene la variación entrópica.

Como los datos disponibles corresponden al proceso de disolución de un hidrocarburo en agua, será conveniente

considerar las funciones termodinámicas cuando se aplican al proceso opuesto o sea, μ°_{W} - μ°_{HC}, $\bar{H}^{\circ}_{W}$ - $\bar{H}^{\circ}_{HC}$ y $\bar{S}^{\circ}_{W}$ - $\bar{S}^{\circ}_{HC}$; para de esta forma aproximarnos al análisis de la interacción hidrófoba.

Cuando se analizan los efectos de la temperatura sobre la disolución acuosa de hidrocarburos nos encontramos con dos efectos principales:

1.- La solubilidad de los hidrocarburos disminuye cuando aumenta la temperatura y $\bar{H}^{\circ}_{W}$ - $\bar{H}^{\circ}_{HC}$ es además negativa en el caso de alifáticos, y ligeramente negativa en aromáticos.

2.- La variación de entalpía es fuertemente dependiente de la temperatura, lo que indica que un gran cambio en capacidad calorífica acompaña al proceso:

$$\frac{d(\bar{H}^{\circ}_{W} - \bar{H}^{\circ}_{HC})}{dT} = (\bar{C}^{\circ}_{P})_{W} - (\bar{C}^{\circ}_{P})_{org} \qquad (1.7)$$

Los valores de entalpía y entropía y capacidad calorífica recopiladas en la tabla 1.3 (Tanford, 1980) para la disolución de hidrocarburos en agua reflejan tendencias similares a los correspondientes a la disolución de compuestos anfifílicos.

Los valores negativos de entalpías y entropías de la tabla 1.3 y las anormalmente elevadas capacidades caloríficas, facilitan la comprensión del origen del efecto hidrófobo. Aparentemente, las capacidades caloríficas (Cp) para

transferir un hidrocarburo hacia el agua son mucho mayores que las correspondientes a las propias moléculas de soluto. No es posible que tan gran incremento en Cp pueda ser debido únicamente al efecto de la temperatura sobre los movimientos internos de las moléculas de soluto. Este cambio debe asociarse con las variaciones que tienen lugar en el estado de las moléculas de agua provocadas por la presencia de hidrocarburos en disolución.

Teniendo en cuenta que las transferencias y cambios producidos en la estructura del agua por la presencia de hidrocarburos en solución, están acompañados de cambios entálpicos pequeños, el valor positivo de $\mu^{\circ}_{W} - \mu^{\circ}_{org}$ estará provocado principalmente por variaciones entrópicas negativas en el sistema. Esto puede interpretarse a través del modelo propuesto en el apartado anterior, como una consecuencia de la tendencia al ordenamiento de las moléculas de agua en presencia de sustancias no polares. Y extrapolando al fenómeno inverso, que sería la interacción hidrófoba, podemos concluir que éste se encuentra termodinámicamente favorecido, principalmente por factores entrópicos.

Tabla 1.3.- Parámetros termodinámicos correspondientes a transferencia de hidrocarburos desde disolventes orgánicos al agua a 25°C.

Desde un hidrocarburo puro a agua

	$\mu^\circ_W - \mu^\circ_{HC}$ (cal/mol)	$\bar{H}^\circ_W - \bar{H}^\circ_{HC}$ (cal/mol)	$\bar{S}^\circ_W - \bar{S}^\circ_{HC}$ (cal/°C.mol)	$(\bar{C}^\circ_P)_W - (\bar{C}^\circ_P)_{HC}$ (cal/°C.mol)	$(\bar{C}^\circ_P)_{HC}$ (cal/°C.mol)
C_2H_6	3900	(-2500)*	(-21)*	--	--
C_3H_8	4900	(-1700)*	(-22)*	--	--
C_4H_{10}	5900	(-800)*	(-23)*	(65)*	34
C_5H_{12}	6860	-500	-25	96	41
C_6H_{14}	7740	0	-26	105	47
C_6H_6	4600	+500	-14	54	32
$C_6H_5CH_3$	5400	+410	-17	63	37
$C_6H_5C_2H_5$	6200	+480	-19	76	44
$C_6H_5C_3H_8$	6900	+550	-21	94	--

Basados en datos caloriméticros (Gill, 1976)

* Datos obtenidos a partir de experiencias de solubilidad de hidrocarburos gaseosos en agua (Morrison, 1952; Claussen y Polglase, 1952; Kresheck, 1965).

El ordenamiento de las moléculas de agua alrededor de un soluto hidrófobo, como se refleja en los valores negativos de $\bar{S}^\circ_W - \bar{S}^\circ_{HC}$, está también acompañado por un descenso del volumen molar parcial (Friedman y Scheraga, 1965). Por ejemplo, el volumen molar parcial del n-pentanol a dilución infinita en agua a 20°C es de 101,9cc/mol, mientras que el valor correspondiente al líquido puro es de

108,2cc/mol. El origen entrópico de la baja afinidad de los grupos no polares por el agua ha sido reconocido por varios autores (Butler, 1937; Eley, 1939; Edsall and Scatchaud, 1943; Frank y Evans, 1945). Este gran efecto entrópico en agua no es característico únicamente de hidrocarburos, sino también, de muchas otras moléculas orgánicas que tienen grupos apolares unidos a grupos polares, como se desprende de los siguientes hechos (Kauzmann, 1959):

- Las mezclas de alcoholes alifáticos de cadena corta (metanol, etanol, propanol) con el agua, muestran desviaciones positivas de la ley de Raoult indicando que se produce un incremento de la energía libre cuando la molécula de alcohol es transferida desde la fase alcohol puro (menos polar) al agua. Como la adición de alcoholes a un gran exceso de agua es exotérmica, el efecto aludido sólo puede estar producido por un descenso de la entropía.

- Las solubilidades de un gran número de derivados alifáticos (por ejemplo, dietilcetona, éter etílico, dietilsulfuro, acetato de etilo, n-butanol, etc.) en agua disminuyen cuando se aumenta la temperatura. Esto significa, por el principio de Chatelier que el proceso es exotérmico. El hecho es que estas sustancias no se mezclan con el agua en todas las proporciones, sin embargo, se produce un aumento de energía libre, lo que debe atribuirse a una variación negativa de la entropía de mezcla.

- Se ha observado (Goddard y col., 1957) que la formación de micelas a partir de moléculas de tensioactivos en agua está acompañada de pequeños efectos caloríficos. Esto es, la escasa tendencia de la reacción,

micela en agua⇌moléculas aisladas de tensioactivo en agua

para ir hacia la derecha, excepto a bajas concentraciones del tensioactivo no está originado por un valor de ΔH alto y positivo, sino por un valor de ΔS altamente negativo, presumiblemente debido a que los residuos no polares del tensioactivo, cambian su entorno no polar de la micela por un entorno acuoso.

Todos los efectos descritos, para la entalpía, entropía y el volumen molar comienzan a verse disminuidos cuando la temperatura se sitúa entre los 50 y los 100°C, pues entonces se produce la "fusión" de las agrupaciones de moléculas de agua -ver modelo apartado 1.4.2.2.- y consecuentemente las disoluciones tienden a alcanzar un comportamiento más próximo a la idealidad.

Los compuestos aromáticos también muestran todos los efectos aludidos, pero en un grado considerablemente menor que sus correspondientes alifáticos (Bohon y Claussen, 1951).

1.4.3. Diferenciación y propiedades específicas

Históricamente, la noción diferenciada de enlace hidrófobo fue introducida por Kauzmann (1959) en su revisión sobre los factores que intervienen en la desnaturalización de las proteínas. Kauzmann establece un paralelismo entre las cadenas laterales de las proteínas y los hidrocarburos en solución, en cuyas propiedades termodinámicas se basa esta teoría, de ahí que las propiedades específicas de los mismos estén referidas a su intervención en la estabilización de la estructura proteica; aunque como se verá más adelante, estas peculiaridades también son aplicables a otros sistemas donde se ha encontrado que se producen interacciones de carácter hidrófobo.

Las propiedades más importantes de la interacción hidrófoba -para sistemas proteicos- pueden resumirse en los puntos siguientes:

a) Estas interacciones se estabilizan ampliamente por efectos entrópicos, motivados principalmente -como ya se ha expuesto- por alteraciones en la estructura del disolvente acuoso.

b) La transferencia de una cadena lateral alifática desde el agua a una región no polar en la proteína es endotérmica. Mientras que en el caso de restos aromáticos dicha transferencia es aproximadamente atérmica.

c) El cambio de energía libre en la transferencia desde el agua a un entorno no polar es favorable a temperatura ambiente.

d) Las interacciones hidrófobas entre cadenas laterales alifáticas son más estables a temperatura ambiente que a O°C dado su carácter endotérmico.

e) La transferencia aludida (apartado c) se acompaña de una expansión de alrededor de 20 ml/mol en las cadenas laterales alifáticas, mientras que en el caso de las aromáticas el cambio resultante será algo menor. Este fenómeno es inverso al que se da como consecuencia del ordenamiento de las moléculas de agua en la disolución de hidrocarburos en ese medio.

f) La interacción hidrófoba es de carácter netamente inespecífico; no existen direcciones preferentes para que ésta se produzca.

g) Dado que la presencia de electrolitos disminuye la solubilidad de las sustancias no polares en agua, también favorecen la interacción hidrófoba.

h) La utilización de disolventes menos polares que el agua debilita e incluso inhibe la formación de enlaces hidrófobos lo cual viene a reforzar la importancia del disolvente en esta interacción, que prácticamente sólo se ve favorecida en medio acuoso.

Quizás sus características más importantes sean su <u>inespecifidad</u> que las diferencia de las interacciones electrostáticas y por puentes de hidrógeno, y su <u>dependencia del medio</u> que las diferencia de las interacciones por fuerzas de van der Waals.

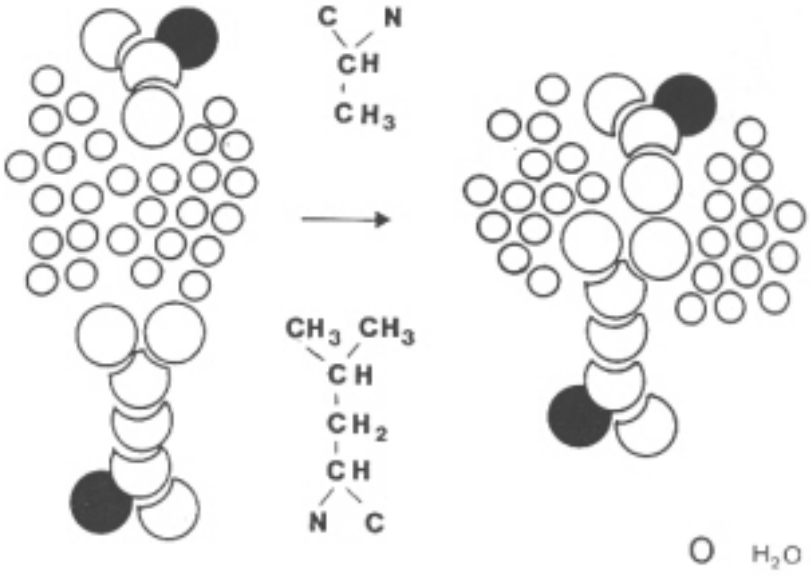


Figura 1.22.- Representación esquemática de la formación del enlace hidrófobo entre cadenas aisladas (alanina y leucina). Las moléculas de agua se muestran sólo de forma esquemática, sin indicar ninguna orientación particular (Nemethy y Scheraga, 1962c).

1.4.4. Sistemas en los que intervienen

En el presente apartado se efectuará una revisión de los sistemas en los que se observan evidencias experimentales acerca de la existencia de interacciones hidrófobas.

1.4.4.1.- Estabilización de la estructura proteica

Como ya se ha mencionado anteriormente, Kauzmann (1959) acuñó el término interacción hidrófoba, identificándolo como uno de los factores que más influyen en la estabilización de la estructura proteica.

La formación de un enlace hidrófobo en una proteína tiene lugar cuando se aproximan dos o más cadenas laterales de aminoácidos -previamente rodeadas por agua- hasta que se tocan -dentro de su radio de van der Waals- y como consecuencia desciende el número total de moléculas de agua en contacto con ellas (fig. 1.22). La magnitud del cambio en los parámetros termodinámicos debe ser menor que el supuestamente esperado ya que las cadenas laterales de aminoácidos no se liberan totalmente de su entorno acuoso cuando forman el enlace hidrófobo (Nemethy y Scheraga, 1962c).

La energía libre estándar total de formación del enlace hidrófobo puede tomarse según la expresión siguiente:

$$\Delta G^{\circ}_{H} = \Delta G^{\circ}_{W} + \Delta G^{\circ}_{HC} \qquad (1.8)$$

como suma de las contribuciones correspondientes al cambio en la estructura del agua (ΔG°_{W}) y al cambio de estado de las propias cadenas que intervienen en el enlace (ΔG°_{HC}).

La contribución total de los cambios de la estructura del agua al enlace hidrófobo puede estimarse como sigue:

$$\Delta G^{o}_{W} = \Delta Y^{HC} \; (G^{o}_{W} - G^{c}_{W}) \qquad (1.9)$$

donde ΔY^{HC} es el número total de moléculas de agua desplazadas desde la primera capa próxima a la cadena lateral que interviene en el enlace hidrófobo; G^{o}_{W} representa al estado del agua pura y G^{c}_{W} hace referencia al caso de disoluciones diluidas de sustancias apolares en agua (ver apartado 1.4.2.2.)

Para evaluar la contribución de la cadena lateral al enlace, hay que tener en cuenta la alta proporción de aminoácidos con cadenas laterales apolares, cifrada en un 35-45% según Kauzmann (1959). En la tabla 1.4, se presenta una relación de aminoácidos capaces de formar uniones hidrófobas. Tales restos no polares tienen una baja afinidad por el agua, y se reordenarán formando una especie de "micelas" intramoleculares, similares a las que se producen en las disoluciones de jabones y tensioactivos en medio acuoso. La contribución a la energía libre de formación del enlace puede expresarse como:

$$\Delta G^{o}_{HC} = - \tfrac{1}{2} \, E_{RW} \, \Delta Y^{HC} + Z_{R} \, E_{R} + Z \, \Delta G_{rot} \qquad (1.10)$$

donde el primer término indica las pérdidas energéticas provocadas por la disminución en las interacciones agua-soluto; el segundo hace referencia a la ganancia energética producida como consecuencia de las interacciones entre las

Tabla 1.4.- Relación de aminoácidos capaces de formar uniones hidrófobas (Nemethy y Scheraga, 1962c).

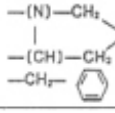
	ABREVIATURA	ESTRUCTURA
Alanina	Ala	$-CH_3$
Valina	Val	$-CH(CH_3)_2$
Leucina	Leu	$-CH_2-CH(CH_3)_2$
Isoleucina	Ile	$-CH(CH_3)-CH_2-CH_3$
Metionina	Met	$CH_2-CH_2-S-CH_3$
Cisteína	Cys	$-CH_2-SH$
Prolina	Pro	$-(N)-CH_2$ / $-(CH)-CH_2$
Fenilalanina	Phe	$-CH_2-$ 

Tabla 1.5.- Energía libre estándar (kcal/mol) de formación de enlaces hidrófobos de máxima estabilidad entre cadenas laterales aisladas, a 25°C (Nemethy y Scheraga, 1962c).

	Ala	Val	Leu	Ile	Met	Cys	Pro	Phe
Ala	-0.7	-0.6	-0.5	-0.6	-0.4	-0.6	-0.7	-0.2
Val	-0.6	-0.9	-0.8	-1.2	-1.1	-0.7	-1.0	-0.6
Leu	-0.5	-0.8	-0.7	-1.1	-1.0	-0.6	-0.9	-0.5
Ile	-0.6	-1.2	-1.1	-1.5	-1.3	-0.6	-1.2	-0.8
Met	-0.4	-1.1	-1.0	-1.3	-1.1	-0.4	-1.1	-0.6
Cys	-0.6	-0.7	-0.6	-0.6	-0.4	-0.6	-0.6	-0.4
Pro	-0.7	-1.0	-0.9	-1.2	-1.1	-0.6	-1.0	-0.7
Phe	-0.2	-0.6	-0.5	-0.8	-0.6	-0.4	-0.7	-1.4

cadenas; y el último término representa un aumento en energía libre causado por el aumento de las restricciones en la rotación del enlace C-C. Como la formación de un enlace entre dos cadenas laterales supone una limitación en sus grados de libertad internos, el término ΔG_{rot} se debe esencialmente al descenso entrópico que se produce como consecuencia de la restricción en rotación. En la tabla 1.5 se recogen los valores de ΔG°_{HC} correspondientes a uniones entre restos hidrófobos de la proteína.

Debido a la naturaleza no-específica de las interacciones hidrófobas, pueden darse una amplia variedad de las mismas, cuyas características deben ser siempre analizadas desde un punto de vista particular en cada caso.

Los parámetros generales que influyen en la formación de este enlace han sido recogidos por Nemethy y Scheraga (1962c) para el caso de los aminoácidos con cadena lateral apolar que constituyen un porcentaje generalmente muy elevado de la mayoría de las proteínas:

A/ Interacción hidrófoba entre dos cadenas laterales aisladas

Se trata del caso más simple, donde se eliminan todo tipo de impedimentos y la hipótesis de considerar un tratamiento inverso al de las disoluciones diluidas de hidrocarburos -ver apartado 1.4.2.2.- es rigurosamente válida.

Pueden darse enlaces hidrófobos dentro de un amplio rango en función del grado de acercamiento y solapamiento

de las cadenas que intervengan en él y de su naturaleza alifática o aromática.

Para la formación de la interacción hidrófoba a temperaturas próximas a la ambiente se cumple:

$$\Delta G_{HC} < 0$$
$$\Delta H_{HC} > 0$$
$$\Delta S_{HC} > 0$$

La desfavorable entalpía de formación está sobradamente contrabalanceada por el cambio entrópico positivo, resultando globalmente una variación de energía libre propicia para que tenga lugar la interacción. Puede destacarse entonces que la entropía es el factor más importante en la estabilización de la interacción hidrófoba, debido a los cambios en la estructura del agua. La naturaleza endotérmica de la interacción hidrófoba provoca que la fuerza de éste aumente con la temperatura.

Es importante resaltar, que en el caso de cadenas laterales aromáticas, los valores de variación de energía libre en valor absoluto, son más bajos en el caso de cadenas alifáticas.

Aunque las cadenas laterales no polares pueden considerarse análogas a los hidrocarburos de pequeño tamaño, sería incorrecto identificar completamente su comportamiento al del hidrocarburo de idéntico esqueleto, como por ejemplo sucedería en el caso de la valina y el propano.

Esto se debe a que la presencia del esqueleto peptídico modifica las interacciones con el disolvente, principalmente, por dos razones:

- Menos moléculas de agua pueden existir como vecinas más próximas.
- La existencia de las estructuras se encuentra estrictamente limitada, incluso en torno a cadenas laterales cortas.

B/ Interacciones hidrófobas en las estructuras típicas de las proteínas

La estabilización de una molécula proteica comienza con la formación de estructuras secundarias tales como las hélices α y estructuras β, produciéndose a continuación el proceso de plegamiento (Lehningher, 1984). Tenemos pues dos etapas: primero la formación de las estructuras secundarias y segundo el plegamiento de las mismas.

Dentro de las hélices α una cadena lateral dada puede interaccionar con las cadenas laterales más próximas a ella en el espacio. Éstos pueden ser grupos próximos a lo largo del esqueleto básico y algunos situados sobre la vuelta próxima de la hélice (Nemethy y Scheraga, 1962c); pero la interacción hidrófoba no sólo es importante en las hélices α, también en el caso de las estructuras β se producen un elevado número de interacciones, incluso más intensas, lo que propicia una mayor estabilización de las mismas.

El paso siguiente para la estabilización consiste en el plegamiento de la estructura secundaria (Saito, 1982). Existen muchas clases de interacciones entre los átomos constituyentes de la proteína de entre las que merecen especial atención las hidrófobas ya que el rango de las mismas se corresponde con las medidas experimentales tomadas. Inspeccionando las posiciones de los pares hidrófobos para el enlace se comprueba que éstas corresponden a lugares claves para el plegamiento.

El importante papel de las interacciones hidrófobas en los modos de plegado de las proteínas, está además apoyado por el hecho de que en una familia de proteínas homólogas de diferentes especies los residuos hidrófobos usualmente permanecen inalterados o son reemplazados por otros residuos también hidrófobos. En otras palabras, la hidrofobocidad de los residuos ha sido preservada durante la evolución de las especies (Saito, 1982).

C/ Interacciones entre varias cadenas laterales: Regiones hidrófobas

Este tipo de interacciones se producen únicamente cuando las cadenas laterales pertenecientes a más de un esqueleto peptídico pueden colocarse adyacentes las unas a las otras. Son posibles una amplia variedad de interacciones hidrófobas de fuerzas distintas -extensión de contacto-, en un rango que va desde la simple interacción de dos cadenas laterales hasta la formación de "densas" e importantes regiones hidrófobas.

Varias cadenas laterales pertenecientes a diferentes porciones del esqueleto proteico pueden asociarse para formar "regiones hidrófobas". Éstas pueden considerarse como una agrupación de varias cadenas laterales, constiyéndose una región en el espacio de varios diámetros atómicos, de la cual el agua está completamente excluida. Un importante ejemplo lo tendríamos en el caso en que queda atrapado un grupo polar -capaz de ionizarse o formar enlaces de hidrógeno-. Estos grupos exhibirían una reactividad anómala como resultado de encontrarse encerrados entre los grupos no polares (Hermans, 1961). La formación de una región hidrófoba de tamaño suficiente para contener grupos "encerrados" es posible sólo por la interacción de cadenas laterales pertenecientes a tres o más porciones del esqueleto proteico. El efecto de enmascaramiento de grupos ionizables en regiones hidrófobas también ha sido discutido por Tanford (1961).

La variación de energía libre entre la situación de un resto no polar circundado por agua y el mismo resto en una región hidrófoba puede ser calculada (Nemethy y Scheraga 1962c) comprobándose siempre la tendencia termodinámicamente favorable de esta transición.

D/ Características más significativas de las interacciones hidrófobas en las proteínas

Las interacciones hidrófobas, tomadas individualmente, son más débiles que las interacciones iónicas o por puente

de hidrógeno que tienen lugar entre las cadenas laterales de las proteínas. Sin embargo, son muy importantes para su estabilización, dado el gran número en que se producen.

Como ya se ha comentado, las propiedades peculiares que caracterizan a las interacciones hidrófobas son su falta de especificidad y su dependencia del medio (sólo se producen en medio acuoso). Siendo este último aspecto de singular importancia en el caso de las estructuras proteicas por lo que será objeto de un análisis más extenso.

La existencia de dominios hidrófobos en el colágeno tipo I ha sido observado mediante estudios basados en la unión del ácido 1-anilino naftalen-8-sulfónico a esta proteína. Dichos dominios hidrófobos permanecen después de someter la proteína a una digestión con pepsina, por lo que se supone que estarán formados por las porciones no degradadas de los grupos COOH -extrahélice terminales de la proteína (Martínez del Pozo, 1986).

En presencia de disolventes no acuosos cuyas moléculas son parcialmente no polares -p.e. hidrocarburos- las cadenas laterales apolares no formarán enlaces entre ellas. En este caso, la interacción con el disolvente es tan favorable como entre ellas mismas. Este efecto puede ser importante en la desnaturalización de las proteínas por alcoholes y otros disolventes orgánicos. Incluso en mezclas conteniendo agua y un disolvente orgánico, este último puede formar interacciones hidrófobas con las cadenas laterales no polares, facilitando de este modo el desplegado de la proteína. Este efecto está relacionado también con la inte-

racción de tensioactivos con la proteína. Aunque la unión de un tensioactivo a una proteína está determinado primariamente por interacciones en las que interviene su cabeza polar, éstas se verán favorecidas si la fracción no polar del tensioactivo puede formar interacciones hidrófobas con las cadenas laterales expuestas de la proteína. Si la fracción no polar de la molécula que se enlaza es suficientemente grande, ésta podrá interaccionar con más de un resto no polar de la proteína. De esta forma, los tensioactivos a bajas concentraciones pueden estabilizar la estructura plegada de las proteínas globulares. Sin embargo, a más altas concentraciones, los tensioactivos pueden actuar como agentes desnaturalizantes rompiendo las uniones hidrófobas entre cadenas laterales de la proteína y estableciendo nuevos enlaces proteína-tensioactivo (Nemethy y Scheraga, 1962c).

1.4.4.2. Interacciones tensioactivos proteínas

En la mayoría de las proteínas nativas algunos grupos hidrófobos permanecen expuestos en la superficie molecular o en hendiduras. Si se forman regiones hidrófobas suficientemente grandes éstas pueden constituirse en centros de enlace para hidrocarburos o moléculas anfifílicas -tensioactivos-. La energía libre del proceso de transferencia de una molécula a tales centros en la proteína (μ°_{P} - μ°_{W}) pueden ser más negativa que μ°_{HC} - μ°_{W} (para un hidrocarburo) o μ°_{mic} - μ°_{W} (para un anfifílico), porque el proceso de enlace puede incluir la eliminación de una interfase hidrocarburo-agua en la superficie de la proteína al mismo tiempo que se produce la asociación con un ligando libre en el medio acuoso. Existen otros factores desde luego, que pueden disminuir la afinidad entre la proteína y un ligando hidrófobo. Por ejemplo, la interfase hidrocarburo-agua se puede eliminar tan sólo parcialmente por el hecho de producirse la unión a un centro superficial, o el ligando que se enlaza puede tal vez requerir una conformación desfavorable para que se produzca la interacción. Otra posibilidad es que se produzcan reordenamientos locales, energéticamente desfavorables, de la estructura de la proteína cerca de los centros de enlace como una consecuencia del proceso de asociación.

En la asociación de sustancias anfifílicas con los centros hidrófobos de las proteínas nativas, el grupo hidrofílico puede jugar un papel importante. Un claro ejemplo

lo constituye el caso de los tensioactivos iónicos. La repulsión electrostática entre grupos puede suponer una contribución positiva a $\mu^{\circ}_{mic} - \mu^{\circ}_{W}$, mientras que la atracción electrostática entre la cabeza polar y una cadena lateral iónica de la proteína con carga opuesta podría suponer al mismo tiempo una contribución negativa $\mu^{\circ}_{P} - \mu^{\circ}_{W}$, o sea por un lado se dificulta la formación de la micela y por otro lado se favorece la unión con la proteína.

La conclusión general es que las moléculas de proteína nativa pueden tener centros hidrófobos disponibles para asociarse con hidrocarburos o sustancias anfifílicas, y que la energía libre asociada con tales interacciones es, en general impredecible, pudiendo ser más grande o más pequeña que la energía libre asociada con el proceso competitivo que sería el de la formación de las micelas (Tanford, 1980).

A/ Mecanismos de interacción

El número de moléculas ligando capaces de interaccionar con una molécula simple de proteína es grande. Las isotermas experimentales se obtienen al representar el número de ligandos enlazados por mol de proteína (k) frente a la concentración de los mismos que quedan libres en disolución acuosa (Xw). Existen muchas formas posibles de asociación, que pueden conducir a gran número de interacciones ligando-proteína, y para definirlas, resulta más sencillo en un principio limitar la discusión a situaciones

en las que los ligandos no enlazados se presentan en una forma monomérica, dejando para más tarde los efectos de autoasociación de los ligandos (Tanford, 1980).

Como se ha mencionado previamente, una proteína en su estado nativo puede tener centros de enlace para ligandos hidrófobos. Si llamamos n a dichos centros, y consideramos que éstos son idénticos e independientes, el equilibrio en cada centro estará gobernado por el proceso:

$$\textbf{centro(S) + ligando (L)} \overset{\textbf{cte}}{\leftrightharpoons} \textbf{SL}$$

y la forma de la isoterma sería exactamente la misma que cuando se considera el caso de un gran número de pequeñas moléculas, enlazadas cada una a un sólo centro. La ecuación de la isoterma es:

$$\frac{k}{n-k} = \text{cte}.X_w \qquad (1.11)$$

la constante del equilibrio puede determinarse a partir del punto medio de la isoterma donde $X_w = \frac{1}{cte}$ cuando k = n/2. El valor de la cte se relaciona con la energía libre del proceso -transferencia de un ligando a un centro en la proteína-:

$$-RT\ln \text{cte} = \mu_P^\circ - \mu_W^\circ \qquad (1.12)$$

En la práctica se observa (Reyno1ds, 1967) que a medida que aumentan Xw y k, el valor de la cte se va

haciendo progresivamente más pequeño, lo cual tiene dos posibles interpretaciones. Una es que los centros de enlace -n- son todavía independientes, pero no presentan la misma afinidad por el ligando. En tal caso, los centros de más alta afinidad se cubren a valores menores de Xw, o sea, la isoterma global será una superposición de isotermas individuales, cada una de las cuales obedecerá la ecuación (1.11), pero con una constante distinta para cada punto medio -en esta situación el punto medio de la isoterma global se calculará promediando los de las isotermas individuales-. La otra interpretación sería que existiera interacción entre los centros de forma que cuando un ligando se enlaza en uno de ellos puede interferir con las uniones de los demás -por ejemplo debido a impedimentos estéricos o repulsiones electrostáticas-.

En el caso general de que se produzca una unión cooperativa de varios ligandos con la proteína tendríamos un proceso como el representado por la reacción siguiente:

$$\mathbf{P\ (molec.prot.nativa) + nL \overset{cte}{\leftrightharpoons} PLn}$$

entonces la ecuación de la isoterma vendría dada por:

$$\frac{\mathbf{k}}{\mathbf{(n - k)}} = \mathbf{cte\ Xw} \qquad (1.13)$$

con

$$-RT \ln cte = n\,\mu_P^\circ - \mu_W^\circ \qquad (1.14)$$

Cuando el enlace intrínsecamente cooperativo tiene lugar con ligandos hidrófobos, la participación simultánea de muchas moléculas en el proceso de enlace estará propiciada por la necesidad de contactos entre las fracciones hidrocarbonadas de las moléculas de ligandos adyacentes para conseguir un producto estable, y sólo una pequeña proporción de las moléculas de ligando precisan estar en contacto directo con la superficie de la proteína si n es grande. En esta situación el valor de $\mu_P^\circ - \mu_W^\circ$ es más fácilmente predecible que para el caso de uniones de ligandos simples en centros discretos. Para el caso de los tensioactivos, si no hay fuertes interacciones específicas que incluyan las cabezas polares, la ganancia de energía libre producida en el proceso de aislar la superficie hidrófoba de la proteína del entorno acuoso se distribuye entre todas las moléculas de ligando.

Un caso especial de cooperación intrínseca tiene lugar cuando una proteína presenta una cadena hidrófoba, que puede servir como núcleo para la formación de una micela mixta entre varios ligandos y la proteína. En tal caso, las ecuaciones (1.13) y (1.14) podrían aplicarse tomando n aproximadamente igual al número de agregación -m- para la formación de la micela en ausencia de la proteína.

Una interacción cooperativa puede producirse también de una forma completamente diferente, cuando los centros de

enlace no existen inicialmente en la proteína, pero pueden crearse tan sólo por un desplegado de la estructura nativa de forma que las cadenas laterales hidrófobas ocultas, quedan expuestas a la superficie. Esta situación implica la existencia de dos equilibrios sucesivos. El primero es entre la proteína nativa (P) y su conformación desplegada (Q), equilibrio desplazado hacia el lado de P y con una variación de energía libre alta y positiva. El segundo equilibrio corresponde a la formación del complejo entre Q y el ligando L, que debe tener lugar a una concentración de L suficientemente elevada de forma que se produzca una alta saturación de todos los centros sobre Q y pueda compensarse la energía libre desfavorable del proceso anterior. La reacción representantiva del proceso sería:

$$P + nL \overset{cte}{\leftrightharpoons} QLn$$

con un cambio en energía libre representado por la ecuación:

$$-RT \ln cte = \Delta G^{\circ}_{PQ} + n\,(\mu^{\circ}_{Q} - \mu^{\circ}_{W}) \qquad (1.15)$$

siendo ΔG°_{PQ} la energía libre de paso de P a Q y $(\mu^{\circ}_{Q} - \mu^{\circ}_{W})$ la ganancia en potencial unitario por transferir ligandos desde la solución acuosa hacia centros discretos de enlace, o hacia regiones de enlace intrínsecamente cooperativa sobre la proteína en su estado desplegado Q. Esta situación debe estudiarse de forma independiente, mediante técnicas hidrodinámicas u ópticas que permitan detectar el cambio configuracional cuando éste se produzca.

Una vez que se han discutido los posibles mecanismos de interacción tensioactivo-proteína cuando el primero se encuentra en su forma monomérica, conviene también tener en cuenta la posibilidad de que se produzcan autoasociaciones entre las moléculas del tensioactivo que dan lugar a la formación de micelas cuyo principal efecto es el de limitar la concentración de ligando monomérico asequible.

Resulta evidente que este proceso competitivo complica la interpretación del fenómeno global ya que pueden darse dos situaciones: a) Isoterma observable por completo, entonces la afinidad del ligando por la proteína debe ser alta en comparación con el otro proceso previamente considerado; b) Isoterma no observable, esto no quiere decir que no hayan centros de enlace sobre la proteína, sino únicamente que $\mu_P^\circ - \mu_W^\circ$ o $\mu_Q^\circ - \mu_W^\circ$ para los centros de enlace no es suficientemente negativo para competir con el proceso de autoasociación.

B/ Datos experimentales sobre proteínas globulares

Existen muchos estudios realizados sobre el enlace de tensioactivos en las proteínas (Steinhardt, 1969); la mayoría de los cuales están orientadas hacia proteínas globulares y más concretamente al caso de la proteína seroalbúmina cuya función biológica consiste en actuar como portadora de ácidos grasos y otros tensioactivos simples. Los resultados experimentales suelen ser bastante complejos, indicando la existencia de varios niveles de afinidad. Parece ser que

las uniones de muy alta afinidad sólo se producen en la seroalbúmina ya que muchas otras proteínas comunes solubles en agua no las presentan. Sin embargo, el tipo de asociación de más baja afinidad, que parece ser un proceso cooperativo en el que la proteína enlaza más de su propio peso en tensioactivo, sí aparece como un proceso no específico común a todas las proteínas.

En el caso de la proteína seroalbúmina existen 10 u 11 centros discretos de enlace con una constante de asociación alta para tensioactivos aniónicos (Reyno1ds, 1967, 1968, 1970). También hay cuatro centros de enlace para tensioactivos catiónicos con una afinidad moderada (Nozaki, 1974), y las áreas hidrófobas de estos centros se combinan con los núcleos iónicos constituyéndose una simbiosis fundamental como lo demuestra el hecho de que los tensioactivos aniónicos se enlazan fuertemente, mientras que los hidrocarburos no interaccionan (Reyno1ds, 1968). Algo similar, pero en menor medida puede ocurrir con los tensioactivos catiónicos (Nozaki, 1974).

Reynolds y col. (1967, 1968, 1970) cuando llevaron a cabo el estudio de las interacciones entre tensioactivos aniónicos y seroalbúmina (SA) llegaron a algunas conclusiones importantes: (i) Las uniones sobre un número limitado de centros de alta energía de la proteína SA nativa estaban acompañadas por pequeñas perturbaciones en propiedades ópticas de la proteína que no se asociaban con la distorsión masiva de la estructura tridimensional (Polet, 1968).

(ii) Únicamente los sulfatos de dodecilo y tetradecilo provocan el desplegado de la macromolécula nativa. (iii) Cuando se comparan compuestos de idénticas longitudes de cadena hidrocarbonada pero con diferentes grupos polares terminales, la afinidad de la proteína por el ligando desciende en el orden SO_4^- > SO_3^- > OH. (iv) El número de centros de alta energía sobre la proteína nativa desciende cuando disminuye la longitud de la cadena hidrocarbonada, pero las energías de enlace no difieren significativamente dentro de las mismas series (p.e. mismo grupo polar terminal). (v) La energía libre de enlaces de aniones a SA incluye otras fuerzas además de las culómbicas, y tiene primariamente un origen entrópico. (vi) La contribución más importante a la energía libre de asociación entre sulfatos de C_8 Y C_{12}, y SA se atribuye a múltiples interacciones de la cadena hidrocarbonada con las regiones hidrófobas en la proteína. Se asume que el número de tales interacciones aumenta con la longitud de la cadena. Las interacciones iónicas contribuyen en una pequeña fracción de la energía libre para estos dos ligandos. (vii) Se considera que el sulfato de C_{10} tiene exactamente la longitud y "conformación" correctas para interaccionar con las regiones hidrófobas e intervenir en ciertas interacciones iónicas específicas no accesibles a ligandos con otras longitudes de cadena, estas últimas interacciones aumentan cuando disminuye el pH.

A partir de los estudios mencionados y de otros (Wishnia, 1964; Tanford, 1972 y Makino, 1973) se comprueba

que se presentan tres modos completamente distintos de interacción entre los agentes tensioactivos y las proteínas globulares:

1.- Asociación con centros específicos de enlace de las proteínas nativas. Dos proteínas comunes solubles en agua, seroalbúmina y β-lactoglobulina, poseen dichos centros, pero muchas otras proteínas, ej: ovoalbúmina y hemoglobina no los presentan. Los centros de enlace de seroalbúmina y β-lactoglobulina difieren en su especifidad: el centro simple de la β-lactoglobulina es de carácter primariamente hidrófobo y puede combinarse con hidrocarburos y también con tensioactivos, mientras que 10 (o más) centros de enlace de la seroalbúmina incluyen una afinidad de tipo electrostática e hidrófoba al mismo tiempo mostrando una elevada especifidad hacia los tensioactivos aniónicos.

2.- Asociación cooperativa entre la proteína y un gran número de moléculas de tensioactivo sin que se produzca un cambio conformacional significativo. Este tipo de reacción se ha observado entre seroalbúmina y sulfatos y sulfonatos de alquilo con cadenas hidrocarbonadas relativamente cortas.

3.- Asociación cooperativa con una desnaturalización completa de la proteína. Esta reacción, estudiada en

mayor detalle con dodecil sulfato sódico, tiene lugar con todas las proteínas a las que este tensioactivo se une inespecíficamente. La estructura nativa se destruye y es reemplazada por una conformación más abierta con un contenido moderadamente alto de hélices α en la que la mayoría de los residuos hidrófobos están presumiblemente expuestos para su asociación con el tensioactivo. Dicha transformación supone fundamentalmente la rotura previa de puentes de azufre en la proteína (Pitt-Rivers, 1968).

En todas estas reacciones, la actividad termodinámica del tensioactivo viene dada por la concentración de moléculas monoméricas, y las micelas del mismo no contribuyen. Los dos tipos de asociación cooperativa descritos anteriormente requieren una concentración monomérica del tensioactivo considerablemente más alta que la que se precisa para la asociación con los centros de enlace nativos, donde éstos existan. La termodinámica del proceso de formación de la micela aparece entonces como un factor importante.

Podría pensarse que todos los tensioactivos pueden asociarse cooperativamente con las proteínas, pero aquellos que presenten una concentración micelar crítica relativamente baja, puede que no alcancen una concentración monomérica suficientemente elevada para llevarlo a cabo (Makino, 1973). Si tenemos en cuenta que los tensioactivos iónicos presentan una concentración micelar crítica considerablemente más alta que los no iónicos con cadenas hidrocarbona-

das de la misma longitud (Tanford, 1972) debido a las fuertes repulsiones entre las cabezas iónicas, las formas cooperativas de asociación serán más fácilmente observables en tensioactivos iónicos que en no iónicos.

