
Cambios microestructurales de agregados de carbonato de calcio generados a partir de secado por aspersión

Johnatan Diosa Arango^{1*}, Herley Casanova

¹Grupo de Coloides, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, A.A.1226, Medellín, Colombia

Microstructural changes in calcium carbonate aggregates induced by spray drying

Canvis microestructurals d'agregats de carbonat de calci generats a partir d'assecat per aspersió

Recibido: 1 de septiembre de 2014; revisado: 2 de febrero de 2015; aceptado: 3 de febrero de 2015

RESUMEN

El secado por aspersión es una técnica ampliamente utilizada en las industrias química, farmacéutica y de alimentos para generar sólidos secos en polvo. Las aplicaciones de los materiales obtenidos bajo esta técnica dependerán especialmente de la microestructura generada durante el proceso. Es posible controlar esta microestructura a partir de cambios en temperatura y flujo de aire durante el secado, presencia de biomoléculas, entre otras. En el presente trabajo se evaluaron los cambios microestructurales de agregados de carbonato de calcio, debidos a variaciones en la temperatura del proceso de secado. El material obtenido se caracterizó por dispersión de luz estática, microscopía electrónica de barrido y espectroscopia infrarroja. Se encontró que la temperatura del proceso promueve cambios microestructurales del material en conjunción con cambios conformacionales de una proteína láctea. Las principales microestructuras encontradas fueron agregados esféricos y toroidales.

Palabras clave: adsorción de proteínas, agregados de carbonato de calcio, secado por aspersión.

SUMMARY

Spray drying is widely used in several industries like chemical, pharmaceutical and food to elaborate dry powders. Applications of these products depend on the microstructure generated during the process. It is possible to control such microstructure by changing temperature, air flow, addition of biomolecules, etc. In the present work, microstructural changes in calcium carbonate aggregates have been evaluated after variations in temperature during spray drying process. The final product was character-

ized with different techniques like static light scattering, scanning electron microscopy and infrared spectroscopy. It was found that controlling the process temperature promotes microstructural changes in the final product in conjunction with conformational changes in a lacteous protein. The principal microstructures found in this work were spherical and toroidal aggregates.

Keywords: protein adsorption, calcium carbonate aggregates, spray drying.

RESUM

L'assecat per aspersió és una tècnica àmpliament utilitzada en les indústries química, farmacèutica i d'aliments per generar sòlids secs en pols. Les aplicacions dels materials obtinguts sota aquesta tècnica dependran especialment de la microestructura generada durant el procés. És possible controlar aquesta microestructura a partir de canvis en temperatura i flux d'aire durant l'assecat, presència de biomolècules, entre d'altres. En el present treball es van avaluar els canvis microestructurals d'agregats de carbonat de calci, deguts a variacions en la temperatura del procés d'assecat. El material obtingut es va caracteritzar per dispersió de llum estàtica, microscòpia electrònica de rastreig i espectroscòpia infraroja. Es va trobar que la temperatura del procés promou canvis microestructurals del material en conjunció amb canvis conformacionals d'una proteïna làctia. Les principals microestructures trobades van ser agregats esfèrics i toroïdals.

Paraules clau: Adsorció de proteïnes; agregats de carbonat de calci; assecat per aspersió.

* Autor para la correspondencia: johnataz@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El secado por aspersión es un proceso industrial utilizado para la generación de sólidos secos en polvo, con amplia aplicación en las industrias química, farmacéutica y de alimentos [1]. Este proceso consta de tres etapas: i) aspersión de la muestra en forma de pequeñas gotas, ii) evaporación del solvente presente en la gota, iii) recuperación del material seco [2]. Dicho proceso es de especial interés en la aglomeración de minerales como el carbonato de calcio (CaCO_3), debido a la versatilidad que se puede ejercer sobre el producto final. Dentro del espectro de microestructuras que se pueden generar, se encuentran partículas con porosidad variable, partículas toroidales, entre otras [3]. La obtención de una determinada microestructura dependerá, entre otros factores, de la interacción de las partículas de mineral suspendidas en las pequeñas gotas asperjadas, lo cual es determinado por la presencia de agentes con actividad superficial como los surfactantes o biomoléculas como las proteínas [4].

