

EFFECTO DE LA LONGITUD DE ONDA DE LA RADIACIÓN UV SOBRE LA SEDA DE ARAÑA

G. B. Perea, J. Pérez-Rigueiro, G. R. Plaza, G. V. Guinea, M. Elices

Departamento de Ciencia de Materiales, E.T.S. de Ingenieros de Caminos,
Canales y Puertos, Universidad Politécnica de Madrid, C/ Profesor Aranguren s/n,
28040 Madrid, España.
E-mail: bperea@mater.upm.es

RESUMEN

En el presente trabajo se continúa el análisis de la influencia de la radiación UV sobre las propiedades mecánicas de las fibras de seda de araña. Para ello se ha empleado la seda producida por la glándula ampollácea mayor de la especie *Argiope trifasciata* y se ha estudiado el comportamiento en tracción simple de fibras de seda sometidas a diferentes tiempos de irradiación con luz UV de longitudes de onda de 254, 312 y 365 nm. Se ha encontrado que la radiación ultravioleta disminuye la tensión de rotura y la deformación de rotura modificando, en algunos casos, el aspecto general de las curvas tensión-deformación. Además se ha hecho uso de la radiación UV de longitud de onda de 254 nm para introducir daño en las fibras con objeto de realizar un análisis fractográfico sistemático. El estudio se complementa con la evaluación del efecto producido por la irradiación en el fenómeno de supercontracción.

ABSTRACT

The present work continues the analysis on the influence of UV radiation on the mechanical properties of spider silk fibers. Major ampullate gland silk (MAS) fibers were collected from *Argiope trifasciata* spiders, and tensile tested after irradiation. Wavelengths of 254, 312 and 365 nm were used. It has been found that exposure to UV radiation reduces the tensile strength and the deformation at breaking of the fibers, modifying in some cases the shape of the stress-strain curve. In addition, radiation with a wavelength of 254 nm was used to induce damage in the fibers in order to perform a systematic fractographic analysis. The study is complemented with the evaluation of the effect exerted by UV irradiation on the supercontraction of spider silk.

PALABRAS CLAVE: Seda de araña, fractografía, microestructura.

1. INTRODUCCIÓN

Las fibras de seda de araña constituyen un material enormemente atractivo. Su elevada resistencia y deformabilidad les permite almacenar gran cantidad de energía mecánica, que pueden después disipar, de modo que son especialmente apropiadas para absorber impactos [1], [2]. La combinación en un solo material de una elevada resistencia mecánica y una gran deformación de rotura implica un elevado trabajo hasta rotura. Esta combinación es difícil de alcanzar en los materiales artificiales ya que las mejoras en la resistencia mecánica suelen implicar una disminución de la deformación de rotura y viceversa [3].

De todas las sedas producidas por las arañas, la más resistente es la producida en la glándula ampollácea mayor o seda MAS. Las excelentes propiedades de la seda MAS son necesarias para cumplir su función en la construcción de la estructura de las telas y como hilo de seguridad que mantiene a la araña unida a la superficie sobre la que se desplaza. Este atractivo ha hecho que se hayan dedicado importantes esfuerzos a intentar producir fibras de proteínas inspiradas en la seda de araña mediante Ingeniería Genética [4]. Pese a los

esfuerzos realizados, las fibras bioinspiradas no han llegado aún a igualar las propiedades de la seda producida por las propias arañas. En efecto, las técnicas de Ingeniería Genética actualmente sólo pueden producir de manera eficiente proteínas con pesos moleculares que son cinco veces menores que los de las proteínas naturales [5], [6]. Existe, por este motivo, un gran interés en establecer la relación entre el peso molecular de las proteínas que constituyen la seda de araña y las propiedades mecánicas que ésta presenta.

Con el fin de establecer esta relación, en el presente trabajo se continúa haciendo uso de la radiación UV de varias longitudes de onda [7], [8], aprovechando que el principal efecto de la luz ultravioleta es la rotura de enlaces covalentes [9]. Hay que indicar, sin embargo, que la rotura de los enlaces covalentes no implica necesariamente una disminución del peso molecular de las proteínas [10], sino que podría dar lugar a entrecruzamientos. La aparición de entrecruzamientos (enlaces covalentes entre proteínas) conduciría a un aumento del peso molecular. La irradiación UV es por tanto un medio para caracterizar la modificación de las propiedades mecánicas de la seda de araña en función

de la variación del tamaño de las proteínas que la conforman.

