

UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ingeniería

Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales

“Estudio de la Interacción de Albúmina de Suero Bovino y N-nitrosodietilamina en Interfases, mediante Análisis Axisimétrico de Gota”

Tesis

Para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN POLÍMEROS Y MATERIALES

Presenta:

1942

Josué Elías Juárez Onofre

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| LISTA DE FIGURAS | III |
| LISTA DE TABLAS | VI |
| RESUMEN | VII |
| 1.0.0 INTRODUCCION | 1 |
| 1.1.0 OBJETIVO GENERAL | 3 |
| 1.1.1 Objetivos particulares. | 3 |
| 2.0.0 ANTECEDENTES | 4 |
| 2.1.0 Tensión Superficial. | 4 |
| 2.1.1 Ecuación de Young-Laplace y Tensiómetro de Gota. | 6 |
| 2.1.2 Tensión interfacial de soluciones de proteína mediante el análisis axisimétrico de forma de gota (ADSA). | 11 |
| 2.2.0 Fluorescencia. | 13 |
| 2.2.1 Fluorescencia de Proteínas. | 21 |
| 2.2.2 Propiedades de fluorescencia de la albúmina de suero bovino BSA. | 24 |
| 2.3.0 Dicroísmo Circular (CD). | 26 |
| 2.3.1 CD de BSA y su interacción con otras moléculas. | 33 |
| 3.0.0 Desarrollo experimental. | 35 |
| 3.1.0 Tensiómetro de gota. | 35 |
| 3.1.1 Propiedades reológicas de dilatación interfacial. | 36 |
| 3.2.0 Fluorescencia. | 38 |
| 3.2.1 Quenching (apagamiento) de la fluorescencia. | 39 |
| 3.3.0 Dicroísmo circular. | 40 |
| 4.0.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 42 |
| 4.1.0 Presión dinámica de superficie. | 42 |
| 4.1.1 BSA en interfase aire-agua. | 42 |
| 4.1.2 Adsorción de BSA sobre una monocapa de DPPC en interfase cloroformo-agua. | 45 |
| 4.1.3 Extrapolación de γ contra $t^{-1/2}$. | 46 |
| 4.2.0 Propiedades reológicas de dilatación superficial de BSA y N-dea | |

| | |
|--|----|
| en interfase aire-agua y cloroformo-agua. | 51 |
| 4.2.1 Módulo elástico (G') y módulo viscoso (G''). | 51 |
| 4.3.0 Apagamiento (quenching) de la fluorescencia de BSA. | 55 |
| 4.4.0 Dicroísmo Circular. | 64 |
| 5.0.0 CONCLUSIONES | 70 |
| 6.0.0 BIBLIOGRAFÍA | 72 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | a) Película de jabón sobre un bastidor de alambre, con un brazo móvil, b) Burbuja de jabón | 5 |
| 2 | a) Sección de una superficie curva bajo condiciones de equilibrio mecánico, b) Descripción del perfil de una gota, donde X es la distancia a partir del eje de la gota, y Z la vertical | 7 |
| 3 | Representación esquemática del drop tensiometer I.T.Concept y sus principales componentes | 10 |
| 4 | Diagrama de Perrin-Jablonski, en los que se muestran el proceso de absorción y algunos mecanismos de desexcitación. | 17 |
| 5 | a) Transiciones de absorción y emisión de los estados electrónicos S_0 y S_1 , b) Cruce intersistemas de un estado electrónico singulete excitado a un triplete excitado. | 19 |
| 6 | Espectro de absorción de fenilalanina, tirosina y triptofano. | 23 |
| 7 | Componentes L y R, de la luz polarizada. Tanto las intensidades y las fases de los componentes circularmente polarizados son iguales. b) Si la componente circularmente polarizada a la derecha es menos intensa (es mas absorbida) que la componente circularmente polarizada a la izquierda, el vector del campo eléctrico del haz de luz sigue una trayectoria elíptica, tal como se muestra, que corresponde a una luz elípticamente polarizada. c) El eje semimayor y semimenor de la elipse de un triangulo y el ángulo opuesto del ángulo opuesto del eje semimenor es el ángulo θ , La elipticidad. El ángulo es proporcional al dicroísmo circular. El eje mayor de la elipse ha sido rotado a través de un ángulo α , que corresponde a la rotación | |

| | | |
|----|--|----|
| | óptica. | 29 |
| 8 | Espectros característicos de dicroísmo circular para arreglos de estructura secundaria en α -hélice, β -hoja y arreglos al azar. | 32 |
| 9 | Espectro de dicroísmo circular de BSA en solución acuosa | 34 |
| 10 | Mecanismo de adsorción para proteínas en una interfase fluido/fluido. (I) Adsorción inicial en una conformación parecida al estado nativo. (II) Después de la adsorción y envejecimiento de la interfase las proteínas se desdoblán y exponen sus grupos hidrofóbicos. (III) El desdoblamiento y agregación de las proteínas continúa, formándose una multicapa. | 43 |
| 11 | Cinética de adsorción de BSA y N-dea/BSA en interfase aire-agua, I periodo de inducción, II saturación de la interfase y III gelación interfacial. | 44 |
| 12 | a) Curvas de adsorción de DPPC y BSA sobre una monocapa de DPPC en interfase cloroformo agua, b) Curvas de adsorción de DPPC, BSA y N-dea/BSA sobre una monocapa de DPPC en interfase cloroformo agua. | 47 |
| 13 | a) Tensión superficial contra $t^{1/2}$ para BSA y diferentes relaciones N-dea/BSA, en interfase aire-agua, b) Tensión superficial contra $t^{1/2}$ para BSA y diferentes relaciones N-dea/BSA, sobre una monocapa de DPP en interfase cloroformo-agua | 49 |
| 14 | Grafica de G' y G'' contra frecuencia de oscilación, de BSA y N-dea/BSA (1500 y 12500) en interfase aire-agua. Los valores de G' y G'' corresponden a los valores obtenidos experimentalmente | 52 |
| 15 | Grafica de G' y G'' contra frecuencia, de BSA y N-dea/BSA (1500 y 12500), sobre una capa de DPPC, en interfase cloroformo agua. Los valores de G' y G'' son los resultados | |

| | | |
|----|---|----|
| | obtenidos experimentalmente. a) DPPC en presencia de N-dea, b) DPPC en presencia de BSA y N-dea/BSA. | 54 |
| 16 | Datos experimentales y ajuste teórico de G' y G'' de BSA y N-dea/BSA, sobre una capa de DPPC en interfase cloroformo-agua, a) Modulo elástico, b) Módulo viscoso. | 56 |
| 17 | Espectro de fluorescencia de BSA (2.5×10^{-7} M) a diferentes concentraciones de N-dea a 293.15 K. Apagamiento del espectro de fluorescencia de BSA (2.5×10^{-7}) en presencia de N-dea. La relación molar de N-dea a bsa corresponde a 0, 300, 600, 900, y 1500, en solución acuosa | 59 |
| 18 | Curva de Stern-Volmer de BSA (2.5×10^{-7} M) a 293 K, utilizando diferentes concentraciones de N-dea, 0, 7.5×10^{-5} , 1.5×10^{-4} , 2.25×10^{-4} y 3.75×10^{-4} M, utilizando una longitud de onda de excitación de 280 nm y una longitud de onda de emisión de 340 nm | 60 |
| 19 | $\ln K$ contra T^{-1} para los diferentes valores de K_{sv} a 296.15, 299.15, 305.15 y 311.15 K | 65 |
| 20 | Espectros de dicroísmo circular de BSA y complejo N-dea/BSA, 300, 600, 900, 1500, 2000, 6000, 12500 moléculas de N-dea por molécula de BSA. | 68 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|-------|--|--------|
| 1 | Tipos de luminiscencia según el modo de excitación. | 16 |
| 2 | Valores de la constante de apagamiento de Stern-Volmer, y parámetros fisicoquímicos, obtenidos a partir de la ecuación de van'Hoff. | 28 |
| 3 | Valores de γ_{∞} de BSA y N-dea/BSA en interfase aire-agua y sobre una monocapa de DPPC en interfase cloroformo agua | 52 |
| 4 | Valores de $G'+\Delta G'$ y $\Delta G''$ obtenidos a partir del modelo de Maxwell | 59 |
| 5 | Longitudes de onda máxima de emisión de BSA y a diferentes relaciones N-dea y a cuatro distintas temperaturas. | 62 |
| 6 | Constante de apagamiento de Stern-Volmer y parámetros termodinámicos relativos de N-dea-BSA en agua. | 65 |
| 7 | Contenido de los diferentes tipos de estructura secundaria, obtenidos por análisis de los datos experimentales por medio del software DICHROWEB. | 70 |

RESUMEN

La cinética de adsorción y propiedades reológicas interfaciales de albúmina de suero bovino (BSA 2.5×10^{-7} M) pura y acomplejada con N-nitrosodietilamina (N-dea), en interfase aire-agua y cloroformo-agua, se estudio utilizando la técnica de gota pendiente. El complejo N-dea/BSA a bajas concentraciones de N-dea muestra un mayor incremento de la presión superficial comparado con BSA, mientras que a altas concentraciones se observa un comportamiento contrario, en ambas interfases. En el comportamiento reológico de BSA en interfase aire-agua, se observó una mayor contribución del módulo elástico que el módulo viscoso, sobre el valor del módulo complejo. El quenching (apagamiento), de la fluorescencia de BSA por efecto de la concentración de N-dea, se analizó de acuerdo al modelo de Stern-Volmer, obteniendo diferentes constantes de apagamiento a diferentes temperaturas (293, 299, 305 y 311 K), y valores de ΔH^0 , ΔS^0 , ΔG^0 del acomplejamiento de N-dea y BSA. Los resultados obtenidos por dicroísmo circular muestran un incremento del contenido de α -hélice, de los complejos de N-dea/BSA, a bajas concentraciones del carcinógeno y posteriormente una pérdida de la estructura secundaria de la albúmina, cuando se aumenta la concentración de N-dea.

1.0.0 INTRODUCCIÓN

Las proteínas son macromoléculas biológicas, que generalmente se presentan en interfases de sistemas biológicos, como son las membranas celulares, las paredes de los vasos sanguíneos y las superficies de implantes. Estas moléculas juegan un papel importante en procesos biológicos tales como, la cicatrización, la formación de coágulos de sangre, la integración de biomateriales y la adhesión de microorganismos infecciosos. Se sabe que las propiedades de adsorción de las proteínas son determinantes en la formación y estabilización de interfases fluido/fluido, siendo esto relevante para sus aplicaciones en la industria médica y química y en tecnología de alimentos.¹⁻³

Existe un gran número de estudios de adsorción de proteínas, particularmente los llevados a cabo por mediciones de la tensión superficial, la mayoría de los cuales se han realizado en interfase agua/aire. Sin embargo, para una aplicación biológica y biotecnológica, es importante estudiar las propiedades de adsorción en interfases líquido/líquido y líquido/sólido.⁴

La proteína plasmática más abundante del sistema circulatorio es la albúmina (representa aproximadamente del 52 al 60 % de las proteínas plasmáticas), cuyas funciones son la regulación de la presión osmótica sanguínea y en el transporte y almacenaje de moléculas endógenas y exógenas (hormonas, iones, ácidos grasos, drogas). La acción de estas sustancias está regulada por su concentración en el plasma. A nivel industrial, la albúmina tiene un rol importante en la tecnología médica, de alimentos, fármacos y en el desarrollo de biosensores, esto debido a sus fuertes propiedades de adsorción.⁴⁻⁸

La albúmina es una proteína globular formada por una sola cadena polipeptídica. La estructura de esta proteína esta constituida por 582

residuos de aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 66,500 g/mol. Su estructura secundaria consta principalmente de hélices α (55 %), y además presenta 17 puentes disulfuro, los que le confieren una gran estabilidad.⁴⁻⁸

Las N-nitrosaminas (N-na) son un grupo químico conocido por más de 100 años. Investigaciones realizadas en 1958 demostraron que las N-na tienen un efecto hepatocarcinógeno en ratas, provocando un gran interés en el estudio estos de compuestos. Desde 1978 la agencia internacional para la investigación de cáncer, IARC (por sus siglas en ingles), catalogó a las N-na como un factor de riesgo para humanos. A la fecha se sabe que ciertos compuestos N-na son potentes carcinógenos, capaces de inducir tumores en animales, y que las principales fuentes de exposición para el humano son la dieta y el medio ambiente, así como la síntesis endógena de N-na. Dentro del grupo de compuestos N-na carcinógenos se pueden mencionar los siguientes: N-nitrosodimetilamina, N-dea, N-nitrosodibutilamina, N-nitrosodipepiridina y N-nitrosopirrolina.⁹⁻¹⁰ Los compuestos N-na pueden encontrarse en productos tales como el pescado, carne, aceite vegetal y queso, además, también pueden encontrarse como contaminantes en bebidas como agua y cerveza entre otras.⁹⁻¹⁴

Debido a que la albúmina es una proteína de transporte, puede interaccionar con distintas sustancias, lo que provoca cambios en su conformación. La interacciona con compuestos de bajo peso molecular, como por ejemplo, fármacos, drogas y carcinógenos, además, afecta las propiedades intrínsecas de la albúmina, como son la fluorescencia e hidrofocidad, así como sus estructuras secundaria y terciaria. Se espera que los cambios de conformación de la proteína, producidas por la interacción con N-dea se vean reflejados en algunas propiedades de adsorción sobre una interfase de dipalmitoilfosfatidil colina (DPPC) en interfases aire-agua y cloroformo-agua.⁵⁻¹¹

1.1.0 OBJETIVO GENERAL

“Determinar las propiedades de adsorción de la albúmina de suero bovino (BSA) y del complejo N-nitrosodietilamina/BSA (N-dea/BSA) en interfase aire-agua y cloroformo-agua”

1.1.1 Objetivos particulares

1. Determinar las propiedades de adsorción de BSA y del complejo N-dea/BSA por análisis axisimétrico de gota (tensiometría de gota pendiente), en interfases aire-agua y cloroformo-agua.
2. Determinar las características reológicas de BSA y del complejo N-dea/BSA en interfases aire-agua y cloroformo-agua, mediante tensiometría de gota.
3. Evaluar los cambios en las propiedades de fluorescencia de BSA por efecto de la concentración del carcinógeno por espectroscopia de fluorescencia.
4. Determinar los cambios de la estructura secundaria por dicroísmo circular, en la región del ultravioleta lejano.