En el caso específico de las proteínas, estas pueden afectar la interacción de las partículas debido a su facilidad para exhibir cambios conformacionales en su estructura. Estos cambios se producen por adsorción sobre superficies sólidas o variaciones en la temperatura. Durante el proceso de secado por aspersión es posible controlar la temperatura de secado, induciendo cambios conformacionales de la proteína durante el proceso, que repercuten en la microestructura del material seco. Una de las técnicas más comunes para la determinación de cambios en la estructura secundaria de las proteínas es la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR). Estos estudios se basan en el seguimiento de la señal característica de las proteínas, conocida como amida I, la cual se detecta a una longitud de onda de 1653 cm^{-1} , y corresponde al estiramiento $\text{C}=\text{O}$ del enlace peptídico [5]. Ésta banda es la superposición de varias frecuencias vibracionales relacionadas con las estructuras tipo hélice alfa, hoja beta, desordenadas y giros, por lo que es posible determinar porcentualmente la distribución conformacional de una proteína en términos de las estructuras secundarias que la componen.

En este trabajo se evaluaron los cambios conformacionales de proteínas lácteas debidos al proceso de secado por aspersión al ser incorporadas en una suspensión concentrada de microcápsulas de CaCO_3 provista por la empresa Nexentia S.A.S. Igualmente, se correlacionaron los cambios conformacionales con la microestructura de los agregados de CaCO_3 durante el proceso de secado en función de la temperatura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó una suspensión concentrada de partículas de CaCO_3 (fase calcita), estabilizadas con proteína láctea, provista por la empresa Nexentia S.A.S. (Sabaneta, Colombia). *Secado por aspersión*

El secado por aspersión se llevó a cabo usando un secador B-290 (Büchi, Suiza). La suspensión (30% m/m) fue asperjada por una boquilla de dos fluidos con un diámetro de 1.5 mm utilizando aire comprimido. La suspensión fue alimentada al secador por medio de una bomba peristáltica. Las condiciones de operación fueron: temperatura de

entrada entre 180°C y 220°C , flujo del aire de secado de $32\text{ m}^3/\text{h}$, flujo de aire de atomización (Q_{AA}) de 1052 L/h , velocidad de alimentación de la suspensión (Q_A) de 0.3 L/h . Bajo estas condiciones la temperatura de salida estuvo entre 90°C y 110°C .

Tamaño de partícula

Se utilizó un analizador de tamaño de partícula por dispersión de luz estática Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, U.K.). Se reportó el diámetro promedio al volumen de las partículas, $D[4,3]$.

Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Los cambios microestructurales de los agregados de CaCO_3 durante el secado por aspersión, se evidenciaron en las características morfológicas de los sistemas obtenidos a través de microscopia electrónica de barrido (SEM) en un microscopio JSM 6490LV (JEOL, Japón). Los análisis se realizaron en condiciones de vacío de 10^{-5} torr. Las muestras se depositaron sobre una cinta conductora de grafito soportada en un cilindro de acero y se depositó oro para aumentar la conductividad eléctrica de las muestras.

Espectroscopia infrarroja

Los análisis por FT-IR se realizaron en un espectrofotómetro FT-IR IRAffinity-1 (Shimadzu, Japón). Las muestras sólidas fueron medidas formando pastillas con KBr de aproximadamente 2 mm de espesor. Se tomaron 16 espectros por muestra con una resolución de 4 cm^{-1} .

Para realizar los análisis de estructura secundaria de la proteína los espectros se transformaron a valores de absorbancia utilizando el software IRsolution. Posteriormente, la banda amida I correspondiente al rango 1600 cm^{-1} – 1720 cm^{-1} fue separada, para luego realizar una corrección de la línea base. Por último se realizó un proceso de ajuste tipo multi-pico con curvas Gaussianas para deconvolucionar las diferentes bandas que conforman la banda amida I y así determinar las estructuras secundarias que adquiere la proteína en cada muestra [5].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó el efecto de la temperatura de entrada (T_{in}) sobre la microestructura de las microcápsulas de CaCO_3 , variando T_{in} entre 180°C y 200°C . Las condiciones de las variables del secado se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones del proceso de secado por aspersión.

