

Afinidad entre queratosas de lana y distintos iones en fase acuosa analizada mediante sedimentación

Tomás Soria Biurrún^{a, b, c}, Laura Abarzuza^{c, d}, Borja Fernández-d'Arlas^{c, e, f}

^a CEIT-Basque Research and Technology Alliance (BRTA),

Manuel Lardizabal 15, 20018 Donostia / San Sebastián, Spain

^b Universidad de Navarra, Tecnun, Manuel Lardizabal 13, 20018 Donostia / San Sebastián, Spain

^c Instituto InaMat (Instituto de Materiales Avanzados), Universidad Pública de Navarra (UPNA). Edif. Jerónimo de Ayanz, Campus Arrosadía, Pamplona, España.

^d UNED-Pamplona, C/ Sadar, s/n. 31006 Pamplona (Navarra)

^e NanoBioTechnology Group, CIC NanoGUNE, Avenida de Tolosa 1, 20018 Donostia-San Sebastián, España.

^f Evolgen Genomics S.L, Avenida de Tolosa 1, 20018 Donostia-San Sebastián, España

Affinity between wool keratases and different aqueous phase ions analyzed by sedimentation

Afinitat entre queratoses de llana i diferents ions de fase aquosos analitzats per sedimentació

RECEIVED: 20 SEPTEMBER 2021; ACCEPTED: 8 FEBRUARY 2023; DOI: <https://doi.org/10.55815/413303>

ABSTRACT

This article shows the results of solubility tests of keratin not only in basic media, close to the isoelectric point, but also in acidic media in the presence of different salts such as sodium and potassium halides, as well as several alkaline chlorides. The salt's effect on the solubility of keratin or keratases is described in terms of the law of matching water affinity, based on the distinct tendency of ions towards hydration. The application of this principle is focused on explaining the interaction's competitiveness between inorganic salts' ions and ionized groups of keratin amino acids.

Keywords: Hofmeister series, Keratin, Anions, Cations

RESUMEN

En este artículo se presentan los resultados de unos sencillos ensayos de solubilidad de la queratina en medios tanto básico, cercano al punto isoelectrico como ácido en presencia de distintas sales tales como haluros sódicos y potásicos, así como varios cloruros alcalinos. El efecto de la sal sobre la solubilidad de la queratina o queratosas se describe en términos de la Regla de

Competitividad de Fajans o Regla de Afinidades al Agua Equivalente, en base a la distinta tendencia de los iones hacia la hidratación. La aplicación de este principio se orienta a explicar la competitividad de interacción entre iones de sales inorgánicas y grupos ionizados de los aminoácidos de la queratina.

Palabras claves: Series de Hofmeister, Queratina,

RESUM

Aquest article presenta els resultats d'unes senzilles proves de solubilitat de queratina en ambdós medis bàsics, propers al punt isoelectric i àcid en presència de diferents sals com els halurs de sodi i potassi, així com diversos clorurs alcalins. L'efecte de la sal sobre la solubilitat de la queratina o queratosa es descriu en termes de la regla de competitivitat de Fajans o regla d'afinitat equivalent a l'aigua, basada en la diferent tendència dels ions cap a la hidratació. L'aplicació d'aquest principi té com a objectiu explicar la competitivitat de la interacció entre ions de sals inorgàniques i grups ionitzats d'aminoàcids queratina.

Paraules clau: Sèrie Hofmeister, Queratin, Anions, Cations



*Corresponding author: b.fernandez-darlas@evolgene.com

INTRODUCCIÓN

La solubilidad de las proteínas puede ser regulada por sales en numerosos procesos bioquímicos, de análisis a nivel de laboratorio y a escala industrial¹⁻⁹. Esta fenomenología tiene gran interés a nivel operacional y práctico a la hora de diseñar procesos que manipulen proteínas. No obstante, sigue sin comprenderse bien el mecanismo de acción solubilizante o precipitante de los distintos iones y sales sobre las proteínas, y sobre las macromoléculas en general^{10,11}.

Aunque algunos de los efectos de las sales sobre las macromoléculas se conocían con anterioridad, entre 1887 y 1888 Lewit¹² y Hofmeister^{13,14} fijaron que la cantidad de sal necesaria para hacer precipitar la proteína dependía de la naturaleza de los electrolitos utilizados. Ordenó los iones según su efecto estabilizante o desestabilizante. Este ordenamiento se conoce como series de Hofmeister o series *liotrópicas*. Lejos de ser una propiedad específica a las proteínas, las series de Hofmeister han resultado ser aplicables a numerosas fenomenologías concernientes a distintas macromoléculas. Algunas hipótesis tratan de explicar la fenomenología en función de la capacidad de los iones de interactuar con el agua. Los iones se han clasificado en dos tipos según afinidad con el agua. Aquellos en los que la interacción ion-agua es más fuerte que la interacción agua-agua se denominan iones *cosmotrópicos*. En cambio, aquellos que interactúan con el agua más débilmente que el agua consigo misma se denominan *caotrópicos*. No obstante, en algunos sistemas ión-macromolécula, aparecen comportamientos intermedios y opuestos al descrito por Hofmeister¹⁵ y distintos a los predichos por la mera afinidad acuosa de los iones. En muchos casos hay que considerar también las interacciones directas entre los iones y las macromoléculas. Por ejemplo, la influencia de agentes externos como el pH en relación al punto isoelectrico de la proteína, parecen resultar relevantes en su comportamiento fisicoquímico¹⁰.

Las interacciones entre iones provenientes de sales inorgánicas y los grupos funcionales ionizados de las proteínas han sido estudiados por diversos autores. Zhang y col.¹⁶ han observado series directas e inversas trabajando con lisozima cargada positivamente ($\text{pH} < \text{pI}$) dependiendo de la concentración de la sal; López-León et al. la estabilización coloidal de superficies cargadas, tanto positiva como negativamente, de sistemas látex y látex-proteína IgG (Inmunoglobulina-G), con grupos amidina ($=\text{NHR}$) NR_2^+ o con grupos sulfato (RSO_4^-) y carboxilo (RCO_2^-)^{15,17}; poliuretanos modelo de alta densidad catiónicos, con grupos amonio cuaternarios $\text{R}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{H}^+$, dieron resultados análogos^{9,18}; por su parte, Jungwirth et al. estudiaron las interacciones entre funcionalidades amonio (R_3NH^+) de aminoácidos y aniones como el cloruro (Cl^-) o yoduro (I^-)¹⁹; Cremer et al. ensayaron experimentalmente la interacción entre carboxilatos ($-\text{COO}^-$) y cationes mono y divalentes²⁰. En el marco teórico, Schwierz et al.^{21,22} y Salis y Ninham²³ han propuesto algunas modificaciones del comportamiento en las series de Hofmeister para interacciones ion-macromolécula por métodos computacionales; Así, las series de Hofmeister sufren modificaciones

en determinadas condiciones ambientales que ha sido ajustadas a un espectro diverso de series directas, parcialmente modificadas e inversas.

López-León¹⁵ subraya dos aspectos relacionados con estos procesos: el carácter hidrófilo/hidrófobo y el signo de las partículas y superficies. Así, cationes y aniones inducirían efectos inversos en la estabilidad coloidal, pudiendo producirse acumulaciones y expulsiones de los iones en regiones concretas (series directas o inversas con iones kosmotrópicos y caotrópicos) en los que las propiedades fisicoquímicas como polaridad y polarizabilidad resultarían determinantes, y además de la carga iónica y el carácter superficial macromolecular en estructura del agua, existirían otros factores relacionados con las fuerzas de dispersión que influirían directamente en estos procesos.

Estos resultados unidos a los distintos espectros obtenidos por dinámica molecular^{21,22} proponen que los cambios se originan a partir de la variación de las interacciones ión-superficie al cambiar las propiedades de la superficie; una doble naturaleza de estos fenómenos relacionados, por un lado, con la reestructuración del agua y la teoría clásica de estabilidad coloidal DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) y por otro lado, con la acumulación/expulsión de iones y la teoría de Ninham y Yaminsky originada por las fuerzas de dispersión^{15,21-23}. Los modelos que mejor explican estos fenómenos van desde los basados en la termodinámica del sistema superficie-disolución y los movimientos de origen entrópico, a los relacionados con cambios en el potencial superficial de la interfase e interacciones de corto y largo alcance.