Para caracterizar la influencia de la radiación UV sobre las propiedades mecánicas de la seda de araña, se han sometido las fibras a diferentes tiempos de irradiación y se han obtenido sus curvas fuerza-desplazamiento para poder caracterizar su variación con el tiempo de exposición. Además se ha extendido el análisis para incluir el efecto de la radiación UV sobre la supercontracción de las fibras [11], [12]. En último lugar y con el fin de identificar los mecanismos de daño de las fibras de seda de araña irradiadas con luz UV se ha realizado un análisis fractográfico sistemático de muestras con diferentes niveles de alineamiento molecular.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En este estudio se ha utilizado la seda de araña MAS, hilo producido por la glándula ampollácea mayor de la especie *Argiope trifasciata*. La seda se ha obtenido mediante la técnica de hilado forzoso en una máquina de tracción [13]. Brevemente, el procedimiento de hilado comienza con la inmovilización de la araña en una bolsa de plástico que se fija con alfileres sobre una superficie de poliestireno expandido. La bolsa se perfora para permitir el acceso a las hilanderas, de las que se obtiene el primer tramo de seda. La araña inmovilizada se sitúa sobre la base de una máquina universal de ensayos Instron 4411. Posteriormente se une el tramo inicial de seda a un trozo de poliestireno expandido acoplado a un imán. Este imán se fija a una célula de carga inductiva HBM Q-11 que permite medir la fuerza con la que se extrae el hilo en cada momento. La célula de carga se encuentra situada en la mordaza móvil de la máquina de tracción, mientras que la araña inmovilizada se coloca en la base de la máquina. El proceso de extracción del hilo se lleva a cabo desplazando la mordaza móvil a velocidad constante mientras que la araña permanece fija en la base de la máquina. Se ha obtenido seda a dos velocidades de hilado: 50 mm/min y 500 mm/min. Con este método de extracción de hilo se obtiene aproximadamente 1 metro de fibra. La técnica de hilado forzoso en máquina de tracción tiene la ventaja de que las fibras obtenidas presentan la menor variabilidad observada en los distintos procesos de hilado permitiendo identificar el efecto de la radiación UV mediante la comparación de los resultados obtenidos a partir de muestras irradiadas y de muestras control sin irradiar.

Para determinar la influencia de la radiación UV en las propiedades mecánicas de la seda de araña y su relación con los diferentes estados de alineamiento molecular hemos hecho uso del proceso de supercontracción. La inmersión de las fibras de seda MAS en agua, sin impedir su acortamiento, produce una serie de cambios en sus propiedades; a este fenómeno se le conoce como supercontracción y se caracteriza por una disminución de más del 50 % de la longitud inicial de fibras. A las

fibras sometidas al proceso de supercontracción se las denomina fibras MS [14] y corresponden al estado de máximo enrollamiento (o equivalentemente de mínimo alineamiento) de las proteínas de la seda. Por el contrario, las fibras obtenidas mediante hilado forzoso, denominadas fibras FS, se encuentran en el estado de máximo alineamiento de sus proteínas.

Para la irradiación de las muestras se utilizan dos lámparas ultravioleta modelo Vilmer Lourmat 215 LC de 15 W de potencia. Una de ellas puede emitir a 254 nm y 365 nm y la otra emite a 312 nm.

Para poder determinar los cambios en las propiedades mecánicas de la seda de araña tras el proceso de irradiación se han realizado ensayos mecánicos de tracción simple. A partir de ellos se han determinado las curvas fuerza-desplazamiento del material utilizado. Una vez obtenidas estas curvas y mediante la medida de la sección transversal de la seda en el microscopio electrónico de barrido se han determinado las curvas tensión ingenieril-deformación ingenieril. Para realizar los ensayos mecánicos se ha utilizado la máquina Instron 4411 en la que se ha sustituido la mordaza inferior de por una balanza de precisión modelo PRECISA XT 220 A con una resolución de 0.1mg (1μN) [14]. Todos los ensayos mecánicos se han hecho en condiciones nominales de 25°C y 35% de humedad relativa.