Ensayo	T_{in} ($^\circ\text{C}$)	Flujo de aire de secado [Q_{AS}] (m^3/h)	Q_A (L/h)	Q_{AA} (L/h)
T1	180	32	0.3	1052
T2	190	32	0.3	1052
T3	200	32	0.3	1052
T4	210	32	0.3	1052
T5	220	32	0.3	1052

La Figura 1 muestra las distribuciones de tamaño de partícula de las microcápsulas de carbonato de calcio correspondientes a los ensayos T1 a T5 y para el CaCO_3 como materia prima. Aquí se observa que las microcápsulas presentan dos poblaciones de partícula: Una submicro-métrica, con tamaños alrededor de 200 nm , y otra micro-métrica con partículas de $7\text{ }\mu\text{m}$. Adicionalmente, las distribuciones de tamaño de partícula son similares entre sí, lo cual sugiere un mínimo efecto de la temperatura de secado del sistema (T_{in}) sobre la formación de los agregados de CaCO_3 . Posiblemente las temperaturas de secado de las microcápsulas de CaCO_3 , no generaron inestabilidad

inercial de las gotas asperjadas en la cámara de secado, debido a una mínima microcirculación de las partículas de CaCO_3 dentro las gotas [6].

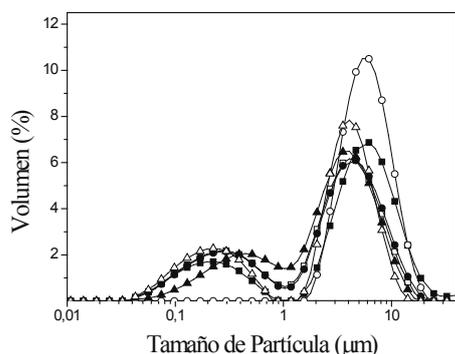


Figura 1. Distribución de tamaño de partícula para los ensayos: (■), T1; (□), T2; (●), T3; (○), T4; (▲), T5; (△), CaCO_3 sin presencia de proteínas.

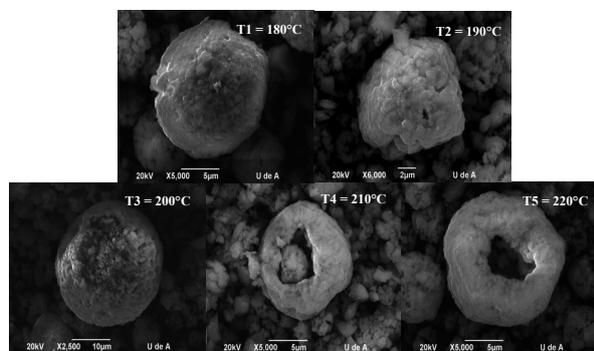


Figura 2. Micrografías SEM para microcápsulas de CaCO_3 elaboradas a diferentes T_{in} .

En la Figura 2 se muestran las micrografías SEM para los ensayos de secado por aspersión a las cinco temperaturas de entrada T_{in} analizadas en el presente trabajo. A diferencia de lo que ocurrió con el tamaño de partícula, la microestructura de los agregados de CaCO_3 si se ve afectada por los cambios en la temperatura. Se observa que un aumento en la T_{in} , genera deformación en la microestructura de los aglomerados de microcápsulas desde una geometría esférica (i.e., T1 a T3), hacia partículas tipo toroidal (T4 y T5). Lo interesante de este hecho, es que las variaciones morfológicas de los agregados en este caso son debidas a cambios en la T_{in} del orden de las decenas, mientras que se ha reportado que al secar por aspersión materiales inorgánicos como el SiO_2 , se requieren aumentos de cientos de grados centígrados en la T_{in} para la generación de partículas tipo toroidal como las exhibidas por los ensayos T4 y T5 (Figura 2) [6, 7]. En el caso de los sistemas de SiO_2 mencionados, la obtención de partículas toroidales es debida al incremento de la microcirculación de partículas cerca de la superficie de las gotas, como consecuencia de un aumento en el gradiente de temperatura en dicha superficie [6]. En el presente trabajo, el análisis de tamaño de partícula sugiere que no se presentó recirculación al interior de las gotas de suspensión asperjadas. Por lo tanto, los cambios microestructurales exhibidos pueden estar asociados con cambios en la estructura secundaria de la proteína láctea presente en el sistema. Para proporcionar evidencia adicional a lo anterior, se realizó un seguimiento de la proteína por FT-IR en función de la T_{in} .