Una reciente revisión de Okur y col. recoge una pléyade de estudios y fenomenologías relacionadas con la interacción entre iones y proteínas²⁴. Una de las principales conclusiones que se pueden extraer de los trabajos realizados hasta la fecha es que, para los ionómeros o macromoléculas cargadas, los iones con similar grado de hidratación tienden a interactuar entre ellos. A esta hipótesis se la denomina Principio de Afinidades al Agua Equivalentes. Este principio de actuación sería similar al dispuesto por Fajans (1921) para las sales de iones monovalentes tales como los haluros alcalinos^{25,26}. El *Principio de Competitividad de Fajans* explica cómo los iones de la mezcla de dos sales “competirían” por formar pares iónicos más estables, de acuerdo con el principio de similitud en cuanto a su tendencia a la hidratación. De igual manera que en el caso de sales inorgánicas este principio podría aplicarse a distintas sales orgánicas o incluso a grupos ionizables de macromoléculas y distintos contraiones^{27,28}. Todos estos antecedentes resultan de interés para ayudarnos a interpretar los nuestros resultados experimentales obtenidos respecto a la solubilidad de queratas extraídas de lana de oveja Latxa, tal y como se describe a continuación, en presencia de distintas sales inorgánicas.

Las proteínas de la lana Latxa, principalmente queratinas (KRT, del inglés *Keratin*) y proteínas asociadas a queratina (KAP, del inglés *Keratin Associated Protein*), son de naturaleza muy hidrófoba e interactúan débilmente con el agua, siendo más favorables a interacciones proteína-proteína²⁹⁻³¹. Pueden provocar su agregación,

autoensamblaje, coalescencia y coagulación, debido al aumento de entropía neta (soluto-disolvente) haciendo que las regiones hidrofóbicas se asocien formando agregados de forma espontánea por estabilización estérica^{10,29,32-34}. Este comportamiento viene favorecido por iones *cosmotrópicos* o *estructurantes* que ayudan a formar redes de enlaces de hidrógeno en el seno del disolvente, agua, y expulsar la proteína. No obstante, la acción de iones *caotrópicos* puede dar como resultado la estabilización de la proteína por interacción con aminoácidos cargados y de naturaleza polar, ayudando a abrir las estructuras moleculares de las fibras y dar como resultado dispersiones coloidales²⁹.

Los aminoácidos que componen la lana contienen aminoácidos cargados - positivamente, lisina (Lys), arginina (Arg), y negativamente, ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu); contienen grupos hidroxílicos -serina y treonina (Ser y Thr)- y aminoácidos polares como la asparagina o glutamina (Asn y Gln) que hacen que se formen puentes de hidrógeno y salinos que contribuyen a que se establezcan interacciones inter e intramoleculares^{29, 30, 35, 36}. Estas interacciones, junto a las atracciones y repulsiones estéricas derivadas de las cadenas laterales de los aminoácidos, llevan a la macromolécula a adquirir su conformación más estable, de menor energía. Ya sean interacciones covalentes o no covalentes, intervienen en el proceso de plegamiento y desnaturalización de proteínas, y como consecuencia, en propiedades como la solubilidad.

La extracción de las proteínas de la lana es compleja debido a la estructura que presenta con multitud de enlaces disulfuro e isopeptídicos. Para ello, la lana se puede someter a distintos agentes externos de naturaleza química, física o biológica^{30, 36, 37}. En nuestros ensayos, se han estudiado proteínas de la lana extraídas por un método químico de oxidación con peróxido de hidrógeno (H₂O₂)³⁸. El tratamiento con H₂O₂ consigue romper las fibras proteínicas y los enlaces disulfuro para llevarlas a disolución. Así, las queratinas resultantes estarían parcialmente oxidadas y por ello se denominan queratosas. En particular, los productos de reacción resultantes de este método formarían especies derivadas del azufre oxidado, entre ellas los ácido sulfónico (R-SO₃H), sulfínico (R-SO₂H), y sulfénicos (R-SOH), que llevarían un punto isoeléctrico (pI) más alto que el observado en la queratina por influencia de los residuos cargados negativamente, que facilitan interacciones de tipo electrostático y de fuerzas de dispersión^{30, 35, 36, 38, 39}. La presencia de estas especies oxidadas se reconoce en importantes bandas de tensión S-O y S=O en el rango 1055-1044 cm⁻¹ observadas en los espectros de infrarrojo, FTIR³⁸. Los grupos sulfonato y sulfato han sido descritos previamente por Kunz y col. como grupos 'blandos' o capaces de interactuar más fuertemente con cationes voluminosos, poco hidratados y de baja densidad de carga como el potasio (K⁺), al contrario que los carboxilatos que interactúan más fuertemente con cationes como el litio (Li⁺)⁴⁰. En la Figura 1 se representa la estructura de los grupos cargados de las queratosas y su ordenación en cuanto a su densidad de carga. Se representa también cómo los contra-iones con similar

densidad de carga tienden a interactuar más fuertemente según la ley de Afinidades al Agua Equivalentes.

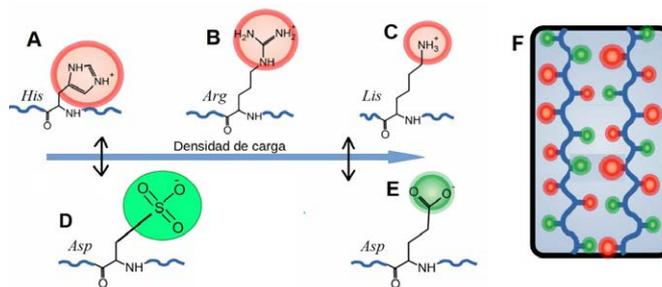


Figura 1. Ordenamiento de los grupos ionizables de las queratosas en función de su densidad de carga: De carga positiva: A) histidina, B) Arginina, C) Lisina. De carga negativa: D) sulfonato (derivado oxidado de la cisteína y cistinas nativas) y E) carboxilato. Las flechas verticales indican una mayor interacción entre grupos con similar densidad de carga (pero opuesta). F) Esquema de interacción intermolecular donde los grupos de similar densidad de carga interactúan entre sí.

Estudios mediante hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas que componen la lana muestran que la composición presenta mayor porcentaje en aminoácidos Cys, Glu/Gln, Ser, Gly, Leu, Pro, Arg, Asp/Asn y Thr^{29, 30}. Según la clasificación de hidrofobicidad de los aminoácidos de Chothia y Finkelstein⁴¹ las proteínas de la lana mostrarían así regiones con porcentajes mayores de composición de aminoácidos polares y neutras, según su hidrofobicidad:

- Polares: Arg, Lys, Glu, Asp, Gln, Asn
- Neutros: Gly, Ala, Ser, Thr, Pro, His, Tyr
- Hidrofóbicos: Cys, Leu, Val, Ile, Met, Phe, Tyr.

Ya que el tratamiento oxidativo rompería los enlaces disulfuro (entre Cys), las queratosas resultantes también contendrían regiones cargadas negativamente³⁸ (aminoácidos polares del tipo sulfonato R-SO₃⁻). Este hecho hace que los péptidos sean más susceptibles tanto al pH como a la interacción con iones.