C/ Datos experimentales sobre proteína colagénica

Las primeras referencias que se tienen sobre interacciones tensioactivo-proteína colagénica corresponden a los trabajos de Pankhurst (1944, 1945, 1947, 1949, 1953) y Harris (1947) que tratan sobre la precipitación de proteínas -fundamentalmente gelatina- en solución acuosa cuando se adicionan tensioactivos aniónicos -DSS- a pH netamente por debajo del punto isoeléctrico. Aunque Pankhurst no se refiere específicamente a interacciones de tipo hidrófobo, si llega a algunas conclusiones que podrían asociarse a las características de este tipo de interacción. De acuerdo con sus investigaciones Pankhurst propuso, para el fenómeno de la fijación de DSS sobre gelatina, el mecanismo que se esquematiza en la figura 1.23. Inicialmente los iones del tensioactivo cargados negativamente se unen por atracción electrostática a los grupos básicos de las cadenas laterales de la proteína dando lugar a una primera capa, con los grupos lipófilos del tensioactivo dirigidos hacia el exterior (superficie hidrófoba) que cuando se completa (adsorción primaria) origina la precipitación máxima de la gelatina (complejo oleofílico). La adición de más tensioactivo inicia la formación de otra capa (adsorción secundaria)

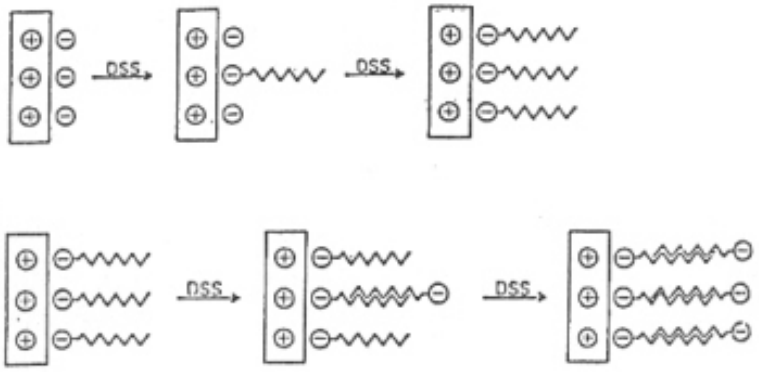


Figura 1.23.- Mecanismo de adsorción de tensioactivos aniónicos sobre proteínas, según Pankhurst (1953).

unida por fuerzas de van der Waals a la primera, con los grupos hidrófilos del tensioactivo hacia el exterior, que una vez completada producirá la redisolución total de la proteína (complejo hidrofílico).

En el punto de máxima precipitación, la cantidad de tensioactivo adsorbido corresponde prácticamente a la de los grupos básicos de las cadenas laterales de la gelatina. La cantidad de tensioactivo requerida para solubilizar el complejo oleofílico fue del mismo orden que la requerida para su precipitación total. Este resultado confirmaría la suposición de que la segunda se ha fijado sobre la primera.

Más adelante Küntzel y le Nenaon (1961a y b) en las conclusiones de sus trabajos sobre la acción de los humectantes aniónicos y catiónicos sobre gelatina sí consideran la posible importancia de la unión hidrófoba tensioactivo-proteína a través de sus cadenas apolares.

1.4.4.3. Interacciones polímeros-tensioactivos

Recientemente se han encontrado evidencias de la existencia de interacciones hidrófobas cuando se mezclan tensioactivos y polímeros en disolución acuosa, que ocasionan a menudo cambios en las propiedades de cada una de las especies individuales (Saito, 1987).

Dichas interacciones se producen tanto con tensioactivos iónicos (Robb, 1981, Molyneux, 1984) como tensioactivos no iónicos (Szmerekov, 1984).

En realidad, las investigaciones sobre la interacción

de tensioactivos y polímeros se encuentran todavía en sus primeros niveles de desarrollo, y serán precisos muchos más datos cuantitativos para entender los términos en que dichas interacciones se producen.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- MATERIALES, PRODUCTOS QUÍMICOS Y APARATOS.

2.1.1. Material colagénico.

El material colagénico mayoritariamente utilizado ha sido polvo de piel (pp) de procedencia bovina, proporcionado por el Departamento de Proteínas y Cuero de la Escuela Técnica Superior de Darmstadt (Alemania Federal). Este material no ha sufrido ningún tipo de tratamiento previo y se obtiene de piel vacuna de la que se eliminan las capas de flor y carne. Esta capa central se seca y se somete a un proceso de desfibrado mecánico en un molino adecuado para tal fin. Este material colagénico (pp) se ha caracterizado mediante los métodos analíticos descritos en los apartados 2.2.1 y los resultados obtenidos se muestra en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Características del polvo de piel (pp)

Determinación	Procedimiento	Resultado
Humedad	UNE 59013	16.0%
pH	UNE 59019	6.5%
Materias solubles en diclorometano	UNE 59012	0.6%
Cenizas totales sulfatadas	UNE 59015	0.2%
Nitrógeno	UNE 59018	18.2%

También se ha utilizado polvo de piel de la misma procedencia y similares características pero con un contenido en óxido de cromo de 0.56%. A partir de este material y de acuerdo con un proceso convencional de curtición (apartado 2.3.9) se han obtenido los restantes materiales colagénicos con mayor contenido en óxido de cromo.

El estudio de la adsorción sobre polvo de piel en función del pH del tensioactivo DSS, así como los tratamientos secuenciales con DSS y ALOE se repitieron sobre material colagénico que previamente había sido sometido a un proceso de extracción de grasas en aparato Soxhlet. Los resultados fueron similares a los presentados en esta memoria por lo que no se han indicado con el fin de facilitar la comprensión global del estudio.

2.1.2. Tensioactivos.

Las abreviaturas utilizadas para designar cada uno de los tensioactivos que se indican a continuación aparecerán entre paréntesis detrás de su denominación química.

La descripción de los tensioactivos se completa en las tablas 2.2 y 2.3.

2.1.2.1. Aniónicos.

* Dodecil sulfato sódico (DSS)
  Tensioactivo conocido también por el nombre de lauril sulfato sódico, suministrado por Merck, con una pureza del 99%.

* Dodecil benceno sulfonato sódico (DBS).
  Producto suministrado por Fluka, con una riqueza del 85%.

* Alcohol graso polioxietilenado con 2 moles de óxido de etileno, sulfatado, sal sódica (ALOES20).
  Producto suministrado por Marchon-Surfac, con una longitud de cadena hidrocarbonada de 12-14 átomos de carbono, en una relación de 55/45, y un 27% de materia activa.

* N,N-metil, lauroil glicinato sódico (MLGS).
  Producto suministrado por Hoechst con el nombre comercial de Medialán LD, con 30% de materia activa.

2.1.2.2. Catiónicos.

* Bromuro de hexadeciltrimetil amonio (BHTA).
  Tensioactivo suministrado por Fluka con una pureza del 98%.

2.1.2.3. Anfóteros.

* Cocoamidopropil betaína (CAPB)
  Producto suministrado por Goldschmidt, comercializado con el nombre de Tego betaína L-7, con un 27% de materia activa.

* Ácido N-coco-3-amino propiónico (ACAP).
  Producto suministrado por Henkel bajo el nombre de Deriphat 154C con un 42% de materia activa.

2.1.2.4. No iónicos.

* Alcohol graso polioxietilenado con 8.5 moles de óxido de etileno (ALOE85).
  Producto suministrado por Marchon-Surfac con el nombre comercial de Dehscoxid 728. La longitud de la cadena hidrocarbonada es de 12-14 átomos de carbono en relación aproximadamente equimolecular.

* Alcohol graso polioxietilenado con 12 moles de óxido de etileno (ALOE120).
  Producto procedente de Marchon-Surfac, comercializado bajo el nombre de Dehscoxid 652. La longitud de la cadena hidrocarbonada es de 12-14 átomos de carbono en relación aproximadamente equimolecular.

* Alcohol graso polioxietilenado con 14 moles de óxido de etileno (ALOE140).
  Producto proporcionado por Pulcra-Henkel, bajo el nombre comercial de Niox KJ-61. La longitud de la cadena hidrocarbonada es de 14-16 átomos de carbono en relación aproximadamente equimolecular.

* Nonilfenol polioxietilenado con 8.5 moles de óxido de etileno (NFOE85).
  Sustancia suministrada por Marchon-Surfac, comercializada con el nombre de Dehscoxid 771.

* Nonilfenol polioxietilenado con 9 moles de óxido de etileno (NFOE90).
  Sustancia tensioactiva suministrada por Pulcra-Henkel.

* Nonilfenol polioxietilenado con 12.4 moles de óxido de etileno (NFOE124).
  Producto suministrado por Marchon-Surfac.

Tabla 2.2. Algunas características de los tensioactivos empleados

TENSIOACTIVO	TIPO	PESO MOLECULAR (g/mol)	MATERIA ACTIVA (%)
DSS	Aniónico	288.4	99
DBS	Aniónico	348	85
ALOES20	Aniónico	430	25
MLGS	Aniónico	293	30
ACAP	Anfótero	266	42
CAPB	Anfótero	363	27
BHTA	Catiónico	365	98
ALOE85	No iónico	572	100
ALOE120	No iónico	728	100
ALOE140	No iónico	871	100
NFOE85	No iónico	594	100
NFOE90	No iónico	616	100
NFOE124	No iónico	766	100

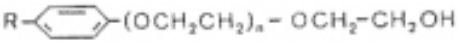
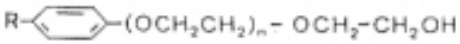
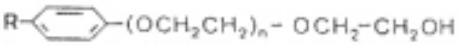
2.1.3. Material curtiente.

El producto usado para la curtición del polvo de piel, fue proporcionado por BAYER, bajo el nombre comercial de CHROMOSAL B, siendo sus características: 33% de basicidad, 26% de óxido de cromo (III) y 24% de sulfato sódico.

Tabla 2.3.- Desarrollo estructural de los tensioactivos estudiados.

DSS	$R-OSO_3^- \; Na^+$	$R = C_{12}$
DBS		$R = C_{12}$
ALOES20	$R-(OCH_2CH_2)_2-OSO_3^- \; Na^+$	$R = C_{12}$
MLGS	$R-\overset{O}{\overset{\|\|}{C}}-\underset{CH_3}{\underset{\|}{N}}-CH_2-COO^- \; Na^+$	$R = C_{12}$
AGAP	$R-NH-CH_2-CH_2-COO^- \; Na^+$	$R = C_{12}$
CAPB	$R-\overset{O}{\overset{\|\|}{C}}-NH-(CH_2)_3-\overset{CH_3}{\underset{CH_3}{\overset{+}{\underset{\|}{N}}}}-CH_2-COO^-$	$R = C_{12}$
BHTA	$R-(CH_2)_4-\overset{CH_3}{\underset{CH_3}{\overset{+}{\underset{\|}{N}}}}-CH_3 \; Br^-$	$R = C_{12}$

Tabla 2.3.- (continuación)

ALOE85	$R-(OCH_2CH_2)_n-OCH_2-CH_2OH$	$R = C_{12-14}$ $n = 7.5$
ALOE120	$R-(OCH_2CH_2)_n-OCH_2-CH_2OH$	$R = C_{12-14}$ $n = 11$
ALOE140	$R-(OCH_2CH_2)_n-OCH_2-CH_2OH$	$R = C_{14-16}$ $n = 13$
NFOE85		$R = C_9$ $n = 7.5$
NFOE90		$R = C_9$ $n = 8$
NFOE124		$R = C_9$ $n = 11.4$

2.1.4. Reactivos.

Los reactivos utilizados en este trabajo han sido:

- Azul de metileno, 99%, p.a., Doesder
- Púrpura de bromocresol, 99%, p.a., Merck
- Iodo, 99%, p.a., Merck
- Ácido sulfúrico, 96%, p.a., Panreac
- Ácido clorhídrico, 35%, p.a., Panreac
- Hidróxido sódico, 97%, p.a., Panreac
- Cloruro sódico, 99.5%, p.a., Panreac
- Sulfato sódico, 99%, p.a., Panreac
- Ioduro potásico, 99%, p.a., Panreac
- Fosfato disódico, 99%, p.a., Panreac
- Etanol, 96% v/v, p.a., Panreac
- Etanol, absoluto, p.a., Panreac
- Cloroformo, p.a., Panreac
- Fenolftaleína, 99%, p.a., Panreac
- Cloruro de N-cetilpiridinio, monohidratado, 99%, p.a., Merck
- Bromuro de 3,8-Diamino-5-Metil-6-Fenilfenantridinio (Bromuro de dimidio), p.a., Merck
- Azul Sulfacide Brillante 6J 50, ICI

2.1.5. Disoluciones.

Todas las disoluciones se preparan a partir de agua destilada y desionizada.

2.1.5.1. Disoluciones de tensioactivos.- Las disoluciones de los distintos tensioactivos se preparan en peso. La concentración de dichas disoluciones se determina por un posterior análisis.

2.1.5.2. Disolución de azul de metileno.- Se prepara una disolución al 0.003% en indicador, 1.2% en ácido sulfúrico concentrado y 5% en sulfato sódico.

2.1.5.3. Disolución de púrpura de bromocresol.- Para su preparación se disuelven 0.25 g de dicho reactivo en 250 ml de etanol al 96%.

2.1.5.4. Disolución de fenolftaleína. Para la preparación de la disolución al 1% se disuelve 1 g del producto en 99 g de la mezcla agua:etanol (1:1).

2.1.5.5. Disolución de fosfato disódico.- Se prepara su disolución disolviendo 44.77 g de fosfato disódico en agua, enrasando hasta 1 litro. La disolución así preparada tiene un pH de 8.2.

2.1.5.6. Disolución de iodo-ioduro.- Se prepara disolviendo 1 g de iodo y 2 g de ioduro potásico en 100 ml de agua. El límite de utilización de esta disolución es de 8 días.

2.1.5.7. Disolución de hidróxido sódico.- Se prepara una disolución 0.1 N, disolviendo 4 g de hidróxido sódico en 1 litro de agua.

2.1.5.8. Disolución de ácido clorhídrico.- La preparación de una disolución 0.1 N se obtiene disolviendo 8.8 ml de ácido clorhídrico al 35% y densidad 1.180 g/ml, en 1 litro de agua.

2.1.5.9. Disolución de indicador ácido mixto.- Para la preparación de 250 ml, se pesan 0.050 g de bromuro de dimidio y se disuelven en caliente con 10-15 ml de etanol (disolución al 10% en volumen). Por otro lado, se disuelven en caliente 0.050 g de azul sulfacide en 10 ml de etanol 10%. Se mezclan ambas disoluciones completando hasta 25 ml con etanol 10%, luego se añaden 100 ml de agua destilada y 10 ml de ácido sulfúrico 2.5 M, completando con agua hasta el volumen final.

2.1.5.10. Disolución de etanol 10% (v:v).- Para preparar 100 ml, se disuelven 10.4 ml de etanol 96% en agua.

2.1.5.11. Disolución de ácido sulfúrico.- Se prepara una disolución 2.5 M, disolviendo 138.7 ml de ácido sulfúrico concentrado al 96% y densidad 1.84 g/ml, en 1 litro de agua.

1.6. Aparatos.

* Espectrofotómetro SHIMADZU, modelo UV-260.

* pH-metro RADIOMETER COPENHAGEN, modelo pHM 62, con electrodo de vidrio.

* Baño termostatizado KOTTERMANN, provisto de un mecanismo de agitación por vaivén, que proporciona una temperatura constante con una aproximación de ±0.5°C.

* Baño ultratermostatizado SELECTA, modelo FRIGITERM, provisto de un termostato de inmersión TERMOTRONIC, que proporciona una temperatura constante con una aproximación de ±0.5'C.

* Centrífuga ORTO, modelo TORNAX.

* Balanza de precisión SAUTER SM 1000.

* Balanza analítica METTLER AE 163.

* Jeringa hipodérmica de 1 ml.

* Filtro SWINNEX de 13 mm de diámetro, de MILLIPORE.

* Cronómetro.

2.2.- MÉTODOS ANALÍTICOS.

2.2.1. Caracterización del material colagénico.

El material colagénico usado en este trabajo se ha caracterizado químicamente de acuerdo con los métodos que se describen a continuación:

2.2.1.1. Determinación de humedad.

Se ha llevado a cabo, según la norma UNE 59013 (ISO 4684), en estufa a 102±2'C durante 6 horas de secado. Esta determinación se realiza para referir los resultados a polvo de piel seco.

2.2.1.2. Determinación del pH.

Esta determinación se efectúa según norma UNE 59019 (ISO 4045), midiéndose el pH del extracto acuoso obtenido después de 6 horas de agitación de la mezcla de 5 g de polvo de piel con 100 ml de agua a 20±2'C.

2.2.1.3. Determinación de materias solubles en diclorometano.

Este ensayo proporciona una idea aproximada del contenido en materias grasas del material empleado. Su determinación se efectúa mediante extracción con diclorometano en aparato Soxhlet, según se describe en la norma UNE 59012 (ISO 4048).

2.2.1.4. Determinación de cenizas totales sulfatadas.

Siguiendo el método descrito por la norma UNE 59015 (ISO 4047) se determina el contenido de sales minerales, en forma de sulfatos, del polvo de piel.

2.2.1.5. Determinación del contenido en nitrógeno.

El análisis cuantitativo de nitrógeno se realiza de acuerdo con la norma UNE 59018 (ISO 5397). Esta determinación proporciona un valor aproximado del contenido en proteína del material utilizado.

2.2.1.6. Determinación del contenido en óxido de cromo.

El análisis cuantitativo del cromo en el material colagénico curtido se ha realizado de acuerdo con la norma UNE 59016.

2.2.2. Análisis de tensioactivos.

Para la determinación cuantitativa del agente tensioactivo presente en el baño, después de un tratamiento, se centrifuga y se toma una alícuota del líquido sobrenadante. Para ello se utiliza una jeringuilla hipodérmica de 1 ml, previamente homogeneizada, filtrando el líquido a través de un filtro SWINNES de 13 mm de diámetro, también homogeneizado con anterioridad.

Sobre una cantidad conocida de este filtrado se realizan las diluciones convenientes para la determinación de la concentración de tensioactivo siguiendo, según el caso, uno de los métodos que se describen en los siguientes apartados.

En el apéndice se indican las rectas de calibrado y los datos para su obtención en las determinaciones espectrofotométricas (Tablas 2.6 a 2.16).

2.2.2.1. Análisis de BHTA.

La determinación cuantitativa del bromuro de hexadeciltrimetil amonio, se ha llevado a cabo mediante el análisis colorimétrico del complejo que forma este tensioactivo con púrpura de bromocresol (Fogh, 1954). Las diluciones para el análisis se han efectuado mediante pesada, con una precisión de ±0.01 mg, encontrando un rango de concentración donde se cumple la ley de Lambert-Beer, entre 9×10^{-4} y 4×10^{-3} g/l, realizando la medición a 618 nm.

2.2.2.2. Análisis de tensioactivos con grupo fenilo.

Los tensioactivos que contienen un grupo fenilo en su molécula, se pueden analizar directamente mediante análisis espectrofotométrico, aprovechando la absorción de dicho grupo en la zona ultravioleta. De esta forma se han determinado los nonilfenoles polioxietilenados, tanto de naturaleza aniónica como no iónica, y el dodecilbenceno sulfonato

sódico (DBS). En la tabla 2.4 se indican los rangos de concentración, donde la ley de Lambert-Beer se cumple, así como las longitudes de onda donde se mide y el coeficiente de extinción molar (ε).

Tabla 2.4.- Datos para el análisis espectrofotométrico de tensioactivos con grupos fenilo

TENSIOACTIVO	ε(molar^{-1}cm^{-1})	C (molar) Rango de linealidad	λ(nm)
DBS	11670	0.35-1.70 x 10^{-4}	223.5
NFOE85	1530	0.10-1.50 x 10^{-3}	275.2
NFOE90	1505	0.10-1.50 x 10^{-3}	276.5
NFOE124	1527	0.07-1.30 x 10^{-3}	276.5

2.2.2.3. Análisis de tensioactivos aniónicos.

El método utilizado para la determinación de tensioactivos aniónicos, donde el análisis espectrofotométrico directo no es viable, es el descrito por Epton (1948), que consiste en una valoración en dos fases (acuosa-orgánica).

El método se basa en la reacción que tiene lugar entre el azul de metileno (indicador) y los tensioactivos aniónicos, que forman un complejo que se extrae en cloroformo. Al ir añadiendo el agente valorante, un tensioactivo de naturaleza catiónica (cloruro de N-cetilpiridinio) éste irá neutralizando tensioactivo aniónico, y en el punto final, desplazará el indicador de la fase orgánica a la fase acuosa, distribuyendo el color azul por igual en ambas fases.

Este método se ha utilizado para determinar dodecil sulfato sódico (DSS) y el alcohol graso polioxietilenado, con 2 moles de óxido de etileno, sulfatado (ALOES20).

La determinación de la concentración del tensioactivo catiónico (cloruro de N-cetilpiridinio), reactivo que se usa como valorante, se efectúa mediante espectrofotometría, midiendo a la longitud de onda de 259 nm, donde se encuentra una respuesta lineal en el rango de concentración entre 1.40 y 7.10 x 10^{-4} M.

2.2.2.4. Análisis de tensioactivos no iónicos de cadena alifática.

Para la determinación cuantitativa de los tensioactivos no iónicos, se sigue el método del iodo-ioduro, descrito por Baleux (1972). En este método se aprovecha la presencia de los grupos de óxido de etileno en estos tensioactivos, para la formación del complejo rojo entre el grupo I_3^- y los grupos oxigenados de la cadena etoxilada que absorbe a la longitud de onda de 505 nm. En la tabla 2.5 se indican los tensioactivos analizados por este método, así como, el rango de linealidad de respuesta y el coeficiente de extinción (ε) obtenido.

Tabla 2.5.- Datos para el análisis espectrofotométrico de tensioactivos no iónicos de cadena alifática

Tensioactivo	ε (molar^{-1}cm^{-1})	C (molar) Rango de linealidad
ALOE85	18096	0.15-1.50 X 10^{-5}
ALOE120	32950	0.14-1.10 X 10^{-5}
ALOE140	20935	0.11-1.10 X 10^{-5}

2.2.2.5. Análisis de tensioactivos anfóteros

El método utilizado para la determinación de tensioactivos anfóteros tiene su fundamento en el procedimiento descrito por Rosen (1987), que consiste en una valoración, en presencia de un indicador ácido mixto, en dos fases (acuosa-orgánica).

El método se basa en la reacción que tiene lugar entre el indicador de naturaleza aniónica (azul de sulfacide) con el anfótero, que en medio ácido fuerte se encuentra cargado positivamente, que forman un complejo que es extraído en la fase orgánica (cloroformo). Al ir añadiendo un agente valorante, un tensioactivo de naturaleza aniónica (DSS), éste irá neutralizando tensioactivo anfótero, y en el punto final, el tensioactivo aniónico reaccionará con el indicador de carácter catiónico (bromuro de dimidio), formando un complejo de color rosa que se extrae en la fase orgánica.

2.3.- PROCEDIMIENTO.

2.3.1. Adsorción de tensioactivos: Procedimiento general.

Los estudios de adsorción se realizan en un sistema heterogéneo formado por el tensioactivo en disolución en medio acuoso, y el polvo de piel en suspensión. La relación inicial:

polvo de piel / tensioactivo / baño

puede considerarse en números enteros igual a 1 / 4 / 100, respectivamente, en donde el polvo de piel y el baño se expresan en peso (g) y el tensioactivo en milimoles (mmol).

En el procedimiento general se pesan 0,5 g de polvo de piel (peso seco) con una precisión de ±0.1 mg y se humectan, durante 16 horas, con aproximadamente 30 g de agua, pesada con una precisión de ±0.01 g. A continuación se ajusta el pH de trabajo mediante disoluciones, de HCl y NaOH 0.1 N respectivamente, y se añade la disolución de tensioactivo (2 milimoles), completando con agua hasta un peso total de 50 g. Se agita en un baño termostatizado a 25°C hasta alcanzar el equilibrio (2 horas), se centrifuga a 3500 rpm, se toma una alícuota del líquido sobrenadante y se mide el pH de la disolución final. En la alícuota se procede a la determinación de la concentración del tensioactivo en el baño. La cantidad de tensioactivo adsorbida, se calcula por diferencia entre la cantidad ofrecida inicialmente y la que queda en la disolución después del tratamiento. El resultado se expresa en milimoles de tensioactivo adsorbidos por gramo de polvo de piel (mmol/g pp).

Las desviaciones sobre este procedimiento general se describen a continuación para cada uno de los estudios realizados.

2.3.2. Adsorción en función del pH.

En este caso se sigue el procedimiento general ajustando los correspondientes pH mediante disoluciones de HCl y NaOH 0.1 N, respectivamente.

2.3.3. Cinéticas de adsorción.

El estudio de la adsorción de los tensioactivos en función del tiempo, se efectúa con una serie de muestras preparadas en las mismas condiciones de pH, temperatura y concentración de tensioactivo. El estudio se lleva a cabo retirando las alícuotas necesarias para su análisis, de cada una de las muestras a los distintos tiempos de trabajo midiendo el pH después de cada período de tiempo.

2.3.4. Isotermas de adsorción

Las isotermas de adsorción se han efectuado según se ha descrito en el apartado de adsorción de tensioactivos, excepto que la concentración inicial de tensioactivo en este caso es variable.

Las isotermas de adsorci6n del DSS sobre pp se han realizado con una relación inicial pp/tensioactivo/baño de 1/x/400.

2.3.5. Influencia de la polaridad del medio en la adsorción

En este caso se aplica el procedimiento general pero el medio es etanólico. Se utiliza etanol absoluto y las proporciones etanol / agua se indican en peso.

2.3.6. Influencia del electrolito en la adsorción

Cuando se realiza el estudio de adsorción de tensioactivos en presencia de electrolitos se sigue el procedimiento general, añadiendo la cantidad de electrolito correspondiente, cloruro sódico o sulfato sódico, después de la humectación del polvo de piel. Se agita durante 30 minutos y se prosigue con la adición del tensioactivo.

2.3.7. Adsorción secuencial de tensioactivos.

El estudio de la adsorción secuencial de tensioactivos aniónicos y posterior adsorción de tensioactivos no iónicos, se efectúa mediante el siguiente procedimiento: En primer lugar se procede a la adsorción del tensioactivo aniónico, según se ha descrito en el procedimiento general (2.3.1), pero empleando cantidades crecientes de DSS. Des-

pués del tiempo de equilibrio se centrifuga, se toman las alícuotas oportunas para el análisis del tensioactivo aniónico, se mide el pH final, y se elimina el baño de tratamiento. A continuación, se añade la disolución de tensioactivo no iónico, completando con agua hasta el volumen final de trabajo. Tanto la disolución de tensioactivo no iónico como el agua se ajustan al pH del tratamiento previo con DSS. Se agita hasta que se alcanza el equilibrio (2 horas), se toman alícuotas para el análisis del tensioactivo, y se mide el pH final. Se determina en la alícuota el tensioactivo no iónico, y el aniónico en los casos en que se presenta desorción del mismo.

2.3.8. Desorción de tensioactivos

El estudio de desorción de los tensioactivos se ha llevado a cabo después de la adsorción previa sobre polvo de piel del tensioactivo en cuestión. Para ello, después de centrifugar a 3500 rpm, se elimina la disolución sobrenadante, y mediante pesada se calcula el baño residual. Se añade, a continuación, una cantidad de agua (ajustada al pH del tratamiento previo) hasta que se completa el total del baño de trabajo. Normalmente, y salvo que se indique lo contrario, las desorciones se efectúan manteniendo la relación en peso, piel / baño, en 1 / 100. El tiempo de desorción es de 2 horas, y la temperatura de trabajo se mantiene constante a 25°C, como en el estudio de adsorción.

2.3.9. Tratamiento curtiente.

Sobre una cantidad de polvo de piel se añaden las cantidades necesarias de Chromosal B y agua, para mantener la relación piel:baño de 1:20, y una concentración inicial de 0.05 M de óxido de cromo (III).

La mezcla se agita, mediante volteo, durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se mide el pH, y si no está comprendido entre los valores de 3.5 - 3.6, entonces se añade la cantidad necesaria de una disolución de bicarbonato sódico al 1%, en pequeñas porciones, se agita durante 15 minutos entre cada adición, y se mide el pH final. Una vez conseguido el pH indicado, se agita durante 2 horas más. A continuación se filtra al vacío en büchner, y el polvo de piel se lava con agua hasta eliminar la totalidad del cromo no fijado, escurriendo bien el último lavado a vacío, para pasar a lavar con 14 porciones de acetona. Por último se deja acondicionar el polvo de piel durante 24 horas a una humedad relativa del 50%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.- ADSORCIÓN DE TENSIOACTIVOS SOBRE COLÁGENO: GENERALIDADES.

Debido a su carácter anfótero las proteínas son capaces de fijar ácidos y bases. Este comportamiento les permite reaccionar a través de sus grupos básicos con sustancias aniónicas cuando el pH del medio se encuentra por debajo del punto isoeléctrico (PI) de la proteína, y a través de sus grupos ácidos interaccionan con compuestos catiónicos cuando el pH del medio se encuentra por encima de su PI.

Teniendo en cuenta esta característica general de las proteínas, se ha realizado un estudio de adsorción en función del pH utilizando tensioactivos de diferente naturaleza: aniónico, dodecil sulfato sódico (DSS), catiónico, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (BHTA), no iónico, alcohol graso polioxietilenado con 8.5 moles de óxido de etileno (ALOE85), y anfótero, cocoamido propil betaína (CAPB) (fig. 3.1). El estudio se realizó sobre polvo de piel (pp) sin tratamiento previo alguno.

En un primer análisis de las curvas de adsorción, se observa que a pH básicos se favorece la adsorción del tensioactivo catiónico (BHTA), mientras que el aniónico (DSS) se adsorbe preferentemente en medio ácido, aunque también se produce una notable adsorción en el punto isoeléctrico de la proteína (aproximadamente a pH 7). Sin embargo, no se observa adsorción ni en el caso del tensioactivo no iónico (ALOE85), ni del anfótero (CAPB) en el rango de pH estudiado.

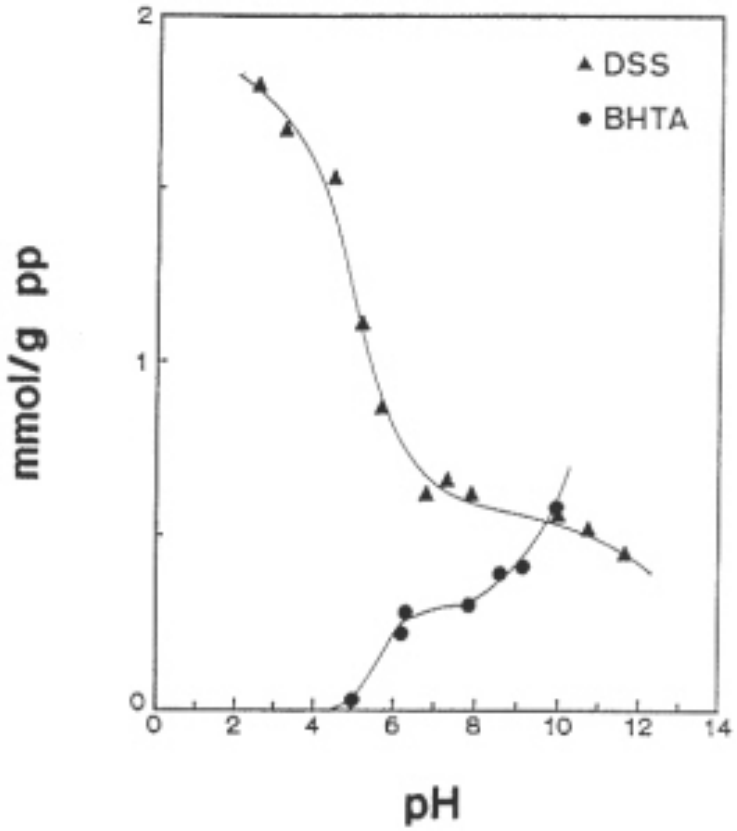


Figura 3.1.- Adsorción sobre polvo de piel (pp) de tensioactivos de distinto carácter, DSS, aniónico, y BHTA, catiónico, frente al pH. El tensioactivo de carácter no iónico, ALOE85, y el tensioactivo anfótero, CAPB, no presentan adsorción en el intervalo de pH estudiado.
Excepto cuando se indican otras condiciones los tratamientos se realizan a 25°C y 2 horas de equilibrio.

Las primeras referencias que se encuentran sobre el tema, relacionadas con el estudio del colágeno, se remontan a los trabajos de Pankhurst en la década de los cuarenta, quien mediante estudios de precipitación de gelatina a pH por debajo del punto isoeléctrico (PI) llega a la conclusión de que los iones negativos del DSS se unen por atracción electrostática a la proteína, dejando los grupos lipofílicos dirigidos hacia el exterior de la molécula colagénica, llegándose a la formación de la denominada "primera capa de adsorción", que neutraliza las cargas de los grupos básicos de la proteína, provocando su precipitación.

Precisamente en la discusión-coloquio que aparece en un trabajo de Pankhurst (1949) uno de los participantes sugirió que de acuerdo con los resultados de alguna de sus experiencias, la capacidad de fijación de las proteínas, dependía generalmente de las fuerzas electrostáticas que se establecen entre grupos con cargas de signo contrario, y de las fuerzas de van der Waals establecidas entre las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de tensioactivo y las cadenas laterales no polares de los residuos de aminoácidos de la proteína.

Más adelante Ernerth (1954) cuando estudiaba la acción hidrotrópica de los tensioactivos sobre el colágeno, sugirió que el fenómeno de hinchamiento del mismo se debe a la formación de compuestos de adición entre los restos hidrocarbonados hidrófobos del tensioactivo, y las cadenas laterales apolares de los aminoácidos de la proteína. Los hu-

mectantes así unidos atraen hacia el sistema de la molécula colagénica una envoltura de agua, gracias a los grupos iónicos hidrofílicos de los tensioactivos.

Loewe y Otto (1960), independientemente del criterio de Ernerth, llegan a la misma conclusión respecto al mecanismo de la acción hidrotrópica de los humectantes iónicos sobre el colágeno.

Sin embargo, Küntzel (1961a) al estudiar la dependencia del pH y acción hidrotrópica de los tensioactivos iónicos sobre la gelatina y sobre el colágeno encontró que la teoría de Ernerth sobre la interacción entre los tensioactivos iónicos y colágeno resultaba poco consistente.

Küntzel considera correcta la interpretación de Pankhurst, en lo que se refiere a la intervención del enlace electrovalente, pero establece que además debe de existir otro tipo de unión adicional entre el tensioactivo y la proteína posiblemente a través de la cadena hidrocarbonada del primero y los grupos apolares del colágeno. Por tanto, según Küntzel, una explicación satisfactoria de la interacción entre proteína y tensioactivo solamente es posible cuando se tienen en cuenta ambos tipos de interacción: el enlace electrovalente y la unión a través de grupos apolares.

Haciendo referencia a otras proteínas fibrosas, en lo que concierne a su interacción con los tensioactivos, en concreto en el caso de la lana, hay diversidad de opiniones sobre el mecanismo que regula el fenómeno. Algunos autores

han considerado que las acciones entre los tensioactivos y la lana se rigen exclusivamente por interacción electrovalente, y sin embargo, otros resaltan la importancia del carácter hidrófobo de la lana con respecto al tipo de interacción que se pueda presentar (Sánchez-Leal, 1977).

Analizando más detenidamente el comportamiento del DSS (fig. 3.2), se aprecian niveles de adsorción del tensioactivo, superiores a lo que sería de esperar si se produjera una interacción únicamente de tipo electrostático, es decir, por encima de la capacidad de interacción con los grupos básicos de la proteína, como se desprende de la comparación con la curva de valoración del colágeno (fig. 3.2). Esta adsorción en exceso, es objeto de diversas interpretaciones en la bibliografía, desde la primera de Pankhurst (1953) que suponía la formación de asociaciones entre las cadenas hidrocarbonadas de los tensioactivos con formación de bicapas (apartado 1.4.4.2.C y figura 1.23), hasta otras más recientes que suponen la formación de pseudomicelas o hemimicelas sobre la superficie de la proteína (García-Domínguez, 1973). Este punto de vista está muy arraigado en la interpretación de la adsorción de tensioactivos sobre sustratos tan dispares de los proteínicos como pueden ser sustancias adsorbentes de naturaleza inorgánica (Jackson, 1987).

Las interacciones de las sustancias tensioactivas con otras proteínas han sido objeto de numerosos estudios (Steinhardt y Reynolds, 1969; Tanford, 1980). La mayoría de

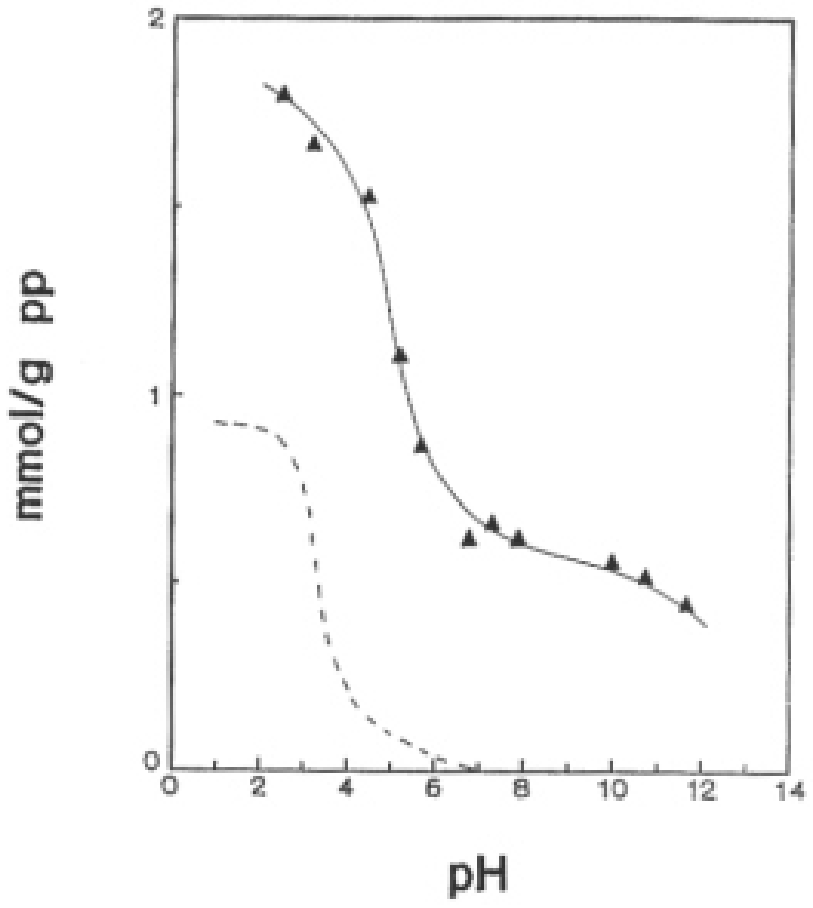


Figura 3.2.- Adsorción de DSS sobre pp en función del pH. (--) Curva de valoración del colágeno (Bowes, 1948).

tales investigaciones se han orientado hacia la interacción de tensioactivos iónicos con proteínas globulares. Ha quedado establecido que en la mayoría de los casos esta interacción se produce después de que tenga lugar un cambio conformacional importante en la proteína (Reynolds, 1967; Steinhardt, 1971; Nozaki, 1974), aunque también se han encontrado casos en los que este cambio no se produce (Reynolds, 1967). El mecanismo para interpretar esta adsorción sin que tenga lugar el desplegamiento de la estructura nativa de la proteína no ha sido descrito (Tanford, 1980, p159).

En cualquier caso se debe adelantar que puede existir una cierta confusión cuando se comparan resultados de la bibliografía, debido a que como se verá en este trabajo, en la adsorción entre proteína y tensioactivos se pueden presentar varios procesos simultáneos que de no tenerlos en cuenta pueden dar lugar a interpretaciones erróneas.