La Figura 3 muestra el espectro infrarrojo para la proteína láctea en el sistema T4 en la zona de la banda amida I. Al deconvolucionar este espectro se hace evidente que dicha banda se compone de diferentes modos vibracionales que se asocian a las diferentes conformaciones que puede exhibir la proteína. Los análisis demostraron la existencia de cuatro estructuras proteicas: i) hoja beta (1634cm^{-1} , 1680cm^{-1}); ii) hélice alfa (1651cm^{-1}); iii) giros (1662cm^{-1}); iv) desordenada (1646cm^{-1}).

En la Figura 4 se presenta un resumen de los cambios conformacionales que presentó la proteína en función de la T_{in} durante el secado por aspersión. Los ensayos a 190°C y 210°C , fueron los únicos que indujeron estructura secundaria tipo giros, e igualmente fueron los que presentaron poca generación de agregados esféricos durante el secado por aspersión, efecto que fue más notorio en el sistema a 190°C , como se evidencia en las microfotografías SEM de la Figura 5.

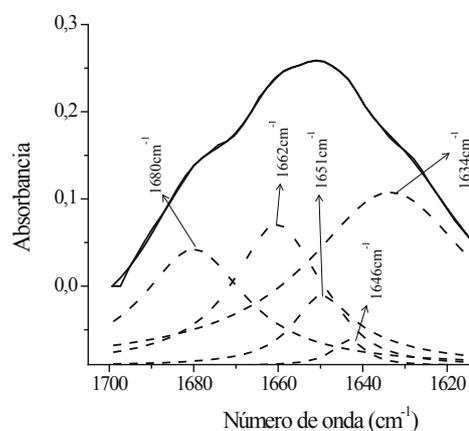


Figura 3. Espectro infrarrojo deconvolucionado para la banda amida I de la proteína láctea en el sistema T4 (i.e., 200°C). Hoja beta (1634cm^{-1} , 1680cm^{-1}), hélice alfa (1651cm^{-1}), giros (1662cm^{-1}), desordenada (1646cm^{-1}).

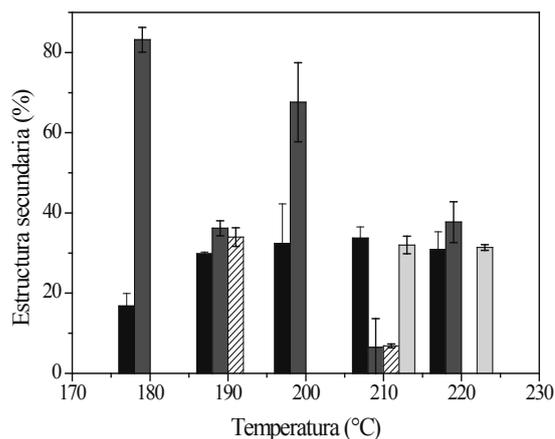


Figura 4. Variación en la estructura secundaria de la proteína láctea a medida que se aumenta T_{in} ; (●) Hoja- β ; (●) Hélice- α ; (rayada) giros; (●) desordenada.

Un giro se conoce como aquel punto en la cadena peptídica de una proteína en el que hay un cambio de dirección; generalmente estos giros ocurren entre estructuras secundarias periódicas como las *hojas beta* o las *hélices alfa*, y son comunes en las superficies de las moléculas de proteína [8]. Por lo tanto, es de esperarse que estos giros