2.0.0 ANTECEDENTES

2.1.0 Tensión superficial. Se define como la energía libre por unidad de área. Para tener un mejor entendimiento respecto a la tensión superficial a continuación se da un ejemplo para ilustrar este fenómeno. Si suponemos que se extiende una película de jabón sobre un bastidor de alambre, (Figura 1a), el cual posee un lado móvil. Experimentalmente se puede observar que existe una fuerza que actúa sobre la parte móvil en dirección opuesta a la flecha, como se muestra en el diagrama. Si el valor de esta fuerza por unidad de longitud se denota como γ , entonces el trabajo que se requiere para extender la parte movable a una distancia dx es:¹⁵

$$\text{Trabajo} = \gamma dx \quad (1)$$

que también puede escribirse como:

$$\text{trabajo} = \gamma dA \quad (2)$$

donde $dA = ldx$, en la segunda formula γ es la energía por unidad de área. Las unidades SI correspondientes para γ son, Joules por metro cuadrado (Jm^{-2}) o Newton por metro (Nm^{-1}).¹⁵ Un segundo ejemplo en el que se involucra una burbuja de jabón, explicando el fenómeno de tensión superficial, se da a continuación. En este ejemplo γ es un término por unidad de área. En ausencia de campos, tales como el campo gravitacional, una burbuja jabonosa es esférica, esta es la forma en la cual el área de superficie es mínima para un volumen, de mínima energía libre de superficie. Considerando una burbuja de jabón de radio r , como se ilustra en la (Figura 1b). Su energía libre total es $4\pi r^2 \gamma$, si el radio disminuye por dr , entonces el cambio de energía libre de superficie será $8\pi r \gamma dr$. Puesto que este encogimiento disminuye la energía superficial, el sistema queda balanceado mediante una diferencia de presión a través de la película ΔP , tal que el

a)



b)

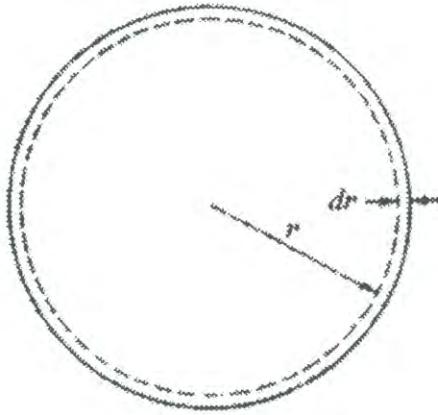


Figura 1. a) Película de jabón sobre un bastidor de alambre, con un brazo móvil, b) Burbuja de jabón. (Ref. 15)

trabajo realizado en contra de esta diferencia de presión $\Delta P 4\pi r^2 \gamma dr$ es iguala la disminución de la energía libre de superficie. Ahora:¹⁵

$$\Delta P 4\pi r^2 dr = 8\pi r \gamma dr \quad (3)$$

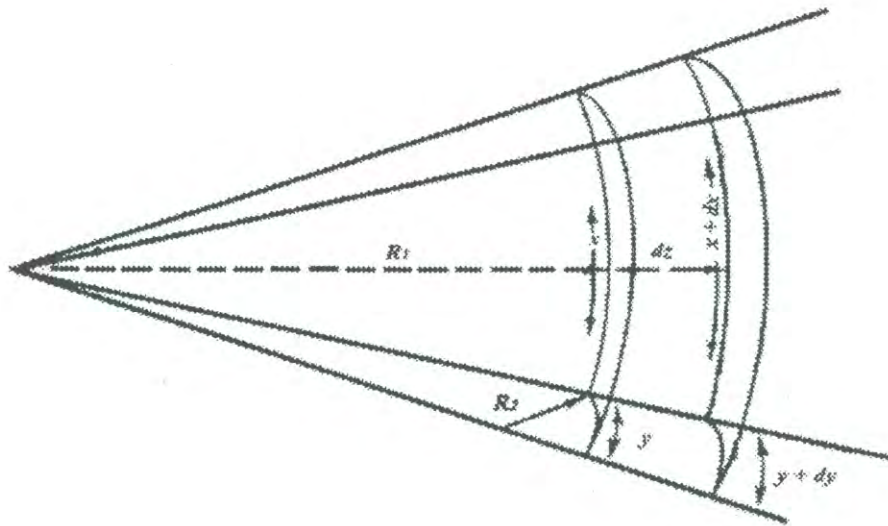
$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r} \quad (4)$$

La ecuación resultante expresa fundamentalmente que la presión en el interior de una burbuja pequeña es mayor que la del exterior.

2.1.1 Ecuación de Young-Laplace y Tensiómetro de Gota. Las gotas o burbujas que son pequeñas tienden a ser esféricas debido al efecto que ejerce la fuerza o tensión superficial, la cual es dependiente del área y disminuye en forma cuadrática, en una dimensión lineal, por otra parte, la distorsión debida al efecto gravitacional depende del volumen de la gota, disminuyendo en forma cúbica. Así pues, la forma real de la gota es el resultado del equilibrio que se origina entre la tensión interfacial y el efecto de gravedad. Mientras que por un lado, la tensión superficial le confiere una conformación esférica a la gota, por otra parte, el efecto de gravedad hace que esta se alargue, resultando una gota en forma de pera. Este efecto permite observar la influencia del cambio de la tensión superficial sobre la forma de la gota, conforme se lleva acabo la adsorción de moléculas en la interfase de dos fluidos.^{15, 16}

La ecuación (4) es una relación general y es una ecuación básica de capilaridad que fue descrita en 1805 por Young y Laplace. En forma general para describir una superficie curva es necesario mencionar dos radios de curvatura; los cuales son iguales para una esfera, pero no necesariamente para cualquier otra. Una pequeña sección de una superficie curva se muestra en la Figura 2. Los dos radios de curvatura R_1 y R_2 se indican en la figura, y tomando una sección suficientemente pequeña para que R_1 y R_2

a)



b)

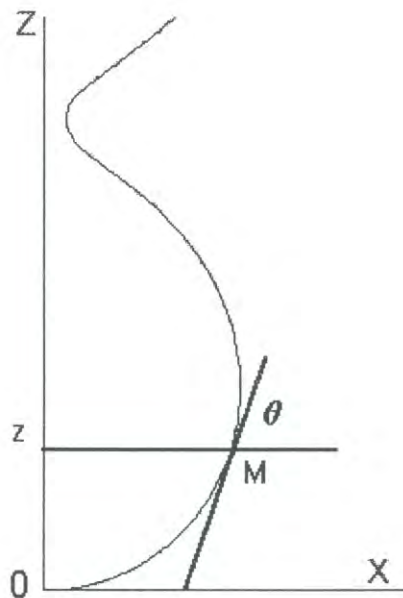


Figura 2. a) Sección de una superficie curva bajo condiciones de equilibrio mecánico, b) Descripción del perfil de una gota, donde X es la distancia a partir del eje de la gota, y Z la vertical. (Ref. 15 y 16)

permanezcan prácticamente constantes. Bajo este argumento, si la superficie se desplaza a una pequeña distancia, el cambio del área es:^{15, 16}

$$\Delta A = (x + dx)(y + dy) - xy = xdy + ydx \quad (5)$$

El trabajo que se realiza para obtener esta cantidad adicional de superficie entonces es:

$$trabajo = \gamma(xdy + ydx) \quad (6)$$

Entonces la diferencia de presión ΔP a través de la superficie; actúa sobre el área xy y a través de la distancia dz . El trabajo ahora corresponde a:

$$trabajo = \Delta Pxydz \quad (7)$$

Por comparación se obtiene que:

$$\frac{x + dx}{R_1 + dz} = \frac{x}{R_1} \quad \text{ó} \quad dx = \frac{xdz}{R_1} \quad (8)$$

y

$$\frac{y + dy}{R_2 + dz} = \frac{y}{R_2} \quad \text{ó} \quad dy = \frac{ydz}{R_2} \quad (9)$$

Si la superficie se encuentra en equilibrio, los dos términos de trabajo se igualan, sustituyendo en la ecuación las expresiones obtenidas para dx y dy , se obtiene:^{15, 16}

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (10)$$

La ecuación de Young-Laplace expresa la diferencia en presión (ΔP), entre la interfase de dos fluidos, en donde la presión de superficie es proporcional a la curvatura promedio, el coeficiente de proporcionalidad es la tensión superficial (γ), y R_1 y R_2 representan dos radios de curvatura del área superficial. Sobre el ápice de la gota ambos radios de curvatura son iguales, por lo tanto:^{15, 16}

$$\frac{1}{R_1} = \frac{1}{R_2} = \frac{1}{R_{\text{ápice}}} = b \quad (11)$$

El peso de la gota esta parcialmente compensado con la fuerza de empuje, y de acuerdo al principio de Arquímedes, para una gota de volumen V , la fuerza de gravedad puede escribirse de la siguiente manera:¹⁶

$$F = V(\rho_1 - \rho_2)g = V\Delta\rho g \quad (12)$$

en donde ρ_1 y ρ_2 son las densidades de los dos fluidos, respectivamente y g es la aceleración gravitacional.^{15, 16}

El sistema de coordenadas curvilínea que describen el perfil de la gota resulta del equilibrio entre la fuerza de gravedad y la tensión superficial, Figura 2b, en el equilibrio y para cualquier plano horizontal, se obtiene la siguiente ecuación:^{1, 15, 16}

$$2\pi r \gamma \sin\theta = V\Delta\rho g + \pi R_{\text{ápice}}^2 \Delta P \quad (13)$$

La Figura 3, muestra una representación del tensiómetro de gota (Drop tensiometer ITC tracker), en la que se pueden observar algunos de sus componentes básicos, como una microjeringa la cual esta unida a un capilar cilíndrico y sobre la punta de este capilar se forma la gota de la solución de DPPC. La gota esta inmersa en una celda la cual contiene la

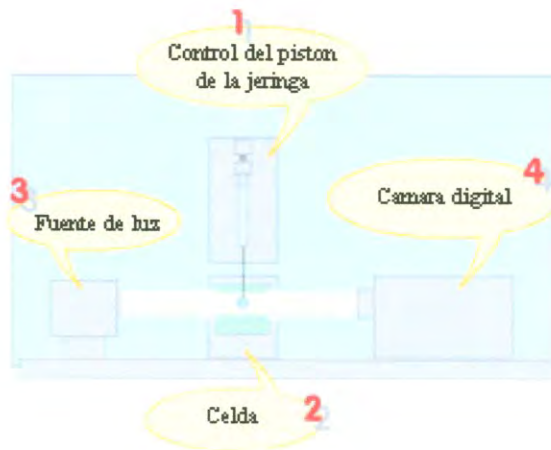


Figura 3. Representación esquemática del tensiometro de gota I.T. Concept y sus principales componentes.

(http://www.itconceptfr.com/Pageshtml/Tracker_Desc_VA.html).

solución de proteína o agua. La celda se coloca en una cámara, la cual puede estar conectada a un controlador de temperatura. El equipo tiene una fuente de luz la cual permite dar una iluminación homogénea y una videocámara CCD de alta velocidad que permite tomar las imágenes de la gota y que permite realizar un análisis digital.^{1, 15}

La tensión interfacial entre los dos fluidos se determina mediante el análisis digital de la forma de la gota de uno de los fluidos, la gota se forma en la punta del capilar de la jeringa y esta se encuentra sumergida dentro de la celda que contiene el segundo fluido.¹

El análisis axisimétrico de forma de gota, puede aplicarse al estudio en interfases de sistemas líquido-aire y líquido-líquido, y permite monitorear la dependencia de la tensión interfacial respecto al tiempo.

2.1.2 Tensión interfacial de soluciones de proteína mediante el análisis axisimétrico de forma de gota (ADSA). Debido a la naturaleza anfifílica de las proteínas, la cual está determinada por la composición de residuos de aminoácidos polares y no polares, la adsorción en interfase se favorece, originando una reorientación de la proteína, lo cual expone sus residuos a la fase hidrofóbica y los residuos hidrofílicos a la fase acuosa.¹ Durante la adsorción de proteínas en interfase existen cambios configuracionales, representando una pérdida en la estructura terciaria y cuaternaria, las cuales pueden ser reversibles o irreversibles. En solución, los cambios configuracionales y la inestabilidad física de las moléculas de proteína son el resultado de cambios en el ambiente, en los que se incluye el pH, fuerza iónica, temperatura, concentración de proteína y la adición de agentes químicos (urea, guanidina, sulfato de cobre^{17, 18} y en el presente estudio N-nitrosodietilamina). Las moléculas de estos compuestos se unen a las moléculas de proteínas, dando como resultado una pérdida en la estructura terciaria y cuaternaria. El pH afecta la ionización de los grupos carboxilo y amino de la proteína, afectándose así las interacciones intermoleculares y

por lo tanto el doblamiento de la proteína. La carga efectiva de la proteína depende de la fuerza iónica a través del apantallamiento de cargas, por lo que la fuerza iónica también afecta el plegamiento molecular. Los cambios en la energía térmica pueden originar cambios conformacionales, los cuales pueden ser reversibles e irreversibles, dependiendo de la temperatura, a altas temperaturas puede originarse un rompimiento de enlace, conduciendo a una desnaturalización irreversible.¹⁻⁴

El método de gota pendiente, ha sido utilizado por diversos grupos de investigación para estudiar la interacción polielectrolitos-surfactantes,¹⁹ estudiar el comportamiento reológico de las propiedades de una monocapa de fosfolípidos en interfase líquido-líquido,¹⁹ en isotermas de adsorción de proteínas,²⁰⁻²¹ tanto en interfases aire-líquido como líquido-líquido, y la actividad de superficie de distintas proteínas, por mencionar algunos ejemplos.

Las propiedades de adsorción de albúmina han sido ampliamente estudiadas, debido a sus aplicaciones en la bioquímica, industria de alimentos y medicina.^{1-4, 22-25} En 1995, M. A. Cabrerizo Vilchez y colaboradores,³ describieron la tensión superficial dependiente de la temperatura, de soluciones acuosas de albúmina, en una interfase decano-agua y observaron una disminución en la tensión superficial conforme aumenta la temperatura. En un estudio de cinética de adsorción de albúmina de suero humano (HSA) en interfase aire agua, realizado por F. Knut y R. Myrvold en 1995,^{26, 27} determinan las propiedades de adsorción de HSA a diferentes pH, encontrando que la adsorción de HSA, en la interfase aire-agua, se lleva a cabo mediante un mecanismo de adsorción irreversible por difusión. En otro estudio realizado en el año 2001,²⁸ por X. Wen y E. I. Franses, determinaron el proceso de adsorción de albúmina de suero bovino (BSA), en una interfase aire-agua y el efecto de adsorción en la interfase, cuando se mezcla BSA con dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), encontrando que el proceso de adsorción en la interfase está determinado principalmente

por BSA, ya que en los valores, la presión superficial en el equilibrio de BSA y BSA-DPPC no se observó diferencias significativas.

Recientemente, D. Güzey y colaboradores, en 2005,²⁹ determinaron las propiedades interfaciales y conformación estructural de BSA termosónica, y llegaron a la conclusión de que BSA tiene la capacidad de cambiar su conformación estructural sin afectar significativamente sus propiedades de adsorción.