Las superficies de fractura se obtuvieron a partir de los extremos del hilo que quedan después de realizar el ensayo de tracción. Las muestras fueron recubiertas con grafito para aumentar su resistencia frente al haz electrónico, permitiendo su observación en el microscopio electrónico de barrido sin dañar la seda. Una vez depositado el grafito se metalizan las muestras con oro durante 4 minutos. Posteriormente fueron observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico de barrido JEOL 6300. Las condiciones típicas de observación han sido un voltaje de 10kV y una intensidad de $6 \cdot 10^{-10}$ A, aunque estos parámetros se han variado dependiendo de la necesidad de observación de cada muestra. Las imágenes se han obtenido con aumentos entre x10000 y x15000.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se muestran las curvas tensión-deformación ingenieriles obtenidas para las fibras FS obtenidas mediante hilado forzoso sometidas a diferentes tiempos de irradiación con luz UV de longitud de onda de 254 nm.

En primer lugar, se observa una flexibilización del material, además de una disminución de la tensión y deformación de rotura a medida que aumenta el tiempo de irradiación de las muestras.

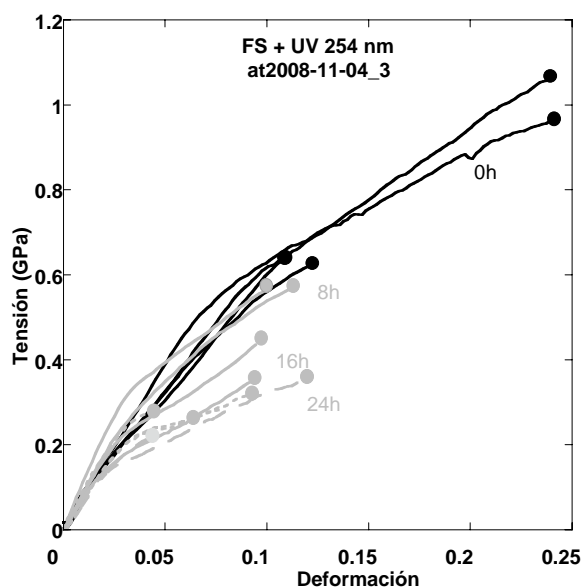


Figura 1. Curvas tensión ingenieril–deformación ingenieril de fibras FS sometidas a diferentes tiempos de irradiación con luz ultravioleta de 254nm.

La figura 2 muestra el efecto de la radiación UV de $\lambda=254$ nm sobre las propiedades mecánicas de muestras sometidas al proceso de máxima supercontracción (fibras MS) e irradiadas a tiempos variables.

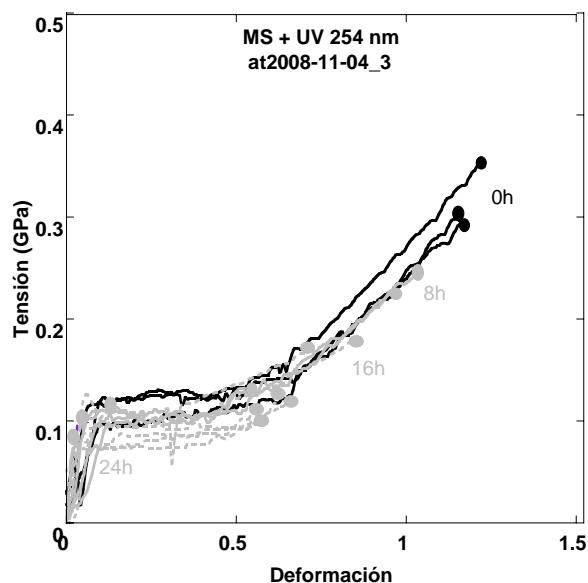


Figura 2. Curvas tensión ingenieril–deformación ingenieril de fibras MS sometidas a diferentes tiempos de irradiación con luz ultravioleta de 254nm.

A diferencia de los que ocurría en las fibras FS, en las fibras MS irradiadas con luz UV de 254 nm no se observa flexibilización apreciable del material. Al igual que en el caso anterior se observa una disminución de la tensión y de la deformación de rotura a medida que aumenta el tiempo de irradiación.

En la figura 3 se muestran las curvas tensión deformación ingenieriles para muestras de seda irradiadas con luz UV de 254 nm y posteriormente supercontraídas.