se encuentren expuestos sobre la superficie de las partículas de CaCO_3 , lo que genera un efecto de puenteo entre las partículas de CaCO_3 dentro de las gotas de suspensión durante el proceso de secado. Este puenteo redundaría en la desestabilización de las gotas de suspensión, por lo que al final se obtienen agregados de CaCO_3 no esféricos. Por otro lado, en la Figura 4 se observa un punto de quiebre entre el sistema a 190°C y el sistema a 210°C . En el sistema obtenido a 190°C , el contenido de estructura *hélice alfa* es mayor en un 19% que el de *hoja beta*, lo cual se invierte al pasar al sistema obtenido a 210°C en donde el contenido de estructura *hoja beta* es un 81% mayor en comparación al de *hélice alfa*. Este cambio conformacional de la proteína láctea en estos sistemas se relaciona con los cambios microestructurales de las microcápsulas de CaCO_3 mostrados en la Figura 5. En el sistema a 190°C se observan menos agregados esféricos que en el sistema a 210°C , esto podría atribuirse a que dentro de la estructura tridimensional de la proteína láctea, se generan conexiones entre dominios hidrofóbicos e hidrofílicos mediados por *hélices alfa* [9]. Por lo tanto, se plantea la existencia de interacciones hidrofílicas-hidrofóbicas entre moléculas de proteínas que se encuentran ancladas en sendas partículas de CaCO_3 , lo que conlleva a un efecto de puenteo similar al planteado bajo la existencia de *giros* y por consiguiente como producto de secado se obtiene un sistema con aglomerados no esféricos. Por otro lado, la estructura secundaria tipo *hoja beta* es una estructura más abierta que la *hélice alfa*, por lo que se espera una mayor interacción con la superficie de las partículas de CaCO_3 . Esta alta interacción con el CaCO_3 conlleva a que la proteína láctea en el sistema obtenido a 210°C se comporte como un buen agente dispersante y, por tanto, las gotas dentro de la cámara de aspersión y secado se estabilizan efectivamente a medida que se da la evaporación de agua y, por ende, en el material seco final se obtiene una mayor proporción de agregados esféricos y partículas individuales, este efecto de estabilización atribuido a la conformación tipo *hoja beta*, contrarresta en cierta medida el efecto desestabilizante de la conformación tipo *giro* [10].

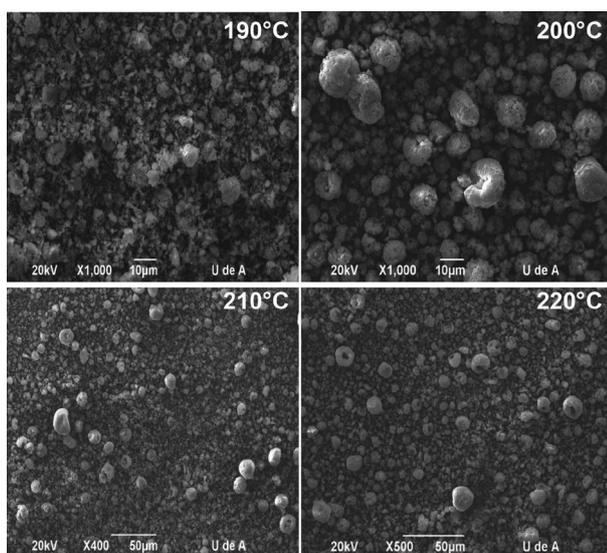


Figura 5. Micrografías SEM para microcápsulas de CaCO_3 obtenidas a 190°C , 200°C , 210°C , 220°C .

En cuanto a la generación de aglomerados tipo toroidal, ésta parece estar mediada por la presencia de estructuras desordenadas dentro de la proteína. En los ensayos obtenidos a 210°C y 220°C se nota alta presencia de partículas tipo toroidal y colapsadas con un porcentaje de estructura desordenada del 30%, como lo evidencia la micrografía SEM en la Figura 5 (sistema T5). Esta estructura desordenada es efectiva para generar agregación entre las partículas más pequeñas de CaCO_3 como se observa en la Figura 2, en donde los agregados esféricos obtenidos en el sistema T1 (180°C) están compuestos por partículas de CaCO_3 más grandes que las partículas que conforman los agregados del sistema T5 (220°C). Esto implica que las partículas de CaCO_3 dentro de las gotas de la suspensión tienen dinámicas distintas. En el caso del sistema T1, los agregados que se forman dentro de la gota se mueven hacia la superficie de la misma con una velocidad menor a los agregados que se forman en el sistema T5. Por lo tanto, las gotas del sistema T5 se deforman debido a los efectos inerciales generados por el movimiento rápido de los agregados de CaCO_3 [6].

Mecanismos de formación de agregados de CaCO_3 a través de secado por aspersión

Con base en los resultados de cambios en la microestructura de los agregados de CaCO_3 durante el proceso de secado por aspersión y las variaciones conformacionales en la estructura secundaria de la proteína láctea, se proponen los siguientes mecanismos de agregación.