Sobre estos procesos simultáneos apenas aparecen en la bibliografía comentarios en cuanto a los posibles mecanismos que pueden tener lugar; generalmente sólo se suele mencionar la posible intervención de la interacción iónica (II) y la interacción hidrófoba (IH) por separado (Imamura, 1987).

3.2.- ADSORCIÓN DE TENSIOACTIVOS ANIÓNICOS

A la vista de los resultados anteriores, se ha planteado un estudio sistemático de los distintos parámetros que intervienen en el proceso de adsorción de los tensioactivos sobre el colágeno, con el fin de confirmar su comportamiento análogo con otras proteínas estudiadas, y en un estudio posterior establecer el mecanismo de adsorción (apartados 3.3 y 3.4).

En la primera parte de este trabajo se ha utilizado principalmente el tensioactivo aniónico, dodecil sulfato sódico (DSS), ya que tiene una estructura más simple y definida, y presenta la mayor adsorción de todos los estudiados.

3.2.1.- Cinéticas de adsorción

Para establecer las condiciones de equilibrio del proceso de adsorción, se han planteado estudios cinéticos a diferentes pH (fig. 3.3) y a distintas concentraciones de tensioactivo (fig. 3.4).

En el primer caso (fig. 3.3), se aprecia que el tiempo de equilibrio, se alcanza a partir de una hora, independientemente de la cantidad adsorbida y del pH estudiado.

De igual forma, la concentración inicial de tensioactivo ofrecida para un mismo pH (fig. 3.4), no afecta significativamente a la cinética del proceso, aunque convendría poner de manifiesto que por debajo de la concentración micelar crítica (CMC DSS, 8 mmol/l ó 0.23%) la adsorción es

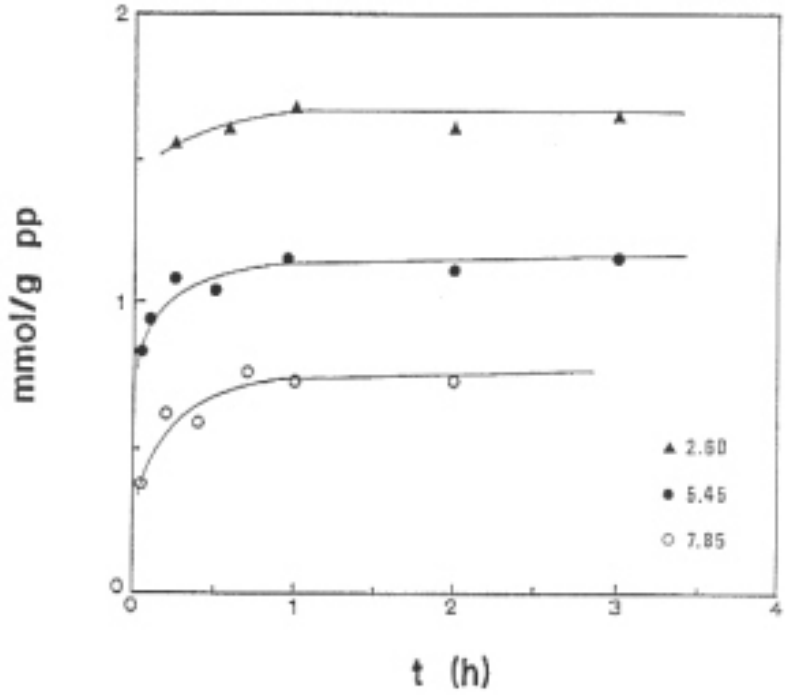


Figura 3.3.- Cinética de adsorción del DSS sobre pp, a diferentes valores de pH.

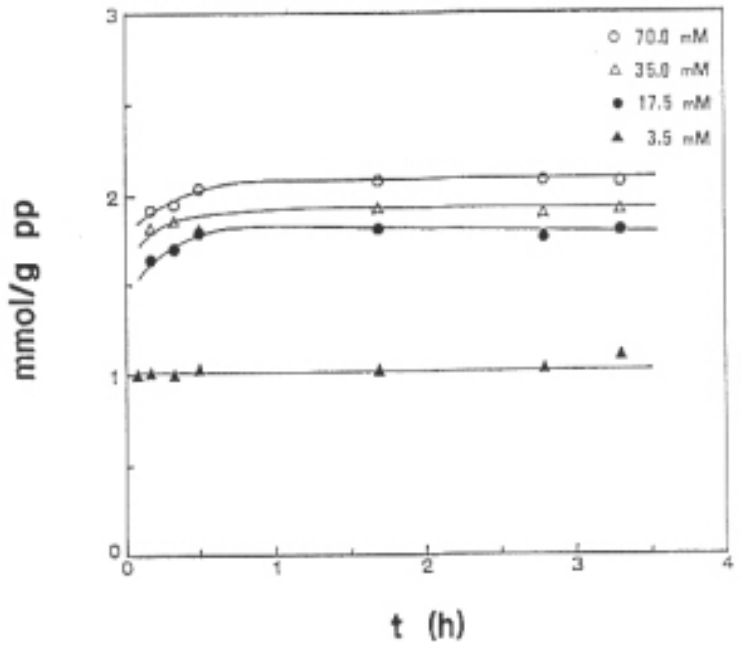


Figura 3.4.- Cinética de adsorción de DSS sobre pp, a pH 3 y distintas concentraciones de tensioactivo.

sensiblemente menor y el equilibrio se alcanza más rápidamente. En este estudio la relación inicial polvo de piel/tensioactivo se mantiene en 1/4 como en el procedimiento general, pero los respectivos baños se modifican con el fin de obtener las concentraciones iniciales indicadas en la figura.

En suma se considera que un tiempo de 2 horas es suficiente para asegurarse de que el proceso ha alcanzado el equilibrio.

3.2.2.- Isotermas de adsorción

La adsorción de solutos en disolución es un fenómeno superficial, que tiene lugar en la interfase sólido-líquido, donde las moléculas de adsorbato (soluto) se fijan sobre la superficie del adsorbente.

Aunque se acostumbra a hablar de la adsorción como un fenómeno físico o químico (fisisorción o quimisorción) dependiendo de la fortaleza de las uniones o de las energías de enlace, en realidad existe una gama intermedia muy amplia de efectos que intervienen en la adsorción, originados por una gran variedad de energías y tipos de enlace, lo que hace complejo su estudio, especialmente en el caso de adsorbentes como el colágeno.

Para analizar el proceso desde un punto de vista mecanístico, se utilizan las denominadas isotermas de adsorción. En ellas se representa la cantidad adsorbida de soluto relativa a masa de adsorbente, en función de la concentración del soluto en el equilibrio.

Giles (1974 a y b) desarrolló una clasificación de isotermas de adsorción para disoluciones diluidas que ha servido para facilitar su tratamiento teórico y comprensión.

La clasificación de Giles se basa en la forma de la parte inicial de la isoterma, y los subgrupos se diferencian en la forma de la curva a altas concentraciones (fig. 3.5). La clase L (Langmuir) es la más común y se caracteriza porque su región inicial es cóncava con respecto al eje de concentraciones. La isoterma L-5 muestra un máximo y refleja una situación especial, que se suele dar cuando hay solutos que se asocian en disolución, como es el caso de los tensioactivos y de ciertos colorantes.

En la clase S la forma inicial es convexa respecto al eje de concentración, y se explica mediante una dependencia adicional de la concentración con los parámetros característicos del disolvente, implicando una adsorción cooperativa.

La clase H ("high affinity", alta afinidad), implica adsorciones importantes a bajas concentraciones que se mantienen a mayores concentraciones de equilibrio.

Por último, la clase C (constante de partición), se interpreta a través de la penetración del soluto en los microporos del sustrato, sin disolvente, con lo cual se abren nuevos centros de adsorción.

Posiblemente la interacción tensioactivo/colágeno participa de más de una de estas clases de adsorción debido

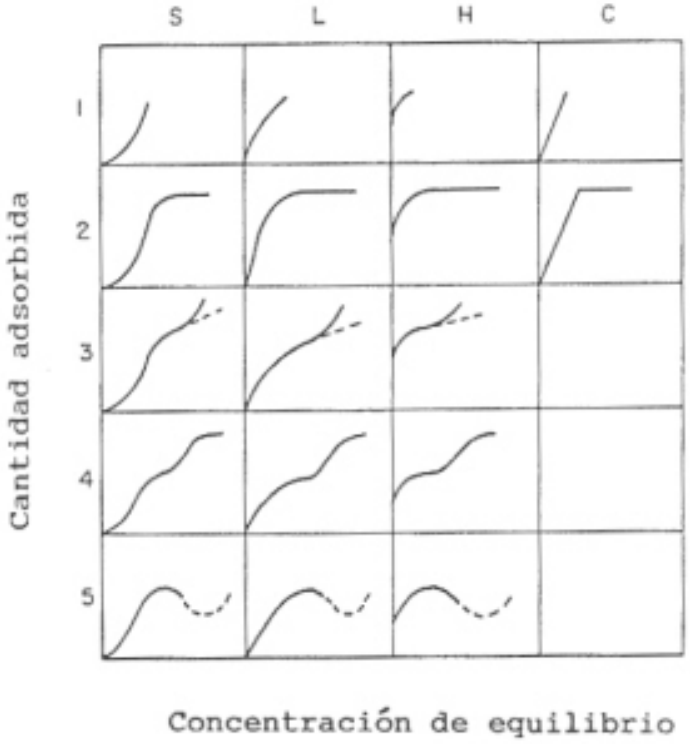


Figura 3.5.- Clasificación de las distintas isotermas de adsorción para disoluciones diluidas según Giles (1974a).

a la existencia inicial de varios mecanismos de enlace y la aparición de nuevos tipos de uniones una vez fijadas las primeras moléculas de tensioactivo.

En este estudio se han realizado isotermas de adsorción de DSS sobre polvo de piel a dos pH diferentes: 3.0 y 10.0 (fig. 3.6). En ambas isotermas se aprecian dos zonas muy bien diferenciadas: la primera para concentraciones inferiores a 4 mM en el equilibrio, y la segunda para concentraciones superiores. A pH 3.0 la isoterma de adsorción alcanza dos mesetas, la primera a bajas concentraciones, por debajo de la concentración micelar crítica (CMC) del DSS (8 mmol/l ó 0.23%), y la segunda a concentración más elevada, superior a la CMC del tensioactivo. La isoterma a pH 10.0 sólo muestra una meseta a concentraciones altas, y no presenta adsorción significativa a bajas concentraciones.

Este comportamiento puede ser indicativo de que se esté produciendo una interacción de tipo hidrófobo, como demuestra el hecho de que haya una adsorción del tensioactivo aniónico a pH básico y que la adsorción que se produce a pH ácido supera la capacidad de intercambio iónico de la proteína a este pH. Este comportamiento indica también que en el caso del colágeno el enlace hidrófobo "puro" de la denominada segunda capa se produce en estas condiciones, sin necesidad de que exista un exceso de tensioactivo, a diferencia de lo parece ocurrir con otros sustratos (Giles,

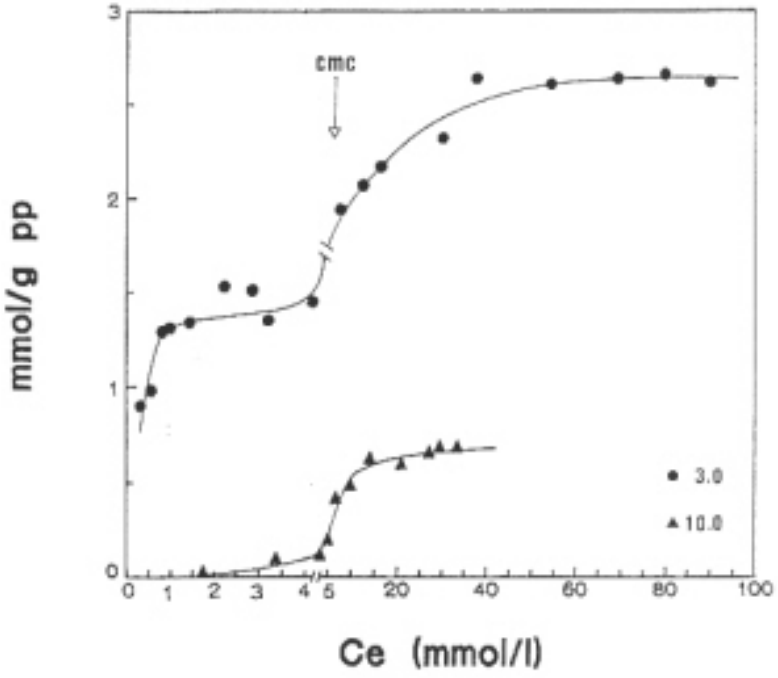


Figura 3.6.- Isotermas de adsorción de DSS sobre pp, a pH 3.0 y a pH 10.0.

1960). Estos resultados se aplicarán más adelante en la discusión de la propuesta de mecanismo que se hace en este trabajo (apartado 3.4).

El carácter hidrófobo de la interacción ha sido puesto de manifiesto en una serie de experiencias realizadas para evaluar por separado las propiedades más características de este tipo de interacción: a) Influencia de la polaridad del medio, b) Influencia de la temperatura y c) Influencia de la concentración salina.

3.2.3.- Influencia de la polaridad del medio

Como ya se ha comentado en la introducción, el agua es el medio donde más se favorece la interacción hidrófoba. Cualquier otro disolvente la reduce sensiblemente o impide que tenga lugar.

Se han utilizado mezclas de etanol-agua para diferenciar, en una primera aproximación, el tensioactivo fijado por interacción iónica e hidrófoba, del adsorbido sólo iónicamente (fig. 3.7).

Como puede observarse, se produce un descenso significativo en la adsorción del tensioactivo al pasar de un medio acuoso a otro parcialmente etanólico, mereciendo especial atención el efecto producido a pH por encima del punto isoeléctrico donde las cantidades adsorbidas son prácticamente nulas. En otras palabras, al pasar a un medio

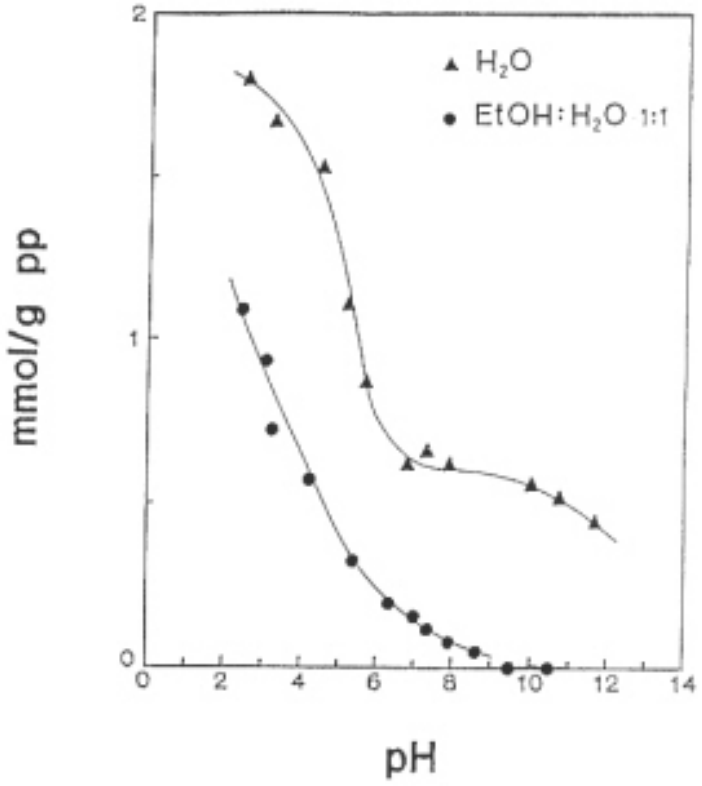


Figura 3.7.- Adsorción de DSS sobre pp en función del pH, y distinta polaridad del medio.

menos polar la forma de la curva se asemeja a la de un proceso típicamente iónico (ver curva de valoración en fig. 3.2), como consecuencia del descenso que habrá de tener lugar en la adsorción producida a través de interacciones típicamente hidrófobas.

Este comportamiento concuerda con lo observado por Lundgren (1945), cuando realizaba la extracción del tensioactivo del complejo formado con la fibra proteica, utilizando mezclas de acetona y agua.

3.2.4.- Influencia de la temperatura

En el estudio teórico ya comentado de Nemethy y Scheraga (1962c), dejando aparte consideraciones termodinámicas, se deduce que la formación del enlace hidrófobo es de naturaleza endotérmica. Es decir que su estabilidad aumenta con el incremento de la temperatura hasta llegar a un máximo que se alcanza aproximadamente a los 60°C. Sin embargo Ben-Naim (1980) de acuerdo con sus consideraciones, este máximo lo sitúa en los 85°C. En la figura 3.8 se muestra la adsorción del DSS sobre polvo de piel, a diferentes temperaturas, en función del pH. Los resultados están de acuerdo en principio con la intervención de la interacción hidrófoba en la fijación del tensioactivo sobre la proteína.

Estos resultados se confirman ampliamente en el estudio de la adsorción de tensioactivos no iónicos en el tratamiento secuencial DSS/no iónico (apartado 3.3.2).

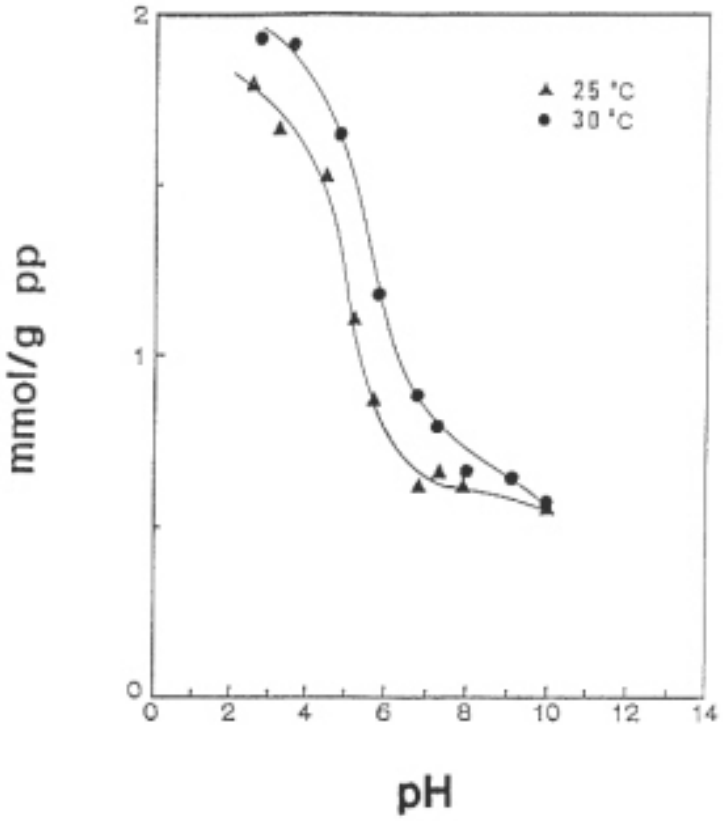


Figura 3.8.- Adsorción de DSS sobre pp en función del pH, a 25 y 30°C respectivamente.

3.2.5.- Influencia de la presencia de electrolitos

Otro factor que favorece las interacciones hidrófobas es la presencia de un electrolito en el medio acuoso que rodea la proteína. Es sabido que la solubilidad en agua de las sustancias con grupos no polares disminuye sensiblemente en medio salino. Es de esperar por tanto que en disoluciones de cloruro sódico se fomenten las interacciones hidrófobas de la proteína y en consecuencia se favorezca la adsorción de tensioactivos. Aquí convendría recordar que si la interacción tensioactivo/proteína fuese sólo de carácter iónico la presencia de electrolito reduciría la adsorción del tensioactivo.

En la figura 3.9 se representa la adsorción de dodecil sulfato sódico (DSS) en función del pH, a diferentes concentraciones salinas del baño de tratamiento. Los resultados están de acuerdo con el carácter hidrófobo de las interacciones que se presentan entre el tensioactivo y la proteína.

En la figura 3.9 puede apreciarse el incremento que se produce en la adsorción cuando aumenta la concentración salina del medio, siendo dicho incremento especialmente significativo a pH básicos, donde se pasa de una adsorción, por ejemplo a pH 10, de 0.6 mmol/g en ausencia de sal a 2.3 mmol/g en una concentración 0.5 M en cloruro sódico. De igual forma, este mismo efecto se observa a pH ácidos, aunque en menor magnitud.

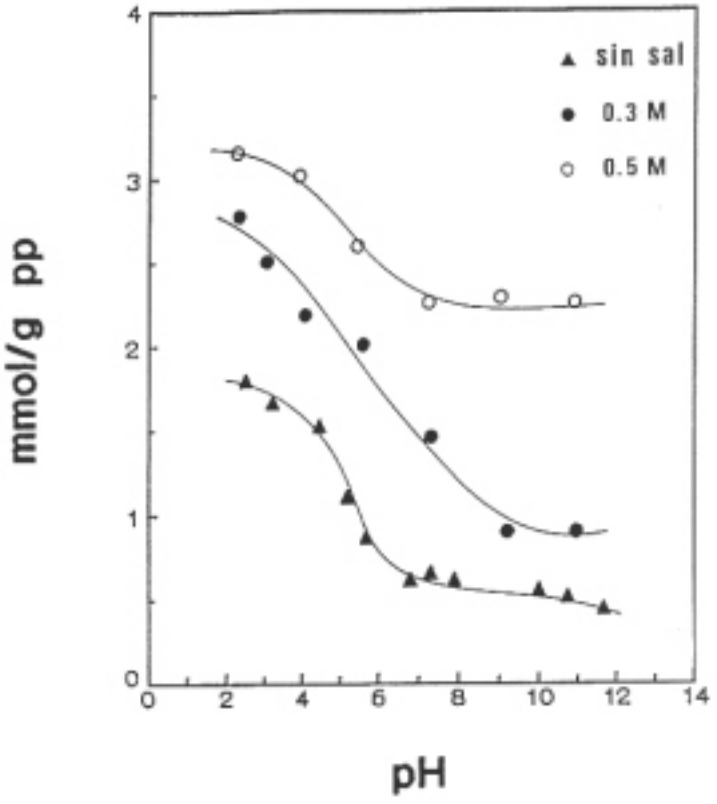


Figura 3.9.- Adsorción de DSS sobre pp en función del pH, a distintas concentraciones de cloruro sódico.

En principio se ha realizado el estudio con cloruro sódico, ya que ésta es la sal más utilizada en los procesos de elaboración del cuero. No obstante, para ampliar el estudio se han realizado adsorciones en función del pH en presencia de distintas concentraciones de sulfato sódico. Como puede observarse en la figura 3.10 el comportamiento es similar al del cloruro sódico, aumentando la adsorción al aumentar la concentración de la sal. No obstante, a pH básicos, la adsorción en presencia de sulfato sódico no es tan elevada como en el caso del cloruro sódico.

Este fenómeno, sobre todo a concentraciones más elevadas de cloruro sódico, puede conducir a una especie de efecto igualador de éste en la reactividad del enlace iónico de la proteína, al actuar solvatando y disminuyendo la fuerza de dicho enlace, en mayor medida, lógicamente, en la zona cercana al punto isoeléctrico.

Tal vez sea esta la causa por la que algunos autores no observan diferencias de adsorción de tensioactivos en función del pH sobre algunas proteínas globulares (Reynolds, 1970), ya que trabajan en medios tamponados.

Sin embargo, puede darse el caso como sucede con la adsorción del éter sulfato ALOES20 en medio salino (fig. 3.11), que la presencia de electrolito actúe negativamente sobre la fijación del tensioactivo. Este efecto se atribuye al debilitamiento de la unión iónica tensioactivo-proteína en el medio salino, que en el caso concreto del éter sulfato no puede verse compensado por el efecto estabilizante

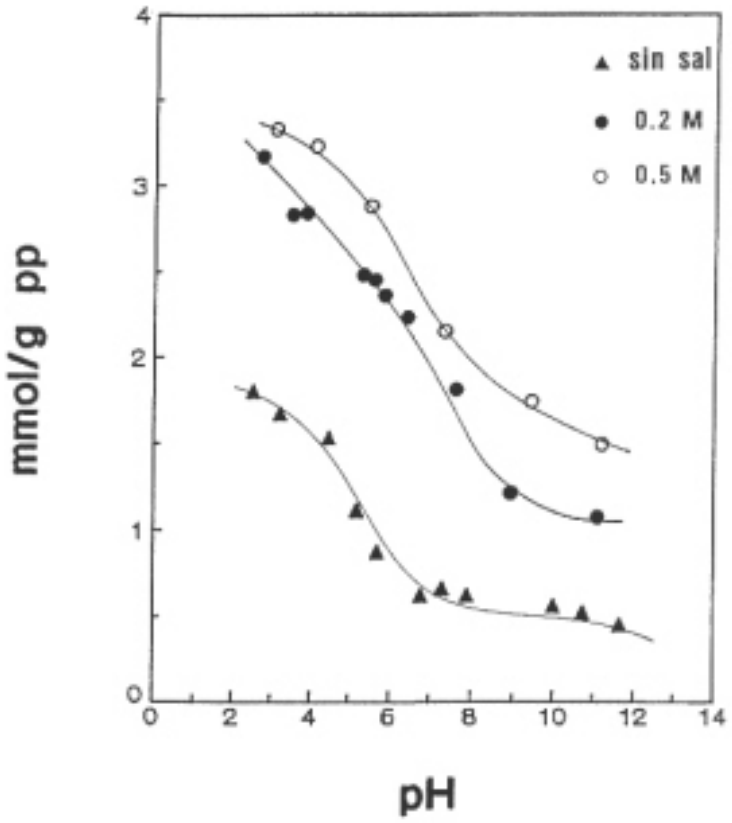


Figura 3.10.- Adsorción de DSS sobre pp en función del pH, a distintas concentraciones de sulfato sódico.

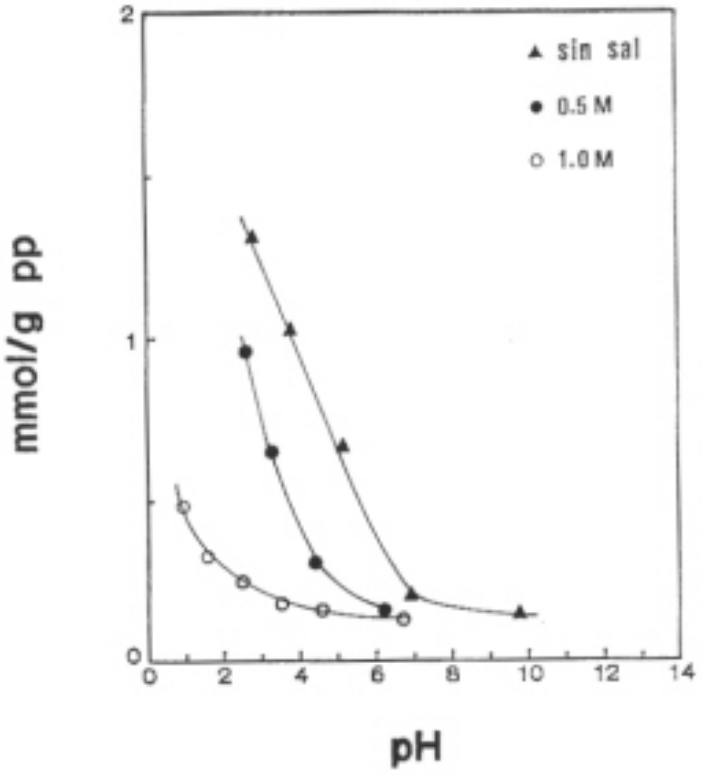


Figura 3.11.- Adsorción de ALOES20 sobre pp en función del pH, a distintas concentraciones de cloruro sódico.

de la interacción hidrófoba en la misma medida que el DSS. Más adelante se incidirá con mayor detalle sobre este aspecto cuando se estudie la influencia de la estructura del tensioactivo en la adsorción sobre pp (apartado 3.5.3) y en la adsorción de DSS sobre polvo de piel curtida (apartado 3.6).

Hasta aquí, se han comentado los factores o parámetros que intervienen en la formación de las interacciones hidrófobas en la proteína, que se han comprobado de una manera indirecta con el estudio de la adsorción de DSS, fundamentalmente. Queda establecido que aquellos parámetros que favorecen la interacción hidrófoba incrementarán la adsorción de tensioactivos sobre la proteína. En general, las mismas causas que fomentan la formación de zonas hidrófobas en la proteína, están actuando en el mismo sentido en la adsorción del tensioactivo sobre la proteína.

Al igual que en los estudios realizados con otras proteínas (Steinhardt, 1969; Tanford, 1980) ha quedado demostrado globalmente la existencia de las interacciones hidrófobas en la proteína colagénica. En los apartados que siguen se profundizará en los mecanismos que gobiernan la interacción de los tensioactivos sobre el colágeno, estableciendo previamente las condiciones que favorecen la adsorción de tensioactivos de naturaleza no iónica.

3.3.- ADSORCIÓN DE TENSIOACTIVOS NO IÓNICOS

3.3.1.- Adsorción de mezclas de tensioactivos

Como ya se ha comentado, cuando se estudia por separado la adsorción de tensioactivos iónicos y no iónicos sobre el colágeno (pp) se encuentra que la adsorción de los tensioactivos iónicos depende del pH (fig. 3.1), y que los tensioactivos no iónicos no se adsorben.

Con el fin de analizar el efecto de la presencia simultánea de tensioactivos aniónicos y no iónicos en el medio, se ha planteado en primer lugar el estudio de adsorción de mezclas de estos tensioactivos sobre polvo de piel como paso previo al análisis de la adsorción secuencial, que será el principal objetivo de este apartado.

Para realizar este estudio preliminar se ha utilizado una mezcla de tensioactivos, aniónico, dodecil sulfato sódico (DSS), y no iónico, alcohol graso polioxietilenado con 8.5 moles de óxido de etileno (ALOE85).

En primer lugar, se ha efectuado un estudio cinético a pH 2.2, para la proporción molar ofrecida (2:1) de tensioactivos aniónico (1.8 mmol/g pp) y no iónico (0.9 mmol/g pp) (fig. 3.12). Como se puede apreciar el equilibrio se alcanza rápidamente, siendo de destacar el hecho de que se produzca un nivel de adsorción significativo del tensioactivo no iónico.

Una vez que se han fijado las condiciones que determinan el equilibrio de adsorción de la mezcla a pH ácido,

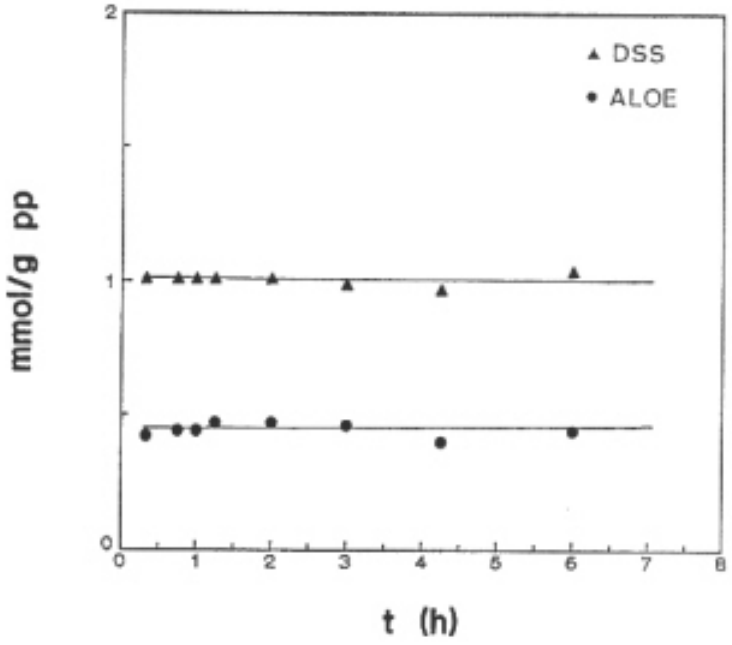


Figura 3.12.- Cinética de adsorción sobre pp de una mezcla de DSS y ALOE85 para una relación molar 2:1, a pH 2.2.

donde la unión del tensioactivo aniónico está favorecida, se ha procedido al estudio del comportamiento frente al pH, de una mezcla de DSS y ALOE85 en proporción 1:5 (se ofrecen 0.6 y 3.0 mmol/g pp de los tensioactivos aniónico y no iónico respectivamente) (fig. 3.13). La elección de esta proporción viene determinada por dos motivos: el primero, es que la cantidad de DSS presente en el medio no supere la capacidad de intercambio iónico de la proteína (Bowes, 1948), con lo cual se intenta eliminar las posibles competencias entre el tensioactivo iónico y no iónico por otros tipos de interacciones, que no sean de carácter iónico. Y segundo, que la suma de la cantidad inicial de ambos tensioactivos sea similar a la que se ofrece en el proceso de adsorción del DSS únicamente, con lo cual se podría comparar el nivel de adsorción en ambos casos.

En la figura 3.13 se observa la existencia de una elevada adsorción del tensioactivo no iónico en el intervalo de pH de 2 a 8, coincidiendo con la del tensioactivo aniónico. Sin embargo, a pH superiores a 8 la adsorción tanto del aniónico como del no iónico no tiene lugar, lo cual indica la interrelación existente entre las adsorciones de ambos tensioactivos. Por otro lado, si se compara la adsorción global de la mezcla de tensioactivos con la que tiene lugar cuando sólo se adsorbe el DSS (fig. 3.14), se comprueba que la adsorción total de la mezcla, a pH ácidos, es mayor, lo que pone de manifiesto que el tensioactivo no iónico tiene una afinidad más elevada por la proteína que el propio iónico, en el ámbito de las interac-

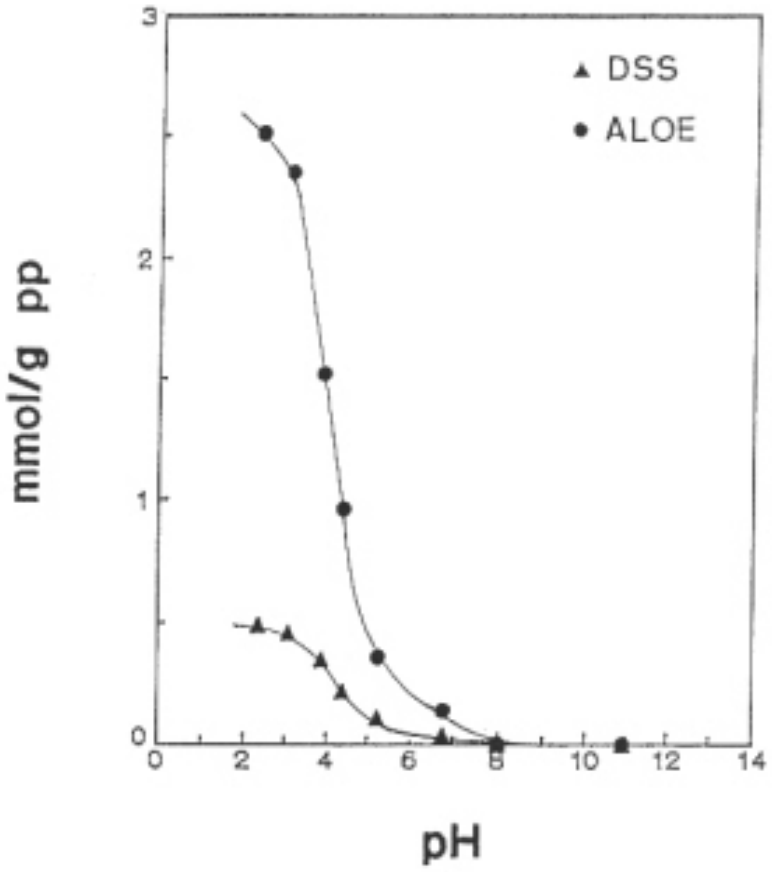


Figura 3.13.- Adsorción sobre pp de una mezcla de DSS y ALOE85 para una relación molar 1:5, en función del pH.

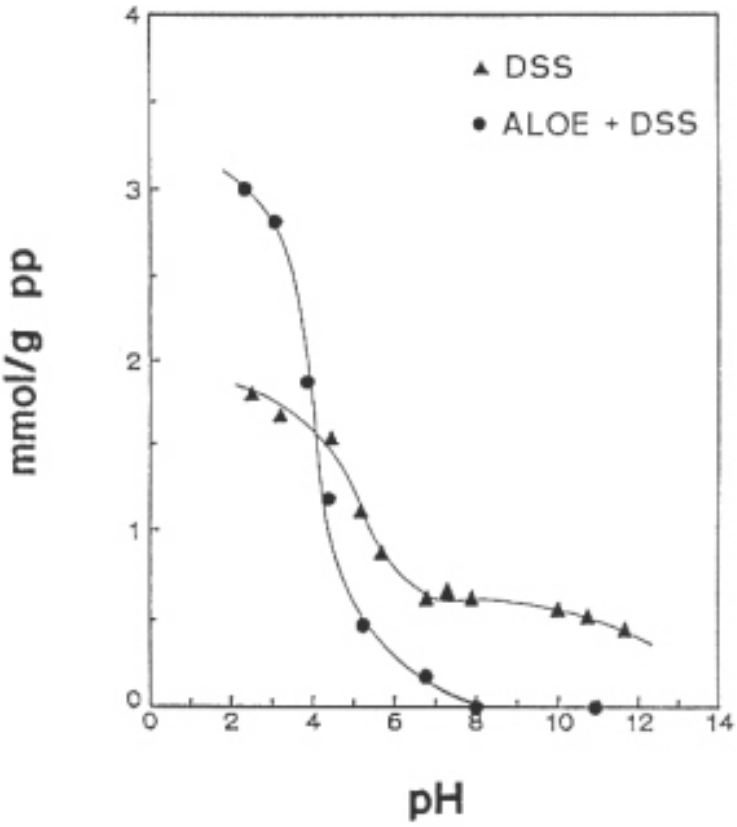


Figura 3.14.- Estudio comparativo sobre pp entre la adsorción de DSS y la adsorción total de una mezcla de DSS y ALOE85 en la relación molar 1:5, en función del pH.

ciones secundarias o interacciones hidrófobas "puras". Este diferente comportamiento se puede explicar por la ausencia de carga en el tensioactivo no iónico que permitirá una mayor adsorción al no existir la posibilidad de que se produzcan repulsiones electrostáticas.

3.3.2.- Adsorción secuencial de tensioactivos

Una vez comprobado que los tensioactivos no iónicos pueden adsorberse sobre polvo de piel cuando se produce la interacción simultánea de un tensioactivo aniónico con el mismo sustrato, se ha procedido a estudiar la adsorción secuencial de tensioactivos aniónicos y no iónicos, centrándose, en los primeros experimentos, en el DSS como tensioactivo aniónico, y ALOE85 como no iónico.