2.2.0 Fluorescencia. La luminiscencia es la emisión de fotones ultravioleta, visible o infrarrojo de estados electrónicamente excitados. El término luminiscencia, del latín *luminescentz* (*lumen = luz*), fue introducido por el físico Eilhardt Wiedemann en 1888, para describir “todos los fenómenos de luz, que no solo están condicionados por un incremento de la temperatura”, contrarios a la incandescencia.³⁰⁻³² La luminiscencia es una luz fría, mientras que la incandescencia es una luz caliente.³⁰

La luminiscencia se divide en dos tipos, dependiendo de la naturaleza del estado basal y excitado. En un estado singulete excitado, la orientación del spin del electrón en el orbital de más alta energía, tiene una dirección opuesta al spin de un segundo electrón que se encuentra en el orbital de menor energía, por lo que se dice que estos electrones están apareados. En un estado triplete los electrones están desapareados, es decir, los electrones tienen la misma orientación. Para regresar al estado basal de un estado singulete excitado, no es necesario que el electrón cambie su orientación de spin, mientras que para un estado triplete, es necesario un cambio de la orientación de spin para regresar al estado singulete basal. Por lo tanto, la fluorescencia es la emisión de fotones que resulta del regreso de un electrón apareado de un orbital de mayor energía a un orbital de menor energía. Tales transiciones son cuánticamente permitidas y la tasa de emisión es de 10^8 s^{-1} . Esta tasa tan alta de emisión es el resultado del tiempo de vida media de la fluorescencia, el cual es aproximadamente 10^{-8} s o 10 ns . La

fosforescencia es la emisión que resulta de la transición entre estados de diferente multiplicidad, generalmente consiste en el regreso del estado triplete excitado al estado singulete basal, presentando una velocidad de emisión menor que en el caso de la fluorescencia. Los tiempos de vida media típicos para fosforescencia están en el rango de milisegundos o segundos, dependiendo principalmente de otros procesos de desactivación más que de los de emisión.³¹⁻³² La luminiscencia se clasifica en varios tipos, de acuerdo al modo de excitación, en la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos.³¹⁻³²

Las sustancias fluorescentes generalmente poseen electrones deslocalizados³¹ y pueden ser:

- Compuestos orgánicos: hidrocarburos aromáticos (naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno perileno, etc), fluoresceína, rodaminas, coumarinas, oxazinas, polienos, difenilpolienos, aminoácido (triptofano, tirosina, fenilalanina), etc.³⁰
- Compuestos inorgánicos: iones de uranio (UO_2^+), iones de lantánidos (Eu^{3+} , Tb^{3+}), vidrios dopados (con Nd, Mn, Ce, Sn, Cu, Ag), cristales (ZnS , CdS , ZnSe , CdSe , GaS , GaP , $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Cr}^{3+}$ (ruby)), etc.³⁰
- Compuestos organometálicos: Complejos de rutenio ($\text{Ru}(\text{biPy})_3$), complejos con iones de lantánidos, complejos con agentes quelantes fluorogénicos (8-hidroxi-quinolina, también llamada oxina).³⁰

La fluorescencia y fosforescencia son casos particulares de luminiscencia, y son el resultado de una subsecuente interacción con la luz, en donde el modo de excitación es la absorción de un fotón, que permite a las especies absorbentes llegar a un estado electrónico excitado. A la desexcitación acompañada por una emisión de fotones se le ha denominado como fotoluminiscencia (fluorescencia, fosforescencia o decaimiento de la fluorescencia), el cual es un efecto físico, siendo esta una manifestación de

TABLA 1 Tipos de luminiscencia según el modo de excitación.

| Fenómeno | Modo de excitación |
|----------------------|---|
| Fotoluminiscencia* | Absorción de luz (fotones) |
| Radioluminiscencia | Radiación de ionización (rayos-X, α, β, γ) |
| Catodoluminiscencia | Rayos catódicos (haz de electrones) |
| Electroluminiscencia | Campo eléctrico |
| Termoluminiscencia | Calentamiento |
| Quimiluminiscencia | Proceso químico (e.g. oxidación) |
| Bioluminiscencia | Proceso bioquímico |
| Triboluminiscencia | Fuerzas de fricción y electrostáticas |
| Sonoluminiscencia | Ultrasonido |

*fluorescencia, fosforescencia y decaimiento de la fluorescencia. (Ref. 30).

la interacción de la luz con la materia.³¹⁻³²

El fenómeno de la fluorescencia es muy común en los procesos biológicos. Tal como se mencionó anteriormente, el proceso de fluorescencia consiste en la absorción de luz de alta energía, y posteriormente una emisión de luz de menor energía, la cual está asociada con el movimiento de electrones, que regresan de un estado electrónico excitado al estado electrónico basal. La fluorescencia es una herramienta ampliamente utilizada para el estudio de diversos procesos biológicos debido a su alta sensibilidad.³⁰⁻³²

El diagrama de niveles de energía de Perrin-Jablonski (Figura 4), es muy útil para poder visualizar de una manera fácil los posibles procesos de: absorción del fotón, conversión interna, fluorescencia, cruce intersistemas, fosforescencia, decaimiento de la fluorescencia y transiciones triplete-triplete. El estado electrónico singulete está denotado por S_0 (es el estado electrónico fundamental), S_1 , S_2, \dots y los estados triplete T_1 , T_2, \dots . En donde diferentes niveles vibracionales están asociados con cada uno de los estados electrónicos. Es importante notar que el proceso de absorción es más rápida (10^{-15} s) comparada con el resto de los procesos.³⁰⁻³²

Las flechas verticales corresponden a la absorción que inicia desde el nivel de energía vibracional 0 (más bajo), S_0 , debido a que la mayoría de las moléculas se encuentran en este nivel de energía a temperatura ambiente. Durante la absorción de un fotón, pueden suceder varios procesos. Un fluoróforo es usualmente excitado a niveles vibracionales más altos S_1 , o S_2 . Con raras excepciones, las moléculas en fase condensada llevan un proceso de relajación rápido al nivel vibracional más bajo de S_1 . Este proceso es llamado conversión interna y generalmente ocurre en 10^{-12} s. Ya que los tiempos de vida de la emisión de fluorescencia son típicamente de 10^{-8} s, la conversión interna generalmente se completa antes de la emisión. Por lo tanto, la emisión de la fluorescencia generalmente resulta del equilibrio

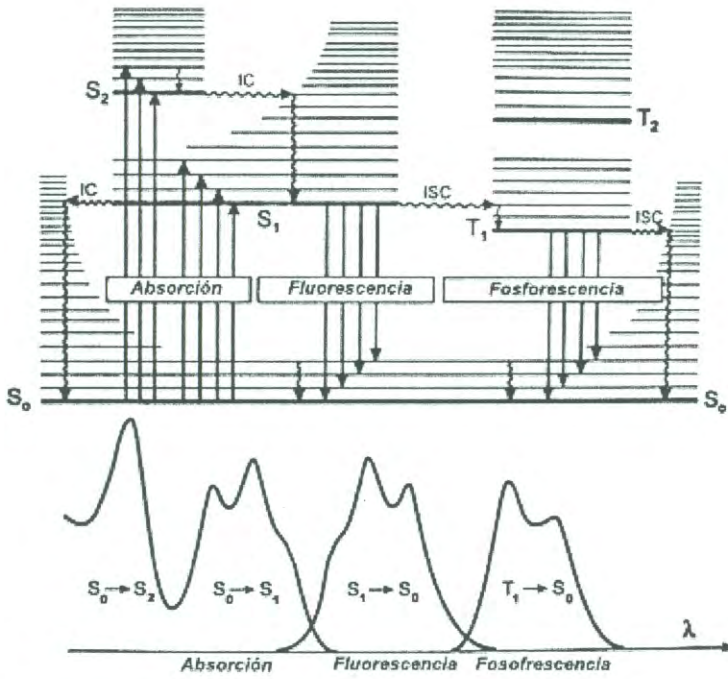


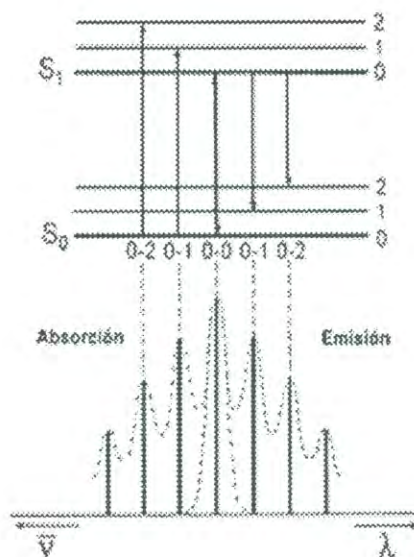
Figura 4. Diagrama de Perrin-Jablonski, en los que se muestran el proceso de absorción y algunos mecanismos de desexcitación. (Ref. 30)

térmico del estado excitado. A continuación se describirá brevemente los posibles procesos de desexcitación.³⁰⁻³¹

La conversión interna, es un proceso de transición no radiativo entre los estados electrónicos de la misma multiplicidad de spin. En solución, este proceso es seguido por una relajación vibración del estado electrónico final llegando a niveles de vibración más bajos. El exceso de energía vibracional se transfiere al solvente durante las colisiones que ocurren entre las moléculas excitadas con las moléculas del solvente que la rodean. Cuando una molécula es excitada a un nivel de energía mas alto que el nivel vibracional mas bajo del estado electrónico excitado, la relajación vibracional (si la conversión interna del estado singulete excitado es mas alto que S_1) lleva a las moléculas excitadas hacia niveles vibracionales 0 del estado singulete S_1 . De S_2 , la conversión interna a S_0 es posible pero es menos eficiente que la conversión de S_2 a S_1 , debido a que el gap de energía es mucho más grande entre S_2 y S_0 .³⁰

La emisión de fotones acompañada de una relajación $S_1 \rightarrow S_0$ se le ha llamado fluorescencia. Se puede decir, con algunas excepciones, que la emisión de fluorescencia ocurre de S_1 y por lo tanto sus características (excepto la polarización) no dependen de la longitud de onda de excitación. La transición 0-0 es usualmente la misma para la absorción y fluorescencia. Sin embargo, el espectro de fluorescencia esta localizado a longitudes de onda más grandes (menor energía) que los espectros de absorción debido a la perdida de energía durante el proceso de relajación vibracional que ocurre en el estado electrónico excitado (Figura 5a). De acuerdo a la regla de Stokes (observación empírica predicha por el diagrama de Perrin-Jablonski), la longitud de onda de la emisión de fluorescencia es mas grande que la longitud de onda de absorción. Sin embargo en muchos casos, el espectro de absorción se traslapa parcialmente con el espectro de fluorescencia. En general, las diferencias entre los niveles vibracionales son similares en los estados basales y estados excitados, por lo que el espectro de fluorescencia

a)



b)

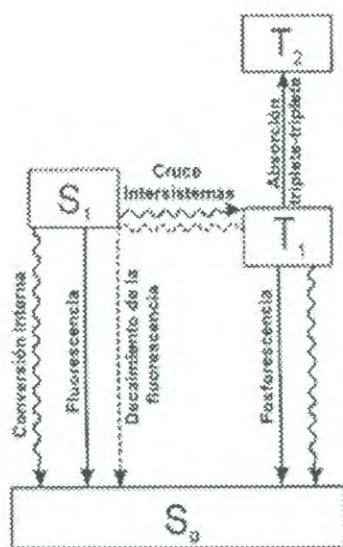


Figura 5. a) Transiciones de absorción y emisión de los estados electrónicos S_0 y S_1 , b) Cruce intersistemas de un estado electrónico singlete excitado a un triplete excitado. (Ref 30).

a veces se parece a la primer banda de absorción (regla de la imagen de espejo). El gap (expresado en número de onda), entre el máximo de la primera banda de absorción y el máximo de fluorescencia se le llama desplazamiento de Stokes.³⁰⁻³²

Un tercer proceso de desexcitación de S_1 es el cruce intersistemas hacia un estado triplete, T_1 seguido de otros procesos de desexcitación, Figura 5b. El cruce intersistemas es una transición no radiativa entre dos niveles vibracionales isoenergéticos asociados a los estados electrónicos de diferentes multiplicidades. Por ejemplo, una molécula excitada en el nivel vibracional 0 del estado S_1 puede moverse a un nivel vibracional isoenergético del estado triplete T_n ; entonces, por medio de otra relajación vibracional llega hasta el nivel vibracional T_1 de menor energía. El cruce intersistemas puede ser tan rápido (10^{-8} s), como para competir con otros mecanismos de desexcitación de S_1 (fluorescencia y conversión interna $S_1 \rightarrow S_0$). El cruzamiento entre estados de diferentes multiplicidades en principio es una transición prohibida, pero el acoplamiento spin-orbital (acoplamiento entre el momento magnético de orbital y el momento magnético de spin) puede ser tan grande para que se origine el cruce intersistemas. Esta posibilidad depende de los estados singulete y triplete involucrados. Si el tipo de transición $S_0 \rightarrow S_1$ es de $n \rightarrow \pi^*$ para este caso, el cruce intersistemas es eficiente. También se ha observado que la presencia de átomos pesados incrementan el acoplamiento spin-orbital favoreciendo el cruce intersistemas.³⁰⁻³¹

En solución a temperatura ambiente, la desexcitación no radiativa del estado triplete T_1 es predominante sobre la desexcitación radiativa, llamada fosforescencia. En realidad, la transición $T_1 \rightarrow S_0$ es una transición prohibida (pero puede ser observado por el acoplamiento spin-orbital), por lo que la constante de velocidad radiativa es muy lenta. Durante tales procesos el número de colisiones con las moléculas del solvente favorecen el cruce

intersistemas y relajación vibracional a S_0 . Por el contrario, a bajas temperaturas y/o en un medio semirígido, la fosforescencia puede observarse. El tiempo de vida del estado triplete, bajo ciertas condiciones, puede ser tan grande para observar la fosforescencia sobre una escala de tiempo que va de segundos a minutos o más. El espectro de fosforescencia está localizado a longitudes de onda más grandes que el espectro de fluorescencia debido a que la energía del nivel vibracional del estado triplete T_1 es más baja que el estado singulete S_1 .³⁰

El cruce intersistemas inverso $T_1 \rightarrow S_1$ puede ocurrir cuando la diferencia de energía entre los estados S_1 y T_1 es pequeña y cuando el tiempo de vida en T_1 es grande. Resultando una emisión con la misma distribución espectral como la fluorescencia normal pero con un tiempo de decaimiento de la fluorescencia mucho más grande debido a que las moléculas se encuentran en el estado triplete antes de la emisión de S_1 . Este tipo de fluorescencia es activado térmicamente; consecuentemente, su eficiencia se incrementa con el aumento de la temperatura.³⁰

En soluciones concentradas, una colisión entre dos moléculas en el estado T_1 puede generar energía para provocar el regreso al estado S_1 . Esta eliminación triplete-triplete también conduce al decaimiento de la emisión de la fluorescencia.³⁰

Por último si una molécula es excitada y alcanza un estado triplete T_1 , puede absorber otro fotón a diferente longitud de onda debido a que se da una transición triplete-triplete con la misma orientación de spin. Esta transición puede observarse cuando la población de moléculas en el estado triplete es muy grande.³⁰

2.2.1 Fluorescencia de Proteínas. Las proteínas son de gran interés para la biología, debido a su gran importancia y amplia distribución en sistemas vivos. Estas moléculas están formadas por aminoácidos, los cuales

absorben en el rango del ultravioleta cercano del espectro electromagnético,³¹ obteniéndose una gran cantidad y variedad de estudios en los que se reportan las propiedades de fluorescencia tanto de polipéptidos como de péptidos.

Las proteínas contienen tres aminoácidos los cuales contribuyen en sus propiedades fluorescentes: tirosina (try), triptofano (trp) y fenilalanina (phe). El espectro de absorción de estos aminoácidos se muestra en la Figura 6. La excitación de las proteínas fluorescentes, generalmente se realiza a la absorción máxima, a 280 nm, o a longitudes de onda mayores. Consecuentemente, en muchos casos experimentales, no se lleva a cabo la excitación de fenilalanina. Debido a que el rendimiento cuántico de la fenilalanina en proteínas es muy pequeño, la emisión de este aminoácido se observa raramente.³¹⁻³² La absorción de las proteínas a una longitud de onda de 280 nm es debido a residuos de tirosina y triptofano. Las proteínas que contienen tirosina pero no contienen triptófano, exhiben una emisión de fluorescencia de tirosina. Sin embargo, cuando esta presente el triptófano en una proteína, aún en pequeñas cantidades, la emisión de la fluorescencia está determinada por este aminoácido, por lo que se puede observar que en muchos casos, la fluorescencia de la proteína se debe exclusivamente al triptófano. Sin embargo, este fenómeno no ocurre en soluciones equimolares diluidas de estos aminoácidos, lo que sugiere que la estructura de la proteína es responsable de apagamiento de la fluorescencia o quenching de la fluorescencia de tirosina.³¹⁻³² Además se sabe que el espectro de emisión de las proteínas es sensible a los enlaces de sustratos dentro de la proteína, a las reacciones de asociación, y a la desnaturalización³¹⁻³² en donde se puede observar una disminución de la intensidad de fluorescencia y un desplazamiento de la longitud de onda máxima de emisión,³⁰⁻³² debido a que el espectro de emisión del triptofano es sensible a la polaridad del solvente.