Mecanismo dirigido por conformación tipo giro en proteína láctea

El material final obtenido bajo este mecanismo se compone por agregados de CaCO_3 con tamaños alrededor de $5\ \mu\text{m}$, siguiendo el mecanismo propuesto en la Figura 6. En este esquema se muestra el cambio en la conformación de una gota de suspensión de CaCO_3 durante el proceso de secado. En un primer paso se muestra la gota esférica en donde las partículas micrométricas de CaCO_3 se puentean debido a un aumento en la interacción proteína-proteína; esto es consecuencia de la presencia de conformación tipo giros en la proteína láctea. Este puenteo genera agregados de CaCO_3 que pueden migrar a la superficie de la gota a medida que esta se evapora, lo cual redundaría en una desestabilización de la gota debido a efectos inerciales, conllevando así al fraccionamiento de la misma y a la producción de agregados esféricos pequeños (ca. $5\ \mu\text{m}$).

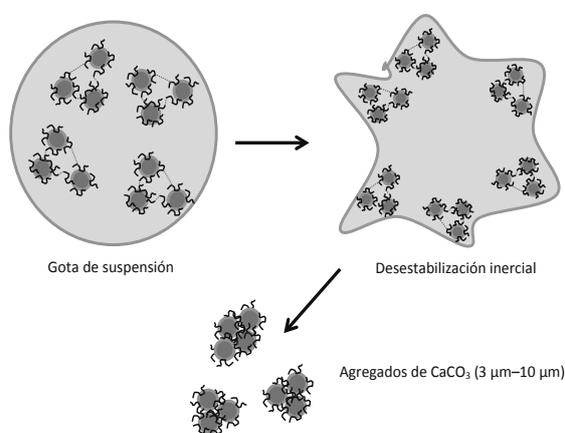


Figura 6. Esquema para la formación de agregados debidos a la presencia de giros en la proteína láctea

Mecanismo en ausencia de conformación tipo giros en la proteína láctea.

En este caso la formación de agregados de CaCO_3 ocurre de acuerdo al mecanismo planteado en la Figura 7. Al no existir conformación tipo giros en la estructura secundaria de la proteína láctea, se aumenta la posibilidad de interacción CaCO_3 -proteína. Por lo tanto, a medida que se evapora el agua las partículas de CaCO_3 se estabilizan efectivamente y se distribuyen homogéneamente dentro de la gota. Al observar en la Figura 5 el sistema secado a 200°C , se evidencia que la superficie de los agregados esféricos es homogénea. Esta superficie se compone principalmente por la fracción nanométrica del CaCO_3 , las cuales están embebidas en una red proteica que recubre el agregado final. Según lo reportado en la literatura, cuando se seca por aspersión una suspensión con dos poblaciones de partículas de tamaños diferentes, las partículas más pequeñas migran hacia la superficie de la gota a medida que esta se evapora [3]. Una variación a este mecanismo ocurre cuando se presenta conformación *desordenada* en la estructura secundaria de la proteína, experimentalmente se evidenció que en este caso los agregados de CaCO_3 colapsan formando partículas tipo toroidal y colapsadas. La conformación *desordenada* genera mayor interacción entre las partículas nanométricas de CaCO_3 , por lo que se presenta un aumento rápido de la concentración de CaCO_3 sobre la superficie de la gota de suspensión a medida que se evapora el agua. Este enriquecimiento rápido de la superficie redundó en un colapso del agregado llevando a la obtención de las morfologías tipo toroidal o colapsadas [3].

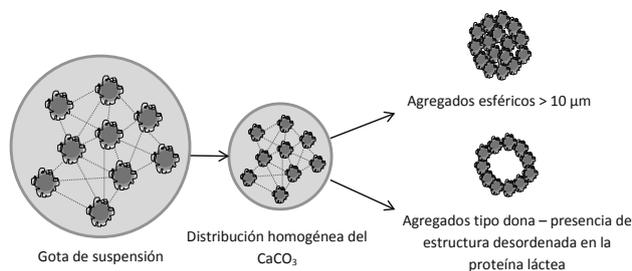


Figura 7. Esquema para la formación de agregados en ausencia de giros en la proteína láctea.