En primer lugar, se ha estudiado la influencia de la cantidad adsorbida de DSS (se ofrece entre 0.05 y 1.7 mmol/g pp), en la posterior adsorción de ALOE85, a pH 2.5, 3.0 y 3.7, respectivamente. La cantidad de ALOE85 ofrecida es de 2 mmol/g pp a pH 3.0 y 3.65, y de 4 mmol/g pp a pH 2.5 (ver procedimiento en 2.3.7). Como puede observarse, en las figuras 3.15 y 3.15a, existe una clara dependencia entre la cantidad de DSS previamente adsorbida en la proteína y la cantidad que se adsorbe de tensioactivo no iónico, produciéndose un máximo en la adsorción de este último, que es función del pH. De esta forma se pone de manifiesto la interrelación entre una interacción primaria, producida cuando se adsorbe el DSS, fundamentalmente de carácter

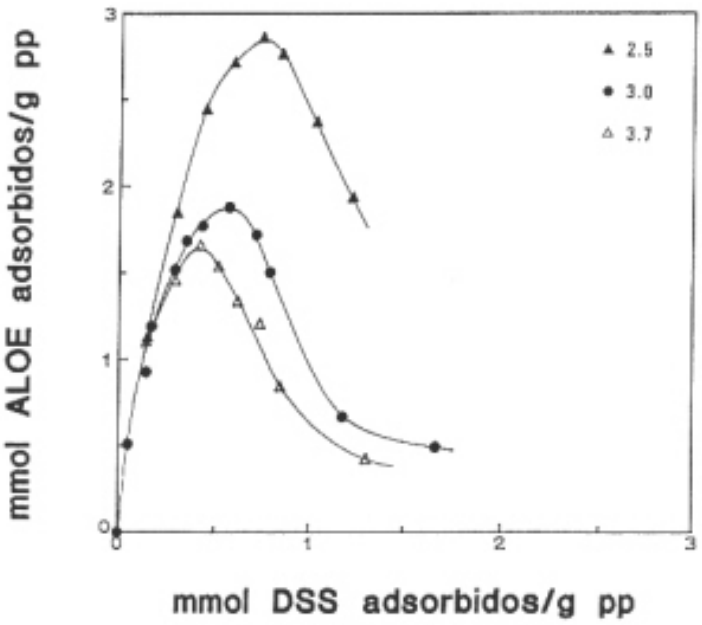


Figura 3.15.- Adsorción de ALOE85 sobre pp que tiene previamente adsorbido diferentes cantidades de DSS (tratamiento secuencial). El estudio se realiza a pH 2.5, 3.0 y 3.7, respectivamente.

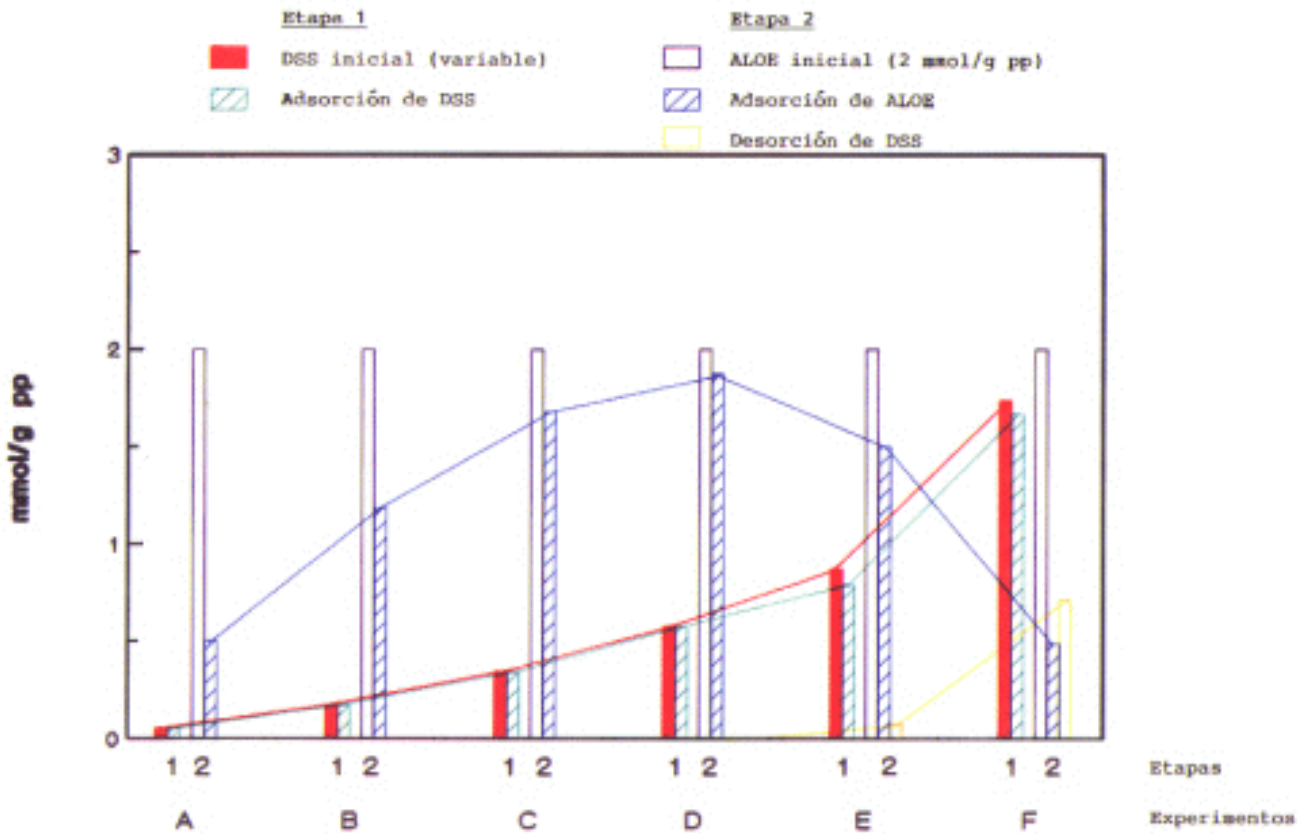


Figura 3.15a.- Representación esquemática alternativa, mediante diagrama de barras, del tratamiento secuencial a pH 3.0 correspondiente a las figuras 3.15 y 3.16. En este caso, para facilitar la comprensión del fenómeno sólo se representan parte de los valores experimentales.

iónico e hidrófobo, y una segunda adsorción de ALOE85, que necesariamente sólo puede tener carácter hidrófobo, dada la propia naturaleza química del tensioactivo no iónico.

El máximo que aparece en la figura 3.15 viene a marcar la diferencia entre los dos tipos de interacción. Así, a la izquierda del mismo se produce una adsorción irreversible de los dos tensioactivos, tanto en el caso de las uniones iónicas como hidrófobas, mientras que a la derecha del máximo la adsorción transcurre a través de mecanismos reversibles como se deduce de los datos experimentales de desorción de DSS durante el proceso de adsorción del no iónico, reflejados en la figura 3.16. Esta desorción, dado que los pH de trabajo son ácidos, debe provenir del tensioactivo aniónico unido por interacción hidrófoba. Dicha desorción puede estar provocada por el propio tensioactivo no iónico, que al ser mayoritario en concentración, puede desplazar en parte el tensioactivo aniónico de sus centros de enlace hidrófobos iniciales, aunque también podría pensarse en un desplazamiento del tensioactivo aniónico al seno de la disolución para la formación de las micelas mixtas, que en estas condiciones pueden estar favorecidas.

Siguiendo dentro del ámbito de la adsorción secuencial se han analizado otros factores que han sido considerados de interés para facilitar la comprensión del fenómeno:

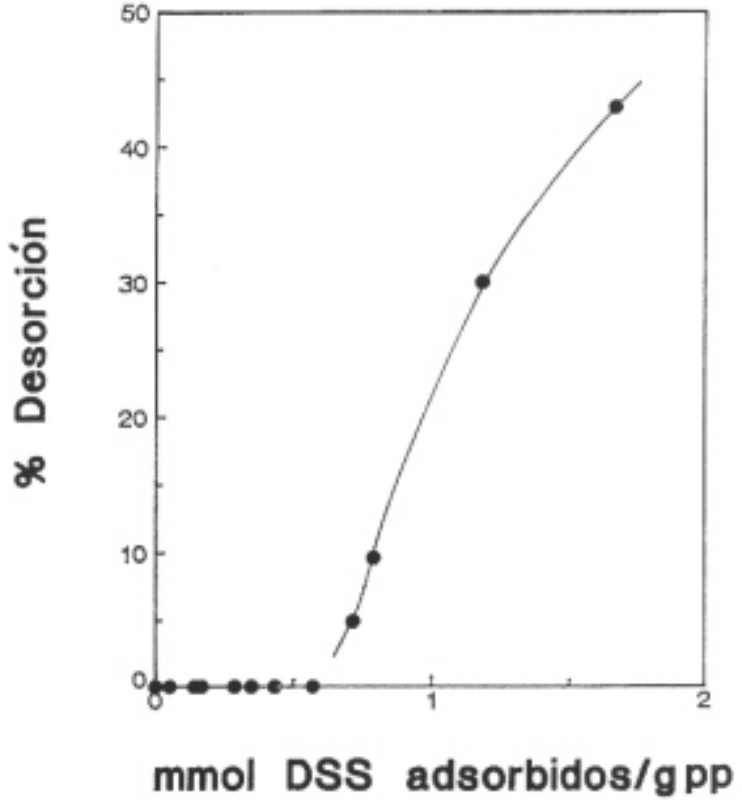


Figura 3.16.- Desorción del tensioactivo aniónico, DSS, en presencia de ALOE85, en el tratamiento secuencial sobre polvo de piel, 2 horas de equilibrio y pH 3.0.

a) **Isotermas de adsorción.** Para estudiar la capacidad de adsorción del tensioactivo no iónico, se han realizado isotermas de adsorción en condiciones similares a las que se determinó la existencia de un máximo a pH 3.0, es decir, se ha procedido a una primera adsorción de DSS (0.6 mmol/g pp), y posteriormente, se ha llevado a cabo la isoterma de adsorción del tensioactivo no iónico ofreciendo cantidades variables del mismo, comprendidas entre 0.7 y 4.5 mmol/g pp. En la figura 3.17 se representan las isotermas obtenidas a dos temperaturas (25 y 35°C). La forma de estas curvas indican también una alta afinidad del tensioactivo no iónico sobre la proteína que tiene adsorbido el tensioactivo aniónico. El hecho de que las cantidades adsorbidas aumenten con la temperatura corrobora que la adsorción está regida por interacciones de tipo hidrófobo, ya que dado el carácter endotérmico de las mismas, se ven favorecidas por un aumento de la temperatura.

b) **Polaridad del medio.** Para confirmar el carácter hidrófobo de las interacciones, resulta determinante estudiar la influencia de la polaridad del medio, ya que estas interacciones se ven favorecidas fundamentalmente en medio acuoso. En este sentido, se ha efectuado un estudio de adsorción del tensioactivo no iónico (se ofrecen 2 mmol/g pp) en las condiciones más favorables, a pH 3.0 y con una cantidad adsorbida previamente de ten-

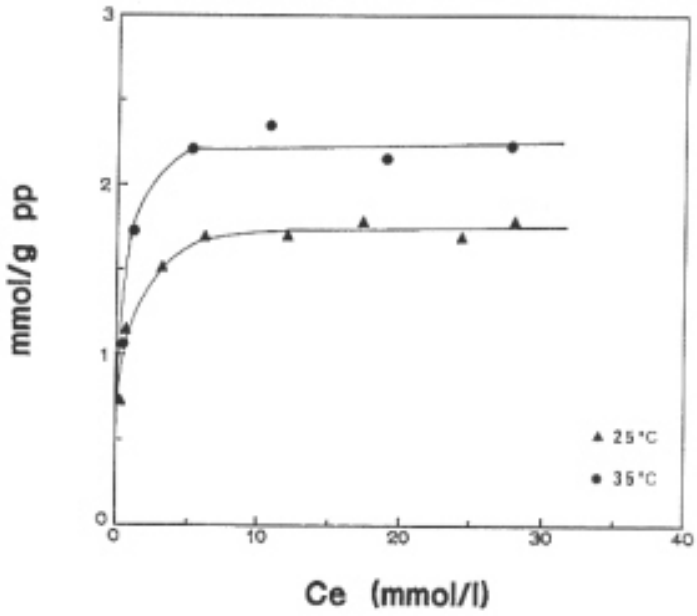


Figura 3.17.- Isotermas de adsorción de ALOE85 sobre polvo de piel, en las condiciones del máximo del tratamiento secuencial, a distintas temperaturas y pH 3.0.

sioactivo aniónico (se ofrecen 0.6 mmol/g pp), pero variando la polaridad del medio mediante el uso de mezclas etanol-agua (entre 0 y 50% en etanol).

Efectivamente, se comprueba que a medida que aumenta la proporción de etanol en el medio, la adsorción del tensioactivo no iónico disminuye, llegando a anularse cuando la relación etanol-agua es del 40% aproximadamente (fig. 3.18). Esta disminución de la adsorción del tensioactivo no iónico puede deberse a dos fenómenos. En primer lugar, se tiene una disminución de la interacción hidrófoba de este tensioactivo al aumentar la presencia de etanol en el medio, pues en estas condiciones se ve desfavorecida. En segundo lugar, y como se puede observar en la figura 3.19, este mismo medio etanólico propicia la desorción parcial del DSS que ya estaba adsorbido, fenómeno que a su vez se ve favorecido por la presencia del no iónico, llegando a desorberse el 50% del DSS. En consecuencia, este hecho influirá en el comportamiento observado en la adsorción del tensioactivo no iónico, ya que como se ha puesto de manifiesto, ambos procesos están íntimamente relacionados.

c) **Influencia de la estructura de la cadena hidrocarbonada y del número de grupos de óxido de etileno.** Por último, resulta interesante comprobar el efecto de la estructura de la cadena hidrocarbonada y del número de grupos de óxido de etileno del tensioactivo no iónico sobre su

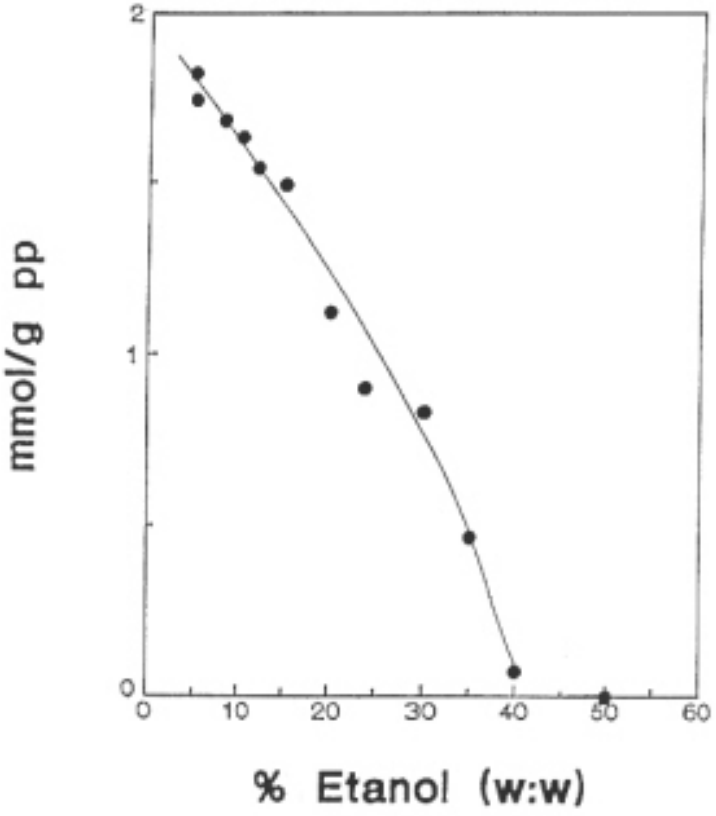


Figura 3.18.- Influencia de la polaridad del medio en la adsorción sobre polvo de piel de ALOE85, en las condiciones del máximo del tratamiento secuencial, a pH 3.0.

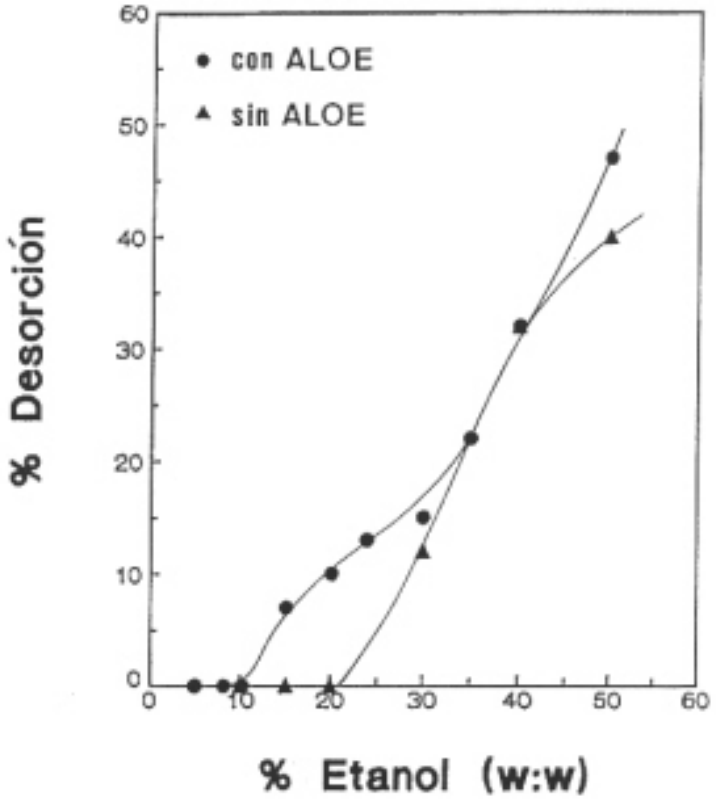


Figura 3.19.- Desorción de DSS en función de la polaridad del medio en las condiciones del máximo del tratamiento secuencial, sobre polvo de piel, 2 horas de equilibrio y pH 3.0.

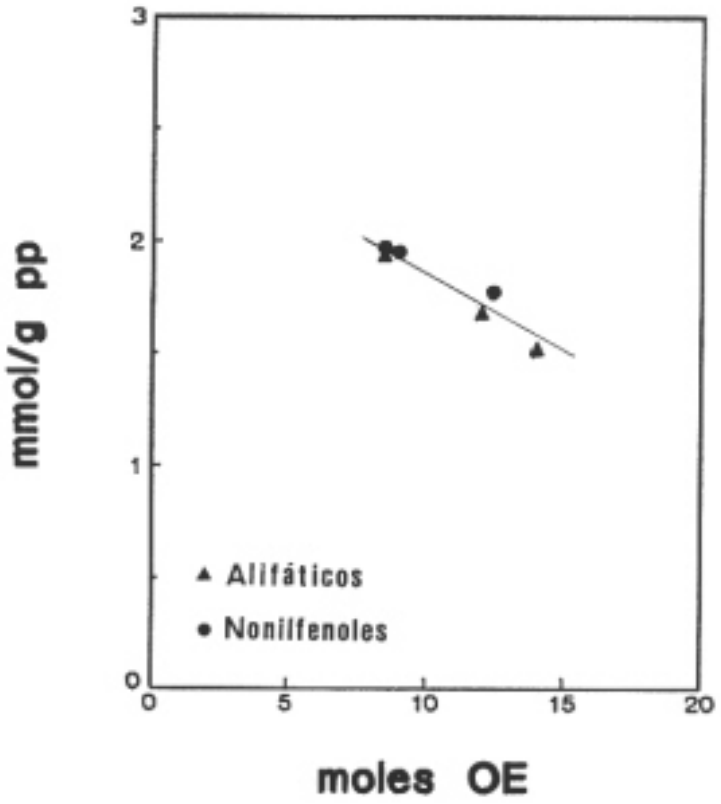


Figura 3.20.- Adsorción sobre polvo de piel, de distintos tensioactivos no iónicos, en las condiciones del máximo del tratamiento secuencial, en función del número de moles de óxido de etileno (OE) presentes en su cadena hidrocarbonada. Los tratamientos se realizan a pH 3.0.

comportamiento en la adsorción secuencial. Para ello, se ha distinguido entre compuestos con cadenas de carácter aromático y alifático, que contienen números de moles de óxido de etileno comprendidos entre 8.5 y 14. Las condiciones de tratamiento son las determinadas en el máximo de adsorción observado en el tratamiento secuencial con DSS y ALOE85 (pH 3.0, y 0.6 mmol ofrecidos de DSS/g pp); el estudio comparativo se ha llevado a cabo ofreciendo 2 mmol/g pp, de cada uno de los tensioactivos no iónicos. Los resultados obtenidos se representan en la figura 3.20, comprobándose que las cantidades adsorbidas de los tensioactivos no iónicos descienden cuando estos tensioactivos contienen un mayor número de grupos de óxido de etileno en su molécula. Tal hecho está relacionado con el carácter hidrófobo de la interacción, ya que al aumentar la polaridad de la cadena con el número de óxidos de etileno, ésta se ve menos favorecida. Sin embargo, cuando se varía el carácter de la cadena hidrocarbonada (alifática, o alifática-aromática) del tensioactivo no se aprecian diferencias significativas en la adsorción.

3.4.- INTERPRETACIÓN DE LA INTERACCIÓN TENSIOACTIVO/COLÁGENO: MECANISMO PROPUESTO

A partir de toda la información obtenida en la experimentación que se ha llevado a cabo, se ha elaborado una propuesta de mecanismo para interpretar globalmente el fenómeno de adsorción de tensioactivos sobre el colágeno.

En primer lugar, mediante estudios de la dependencia con la temperatura, polaridad del medio y presencia de electrolitos, ya se ha confirmado que además de las interacciones iónicas, deben existir otras de carácter hidrófobo responsables de la adsorción en exceso del tensioactivo.

En el estudio secuencial DSS/no iónico ha quedado demostrado que después de la adsorción del tensioactivo aniónico se puede dar la adsorción hidrófoba "pura" al observarse la fijación del tensioactivo no iónico.

Centrándose ahora en el análisis de las isotermas de adsorción de DSS sobre polvo de piel, en iguales condiciones, a pH 3.0 y pH 10.0 respectivamente (fig. 3.6), es decir, por encima y por debajo del punto isoeléctrico de la proteína, se va a tratar de establecer el mecanismo que rige las interacciones (iónica e hidrófoba), que intervienen en el proceso.

Como ya se puso de manifiesto en el apartado 3.2.2 existían dos zonas bien diferenciadas en estas isotermas separadas por la concentración micelar crítica del tensioactivo, que se analizarán a continuación, en función del objetivo marcado.

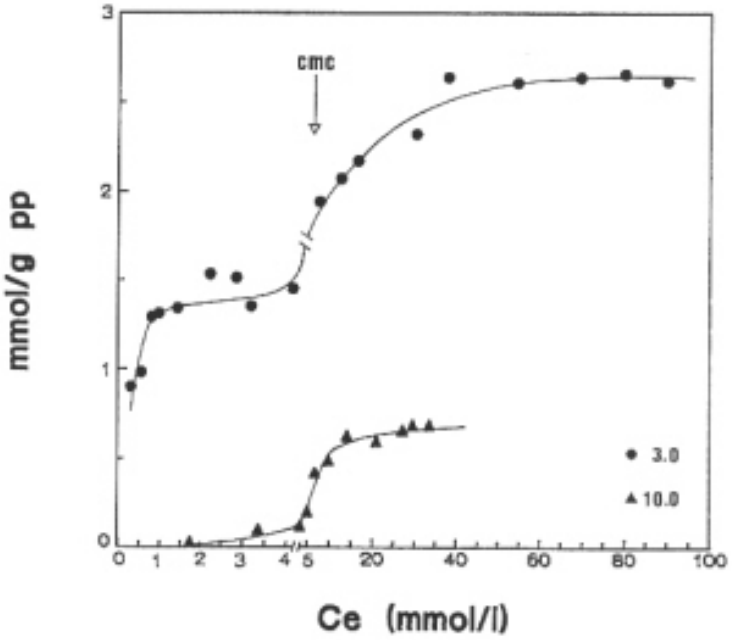


Figura 3.6.- Isotermas de adsorción de DSS sobre pp, a pH 3.0 y a pH 10.0.

a) **Concentraciones inferiores a la concentración micelar crítica.** Centrándose en la primera meseta de la isoterma a pH ácido (fig. 3.6) por debajo de la CMC, donde el tensioactivo debe encontrarse en forma de monómero se comprueba que:

a) El nivel de adsorción de tensioactivo (1.4 mmol/g pp), supera la capacidad total de interacción con los grupos básicos de la proteína (aprox. 0.9 meq/g de colágeno), siendo esta diferencia aún mayor a pH 3.0, en el que se realiza la isoterma, en el cual los grupos básicos reactivos son del orden de 0.7 meq/g de colágeno (Bowes, 1948).

b) En la zona considerada, la máxima adsorción se alcanza a concentraciones de equilibrio de un orden de magnitud inferior a la CMC del DSS.

c) Después de realizar sucesivas experiencias de desorción con agua a pH 3.0 sobre polvo de piel tratado, todo el tensioactivo fijado permanece en la proteína, lo que es indicativo de una unión de tipo irreversible.

Por tanto, es evidente, que esta adsorción no puede explicarse exclusivamente por la intervención del enlace iónico, por lo que debe existir otro tipo de interacción que permita interpretar la fijación del exceso de tensioactivo. Se deben descartar uniones de fuerza similar a las que se presentan en la formación de

micelas, y ello por dos razones principales: porque la adsorción se produce a concentraciones de equilibrio situadas muy por debajo de la MC del DSS, y porque la formación de micelas implica un equilibrio entre la micela y los monómeros, aspecto que no se da en este caso puesto que no se observa desorción.

A modo de simplificación, la variación del carácter de los centros iónicos de la proteína con el pH puede representarse como se indica en la figura 3.21, donde el eje central representa un segmento de la triple hélice del colágeno, que soporta los grupos ácidos y básicos, y las cadenas laterales apolares que vienen indicadas por los pequeños tramos transversales.

Antes de seguir adelante con otros resultados, se propone un esquema sencillo para representar el mecanismo de las interacciones que tienen lugar en la zona de la isoterma que se está considerando (fig. 3.22).

En primer lugar se produce una atracción de tipo electrostático entre el tensioactivo y el grupo básico de la proteína colagénica. El siguiente paso después de este acercamiento previo es la interacción de tipo hidrófobo entre la cadena hidrocarbonada de la misma molécula de tensioactivo y las regiones apolares de la proteína. El conjunto de ambas interacciones, iónica e hidrófoba, constituye lo que se denomina **adsorción primaria** (AP).

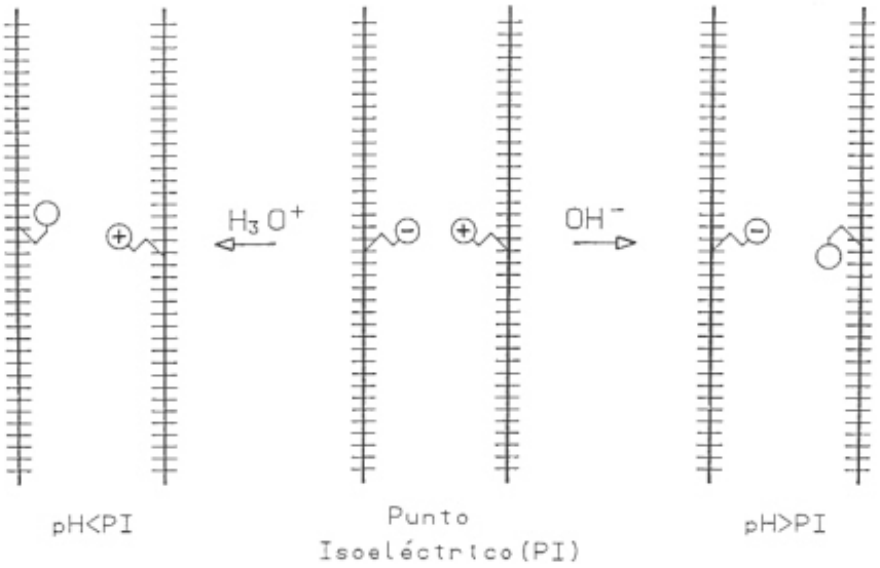


Figura 3.21.- Representación esquemática de la proteína colagénica y de las modificaciones que sufre el enlace iónico en función del pH. Cada eje principal representa un segmento de la triple hélice del colágeno, que soporta los grupos ácidos y básicos, y las cadenas laterales apolares, representadas por los pequeños tramos transversales.

Esta disposición "paralela" del tensioactivo sobre la molécula de proteína globular fue comprobada por Oakes (1973) utilizando la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN).

La interacción hidrófoba contribuye en gran medida a la fuerza de la AP del tensioactivo sobre el colágeno aunque en el caso de la proteína nativa, el primer e imprescindible paso sea el enlace electrovalente.

En la figura 3.22 se observa que los tramos cruzados se "compactan", pretendiendo indicar con ello que la incorporación del tensioactivo realza la hidrofobicidad de las regiones no polares ya existentes en la proteína. En el tratamiento cuantitativo de las propiedades termodinámicas del enlace hidrófobo, realizado en 1962 por Nemethy y Scheraga, se comentaba la posibilidad de la formación de regiones hidrófobas. Estas zonas se originarían por el agrupamiento de varias cadenas laterales pertenecientes a diferentes cadenas polipeptídicas, donde las moléculas de agua estarían completamente excluidas. Cabe esperar que la larga porción hidrocarbonada de los tensioactivos que han interaccionado con la proteína según el proceso de adsorción primaria (fig. 3.22) colabore en la creación de estas regiones hidrófobas, actuando de puente, y formando parte de las mismas, favoreciendo el acercamiento de gran número de cadenas

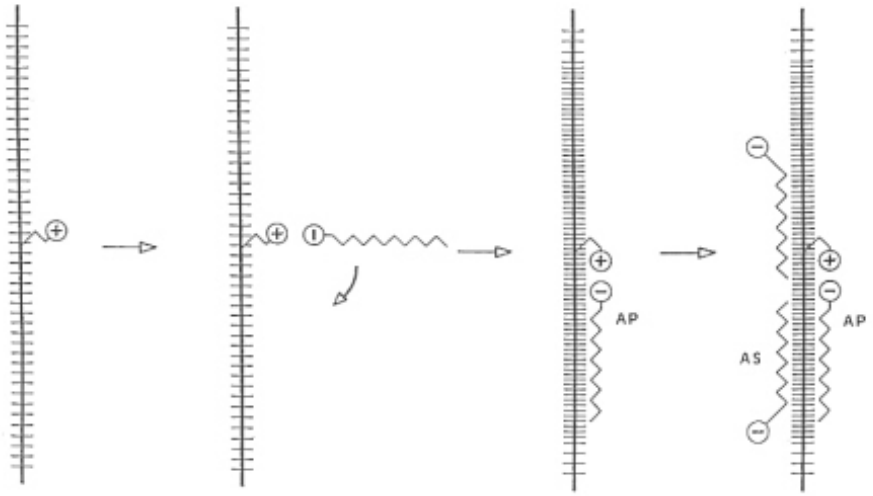


Figura 3.22.- Esquema del mecanismo de adsorción de un tensioactivo aniónico sobre la proteína colagénica.

laterales apolares de la proteína. Estas zonas poseerían una gran afinidad por otras moléculas del propio tensioactivo, o por otras sustancias no polares o con porciones hidrocarbonadas en su molécula, favoreciéndose de esta forma el fenómeno que se denominará **adsorción secundaria** (AS).

La AS puede ser considerada de algún modo consecuencia de un proceso cooperativo, entendiendo éste como un mecanismo donde la ocupación de un centro de enlace afecta de alguna forma a las propiedades de otros centros (Schwarz, 1970).

La adsorción secundaria puede estar constituida, incluso, por tensioactivo no iónico, que en principio no se adsorbe en la proteína nativa. Sin embargo, cuando se realiza una adsorción previa de tensioactivo aniónico (DSS), como ya se ha comentado con detalle en apartados anteriores, sí que se observa la adsorción del tensioactivo no iónico, en cantidades incluso superiores en masa a la proteína que actúa de adsorbente.

En la figura 3.23 se presenta esquemáticamente, la aplicación del mecanismo propuesto a este tratamiento secuencial donde se aprecia de una forma más ilustrativa, la importancia de los entornos o zonas hidrófobas que se pueden desarrollar o crear en la proteína, gracias al tratamiento previo controlado con determinadas moléculas de tensioactivo.

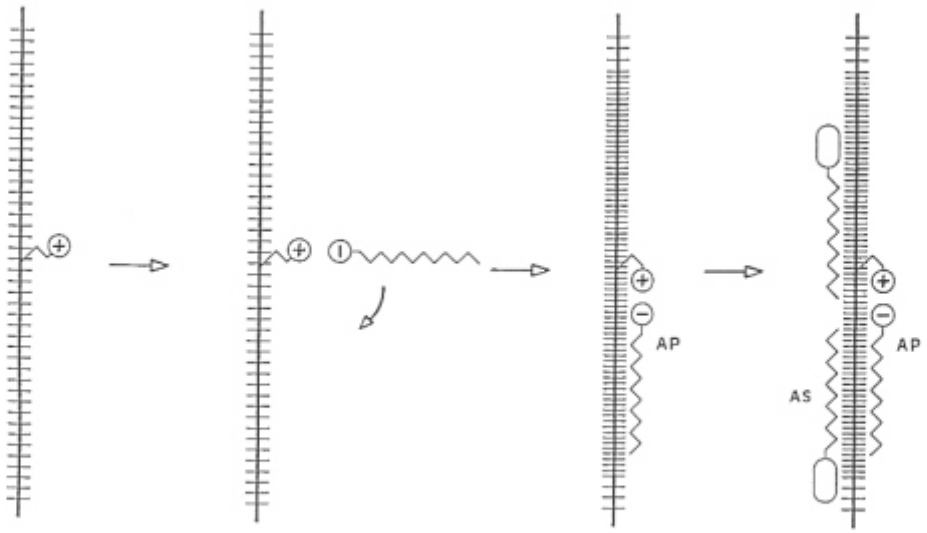


Figura 3.23.- Esquema del mecanismo de adsorción secuencial de los tensioactivos aniónico y no iónico sobre la proteína colagénica.

b) **Concentraciones superiores a la concentración micelar crítica.** En la segunda zona de las isotermas (fig. 3.6), donde se trabaja a concentraciones más altas de tensioactivo, se puede producir un fenómeno de competencia, incluso a pH básicos, entre las cabezas polares de los tensioactivos y los grupos carboxílicos cargados de la proteína, por la interacción con los grupos positivos de la misma. Así, a partir de un cierto nivel de concentración puede llegar a darse la interacción iónica e hidrófoba del tensioactivo con estos grupos positivos de la proteína (adsorción primaria) y una vez que ésta tiene lugar, y como ocurre en la primera zona de la isoterma, se producirá una ulterior interacción hidrófoba (adsorción secundaria).

En el esquema (fig. 3.24) se ilustra el mecanismo de este fenómeno en el supuesto de que la proteína se encuentre en el punto isoeléctrico. No obstante, no se puede descartar, que en estas condiciones, a concentraciones más elevadas, se produzca "adsorción micelar" o formación de "pseudomicelas" en la superficie de la proteína, fenómeno descrito en la bibliografía cuando se estudian otros sustratos; aunque recientemente, otros autores (Chattoraj, 1984), consideran que la existencia de complejos micela-proteína no es posible desde un punto de vista estrictamente termodinámico.

Estudios de desorción (a pH 3.0 y 10.0) (fig. 3.25) indican la reversibilidad de las interacciones

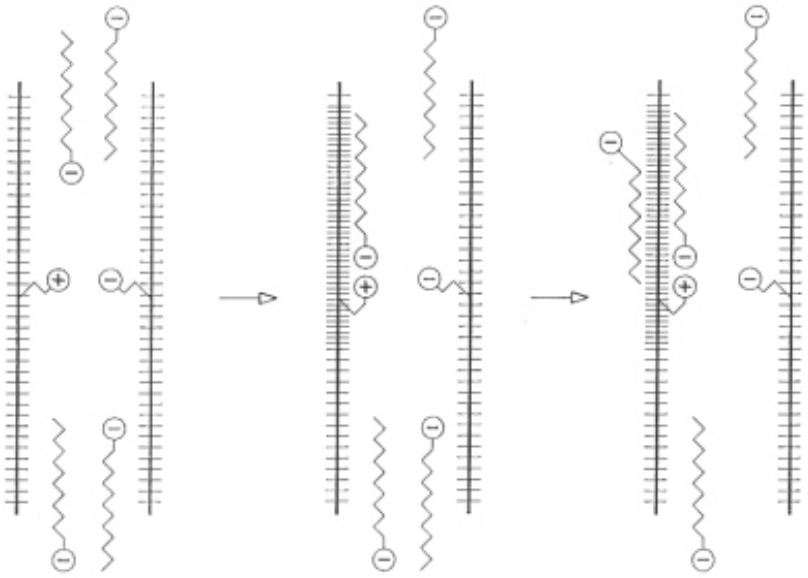


Figura 3.24.- Esquema de adsorción de un tensioactivo aniónico a concentraciones superiores a su CMC, en el punto isoeléctrico de la proteína.

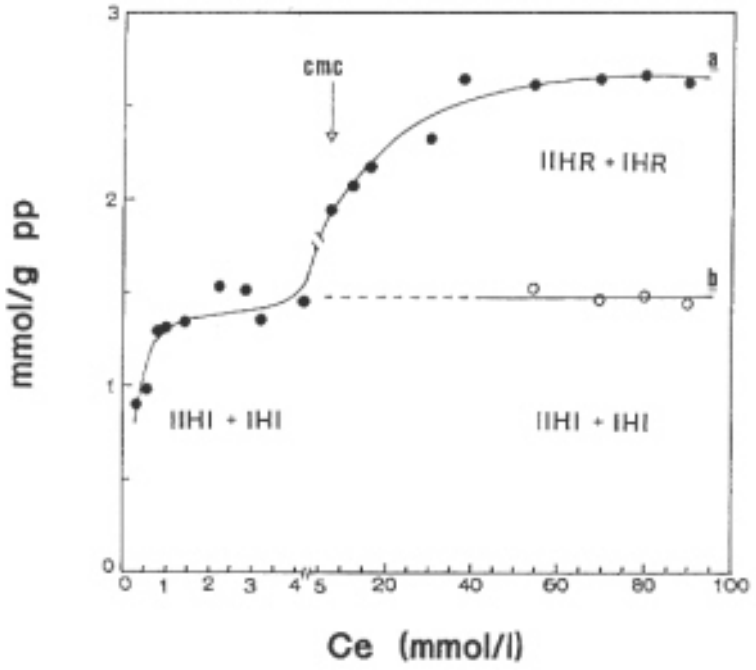


Figura 3.25.- Estudio de desorción en la isoterma de adsorción de DSS sobre polvo de piel a pH 3.0 y 25°C. (a) Adsorción total: (b) DSS en el sustrato después de la desorción.

tanto iónicas como hidrófobas que tienen lugar en la segunda zona de la isoterma, lo cual está plenamente de acuerdo con el hecho de que esta adsorción se produzca por un efecto de concentración. En el caso de la isoterma a pH 3.0, la desorción observada se corresponde con la diferencia entre las curvas a y b, mientras que en la isoterma a pH 10.0 se desorbe todo el tensioactivo fijado. En consecuencia, se podría concluir indicando que además de la existencia de las interacciones iónicas e hidrófobas, la adsorción puede tener un carácter irreversible o reversible en función del intervalo de concentración considerado, y del pH del medio, según se encuentre por encima o por debajo del punto isoeléctrico (PI) de la proteína.

3.5.- EVIDENCIAS COMPLEMENTARIAS SOBRE EL EFECTO HIDRÓFOBO EN EL COLÁGENO

A modo de ejemplo, se presentan a continuación algunos resultados experimentales que pueden interpretarse en los términos del mecanismo propuesto.

3.5.1.- Comprobaciones experimentales sobre la adsorción secundaria: hidrofobicidad

Otra evidencia experimental, que de una forma independiente, revela la existencia e importancia de la interacción hidrófoba, que constituye la adsorción secundaria mencionada anteriormente, es la que se desprende de los estudios sobre hidrofobicidad en polvo de piel.

Cuando se trata de polvo de piel en medio ácido (pH 3.0) con una cantidad de DSS suficiente para contrarrestar solamente cargas positivas de la proteína (por ejemplo con una relación pp/DSS de 1/0.5 en lugar de 1/4), sería de esperar que se alcanzase un cierto grado de hidrofobicidad, fundamentalmente por dos razones:

1) Se eliminan centros hidrófilos (grupos básicos positivos9
2) Se incorporan largas cadenas apolares a la proteína, tal como se representa esquemáticamente en el dibujo B de la figura 3.26.