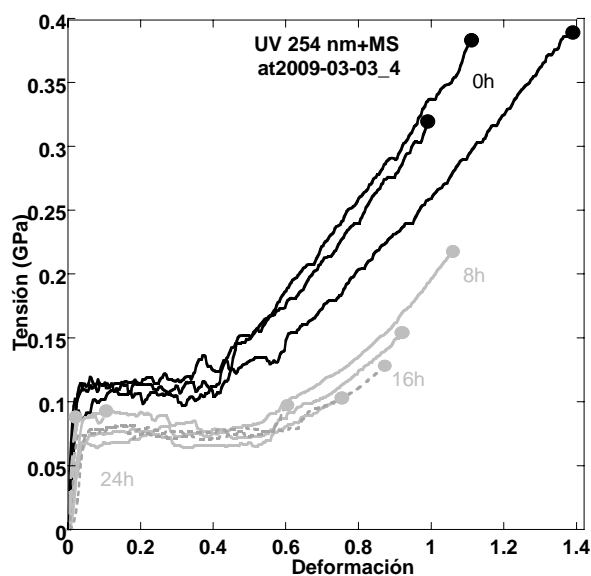


Figura 3. Curva tensión ingenieril–deformación ingenieril de fibras FS sometidas a diferentes tiempos de irradiación con luz ultravioleta de 254nm y luego supercontraídas.

En este caso se aprecia una disminución significativa de la tensión de la meseta (región entre el límite elástico y el comienzo de la rama de endurecimiento en la que la tensión es prácticamente constante) a medida que aumenta el tiempo de irradiación. Además, al igual que ocurría en las muestras FS y MS sometidas a diferentes tiempos de irradiación con luz UV, se aprecia una disminución de la tensión de rotura y de la deformación de rotura a medida que aumenta el tiempo de irradiación.

En la figura 4 se representan nuevamente las curvas de las muestras sometidas a irradiación y posterior supercontracción. En este caso, y a diferencia de la figura 3, se representa en el eje de abscisas el valor de L/L_0 donde L es la longitud instantánea de la fibra y L_0 la longitud en el estado FS. Esta representación tiene la ventaja de que permite tener en cuenta la posible influencia de la radiación UV en la longitud de supercontracción. En efecto, el primer valor del eje x para cada curva es una medida de la longitud que se ha supercontraído el hilo. De esta manera es fácil apreciar que en el proceso de supercontracción de las muestras FS irradiadas, a medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz UV, las fibras se supercontraen menos.

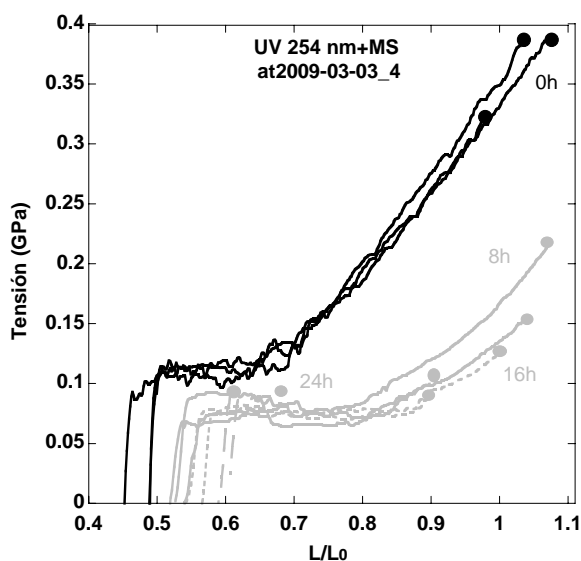


Figura 4. Curva tensión ingenieril-longitud (L/L_0) de hilos sometidos a diferentes tiempos de irradiación con luz ultravioleta de 254nm y luego supercontraídos.