El pH y la concentración salina de iones monovalentes se estudian en este trabajo y están relacionados con factores que implican cambios en la naturaleza superficial de las macromoléculas y su comportamiento fisicoquímico. Se presentan los resultados cualitativos de un experimento de solubilidad de queratosas en presencia de distintas sales y a pH por encima, cercano y por debajo de su punto isoeléctrico. Este experimento pretende dilucidar el impacto de las sales sobre la queratina, observando su cinética y grado de hidrofobicidad mediante cambios de fase a nivel macroscópico. Además, el conocimiento de la composición de la queratina (Tabla 1), de la estructura, del carácter ácido-base de sus aminoácidos constituyentes, se pueden deducir interacciones particulares entre los distintos iones y segmentos particulares de la queratina. Las observaciones son explicadas en base a las series de Hofmeister, los ajustes a modelos de Debye-Hückel (DH) y al Principio de Competitividad entre iones y especies ionizadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los siguientes reactivos fueron utilizados en esta investigación: LiBr (Acros Organics), LiCl (Panreac), NaF (Panreac), NaCl (Panreac), NaBr (Acros Organics), NaI (Acros Organics), NaSCN (Acros Organics), NaOH (Panreac), KF (Panreac), KCl (Panreac), KBr (Acros Organics), KI (Panreac), KSCN (Panreac), NH₄Cl (Scharlau), HCl (Panreac), CH₃COOH (Panreac), CH₃COONa (Panreac). Las sales fueron utilizadas tal como fueron recibidas, excepto KF, KI, KSCN y NH₄Cl, las cuales fueron secadas a vacío a 100 °C, antes de ser usadas para la preparación de las disoluciones.

Obtención de queratosas a partir de la lana

La lana utilizada ha sido la de una oveja caranegra. La lana se ha lavado con agua y jabón y posteriormente se ha enjuagado y aclarado con agua y etanol, después se ha secado a vacío. A partir de ella se ha extraído una serie de proteínas, comúnmente denominadas queratinas, con cierto grado de oxidación, por lo que de aquí en adelante se denominarán queratosas. Para la extracción de la queratosa se ha utilizado un protocolo de extracción descrito en trabajos anteriores de los autores¹⁹. Brevemente, se ha pesado 102,8 g de lana y se ha dispersado en una disolución 1 M de agua oxigenada (H₂O₂) a pH=10,8. La temperatura de la suspensión se ha elevado hasta 50 °C y se ha agitado durante 2 horas mediante agitación forzada. Transcurrido el tiempo se ha filtrado a través de una media de masa conocida, donde se ha recogido la lana, que tras secada ha sido pesada para determinar el rendimiento de extracción, el cual ha sido de un 92%. El filtrado ha sido acidificado con HCl concentrado hasta observar la precipitación de la queratosa a un pH entre 4 y 5 (Tabla 1). Tras su decantación ésta ha sido secada 50 °C, obteniéndose 43 g de queratina.

Disoluciones de haluros sódicos y potásicos, y de cloruros alcalinos

El objeto de este trabajo ha sido determinar el efecto de cada ión individual sobre la solubilidad de las queratosas. Para estudiar el impacto de los aniones se han preparado disoluciones de haluros potásicos (KF, KCl, KBr, KI), inclusive el tiocianato potásico (KSCN). Para estudiar el impacto de los cationes se han preparado disoluciones de cloruros alcalinos (LiCl, NaCl, KCl) inclusive el cloruro amónico (NH₄Cl). Estas disoluciones han sido preparadas con una concentración de 1 M a pH 1, 5 y 10.

Disoluciones de queratosas en presencia de sales

Las disoluciones de queratina con concentración de 3 mg/mL han sido preparadas mezclando aproximadamente 9 mg de queratina con 3 mL de las disoluciones salinas de concentración 1 M, a pH básico (pH=10), cercano al isoelectrico (pH=5) y ácido (pH=1).

Las disoluciones se prepararon con una concentración de las sales de 1M. Para las disoluciones de pH básico (pH = 10) el pH se ajusto empleando NaOH. Las disoluciones cercanas al punto isoelectrico (pH = 5) se prepararon empleando un tampón de CH₃COOH/CH₃COONa de concentración 0,02 M tanto del ácido como de la sal y se añadió 0,01 moles de NaOH. Las disoluciones con pH ácido (pH ~1) se prepararon ajustando el pH con HCl 3M

Además, se prepararon tres blancos que no contenían queratina, un blanco a pH=10, otro blanco a pH=5 y el otro blanco a pH=1. También se prepararon tres blancos que contenían queratina, un blanco a pH=10, otro blanco a pH cercano al isoelectrico y el otro blanco a pH=1.

- Efecto de los cationes en la solubilidad de las queratosas a pH > pI.
- Efecto de los aniones en la solubilidad de las queratosas a pH > pI.”

Tabla 1. Aminoácidos ionizables en la queratina y estimación de su punto isoelectrico, pI.

	Aminoácidos ácidos		Aminoácidos básicos				
	Ac. Asp	Ac. Glu	Hist	Lis	Arg		
Proporción (g_{aminoácido}/g_{queratina}; %)	10.2	19.1	1.4	4.7	11.3		
Masa molar (g/mol)	133	147	155	146	174		
pK_a (grupo lateral)	3.6	4.2	6.0	10.5	12.5		
Nº moles	0.077	0.13	0.009	0.032	0.065		
pH	Carga, q					Σq·Nº moles	
3.65	0	0	+	+	+	10.6	pI ≈ 4.05
	-	0	+	+	+	2.9	
4.25	-	-	+	+	+	-10.1	
6	-	-	0	+	+	-11	
10.5	-	-	0	0	+	-14.2	
12.5	-	-	0	0	0	-20.7	

- c) Efecto de los cationes en la solubilidad de las queratosas a $\text{pH} \sim \text{pI}$.
- d) Efecto de los aniones en la solubilidad de las queratosas a $\text{pH} \sim \text{pI}$.
- e) Efecto de los cationes en la solubilidad de las queratosas a $\text{pH} < \text{pI}$.
- f) Efecto de los aniones en la solubilidad de las queratosas a $\text{pH} < \text{pI}$.

Las disoluciones salinas fueron sonicadas durante dos horas en el baño de ultrasonidos *SELECTA ULTRASONOS*. Después de la sonicación se ha estudiado cómo afecta el impacto de los diferentes aniones y de los cationes en la solubilidad y si seguían una serie de Hofmeister directa o inversa.

Medidas de precipitación de la queratina mediante un polaroscopio casero

Las disoluciones de queratina en presencia de distintas sales inorgánicas (sales de cloruro y sales potásicas) fueron llevadas a un baño de ultrasonidos *SELECTA ULTRASONOS*. El tiempo de sonicación de las disoluciones en el baño de ultrasonidos fue de 30 minutos y durante la sonicación se mantuvo a temperatura ambiente. Después de la sonicación, las disoluciones fueron llevadas a una caja que tenía dos polarizadores cruzados y una luz para iluminar el interior (Figura 2a), y se hicieron fotos a tiempo 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 1440, 2880, 4320 minutos. Las fotos tomadas a los tiempos indicados anteriormente fueron analizadas mediante el programa *Image J*, midiendo el valor del pixel. Estos experimentos fueron llevados a cabo para estudiar la influencia del catión (en el caso de las sales de cloruro) y la influencia del anión (en el caso de las sales potásicas) en el proceso de sedimentación de la queratina.

Estudio del impacto de la concentración de sal sobre la solubilidad de la queratosa

Para determinar la concentración de queratosa en el sobrenadante en presencia de distintas sales a distintas concentraciones de éstas, se ha tomado 1 mL de disolución homogenizada y se ha centrifugado durante 10 s. El precipitado se ha lavado con etanol/agua (60/40), centrifugado otra vez y secado a 80°C a vacío. El procedimiento se ha repetido hasta obtener un peso constante del precipitado. Por diferencia, respecto a la concentración inicial, puede estimarse la cantidad de queratosa disuelta.