CONCLUSIONES

En este trabajo se mostró que la morfología de los agregados de CaCO_3 obtenidos a través de secado por aspersión es altamente dependiente de la temperatura de entrada del secador. Además, se encontró que a medida que se aumenta la T_{in} , se propicia la generación de agregados que exhiben una morfología tipo toroidal, en lugar de agregados esféricos, los cuales se forman a T_{in} bajos (i.e., 180°C). Los cambios en la T_{in} conllevaron a cambios conformacionales en la proteína láctea, los cuales se correlacionaron con la morfología final de los agregados de CaCO_3 . La presencia de conformación tipo *giro* generó poca agregación, y la ausencia de ésta generó agregados esféricos. Por otro lado, la presencia de conformación *desordenada* generó agregados con morfologías tipo toroidal. Estos mecanismos se derivan de resultados de FT-IR, SEM y distribuciones de tamaño de partícula. Sin embargo, otras técnicas instrumentales

como difracción de Rayos X a ángulos bajos, pueden complementar la evidencia experimental para corroborar los cambios conformacionales de la proteína láctea y el efecto de la superficie mineral sobre estas conformaciones [12]. También existe la posibilidad de medir la distribución de tamaños de partícula justo a la salida de la tobera de secado (medición *in-situ*), lo cual permitiría corroborar estados de aglomeración instantáneos de las partículas durante el proceso de secado, lo cual aportaría mayor evidencia a los procesos inerciales generados durante el rápido secado de las gotas asperjadas [6, 7]. Finalmente es posible obtener información respecto a la química superficial del material obtenido por medio de microscopía de fuerza atómica (AFM), lo cual indicaría la efectividad del proceso de adsorción de la proteína sobre la superficie sólida [13].

REFERENCIAS

1. Walton, D.E., *The morphology of spray-dried particles a qualitative view*. *Drying Technology*, 2000. **18**(9): p. 1943-1986.
2. Parikh, D.M., ed. *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*. 2010, Informa Healthcare: New York.
3. Nandiyanto, A.B.D. and K. Okuyama, *Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges*. *Advanced Powder Technology*, 2011. **22**(1): p. 1-19.
4. Zhang, X., et al., *Fabrication and photocatalytic activity of porous TiO_2 nanowire microspheres by surfactant-mediated spray drying process*. *Materials Research Bulletin*, 2009. **44**(5): p. 1070-1076.
5. Mauerer, A., *Secondary Structural Changes of Spray Dried Proteins with Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, in *Naturwissenschaftlichen Fakultäten*. 2006, Friedrich-Alexander Universität: Erlangen-Nürnberg.
6. Iskandar, F., L. Gradon, and K. Okuyama, *Control of the morphology of nanostructured particles prepared by the spray drying of a nanoparticle sol*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003. **265**(2): p. 296-303.
7. Iskandar, F., et al., *Functional Nanostructured Silica Powders Derived from Colloidal Suspensions by Sol Spraying*. *Journal of Nanoparticle Research*, 2001. **3**(4): p. 263-270.
8. Marcelino, A.M.C. and L.M. Gierasch, *Roles of β -turns in protein folding: From peptide models to protein engineering*. *Biopolymers*, 2008. **89**(5): p. 380-391.
9. Kumosinski, T.F., E.M. Brown, and H.M. Farrell Jr, *Three-Dimensional Molecular Modeling of Bovine Caseins: α s1-Casein*. *Journal of Dairy Science*, 1991. **74**(9): p. 2889-2895.
10. Farrell, H.M., Jr., et al., *Secondary Structural Studies of Bovine Caseins: Structure and Temperature Dependence of β -Casein Phosphopeptide (1-25) as Analyzed by Circular Dichroism, FTIR Spectroscopy, and Analytical Ultracentrifugation*. *Journal of Protein Chemistry*, 2002. **21**(5): p. 307-321.

-
11. Vogel, H.J., ed. *Calcium-Binding Protein Protocols: Reviews and Case Studies*. Vol. 1. 2002, Human Press: Totowa.
 12. Nakanishi, K., Sakiyama, T., & Imamura, K. *On the Adsorption of Proteins on Solid Surfaces , a Common but Very Complicated Phenomenon*. *Journal of Bioscience and Bioengineerin*, 2001. **91**(3): p 233–244.
 13. Kim, D. T., Blanch, H. W., & Radke, C. J. *Direct Imaging of Lysozyme Adsorption onto Mica by Atomic Force Microscopy*. *Langmuir*, 2002. (18): p 5841–5850.