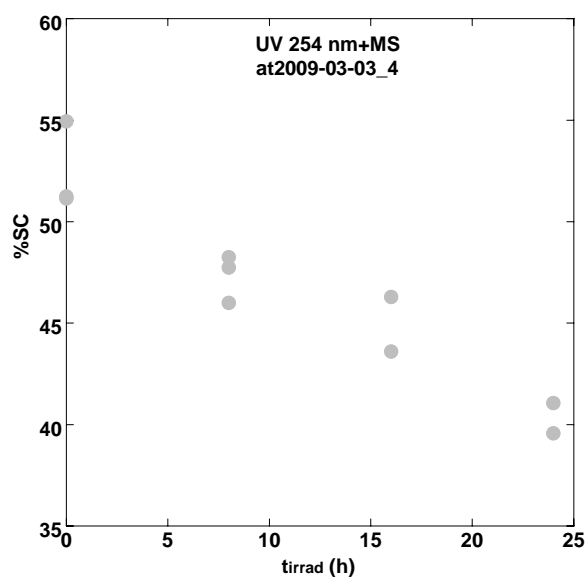


Figura 5. Porcentaje de supercontracción frente al tiempo de irradiación (t_{irrad}) de hilos FS sometidos a diferentes tiempos de irradiación con luz ultravioleta de 254nm y luego supercontraídos.

La longitud de supercontracción, que llamaremos L_{MS} , es la longitud de las fibras irradiadas y supercontraídas al comienzo del ensayo, es decir cuando la tensión es cero. En la gráfica se ve que, a medida que aumenta el tiempo de exposición a la radiación UV de las muestras de seda, la longitud de supercontracción es mayor y por tanto las muestras se supercontraen menos. Dicha menor contracción al incrementarse el tiempo de exposición a la radiación UV de las muestras de seda se pone de manifiesto más claramente si se representa gráficamente el porcentaje de supercontracción (%SC)

frente al tiempo de irradiación (Figura 5). El porcentaje de supercontracción se define de la siguiente forma:

$$\%SC = 100 \times \frac{L_0 - L_{MS}}{L_0} \quad (1)$$

Siendo L_0 la longitud inicial de la muestra en el estado de alineamiento FS y L_{MS} la longitud de la muestra supercontraída.

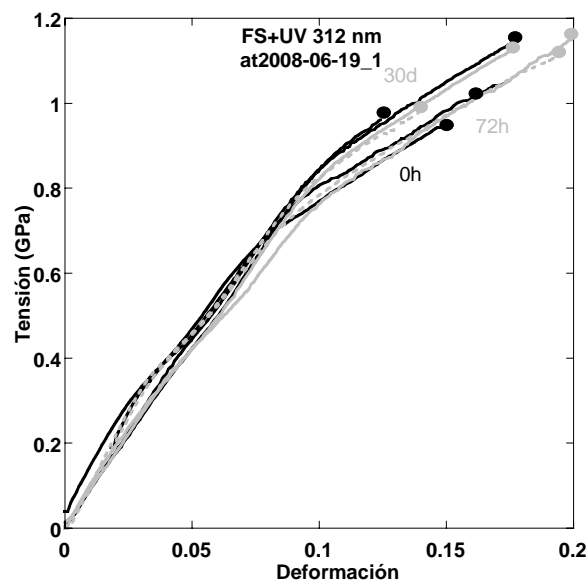


Figura 6. Curva tensión ingenieril-deformación ingenieril de fibras FS sometidas a diferentes tiempos de irradiación con luz ultravioleta de 312nm.

La radiación UV de 312 nm (Figura 6) y 365 nm (Figura 7) no producen ningún efecto sobre las propiedades mecánicas de la seda de araña.

Como se ha mostrado, la radiación UV de longitud de onda de 254 nm es la única de las utilizadas en este trabajo que modifica las propiedades mecánicas de la seda de araña. En particular se ha comprobado que la irradiación a esa longitud de onda provoca una disminución en los valores de tensión y deformación de rotura junto con una flexibilización de las fibras FS. En las muestras MS sometidas a diferentes tiempos de irradiación con luz UV también se aprecia la disminución de las tensiones y deformaciones de rotura al aumentar el tiempo de irradiación, no modificándose el aspecto general de la curva. En las muestras irradiadas y luego supercontraídas la disminución de la tensión de la meseta es acusada produciéndose también una disminución en el porcentaje de supercontracción al aumentar el tiempo de irradiación.

Los resultados obtenidos no permiten discernir si los efectos asociados con la irradiación UV son el resultado de un acortamiento de las cadenas o, por el contrario, de la formación de entrecruzamientos entre las cadenas, ya que es posible justificar los resultados macroscópicos bajo ambas condiciones. Si bien, cada una implica unos

micromecanismos de deformación y rotura radicalmente diferentes. La distinción entre ambos posibles fenómenos deberá realizarse mediante el empleo de técnicas bioquímicas.