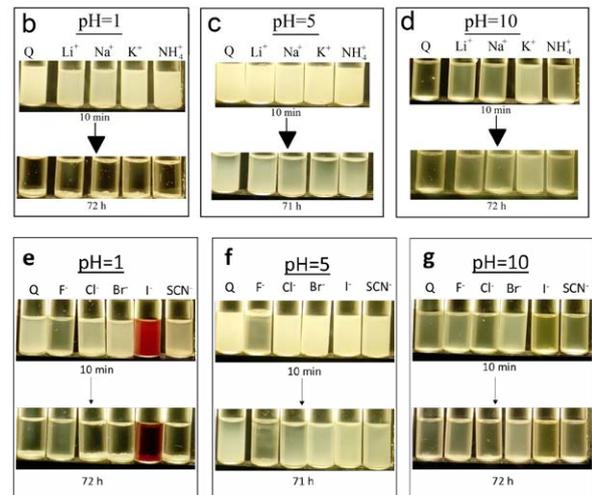
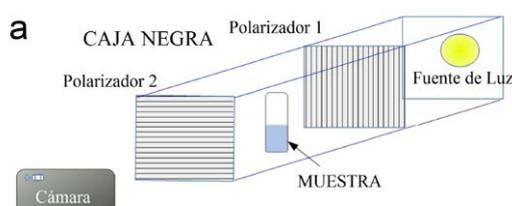


Figura 2. a) Montaje experimental para la determinación de queratina coloidal presente en dispersión acuosa. Evolución de la estabilidad de las dispersiones de queratina, 3 mg/mL, en presencia de distintos cloruros, 1M, a distintos pH: b) pH 1, c) pH 5 y d) pH 10. Y en presencia de distintas sales sodicas, 1M, a distintos pH: e) pH 1, f) pH 5 y g) pH 10.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del pH sobre la solubilidad de la queratina

Tal y como se ha indicado en la Tabla 1, a $\text{pH} < \text{pI}$ la queratina se carga positivamente, mientras que a $\text{pH} > \text{pI}$ esta predominantemente cargada negativamente.

En la Figura 2 se muestra la evolución de la concentración de queratina en función del pH y del tiempo. En la Figura 3a se representan los datos con una escala logarítmica en el tiempo. Es decir, pretende simular la precipitación mediante una relación en la que C a $\log t$. Es decir un proceso lineal según de la siguiente relación:

$$C = C_0 - \beta \cdot \log t \quad \text{Ec.(1)}$$

Tal y como se indica en la Figura 3a, el ajuste a (1) de los datos a tiempo iniciales proporciona unos valores de 1,5; 0,5 y 0,1 para los sistemas a $\text{pH} = 1, 5$ y 10 , respectivamente. Sin embargo, es notorio que los datos experimentales no cumplen la linealidad. Tampoco lo cumplen en una relación doble logarítmica del tipo $\log C$ a $\log t$, como puede apreciarse en la Figura 3b. Tampoco se da una linealidad del tipo $\log C$ a t . Sin embargo en este último caso si se ha observado una linealidad a tiempos cortos. Por ello se propone que la precipitación viene dada por una fracción inestable representada por su concentración, $C_{\text{ines.}}$, cuya precipitación sigue una linealidad del tipo $\log C_{\text{ines.}}$ a t . Sin embargo la concentración total estaría dada por la suma de la queratina estable, representada por la queratina en el equilibrio, $C_{\text{eq.}}$, y la inestable:

$$C(t) = C_{\text{eq.}} + C_{\text{ines.}}(t) \quad \text{Ec.(2)}$$

siendo $C_{\text{ines.}}(t) = C_{\text{ines.}}^0 \cdot 10^{-bt}$ el proceso se podría modelar con una relación tal que:

$$C(t) = C_{eq} + C_{ines}^0 \cdot 10^{-\beta t} \quad \text{Ec. (3)}$$

Mediante una representación de $\log[C(t) - C_{eq}]$ frente a t , es posible determinar los valores C_{ines}^0 y b' a partir de la ordenada en el origen y la pendiente, respectivamente:

$$\log[C(t) - C_{eq}] = \log C_{ines}^0 - \beta' \cdot t \quad \text{Ec. (4)}$$

En la Tabla 2 se listan los valores de C_{ines}^0 y b' así obtenidos para los sistemas a distintos pH. El valor de C_{eq} es tomado como el último valor de concentración en función del tiempo, $C_{eq} \sim C(t)$ cuando $t \rightarrow \infty$ y ya ha precipitado toda la fracción inestable, esto es $C_{ines}(t \rightarrow \infty) \sim 0$. Puede observarse que la suma de $C_{ines}^0 + C_{eq}$ coincide bastante bien con el valor de concentración inicial de queratina de ~ 3 mg/mL lo cual da cuenta de la bondad del modelo.

Tabla 2. Parámetros de ajuste de la precipitación de la queratina a distintos pH según la ecuación (4).

pH	C_{eq} (g/L)	$\log C_{ines}^0$	C_{ines}^0 (g/L)	b'	$C_{ines}^0 + C_{eq}$
1	0,25	0,44	2,75	0,00420	3,00
5	1,36	0,20	1,61	0,00031	2,97
10	2,55	-0,21	0,61	0,00024	3,16

A pH = 1, parece que a partir aproximadamente de 1000 min se llega a un régimen de equilibrio donde precipita toda la queratina. En cambio, a pH cerca del punto isoelectrico y por encima del pI, se observa que la queratina necesita mayor tiempo para que precipite toda.

Por lo tanto, queda expuesto que la influencia del pH afecta a la cinética de precipitación de la queratina, siendo más rápida su precipitación a tiempos más cortos en un $\text{pH} < \text{pI}$.

Aparte, hay que considerar que la queratina está cargada positivamente a $\text{pH} < \text{pI}$, y esto afecta a grupos positivos de la queratina interactúen de una forma específica con el agua, de tal manera que favorecen la precipitación.

Efecto de los cationes sobre la solubilidad de la queratina

Tal y como se puede ver en las imágenes de las Figura 1a-c, la naturaleza catiónica repercute en la estabilidad coloidal de la queratina en medio acuoso. Los datos cuantitativos de concentración frente a tiempo, en función de la naturaleza del catión a distintos pH se muestra en la Figura 4 para distintos cloruros.

A pH=1 C_{ines} (Tabla 3) crece en el orden $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{K}^+$, en cambio para pH=5 y pH=10 esta tendencia se ve modificada en el orden $\text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ y $\text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{NH}_4^+$ respectivamente. Lo cual puede estar relacionado con una mayor interacción del K^+ con la proteína, que hace neutralizar sus cargas parcialmente y favorecer su comportamiento hidrofóbico.

Efecto de los aniones sobre la solubilidad de la queratina

De manera similar al estudio de los cationes mostrado arriba, se ha encontrado que la naturaleza aniónica repercute en la estabilidad coloidal de la queratina en medio acuoso. Los datos cuantitativos de concentración frente a tiempo, en función de la naturaleza del anión a distintos pH se muestra en la Figura 5 para distintas sales potásicas.

A pH=1 C_{ines} (Tabla 4) crece en el orden $\text{Br}^- > \text{I}^- > \text{Cl}^- > \text{SCN}^- > \text{F}^-$. En cambio, para pH=5 y pH=10 esta tendencia se ve modificada en el orden $\text{Cl}^- > \text{F}^- > \text{Br}^- > \text{SCN}^- > \text{I}^-$ y $\text{Cl}^- > \text{F}^- > \text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^-$ respectivamente. Esto puede estar relacionado con una mayor interacción del Cl^- a $\text{pH} = \text{pI}$ y $\text{pH} > \text{pI}$ con la proteína, que hace neutralizar sus cargas parcialmente y favorecer su comportamiento hidrofóbico.