El término quenching de la fluorescencia, hace referencia a cualquier proceso en el cual se observa una disminución de la intensidad de la

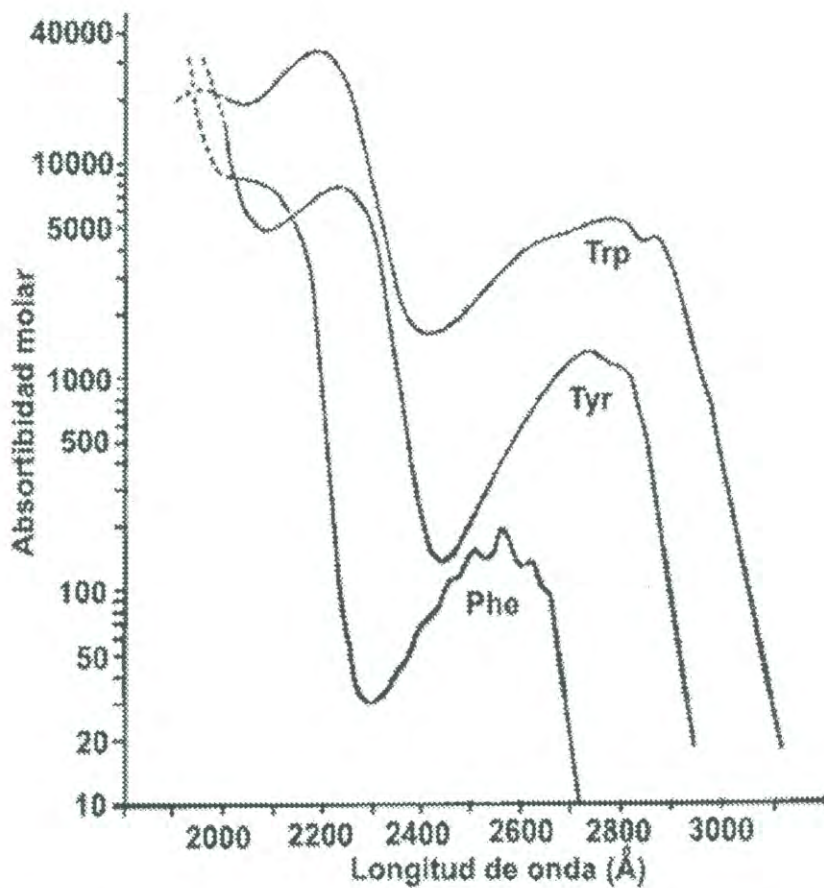


Figura 6. Espectro de absorción de fenilalanina, tirosina y triptofano. (Ref. 31)

fluorescencia de una sustancia dada. Dentro de estos procesos de apagamiento se incluyen estados excitados de reacción, transferencia de energía, formación de complejos y quenching dinámico o de colisión.³¹

El quenching de la fluorescencia ha sido ampliamente estudiado tanto desde un punto de vista fundamental, así como sus aplicaciones a problemas bioquímicos. Para que ocurra el fenómeno de apagamiento de fluorescencia se requiere un contacto molecular entre el fluoróforo y el quencher, permitiendo desarrollar numerosas aplicaciones del quenching, por ejemplo, las mediciones del apagamiento pueden revelar la accesibilidad del fluoróforo al quencher.³¹

2.2.2 Propiedades de fluorescencia de la albúmina de suero bovino

(BSA). La albúmina sérica es una de las proteínas más estudiadas, particularmente la variante bovina, la cual muestra una alta homología con la variante humana. La BSA, ya ha sido ampliamente caracterizada. La albúmina tiene tres dominios, y tiene predominantemente una estructura en hélice. Cuando se encuentra libre de lípido, tiene una forma triangular parecida a un corazón. Se sabe también que BSA posee 582 residuos de aminoácidos, dentro de los cuales, dos residuos de aminoácidos son de triptofano, los cuales están localizados en regiones altamente hidrofóbicas de la estructura de la proteína, y 21 residuos de aminoácido de tirosina, sin embargo y de acuerdo a lo descrito anteriormente, las propiedades de fluorescencia están determinadas por los residuos de triptofano.⁵

La fluorescencia es una herramienta de análisis altamente sensible para la determinación de interacciones, entre proteínas y otras moléculas de compuestos con un peso molecular relativamente alto, como son los fosfolípidos, fármacos, drogas, y hormonas, por mencionar algunos, así como la interacción con moléculas mas sencillas de menor peso molecular, como iones metálicos, urea, peróxido de hidrógeno, dicloroacetamina, entre otros.³¹

Recientemente varios grupos de investigadores^{5, 6 33-36} han realizado diversos estudios de la interacción de albúmina con algunos fármacos, drogas y compuestos fenólicos, mediante el estudio del quenching de la fluorescencia de la albúmina, utilizando el modelo de Stern-Volmer. La constante de apagamiento de Stern-Volmer permite determinar la interacción de la albúmina con diversos sustratos, además también, es posible determinar la afinidad de la interacción albúmina-quencher. Por lo que este tipo de estudios son de gran ayuda para tener un mejor entendimiento de los mecanismos de enlace o asociación de moléculas de bajo peso molecular con una proteína,⁴ por otra parte, los estudios de fluorescencia han permitido determinar constantes de asociación, número de sitios de enlaces y algunos parámetros termodinámicos, relacionados con la asociación del quencher y la proteína, como son el cambio de entalpía (ΔH^0), cambio de la entropía (ΔS^0) y cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG^0).³³⁻³⁷

Para calcular las constantes de apagamiento, generalmente se hace utilizando la ecuación de Stern-Volmer:³¹⁻³²

$$F_0 / F = 1 + K_{sv}[Q] \quad (14)$$

en donde, F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia de la molécula responsable de la disminución de la intensidad de la fluorescencia, a la cual se le denomina quencher, K_{sv} , es la constante de quenching de Stern-Volmer, y $[Q]$ la concentración del quencher.

Las fuerzas moleculares que intervienen en la interacción de las proteínas con sustratos de bajo peso molecular, pueden ser interacciones de van' der Waals, puentes de hidrogeno, interacciones iónicas, interacciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. Por lo que, la magnitud y signo de los parámetros termodinámicos en la reacción de la proteína, juegan un papel importante en la estabilidad de la proteína. Si el cambio de entalpía

(ΔH^0), para un rango de temperatura, no es significativo, es posible determinar el cambio de entropía (ΔS^0), mediante la ecuación van't Hoff: ³³⁻³⁷

$$\ln K_{SV} = -\Delta H^0 / RT + \Delta S^0 / R \quad (15)$$

en donde, K_{SV} es la constante de quenching de Stern-Volmer a la temperatura correspondiente, R es la constante de gases ideales. El cambio de entalpía se calcula a partir de la pendiente de la relación de van't Hoff, y finalmente el cambio de energía libre (ΔG^0), se determina a partir de la ecuación: ³³⁻³⁷

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (16)$$

En la Tabla 2, se muestran valores de las constantes de apagamiento K_{SV} , ΔH^0 , ΔS^0 y ΔG^0 , de la interacción de albúmina con distintos compuestos.

2.3.0 Dicroísmo Circular (CD). Cuando la luz polarizada pasa a través de una sustancia ópticamente activa, no solo la luz circularmente polarizada a la izquierda y derecha viajan a diferentes velocidades, $c_L \neq c_R$, lo que conduce a $\lambda_L \neq \lambda_R$, sino que también, estos dos haces de luz se absorben en diferentes proporciones; $\varepsilon_L \neq \varepsilon_R$. La diferencia $\Delta\varepsilon \equiv \varepsilon_L - \varepsilon_R$ se le llama dicroísmo circular (CD).³⁸⁻³⁹ Para describir el CD en una forma estándar y cuantitativa se hará referencia a la ley de Beer-Lambert-Bouguer. Si I_0 es la luz que incide sobre la celda, e I es la intensidad de luz después de pasar por la celda, la absorbancia $A = \log_{10} I_0/I = \varepsilon cl$; esto significa que la señal adquirida es proporcional a la concentración c y a la longitud de la celda l . Si c esta dada en moles por litro y l en centímetros, entonces a ε se le llama coeficiente de absorción molar o absortividad molar.³⁸

En un medio ópticamente activo se puede observar las absorciones de la luz circularmente polarizada a la izquierda y derecha, $A_L = \log_{10}(I_0/I)$ y

Tabla 2. Valores de la constante de apagamiento de Stern-Volmer, y parámetros fisicoquímicos, obtenidos a partir de la ecuación de van'Hoff.

| T (K) | $K_{sv} (10^4)$ | $\Delta H^0 (kJmol^{-1})$ | $\Delta G^0 (kJmol^{-1})$ | $\Delta S^0 (kJmol^{-1}K^{-1})$ | Compuesto |
|-------|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 298 | 2.339 | 15.0 | -24.9 | 134 | Monoamonio de Gliciricinato |
| 302 | 2.548 | | -25.5 | | |
| 306 | 2.779 | | 26.0 | | |
| 310 | 2.948 | | 26.5 | | |
| 296 | 3.722 | -25.312 | -27.396 | 7.04 | Cardamomo |
| 303 | 3.544 | | -27.466 | | |
| 313 | 3.182 | | 27.516 | | |
| 318 | 3.139 | | 27.551 | | |
| 297 | 1.116 | -85.96 | -21.36 | -217.4 | Flucitosina |
| 304 | 1.113 | | -19.67 | | |
| 311 | 1.009 | | -17.57 | | |
| 298 | 2.08 | -1.03 | -29.83 | 96.51 | PFLX (Mesilato de Plefoxacina) |
| 313 | 4.73 | | | | |
| 298 | 7.35 | -17.3 | -29.7 | 41.6 | PFLX-Cu |
| 313 | 7.2 | | | | |

(Ref. 33-37)

$A_R = \log_{10}(I_0/I)$. En principio las intensidades de I_{0L} e I_{0R} son iguales antes de interaccionar con el material absorbente, al final se realiza la diferencia de absorbancias:³⁸

$$\Delta A = A_L - A_R = \log_{10} \frac{I_0}{I_L} - \log_{10} \frac{I_0}{I_R} = \log_{10} \frac{I_R}{I_L} \quad (17)$$

$$\Delta \varepsilon = \frac{1}{cl} \Delta A$$

Se puede observar que en la ecuación 17 I_0 no aparece al término de la ecuación; por lo que no es necesario un haz de referencia.³⁸

El CD causa otro efecto llamado elipticidad. Como se mencionó anteriormente, la intensidad del haz de los componentes circularmente polarizados antes de pasar por la celda son $I_{0L} = I_{0R}$, pero cuando dejan la celda $I_{0L} \neq I_{0R}$ (Figura 7). Si se realiza la suma de vectores correspondiente para cada par de ángulos, entonces las manecillas describe una elipse: La luz polarizada, originalmente, se convierte en una luz elípticamente polarizada. La forma de esta elipse esta matemáticamente determinada por en ángulo $\theta = \arctan(b/a)$, y se le llama elipticidad.³⁸⁻³⁹

El CD es una técnica ampliamente utilizada para estudiar las diferentes conformaciones de péptidos y proteínas. Esta herramienta espectroscópica es muy sensible a los cambios conformacionales y estructurales de las proteínas. El estudio del doblamiento de las proteínas³⁴ surge como el principal problema en la biofísica molecular, por lo que CD es muchas veces utilizado para seguir las transiciones de doblamiento y desdoblamiento de las proteínas, principalmente en proteínas globulares. Por ejemplo, CD puede ser utilizado para detectar y caracterizar cualquier cambio estructural, el cual es producto de la sustitución de uno de los residuos de aminoácidos en la proteína, por medio de mutagénesis dirigida. Existen otras técnicas espectroscópicas utilizadas en el estudio de péptidos

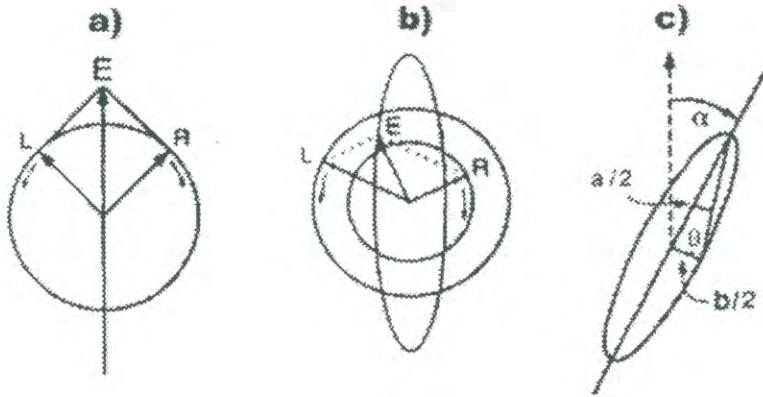


Figura 7. Componentes L y R, de la luz polarizada. Tanto las intensidades y las fases de los componentes circularmente polarizados son iguales. b) Si la componente circularmente polarizada a la derecha es menos intensa (es mas absorbida) que la componente circularmente polarizada a la izquierda, el vector del campo eléctrico del haz de luz sigue una trayectoria elíptica, tal como se muestra, que corresponde a una luz elípticamente polarizada. c) El eje semimayor y semimenor de la elipse de un triángulo y el ángulo opuesto del ángulo opuesto del eje semimenor es el ángulo θ , La elipticidad. El ángulo es proporcional al dicroísmo circular. El eje mayor de la elipse ha sido rotado a través de un ángulo α , que corresponde a la rotación óptica. (Ref. 34)

y proteínas en solución, las cuales proveen información complementaria a la obtenida por CD, incluyendo espectroscopia de infrarrojo, actividad óptica de Raman y CD vibracional, resonancia magnética nuclear y estudios de difracción de rayos-X.³⁸⁻³⁹

El espectro de CD de proteínas generalmente se divide en tres regiones: CD ultravioleta lejano (por debajo de 250 nm), CD de la región aromática del ultravioleta cercano (250-350 nm), y CD de la región ultravioleta cercano-visible (300-700nm), en donde diferentes tipos de cromóforos de las proteínas contribuyen en las diferentes regiones. Empíricamente, el análisis de CD de ultravioleta lejano, es dominado por el cromóforo amida, y proporciona información a nivel de estructura secundaria. En la región que abarca de 250-300 nm contribuyen los cromóforos laterales de las cadenas del polipéptido (grupos aromáticos laterales y enlaces disulfuros), y es sensible a la estructura terciaria de las proteínas. Las proteínas con grupos prostéticos, (heme proteínas, flavoproteínas, hierro-azufre proteínas) tienen bandas de CD cerca de 300 nm y refleja la conformación y ambiente de estos cromóforos.³⁸⁻³⁹

Las principales contribuciones en el CD ultravioleta lejano de proteínas, las realiza la columna de aminoácidos, en donde los grupos amidas que forman esta columna de la proteína, son los cromóforos responsables de este fenómeno. El CD ultravioleta lejano refleja la conformación de la secuencia de aminoácidos, y las diferentes estructuras secundarias de proteínas, dando como resultado espectros de CD ultravioleta lejano característicos para cada conformación.³⁸⁻³⁹

Los espectros de CD de polipéptidos modelos han proporcionado importantes datos experimentales para entender las propiedades ópticas de las proteínas. En donde las interacciones entre las cadenas laterales de aminoácidos participan en la estabilización de la conformación de un polipéptido. Así también, la conformación que adopta un polipéptido esta

influenciada por las condiciones del solvente (por ejemplo el trifluoroetanol promueve la formación de α -hélices). Estas características han sido utilizadas para construir polipéptidos modelos para la investigación de problemas específicos.³⁸

La α -hélice, fue inicialmente propuesta por Pauling y colaboradores, y es la estructura secundaria dominante en muchas de las proteínas, en promedio, se sabe que aproximadamente el 33% de la estructura secundaria en proteínas globulares, son α -hélices. La caracterización espectroscópica de la α -hélice ha sido facilitada por muchos homopolipéptidos que adoptan esta conformación, bajo condiciones apropiadas.³⁸