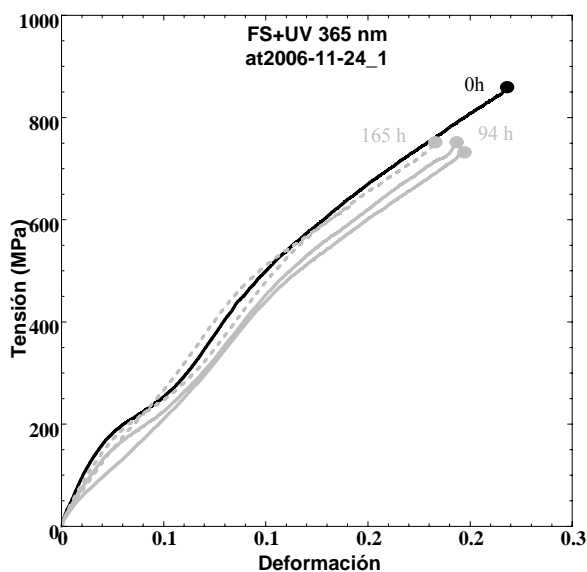


Figura 7. Curva tensión ingenieril-deformación ingenieril de fibras FS sometidas a diferentes tiempos de irradiación con luz ultravioleta de 365 nm.

Debido a que la radiación UV de longitudes de onda de 312nm y 365nm no produce ningún efecto sobre las propiedades mecánicas de la seda de araña, el análisis fractográfico se ha restringido a muestras irradiadas con luz UV de 254 nm (Figuras 8 y 9).

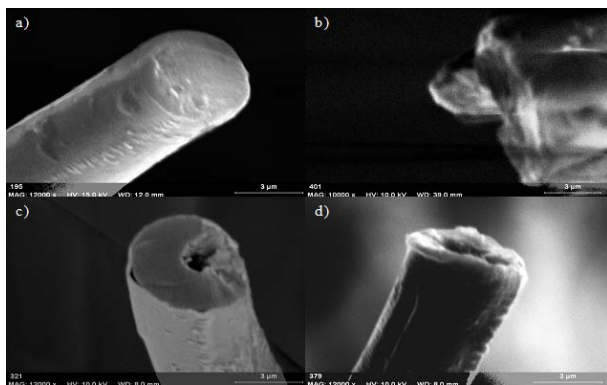


Figura 8. Superficies de fractura de fibras FS irradiadas, expuestas a tiempos de irradiación de a) 0h, b) 8h, c) 16h y d) 24h.

En general podemos decir que en las superficies de fractura obtenidas se observa una ausencia de un mecanismo claro de disipación de energía durante la rotura, independientemente de que el material haya sido sometido a un proceso de supercontracción y del tiempo de exposición a la radiación de éste. Podemos decir que el comportamiento en fractura de la seda de araña es localmente frágil. Además se observa que, a medida que aumenta el tiempo de exposición a la radiación UV, las

superficies de fractura presentan una topografía más rugosa, al menos en las muestras FS.

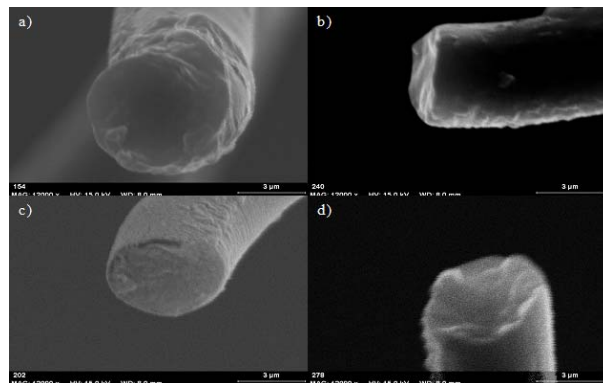


Figura 9. Superficies de fractura de fibras MS irradiadas, expuestas a tiempos de irradiación de a) 0h, b) 8h, c) 16h y d) 24h.