Influencia de los iones a pH < pI

En el caso de los cationes el orden de precipitación sigue una tendencia similar en todos (Figura 4), además cuando se deja mayor tiempo para precipitar, toda la

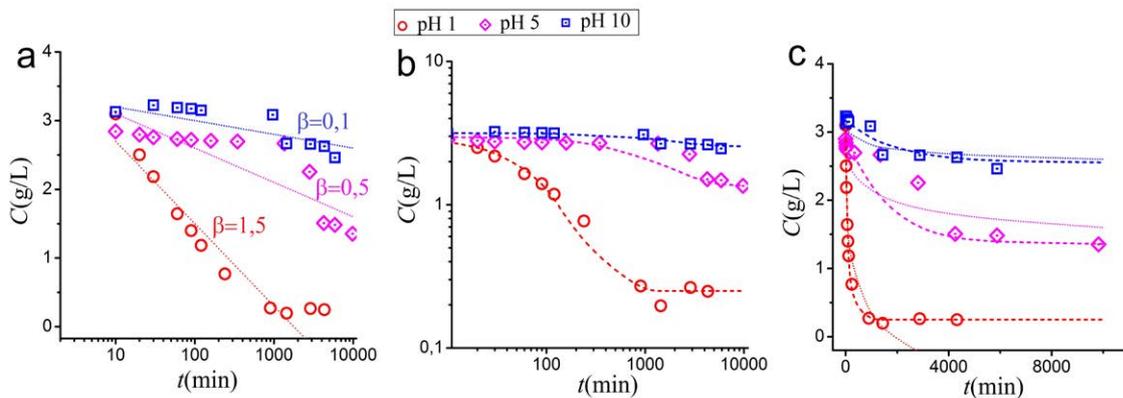


Figura 3. Solubilidad de queratina, 3 mg/mL, en función del tiempo a pH 1, 5 y 10. En (a) y (c) las líneas de puntos corresponden a los respectivos ajustes lineales en C vs. $\log t$ (ec. 1). En (b) y (c) las curvas con rayas cortas corresponden al ajuste de los datos a la ec. 4.

Tabla 3. Parámetros de ajuste de la precipitación de la queratina a distintos pH (a) según la ecuación (1) y (b) según la ecuación (4), para los distintos cationes.

a)	Cación	pH = 1		pH = 5		pH = 10	
		C_0 (g/L)	b	C_0 (g/L)	b	C_0 (g/L)	b
	Li	4,47	1,23	3,37	0,24	3,45	0,27
	Na	4,28	1,21	3,65	0,38	2,92	0,023
	K	3,63	1,01	3,70	0,42	3,35	0,10
	NH ₄	3,84	1,09	3,27	0,28	3,06	0,16

b)	Cación	pH = 1			pH = 5			pH = 10		
		C_{eq} (g/L)	C_{ines}^0 (g/L)	b'	C_{eq} (g/L)	C_{ines}^0 (g/L)	b'	C_{eq} (g/L)	C_{ines}^0 (g/L)	b'
	Li	0,38	2,93	0,0026	2,06	0,92	0,0002	2,52	0,62	0,0013
	Na	0,27	2,90	0,0029	1,58	1,49	0,0003	2,85	0,052	0,0013
	K	0,29	2,50	0,0033	1,36	1,66	0,0002	2,93	0,32	0,0019
	NH ₄	0,27	2,77	0,0036	1,64	1,19	0,0001	2,48	0,39	0,0012

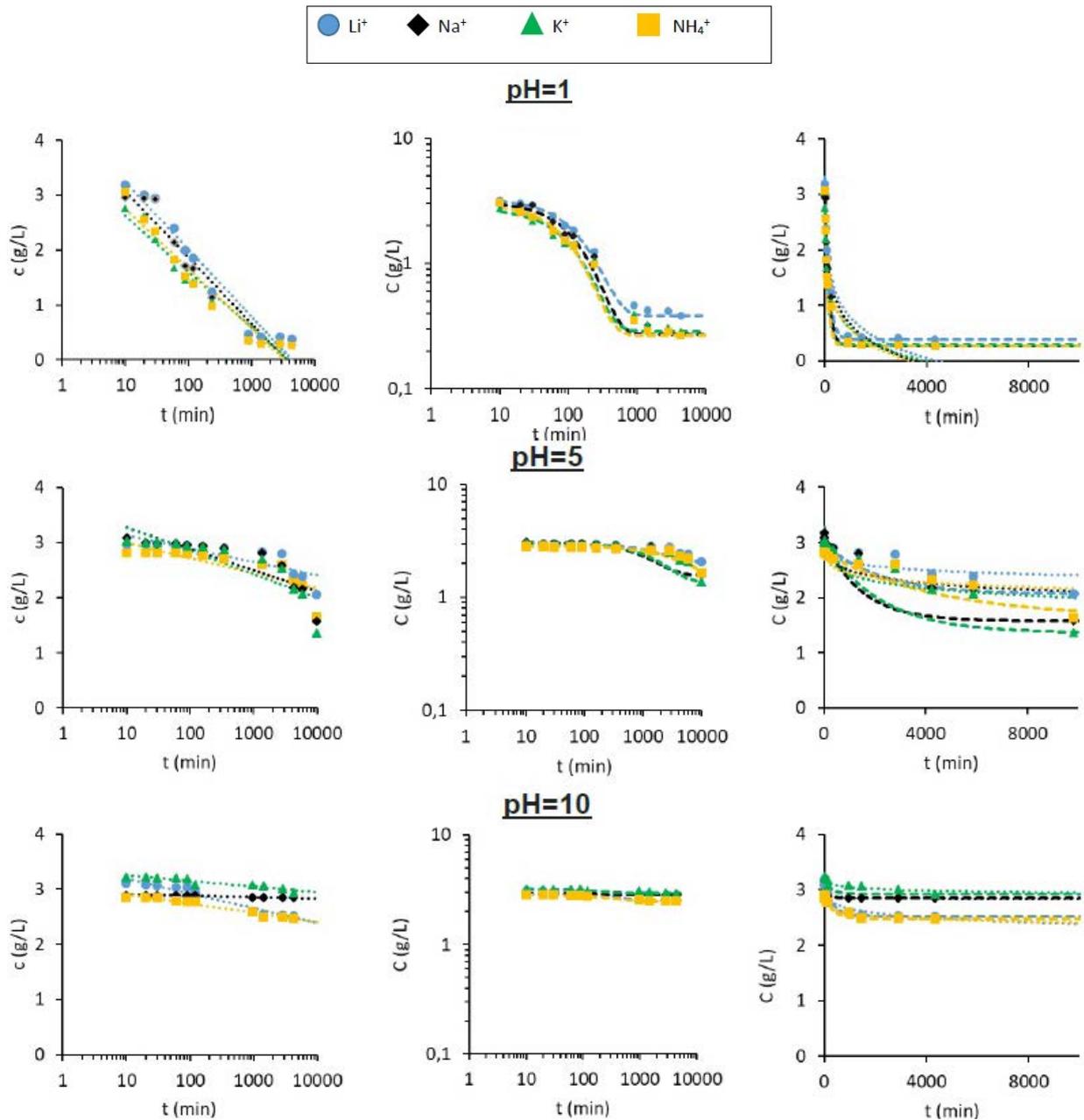


Figura 4. Evolución de la concentración de queratina coloidal, 3 mg/mL, en presencia de distintos cloruros en función del tiempo a pH=1, pH=5 y pH=10. En las columnas de la izquierda y derecha las líneas de puntos corresponden a los respectivos ajustes lineales en C vs. $\log t$ (ec. 1). En las columnas del centro y de la derecha las curvas con rayas cortas corresponden al ajuste de los datos a la ec. 4.

Tabla 4. Parámetros de ajuste de la precipitación de la queratina a distintos pH (a) según la ecuación (1) y (b) según la ecuación (4), para los distintos aniones.

a)	Anión	pH = 1		pH = 5		pH = 10	
		C_0 (g/L)	b	C_0 (g/L)	b	C_0 (g/L)	b
	F	3,62	0,47	2,16	0,27	3,40	0,15
	Cl	2,84	0,72	3,83	0,53	3,33	0,11
	Br	3,69	0,96	2,69	0,23	3,31	0,086
	I	3,03	0,78	2,40	0,16	3,24	0,10
	SCN	2,86	0,71	2,51	0,17	3,07	0,14

b)	Anión	pH = 1			pH = 5			pH = 10		
		C_{eq} (g/L)	C_{ines}^0 (g/L)	b'	C_{eq} (g/L)	C_{ines}^0 (g/L)	b'	C_{eq} (g/L)	C_{ines}^0 (g/L)	b'
	F	1,99	1,15	0,0022	1,11	1,17	0,0051	2,85	0,37	0,0015
	Cl	0,35	2,17	0,0044	0,87	2,13	0,0003	2,97	0,44	0,0113
	Br	0,42	2,80	0,0047	1,42	1,01	0,0009	3,00	0,21	0,0014
	I	0,40	2,46	0,0061	1,56	0,76	0,0016	2,84	0,26	0,0009
	SCN	0,36	2,09	0,0037	1,61	0,79	0,0012	2,54	0,33	0,0007