El espectro de CD de un polipéptido α -hélice está caracterizado y se muestra en la Figura 8. La banda negativa a 222 nm es debida a una transición $n\pi^*$ del péptido, mientras que la banda negativa a 208 nm y la banda positiva a 190 nm resulta de la transición $\pi\pi^*$.³⁴ La β -hoja dependen de la formación de puentes de hidrógeno intercadena, entre cadenas β -paralelas, así como, cadenas β -antiparalelas, y son mucho más flexibles que la α -hélice. Las variaciones en las β -hojas pueden presentarse a lo largo y ancho de la proteína, en proteínas globulares, este tipo de estructura se desvía sustancialmente de la estructura plana propuesta inicialmente. La solubilidad de polipéptidos en conformación β generalmente es limitada, especialmente en aquellos solventes con buena transmisión de luz ultravioleta. Por lo que la caracterización del CD, para polipéptidos con estructuras en β -hoja, Figura 8, ha sido mas difícil, en comparación con los polipéptidos que presentan una conformación en α -hélice.³⁸⁻³⁹

El CD de la conformación en β -hoja, se caracteriza por presentar una banda negativa a 216 nm y una banda positiva a 195 nm. Sin embargo, el CD de β -hojas muestran grandes variaciones con el solvente y la cadena lateral, debido a la variabilidad de la estructura β -hoja. La banda negativa a

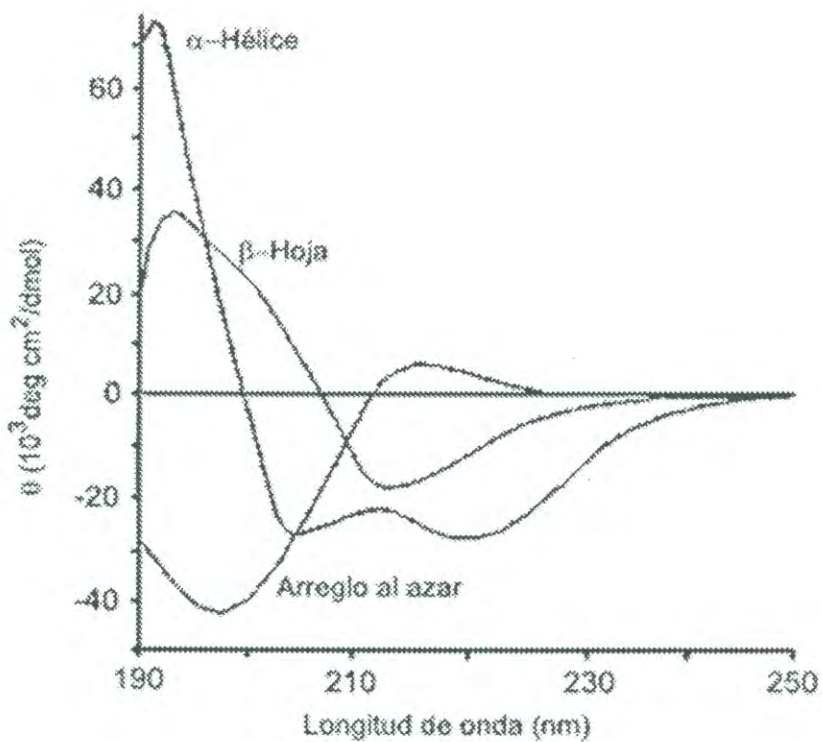


Figura 8. Espectros característicos de dicroísmo circular para arreglos de estructura secundaria en α -hélice, β -hoja y arreglos al azar. (Ref. http://sbio.uct.ac.za/Sbio/documentation/ProbingProteinStructurebySpectroscopy_files/l6i.gif)

216 nm se debe a una transición péptidica $n\pi^*$, y la banda positiva a 195 nm a una transición $\pi\pi^*$.³⁸

En proteínas globulares, a las regiones polipeptídicas que no tienen una conformación α -hélice, β -hoja o vuelta, se les denomina como regiones *desordenadas, otras, o arreglos al azar*. Polipéptidos con cadenas laterales ionizables, tales como poli(Lys) y poli(Glu) a pH neutro, comúnmente han sido utilizadas como modelos para determinar el porcentaje de regiones desordenadas en proteínas globulares. El espectro de CD de tales sistemas, Figura 8, se caracteriza por una banda negativa cerca de 200 nm. El espectro de CD en 200 nm, muestra variaciones considerables, en donde se observa una banda positiva cerca de 218 nm y una banda negativa a 220 nm.³⁸⁻³⁹

2.3.1 CD de BSA y su interacción con otras moléculas. En la Figura 9 se muestra el espectro de CD característico para BSA en solución acuosa. BSA es una proteína globular. La estructura secundaria de esta proteína consta principalmente de α -hélice (60%). Sin embargo, las proporciones de estructura secundaria están influenciadas por diversos factores tales como la temperatura, pH, fuerza iónica, procesos de sonicación y termosonicación, la interacción con lípidos, drogas, fármacos, agentes desnaturalizantes (como la urea y compuestos carcinogénicos), entre otros.^{10, 38-39}

La espectroscopia de dicroísmo circular es una herramienta útil y ampliamente utilizada para estudiar los cambios de conformación de diversas proteínas. Se ha observado que la interacción de BSA con diversas drogas y fármacos originan cambios conformacionales en la estructura de la proteína sin causar una pérdida total su conformación. Estos cambios conformacionales de BSA se han monitoreado bajo el análisis de CD.³³⁵⁻³⁷

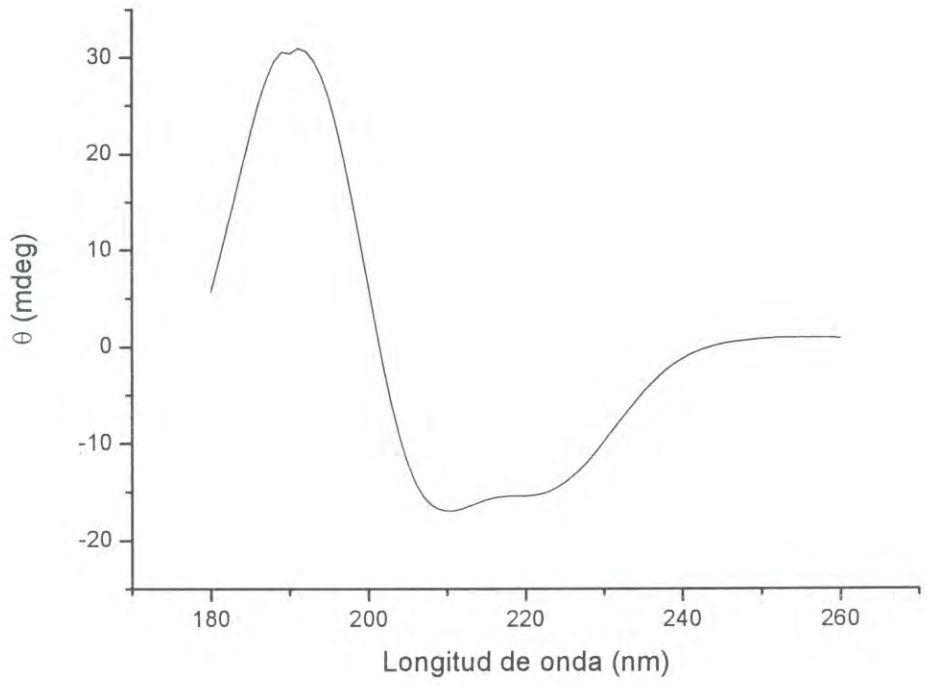


Figura 9. Espectro de dicroísmo circula de BSA en solución acuosa.

3.0.0 DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1.0 Tensiómetro de gota. La tensión interfacial, de soluciones de albúmina de suero bovino (BSA) y del complejo N-nitrosodietilamina/BSA (N-dea/BSA), en interfase aire-agua y DPPC-agua se determinó mediante tensiometría de gota pendiente. Para el estudio de tensión interfacial dinámica en interfase aire-agua, se hizo con una burbuja de aire formada sobre la punta de una aguja de acero inoxidable en forma de U, inmersa en una solución de BSA o N-dea/BSA. El mismo equipo se utilizó para medir la tensión interfacial y propiedades reológicas de la interfase.

Después de la formación de una burbuja de aire, sobre la punta de la aguja, la tensión interfacial fue seguida en el tiempo usando un análisis axisimétrico de la gota, el cual se realizó en un tensiómetro de gota pendiente (drop tensiometer I.T. Concept Tracker, Francia). Este equipo realiza los cálculos de la tensión interfacial entre la frontera de dos fluidos, en este trabajo se realizó sobre una interfase de aire/agua y cloroformo-agua. Los valores de la tensión superficial se obtienen a partir de la distorsión de la forma de la burbuja o gota debido al efecto de la gravedad. El análisis de los resultados experimentales se realizó con el software del equipo, Windrop.

Para las mediciones de tensión interfacial dinámica en interfase aire-agua se utilizó una solución de BSA de $2.5 \times 10^{-7} \text{ M}$. Los complejos de N-dea/BSA se hicieron de la siguiente manera. Se prepararon soluciones de BSA con una concentración de $2.5 \times 10^{-7} \text{ M}$, enseguida se le adicionó un volumen determinado de N-dea, en solución acuosa 0.015 M , para obtener una relación de N-dea/BSA por molécula que corresponde a 0, 300, 900, 1500, 2000, 6000 y 12500 moléculas de N-dea por molécula de BSA, la concentración final de N-dea en el complejo fue de 0, 7.5×10^{-5} , 2.25×10^{-4} y 3.75×10^{-4} , 5×10^{-4} , 1.625×10^{-3} y $3.125 \times 10^{-3} \text{ M}$, respectivamente.

El estudio de las propiedades reológicas se hizo utilizando las mismas soluciones de BSA y complejos N-dea/BSA. Al iniciar del experimento, se siguió la caída de la tensión superficial de BSA, por un periodo de tiempo de 1800 segundos, en la interfase aire-agua, posteriormente, se realizaron variaciones sinusoidales del área superficial de la gota a diferentes frecuencias 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.1, 0.05 y 0.033 s⁻¹. La variación sinusoidal se hizo mediante la inyección de 1 μL en el volumen de la gota. Para las oscilaciones con frecuencia de 1 s⁻¹ se realizó por un período de tiempo de 100 s, mientras que para el barrido de frecuencias de se utilizaron de 200 s, para la frecuencia de 0.05 se midió por 400 s y para 0.033 por un tiempo de 400 seg. El barrido de frecuencia se determinó para BSA y complejo N-dea/BSA. Los módulos elástico (G'), viscoso (G'') y viscoelástico (G) y la tensión superficial (γ), se analizaron por el software Windrop de la compañía I.T. Concept.

Para determinar γ , G , G' y G'' en la interfase DPPC/agua, DPPC/solución acuosa de BSA y del complejo DPPC/(N-dea/BSA). Se utilizó una solución de DPPC 1×10^{-5} M, usando como disolvente cloroformo grado reactivo. La tensión dinámica de adsorción de DPPC en la interfase cloroformo/agua, se siguió por un periodo de tiempo de 150 segundos. Así también, se estudió el efecto de N-dea, sobre la interfase de DPPC, cuando N-dea se encontraba en una solución acuosa, utilizando las mismas concentraciones del carcinógeno. Posteriormente se estudio la adsorción de BSA y N-dea/BSA en la interfase de DPPC, utilizando las mismas concentraciones de proteína y las misma relación en moléculas de carcinógeno por molécula de BSA.

3.1.1 Propiedades reológicas de dilatación interfacial. Estos son algunos factores que afectan la cinética de absorción de una proteína en una interfase dada la temperatura, pH y fuerza iónica de la solución; así como, la concentración, estructura, conformación y carga eléctrica de la proteína. Sin

embargo se ha reportado que el estudio la tensión superficial de equilibrio de albúmina no es suficiente para caracterizar las propiedades en la interfase proteína-aire, o proteína-fase orgánica, debido a que en diversas ocasiones no se observan variaciones significativas en la cinética de adsorción de la proteína. Es por ello, que es importante y se sugiere estudiar, para estos casos, un parámetro de interfase adicional, como las propiedades reológicas dilatacional de interfase.⁴⁰

Por simple observación visual de la nata proteica, formada por una exposición continua en una interfase aire-liquido ó liquido-liquido, es posible obtener información cuantitativa sobre las propiedades mecánicas de la interfase. Sin embargo, realizando mediciones de reología dinámica de la interfase, se puede estudiar el desarrollo del proceso de agregación proteica-gelación para establecer la elasticidad del agregado interfacial y para caracterizar su naturaleza viscoelástica.⁴⁰⁻⁴²

Esta técnica consiste en realizar perturbaciones sinusoidales por medio de las cuales se mide la respuesta de la tensión interfacial a diferentes variaciones armónicas (caracterizadas por un pulso ω) del área interfacial. Para una gota dada a la cual se aplica, por medio del Tracker, una frecuencia ω de oscilación en un periodo de tiempo t , se obtiene un valor para la tensión superficial $\gamma(t)$ y una área de la gota $A(t)$, que son utilizados para determinar el modulo complejo de elasticidad de la interfase $G(\omega)$ definido como:²⁰

$$G(\omega) = G'(\omega) + G''(\omega) \quad (18)$$

donde $G'(\omega)$ y $G''(\omega)$ corresponde a la parte real y parte imaginaria del modulo viscoelástico, respectivamente, y están relacionados con el cambio de $\gamma(t)$ y $A(t)$ en la interfase por $G = -A \frac{d\gamma}{dA}$ y el ángulo de fase entre la

compresión y expansión. Además la parte real y la parte imaginaria están relacionados con el módulo complejo por $G' = G \cos(\phi)$ y $G'' = G \sin(\phi)$. En donde la influencia de la parte imaginaria se ve reflejada en la diferencia de fase entre el esfuerzo $d\gamma$ y la deformación del área $dlnA$. Por lo tanto, si la diferencia de fase se aproxima a cero, se puede considerar la interfase como elástica, de lo contrario, la superficie mostrará un comportamiento viscoelástico.²⁰

Considerando las propiedades mecánicas de la interfase y siguiendo el modelo de Maxwell, el módulo de almacenamiento se escribe de la siguiente forma:²⁰

$$G'(\omega) = G'_0 + \Delta G' \frac{\omega^2 \tau^2}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (19)$$

y el módulo de pérdida:

$$G''(\omega) = \Delta G'' \omega \tau \frac{1}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (20)$$

en donde el valor de G'_0 se obtiene a partir de la gráfica G'_0 vs ω , extrapolando el módulo elástico (módulo de almacenamiento), cuando $\omega = 0$. Los valores $\Delta G'$ y $\Delta G''$ se ajustan correspondiendo a los datos experimentales. τ es el tiempo de relajación característico del modelo de Maxwell. Estos tres parámetros se obtuvieron graficando los valores experimentales con el programa Origin 7.0 y ajustando los parámetros dado en las ecuaciones.²⁰

3.2.0 Fluorescencia. Todos los espectros de fluorescencia se obtuvieron en un Espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS 50B. Los valores de la intensidad de fluorescencia se obtuvieron a 340 nm, utilizando una longitud

de onda de excitación de 280 nm. El estudio de fluorescencia de albúmina (BSA) y del complejo N-nitrosodietilamina/BSA (N-dea/BSA), se llevaron a cabo a diferentes temperaturas (293, 299, 305 y 310 K), en las cuales se determinó la constante que apagamiento (quenching) de Stern-Volmer para cada temperatura, utilizando una longitud de onda de emisión de fluorescencia de 340 nm, mediante la ecuación de Stern-Volmer.¹⁷⁻²¹ Si se considera que en este rango de temperatura el cambio de entalpía (ΔH^0), se mantiene prácticamente constante, entonces es posible determinar el cambio de entropía (ΔS^0), mediante la ecuación de van'Hoff,¹⁷⁻²¹ y posteriormente se determinó el cambio de energía libre (ΔG^0) de interacción del complejo BSA-N-dea.