4. CONCLUSIONES

En las curvas obtenidas se observa que la radiación UV de longitudes de onda de 312 y 365 nm no produce ningún efecto sobre las propiedades mecánicas de la seda de araña. Sin embargo, la radiación UV de longitud de onda de 254 nm modifica considerablemente sus propiedades mecánicas. Se produce una disminución en los valores de tensión y deformación de rotura junto con una flexibilización del material en la condición FS a medida que aumenta el tiempo de exposición a la radiación. Por otra parte, se observa que en las fibras supercontraídas y luego irradiadas se produce un acortamiento de la meseta. Además se aprecia un importante efecto en el fenómeno de la supercontracción, observándose que las fibras se supercontraen menos a medida que aumenta el tiempo de irradiación.

En las fractografías no se observa un mecanismo claro de disipación de energía durante la rotura, definiéndose por tanto el comportamiento en fractura de la seda de araña como localmente frágil. Además, a medida que aumenta el tiempo de exposición a la radiación UV las superficies de fractura presentan una topografía más irregular y rugosa.

AGRADECIMIENTOS

Las arañas han sido mantenidas en cautividad por Óscar Campos. El trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (España) a través del proyecto CIT-420000-2008-30, por el Ministerio de Ciencia e Innovación (España) a través del proyecto MAT2009-10258 y por la Comunidad de Madrid (España) a través del programa MADR.IB-CM/S-SAL/0312/2006.

REFERENCIAS

- [1] Kaplan, D.L., Lombardi, S.J., Muller, W.S y Fossey, S.A., Silks, Biomaterials, Byrom, D. (Ed.), Stockton Press, New York, pag. 1-53, 1991.
- [2] Elices, M., Pérez-Rigueiro, J., Plaza, G. and Guinea, G.V., Recovery in spider silk fibers, J. Appl. Polym. Sci. 92, 3537-3541, 2004.
- [3] Elices M., Guinea G.V., Plaza G., Pérez-Rigueiro J., *Argiope trifasciata Spider Silk Fibers*, Journal of Materials, núm. Febrero, 2005.
- [4] Izquierdo Rojo M., *Ingeniería Genética*, Ediciones Pirámide, Madrid, 1993.
- [5] Viney C., Silk Fibers: Origins, Nature and Consequences of Structure en Structural Biological Materials, Elices M. (Ed.), Pergamon Materials Science, Amsterdam, pag. 293-334, 2000.
- [6] Mello, C. M., Senecal, K., Yeung, B., Vouros, P. y Kaplan, D., Initial characterization of Nephila clavipes dragline protein en Silk Polymers. Materials Science and Biotechnology Kaplan D., Adams W.W., Farmer B., Viney C. (Eds.), ACS Symposium Series 544, pag. 67-79, 1994.
- [7] Pérez Rigueiro J., Elices M., Plaza G. R. y Guinea G.V., *El efecto de la irradiación ultravioleta sobre la seda de araña*, Anales de Mecánica de la Fractura pag. 593-598, 2006.
- [8] Rueda J., Pérez Rigueiro J., Elices M. y Guinea G.V., *Influencia de la radiación UV en el comportamiento a fractura del hilo de araña*, Anales de Mecánica de la Fractura pag. 343-348, 2002.
- [9] Stryer, L., *Bioquímica*, Editorial Reverté, Barcelona, pag. 15-42, 1990.
- [10] Becker, M.A. y Tuross, N., Initial degradative changes found in B. mori silk fibroin en Silk Polymers. Materials Science and Biotechnology Kaplan D., Adams W.W., Farmer B., Viney C. (Eds.), ACS Symposium Series 544, pag. 253-269, 1994.
- [11] Work, R.W., Dimensions, birefringences, and force-elongation behaviour of major and minor ampullate silk fibers from orb-web-spinning spiders. The effect of wetting on these properties, Textile Res. J., 47, pag. 650-662, 1977.
- [12] Gosline, J.M., Denny, M. y DeMont, M.E., Spider silk as rubber, Nature, 309, pag. 551-552, 1984.
- [13] Pérez Rigueiro, J., Elices, M., Plaza, G., Real, J. I., Guinea, The effect of spinning forces on spider silk or proprieties, The Journal of Experimental Biology 208, pag. 2633-2639, 2005.
- [14] Guinea, G.V., Elices, M., Pérez-Rigueiro, J., Plaza, G.R., Stretching of supercontracted fibers: a link between spinning and the variability of spider silk, J. Exp. Biol., 208, pag. 25-30, 2005.