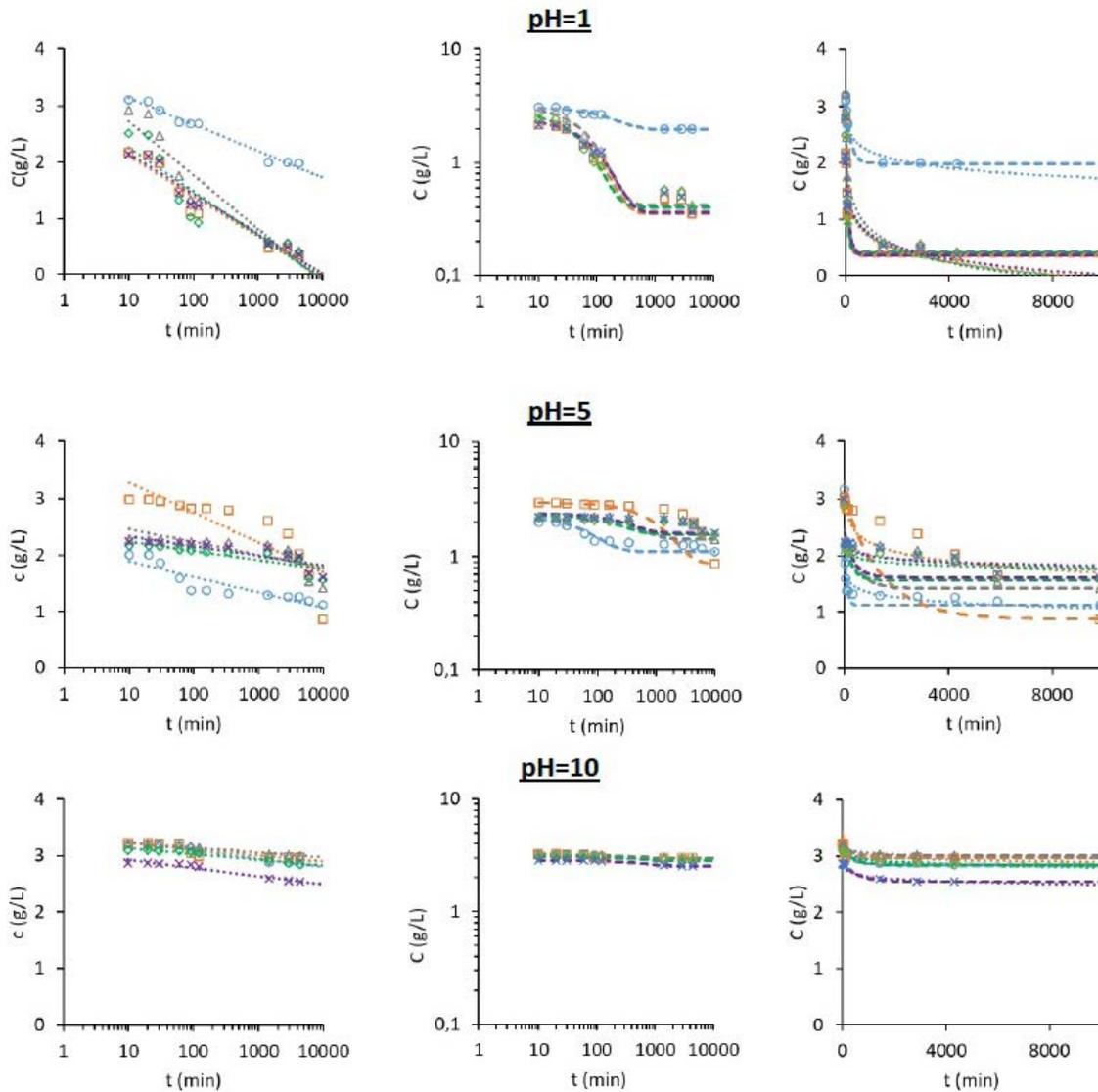


Figura 5. Evolución de la concentración de queratina coloidal, 3 mg/mL, en presencia de distintas sales potásicas en función del tiempo pH=1, pH=5 y pH=10. En las columnas de la izquierda y derecha las líneas de puntos corresponden a los respectivos ajustes lineales en C vs. $\log t$ (ec. 1). En las columnas del centro y de la derecha las curvas con rayas cortas corresponden al ajuste de los datos a la ec. 4.

queratina precipita. Esto implica que hay que tener en cuenta las interacciones posibles ión-macromolécula, ión-agua y macromolécula-agua. En este caso hay una fuerte repulsión del agua con los cationes y con la macromolécula que impide que se solvate, y por lo tanto tiende a precipitar. En la Figura 2 (b), queda claro la precipitación de la queratina en las disoluciones.

La influencia de la naturaleza del anión en las dispersiones acuosas de queratina a pH=1, puede ser observada en la Figura 5. Se puede observar claramente que la tendencia de la queratina para precipitar en las sales potásicas es similar, excepto en el F en el cual aún queda queratina sin precipitar. Además, en la Figura 2 (e) se observa que cuando se deja tiempo para que precipite, precipitan todos los aniones, excepto el F. Por lo tanto, el fluoruro (F) es el anión que más favorece la solubilidad. Se observa como la queratina en la disolución con fluoruro presenta un aspecto más turbio en comparación con el resto de las disoluciones en las cuales la queratina está totalmente precipitada.

Influencia de los iones a pH > pI

Los ensayos realizados a pH = 10, indican que para los cationes en medio básico (Figura 4), la tendencia de la queratina para precipitar es la siguiente: $K^+ < Na^+ < Li^+ < NH_4^+$. Siendo el K^+ el catión que menos favorece la precipitación de la queratina. En la Figura 2 (d), queda claro la turbidez de la disolución de la queratina con K^+ . En medio básico, estas especificidades catiónicas son puestas de manifiesto, debido a la carga negativa de la queratina.

En medio básico para los aniones (Figura 5), el impacto en la precipitación es: $Br^- \sim Cl^- < I^- \sim F^- < SCN^-$. Queda de manifiesto en la Figura 2 (g) la mayor turbidez que presenta el Br^- con respecto al resto de disoluciones. Se puede observar como a pH > pI el anión que más favorece la solubilidad es el Br^- .

Influencia de los iones a pH ~ pI

En la Figura 2 (c) y Figura 4, a un pH cercano al isoelectrico, los cationes siguen el siguiente orden de precipitación: $Li^+ < NH_4^+ < Na^+ < K^+$. Comparando con medio básico, se observa que la tendencia a precipitar en medio cercano al punto isoelectrico es a la inversa, siendo el Li^+ el catión que menos favorece la precipitación mientras que a pH = 10 es el potasio el catión que más solubilidad proporciona. La razón de esta inversión de la tendencia no está clara pero puede deberse a la protonación de la Histidina a pH < 6 que conlleva un reordenamiento de las afinidades intra-macromoleculares y de las de naturaleza macromolécula-ión⁴².

En los aniones el orden de precipitación en un medio cercano al punto isoelectrico sigue el orden (Figura 2 (f) y Figura 5): $SCN^- < I^- < Br^- < F^- < Cl^-$. Comparando con medio ácido y básico, en este caso el anión que menos favorece la precipitación es el SCN^- , diferente anión en comparación con los medios ácido y básico.

A parte, se puede concluir, que conforme aumenta el tiempo en las cuales las mezclas están en reposo, la

cantidad de queratina que precipita sigue aumentando, especialmente en el Cl^- , llegando a extrapolar los datos se puede prever que a tiempos mayores llegará a precipitar toda la queratina.

Además, se manifiesta que el pH afecta a la capacidad de precipitación y/o solubilización de las queratosas en las sales.

Impacto de la concentración de la sal. En-salado y ex-salado.