Los espectros de emisión de la fluorescencia se obtuvieron utilizando una concentración de BSA de 2.5×10^{-7} M. Para el estudio del complejo N-dea/BSA se utilizaron las siguientes relaciones moleculares de N-dea/molécula de BSA: 0, 300, 600, 900 y 1500. Estas relaciones corresponden a una concentración final de N-dea de 0, 7.5×10^{-5} , 1.5×10^{-4} , 2.25×10^{-4} y 3.75×10^{-4} M. Las constantes de apagamiento de Stern-Volmer, se calcularon a las temperaturas antes mencionadas.

3.2.1 Quenching (apagamiento) de la fluorescencia. Apagamiento de la fluorescencia se refiere a cualquier proceso en el cual existe una disminución de la intensidad de la fluorescencia de una sustancia dada. Diversos procesos pueden provocar el quenching, entre los que se incluyen reacciones de los estados excitados, transferencia de energía, formación de complejos y apagamiento por colisión. En esta sección nos enfocamos al quenching que resulta de la colisión entre el fluoróforo y el quencher, denominado quenching dinámico.

El apagamiento dinámico de la fluorescencia está descrito por la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + \kappa_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (21)$$

en esta ecuación F_0 y F son las intensidades de la fluorescencia en ausencia y presencia del quencher, respectivamente, κ_q es la constante del quenching bimolecular, τ_0 es el tiempo de vida del fluoróforo en ausencia de del quencher, $[Q]$ es la concentración del quencher y $K_{SV} = \kappa_q \tau_0$ es la constante de apagamiento de Stern-Volmer. Los datos de quenching frecuentemente se presentan como una gráfica de $\frac{F_0}{F}$ contra $[Q]$, en la que se espera observar una dependencia lineal conforme aumenta la concentración del quencher. En la grafica F_0/F contra $[Q]$, el punto de intersección con el eje y es igual a uno mientras que la pendiente es igual a K_{SV} . Intuitivamente, K_{SV}^{-1} es la concentración del quencher en la cual $\frac{F_0}{F} = 2$ o el apagamiento de la intensidad de fluorescencia es del 50%. El comportamiento lineal de la grafica de Stern-Volmer generalmente indica una sola clase de floróforo y su accesibilidad al quencher es igual.

3.3.0 Dicroísmo circular. Los espectros de dicroísmo circular (CD) se obtuvieron en un espectrofotómetro JASCO J-810, a temperatura ambiente, utilizando una concentración de 0.1 mg/ml de BSA ($1.5 \times 10^{-6} M$), con una relación de 0, 300, 600, 900, 1500, 2000, 6000 y 12500 moléculas de N-dea por molécula de albúmina, estas relaciones corresponden a una concentración final de carcinógeno de 0, 7.5×10^{-5} , 2.25×10^{-4} , 3.75×10^{-4} , 5×10^{-4} , 1.625×10^{-3} y 3.125×10^{-3} $18.75 \times 10^{-3} M$. Los espectros se obtuvieron a partir del promedio de dos corridas utilizando un blanco de agua y soluciones de N-dea, con una concentración de carcinógeno de acuerdo a la relación de N-dea/BSA. La celda utilizada en este experimento tiene una longitud de 0.1 cm, y el espectro de CD se determinó en un rango de longitud de onda que abarca de 260 a 180 nm. Posteriormente se determinó el contenido de

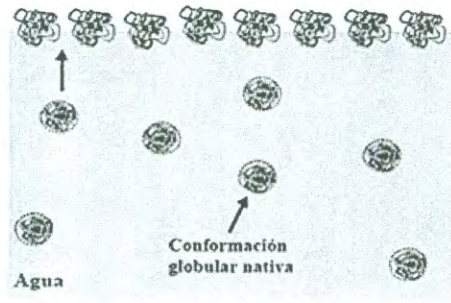
estructura secundaria residual en la proteína de BSA, utilizando un software disponible en red, DICHROWEB, (www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html).

4.0.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

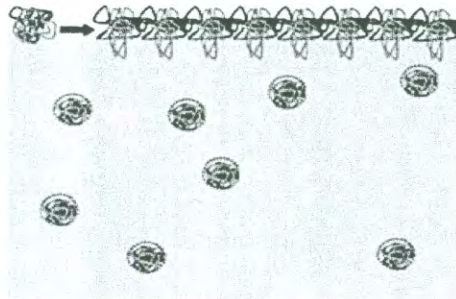
4.1.0 Presión dinámica de superficie.

4.1.1 BSA en interfase aire-agua. La cinética de adsorción para una proteína en una interfase fluido-fluido esta representado en la Figura 10 descrito por Freer et. al.³ y anteriormente descrito por Miller y colaboradores.³³ En el primer paso (I), al que se le denomina como inducción, la adsorción de la proteína en la interfase consiste en la movilización de moléculas de proteína de la fase bulto a una región denominada sub-interfase, la cual se encuentra adyacente a la interfase, Figura 10a antes de pasar de la sub-interfase a la interfase, se origina un pequeño rearrreglo configuracional de la proteína. Conforme pasa el tiempo, la concentración de proteínas en la interfase se incrementa, las proteínas adsorbidas sufren una reconfiguración lenta, como se ilustra en la Figura 10b, (paso II ó saturación de la monocapa). Aquí los residuos hidrofóbicos de la proteína se encuentran parcialmente expuestos hacia la fase aire (o fase hidrofóbica), además de originarse una interacción con otros residuos hidrofóbicos de moléculas de proteínas cercanas, desarrollándose una adsorción irreversible. La adsorción, de las moléculas de proteína, continúa y los cambios conformacionales ocurren tiempo después, dándose una agregación de moléculas interconectadas, formándose un gel interfacial, por lo tanto al paso III se conoce como gelación interfacial, originándose una piel interfacial. El mecanismo descrito en la Figura 10, es una explicación general del proceso de adsorción de proteínas globulares, sin embargo se debe considerar que la estructura de la interfase en este diagrama puede ser terminal o cinéticamente limitado dependiendo del tiempo del experimento.³⁴

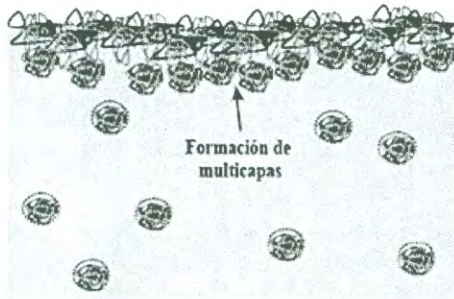
La cinética de adsorción de BSA y de los complejos N-dea/BSA (900, 1500, 2000, 6000 y 12500 moléculas de N-dea por molécula de BSA) en la interfase aire-agua se observa en la Figura 11, en una escala



I Inducción



II Saturación de la Interfase



III Gelación Interfacial

Figura 10. Mecanismo de adsorción para proteínas en una interfase fluido/fluido. (I) Adsorción inicial en una conformación parecida al estado nativo. (II) Después de la adsorción y envejecimiento de la interfase las proteínas se desdobl原因an y exponen sus grupos hidrofóbicos. (III) El desdoblamiento y agregación de las proteínas continúa, formándose una multicapa. (Ref. 38).

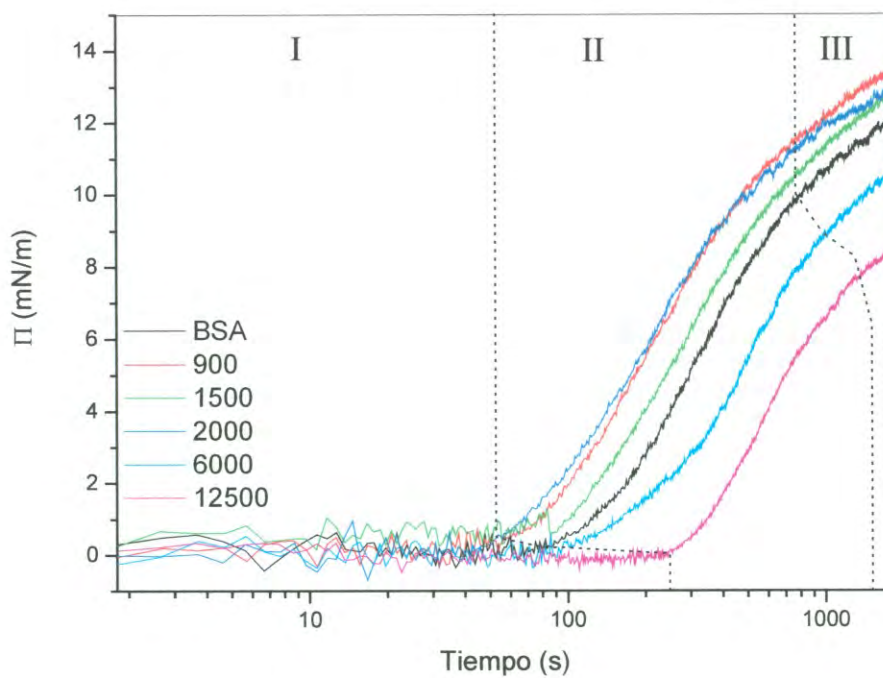


Figura 11. Cinética de adsorción de BSA y N-dea/BSA en interfase aire-agua, I periodo de inducción, II saturación de la interfase y III gelación interfacial.

semilogaritmica, en esta grafica se observan tres dominios de la caída de tensión superficial, separados por unas líneas punteadas, y corresponden al paso de inducción (I), saturación de la monocapa (II) y gelación interfacial (III). El tiempo de inducción de la albúmina es ligeramente mayor comparado con los complejos N-dea/BSA de 900, 1500 y 2000, Figura 11, en interfase aire-agua, lo que sugiere y de acuerdo a los resultados obtenidos por difracción circular (CD), que la estructura de BSA y de los complejos N-dea/BSA presentan cambios estructurales que permiten una adsorción más rápida, disminuyendo así el periodo de inducción mas corto, además de que la pendiente en la fase de saturación de la monocapa está mas pronunciada observándose también una mayor rapidez en la adsorción de BSA y sus complejos en la interfase aire-agua, comparada con la curva de adsorción de BSA. Por otra parte los complejos de 6000 y 12500, muestran un tiempo de inducción relativamente mayor comparado con BSA, obteniéndose una disminución en la adsorción de proteína en la interfase aire-agua, este comportamiento se debe a un cambio drástico de la estructura y conformación de la proteína según los resultados obtenidos por CD, cambios que no favorecen la adsorción de BSA en la interfase aire-agua.

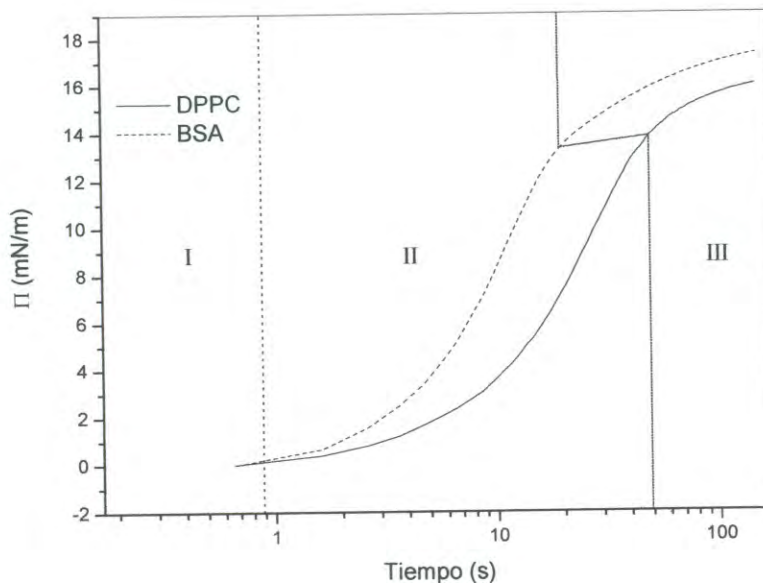
4.1.2 Adsorción de BSA sobre una monocapa de DPPC en interfase cloroformo-agua. La Figura 12a, es una gráfica semilogaritmica, que muestra la cinética de adsorción de DPPC en interfase cloroformo-agua. En esta gráfica se puede observar la cinética de adsorción de DPPC (1×10^{-5} M), en interfase cloroformo agua y BSA (2.5×10^{-7} M), sobre una monocapa de DPPC, en interfase cloroformo-agua. En estas curvas no se presenta el periodo de inducción, sin embargo, como la concentración de DPPC es relativamente baja, la caída de la tensión superficial al inicio del experimento es lenta, lo que con lleva a que se observe un aparente periodo de inducción muy corto. Por lo tanto la caída de la tensión interfacial se debe principalmente a la emigración de DPPC a la interfase cloroformo-agua, además en esta región (I), se puede observar el efecto de BSA sobre la

caída de la tensión superficial, provocando una pequeña diferencia en la rapidez de la adsorción y por lo tanto en el aumento de la presión superficial tanto en el inicio del experimento, como en la saturación de la monocapa. Por lo que se puede observar que la presión interfacial en presencia de albúmina es mayor, comparado con la presión interfacial de DPPC, sin BSA, en interfase cloroformo-agua.

La cinética de adsorción de BSA y de los complejos de N-dea/BSA (300, 900, 1500, 2000, 6000 y 12500 moléculas de N-dea por molécula de BSA) se presentan en la Figura 12b, se puede observar que la fase de inducción tampoco existe, sin embargo, la rapidez de adsorción en la interfase cloroformo-agua para los complejos 900-6000, es mayor comparado con la velocidad de adsorción de BSA y esto puede deberse a que los cambios que ocurren en la estructura de BSA originan una mayor interacción intermolecular (DPPC-BSA), permitiendo la emigración de moléculas de BSA de la sub-interfase a la interfase cloroformo-agua, cabe recordar que en la interfase cloroformo-agua, también se encuentran moléculas de DPPC y los cambios conformacionales en la estructura de BSA aparentemente favorecen las interacciones hidrofóbicas entre DPPC y BSA, provocando una mayor rapidez en el aumento de la presión superficial, I y II. Por otra parte para los complejos de 300 y 12500 N-dea/BSA el periodo de I, prácticamente no muestran diferencia. La pendiente en la región que corresponde a la saturación de la monocapa, II, no muestra una diferencia marcada, lo que sugiere que el tipo de interacciones intermoleculares (proteína-proteína, proteína-DPPC), son similares tanto en BSA como el de los complejos de N-dea/BSA. Por otra parte, la presión interfacial en III (gelación interfacial), es mayor para los complejos N-dea/BSA, sugiere, que la adsorción de BSA en la monocapa de DPPC se favorece con la adición de N-dea, en interfase cloroformo-agua.