Cuando se realiza este experimento se observa un agotamiento del tensioactivo a los pocos minutos de iniciado

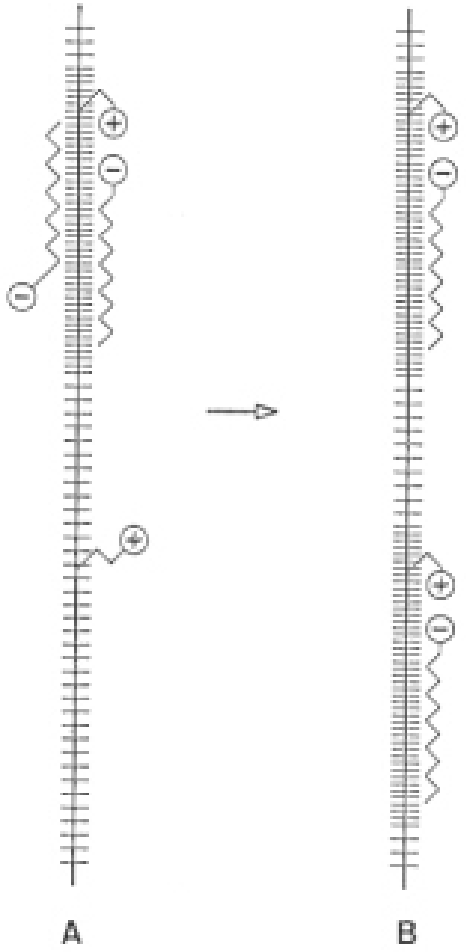


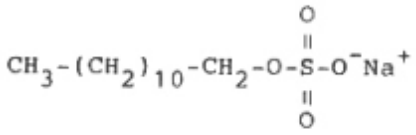
Figura 3.26.- Esquemas de adsorción para el estudio de hidrofobización.

el tratamiento y sin embargo, no se aprecian indicios de que se hayan modificado las características hidrófilas del polvo de piel, ya que se mantiene el mismo nivel de afinidad por el agua que tenía inicialmente. Se precisa prolongar el tiempo de tratamiento a 48 horas para observar un aumento de la repelencia al agua, que puede apreciarse a través del desplazamiento hacia la superficie del polvo de piel, donde permanece aún después de realizar una fuerte y prolongada centrifugación (aproximadamente a 4000 rpm).

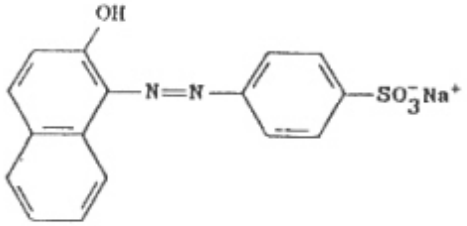
Para interpretar este fenómeno se puede recurrir a los esquemas de la mencionada figura 3.26. Cuando se añade el tensioactivo se produce indiscriminadamente adsorción primaria y secundaria, ya que las primeras moléculas de tensioactivo que se adsorben van a activar las zonas hidrófobas de la proteína, que favorecerán la interacción hidrófoba "pura" de las siguientes moléculas (esquema A). En consecuencia, en la proteína quedarán cargas libres, en un número equivalente a la cantidad de tensioactivo fijado por adsorción secundaria. Este tensioactivo adsorbido por AS es el responsable principal de la hidrofilia que presenta el polvo de piel. Sin embargo, cuando se deja tiempo suficiente, el tensioactivo unido de esta forma, presenta una tendencia termodinámica a una interacción más estable con el grupo básico (esquema B). La gran afinidad que también se presenta en la AS explica el retraso en alcanzarse la situación energéticamente más propicia.

3.5.2.- Importancia de la cadena hidrófoba en la interacción con la proteína colagénica

Con el fin de corroborar la importancia de las interacciones hidrófobas en el proceso de adsorción global sobre el colágeno, se ha estudiado desde un punto de vista comparativo el comportamiento del DSS con otro adsorbato potencial, el colorante azoico Anaranjado II (NII) de carácter aniónico y peso molecular similar:



DSS (PM = 288.3)



NII (PM = 350.3)

En el caso del DSS la naturaleza del resto no iónico de la molécula, es típicamente hidrófobo mientras que en el caso del colorante es de naturaleza más polar.

En primer lugar, al comparar el comportamiento de ambas sustancias cuando se adsorben sobre pp en función del pH (fig. 3.27) se aprecia claramente que el proceso está más favorecido en el caso del DSS que como ya se ha visto, llega a fijarse incluso a valores de pH superiores al punto

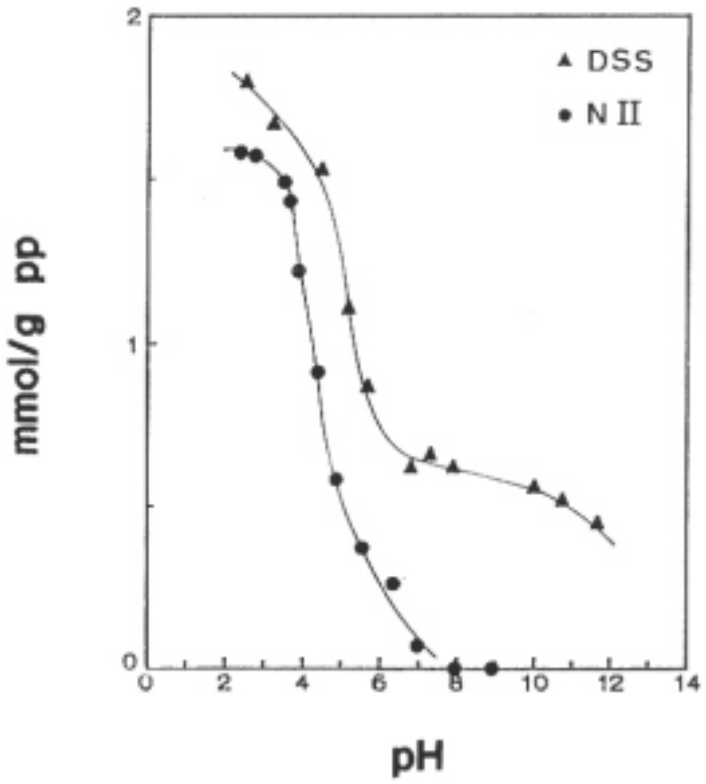


Figura 3.27.- Estudio comparativo sobre pp, entre la adsorción de DSS y el colorante Anaranjado II (NII), en función del pH.

isoeléctrico (PI) de la proteína. Para interpretar las diferencias observadas de acuerdo con los mecanismos propuestos, conviene considerar separadamente las zonas de pH superiores e inferiores al PI de la proteína:

* **Zona de pH inferior al PI:** En principio cabe esperar que el colorante NII no desarrolle las regiones hidrófobas de forma similar al DSS y por tanto la adsorción secundaria (puramente hidrófoba) no esté favorecida. Aunque se debe tener en cuenta que en el caso del colorante pueden darse interacciones de otros tipos con la proteína (dipolo-dipolo, puente de hidrógeno, por deslocalización de electrones, etc.), de ahí que las cantidades fijadas de colorante superen también la capacidad de intercambio iónico de la proteína, y los valores de adsorción se acerquen a los alcanzados por el DSS en la zona más ácida.

* **Zona de pH superior al PI:** Como ya se explicó, el DSS puede adsorberse en esta zona merced a la estabilización que confiere a la AP la interacción hidrófoba, de forma que el tensioactivo puede competir por los centros de enlace catiónicos con los grupos propios de la proteína. En el caso del NII esta estabilización adicional por interacción hidrófoba no se puede dar, aunque en la bibliografía relacionada con colorantes (Zollinger, 1987) se contempla en algún caso la posibilidad de interacciones hidrófobas con este tipo de sustancias.

Para comparar la estabilidad relativa de las uniones producidas entre el polvo de piel con el DSS y el NII se han efectuado dos experiencias a modo de adsorción secuencial con estas sustancias a pH 3.0:

1ª) Se fija DSS sobre el pp en cantidades pequeñas (entre 0.1 y 0.7 mmol/g pp) y a continuación se adsorbe el NII ofreciendo siempre la misma cantidad de colorante (2 mmol/g pp). En la figura 3.28 se representa la cantidad de NII adsorbido en esta segunda etapa en función del DSS previamente fijado.

2ª) Se fija NII sobre el pp en cantidades pequeñas (entre 0.1 y 0.7 mmol/g pp) y a continuación, se adsorbe el DSS ofreciendo siempre la misma cantidad de tensioactivo (2 mmoles/g pp). En la figura 3.29 se representa la cantidad de DSS adsorbido en esta segunda etapa en función del NII previamente fijado.

La simple comparación de las figuras 3.28 y 3.29 da una imagen cierta de la menor fortaleza de la unión NII-proteína frente a la unión DSS-proteína, pues en el primer caso (fig. 3.28) la cantidad de NII desciende proporcionalmente con la cantidad de DSS preadsorbido, de lo que se deduce que el colorante se adsorbe principalmente en los grupos básicos libres no ocupados por el DSS.

Esta menor fuerza de enlace se confirma además en el otro tratamiento secuencial (fig. 3.29) en donde el DSS desplaza al colorante, ya que el nivel de DSS adsorbido se

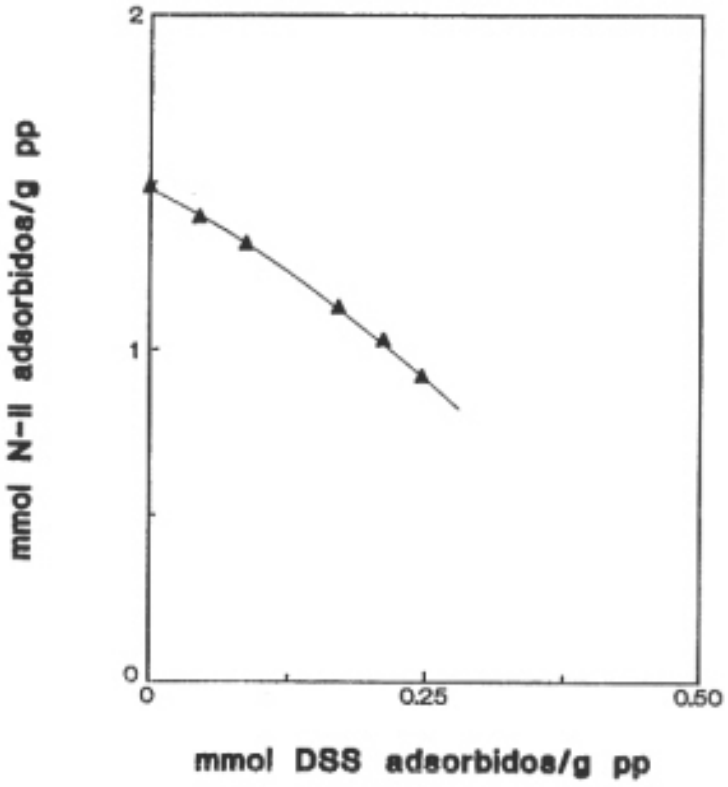


Figura 3.28.- Adsorción de NII sobre pp que tiene previamente adsorbido diferentes cantidades de DSS. Los tratamientos se realizaron a pH 3.0.

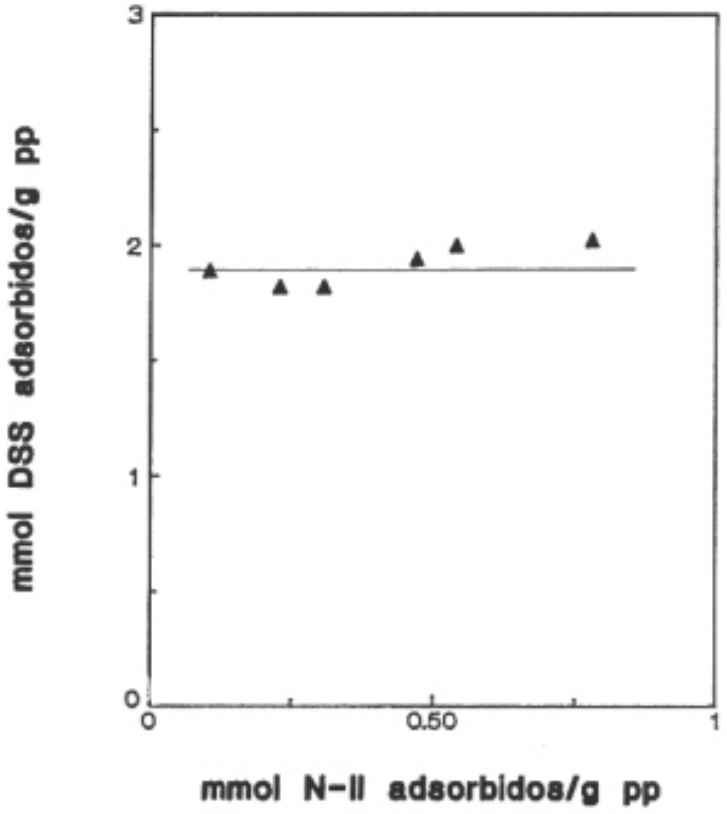


Figura 3.29.- Adsorción de DSS sobre pp que tiene previamente adsorbido diferentes cantidades de NII. Los tratamientos se realizaron a pH 3.0.

mantiene prácticamente constante siendo irrelevante la cantidad de colorante que se hubiera prefijado. Se observa, además, una desorción del NII en presencia del DSS del 80% de la cantidad inicialmente adsorbida.

En conclusión el DSS desplaza al NII de sus centros de enlace en el colágeno mientras que el NII no es capaz de desplazar al DSS aún cuando se encuentre en una proporción sensiblemente mayoritaria, de ahí la importancia de las interacciones hidrófobas que se ha demostrado que contribuyen en gran medida a la fortaleza de la unión de la sustancias que se adsorben sobre el colágeno.

3.5.3.- Influencia de la estructura molecular del tensioactivo en la adsorción sobre el colágeno

En la línea de lo anteriormente expuesto, y con el fin de determinar la importancia de las diferencias estructurales de los tensioactivos, se ha estudiado, desde un punto de vista comparativo, la adsorción de tensioactivos aniónicos con alguna variante en la cadena hidrocarbonada, respecto al DSS (fig. 3.30). En este estudio se incluyen tensioactivos que aunque no sean directamente comparables confirman las conclusiones finales. A medida que aumenta la polaridad de la cadena, ya sea por la presencia de anillos aromáticos (DBS), o por la incorporación de grupos de óxido de etileno (ALOES20), se aprecia, en relación al DSS, un descenso de la afinidad de los tensioactivos hacia la proteína, en todo el intervalo de pH estudiado. Se debe in-

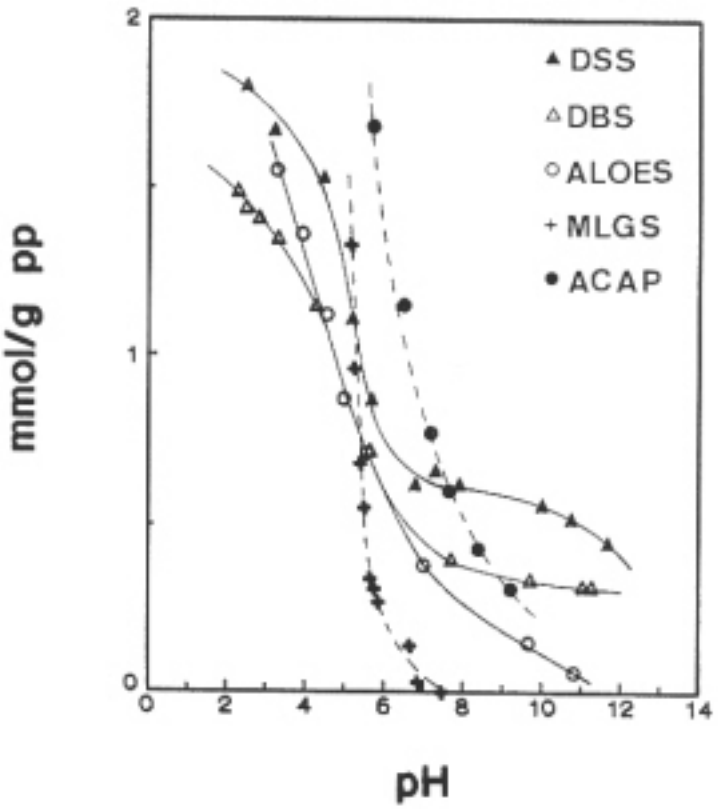


Figura 3.30.- Adsorción sobre pp, de distintos tensioactivos, en función del pH.
No presentan adsorción ALOE85 y CAPB.

dicar que el éter sulfato (ALOES20) es en realidad una mezcla de DSS, y moléculas de éter sulfato con uno o varios moles de óxido de etileno, y que el DBS además, tiene un grupo hidrofílico (sulfónico) distinto al grupo sulfato del DSS.

A título informativo se incluyen en la fig. 3.30 dos tensioactivos MLGS y ACAP que poseen un grupo carboxilo en su molécula, que aparentemente manifiestan una fijación muy elevada sobre la proteína en la zona de pH ácido, posiblemente favorecida por un notable descenso de su solubilidad en el medio ácido.

La no adsorción del tensioactivo anfótero (betaína) comentado anteriormente sería un caso extremo, donde incluso se presenta repulsión electrostática mutua debido a la zona de la molécula con carga positiva. Sin embargo, la causa de la no adsorción del tensioactivo no iónico se debe a la ausencia de carga en su molécula.

En la tabla 3.30a se muestra el desarrollo estructural de los tensioactivos estudiados y los valores de adsorción, tomados de las gráficas de la figura 3.30 a tres pH diferentes.

En consecuencia, se pone de manifiesto, una vez más, la importancia de las interacciones entre los grupos apolares dentro del proceso global de la adsorción, puesto que el dodecil sulfato sódico (DSS) que en su cadena carece de grupos con cierta polaridad es el que manifiesta precisamente una mayor afinidad por el colágeno. A falta de un estudio más completo, se puede decir que el DSS con su

Tabla 3.30a.- Desarrollo estructural y valores de adsorción sobre pp a pH 4.0, 7.0 y 9.0 de diferentes tensioactivos.

Resto hidrófobo común

$CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$

		pH		
		4.0	7.0	9.0
$-OSO_3^- Na^+$	DSS	1.56	0.63	0.56
	DBS	1.19	0.49	0.34
$-(OCH_2CH_2)_2-OSO_3^- Na^+$	ALOES20	1.35	0.38	0.20
$-\overset{O}{\overset{\|\|}{C}}-\underset{CH_3}{\underset{\|}{N}}-CH_2-COO^- Na^+$	MLGS	--	0.02	0.0
$-NH-CH_2-CH_2-COO^- Na^+$	ACAP	--	0.83	0.34
$-\overset{O}{\overset{\|\|}{C}}-NH-(CH_2)_3-\overset{CH_3}{\underset{CH_3}{\overset{+}{\underset{\|}{N}}}}-CH_2-COO^-$	CAPB	0.0	0.0	0.0
$-(OCH_2CH_2)_{15}-OCH_2-CH_2OH$	ALOES5	0.0	0.0	0.0

mmol tensioactivo/g pp

cadena lineal hidrocarbonada es el tensioactivo que presenta mayor adsorción y cualquier modificación en su estructura conduce a una reducción en su afinidad hacia la proteína.

3.6.- INFLUENCIA DE LA CURTICIÓN EN LA ADSORCIÓN

El amplio estudio realizado sobre polvo de piel ha permitido presentar una propuesta de los posibles mecanismos de adsorción de las sustancias tensioactivas sobre la proteína colagénica.

Pensando en la aplicación de estos estudios dentro del proceso de elaboración del cuero, el paso inmediato sería extender la investigación al uso de polvo de piel curtida como sustrato.

La curtición de la piel con sales básicas de cromo se consigue a través de la formación de complejos entre este metal y los grupos carboxílicos de la proteína colagénica dando lugar a enlaces intercadena (apartado 1.3.6). Esta reticulación de la proteína confiere una mayor rigidez a su estructura, que puede verse reflejada en su comportamiento frente a la adsorción de tensioactivos. El estudio del efecto comentado nos permitirá evaluar la aplicabilidad de los mecanismos propuestos para interpretar la adsorción de tensioactivos sobre piel sin curtir, en el caso de la piel curtida.

En primer lugar, se ha comprobado el comportamiento cinético de este sustrato frente a la adsorción de DSS (fig. 3.31). En principio parece que no existen grandes diferencias entre el comportamiento cinético de la piel antes y después de ser curtida, aunque parece que el tiempo para alcanzar el equilibrio es mayor con piel curtida, posiblemente debido a problemas de accesibilidad que cabe

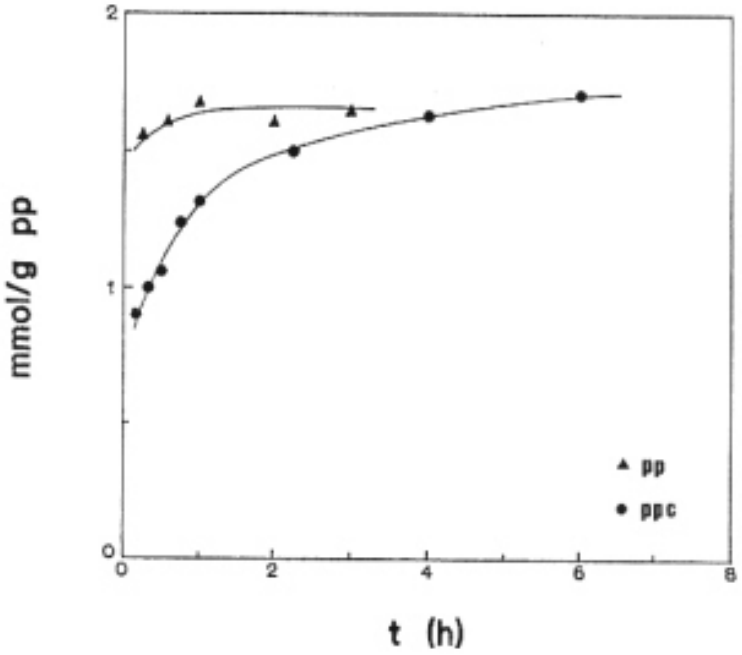


Figura 3.31.- Estudio comparativo de las cinéticas de adsorción de DSS sobre polvo de piel (pp) y polvo de piel curtida (ppc). Los tratamientos se realizaron a pH 2.6 y 2.8 respectivamente.

esperar en la interacción DSS-complejo de cromo, que se puede presentar en este sustrato.

Las curvas de adsorción de DSS sobre polvo de piel curtida (ppc) (a diferentes niveles de contenido en Cr_2O_3) y polvo de piel sin curtir (pp) en función del pH (fig. 3.32) presentan algunas diferencias, fundamentalmente en su forma. En el caso del ppc la evolución de la adsorción de DSS en función del pH se ajusta prácticamente a una línea recta de pendiente negativa, lo cual podría indicar una proporcionalidad entre la cantidad adsorbida de DSS y el pH.

En términos del mecanismo propuesto para el pp este comportamiento podría interpretarse de la siguiente forma: Se produce la adsorción primaria del tensioactivo, pero el aumento de la rigidez de la estructura podría provocar que no se desarrollasen completamente las regiones hidrófobas como ocurría en el pp, con lo cual la adsorción secundaria estaría poco favorecida. También hay que considerar el hecho de que en el caso del ppc el número de centros catiónicos de enlace para el DSS puede ser superior, debido a la presencia del complejo de cromo-colágeno, que en este sentido ejercería una influencia doble, por un lado, como el cromo interacciona primariamente con los grupos COO^-, existirán más grupos $^+NH_3$ libres, disponibles para enlazarse con el tensioactivo aniónico, y además no debe excluirse la posibilidad de que el tensioactivo se fije sobre el complejo de cromo. Estos dos hechos explicarían el aumento de

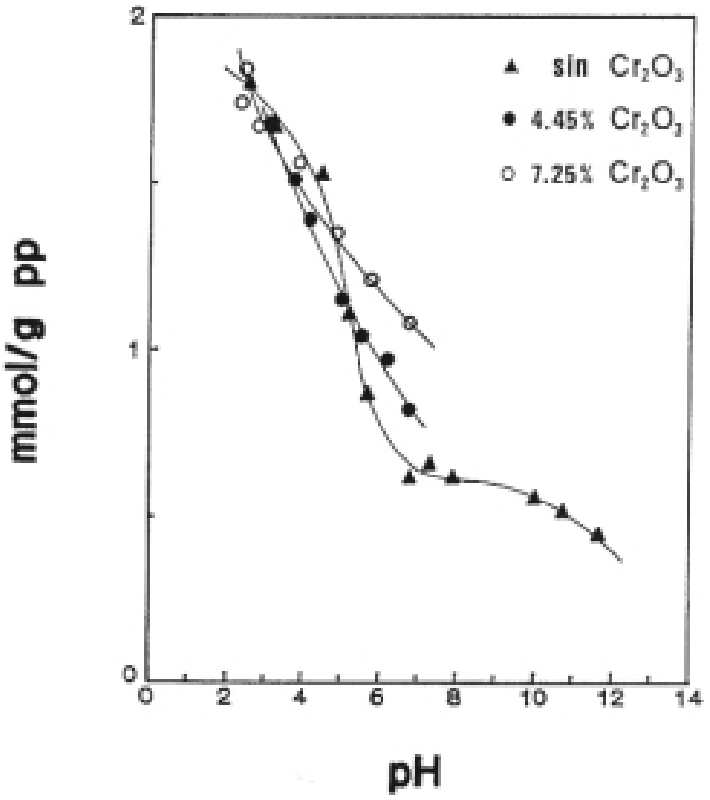


Figura 3.32.- Influencia del pH en la adsorción de DSS sobre polvo de piel con distintos contenidos en óxido de cromo (III).

adsorción de tensioactivo observado (fig. 3.32) a medida que el grado de curtición o el porcentaje de cromo introducido en la piel aumenta.

De particular interés resulta el análisis comparativo de la influencia de la presencia de electrolitos (Na_2SO_4 en este caso) en la adsorción de DSS sobre pp y ppc. Se observa un comportamiento radicalmente opuesto en los dos sustratos estudiados, mientras que la adsorción de DSS sobre el pp se ve enormemente favorecida por el medio salino (fig. 3.10), en el caso del ppc se aprecia una disminución en las cantidades de DSS adsorbidas conforme aumenta la concentración de Na_2SO_4 (fig. 3.33), aunque en términos relativos el aumento de adsorción sobre el pp es más notorio que el descenso observado en el caso del ppc.

El mismo estudio realizado con cloruro sódico revela un comportamiento similar (fig. 3.34) aunque el descenso que se produce en la adsorción de tensioactivo por la proteína en presencia de este electrolito es menos acusado que con el sulfato sódico.

El medio salino produce un doble efecto, por un lado actúa debilitando las interacciones de carácter electrostático puesto que provoca un aumento de la fuerza iónica del medio, y por otro, al disminuir la solubilidad de las sustancias apolares en el agua, actúa favoreciendo las interacciones de carácter hidrófobo. Ambos efectos son los causantes de las diferencias observadas en los estudios realizados sobre pp y ppc (p.e. fig. 3.10 y fig. 3.33). En el

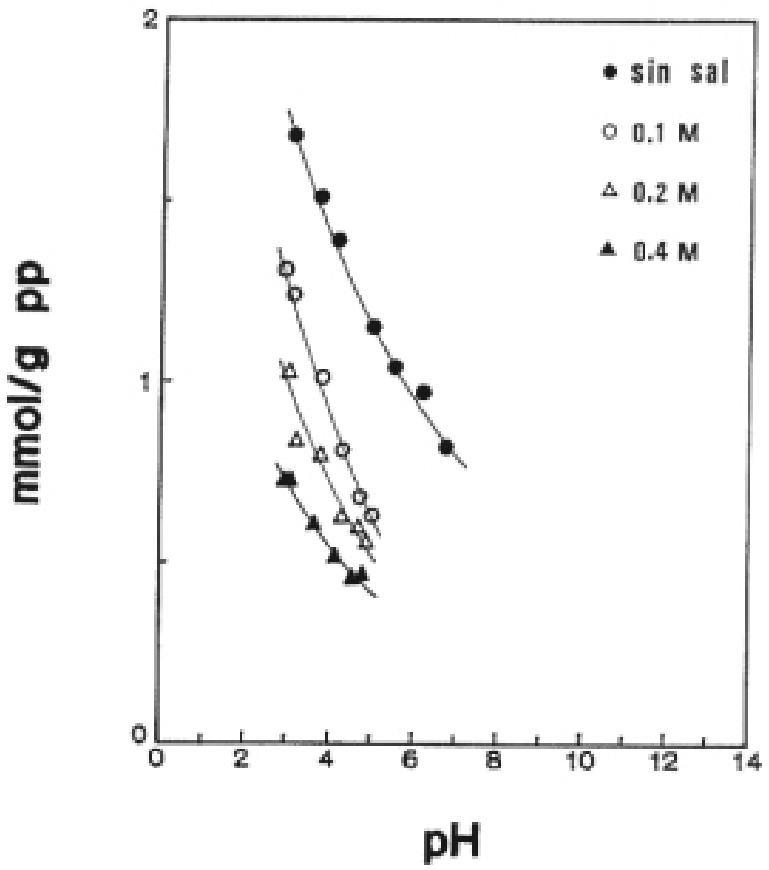


Figura 3.33.- Adsorción de DSS sobre ppc en función del pH, a distintas concentraciones de sulfato sódico.

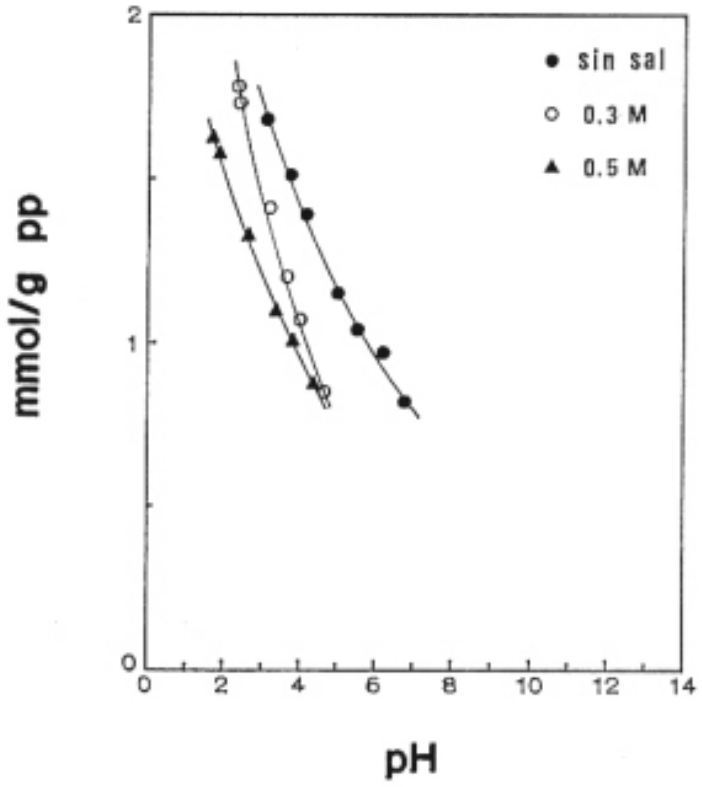


Figura 3.34.- Adsorción de DSS sobre ppc en función del pH, a distintas concentraciones de cloruro sódico.

caso del pp la disminución de la fuerza de la unión iónica tensioactivo-proteína se ve sobradamente compensada por la estabilización adicional que supone la interacción posterior de carácter hidróbofo dentro del ámbito de la adsorción primaria, además se produce un incremento en la adsorción secundaria (puramente hidrófoba) e incluso en la adsorción primaria (y secundaria) "reversible" propiciada por las roturas de uniones iónicas dentro de la proteína que dejarán grupos $^{+}NH_3$ disponibles para el enlace. En el caso del ppc las interacciones hidrófobas no se pueden producir con la misma facilidad por los factores ya comentados y entonces no pueden actuar como elemento estabilizador de la unión global dentro de la adsorción primaria. En definitiva, esta disminución de adsorción que se aprecia en el caso del ppc en medio salino, puede tomarse como una prueba más del importante papel que desempeñan las interacciones hidrófobas en el fenómeno global de adsorción.

En los estudios de adsorción secuencial sobre pp se puso claramente de manifiesto la existencia de las interacciones puramente hidrófobas (AS). Sin embargo, a través del análisis de las experiencias de adsorción secuencial DSS-ALOE85 realizadas sobre pp a diferentes niveles de curtición (fig. 3.35) se llega definitivamente a la conclusión de que la reticulación de la proteína con sales de cromo influye negativamente sobre la adsorción de tensioactivos por interacción puramente hidrófoba (adsorción secundaria) como se desprende del hecho de que el tensioactivo no ióni-

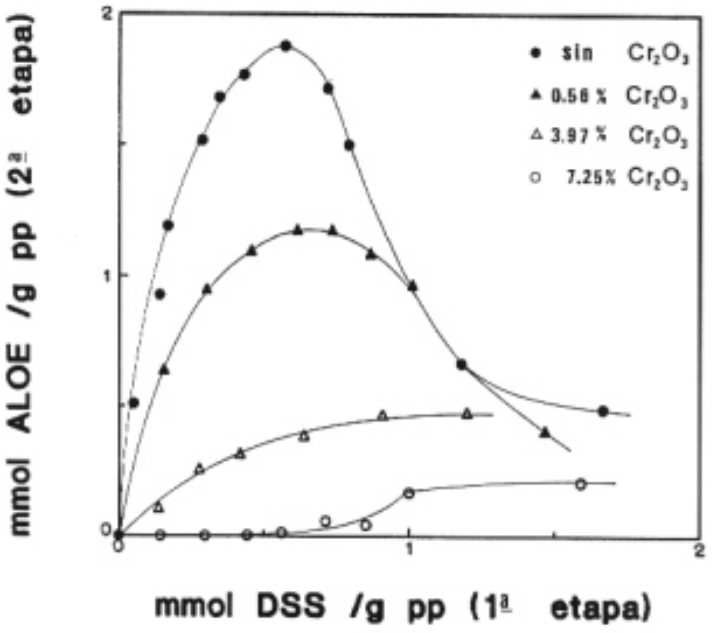


Figura 3.35.- Adsorción de ALOE85 sobre pp con distinto contenido en óxido de cromo (III), que tiene previamente adsorbido diferentes cantidades de DSS (tratamiento secuencial). Los tratamientos se realizaron a pH 3.0.

co disminuya su adsorción, hasta llegar prácticamente a no producirse, a medida que aumenta el contenido de Cr_2O_3 en el polvo de piel.

En definitiva, se confirma que la rigidez conferida a la proteína en el proceso de curtición (reticulación) reduce la creación o desarrollo de las regiones hidrófobas que permiten la fijación de nuevas moléculas de tensioactivo por AS. Esta disminución de reactividad de la proteína por AS estará directamente relacionada con el grado de curtición (reticulación) de la misma.

4. CONCLUSIONES

4.- CONCLUSIONES

El estudio sistemático realizado sobre la interacción de las sustancias tensioactivas, con la proteína colagénica en forma de polvo de piel, ha puesto de manifiesto la enorme importancia del denominado efecto hidrófobo tanto en la propia proteína como en la afinidad del tensioactivo por la proteína.

Como consecuencia de esta investigación, y a partir del análisis de los resultados de la misma, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1.- La adsorción de tensioactivos sobre la proteína colagénica depende de su estructura y carga, y de su concentración en el medio, así como del pH, temperatura, polaridad y fuerza iónica del medio.

2.- A través del comportamiento observado en la adsorción sobre polvo de piel del tensioactivo aniónico DSS en función del pH, temperatura, polaridad y fuerza iónica del medio queda evidenciada la intervención e importancia del denominado efecto hidrófobo dentro del proceso global.

Estos resultados apuntan hacia un comportamiento global similar al encontrado en estudios realizados con otras proteínas tanto globulares como fibrosas. En dichos estudios se comenta la intervención en el fenómeno de adsorción, de interacciones electrovalentes y de tipo hidrófobo, pero no se establece la importancia

relativa de cada una de ellas ni el detalle de los mecanismos involucrados.

3.- Los estudios llevados a cabo con mezclas de DSS/ALOE85 y el tratamiento secuencial DSS/no iónico demuestran, por primera vez, la fijación sobre la proteína del tensioactivo no iónico, y en dicho proceso se confirma de manera inequívoca la importancia del efecto hidrófobo en el fenómeno de adsorción estudiado.

4.- A través de las isotermas de adsorción de DSS a pH 3.0 y 10.0, y de las experiencias presentadas sobre la adsorción de los tensioactivos aniónicos (DSS) y no iónico (ALOE85), sobre polvo de piel, aplicados individualmente, en mezcla y secuencialmente, se han establecido los mecanismos que rigen el proceso, esquematizados en la figura 4.1, y resumidos en los puntos siguientes:

1) La adsorción primaria (AP) tiene lugar sobre los grupos básicos de la proteína que actúan como centros de adsorción. La interacción es estequiométrica en el sentido de que sólo una molécula de tensioactivo puede fijarse a un grupo básico de la proteína. La fijación se establece por interacción iónica e hidrófoba (IIH), es decir, la atracción electrostática facilita el acercamiento del tensioactivo a la cadena peptídica de la proteína, permitiendo de esta forma que tenga lugar la interacción hidrófoba (IH) entre la cadena hidrocarbonada de la misma molécula

del tensioactivo y los residuos apolares de la proteína. La IH es un factor determinante en la fuerza total de la interacción tensioactivo-colágeno.

En función de las condiciones experimentales pueden presentarse dos clases de AP:

a) Cuando la interacción tiene lugar sobre el grupo básico libre, la adsorción no depende esencialmente de la concentración del tensioactivo, y se observa que tiene carácter irreversible (interacción iónica e hidrófoba irreversible, IIHI).

b) Para concentraciones del tensioactivo en los alrededores de la CMC y superiores, el tensioactivo puede competir favorablemente con el grupo ácido no descargado de la proteína, precisamente por la estabilidad que le confiere la IH que se establece con la proteína. En este caso la AP posee carácter reversible, puesto que la fijación se establece por concentración.

Por debajo del PI de la proteína se pueden presentar los dos tipos de AP, irreversible y reversible. En el PI y por encima del mismo sólo puede darse la AP reversible.

2) Una característica muy importante de la AP es la de promover los centros donde va a tener lugar la <u>adsorción secundaria</u> (AS), debido a la creación o desarrollo de las regiones hidrófobas que permiten la adsorción directa del tensioactivo sobre la pro-

teína a través de su cadena hidrocarbonada. La AS no depende directamente de la concentración del tensioactivo, su nivel de adsorción es variable, y viene determinado en gran medida por las condiciones del medio que puede favorecer las interacciones hidrófobas, dada su naturaleza de IH "pura". La estabilidad (reversibilidad) de la AS es función principalmente del carácter irreversible o reversible de la AP de la que depende.

5.- Cuando se realizan los estudios de adsorción sobre colágeno a concentraciones del tensioactivo suficientemente bajas, por ejemplo, por debajo de su CMC se comprueba que:

a) La interacción se establece a nivel molecular entre la triple hélice del colágeno y la forma monomérica del tensioactivo.

b) Por debajo del PI se presenta adsorción primaria, y también la adsorción secundaria que implica una interacción hidrófoba "pura". Es decir, no se requiere un exceso de tensioactivo para la AS.

c) Tanto la II/IH de la adsorción primaria, como la IH de la AS se establecen rápidamente entre el tensioactivo y la proteína.