La variación de la concentración de las sales puede hacer que el comportamiento macromolecular cambie. Es habitual que, a concentraciones bajas, las sales puedan facilitar la solubilidad de las macromoléculas. Este fenómeno puede denominarse como en-salado. A concentraciones mayores, sin embargo, una alta concentración de sal puede promover la insolubilidad de las macromoléculas.

Mediante gravimetría, se ha estudiado el efecto de la concentración de tres sales, NaCl, KCl y LiCl, sobre la solubilidad de las queratosas a un pH cercano al isoelectrico (pH = 5). La Figura 6 muestra la evolución de la solubilidad de la queratosas en presencia de distintas concentraciones de sal. Estos datos se han ajustado al modelo de Debye-Hückel^{43, 44}:

$$\log S_0 + \frac{0.5 \cdot Z^+ Z^- \cdot \sqrt{\mu}}{1 + A \sqrt{\mu}} - K_{ex} \cdot \mu \quad Ec (5)$$

Donde S representa la solubilidad de la queratosa, $Z^+ Z^-$ un término proporcional a su valencia eléctrica, m la fuerza iónica, A una constante dependiente de los radios iónicos, y K_{ex} una constante que refleja la capacidad de la sal de precipitar la queratosa. El segundo término de la ec. 5 determina la capacidad de solubilizar las macromoléculas, mientras que el último término determina la capacidad de insolubilizar las macromoléculas a altas concentraciones de sal, siendo determinada por la constante de ex-salado, K_{ex} . Los parámetros de ajuste para los datos de la Figura 6 se recogen en la Tabla 5. Como puede verse la capacidad de en-salado de los cationes sigue el orden $Li^+ > Na^+ > K^+$. Este orden es el inverso a en cuanto su capacidad de precipitar la queratosa, esto es $K^+ > Na^+ > Li^+$. Estos datos, obtenidos gravimétricamente, coinciden con los datos obtenidos mediante el estudio de decantación realizado con un polarímetro, descrito anteriormente, donde a pH = 5 se observaba que el ajuste lineal a la ec. 1 daba parámetros b decrecientes según $K^+ > Na^+ > Li^+$. También el ajuste al modelo representado por la ec. 4 indicaba que la inestabilidad de la queratosa en presencia de los cationes decrece según $K^+ > Na^+ > Li^+$ (ver Figura 4 y Tabla 3). Según la Regla de Afinidades al Agua Equivalentes, la mayor insolubilidad en presencia de K^+ puede deberse a la menor capacidad de este catión de interactuar con los carboxilatos que, por ejemplo, el Li^+ o el Na^+ , permitiendo un mayor grado de interacciones intra o inter-macromoleculares y así su mayor coalescencia. También podría vincularse a una mayor interacción del K^+ con los grupos sulfonato con respecto a los cationes Li^+ o Na^+ y a un mayor

apantallamiento iónico del potasio que favorecería el carácter hidrófobo de la proteína^{40,42}.

Cabe señalar que la capacidad de en-salado de las sales sobre estas queratosas es muy limitada en comparación con otras proteínas las cuales si presentan una mucha mayor solubilidad con la adición de pequeñas cantidades de sal¹⁰.

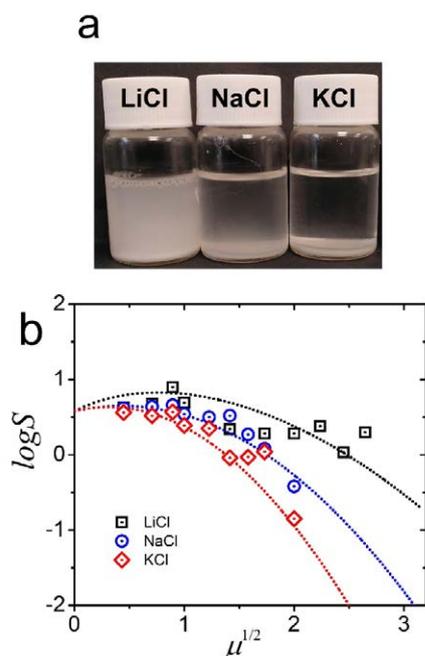


Figura 6. a) Fotografías de suspensiones de queratosas (5 mg/mL) en presencia de distintas sales, 3 M ($\mu^{1/2} = 1,7 M^{1/2}$) tras decantación prolongada (24 h). b) Ajuste al modelo de Debye-Hückel y régimen de en-salado y ex-salado de la queratosa a distinta concentración de LiCl, NaCl, y KCl, y el ajuste de los datos a la ec.5. Ver los parámetros en la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros de ajuste de los datos de solubilidad de las queratosas, obtenidos por gravimetría, en presencia de las sales indicadas, según el modelo de Debye-Hückel (ec.5).

Sal	$\log S_0$	Z^*Z	A	K_{ex}
LiCl	0.579	1.5	0.75	0.2
NaCl	0.579	0.65	0.01	0.372
KCl	0.580	0.7	-0.1	0.6

CONCLUSIONES

Un sencillo experimento de solubilidad de las queratosas en medio ácido ($pH < pI$), medio cercano al punto isoléctrico ($pH \sim pI$) y medio básico ($pH > pI$) en presencia de distintas sales pone de manifiesto la fenomenología ión-macromolécula.

Atendiendo a la composición de la queratina, los resultados de solubilidad observados pueden relacionarse con el Principio de Competitividad de Fajans o también conocido como Regla de Afinidades al Agua Equivalentes.

AGRADECIMIENTOS

Tomás Soria Biurrún quisiera agradecer al Departamento de Educación del Gobierno de Navarra por el apoyo financiero durante la realización de su tesis doctoral. Laura Abarzuza Loidi, el apoyo recibido de la Fundación "la Caixa" (ID 1000010434), Fundación Caja Navarra y UNED Pamplona, según el acuerdo LCF/PR/PR15/51100007". Borja Fernández-d'Arlas agradece la beca de captación de Talento de la UPNA, financiada por Obra Social La Caixa, para la investigación sobre bioplásticos derivados de la lana y la pluma.

REFERENCIAS

- Mayolo-Deloisa K., Martínez L. M., y Rito-Palomares M., «Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas», *Rev. Mex. Ing. Quím.*, vol. 11, n.º 3, pp. 415-429, dic. 2012.
- Voet D., Voet J. G., y Pratt C. W., «Sección 5-2. Purificación de proteínas», en *Fundamentos De Bioquímica*, Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana, 2009.
- Vollrath F., Porter D., y Holland C., «There are many more lessons still to be learned from spider silks», *Soft Matter*, vol. 7, n.º 20, pp. 9595-9600, 2011, doi: 10.1039/C1SM05812F.
- Knight D. P. y Vollrath F., «Changes in element composition along the spinning duct in a Nephila spider», *Naturwissenschaften*, vol. 88, n.º 4, pp. 179-182, 2001, doi: 10.1007/s001140100220.
- Lorenzo Andreu A., «Acción de varias sales alcalinas sobre la división celular en allium cepa», *Action of some alkaline salts on mitosis in allium cepa root tips*, 1951, Accedido: ago. 07, 2020. [En línea]. Disponible en: <https://digital.csic.es/handle/10261/36245>.
- Roughton F. J. W. y Booth V. H., «The manometric determination of the activity of carbonic anhydrase under varied conditions», *Biochem. J.*, vol. 40, n.º 2, pp. 309-319, ene. 1946, doi: 10.1042/bj0400309.
- Ramos C. H. I. y Baldwin R. L., «Sulfate anion stabilization of native ribonuclease A both by anion binding and by the Hofmeister effect», *Protein Sci.*, vol. 11, n.º 7, pp. 1771-1778, 2002, doi: 10.1110/ps.0205902.
- Nebot V. J., Ojeda-Flores J. J., Smets J., Fernández-Prieto S., Escuder B., y Miravet J. F., «Rational Design of Heat-Set and Specific-Ion-Responsive Supramolecular Hydrogels Based on the Hofmeister Effect», *Chem. – Eur. J.*, vol. 20, n.º 44, pp. 14465-14472, oct. 2014, doi: 10.1002/chem.201402547.
- Fernández-d'Arlas B., Pérez-Camargo R., y Müller A. J., «Copolímeros con alta densidad de uretano. Congreso», presentado en Congreso: Avances en Materiales Poliméricos. XIV Reunión del grupo especializado de polímeros (GEP) de la RSEQ y RSEF, Burgos, 2016.
- Fernández-d'Arlas B., «Series liotrópicas en la química macromolecular», *An. Quím.*, vol. 112,