4.1.3 Extrapolación de γ contra $t^{-1/2}$. Se ha sugerido que la extrapolación a cero de la gráfica de tensión interfacial contra $t^{-1/2}$ puede ser utilizada para

a)



b)

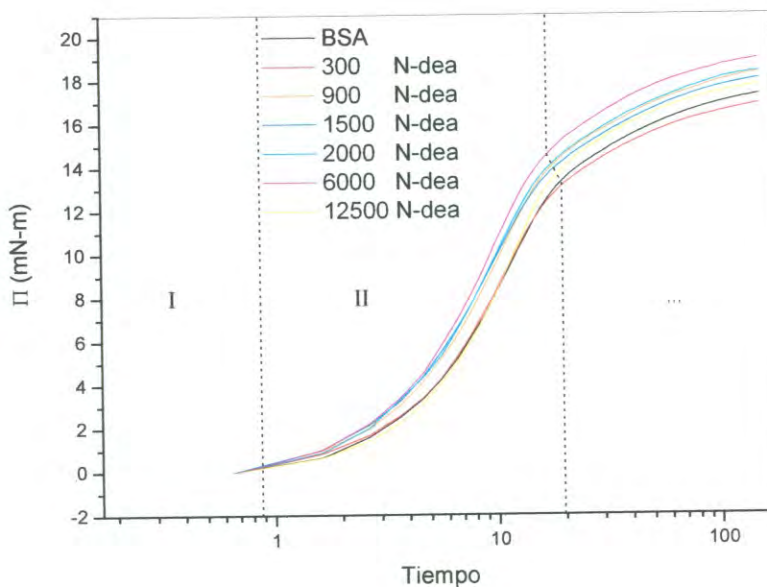
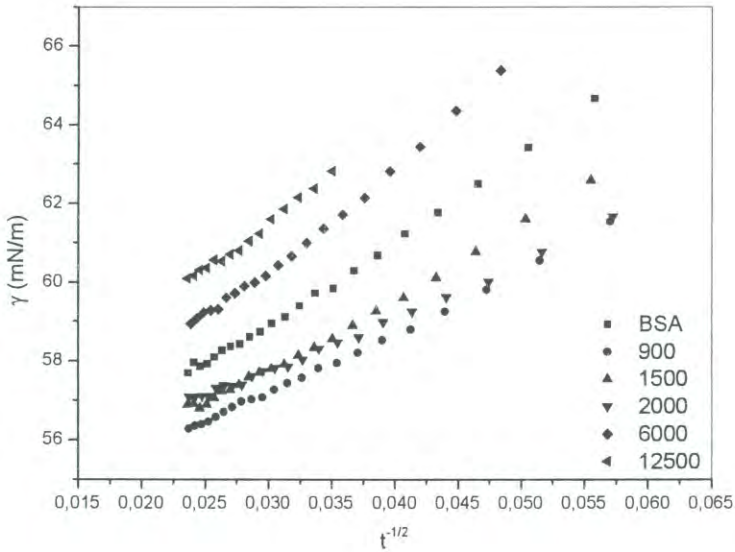


Figura 12. a) Curvas de adsorción de DPPC y BSA sobre una monocapa de DPPC en interfase cloroformo agua, b) Curvas de adsorción de DPPC, BSA y N-dea/BSA sobre una monocapa de DPPC en interfase cloroformo agua.

calcular el valor de γ^1 en el equilibrio y este análisis está basado en un mecanismo de transporte controlado de las moléculas de proteína de la fase bulto a la interfase, y ha quedado demostrado que esta extrapolación es una aproximación al valor de la tensión superficial muy cercana al equilibrio. La Figura 13a muestra la tensión superficial γ contra $t^{-1/2}$ para BSA (2.5×10^{-7} M) y diferentes complejos de N-dea/BSA en interfase aire-agua y sobre una monocapa de DPPC en interfase cloroformo-agua. Los datos experimentales de γ fueron graficados contra $t^{-1/2}$ y posteriormente se hizo una extrapolación a t_∞ . La extrapolación a cero (es decir cuando $t \rightarrow \infty$), proporciona una estimación de la tensión de interfase en equilibrio a γ_∞ . Estos resultados se muestran en la Tabla 3.

De la Figura 13a y de la Tabla 3 podemos observar que, el efecto de N-dea sobre las propiedades de adsorción de la BSA en interfase aire-agua y muestran pequeñas diferencias en la tensión superficial γ_∞ , conforme se aumenta la concentración del carcinógeno. A bajas concentraciones de N-dea (complejo 900-1500), el valor de γ_∞ son similares e incluso menor, para el complejo de 1500 N-dea/BSA, comparado con el valor de γ_∞ obtenido para BSA, lo que sugiere que la adsorción de BSA se favorece, muy probablemente, debido a los cambios estructurales que sufre la albúmina, cuando interacciona con N-dea, este resultado concuerda con investigaciones anteriores, en donde se estudia la adsorción de BSA por medio de la presión superficial.¹⁻³ A bajas concentraciones de N-dea existe una mayor adsorción del complejo comparado con BSA (Figura 13), sin embargo, para altas concentraciones del carcinógeno se observa una disminución en la adsorción de BSA. Estos resultados sugieren que los cambios conformacionales de BSA, que es el resultado directo de la interacción de N-dea con BSA, que a bajas concentraciones de N-dea incrementan la adsorción e interacción (atracción) entre las moléculas de proteína en la interfase aire agua, mientras que a altas concentraciones se presentan pequeñas repulsiones proteína-proteína. Por otra parte, la

a)



b)

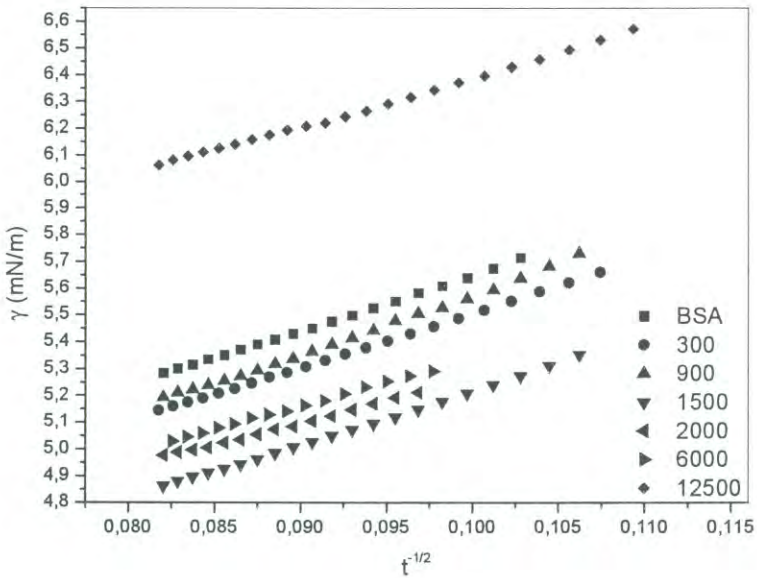


Figura 13. a) Tensión superficial contra $t^{-1/2}$ para BSA y diferentes relaciones N-dea/BSA, en interfase aire-agua, b) Tensión superficial contra $t^{-1/2}$ para BSA y diferentes relaciones N-dea/BSA, sobre una monocapa de DPP en interfase cloroformo-agua.

Tabla 3. Valores de γ_{∞} de BSA y N-dea/BSA en interfase aire-agua y sobre una monocapa de DPPC en interfase cloroformo agua

| Complejo | Tensión interfacial γ_{∞} (mN/m) | Interfase |
|----------|---|-----------------|
| 0 | 52.61 | Aire-agua |
| 900 | 52.62 | |
| 1500 | 52.44 | |
| 2000 | 53.73 | |
| 6000 | 52.72 | |
| 12500 | 54.48 | |
| 0 | 3.61 | Cloroformo-agua |
| 900 | 3.38 | |
| 1500 | 3.22 | |
| 2000 | 3.64 | |
| 6000 | 3.57 | |
| 12500 | 4.49 | |

Ris. T-981

adsorción de BSA sobre una capa de DPPC en interfase cloroformo-agua origina una disminución en γ_{∞} , y esto se debe a que BSA penetra dentro de la capa de DPPC, y aparentemente la penetración de N-dea/BSA en la capa de DPPC se debe una vez más a los cambios estructurales que se originan en la proteína por el aumento de la concentración de N-dea, favoreciendo la adsorción de BSA en la monocapa de DPPC en la interfase cloroformo-agua.

4.2.0 Propiedades reológicas de dilatación superficial de BSA y N-dea en interfase aire-agua y cloroformo-agua.

4.2.1 Módulo elástico (G') y módulo viscoso (G''). Los resultados experimentales obtenidos, del modulo elástico, G', muestran una mayor contribución al módulo complejo, G (modulo viscoelástico), comparado con la contribución del modulo viscoso, G'', (Figura 14). La figura 14a, muestra el comportamiento de G' y G'' contra frecuencia de BSA y N-dea/BSA (1500 y 12500) en interfase aire-agua. Se puede observar que para BSA y el complejo 1500, G' y G'' aumentan gradualmente conforme se aumenta la frecuencia de oscilación, observándose un comportamiento contrario para el complejo de 12500, y esto puede deberse a que la estructura conformacional de BSA para el complejo de 1500 es semejante a la conformación que presenta BSA, mientras que el complejo de 12500, presenta una desnaturalización casi completa de la proteína, (de acuerdo a los resultados obtenidos por dicroísmo circular), por lo que, la interfase de BSA es mas elástica comparada con la del complejo de 1500 y 12500, en interfase aire-agua. Además, es importante mencionar que los cálculos obtenidos de los módulos G' y G'' se obtuvieron al final de la fase de saturación de la interfase y en parte inicial de la fase de gelación interfacial, fases en las cuales aun existen rearrreglos en la conformación de la proteína, así como interacciones entre proteínas (formación de redes proteicas), por lo tanto la estructura de BSA juega un papel importante en ambos procesos y por consiguiente en los módulos G' y G'', durante el proceso de adsorción de BSA en interfase aire-agua.

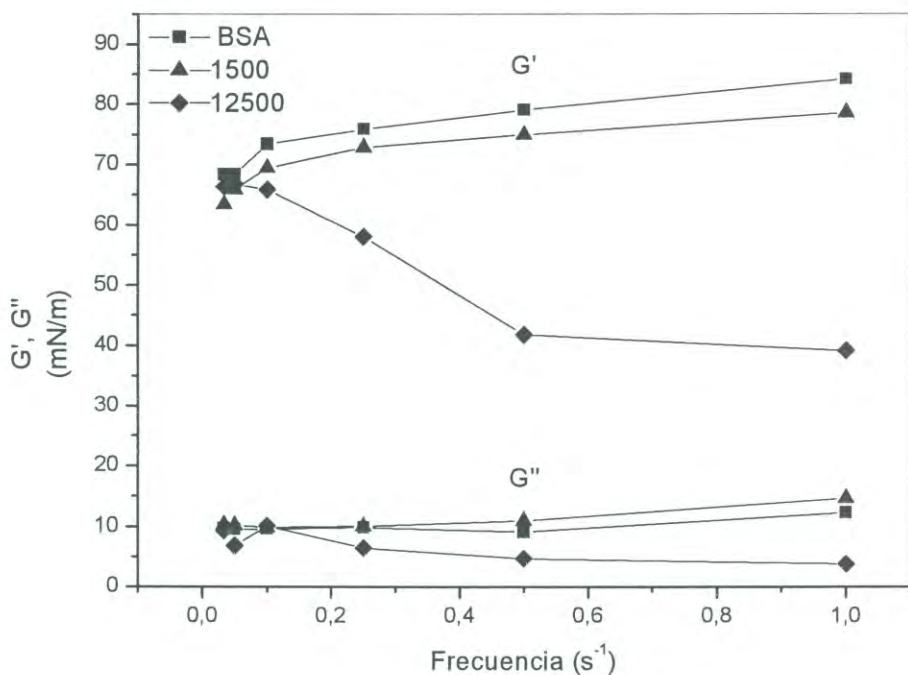
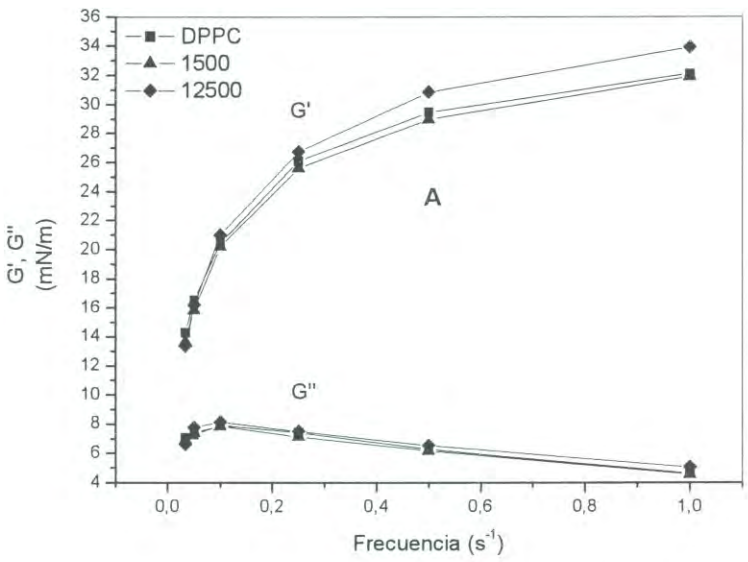


Figura 14. Grafica de G' y G'' contra frecuencia de oscilación, de BSA y N-dea/BSA (1500 y 12500) en interfase aire-agua. Los valores de G' y G'' corresponden a los valores obtenidos experimentalmente.

En la Figura 15 se muestra la grafica de G' y G'' contra frecuencia de DPPC (1×10^{-5} M), en interfase cloroformo agua y DPPC en presencia de N-dea 3.75×10^{-4} y 3.125×10^{-3} M, (complejo 1500 y 12500). Se observa un incremento del módulo elástico y una disminución del módulo viscoso de la interfase, conforme se incrementa la frecuencia de oscilación. Sin embargo cuando se compara el efecto de la concentración de N-dea sobre las propiedades reológicas de la interfase (G' y G''), se observa que a bajas frecuencias ($0.0033-0.25 \text{ s}^{-1}$), no existe una diferencia significativa tanto en G' como en G'' , excepto para G' a 3.125×10^{-3} M de N-dea a frecuencias de 0.5 y 1 s^{-1} . En cambio, si se comparan los valores obtenidos para G' y G'' en ausencia y presencia de BSA y complejos, en la Figura 15 se puede ver que la monocapa de DPPC en ausencia de BSA es mas elástica, y esto puede deberse a que las moléculas de DPPC en la interfase cloroformo-agua se encuentran altamente ordenadas, presentando una mayor resistencia a la deformación; por otra parte, la disminución en los módulos de G' y G'' de DPPC en presencia de BSA, pueden indicar que BSA penetra en la capa de DPPC, originado con esto un desorden en el acomodo de las moléculas de DPPC en la interfase, haciéndola mas susceptible a una deformación, es decir, menos elástica. La adsorción de BSA y N-dea/BSA, sobre DPPC en interfase cloroformo-agua, origina un incremento en G' , parecido al observado en DPPC en ausenta de proteína, en la que si se aumenta la frecuencia de oscilación G' aumenta. Por otra parte, G'' aumenta ligeramente a frecuencias de $0.005-0.25 \text{ s}^{-1}$ y después disminuye. El módulo elástico que presenta el complejo N-dea/BSA 12500, que es mayor comparado con el de 1500 y BSA en interfase cloroformo-agua, se debe principalmente a los cambios conformacionales que sufre BSA, por efecto de la interacción con N-dea, los cuales posiblemente permiten una mayor interacción intermolecular (proteína-proteína), conduciendo a una interfase más rígida, sobre DPPC en interfase cloroformo-agua, aunque posiblemente las moléculas de N-dea influyen levemente en G' .

Los valores experimentales de G' y G'' contra frecuencia de oscilación

a)



b)

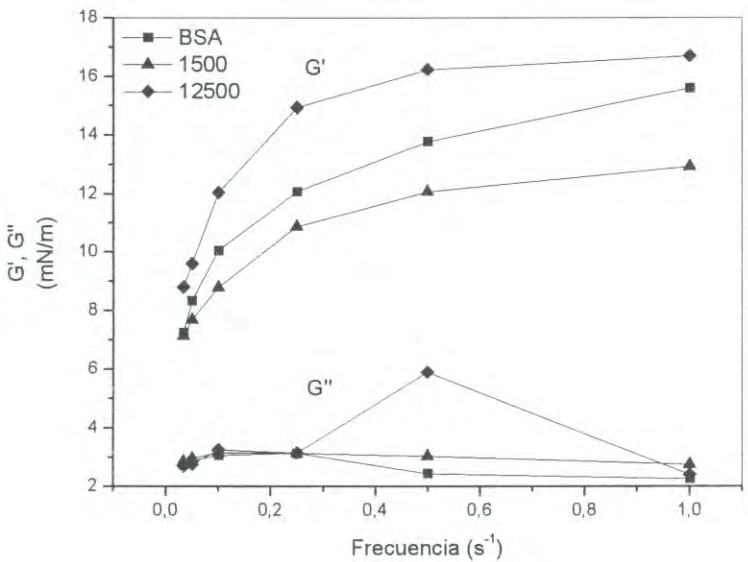


Figura 15. Grafica de G' y G'' contra frecuencia, de BSA y N-dea/BSA (1500 y 12500), sobre una capa de DPPC, en interfase cloroformo agua. Los valores de G' y G'' son los resultados obtenidos experimentalmente. A) DPPC en presencia de N-dea, B) DPPC en presencia de BSA y N-dea/BSA.