Cuando se trabaja a concentraciones más elevadas de tensioactivo estos comportamientos pueden ser diferentes debido posiblemente a problemas de difusión en la proteína.

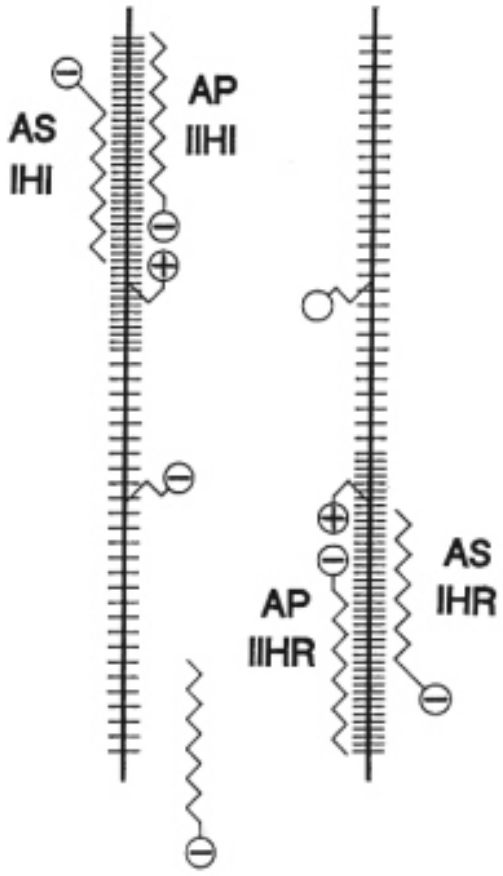


Figura 4.1.- Representación esquemática de los mecanismos de adsorción de un tensioactivo aniónico sobre la proteína colagénica.

6.- El mecanismo propuesto se ha confirmado a través de evidencias experimentales independientes tales como el estudio de hidrofobicidad del DSS sobre pp, el estudio comparativo de adsorción sobre pp entre el DSS y un colorante de peso molecular similar, y el estudio de adsorción de varios tensioactivos de diferente estructura sobre polvo de piel.

7.- El estudio de la adsorción del tensioactivo aniónico DSS sobre polvo de piel que ha sido sometida previamente a un proceso de curtición con sales de cromo (ppc) revela una fijación parecida a la que tiene lugar en polvo de piel, lo que podría indicar un comportamiento similar en ambos casos. Sin embargo al estudiar la influencia de la concentración de electrolito y la adsorción secuencial DSS/no iónico se encuentran comportamientos distintos, que ponen de manifiesto la menor participación en este caso de las IH, posiblemente debido a la rigidez que confiere el tratamiento de curtición a la molécula colagénica.

8.- De particular interés resulta el estudio de la influencia de los electrolitos en la adsorción de tensioactivos sobre el colágeno. El electrolito tiene un doble efecto de signo opuesto en esta adsorción, ya que por un lado su presencia refuerza la interacción hidrófoba pero por otro lado debilita el enlace iónico.

Se ha comprobado que la presencia de electrolito favorece la adsorción cuando tanto adsorbente como adsorbato presentan las mejores condiciones para que se establezca la interacción hidrófoba, como en el caso del DSS y pp, o DBS y pp.
Por el contrario si adsorbente, adsorbato o ambos muestran algún impedimento para que se establezca plenamente la IH, la presencia de electrolito provocará una disminución de la adsorción. En este caso la IH no será suficientemente importante como para compensar la influencia negativa del electrolito sobre el enlace iónico. Tal es el caso del éter sulfato y el pp, o el DSS y ppc.
Esta conclusión abre un interesante campo de experimentación y comprobación.

9.- Los mecanismos que se proponen "armonizan" y completan en algunos aspectos, las diferentes teorías existentes relacionadas con la adsorción de tensioactivos sobre proteínas tanto globulares como fibrosas.

10.- Por último, se incluyen algunos comentarios generales con el fin de hacer hincapié sobre aspectos concretos de las conclusiones alcanzadas, que pueden tener especial relevancia o interés desde el punto de vista de su aplicación tecnológica o incluso en el ámbito de las aportaciones al conocimiento de los complejos mecanismos que rigen las interacciones inter- o intra-

moleculares en las proteínas. Los aspectos de mayor interés se resumen en los puntos siguientes:

- Se ha puesto de manifiesto el enorme potencial reactivo de aquellas regiones de la proteína colagénica consideradas hasta ahora como de menor reactividad. Además de su valor intrínseco, este conocimiento puede tener una importante aplicación a nivel tecnológico ya que abre un nuevo campo dentro de los procesos químicos relacionados con la fabricación del cuero.
- A través de un planteamiento experimental en principio bastante simple, ha sido posible contribuir a un mayor conocimiento de los complejos mecanismos que pueden darse en los procesos de curtición. Al mismo tiempo, la presente investigación ha significado una primera aproximación a la interpretación de otros fenómenos de índole muy diversa relacionados con otras proteínas, en los que se tienen indicios de que la intervención del efecto hidrófobo debe ser muy importante, pero todavía no se ha cuantificado su verdadera influencia. En este sentido se pueden mencionar los mecanismos de la interacción de los tensioactivos con proteínas globulares, procesos enzimáticos y sistemas de actuación de las membranas biológicas.
- Dado el conocimiento que se ha alcanzado sobre la capacidad reactiva del colágeno, podría plantearse

la utilización de esta proteína como relleno en columnas separadoras de sustancias con diferente hidrofobicidad, aunque esta aplicación precisaría de una mayor experimentación que complementase los estudios de índole básico realizados.

- En definitiva, queda abierto un interesante campo de investigación en el que mediante la aplicación de las técnicas y métodos desarrollados en la presente Memoria, a sustancias anfifílicas de diferente naturaleza y a otros sustratos proteicos, será posible elaborar planteamientos mecanísticos lo más generales posibles.

5. BIBLIOGRAFÍA

BALEUX B. (1972).
"Dosage colorimétrique d'agents de surface non ioniques polyoxyèthylènes à l'aide d'une solution iodo-iodurée".
C.R. Acad. Sc. París 274, Serie C, p1617.

BEAR R.S. (1952).
"The structure of collagen fibrils".
Adv. Protein Chem. 7, 149.

BEN-NAIM A. (1980).
"Hydrophobic Interactions".
Plenum Press, New York.

BERNAL J.D. (1964).
Proc. Roy. Soc. A280, 299.
(Vía Tanford, 1980, p37).

BHATNAGAR R.S., RAPAKA R.S. (1977).
"Conformational properties of polypeptide models of collagen" en "Protein Crosslinking: Biochemical and Molecular Aspects", Friedman (Ed.), p491.
Plenum Press, New York.

BIENKIEWICZ K. (1983).
"Physical Chemistry of Leather Making".
Krieger, Florida.

BOHON R.L., CLAUSSEN W.F. (1951).
"The solubility of aromatic hydrocarbons in water".
J. Am. Chem. Soc. 73, 1571.

BOWES J.H., KENTEN R.H. (1948).
"The amino-acid composition and titration curve of collagen".
Biochem. J. 43, 358.

BULL H.B., NEURATH H. (1937).
"The denaturation and hydration of proteins. II. Surface denaturation of egg albumin".
J. Biol. Chem. 118, 163.

BUTLER J.A.V. (1937).
"The energy and entropy of hydration of organic compounds".
Trans. Faraday, Soc. 33, 229.

CASSEL J.M, MCKENNA E. (1954).
"Swelling of collagen and modified collagen".
J. Am. Leather Chem. Assoc. 49, 553.

CHATTORAJ D.K., BIRDI K.S. (1984).
"Adsorption and the Gibbs Surface Excess", c10, p377.
Plenum Press, New York.

CLAUSSEN W.F., POLGLASE M.F. (1952).
"Solubilities and structures in aqueous aliphatic hydrocarbon solutions".
J. Am. Chem. Soc. 74, 4817.

CROSBY N.T. (1960).
"A concise account of our present knowledge of the structure and chemical constituents of collagen".
J. Soc. Leather Trades Chemists 44, 551.

EDSALL J.T., SCATCHARD G. (1943).
"Proteins, Amino Acids and Peptides as Dipolar Ions".
E.J. Cohn, J.T. Edsall, (eds).
Reinhold, New York.

EISENBERG D., KAUZMANN W. (1969).
"The Structure and Properties of Water".
University Press, Oxford.

ELEY D.D. (1939).
"On the solubility of gases. Part I. The inert gases in water".
Trans. Faraday Soc. 35, 1281.

EPTON S.R. (1948).
"A new method for the rapid titrimetric analysis of sodium alkyl sulphates and related compunds".
Trans. Faraday Soc. 44, 226.

ERNERTH M. (1954).
"Uber die Einwirkung von Alkylsulfaten definierter Kettenlängen auf Kollagen und Gelatine".
Tesis doctoral. Universidad de Darmstadt.

FILACHIONE E.M. (1971).
"The use of surface active agents in tanning of leather".
J. Am. Oil. Chem. Soc. 48, 334.

FOGH J., RASMUSSEN P.O.H., SKADHAUGE K. (1954).
"Colorimetric method for quantitative microdetermination of quaternary ammonium compounds".
Anal. Chem. 26, 392.

FRANK H.S., EVANS M.W. (1945).
"Free volume and entropy in condensed systems. III. Entropy in binary liquid mixtures; partial molal entropy in dilute solutions; structure and thermodynamics in aqueous electrolytes".
J. Chem. Phys. 13, 507.

FRIEDMAN M.E., SCHERAGA H.A. (1965).
"Volume changes in hydrocarbon-water systems. Partial molal volumes of alcohol-water solutions".
J. Phys. Chem. 69, 3795.

GARCÍA-DOMÍNGUEZ J.J., SÁNCHEZ LEAL J. (1973).
"A new approach to the theory of adsorption of ionic surfactants on wool".
Federation Lainiere Internationale. Congreso de Roma.

GARCÍA DOMÍNGUEZ J.J. (1986).
"Tensioactivos y Detergencia".
Dossat. Barcelona.

GILES C.H., MACEWAN T.H., NAKHWA S.N., SMITH D. (1960).
"Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids".
J. Chem. Soc. 3973.

GILES C.H., SMITH D., HUITSON A. (1974a).
"A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical".
J. Colloid Interface Sci. 47, 755.

GILES C.H., D'SILVA A.P., EASTON I.A. (1974b).
"A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. II. Experimental interpretation".
J. Colloid Interface Sci. 47, 766.

GILES C.H. (1982).
"Forces operating in adsorption of surfactants and other solutes at solid surfaces: a survey" en "Proceedings of the International Symposium on Solution Behavior of Surfactants: Theoretical and Applied Aspects", K.L. Mittal, E.J. Fendler (Eds).
Plenum Press, New York.

GILL S.J., NICHOLS N.F., WADSÖ J. (1976).
J. Chem. Thermodynamics 8, 445.
(Vía Schick, 1987, p296).

GODDARD E.D., HOEVE C.A.J., BENSON G.C. (1957).
"Heats of micelle formation of paraffin chain salts in water".
J. Phys. Chem. 61, 593.

GRATACOS E., BOLEDA J., PORTAVELLA M., ADZET J.M., LLUCH G. (1962).
"Tecnología Química del Cuero".
Emporium, Barcelona.

GUSTAVSON K.H. (1950).
"The effect of anionic detergents on collagen of mammals and teleostei".
Acta Chemica Scandinavica 4, 1171.

GUSTAVSON K.H. (1956).
"The Chemistry and Reactivity of Collagen".
Academic Press, New York.

GUSTAVSON K.H. (1962).
"The chemistry of chrome tanning, past and present".
J. Soc. Leather Trades Chem. 46, 46.

HARRIS I.I., PANKHURST K.G.A., SMITH R.C.M. (1947).
"The adsorption of paraffin-chain salts to proteins. Part III. The formation of complexes between dodecyl sodium sulphate and chemically modified gelatins".
Trans. Faraday Soc. 43, 506.

HARTLEY G.S. (1936).
"Aqueous Solutions of Paraffin-Chain Salts".
Hermann & Cie., París.

HEIDEMANN E. (1983).
"How can we help to solve the problems of practical tanners using fundamental research?".
J. Am. Leather Chem. Assoc. 78, 251.

HERFELD H. (1974).
"Conferencia Inaugural del XII Congreso de la I.U.L.T.C.S.". Viena 1973.
Bol. Asoc. Quim. Esp. Ind. Cuero 25, 7.

HERFELD H. (1987).
"Entfetten, Fetten und Hydrophobieren bei der Lederherstellung" en "Bibliothek des Leders", v4.
Umschau, Frankfurt.

HERMANS J. Jr., SCHERAGA H.A. (1961).
"Structural studies of ribonuclease. VI. Abnormal ionizable groups".
J. Am. Chem. Soc. 83, 3293.

IMAMURA T., KONISHI K. (1987).
"Studies on interaction of oligopeptides with sodium dodecyl sulfate: Stopped-flow kinetics of chemical modification of trytophan residues with N-bromosuccinimide".
J. Protein Chem. 6, 401.

JACKSON S.M., REBOIRAS M.D., LYLE I.G., JONES M.N. (1987).
"The mechanism of phospholipid adsorption from vesicle dispersions onto glass surfaces".
Colloids Surfaces, 27, 325.

KAUZMANN W. (1959).
"Some factors in the interpretation of protein denaturation".
Adv. Protein Chem. 14, 1.

KRESHECK G.C., SCHNEIDER H., SCHERAGA H.A. (1965).
"The effect of D O on the thermal stability of proteins. Thermodynamic parameters for the transfer of model compounds from H O to D O".
J. Phys. Chem. 69, 3132.

KÜNTZEL A., LE NEANON A.J.C. (1961a).
"Über die Einwirkung von anionischen und kationischen Netzmitteln auf Gelatine".
Das Leder 12, 9.

KÜNTZEL A., LE NEANON A.J.C. (1961b).
"Über die Einwirkung von anioschen und kationischen Netzmitteln auf Gelatine. II. Die Einwirkung von Netzmitteln auf Gelatinegele".
Das Leder 12, 82.

LEHNINGHER A.L. (1984).
"Bioquímica: las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular".
Omega, Barcelona.

LOEWE H., OTTO G. (1960).
"Über hydrotrope Wirkungen grenzflächenaktiver Stoffe auf die Hautsubstanz".
Das Leder 11, 251.

LUNDGREN H.P. (1945).
"Synthetic protein fibers from protein-detergent complexes.
Text. Research. J. 15, 335.

LUNDGREN H.P., ELAM D.W., O'CONNELL R.A. (1943).
"Electrophoretic study of the action of alkyl benzenen-sulfonate detergent on egg albumin".
J. Biol. Chem. 149, 183.

MAKINO S., REYNOLDS J.A., TANDFORD C. (1973).
"The binding of deoxycholate and Triton X-100 to proteins".
J. Biol. Chem. 248. 4926.

MARSAL A., COT J., GRATACOS E. (1976).
"Formación de complejos de cromo-ácido oleico en el cuero".
Bol. Asoc. Quim. Esp. Ind. Cuero 27, 8.

MARTÍNEZ DEL POZO A., OLMO N., OÑADERRA M., LIZARBE M.A., GAVILANES J.G. (1986).
"Binding of 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid to type I collagen".
Int. J. Peptide Protein Res. 28, 173.

MOLYNEUX P. (1984).
"Water-Soluble Synthetic Polymers: Properties and Behaviour", v2.
CRC Press, Florida.

MORRISON T.J. (1952).
"The salting-out of non-electrolytes. Part I. The effect of ionic size, ionic charge, and temperature".
J. Chem. Soc. 3814.

NEMETHY G., SCHERAGA H.A. (1962a).
"Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. I. A model for the thermodynamic properties of liquid water".
J. Chem. Phys. 36, 3382.

NEMETHY G., SCHERAGA H.A. (1962b).
"Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. II. Model for the thermodynamic properties of aqueous solutions of hydrocarbons".
J. Chem. Phys. 36, 3401.

NEMETHY G., SCHERAGA H.A. (1962c).
"The structure of water and hydrophobic bonding in proteins. III. The thermodynamic properties of hydrophobic bonds in proteins".
J. Phys. Chem. 66, 1773.

NOZAKI Y., REYNOLDS J.A., TANDFORD C. (1974).
"The interaction of a cationic detergent with bovine serum albumin and other proteins".
J. Biol. Chem. 249, 4452.

OAKES J. (1973).
"Magnetic-resonance studies of the interactions between bovine-serum albumin and surfactants. I. Nature of binding site".
Eur. J. Biochem. 36, 553.

O'FLAHERTY F., RODDY W.T., LOLLAR R.M. (1956).
"The Chemistry and Technology of Leather", vI.
Reinhold, New York.

O'FLAHERTY F., RODDY W.T., LOLLAR R.M. (1958).
"The Chemistry and Technology of Leather",vII.
Reinhold, New York.

O'FLAHERTY F., RODDY W.T., LOLLAR R.M. (1962).
"The Chemistry and Technology of Leather", vIll.
Reinhold, New York.

OH H.I., HOFF J.E., ARMSTRONG G.S., HAFF L.A. (1980).
"Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes".
J. Agric. Food Chem. 28, 394.

OTTO G. (1962).
"Das Färben des Leders".
E. Roether, Darmstadt.

PANKHURST K.G.A., SMITH R.C.M. (1944).
"The adsorption of paraffin-chain salts to proteins. Part I. Some factors influencing the formation and separation of complexes between gelatin and dodecyl sodium sulphate".
Trans. Faraday Soc. 40, 565.

PANKHURST K.G.A., SMITH R.C.M. (1945).
"The adsorption of paraffin-chain salts to proteins. Part II. The influence of electrolytes and pH on gelatin-dodecyl sulphate complexes from aqueous solutions".
Trans. Faraday Soc. 41, 630.

PANKHURST K.G.A., SMITH R.C.M. (1947).
"The adsorption of paraffin-chain salts to proteins. Part IV. Some physical and chemical properties of gelatin-dodecyl sulphate complexes".
Trans. Faraday Soc. 43, 511.

PANKHURST K.G.A. (1949).
"The adsorption of paraffin-chain salts to proteins. Part V. The influence of size of ion on the binding of amphipathic anions and cations to gelatin".
Faraday Soc. Discussions 6, 52.

PANKHURST K.G.A. (1953).
"The action of large ions on collagen and gelatin".
J. Soc. Leather Trades Chemists 37, 312.

PARRA J.L., GARCÍA-DOMÍNGUEZ J.J., DE LA MAZA A., SÁNCHEZ-LEAL J. (1986).
"Applicability of surfactants mixed micelles on wool textile finishing".
J. Soc. Dyers Colourists 102, 227.

PAULING L. (1960).
"The Nature of the Chemical Bond", p498.
Cornell University Press, New York.

PITT-RIVERS R., IMPIOMBATO F.S.A. (1968).
"The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins".
Biochem. J. 109, 825.

POLET H., STEINHARDT J. (1968).
Biochemistry 7, 1348.
(Vía Reynolds, 1970).

POPLE J.A. (1951).
Proc. Roy. Soc. A205, 163.
(Vía Nemethy, 1962a)

PORE J. (1974).
"La Nourriture du Cuir. Methodes et Principes".
Publ. "Le Cuir", París.

PRIVALOV P.L., GILL S.J. (1989).
"The hydrophobic effect: a reappraisal".
Pure Appl. Chem. 61, 1097.

PUTNAN F.W., NEURATH H. (1944).
"The precipitation of proteins by synthetic detergents"
J. Am. Chem. Soc. 66, 692.

PUTNAN F.W., NEURATH H. (1945).
"Interaction between proteins and synthetic detergents. II. Electrophoretic analysis of serum albumin-sodium dodecyl sulfate mixtures".
J. Biol. Chem. 159, 195.

RAMACHANDRAN G.N., SASISEKHARAN V. (1968).
"Conformation of polypeptides and proteins".
Adv. Protein Chem. 23, 283.

RAMACHANDRAN G.N., REDDI A.H. (1976).
"Biochemistry of Collagen".
Plenum Press, New York.

RAPAKA R.S., NITECKI D.E., BHATNAGAR R.S. (1977).
"Strategies in the racemization-free synthesis of polytripeptide models of collagen" en "Protein Crosslinking: Biochemical and Molecular Aspects". M. Friedmann (Ed), p473.
Plenum Press, New York.

REYNOLDS J.A., HERBERT S., POLET H., STEINHARDT J. (1967).
"The binding of divers detergent anions to bovine serum albumin".
Biochemistry 6, 937.

REYNOLDS J.A., HERBERT S., STEINHARDT J. (1968).
"The binding of some long-chain fatty acid anions and alcohols by bovine serum albumin".
Biochemistry 7, 1357.

REYNOLDS J.A., CALLAGHER J.P., STEINHARDT J. (1970).
"Effect of pH on the binding of N-alkyl sulfates to bovine serum albumin".
Biochemistry 9, 1232.

ROBB I.D. (1981).
"Anionic Surfactants. Physical Chemistry of Surfactant Actions", E.H. Lucassen-Reynders (Ed).
Marcel Dekker, New York.

ROSEN M.J. (1978).
"Surfactants and Interfacial Phenomena".
Wiley, New York.

ROSEN M.J., ZHAO F., MURPHY D.S. (1987).
"Two-phase mixed indicator method for the determination of zwitterionic surfactants".
J. Am. Oil Chem. Soc. 64, 439.

SAITO N., WAKO H., AKUTSU T., OYAMA Y. (1982).
"Hydrophobic interaction and the prediction of the tertiary structures of proteins" en "Ions and Molecules in Solution", N. Tanaka, H. Ohtaki, R. Tamamushi (Eds), p325.
Elsevier, Amsterdam.

SAITO S. (1987).
"Polymer-surfactant interactions" en "Nonionic Surfactants: Physical Chemistry". M.J. Schick (Ed.) c15, p881.
Marcel Dekker, New York.

SÁNCHEZ-LEAL J. (1977).
"La adsorción de tensioactivos iónicos sobre proteínas: Modificación de su reactividad química".
Inv. Inform. Text. 20, 133.

SÁNCHEZ-LEAL J., ANGUERA S., COMELLES F., GARCÍA-DOMÍNGUEZ J.J., PARRA J.L. (1983).
"Interactions between ionic surfactants and wool".
J. Text. Institute 4, 196.

SALEM G., TRAUB W. (1975).
"Conformational implications of aminoacid sequence regularities in collagen".
FEBS lett 15, 94.

SCHERAGA H.A., NEMETHY G., STEINBERG I.Z. (1962).
"The contribution of hydrophobic bonds to the thermal stability of protein conformations".
J. Biol. Chem. 237, 2506.

SCHICK M.J. (1987).
"Nonionic Surfactants. Physical Chemistry".
Marcel Dekker, New York.

SCHWARZ G. (1970).
"Cooperative binding to linear biopolymers. I. Fundamental static and dynamic properties".
Eur. J. Biochem. 12, 442.

SPEACKMAN J.G., HIRST M.C. (1931).
"Constitution of the keratin molecule".
Nature 128, 1073.

STEINHARDT J., REYNOLDS J.A. (1969).
"Multiple Equilibria in Proteins".
Academic Press, New York.

STEINHARDT J., KRIJN R., LEIDY J.G. (1971).
"Differences between bovine and human serum albumins: Binding isotherms, optical rotatory dispersion, viscosity, hydrogen ion titration, and fluorescence effects".
Biochemistry 10, 4005.

STRYER L. (1985).
"Bioquímica".
Reverté, Barcelona.

SZMEREKOV V., KRALIK P., BEREK D. (1984).
J. Chromatogr. 285, 188.
(Vía Schick, 1987).

TANDFORD C. (1961).
"Ionization-linked changes in protein conformation. I. Theory".
J. Am. Chem. Soc. 83, 1628.

TANDFORD C. (1970).
"Protein denaturation. Part C. Theoretical models for the mechanism of denaturation".
Adv. Protein Chem. 24, 1.

TANDFORD C. (1972).
"Hydrophobic free energy, micelle formation and the association of proteins with amphiphiles".
J. Mol. Biol. 67, 59.

TANDFORD C. (1974).
"Theory of micelle formation in aqueous solutions".
J. Phys. Chem. 78, 2469.

TANDFORD C. (1980).
"The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes".
Wiley, New York.

TRAUBE J. (1891).
"Über die Capillaritätsconstanten organischer Stoffe in wässerigen Lösungen".
Ann. 265, 27.

UDY M.J. (1956).
"Chromium: Chemistry of Chromium and its Compounds", v1.
Reinhold, New York.

VAN OSS C.J., ABSOLOM D.R., NEUMANN A.W. (1980).
"The hydrophobic effect: Esentially a van der Waals interaction".
Colloid Polymer Sci. 258, 424.

WISHNIA A., PINDER T. (1964).
"Hydrophobic interaction in proteins: Conformation changes in bovine serum albumin below pH 5".
Biochemistry 3, 1377.

YON J. (1969).
"Structure et Dynamique Conformationell des Proteins".
Hermann, París.

ZOLLINGER H. (1987).
"Color Chemistry. Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments".
VCH, Weinheim.

Abreviaturas

v, volumen
c, capítulo
p, pagina
pp, paginas

6. APÉNDICE

RECTAS DE CALIBRADO

Tabla 2.6.- Calibrado para cloruro de N-cetilpiridinio monohidratado. Medida espectrofotométrica a 259 nm. Blanco:agua.

Concentración x 10^2 (%)	Absorbancia
0.507	0.585
0.634	0.706
0.845	1.017
1.014	1.162
1.267	1.463
1.448	1.521
1.689	1.868
2.027	2.123
2.253	2.278
2.534	2.603

Ecuación de la recta ajustada por mínimos cuadrados:

$$C\ (\%) = 1.0198 \times 10^{-2} * A - 1.411 \times 10^{-3}$$

Coeficiente de correlación: 0.996

Recta de calibrado:

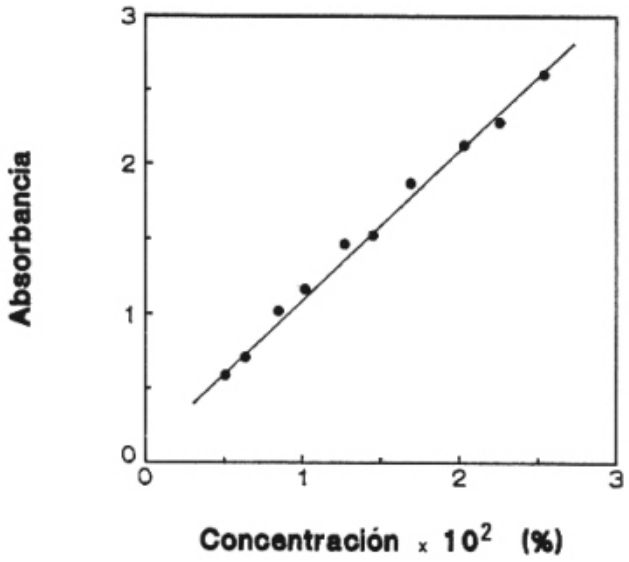


Tabla 2.7.- **Calibrado para BHTA. Método espectrofotométrico descrito por Fogh. Medida del complejo formado con púrpura de bromocresol a 618 nm. Blanco: púrpura de bromocresol en ausencia de analito.**

Concentración x 10^3 (%)	Absorbancia
0.379	0.034
0.655	0.088
1.034	0.176
1.752	0.339
1.976	0.393
2.209	0.444
2.416	0.477

Ecuación de la recta ajustada por mínimos cuadrados:

$$C\ (\%) = 4.48 \times 10^{-3} * A + 2.40 \times 10^{-4}$$

Coeficiente de correlación = 0.9996

Recta de calibrado:

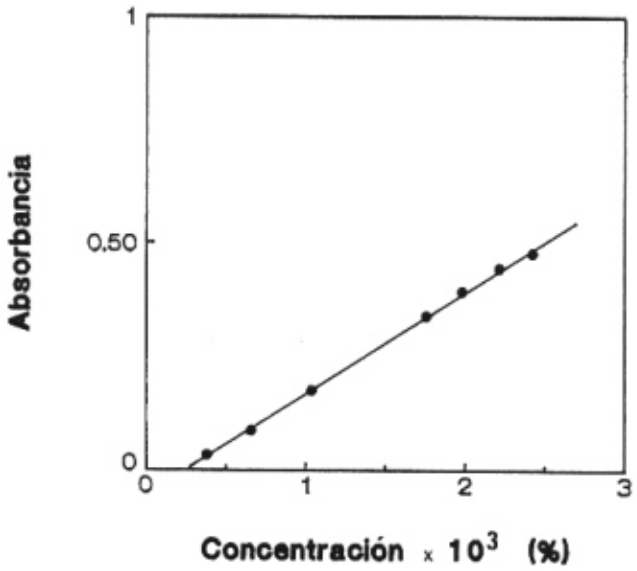


Tabla 2.8.- **Calibrado para ALOE85. Método espectrofotométrico descrito por Baleux. Medida del complejo formado con I_2/IK a 505 nm. Blanco: una muestra con I_2/IK en ausencia de analito.**

Concentración x 10^4 (%)	Absorbancia
0.860	0.019
1.720	0.041
2.580	0.065
3.430	0.092
4.290	0.114
5.150	0.150
6.010	0.178
6.870	0.206
7.730	0.231
8.580	0.257

Ecuación de la recta ajustada por mínimos cuadrados:

$$C\ (\%) = 3.1608 \times 10^{-3} * A + 4.453 \times 10^{-5}$$

Coeficiente de correlación: 0.9989

Recta de calibrado:

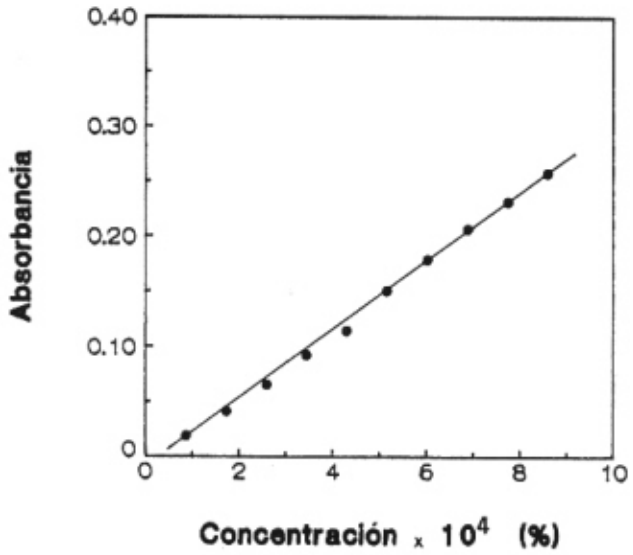


Tabla 2.9.- **Calibrado para ALOE120. Método espectrofotométrico descrito por Baleux. Método del complejo formado con I_2/IK a 505 nm. Blanco: una muestra con I_2/IK en ausencia del analito.**

Concentración x 10^4 (%)	Absorbancia
0.987	0.030
1.975	0.062
2.962	0.095
4.937	0.155
6.911	0.223
7.899	0.254

Ecuación de la recta ajustada por mínimos cuadrados:

$$C\ (\%) = 3.0999 \times 10^{-3} * A + 4.03 \times 10^{-6}$$

Coeficiente de correlación: 0.9998

Recta de calibrado:

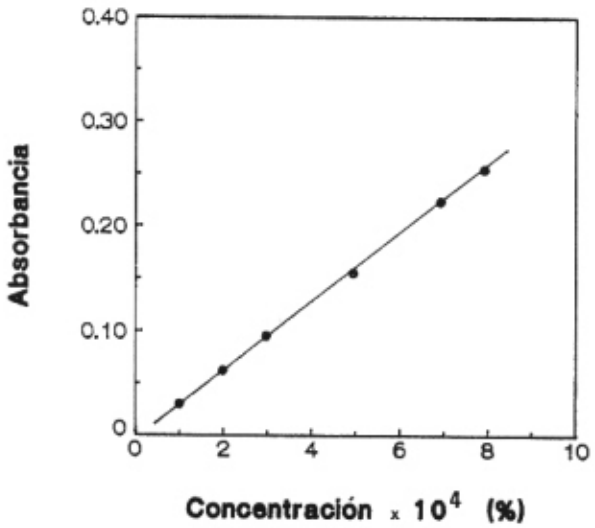


Tabla 2.10.- Calibrado para ALOE140. Método espectrofotométrico descrito por Baleux. Medida del complejo formado con I_2/IK a 505 nm. Blanco: una muestra con I_2/IK en ausencia de analito.

Concentración x 10^4 (%)	Absorbancia
0.980	0.029
1.959	0.049
2.939	0.077
3.918	0.104
4.898	0.125
5.877	0.148
6.857	0.169
7.836	0.192
9.795	0.241

Ecuación de la recta ajustada por mínimos cuadrados:

$$C\ (\%) = 4.1605 \times 10^{-3} * A - 2.356 \times 10^{-5}$$

Coeficiente de correlación: 0.9989

Recta de calibrado:

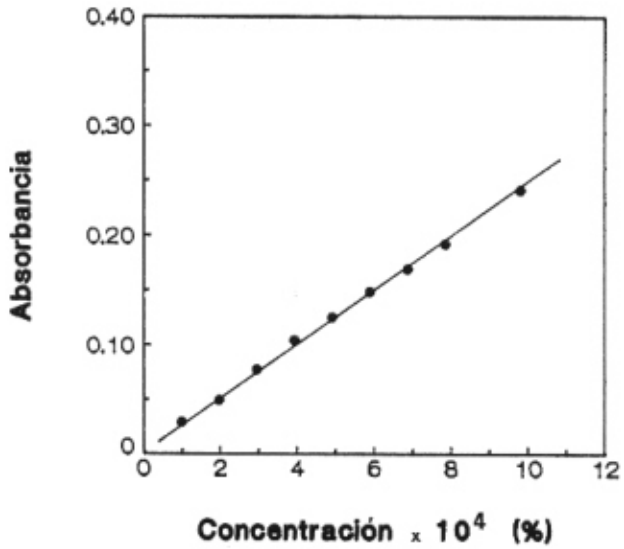


Tabla 2.11.- Calibrado para NFOE85. Medida espectrofotométrica a 275.2 nm. Blanco:agua.

Concentración x 10^2 (%)	Absorbancia
0.563	0.130
1.116	0.272
2.197	0.548
4.540	1.159
5.675	1.443
6.810	1.729
7.945	2.049
9.080	2.315

Ecuación de la recta ajustada por mínimos cuadrados:

$$C\ (\%) = 3.8815 \times 10^{-2} * A + 6.11 \times 10^{-4}$$

Coeficiente de correlación: 0.9999

Recta de calibrado:

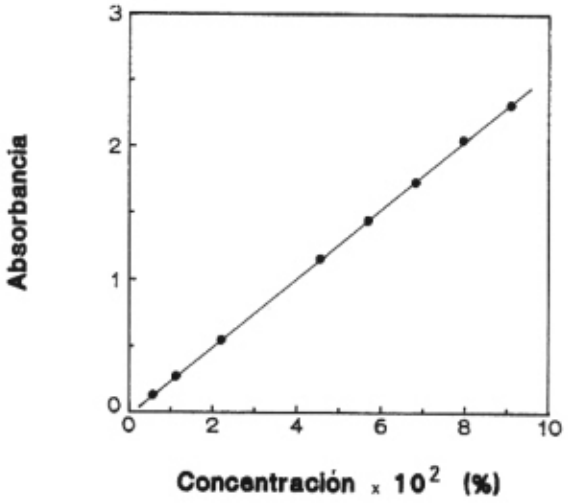


Tabla 2.12.- Calibrado para NFOE90. Medida espectrofotométrica a 276.5 nm. Blanco:agua.

Concentración x 10^2 (%)	Absorbancia
0.566	0.091
1.123	0.252
2.283	0.529
4.567	1.086
5.615	1.352
6.850	1.645
7.861	1.892
9.133	2.187

Ecuación de la recta ajustada por mínimos cuadrados:

$$C\ (\%) = 4.0936 \times 10^{-2} * A + 1.270 \times 10^{-3}$$

Coeficiente de correlación: 0.9999

Recta de calibrado:

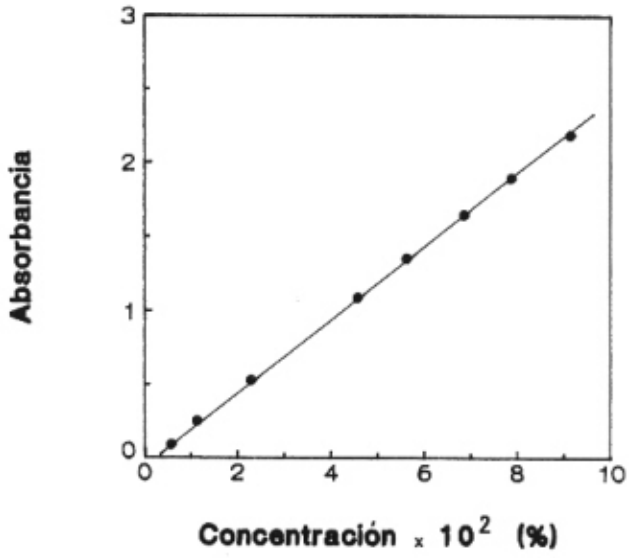


Tabla 2.13.- Calibrado para NFOE124. Método espectrofotométrico a 276.5 nm. Blanco:agua.

Concentración x 10^2 (%)	Absorbancia
0.565	0.114
1.121	0.200
2.206	0.421
4.275	0.860
5.344	1.062
6.412	1.257
7.481	1.473
8.550	1.695
9.619	1.911

Ecuación de la recta ajustada por mínimos cuadrados:

$$C\ (\%) = 5.0157 \times 10^{-2} * A + 5.18 \times 10^{-4}$$

Coeficiente de correlación: 0.9998

Recta de calibrado:

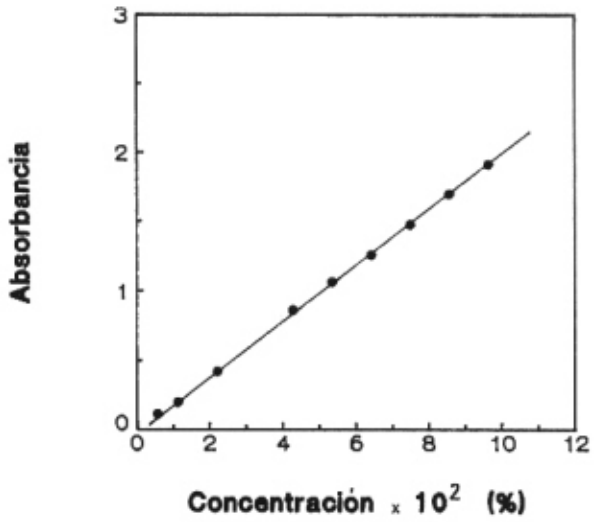


Tabla 2.14.- Calibrado para DBS. Medida espectrofotométrica a 223.5 nm. Blanco:agua.

Concentración x 10^3 (%)	Absorbancia
0.580	0.244
1.150	0.423
2.220	0.791
2.300	0.818
2.740	0.969
3.240	1.136
3.720	1.286
4.190	1.467
4.450	1.507
5.480	1.875

Ecuación de la recta ajustada por mínimos cuadrados:

$$C\ (\%) = 2.982 \times 10^{-3} * A - 1.379 \times 10^{-4}$$

Coeficiente de correlación: 0.9999

Recta de calibrado:

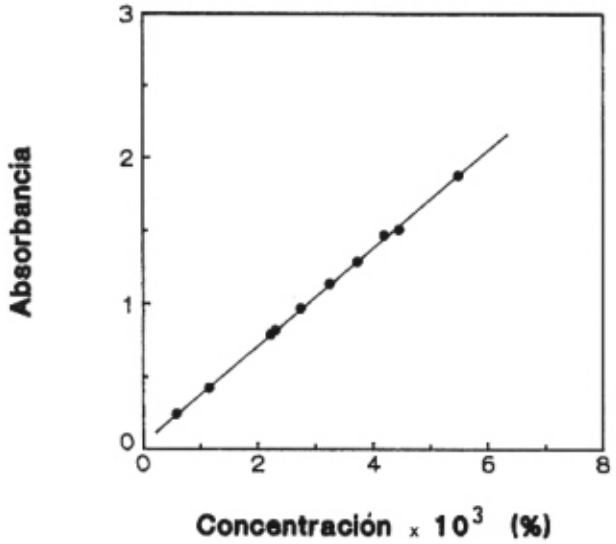


Tabla 2.15.- Calibrado para MLGS. Medida espectrofotométrica a 200 nm. Blanco:agua.