- n.º 2, jun. 2016, Accedido: abr. 16, 2020. [En línea]. Disponible en: <http://gestion.analesdequimica.es/index.php/AnalesQuimica/article/view/777>.
11. Okur H. I. *et al.*, «Beyond the Hofmeister Series: Ion-Specific Effects on Proteins and Their Biological Functions», *J. Phys. Chem. B*, vol. 121, n.º 9, pp. 1997-2014, mar. 2017, doi: 10.1021/acs.jpcc.6b10797.
 12. Lewith S., «Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Erste Mittheilung. Das Verhalten der Eiweisskörper des Blutserums gegen Salze», *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 24, 1, 1887.
 13. Hofmeister F., «Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Zweite Mittheilung. Ueber Regelmässigkeiten in der eiweissfällenden Wirkung der Salze und ihre Beziehung zum physiologischen Verhalten derselben», *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 24, 247, 1887.
 14. Hofmeister F., «Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Dritte Mittheilung. Ueber die wasserentziehende Wirkung der Salze» *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 25, 1, 1888.
 15. López-León T., «Efectos Hofmeister en partículas coloidales», Universidad de Granada, Granada, 2006.
 16. Zhang Y. y Cremer P. S., «The inverse and direct Hofmeister series for lysozyme», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, n.º 36, pp. 15249-15253, sep. 2009, doi: 10.1073/pnas.0907616106.
 17. López-León T., Jódar-Reyes A. B., Ortega-Vinuesa J. L., y Bastos-González D., «Hofmeister effects on the colloidal stability of an IgG-coated polystyrene latex», *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 284, n.º 1, pp. 139-148, 2005, doi: 10.1016/j.jcis.2004.10.021.
 18. F. d'Arlas B. y Müller A. J., «Serie inversa de Hofmeister en la interacción de un poliuretano catiónico y diversos aniones monovalentes», *Rev. Iberoam. Polímeros*, vol. 18, n.º 1, pp. 9-20, 2017.
 19. Mason P. E., Heyda J., Fischer H. E., y Jungwirth P., «Specific Interactions of Ammonium Functionalities in Amino Acids with Aqueous Fluoride and Iodide», *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, n.º 43, pp. 13853-13860, nov. 2010, doi: 10.1021/jp104840g.
 20. Kherb J., Flores S. C., y Cremer P. S., «Role of Carboxylate Side Chains in the Cation Hofmeister Series», *J. Phys. Chem. B*, vol. 116, n.º 25, pp. 7389-7397, jun. 2012, doi: 10.1021/jp212243c.
 21. Schwierz N., Horinek D., y Netz R. R., «Anionic and Cationic Hofmeister Effects on Hydrophobic and Hydrophilic Surfaces», *Langmuir*, vol. 29, n.º 8, pp. 2602-2614, feb. 2013, doi: 10.1021/la303924e.
 22. Schwierz N., Horinek D., Sivan U., y Netz R. R., «Reversed Hofmeister series—The rule rather than the exception», *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 23, pp. 10-18, jun. 2016, doi: 10.1016/j.cocis.2016.04.003.
 23. Salis A. y Ninham B. W., «Models and mechanisms of Hofmeister effects in electrolyte solutions, and colloid and protein systems revisited», *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, n.º 21, pp. 7358-7377, oct. 2014, doi: 10.1039/C4CS00144C.
 24. Okur HI, Hladílková J, Rembert KB, Cho Y, Heyda J, Dzubiella J, Cremer PS, Jungwirth P., «Beyond the Hofmeister Series: Ion-Specific Effects on Proteins and Their Biological Functions», *J. Phys. Chem. B*, 121, 1997, 2017.
 25. Fajans K., «Löslichkeit und Ionisation vom Standpunkte der Atomstruktur», *Naturwissenschaften*, vol. 9, n.º 37, pp. 729-738, sep. 1921, doi: 10.1007/BF01487182.
 26. E. Gutiérrez-Ríos. Química Inorgánica. Cap. 4. Reacciones en Medio Acuoso. Ed. Reverté, Barcelona (España) 1994.
 27. Morris DFC, «Ionic Radii and Enthalpies of Hydration of Ions», *Struct. Bond*, 6, 157-159, 1968.
 28. Collins K.D., «Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process», *Methods* 34 (2004) 300-311.
 29. Plowman J. E., Harland D. P., y Deb-Choudhury S., *The Hair Fibre: Proteins, Structure and Development*. Springer, 2018.
 30. Rippon J. A., «The Structure of Wool», en *The Coloration of Wool and other Keratin Fibres*, John Wiley & Sons, Ltd, 2013, pp. 1-42.
 31. Wang B., Yang W., McKittrick J., y Meyers M. A., «Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration», *Prog. Mater. Sci.*, vol. 76, pp. 229-318, 2016, doi: 10.1016/j.pmatsci.2015.06.001.
 32. Castro E., «Proteínas: estructura y función Estructura y plegamiento de proteínas. Diapositivas.» Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 2010, [En línea]. Disponible:<http://www.departamentos.ulpgc.es/dbbf/medicina/bioquimical/proteinas01.pdf>.
 33. Faccio G., «From Protein Features to Sensing Surfaces», *Sensors*, vol. 18, n.º 4, abr. 2018, doi: 10.3390/s18041204.
 34. Kauzmann W., «Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation», en *Advances in Protein Chemistry*, vol. 14, C. B. Anfinsen, M. L. Anson, K. Bailey, y J. T. Edsall, Eds. Academic Press, 1959, pp. 1-63.
 35. Jones L. y Rogers G., «Structure and Composition of Wool», en *Wool Biology and Metrology*, Melbourne: Australian Wool Education Trust, 2008.
 36. Popescu C. y Höcker H., «Hair: the most sophisticated biological composite material», *Chem. Soc. Rev.*, vol. 36, n.º 8, pp. 1282-1291, ago. 2007, doi: 10.1039/b604537p.
 37. Shavandi A., Silva T. H., Bekhit A. A., y Bekhit A. E.-D. A., «Keratin: dissolution, extraction and biomedical application», *Biomater. Sci.*, vol. 5, n.º 9, pp. 1699-1735, 2017, doi: 10.1039/C7BM00411G.
 38. Fernández-d'Arlas B., «Improved aqueous solubility and stability of wool and feather proteins by reactive-extraction with H₂O₂ as bisulfide (SS) splitting agent», *Eur. Polym. J.*, vol. 103, pp. 187-197, jun. 2018, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2018.04.010.
 39. Urdiales J. L., «Estructura 3D de las proteínas», 2005. http://www.biorom.uma.es/contenido/av_biorom/Mat3b.html (accedido feb. 11, 2019).

40. N. Vlachy, B. Jagoda-Cwiklik, R. Vácha, D. Touraud, P. Jungwirth, W. Kunz, *Adv. Coll. Interf. Sci.*, 146, 42-47, 2009.
41. Chothia C. y Finkelstein A. V., «The classification and origins of protein folding patterns», *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 59, pp. 1007-1039, 1990, doi: 10.1146/annurev.bi.59.070190.005043.
42. Fernández-d'Arlas B. , «Especificidades ion-macromolécula observadas con diversas sales y clara de huevo cocida», *Revista Iberoamericana de Polímeros*, Vol. 19, Nº. 2, 2018, págs. 45-54.
43. Hückel, E. Zur theorie konzentrierterer wässriger Lösungen starker elektrolyte. *Zeitschr. Physik*, vol. 26, 93–147, 1925.
44. Para ver un procedimiento de ajuste a la ecuación de Debye-Hückel (ec.5) ver la revisión 10 citada aquí y sus correspondientes citas bibliográficas.