Concentración x 10^2 2%)	Absorbancia
0.203	0.615
0.406	1.160
0.609	1.671
0.813	2.109
1.015	2.434

Ecuación de la recta ajustada por mínimos cuadrados:

$$C\ (\%) = 4.387 \times 10^{-3} * A - 9.18 \times 10^{-4}$$

Coeficiente de correlación: 0.995

Recta de calibrado:

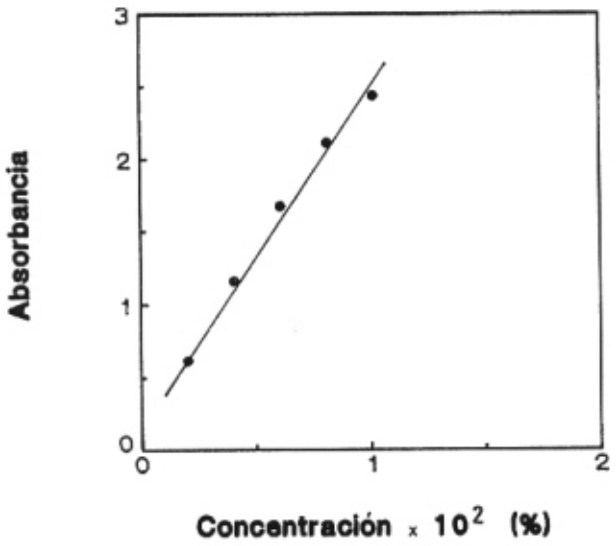


Tabla 2.16.- Calibrado para Naranja II (NII).Medida espectrofotométrica a 484.4 nm. Blanco:agua.

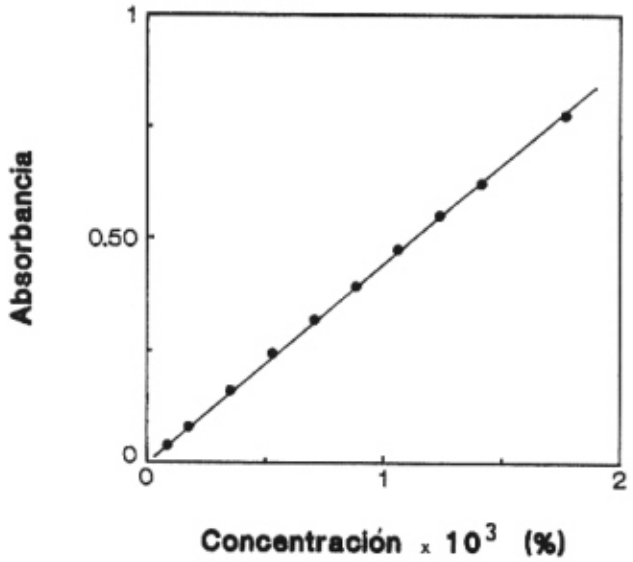
Concentración x 10^3 (%)	Absorbancia
0.088	0.039
0.177	0.080
0.353	0.161
0.530	0.244
0.707	0.318
0.883	0.393
1.060	0.475
1.237	0.550
1.413	0.622
1.767	0.776

Ecuación de la recta ajustada por mínimos cuadrados:

$$C\ (\%) = 2.281 \times 10^{-3} * A - 1.290 \times 10^{-5}$$

Coeficiente de correlación: 0.9998

Recta de calibrado:



DATOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.1.- Adsorción de DSS y HTAB sobre polvo de piel (pp), frente al pH.

DSS		HTAB	
pH	mmol/g pp	pH	mmol/g pp
2.51	1.80	5.00	0.03
3.21	1.67	6.20	0.22
4.46	1.53	6.30	0.28
5.19	1.11	7.85	0.30
5.69	0.87	8.60	0.39
6.79	0.62	9.15	0.41
7.30	0.66	9.95	0.58
7.90	0.62		
10.00	0.56		
10.74	0.52		
11.67	0.45		

Tabla 3.2.- Adsorción de DSS sobre pp en función del pH.

Los datos correspondientes a la adsorción de DSS se encuentran en la tabla 3.1.

Tabla 3.3.- Cinética de adsorción del DSS sobre pp, a diferentes valores de pH: 2.60, 5.45 y 7.85 respectivamente.

2.60		5.45		7.85	
t (h)	mmol/g pp	t (h)	mmol/g pp	t (h)	mmol/g pp
0.25	1.56	0.05	0.83	0.05	0.38
0.58	1.61	0.10	0.94	0.20	0.62
1.00	1.68	0.25	1.08	0.40	0.59
2.00	1.61	0.50	1.04	0.70	0.76
3.00	1.65	0.95	1.15	1.00	0.73
24.00	1.62	2.00	1.11	2.00	0.73
		3.00	1.15		

Tabla 3.4.- Cinética de adsorción de DSS sobre pp, a pH 3.0 y distintas concentraciones de tensioactivo.

t (h)	3.5	17.5	35.0	70.0	mM
0.08	1.00 (*)	--	--	--	
0.17	1.01	1.64	1.82	1.92	
0.33	1.00	1.70	1.86	1.95	
0.50	1.03	1.79	1.81	2.04	
1.00	1.02	1.81	1.93	2.08	
2.00	1.03	1.76	1.90	2.08	
3.00	1.10	1.80	1.92	2.07	

(*) mmol/g pp

Tabla 3.6.- Isotermas de adsorción de DSS sobre pp, a pH 3.0 y a pH 10.0.

3.0		10.0	
Ce (mmol/l)	mmol/g pp	Ce (mmol/l)	mmol/g pp
0.312	0.90	1.734	0.03
0.555	0.98	3.364	0.10
0.798	1.29	4.335	0.12
0.971	1.31	4.993	0.20
1.422	1.34	6.727	0.42
2.219	1.35	9.848	0.49
2.843	1.53	14.113	0.63
3.190	1.51	20.945	0.60
4.161	1.45	27.153	0.66
7.698	1.94	29.544	0.69
12.518	2.07	33.601	0.69
16.437	2.17		
30.169	2.32		
37.797	2.64		
54.442	2.61		
69.353	2.64		
79.756	2.66		
89.812	2.62		

Tabla 3.7.- Adsorción de DSS sobre pp en función del pH, en medio etanol/agua (1:1).

pH	mmol/g pp
2.43	1.09
3.00	0.93
3.23	0.72
4.20	0.57
5.38	0.33
6.33	0.20
6.99	0.16
7.34	0.12
7.91	0.08
8.61	0.05
9.46	0.00
10.47	0.00

Los valores correspondientes a la adsorción de DSS en medio acuoso se encuentran en la tabla 3.1.

Tabla 3.8.- Adsorción de DSS sobre pp en función del pH, a 30°C.

pH	mmol/g pp
2.71	1.93
3.58	1.91
4.81	1.65
5.79	1.18
6.74	0.88
7.24	0.79
7.98	0.66
9.09	0.64
9.95	0.57
10.96	0.44

Los datos de adsorción de DSS a 25°C se encuentran en la tabla 3.1.

Tabla 3.9.- Adsorción de DSS sobre pp en función del pH, a distintas concentraciones de cloruro sódico.

0.3 M		0.5 M	
pH	mmol/g pp	pH	mmol/g pp
2.32	2.78	2.26	3.16
3.05	2.51	3.90	3.02
4.07	2.19	5.43	2.60
5.59	2.01	7.23	2.26
7.30	1.46	9.02	2.29
9.20	0.90	10.90	2.26
10.95	0.90		

Los datos de adsorción de DSS en ausencia de electrolito se encuentran en la tabla 3.1.

Tabla 3.10.- Adsorción de DSS sobre pp en función del pH, a distintas concentraciones de sulfato sódico.

0.2 M		0.5 M	
pH	mmol/g pp	Pm	mmol/g pp
3.24	2.84	3.05	3.33
3.49	2.83	4.07	3.23
5.30	2.48	5.47	2.88
5.59	2.45	7.32	2.15
5.83	2.36	9.42	1.74
6.41	2.23	11.19	1.49
7.60	1.81		
8.93	1.21		
11.09	1.07		

Los datos de adsorción de DSS en ausencia de electrolito se encuentran en la tabla 3.1.

Tabla 3.11.- Adsorción de ALOES20 sobre pp en función del pH, a distintas concentraciones de cloruro sódico.

0.0 M		0.5 M		1.0 m	
pH	mmol/g pp	pH	mmol/g pp	pH	mmol/g pp
2.84	1.32	2.63	0.96	2.50	0.25
3.82	1.03	3.30	0.65	3.52	0.18
5.17	0.67	4.41	0.31	4.58	0.16
6.91	0.21	6.20	0.16	6.70	0.13
9.76	0.15	8.24	0.10	9.95	0.10

Tabla 3.12.- Cinética de adsorción sobre pp de una mezcla de DSS y ALOE85 para una relación molar 2:1, a pH 2.2.

t (h)	mmol DSS/g pp	mmol ALOE85/g pp
0.33	1.01	0.42
0.75	1.01	0.44
1.00	1.01	0.44
1.25	1.01	0.47
2.00	1.01	0.47
3.00	0.99	0.46
4.25	0.97	0.40
6.00	1.04	0.44

Tabla 3.13.- Adsorción sobre pp de una mezcla de DSS y ALOE85 para una relación molar 1:5, en función del pH.

	DSS	ALOE85
pH	mmol/g pp	mmol/g pp
2.34	0.49	2.51
3.07	0.46	2.35
3.87	0.35	1.52
4.39	0.22	0.96
5.23	0.11	0.36
6.76	0.04	0.14
8.00	0.0	0.0
10.92	0.0	0.0

Tabla 3.14.- Estudio comparativo sobre pp entre la adsorción de DSS, y la adsorción total de una mezcla de DSS y ALOE85 en la relación molar 1:5, en función del pH.

pH	Adsorción total (mmol/g pp)
2.34	3.00
3.07	2.81
3.87	1.87
4.39	1.18
5.23	0.47
6.76	0.18
8.00	0.0
10.92	0.0

Los valores correspondientes a la adsorción de DSS se encuentran en la tabla 3.1.

Tabla 3.15.- Adsorción de ALOE85 sobre pp que tiene previamente adsorbido diferentes cantidades de DSS (tratamiento secuencial). El estudio se realiza a pH 2.5, 3.0 y 3.7, respectivamente.

2.5		3.0		3.7	
DSS(*)	ALOE(*)	DSS	ALOE	DSS	ALOE
0.151	1.131	0.052	0.508	0.145	1.104
0.298	1.846	0.143	0.925	0.290	1.458
0.447	2.445	0.170	1.190	0.420	1.660
0.594	2.717	0.287	1.517	0.520	1.539
0.746	2.860	0.347	1.680	0.621	1.336
0.849	2.767	0.431	1.767	0.740	1.206
1.035	2.371	0.573	1.876	0.849	0.844
1.229	1.934	0.718	1.718	1.305	0.426
		0.791	1.501		
		1.180	0.665		
		1.666	0.490		

(*) mmol tensioactivo/g pp

Tabla 3.16.- Desorción del tensioactivo aniónico, DSS, en presencia de ALOE85, en el tratamiento secuencial sobre polvo de piel, 2 horas de equilibrio y pH 3.0.

A	B	% Desorción
0	0.000	0.0
0.052	0.000	0.0
0.143	0.000	0.0
1.170	0.000	0.0
0.287	0.000	0.0
0.347	0.000	0.0
0.431	0.000	0.0
0.573	0.000	0.0
0.718	0.035	4.9
0.791	0.076	9.6
1.180	0.354	30.0
1.666	0.714	42.9

A: mmoles DSS adsorbidos/g pp
B: mmoles DSS desorbidos/g pp

Tabla 3.17.- Isotermas de adsorción de ALOE85 sobre polvo de piel, en las condiciones del máximo del tratamiento secuencial, a distintas temperaturas y pH 3.0.

25°C		35°C	
Ce (mmol/l)	mmol/g pp	Ce (mmol/l)	mmol/g pp
0.350	0.732	0.490	1.061
0.699	1.151	1.154	1.724
3.147	1.515	5.157	2.209
6.119	1.694	10.769	2.349
12.063	1.701	18.881	2.154
17.308	1.783	27.675	2.228
24.301	1.692		
27.972	1.785		

Ce, concentración de equilibrio.

Tabla 3.18.- Influencia de la polaridad del medio en la adsorción sobre polvo de piel de ALOE85, en las condiciones del máximo del tratamiento secuencial, a pH 3.0.

% etanol (w:w)	mmol/g pp
4.9	1.82
5.0	1.74
8.2	1.68
10.2	1.63
12.0	1.54
15.0	1.49
20.1	1.12
23.9	0.90
30.0	0.83
35.0	0.46
40.0	0.07
50.0	0.00

Tabla 3.19.- Desorción de DSS en función de la polaridad del medio en las condiciones del máximo del tratamiento secuencial, sobre polvo de piel, 2 horas de equilibrio y pH 3.0.

En presencia de ALOE85		En ausencia de ALOE85	
% etanol	% Desorción	% etanol	% Desorción
5.0	0	10.0	0
8.2	0	15.0	0
8.2	0	20.0	0
10.2	0	30.0	12
15.0	7	40.0	32
20.1	10	50.0	40
23.9	13		
30.0	15		
35.0	22		
40.0	32		
50.0	47		

Tabla 3.20.- Adsorción sobre polvo de piel, de distintos tensioactivos no iónicos, en las condiciones del máximo del tratamiento secuencial, en función del número de moles de óxido de etileno (OE) presentes en su cadena hidrocarbonada. Los tratamientos se realizan a pH 3.0.

Nonilfenoles		Alifáticos	
OE	mmol/g pp	OE	mmol/g pp
8.5	1.97	8.5	1.94
9.0	1.95	12	1.68
12.4	1.77	14	1.52

Tabla 3.25.- Estudio de desorción en la isoterma de adsorción de DSS sobre polvo de piel a pH 3.0 y 25°C.

Ce (mmol/l)	A	B	C
54.442	2.61	1.09	1.52
69.353	2.64	1.18	1.46
79.756	2.66	1.18	1.48
89.812	2.62	1.18	1.44

A: mmol DSS adsorbidos/g pp
B: mmol DSS desorbidos/g pp
C: mmoles DSS/g pp, en el sustrato después de la desorción.

Tabla 3.27.- Estudio comparativo entre la adsorción de DSS, y el colorante Anaranjado II (NII) sobre pp, en función del pH.

pH	mmol/g pp
2.36	1.58
2.74	1.57
3.48	1.49
3.63	1.43
3.86	1.22
4.38	0.91
4.87	0.58
5.55	0.37
6.33	0.26
6.96	0.07
7.94	0.00
8.91	0.00

Los datos correspondientes a la adsorción de DSS se encuentran en la tabla 3.1.

Tabla 3.28.- Adsorción de N-II sobre pp que tiene previamente adsorbido diferentes cantidades de DSS. Los tratamientos se realizaron a pH 3.0.

mmol DSS adsorbido/g pp	mmol NII adsorbido/g pp
0	1.49
0.045	1.40
0.087	1.32
0.170	1.13
0.211	1.03
0.246	0.02

Tabla 3.29.- Adsorción de DSS sobre pp que tiene previamente adsorbido diferentes cantidades de N-II. Los tratamientos se realizaron a pH 3.0.

mmol NII adsorbido/g pp	mmol DSS adsorbido/g pp
0.107	1.89
0.230	1.82
0.307	1.82
0.470	1.94
0.540	2.00
0.779	2.02

Tabla 3.30.- Adsorción sobre pp, de distintos tensioactivos, en función del pH.

DBS		ALOES20		MLGS		ACAP	
pH	mmol/g	pH	mmol/g	pH	mmol/g	pH	mmol/g
2.29	1.49	3.27	1.55	5.15	1.33	5.71	1.68
2.50	1.44	3.92	1.36	5.25	0.96	6.49	1.15
2.83	1.41	4.54	1.12	5.40	0.68	7.18	0.77
3.31	1.35	4.98	0.87	5.50	0.55	7.64	0.60
4.28	1.15	5.56	0.71	5.65	0.34	8.37	0.43
5.66	0.72	6.99	0.38	5.75	0.31	9.20	0.31
7.70	0.40	9.65	0.15	5.85	0.27		
9.71	0.34	10.81	0.06	6.65	0.14		
11.04	0.32			6.85	0.03		
11.28	0.32			7.45	0.00		
11.52	0.29						

Los datos correspondientes a la adsorción de DSS se encuentran en la tabla 3.1.

Tabla 3.31.- Estudio comparativo de las cinéticas de adsorción de DSS sobre polvo de piel (pp), y polvo de piel curtida (ppc). La cinética sobre ppc se realiza a pH 2.8.

t (h)	mmol/g ppc
0.17	0.90
0.33	1.00
0.50	1.06
0.75	1.24
1.00	1.32
2.25	1.50
4.00	1.63
4.75	1.78
6.00	1.71

Los valores correspondientes a la cinética de adsorción sobre pp se encuentran en la tabla 3.3, pH 2.60.

Tabla 3.32.- Influencia del pH en la adsorción de DSS sobre polvo de piel con distintos contenidos en óxido de cromo (III).

% Cr_2O_3 = 4.45%		% Cr_2O_3 = 7.25%	
pH	mmol/g ppc	pH	mmol/g ppc
3.08	1.68	2.30	1.74
3.72	1.51	2.40	1.34
4.14	1.39	2.75	1.67
5.00	1.15	3.85	1.56
5.52	1.04	4.85	1.35
6.19	0.97	5.75	1.21
6.75	0.82	6.75	1.08

Los valores de adsorción de DSS sobre polvo de piel sin tratamiento curtiente se encuentran en la tabla 3.1.

Tabla 3.33.- Adsorción de DSS sobre ppc en función del pH, a distintas concentraciones de sulfato sódico.

0.1 M		0.2 M		1.4 M	
pH	mmol/g ppc	pH	mmol/g ppc	pH	mmol/g ppc
2.91	1.31	3.04	1.03	2.95	0.73
3.11	1.24	3.22	0.84	3.09	0.73
3.80	1.01	3.79	0.80	3.64	0.61
4.30	0.81	4.30	0.63	4.14	0.52
4.72	0.68	4.70	0.60	4.55	0.46
5.00	0.63	4.89	0.56	4.79	0.47

Los valores de adsorción de DSS sobre ppc (4,45% Cr_2O_3), en ausencia de electrolito, se encuentran en la tabla 3.32.

Tabla 3.34.- Adsorción de DSS sobre ppc en función del pH, a distintas concentraciones de cloruro sódico.

0.2 M		0.5 M	
pH	mmol/g ppc	pH	mmol/g ppc
2.33	1.78	1.68	1.63
2.38	1.73	1.86	1.58
3.17	1.41	2.62	1.33
3.64	1.20	3.36	1.10
3.99	1.07	3.81	1.01
4.65	0.85	4.36	0.88

Los valores de adsorción de DSS sobre ppc (4,45% de Cr_2O_3), en ausencia de electrolito, se encuentran en la tabla 3.32.

Tabla 3.35.- Adsorción de ALOE85 sobre pp con distinto contenido en óxido de cromo (III), que tiene previamente adsorbido diferentes cantidades de DSS (tratamiento secuencial). Los tratamientos se realizaron a pH 3.0.

% Cr_2O_3					
0.56		3.97		7.25	
DSS(*)	ALOE85(*)	DSS	ALOE85	DSS	ALOE85
0.158	0.64	0.139	0.11	0.145	---
0.305	0.95	0.277	0.26	0.298	---
0.458	1.10	0.422	0.32	0.443	0.003
0.616	1.18	0.645	0.39	0.561	0.013
0.735	1.18	0.907	0.47	0.712	0.059
0.869	1.09	1.205	0.48	0.852	0.045
1.013	0.97			1.000	0.170
1.467	0.41			1.590	0.210

(*) mmol tensioactivo/g ppc

Los datos correspondientes a la adsorción secuencial sobre pp sin óxido de cromo se encuentran en la tabla 3.15 (pH 3.0).

LISTADO DE FIGURAS

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1.- Estructura química de una molécula de tensioactivo. En ella se muestra su parte hidrófoba y su parte hidrófila.

Figura 1.2.- Cambios en las propiedades físicas de una disolución acuosa de dodecil sulfato sódico (DSS), en los alrededores de la concentración micelar crítica (CMC) (Tanford, 1974).

Figura 1.3.- Localización en la micela de la zona de solubilización.

Figura 1.4.- Localización en la micela de las distintas zonas de solubilización para los diferentes compuestos: apolar, anfifílico e iónico (García-Domínguez, 1986).

Figura 1.5.- Efecto desengrasante de los diferentes tensioactivos en solucion acuosa: (A) agente no iónico, producto de condensación de una alquilfenol con óxido de etileno. (B) agente catiónico (bromuro de cetiltrimetil amonio). (C) agente aniónico (cetil sulfato sódico), (O'Flaherty, 1958).

Figura 1.6.- (a) Estructura de un aminoácido. (b) Cadena polipeptídica, mostrando su enlace peptídico.

Figura 1.7.- Dimensiones medias de la hélice α. El paso de rosca y el ascenso por resto corresponden a las periodicidades mayores y menores de 0.54 y 0.15 nm, respectivamente (Pauling, 1955, vía Lehninger, 1984).

Figura 1.8.- Representación esquemática de tres cadenas paralelas en estructura β, donde aparece la disposición en lámina plegada (Bennett, 1968, vía Lehninger, 1984).

Figura 1.9.- (A) Aminoácidos que constituyen el colágeno agrupados según la composición de la cadena lateral (CL) que presentan en la proteína. (B) Diagrama sectorial de la proporción existente de dichos aminoácidos.

Figura 1.10.- Conformación de un solo filamento de la triple hélice del colágeno. La secuencia que se muestra es -Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro (Stryer, 1985).

Figura 1.11.- Modelo en esqueleto de la triple hélice del colágeno. La secuencia repetitiva que se muestra es: -Gly-Pro-Pro (Stryer, 1985).

Figura 1.12.- Representación esquemática de los enlaces iónicos que tienen lugar entre los residuos de ácido aspártico y arginina, y entre los residuos de ácido glutámico y lisina.

Figura 1.13.- Curva de valoración del colágeno (Bowes, 1948).

Figura 1.14.- Enlaces por puente de hidrógeno. (a) Enlaces múltiples entre grupos carbonilo y grupos amino. (b) Enlace entre un grupo carbonilo y el grupo hidroxilo de la hidroxiprolina (Gustavson, 1956).

Figura 1.15.- Disposición morfológica de una fibra de colágeno a todos los niveles de organización.

Figura 1.16.- Micrografía electrónica de fibrillas intactas de colágeno, obtenidas de la piel. La preparación fue sombreada con cromo. El período a lo largo del eje de la fibrilla es de 64 nm. (Stryer, 1985).

Figura 1.17.- (a) Esquema de una fibrilla, donde se muestra su estriación y alineación alternada (Lehninger, 1984). (b) Esquema de una protofibrilla mostrando el posible origen de las bandas e interbandas (Bear, 1952).

Figura 1.18.- Proceso cíclico correspondiente a la ecuación (1.3). Dos solutos S se llevan desde separación infinita a una pequeña distancia σ dentro del líquido. El correspondiente cambio de energía libre es ΔG^1 (σ). La segunda ruta consta de una primera transferencia a la fase gaseosa de los dos solutos, luego se llevan desde separación infinita a la separación σ, y finalmente el "dímero" pasa de fase gas a fase líquida (Ben-Naim, 1980).

Figura 1.19.- Niveles energéticos en el agua líquida.

Figura 1.20.- Niveles energéticos en disoluciones diluidas de hidrocarburos en agua.

Figura 1.21.- Estructura del agua en la envolvente parcial de un hidrocarburo (Nemethy y Scheraga, 1962b).

Figura 1.22.- Representación esquemática de la formación del enlace hidrófobo entre cadenas aisladas (alanina y leucina). Las moléculas de agua se muestran sólo de forma esquemática, sin indicar ninguna orientación particular (Nemethy y Scheraga, 1962c).

Figura 1.23.- Mecanismo de adsorción de tensioactivos aniónicos sobre proteínas, según Pankhurst,(1953).

Figura 3.1.- Adsorción sobre polvo de piel (pp) de tensioactivos de distinto carácter, DSS, aniónico, y BHTA, catiónico, frente al pH. El tensioactivo de carácter no iónico, ALOE85, y el tensioactivo anfótero, CAPB, no presentan adsorción en el intervalo de pH estudiado.
Excepto cuando se indiquen otras condiciones los tratamientos se realizan a 25°C y 2 horas de equilibrio.

Figura 3.2.- Adsorción de DSS sobre pp en función del pH. (--) Curva de valoración del colágeno (Bowes, 1948).

Figura 3.3.- Cinética de adsorción del DSS sobre pp, a diferentes valores de pH.

Figura 3.4.- Cinética de adsorción de DSS sobre pp, a pH 3.0 y distintas concentraciones de tensioactivo.

Figura 3.5.- Clasificación de las distintas isotermas de adsorción para disoluciones diluidas según Giles (1974a).

Figura 3.6.- Isotermas de adsorción de DSS sobre pp, a pH 3. 0 y a pH 10.0.

Figura 3.7.- Adsorción de DSS sobre pp en función del pH, y distinta polaridad del medio.

Figura 3.8.- Adsorción de DSS sobre pp en función del pH, a 25 y 30°C respectivamente.

Figura 3.9.- Adsorción de DSS sobre pp en función del pH, a distintas concentraciones de cloruro sodico.

Figura 3.10.- Adsorción de DSS sobre pp en función del pH, a distintas concentraciones de sulfato sódico.

Figura 3.11.- Adsorción de ALOES20 sobre pp en función del pH, a distintas concentraciones de cloruro sódico.

Figura 3.12.- Cinética de adsorción sobre pp de una mezcla de DSS y ALOE85 para una relación molar 2:1, a pH 2.2.

Figura 3.13.- Adsorción sobre pp de una mezcla de DSS y ALOE85 para una relación molar 1:5, en función del pH.

Figura 3.14.- Estudio comparativo sobre pp entre la adsorción de DSS y la adsorción total de una mezcla de DSS y ALOE85 en la relación molar 1:5, en función del pH.

Figura 3.15.- Adsorción de ALOE85 sobre pp que tiene previamente adsorbido diferentes cantidades de DSS (tratamiento secuencial). El estudio se realiza a pH 2.5, 3.0 y 3.7, respectivamente.

Figura 3.15a- Representación esquemática alternativa, mediante diagrama de barras, del tratamiento secuencial a pH 3.0 correspondiente a las figuras 3.15 y 3.16. En este caso, para facilitar la comprensión del fenómeno sólo se representan parte de los valores experimentales.

Figura 3.1P.- Desorción del tensioactivo aniónico, DSS, en presencia de ALOE85, en el tratamiento secuencial sobre polvo de piel, 2 horas de equilibrio y pH 3.0.

Figura 3.17.- Isotermas de adsorción de ALOE85 sobre polvo de piel, en las condiciones del máximo del tratamiento secuencial, a distintas temperaturas y pH 3.0.

Figura 3.18.- Influencia de la polaridad del medio en la adsorción sobre polvo de piel de ALOE85, en las condiciones del máximo del tratamiento secuencial, a pH 3.0.

Figura 3.19.- Desorción de DSS en función de la polaridad del medio en las condiciones del máximo del tratamiento secuencial, sobre polvo de piel, 2 horas de equilibrio y pH 3.0.

Figura 3.20.- Adsorción sobre polvo de piel, de distintos tensioactivos no iónicos, en las condiciones del máximo del tratamiento secuencial, en función del número de moles de óxido de etileno (OE) presentes en su cadena hidrocarbonada. Los tratamientos se realizan a pH 3.0.

Figura 3.21.- Representación esquemática de la proteína colagénica y de las modificaciones que sufre el enlace iónico en función del pH. Cada eje principal representa un segmento de la triple hélice del colágeno, que soporta los grupos ácidos y básicos, y las cadenas laterales apolares, representadas por los pequeños tramos transversales.

Figura 3.22.- Esquema del mecanismo de adsorción de un tensioactivo aniónico sobre la proteína colagénica.

Figura 3.23.- Esquema del mecanismo de adsorción secuencial de los tensioactivos aniónico y no iónico sobre la proteína colagénica.

Figura 3.24.- Esquema de adsorción de un tensioactivo aniónico a concentraciones superiores a su CMC, en el punto isoeléctrico de la proteína.

Figura 3.25.- Estudio de desorción en la isoterma de adsorción de DSS sobre polvo de piel a pH 3.0 y 25°C. (a) Adsorción total; (b) DSS en el sustrato después de la desorción.

Figura 3.26.- Esquemas de adsorción para el estudio de hidrofobización.

Figura 3.27.- Estudio comparativo sobre pp, entre la adsorción de DSS y el colorante Anaranjado II (NII), en función del pH.

Figura 3.28.- Adsorción de N-II sobre pp que tiene previamente adsorbido diferentes cantidades de DSS. Los tratamientos se realizaron a pH 3.0.

Figura 3.29.- Adsorción de DSS sobre pp que tiene previamente adsorbido diferentes cantidades de NII. Los tratamientos se realizaron a pH 3.0.

Figura 3.30.- Adsorción sobre pp, de distintos tensioactivos, en función del pH.
No presentan adsorción ALOE85 y CAPB.

Figura 3.31.- Estudio comparativo de las cinéticas de adsorción de DSS sobre polvo de piel (pp), y polvo de piel curtida (ppc). Los tratamientos se realizaron a pH 2.6 y 2.8 respectivamente.

Figura 3.32.- Influencia del pH en la adsorción de DSS sobre polvo de piel con distintos contenidos en óxido de cromo (III).

Figura 3.33.- Adsorción de DSS sobre ppc en función del pH, a distintas concentraciones de sulfato sódico.

Figura 3.34.- Adsorción de DSS sobre ppc en función del pH, a distintas concentraciones de cloruro sódico.

Figura 3.35.- Adsorción de ALOE85 sobre pp con distinto contenido en óxido de cromo (III), que tiene previamente adsorbido diferentes cantidades de DSS (tratamiento secuencial). Los tratamientos se realizaron a pH 3.0.

Figura 4.1.- Representación esquemática de los mecanismos de adsorción de un tensioactivo aniónico sobre la proteína colagénica.

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL CONSULTADA

Publicaciones Periódicas

ALLEN G. (1974). "The binding of sodium dodecyl sulphate to bovine serum albumin at high binding ratios". Biochem. J. 137, 575. (D1831)

ANFINSEN C.B. (1973). "Principles that govern the folding of proteins chains". Science 181, 223. (D1664)

ANFINSEN C.B., SCHERAGA H.A. (1975). "Experimental and theoretical aspects of proteins folding". Adv. Protein Chem. 29, 205. (D1406)

BALDWIN R.L. (1986). "Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8069. (D1725)

BIRDI K.S. Ver Steinhardt (1974.). (D1422)

BIRDI K.S. Ver Steinhardt (1977). (D1637)

BIRDI K.S.(1973). "The binding of cationic detergent to insulin, zinc-insulin and iso-insulin". Biochem. J. 135, 253. (D848)

BIRDI K.S., MAGNUSSON T. (1976). "Thermodynamics of micellar solubilization of various water-insoluble dyes". Colloid Polymer Sci. 254, 1059-1061. (D1895)

BIRDI K.S., STEINHARDT J. (1975). "Distinct modes of binding of sodium dodecylsulfate to several unfolded proteins". Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 34, 598. (D1804)

BIRDI K.S., STEINHARDT J. (1978). "The effects of diverse proteins on the solubilization of various hydrophobic probes by protein-detergent complexes". Biochem. Biophys. Acta 534, 219. (D1636)

BLEI I. (1959). "The solubilizing properties of the protein-detergent complex". J. Colloid Sci. 14, 358. (D1949)

BLEI I. (1960). "The solubilizing properties of the protein-detergent complex". J. Colloid Sci. 15, 370. (D1948)

BLOEMENDAL M., MARCUS Y., SIJPKES A.H., SOMSEN G. (1989). "Role of hydropohobicity in protein structure is overestimated". Int. J. Peptide Protein Res. 34, 405-408. (D1974)

BOYER P.D. (1945). "The prevention by caprylate of urea and guanidine denaturation of serum albumin". J. Biol. Chem. 158, 715. (D1643)

BOYER P.D., BALLOU G.A.,LUCK J.M. (1946). "The combination of fatty acids and related compounds with serum albumin. II. Stabilization against urea and guanidine denaturation". J. Biol. Chem. 162, 199. (D1642)

BOYER P.D., BALLOU G.A., LUCK J.M.(1947). "The combination of fatty acids and related compunds with serum albumin. III. The nature and extent of the combination". J.Biol. Chem. 167, 407. (D1641)

BOWES J.H., KENTEN R.H. (1948). "The amino-acid composition and titration curve of collagen". Biochem. J. 43, 358. (D1317)

BRAUN P.E., RADIN N.S. (1969). "Interactions of lipids with a membrane structural protein from myelin". Biochemistry 8, 4310. (D2138)

BREUER M., STRAUSS U.P. (1960). "The solubilization of isoöctane by complexes of serum albumin and sodium dodecyl sulfate". J. Phys. Chem. 64, 228. (D1838)

BULL H.B. (1944). "Adsorption of water vapor by proteins". J. Am. Chem. Soc. 66, 1499. (D1858)

BULL H.B., NEURATH H. (1937). "The denaturation and hydration of proteins. II. Surface denaturation of egg albumin". J. Biol. Chem. 118, 163. (D764)

BURLEY S.K.,PETSKO G.A. (1988). "Weakly polar interactions in proteins". Adv. Protein Chem. 39, 125. (D1972)

CID H., BUNSTER M., ARRIAGADA E., CAMPOS M. (1982). "Prediction of secondary structure of proteins by means of hydrophobicity profiles". Febs Letters 150, 247. (D1986)

CLARK A.H., FRANKS F., PEDLEY M.C., REID D.S. (1977). "Solute interactions in dilute solutions. Part 2. A statistical mechanical study of the hydrophobic interaction". J. Chem. Soc. Faraday Trans. 73, 290. (D1221)

DE KROON A.I.P.M., SOEKARJO M.W., DE GIER J., DE KRUIJFF B. (1990). "The role of charge and hydrophobicity in peptidelipid interaction: A comparative study based on tryptophan fluorescence measurements combined with the use of aqueous and hydrophobic quenchers". Biochemistry 29, 8229. (D2051)

DERBYSHIRE A.N. (1955). "Calorimetric determination of heats of dilution, heats of solution and heat of dyeing onto wool of Naphthalene Orange G". Trans. Faraday Soc. 51, 909. (D1961)

DERBYSHIRE A.N., MARSHALL W.J. (1955). "Calorimetric studies of the reaction of Naphthalene Orange G with amino acids". Disc. Faraday Soc. no. 16, 140. (D1977)

DERBYSHIRE A.N., PETERS R.H. (1955). "An explanation of dyeing mechanisms in terms of non-polar bonding". J. Soc. Dyers Col. 71, 530. (D1978)

DICKINSON J.C. (1975). "The influence of surface active agents on the chemical reactivity of wool". Woll Sci. Rev. no. 51, 43. (D2002)

DUGGAN E.L., LUCK J.M. (1948). "The combination of organic anions with serum albumin. IV. Stabilization against urea denaturationll. J. Biol. Chem. 172, 205. (D1640)

EISENBERG D., MCLACHLAN A.D. (1986). "Solvation energy in protein folding and binding". Nature 319, 199. (D1988)

EINSENBERG D., WEISS R.M., TERWILIGER T.C., WILCOX W. (1982). "Hydrophobic moments and protein structure". Faraday Symp. Chem. Soc. 17, 109. (D1523)

EMERSON M.F., HOLTZER A. (1967). "The hydrophobic bond in micellar systems. Effects of various additives on the stability of micelles of sodium dodecyl sulfate and of n-dodecyltrimethylammonium bromide". J. Phys. Chem. 71, 3320. (D1388)

FEW A.V., OTTEWILL R.H., PARREIRA H.C. (1955). "The interaction between bovine plasma albumin and dodecyltrimethylammonium bromide". Biochim. Biophys. Acta 18, 136. (D1850)

FISH W.W., REYNOLDS J.A., TANFORD C. (1970). "Gel chromatography of proteins in denaturing solvents". J. Biol. Chem. 245, 5166. (D1845)

FOSTER J.F., AOKI K. (1958). "Further studies of the isomerization of bovine plasma albumin. The effect of detergent ions at low pH and preliminary observations at high pH". J. Am. Chem. Soc. 80, 5215. (D1859)

FRAENKEL-CONRAT H., COOPER M. (1944). "The use of dyes for the determination of acid and basic groups in proteins". J. Biol. Chem. 154, 239. (D1376)

FRANK H.S., EVANS M.W. (1945). "Free volume and entropy in condensed systems. III. Entropy in binary liquid mixtures; partial molal entropy in dilute solutions; structure and thermodynamics in aqueous elecrolytes". J. Chem. Phys. 13, 507. (D1522)

FRANKS F. (1982)."Hydrophobic interactions-a historical perspective". Faraday Symp. Chem. Soc. 17, 7. (D1826)

FREDERICQ E. (1954). "Interactions de protéines et d'ions en solution. 1. Influences de structure dans les associations entre protéins et anions organiques". Bull. Soc. Chim. Belg. 63, 158. (D1833)

FREYTAG J.W., NOELKEN M.E.,HUDSON B.G.(1979). "Physical properties of collagen-sodium dodecyl sulfate complexes". Biochemistry 18, 4761. (D1713)

FUKUSHIMA K., MURATA H., NISHIKIDO N., SUGIHARA G., TANAKA M. (1981). "The binding of sodium dodecyl sulfate to lysozyme in aqueous solutions". Bull. Chem. Soc. Jpn. 54, 3122. (D1720)

GREFRATH S.P., REYNOLDS J. (1974). "The molecular weight of the major glycoprotein from the human erythrocyte membrane". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 3913. (D1810)

GODDARD E.D. (1986). "Polymer-surfactant interaction. Part I. Uncharged water-soluble polymers and charged surfactants". Coll. Surf. 19, 255. (D1756)

GODDARD E.D. (1986). "Polymer-surfactant interaction. Part II. Polymer and surfactant of opposite charge". Coll. Surf. 19, 301. (D1757)

GOODMAN D.S. (1958). "The interaction of human serum albumin with long-chain fatty acidanions". J. Am. Chem. Soc. 80, 3892. (D1432)

GRIFFITH J.C., ALEXANDER A.E. (1967). "Equilibrium adsorption isotherms for wool/detergent systems". J. Col. Int. Sci. 25, 311. (D1493)

HAROLD S.P. (1958). "Thermodynamics of the adsorption of small molecules by proteins". Trans. Faraday Soc. 54, 1876. (D1556)

HARRAP B.S. (1969). "The effect of aliphatic alcohols on the thermal stability of tropocollagen under acidic conditions". Int. J. Prot. Res. 1, 245. (D1503)

HELENIUS A., SIMONS K. (1972). "The binding of detergents to lipophilic and hydrophilic proteins". J. Biol. Chem. 247, 3656. (D1384)

HELENIUS A., SIMONS K. (1977). "Charge shift electrophoresis: Simple method for distinguishing between amphiphilic and hydrophilic proteins in detergent solution". Pro. Natl. Acad. Sci. USA 74, 529. (D1818)

HERMANS J., SCHERAGA H.A. (1961). "Structural studies of ribonuclease. VI. Abnormal ionizable groups". J. Am. Chem. Soc. 83, 3293. (D1834)

HILL R.M., BRIGGS D.R. (1956). "A study of the interaction of n-Octylbenzene-p-sulfonate with β-lactoglobulin". J. Am. Chem. Soc. 78, 1590. (D1933)

HIRAMATSU K., YANG J.T. (1983). "Cooperative binding of hexadecyltrimethylammonium chloride and sodium dodecyl sulfate to cytochrome c and the resultant change in protein conformation". Biochim. Biophys. Acta 743, 106. (D1660)

HOLT L.A., ONORATO J. (1989)."Substantivity of various anionic surfactants applied to wool". Text. Research J. 59, 653. (D1997)

IMAMURA T., KONISHI K. (1987). "Studies on interaction of oligopeptides with sodium dodecyl sulfate: Stopped-flow kinetics of chemical modification of tryptophan residues with N-bromosuccinimide". J. Protein Chem. 6, 401. (D1655)

ISRAELACHVILI J., PASHLEY R. (1982). "The hydrophobic interaction is long range, decaying exponentially with distance". Nature 300, 341. (D2124)

JACOBS P.T., GEER R.D., ANACKER E.W. (1972). "A comparison of micellar aggregation numbers as determined by dye solubilization and light scattering". J. Coll. Interface Sci. 39, 611. (D1819)

JIRGENSONS B. (1982). "Factors determining the reconstructive denaturation of proteins in sodium dodecyl sulfate solutions. Further circular dichroism studies on structural reorganization of seven proteins". J. Protein. Chem. 1, 71. (D1745)

JONES M.N., MANLEY P. (1979). "Binding of n-alkyl sulphates to lisozyme in aqueous solution". J. Chem. Soc. Faraday 1, 75, 1736. (D1665)

KARUSH F. (1950). "Heterogeneity of the binding sites of bovine serum albumin". J. Am. Chem. Soc. 72, 2705. (D1877)

KARUSH F. (1951). "The study of protein binding by partition analysis. The effect of protein charge". J. Am. Chem. Soc. 73, 1246. (D1885)

KARUSH F. (1952). "The interaction of optically isomeric dyes with bovine serum albumin". J. Phys. Chem. 56, 70. (D1907)

KARUSH F., SONENBERG M. (1949). "Interaction of homologous alkyl sulfates with bovine serum albumin". J. Am. Chem. Soc. 71, 1369. (D1871)

KAUZMANN W. Ver Kuntz I.D. (1974). (D1403)

KAUZMANN W. (1959). "Some factors in the interpretation of protein denaturation". Adv. Protein Chem. 14, 1. (D1331)

KAUZMANN W. (1987). "Protein stabilization. Thermodynamics of unfolding". Nature 325, 763. (D1724)

KUNTZ I.D.,KAUZMANN W. (1974). "Hydration of proteins and polypeptides". Adv. Protein Chem. 28, 239. (D1403)

KLOTZ I.M., BURKHARD R.K., URQUHART J.M. (1952). "The binding of organic ions by proteins. Comparison of bovine and human serum albumins". J. Phys. Chem. 56, 77. (D1904)

KLOTZ I.M., LUBORSKY S.W. (1959). "The binding of organic ions by proteins. Effects of changes in solvent and their implications as to the nature of the complexes". J. Am. Chem. Soc. 81, 5119. (D1335)

KLOTZ I.M., URQUHART J.M. (1949). "The binding of organic ions by proteins. Effect of temperature". J. Am. Chem. Soc. 71, 847. (D1870)

KRAGH-HANSEN U., RIISON T. (1976). "Complexes of aliphatic sulfates and human-serum albumin studied by C nuclear - magnetic - resonance spectroscopy". Eur. J. Biochem. 70, 15. (D1721)

LARSSON A., GUSTAVSON K.H. (1955). "The accesibility of the cationic groups of collagen to large anions of polyacids". J. Soc. Leather Trades Chem. 39, 107. (D1981)

LEONARD W.J., FOSTER J.F. (1961). "The N-F transition as the basis for cooperative detergent binding of bovine plasma albumin". J. Biol. Chem. 236, PC73. (D1659)

LESINS V., RUCKENSTEIN E. (1989). "Chromatographic probing of protein-sorbent interactions". J. Colloid Interface Sci. 132, 566. (D1964)

LOFFLER B.M., KUNZE H. (1989). "Biospecific dye-binding and hydrophobic interactionchromatography as tools for high yield preparation of purified phospholipase A_1 from rat liver". Biochem. Biophys. Acta 1003, 225-231. (D1900)

LOVRIENT R., STURTEVANT J.M. (1971). "Calorimetric determination of the enthalpies of binding of ions to deionized bovine serum albumin". Biochemistry 10, 3811. (D1428)

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent". J. Biol. Chem. 193, 265. (D1830)

LUCK J.M. (1947). "Mandelate as a stabilizer of serum albumin". J. Phys. Chem. 51, 229. (D1639)

LUNDGREN H.P. (1945). "Synthetic protein fibers from protein-detergent complexes". Text. Research J. 15, 335.(D1014)

LUNDGREN H.P. (1949). "Synthetic fibers made from proteins". Adv. Protein Chem. 5, 305. (D1395)

LUNDGREN H.P., ELAM D.W., O'CONNELL R.A. (1943). "Electrophoretic study of the action of alkyl-benzenesulfonate detergents on egg albumin". J. Biol. Chem. 149, 183. (D846)

LUNDGREN H.P., O'CONNELL R.A. (1944). "Artificial fibers from corpuscular and fibrous proteins". Ind. Eng. Chem. 36, 370. (D1947)

MACRITCHIE F. (1978). "Proteins at interfaces". Adv. Protein Chem. 32, 283. (D1408)

MAKINO S., REYNOLDS J.A., TANFORD C. (1973). "The binding of deoxycholate and Triton X-100 to proteins". J. Biol. Chem. 248, 4926. (D1336)

MALLIARIS A., LANG J., ZANA R. (1986). "Dynamics of micellar solutions of ionic surfacants by fluorescence probing". J. Phys. Chem. 90, 655. (D1656)

MARKUS G., LOVE R.L., WISSLER F.C. (1964). "Mechanism of protection by anionic detergents against denaturation of serum albumin". J. Biol. Chem. 239, 3687. (D1820)

MARKUS G., McCLINTOCK D.K., CASTELLANI B.A. (1967). "Ligand-stabilized conformations in serum albumin". J. Biol. Chem. 242, 4402. (D1832)

MAROTTA M., MARTINO G. (1985)."Sensitive spectrophotometic method for the quantitative estimation of collagen". Anal. Biochem. 150, 86. (D950)

MARTINEZ DEL POZO A., OLMO N., OÑADERRA M., LIZARBE M.A., GAVILANES J.G. (1986). "Binding of 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid to type I collagen". Int. J. Peptide Protein Res. 28, 173. (D1587)

MATTICE W.L., HARRISON W.H. (1975). "Estimation of the circular dichroism exhibited by statistical coils of poly(L-alanine) and unionized poly(L-lysine) in water". Biopolymers 14, 2025. (D1802)

MATTICE W.L., HARRISON W.H. (1976). "The importance of coulombic interactions for the induction of β structure in lysine oligomers by sodium dodecyl sulfate". Biopolymers, 15, 559. (D1821)

MATTICE W.L., RISER J.M., CLARK D.S. (1976). "Conformational properties of the complexes formed by proteins and sodium dodecyl sulfate". Biochemistry 15, 4264. (D1663)

MEYBECK J., GALAFASSI P. (1971). "The effect of hydrocarbon substituents in azo dyes on wool dyeing". Appl. Polym. Symp. 18, 463. (D1944)

MILLER S., LESK A.M., JANIN J., CHOTHIA C. (1987). "The accesible surface area and stability of oligomeric proteins". Nature 328, 834. (D1989)

MORGAN N. (1986). "Reassesing the biochemistry of the 1920s: from colloids to macromolecules". Trends Biochem. Sci. 11, 187. (D2018)

MORGENTHALER J.J. (1982). "Hydrophobic chromatography of fibronectin". Febs Letters 150, 81. (D1987)

MUKERJEE P., RAY A. (1963). "The effect of urea on micelle formation and hydrophobic bonding". J. Phys. Chem. 67, 190. (D1925)

MULLER N., MEAD R.J. (1973). "Fluorine magnetic resonance study of the binding of long-chain trifluoroalkyl sulfate ions by bovine serum albumin". Biochemistry 12, 3831. (D1828)

MURATA Y., OKAWAUCHI M., KAWAMURA H., SUGIHARA G., TANAKA M. (1984). "Interaction between ionic detergents and a protein" en "Surfactants in Solution". K.L. Mittal, Bothorell (Eds). Vol. S. Plenum Press, New York. (D1634)

NELSON C.A. (1971). "The binding of detergents to proteins. 1. The maximum amount of dodecyl sulfate bound to proteins and the resistance to binding of several proteins". J. Biol. Chem. 246, 3895. (D1846)

NEMETHY G. Ver Scheraga H.A. (1962). (D2007)

NEMETHY G. (1967). "Hydrophobic interactions". Angew. Chemie Internat. Edit. 6, 195. (D1526)

NEMETY G. (1969). "Noncovalent interactions in solution". Ann. N.Y. Acad. Sci. 155, 492. (D1525)

NEMETHY G., OOI T., SCHERAGA H.A. (1987). "Structural principles of protein architecture". J. Protein Chem. 6, 529. (D1653)

NEMETHY G., SCHERAGA H.A. (1962). "Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. I. A model for the thermodynamic properties of liquid water". J. Chem. Phys. 36, 3382. (D1350)

NEMETHY G., SCHERAGA H.A. (1962). "Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. II. Model for the thermodynamic properties of aqueous solutions of hydrocarbons". J. Chem. Phys. 36, 3401. (D1349)

NEMETHY G., SCHERAGA H.A. (1962). "The structure of water and hydrohphobic bonding in proteins. III. The thermodynamic properties of hydrophobic bonds in proteins". J. Phys. Chem. 66, 1773. (D1172)

NISHIKIDO N. (1977). "Mixed micelles of polyoxyethylene-type nonionic and anionic surfactants in aqueous solutions". J. Coll. Int. Sci. 60, 242. (D1371)

NOZAKI Y., REYNOLDS J.A., TANFORD C. (1974). "The interaction of a cationic detergent with bovine serum albumin and other proteins". J. Biol. Chem. 249, 4452. (D-849)

OAKES J. (1973). "Magnetic-resonance studies of the interactions between bovine-serum albumin and surfactants. I. Nature of binding site". Eur. J. Biochem. 36, 553. (D1813)

OAKES J. (1974). "Protein-surfactant interactions. Nuclear magnetic resonance and binding isotherm studies of interactions between bovine serum albumin and sodium dodecyl sulphate". J. Chem. Soc. Faraday Trans. 70, 2200. (D1118)

OAKES J. (1976). "Thermally denatured proteins. Nuclear magnetic resonance, binding isothermand chemical modification studies of thermally denatured bovine serum albumin". J. Chem. Soc. Faraday Trans. I, 72, 228. (D1969)

OAKES J. (1976). "Protein hydration. Nuclear magnetic resonance relaxation studies of the state of water in native bovine serum albumin solutions". J. Chem. Soc. Faraday Trans. I, 72, 216. (D1971)

OAKES J., CAFE M.C. (1973). "Magnetic-resonance studies of the interactions between bovine-serum albumin and surfactants. 2. Effect of surfactants on the structure of bovine-serum albumin". Eur. J. Biochem. 36, 559. (D1814)

OH H.I., HOFF J.E., ARMSTRONG G.S., HAFF L.A. (1980). "Hydrophobic interaction in tannin-proteins complexes". J. Agric. Food Chem. 28, 394. (D1366)

PALLANSCH M.J., BRIGGS D.R. (1954). "A study of the interaction of dodecyl sulfate with bovine serum albumin". J. Am. Chem. Soc. 76, 1396. (D1497)

PAULING L. (1945). "The adsorption of water by proteins". J. Am. Chem. Soc. 67, 555. (D1884)

PAULING L., COREY R.B. (1951). Varios trabajos sobre estructura y conformación de proteínas. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 37, 205-285. (D1812)

PELEJERO C.M., BALAGUER F., GARCÍA-DOMÍNGUEZ J., PARRA J.L. (1975). "Comparative study of the action of surfactants on some protein materials and their titration potential on human skin". Cosmetics & Perfumery 90, 77. (D874)

PIETRZYKOWSKI W. (1970). "The influence of surface active agents on the activity of proteolytic enzymes in the tannery". J. Soc. Leather Trade Chem. 54, 135. (D931)

PITT-RIVERS R., IMPIOMBATO F.S.A. (1968). "The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins". Biochem. J. 109, 825. (D1426)

PLANT D.A. (1952). "The combination of cation active compounds with collagen and chrome tanned collagen". J. Soc. Leather Trade Chem. 36, 351. (D1237)

POLET H., STEINHARDT J. (1968). "Binding-induced alterations in ultraviolet absorption of native serum albumin". Biochemistry 7, 1348. (D1999)

PRADO A., ARRONDO J.L.R., VILLENA A., GOÑI F.M, MACARULLA J.M. (1983). Membrane-surfactant interactions. The effect of Triton X-100 on sarcoplasmic reticulum vesicles. Biochim. Biophys. Acta 733, 163. (D1575)

PRATT L.R.,CHANDLER D. (1977). "Theory of the hydrophobic effect". J. Chem. Phys. 67, 3883. (D1468)

PRIVALOV P.L. (1979). "Stability of proteins. Small globular proteins". Adv. Protein Chem. 33, 167. (D1409)

PRIVALOV P.L. (1982). "Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system". Adv. Protein Chem. 35, 1. (D1411)

PRIVALOV P.L., GILL S.J. (1988). "Stability of proteins structure and hydrophobic interaction". Adv. Protein Chem. 39, 191. (D1973)

PRIVALOV P.L., GILL S.J. (1989). "The hydrophobic effect: a reappraisal". Pure Appl. Chem. 61, 1097-1104. (D1923)

PROTTEY C., HARTOP P.J., FERGUSON T.F.M. (1973). "The effect of soap upon certain aspects of skin biochemistry". J. Soc. Cosmet. Chem. 24, 473. (D85337)

PRYDE J.G. (1986). "Triton X-114: a detergent that has come in from the cold". Trends Biochem. Sci. 11, 160. (D2017)

PTITSYN O.B. (1987). "Protein folding: Hypotheses and experiments". J. Protein Chem. 6, 273. (D1661)

PUTNAN F.W., NEURATH H. (1944). "The precipitation of proteins by synthetic detergents". J. Am. Chem.Soc. 66, 692. (D847)

PUTNAN F.W., NEURATH H. (1945). "Interaction between proteins and synthetic detergents. II. Electrophoretic analysis of serum albumin-sodium dodecyl sulfate mixtures". J. Biol. Chem. 159, 195. (D845)

PUTNAN F.W. (1948). "The interactions of proteins and synthetic detergents". Adv. Protein Chem. 4, 79. (D1394)

RAMACHANDRAN G.N., SASISEKHARAN V. (1968). "Conformation of polypeptides and proteins". Adv. Protein Chem. 23, 283. (D1400)

RAY A., REYNOLDS J.A., POLET H., STEINHARDT J. (1966). "Binding of large organic anions and neutral molecules by native bovine serum albumin". Biochemistry 5, 2606. (D1837)

REYNOLDS J.A. Ver Fish W.W. (1970). (D1845)

REYNOLDS J.A. Ver Grefrath S.P. (1974). (D1810)

REYNOLDS J.A. Ver Nozaki Y. (1974). (D849)

REYNOLDS J.A. Ver Tanford C. (1976). (D1807)

REYNOLDS J.A. Ver Ray A. (1966). (D1837)

REYNOLDS J.A. Ver Steele J.C.H. (1979). (D1860)

REYNOLDS J.A. (1979). "The role of micelles in protein-detergent interactions". Methods Enzimol. 61, 58. (D1716)

REYNOLDS J.A., GALLAGHER J.P., STEINHARDT J. (1970). "Effect of pH on the binding of N-alkyl sulphates to bovine serum albumin". Biochemistry 9, 1232. (D1424)

REYNOLDS J.A., HERBERT S., POLET H., STEINHARDT J.(1967). "The binding of divers detergent anions to bovine serum albumin". Biochemistry 6, 937. (D1485)

REYNOLDS J.A., HERBERT S., STEINHARDT J. (1968). "The binding of some long-chain fatty acid anions and alcohols by bovine serum albumin". Biochemistry 7, 1357. (D1423)

REYNOLDS J.A., TANFORD C. (1976). "Determination of molecular weight of the protein moiety in protein-detergent complexes without direct knowledge of detergent binding". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4467. (D1809)

REYNOLDS J.A., TANFORD C. (1970). "The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes". J. Biol. Chem., 19, 5161. (D1667)

REYNOLDS J.A., TANFORD C. (1970). "Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 1002. (D1719)

RICH A., CRICK F.H.C. (1955). "The structure of collagen". Nature 176, 915. (D1806)

ROBILLARD K.A., WISHNIA A. (1972). "Aromatic hydrophobes and β-lactoglobulin A. Thermodynamics of binding". Biochemistry 11, 3835. (D1840)

ROBILLARD K.A., WISHNIA A.(1972). "Aromatic hydrophobes and β-lactoglobulin A. Kinetics of binding by nuclear magnetic resonance". Biochemistry 11, 3841. (D1941)

ROBINSON N.C., TANFORD C. (1975). "The binding of deoxycholate, Triton X-100, sodium dodecyl sulfate, and phosphatidylcholine vesicles to cytochrome b_5". Biochemistry 14, 369. (D1811)

ROSEN M.J. (1975). "Relationship of structure to properties in surfactants. III. Adsorption at the solid-liquid interface from aqueous solution". J. Am. Oil. Chem. Soc. 52, 431. (D1427)

ROSENBERG R.M., CRESPI H.L, KATZ J.J. (1969). "Nuclear magnetic resonance study of the interaction of sodium dodecyl sulfate with phycocyanin". Biochim. Biophys. Acta 175, 31. (D1839)

ROSENBERG R.M., KLOTZ I.M. (1955). "The binding of organic ions by proteins. Volume changes". J. Am. Chem. Soc. 77, 2590. (D1369)

ROWE E.S., STEINHARDT J. (1976). "Electrooptical properties of reduced protein-sodium dodecyl sulfate complexes". Biochemistry 15, 2579. (D1707)

SAITO N., WAKO H., AKUTSU T., OYANA Y. (1982). "Hydrophobic interaction and the prediction of the tertiary structures of proteins" en "Ions and Molecules in Solution", N. Tanaka, H. Ohtaki, R. Tamamushi (Eds). vol. 27, pp. 325-338. Elsevier Amsterdam. (D1454)

SÁNCHEZ-LEAL J., ANGUERA S., COMELLES F., GARCÍA DOMÍNGUEZ J.J., PARRA J.L. (1983). "Interactions between ionic surfactants and wool". J. Text Inst. 4, 196. (D1975)

SATAKE I., YANG J.T. (1976). "Interaction of sodium dodecyl sulfate with poly(L-ornithine) and poly(L-lysine) in aqueous solution". Biopolymers 15, 2263. (D1654)

SAVARINO P., VISCARDI G., CARPIGNANO R., BARNI E. (1989). "Amphiphilic acid dyes. Dyeing properties and interactions with surface-active systems". Colloid Surfaces 35, 251-260. (D1908)

SCHERAGA H.A. Ver Hermans J. (1961). (D1834)

SCHERAGA H.A. Ver Nemethy G. (1962). (D1172)

SCHERAGA H.A. Ver Nemethy G. (1962). (D1349)

SCHERAGA H.A. Ver Nemethy G. (1962). (D1350)

SCHERAGA H.A. Ver Nemethy G. (1987). (D1653)

SCHERAGA H.A. Ver Schneider H. (1965). (D1169)

SCHERAGA H.A. Ver Wako H. (1982). (D1743)

SCHERAGA H.A. (1961). "Effect of hydrophobic bonding on protein reaction". J. Phys. Chem. 65, 1071. (D1337)

SCHERAGA H.A. (1963). "Intramolecular bonds in proteins. II. Noncovalent bonds" en "The Proteins - Composition, Structure and Function". H. Neurath (Ed.). Vol. 1, cap. 6. Academic Press, New York. (D1519)

SCHERAGA H.A. (1965). "The effect of solutes on the structure of water and its implications for protein structure". Ann. N.Y. Acad. Sci. 125, 253. (D1565)

SCHERAGA H.A. (1987). "Conformational analysis of polypeptides and proteins for the study of protein folding, molecular recognition, and molecular design". J. Protein Chem. 6, 61. (D1433)

SCHERAGA H.A., NEMETHY G., STEINBERG I.Z. (1962). "The contribution of hydrophobic bonds to the thermal stability of protein conformations". J. Biol. Chem. 237, 2506. (D2007)

SCHNEIDER H., KRESHECK G.C., SCHERAGA H.A. (1965). "Thermodynamic parameters of hydrophobic bond formation in a model system". J. Phys. Chem. 69, 1310. (D1169)

SCHNELL J. (1968). "Evidence for the existence of hydrophobic interactions as a stabilizing factor in collagen structure". Arch. Biochem. Biophys. 127, 496. (D1530)

SCHOTT H. (1966). "Solubilization of a water-insoluble dye as a method for determining micellar molecular weights". J. Phys. Chem. 70, 2966. (D2137)

SCHWARZ G. (1970). "Cooperative binding to linear biopolymers. 1. Fundamental static and dynamic properties". Eur. J. Biochem. 12, 442. (D1650)

SCHWARZ G., KLOSE S., BALTHASAR W. (1970). "Cooperative binding to linear biopolymers. 2. Thermodynamic analysis of the proflavine-poly(L-glutamic acid) system". Eur. J. Biochem. 12, 454. (D1651)

SCHWARZ G.,BALTHASAR W. (1970). "Cooperative binding to linear biopolymers. 3. Thermodynamic and kinetic analysis of the acridine orange-poly(L-glutamic acid) system". Eur. J. Biochem. 12,461. (D1652)

SHIRAHAMA K., TSUJII K., TAKAGI T. (1974). "Free-boundary electrophoresis of sodium dodecyl sulfate-protein polypeptide complexes with special reference to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis". J. Biochem. 75, 309. (D1759)

SMITH M.L., MULLER N. (1975). "Fluorine magnetic resonance and equilibrium dialysis study of the binding of sodium 12,12,12-Trifluorododecylsulfate by polyethylene glicol". J. Colloid Interface Sci. 52, 507. (D1963)

SOOKNE A.M., FUGITT C.H., STEINHARDT J. (1940). "Electrodialytic estimation of ash and of acidic and basic groups in textile fibers". J. Res. Nat. Bur. Stand. 25, 61. (D1537)

SPECTOR A.A., FLETCHER J.E., ASHBROOK J.D. (1971). "Analysis of long-chain free fatty acid binding to bovine serum albumin by determination of stepwise equilibrium constants". Biochemistry 10, 3229. (D1844)

STEELE J.C.H., TANFORD C., REYNOLDS J.A. (1979). "Determination of partial specific volumes for lipid-associated proteins". Methods Enzymol. 48, 11. (D1860)

STEINHARDT J. Ver Birdi K.S. (1978). (D1636)

STEINHARDT J. Ver Polet H. (1968) (D1999)

STEINHARDT J. Ver Rowe E.S. (1976). (D1707)

STEINHARDT J. Ver Reynolds J.A. (1968). (D1423)

STEINHARDT J. Ver Sookne A.M. (1940). (D1537)

STEINHARDT J. (1942). "Calculation of protein-anion affinity constants from acid titration data". J. Res. Nat. Bur. Stand. 28, 191. (D1539)

STEINHARDT J. (1942). "Analysis of theselective combination of wool with acids in mixtures". J. Res. Nat. Bur. Stand. 29, 425. (D1543)

STEINHARDT J. (1945). "The chemistry of the amino acids and proteins". Ann. Rev. Biochem. 14, 145. (D1049)

STEINHARDT J. (1975). "The nature of specific and non-specific interactions of detergents with proteins: Complexing and unfolding" en "Protein-Ligand Interactions". H.Sund, G. Blauer (Eds.), p. 412-426. De Gruyter, Berlin. (D1906)

STEINHARDT J., FUGITT C.H. (1942). "Catalyzed hydrolysis of amide and peptide bonds in proteins". J. Res. Nat. Bur. Stand. 29, 315. (D1541)

STEINHARDT J., FUGGIT C.H., HARRIS M. (1940). "Combination of wool protein with acid and base: the effect of temperature on the titration curve". J. Res. Nat. Bur. Stand. 25, 519. (D1538)

STEINHARDT J., FUGITT C.H., HARRIS M. (1941). "Relative affinities of the anions of strong acids for wool protein". J. Res. Nat. Bur. Stand. 26, 293. (D1015)

STEINHARDT J., FUGITT C.H., HARRIS M. (1942). "Further investigations of the affinities of anions of strong acids for wool protein". J. Res. Nat. Bur. Stand. 28, 201. (D1540)

STEINHARDT J., FUGITT C.H., HARRIS M. (1942). "Combination of wool protein with acids in mixtures, and its relation to the acid dyeing of wool". J. Res. Nat. Bur. Stand. 29, 417. (D1542)

STEINHARDT J., HARRIS M.,(1940). "Combination of wool protein with acid and base: hydrochloric acid and potassium hydroxide". J. Res. Nat. Bur. Stand. 24, 335. (D1535)

STEINHARDT J., KRIJN J., LEIDY J.G. (1971). "Differences between bovine and human serum albumins: Binding isotherms, optical rotatory dispersion, viscosity, hydrogen ion titration, and fluorescence effects". Biochemistry 10, 4005. (D1429)

STEINHARDT J., SCOTT J.R., BIRDI K.S. (1977). "Differences in the solubilizing effectiveness of the sodium dodecyl sulfate complexes of various proteins". Biochemistry 16,, 718. (D1637)

STEINHARDT J., STOCKER N., CARROLL D., BIRDI K.S. (1974). "The nonspecific large binding of amphiphiles by proteins". Biochemistry, 13, 4461. (D1422)

STEINHARDT J., ZAISER E.M. (1955). "Hydrogen ion equilibria in native and denatured proteins". Adv. Protein Chem. 10, 151. (D1396)

STRYER L. (1965). "The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites". J. Mol. Biol. 13, 482. (D1649)

TAKAGI T., TSUJII K., SHIRAHAMA K. (1975). "Binding isotherms of sodium dodecyl sulfate to protein polypeptides with special reference to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis". J. Biochem. 77, 939. (D1783)

TANFORD C. Ver Pish W.W. (1970). (D1845)

TANFORD C. Ver Nozaki Y. (1974). (D849)

TANFORD C. Ver Reynolds J.A. (1970). (D1667)

TANFORD C. Ver Reynolds J.A. (1970). (D1719)

TANFORD C. Ver Reynolds J.A. (1976). (D1809)

TANFORD C. Ver Robinson N.C. (1975). (D1811)

TANFORD C. Ver Steele J.C.H. (1979). (D1860)

TANFORD C. (1961). "Ionization-linked changes in protein conformation. I. Theory". J. Am. Chem. Soc. 83, 1628. (D1334)

TANFORD C. (1962). "Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins". J. Am. Chem. Soc. 84, 4240. (D1886)

TANFORD C. (1964). "Isothermal unfolding of globular proteins in aqueous urea solutions". J. Am. Chem. Soc. 86, 2050. (D1932)

TANFORD C. (1968). "Protein denaturation". Adv. Protein Chem. 23, 121. (D1399)

TANFORD C. (1970). "Protein denaturation. Part C. Theoretical models for the mechanism of denaturation". Adv. Protein Chem. 24, 1. (D1401)

TANFORD C. (1972). "Micelle shape and size". J. Phys. Chem. 76, 3020. (D1167)

TANFORD C. (1972). "Hydrophobic free energy, micelle formation and the association of proteins with amphiphiles". J. Mol. Biol. 67, 59. (D1557)

TANFORD C. (1974). "Theory of micelle formation in aqueous solutions". J. Phys. Chem. 78, 2469. (D1170)

TANFORD C. (1978). "The hydrophobic effect and the organization of living matter". Science 200, 1012. (D1827)

TANFORD C. (1981). "Chemical potential of bound ligand, an important parameter for free energy transduction". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 270. (D1635)

TANDFORD C.,DE PARITOSH K., TAGGART V.G. (1960)."The role of the α-helix in the structure of proteins. Optical rotatory dispersionof β-lactoglobulin". J. Am. Chem.Soc. 82, 6029. (D1929)

TANFORD C., REYNOLDS J.A. (1976). "Characterization of membrane proteins in detergent solutions". Biochim. Biophys. Acta. 457, 133. (D1807)

TANFORD C., ROBERTS G.L. (1952). "Phenolic hydroxyl ionization in proteins. I. Bovine serum albumin". J. Am. Chem. Soc. 74, 2509. (D1888)

TERESI J.D., LUCK J.M. (1948). "The combination of organic anions with serum albumin. VI. Quantitative studies by equilibrium dialysis". J. Biol. Chem. 174, 653. (D1816)

TERESI J.D., LUCK J.M. (1952). "The combination of organic anions with serum albumin. VIII. Fatty acid salts". J. Biol. Chem. 194, 823. (D1815)

TIPPING E., MALCOLM N.J., SKINNER H.A.(1974). "Enthalpy of interaction between some globular proteins and sodium n-dodecyl sulphate in aqueous solution". J. Chem.Soc. Faraday Trans. I, 70, 1306. (D1970)

TRAUB W.,PIEZ K.A. (1971). "The chemistry and structure of collagen". Adv. Protein Chem. 25, 243. (D1402)

VAN OSS C.J., ABSOLOM D.R., NEUMANN A.W. (1980). "The Hydrophobic effect: Essentially a van der Waals interaction". Colloid Polymer Sci. 258, 424. (D1217)

VIJAYENDRAN B.R. (1979). "Polymer polarity and surfactant adsorption". J. Applied Polymer Sci. 23, 733. (D1222)

WAKO H.,SCHERAGA H.A. (1982). "Distance-constraint approach to protein folding. II. Prediction of three-dimensional structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor". J. Pro. Chem. 1, 85. (D1743)

WEBER K., OSBORN M. (1975). "Proteins and sodium dodecyl sulfate: Molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures" en "The Proteins", H. Neurath (Ed), 3ª ed. Vol. 1, cap. 3. Academic Press, New York. (D1808)

WEINER A.L., CARPENTER-GREEN S.S., SOEHNGEN E.C., LENK R.P., POPESCU M.C. (1985). "Liposome-collagen gel matrix: A novel sustained drug delivery system". J. Pharm. Sci. 74. (D1903)

WETLAUFER D.B., LOVRIEN R. (1964). "Induction of reversible structural changes in proteins by nonpolar substances". J. Biol. Chem. 239, 596. (D1387)

WISHNIA A. Ver Robillard K.A. (1972). (D1840)

WISHNIA A. Ver Robillard K.A. (1972). (D1841)

WISHNIA A. (1962). "The solubility of hydrocarbon gases in protein solutions". Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 48, 2200. (D1718)

WISHNIA A., PINDERT. (1964). "Hydrophobic interactions in proteins: Conformation changes in bovine serum albumin below pH 5". Biochemistry 3, 1377. (D1843)

WISHNIA A., PINDER T.W.(1966). "Hydrophobic interactions in proteins. The alkane binding site of β-lactoglobulins A and B". Biochemistry 5, 1534. (D1842)

WRIGHT A.K., THOMPSON M.R., MILLER R.L. (1975). "A study of protein-sodium dodecyl sulfate complexes by transient electric birefringence". Biochemistry 14, 3224. (D1666)

WU C.S.C., YANG J.T. (1981). "Sequence-dependent conformations of short polypeptides in a hydrophobic environment". Mol. Cell. Biochem. 40, 109. (D1965)

YANG J.T., FOSTER J.F.(1953). "Statistical and all-or-none binding of alkylbenzenesulfonate by albumins". J. Am. Chem. Soc. 75, 5560. (D1496)

YONATH J., BLAUER G. (1975). "Interaction of detergents with proteins: Effect of counter ions on the system ferrimyoglobin-laurylpyridinium halides in aqueous medium", en "Protein-Ligand Interactions". H. Sund, G. Blauer (Ed), pp 427-440, De Gruyter, Berlin 1975. (D1905)

ZETTA L., KAPTEIN R. (1984). "Interaction of β-endorphin with sodium dodecyl sulfate in aqueous solution. H-NMR investigation". Eur. J. Biochem. 145, 181. (D1817)

Libros

ADZET J.M. y col. (1985).
"Química Técnica de Tenería".
Escuela Nacional de Tenería. Igualada.

AUSTIN R. y col. (1987).
"Protein Structure. Molecular and Electronic Reactivity".
Springer. New York.

BROOKS III C.L., KARPLUS M., MONTGOMERY PETTITT B. (1988).
"Proteins: a Theoretical Perspective of Dynamics, Structure, and Thermodynamics".
John Wiley. New York.

BRITISH LEATHER MANUFACTURERS' RESEARCH ASSOCIATION (1948).
"Progress in Leather Science 1920-1945".
BLMRA. London.

GUSTAVSON K.H. (1956).
"The Chemistry of Tanning Processes".
Academic Press. New York.

JAYCOCK M.J., PARPITT G.D. (1981).
"Chemistry of Interfaces".
Johy Wiley. New York.

HERFELD H. (1981-1990).
"Bibliothek des Leders" Vol 1-10.
Umschauverlag. Frankfurt.

KESHAVARZ E. (1977).
"The Relationship Between Hydrophobicity and Surfactant Properties of Proteins".
Tesis Doctoral. The University of British Columbia. (D1708)

KIPLING J.J. (1965).
"Adsorption from Solutions of Non-Electrolytes".
Academic Press. New York. (D1131)

LAPANJE S. (1978).
"Physicochemical Aspects of Protein Denaturation".
Wiley. New York

McLAUGHLIN G.D., THEIS E.R. (1945).
"The Chemistry of Leather Manufacture".
Reinhold Publ. Corp. New York.

OSCIK J. (1982).
"Adsorption".
John Wiley. New York. (D1106)

OSIPOW L.I. (1977).
"Surface Chemistry. Theory and Industrial Applications".
Krieger. New York. (D1107)

OTTEWILL R.H., ROCHESTER C.H., SMITH A.L. (1983).
"Adsorption from Solution".
Academic Press. New York. (D1132)

REICH G. (1966).
"Kollagen".
Steinkopff. Dresden.

ROSEN M.J. (1984).
"Structure/Performance Relationships in Surfactants".
American Chemical Society. Washington.

SCHULZ G.E., SCHIRMER R.H. (1979).
"Principles of Protein Structure".
Springer. New York.

SHARPHOUSE J.H. (1971).
"Leather Technician's Handbook".
Leather Producers' Association. London.

SHINODA K. y col. (1963).
"Colloidal Surfactants. Some Physicochemical Properties".
Academic Pres. New York. (D1133)

SQUIRE J.M. y col. (1987).
"Fibrous Protein Structure".
Academic Press. New York.

THORSTENSEN T.C. (1976).
"Practical Leather Technology".
Krieger. New York.

WARD A.G., COURTS A. (1977).
"The Science and Technology of Gelatin".
Academic Press. New York.

WILSON J.A. (1941).
"Modern Practice in Leather Manufacture".
Reinhold Publ. Corp. New York.

CENTROS DE DOCUMENTACIÓN

Centros de Documentación y Bibliotecas en las que se han realizado búsquedas bibliográficas

España

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
Velázquez, 144. 28006 MADRID
Tel.: (91) 261 18 00. Fax: (91) 262 75 18

ICYT
Joaquín Costa, 22. 28002 MADRID
Tel.: (91) 563 54 87. Fax: (91) 564 26 44

INSTITUTO DE QUÍMICA FÍSICA "ROCASOLANO"
Serrano, 119. 28006 MADRID
Tel.: (91) 261 94 00. Fax: (91) 564 24 31

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
Jorge Girona, 18-26. 08034 BARCELONA
Tel.: (93) 204 06 00. Fax: (93) 204 59 04

INSTITUTO QUÍMICO DE SARRIÁ
Dr. Amigant, s/n. 08047 BARCELONA
Tel.: (93) 203 89 00

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
Facultad de Biología
Diagonal, 645. 08028 BARCELONA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
Facultad de Farmacia
Diagonal, s/n. 08028 BARCELONA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
Facultad de Física y Química
Diagonal, 647. 08028 BARCELONA

INSTITUTO DE LA GRASA Y SUS DERIVADOS
Avda. Padre García Tejero, 4. 41012 SEVILLA
Tel.: (95) 461 15 50. Fax: (95) 461 67 90

CAJA DE AHORROS DEL MEDITERRÁNEO
Centro de Documentación
Universidad de Alicante. Pabellón n° 8
San Vicente del Raspeig. ALICANTE
Tel.: 566 11 50 Ext. 1251

UNIVERSIDAD DE ALICANTE
Facultad de Medicina
Carretera Nacional 332, km 87. 03550 SAN JUAN
Tel.: 565 98 11 Ext. 326

UNIVERSIDAD DE ALICANTE
Facultad de Químicas San Vicente del Raspeig. ALICANTE
Tel.: 566 11 50 Ext. 1174

UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO
Facultad de Ciencias
48080 BILBAO

Otros países

McGILL UNIVERSITY
Physical Sciences and Engineering Library
809 Sherbrooke W.
Montreal, Quebec
CANADA

CANADA INSTITUTE FOR SCIENTIFIC
AND TECHNICAL INFORMATION
National Research Council Canada
Montreal Road (Building M-55)
Ottawa, Ontario
K1A OS2
CANADA

UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA
Biology Library and Biomedical Library
Johnson Pavilion
36th & Hamilton Walk/6060
PHILADELPHIA, PA 19104-6060
USA

UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA
Chemistry Library
536 Chemistry Building
34th & Spruce Sts/6323
PHILADELPHIA
USA

STATE LIBRARY OF NEW SOUTH WALES
Macquarie Street
Sydney 2000
AUSTRALIA

STADT-UND UNIVERSITÄTSBIBLIOTHEK
Senckenbergische Bibliothek
Bockenheimer Landstrasse 134-138
6000 FRANFURT 1
ALEMANIA

ZENTRALBIBLIOTHEK DER MEDIZIN
Joseph-Stelzmann-Str. 9
5000 KÖLN 41
ALEMANIA

BRITISH LIBRARY
Science Reference Library (Holborn)
25 Southampton Buildings
Chancery Land, London WC2A 1AW
U.K.

TECHNISCHE HOCHSCHULE
Makromolekulare Chemie
Abtlg. Eiweiss und Leder
Petersenstr, 22
D-6100 DARMSTADT
ALEMANIA

ABSTRACT

The interaction of surfactants with collagen is not only important at a basic level but is also of considerable interest fron the point of view of obtaining suitable parameters involved in the leather tanning process.

The in-depth study on the adsorptions of sodium dodecyl sulphate (SDS) and other surfactants on collagen, combined with the titration curve of the latter has revealed adsorption levels of surfactants higher than to be expected if only electrostatic forces are involved. Through other experiments, such as sequential adsorption of anionic and non-ionic surfactants, it has been possible to determine that the increased adsorption is due to little known hydrophobic interactions. From the above results and adsorption isotherms at pH 3.0 and 10.0, mechanisms are being proposed which could explain the interaction process between surfactants and collagen, by the main intervention of hydrophobic interactions. It must not be forgotten that the ionic bond has an important role in adsorption, thouah in this case, it acts only as an initiator of the interaction.

The research carried out has started to uncover the enormous potential for reactivity of regions of the collagenic protein hich were previously considered the least reactive.