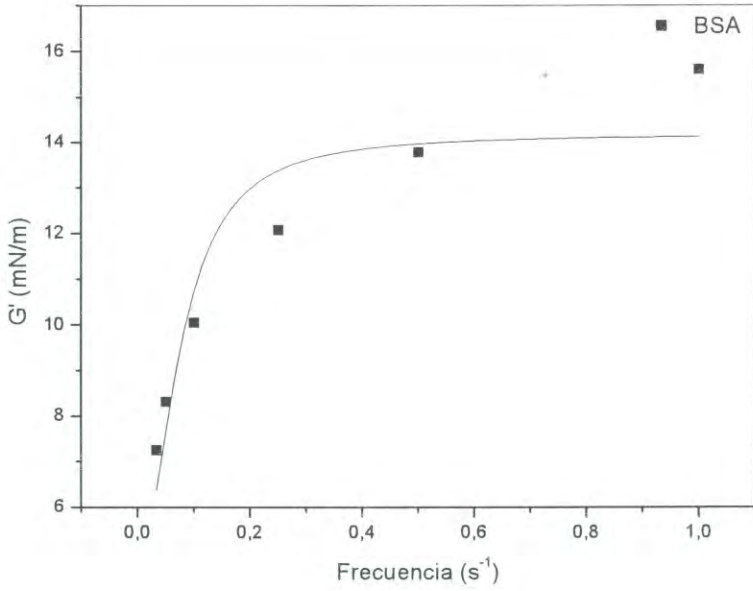
de BSA en interfase cloroformo-agua, en que previamente se había disuelto DPPC en la fase de cloroformo, se muestran en la Figura 16, en donde las líneas sólidas representa la aproximación teórica del modelo de Maxwell. Se puede observar una buena correlación entre los puntos experimentales y su aproximación teórica en toda la gráfica. Esta figura es una representación general de los datos experimentales obtenidos en los estudios realizados de BSA y sus respectivos complejos en interfase aire-agua y cloroformo-agua. También, se observa que el modelo de Maxwell, se ajusta mejor a los datos experimentales de G''/ω que para el módulo elástico.

En la siguiente Tabla 4 se resume el comportamiento de G'_0 , $\Delta G'$ y $\Delta G''$ para BSA y N-dea/BSA en interfase aire-agua, y sobre DPPC en interfase cloroformo-agua, obtenidos por el modelo de Maxwell. Como se mencionó anteriormente, se puede observar que la principal contribución al módulo viscoelástico (G), la realiza el módulo elástico ($G'_0 + \Delta G'$) de la interfase, en los diferentes experimentos. Además, también se puede observar que los valores obtenidos de $G'_0 + \Delta G'$ en la interfase cloroformo agua, de DPPC en presencia y de BSA y N-dea es menor que $G'_0 + \Delta G'$ en ausencia de la proteína ó de sus complejos, lo que confirma una vez mas que tanto BSA como N-dea penetra dentro de la capa de DPPC, aumentando la flexibilidad de la interfase.

4.3.0 Apagamiento (quenching) de la fluorescencia de BSA. Las propiedades de fluorescencia de los residuos de triptofano, presentes en la albúmina, fueron determinadas, en presencia N-nitrosodietilamina, como quencher, en solución acuosa. El espectro del apagamiento de la fluorescencia, se muestran en la Figura 17, observándose el quenching conforme se aumenta la concentración de N-dea, a una concentración fija de BSA (2.5×10^{-7} M).

Los valores de fluorescencia obtenidos a 340 nm se graficaron de acuerdo al

a)



b)

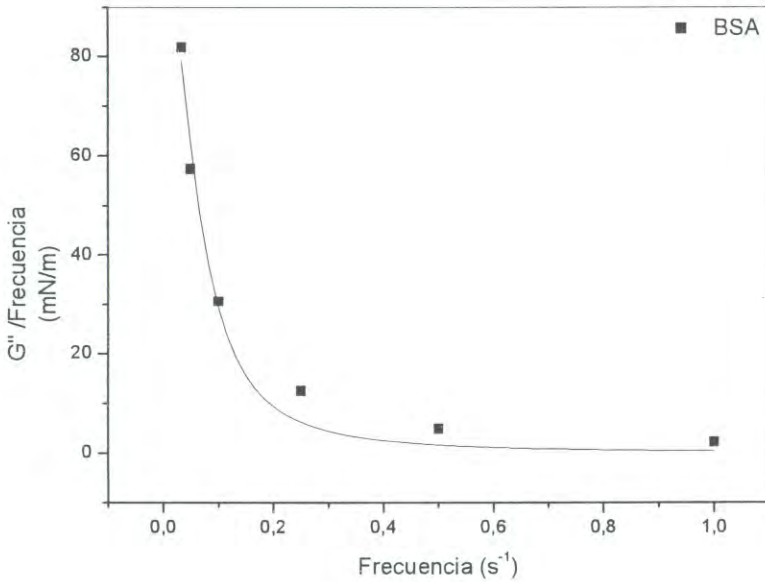


Figura 16. Datos experimentales y ajuste teórico de G' y G'' de BSA y N-dea/BSA, sobre una capa de DPPC en interfase cloroformo-agua, a) Modulo elástico, b) Módulo viscoso

Tabla 4 Valores de $G'+\Delta G'$ y $\Delta G''$ obtenidos a partir del modelo de Maxwell.

| N-dea/BSA | 0 | 300 | 900 | 1500 | 2000 | 6000 | 12500 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Aire-agua $G'_0+\Delta G'$ (mN/m) | 80.49 | 81.43 | 81.36 | 76.18 | 81.97 | 83.63 | 34.74 |
| dppc-bsa- cloroformo-agua $G'_0+\Delta G'$ (mN/m) | 14.18 | 13.42 | 13.33 | 12.22 | 12.16 | 13.27 | 16.32 |
| dppc-cloroformo- agua $G'_0+\Delta G'$ (mN/m) | 29.81 | 31.12 | 29.99 | 29.41 | 29.95 | 28.49 | 31.42 |
| Aire-agua $\Delta G''$ (mN/m) | 20.85 | 19.43 | 24.84 | 22.08 | 26.28 | 22.07 | 17.91 |
| dppc-BSA- cloroformo-agua $\Delta G''$ (mN/m) | 6.44 | 6.37 | 6.44 | 6.63 | 6.67 | 7.06 | 6.58 |
| dppc-cloroformo- agua $\Delta G''$ (mN/m) | 16.39 | 18.20 | 16.81 | 16.50 | 16.73 | 16.39 | 17.35 |

modelo de Stern-Volmer. La grafica F_0/F contra concentración de N-dea (quencher) se muestra en la figura 18. Los espectros de fluorescencia de BSA, se obtuvieron a cuatro temperaturas diferentes, 293.15, 299.15, 305.15 y 311.15 K, siguiendo el protocolo experimental. La Figura 18, es una representación del modelo de Stern-Volmer a 20 °C, siguiendo el mismo tratamiento de datos para los cuatro experimentos en los cuales se observan diferencias en los máximos de absorción conforme se aumenta la concentración de N-dea. El máximo de emisión de fluorescencia para triptofano en agua se presenta a una longitud de onda de 348 nm,²⁷ sin embargo, para BSA en solución acuosa, el máximo de emisión se presenta a longitudes de onda más cortas, este desplazamiento hacia el azul es el resultado de una protección de los residuos de triptofano de las moléculas de agua, por la matriz proteica.²⁷ Además de esto, el máximo de emisión del triptofano es altamente sensible a los cambios de polaridad del solvente, así como a las interacciones específicas entre el solvente y el anillo indol. Por lo tanto, se puede esperar que el máximo de emisión de proteínas dependa sobre los factores que afectan la exposición de los residuos de triptofano a la fase acuosa,²⁷ en donde los residuos hidrofóbicos estarán más o menos expuestos de acuerdo, a los cambios en la estructura terciaria de la proteína. En la Tabla 5 se presentan los máximos de emisión de BSA para las cuatro temperaturas. Basándose en lo descrito anteriormente, estas diferencias en las longitudes de emisión, observados en BSA conforme se aumenta la concentración de N-dea, sugieren que se originan cambios en la estructura terciaria, que protegen al anillo indol, de las moléculas del solvente, observándose un desplazamiento del máximo de emisión hacia el azul. En donde, el desplazamiento de la longitud de onda máxima de emisión hacia el rojo se debe a una mayor exposición de los residuos de triptofano al solvente y N-dea.

El análisis cuantitativo de la interacción de N-dea a BSA se realizó utilizando el apagamiento de la fluorescencia a una longitud de onda de 340 nm a diferentes temperaturas, Figura 18. El apagamiento de la fluorescencia

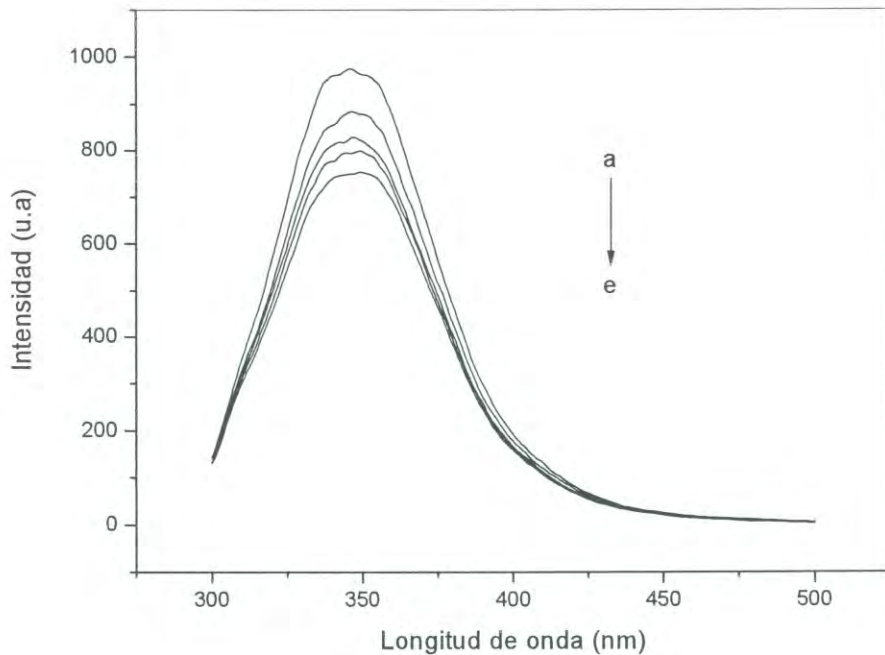


Figura 17. Espectro de fluorescencia de BSA (2.5×10^{-7} M) a diferentes concentraciones de N-dea a 293.15 K. Apagamiento del espectro de fluorescencia de BSA (2.5×10^{-7}) en presencia de N-dea. La relación molar de N-dea a bsa corresponde a a) 0, b) 300, c) 600, d) 900, y e) 1500, en solución acuosa.

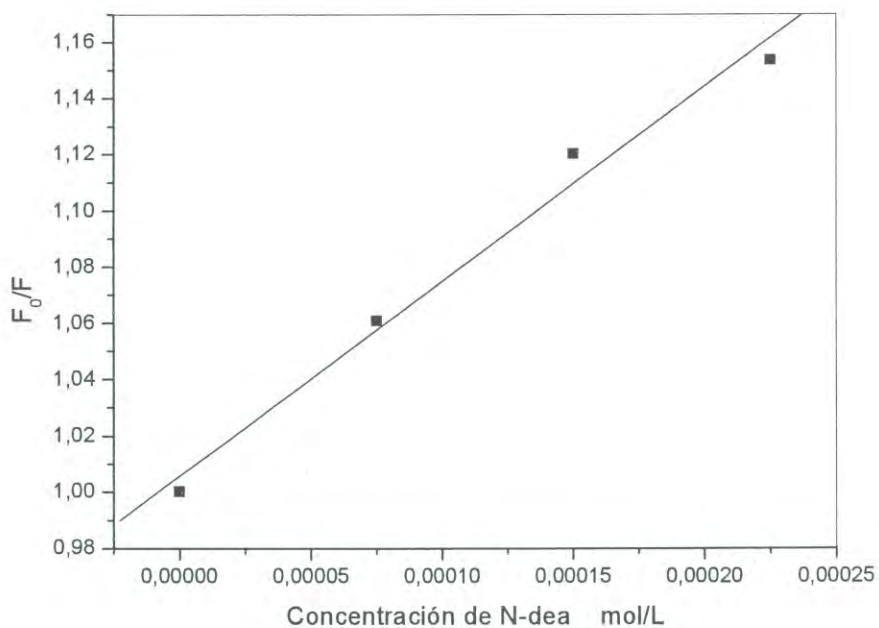


Figura 18. Curva de Stern-Volmer de BSA (2.5×10^{-7} M) a 293 K, utilizando diferentes concentraciones de N-dea, 0, 7.5×10^{-5} , 1.5×10^{-4} , 2.25×10^{-4} y 3.75×10^{-4} M, utilizando una longitud de onda de excitación de 280 nm y una longitud de onda de emisión de 340 nm.

Tabla 5 Longitudes de onda máxima de emisión de BSA y a diferentes relaciones N-dea y a cuatro distintas temperaturas.

| N-dea/BSA | 293.15 K | 299.15 K | 305 K | 311 K |
|-----------|----------|----------|-------|-------|
| 0 | 346.0 | 347.0 | 345.0 | 345.5 |
| 300 | 346.0 | 346.5 | 344.5 | 344.5 |
| 600 | 347.5 | 345.0 | 346.5 | 34.5 |
| 900 | 348.5 | 347.5 | 346.5 | 342 |
| 1500 | 348.0 | 348.0 | 346.5 | 342 |

muestra un comportamiento lineal, en un gráfica, de acuerdo al modelo de Stern-Volmer. El comportamiento lineal no cambia con el aumento de la temperatura, la linealidad obtenida en estos estudios sugieren un solo tipo de quenching, ya sea dinámico o estático.²⁷⁻³² La disminución en K_{SV} , Tabla 6, con el incremento de la temperatura sugiere que el tipo de apagamiento que se origina entre N-de y BSA es un quenching estático, debido a que K_{SV} disminuyó con el incremento de la temperatura.²⁷⁻³²

La constante de Stern-Volmer, es una constante de asociación, la cual nos da una idea de la capacidad de N-dea para enlazarse a la albúmina. Los valores obtenidos de K_{SV} , en este trabajo son relativamente bajas (10^2) comparados con las constantes obtenidas en diversos estudios para fosfolípidos, drogas, y fármacos, entre otras (10^4).²⁸⁻³² Esto puede deberse a que la estructura de este tipo de moléculas es mucho mas compleja y tienen un tamaño mucho mayor, comparado con la estructura y tamaño de N-nitrosodietilamina, lo que permite que se unan más fuertemente a la albúmina.

Las fuerzas moleculares que contribuyen en la interacción de una proteína con sustratos de bajo peso molecular, pueden ser interacciones de van' der Waals, puentes de hidrogeno, interacciones iónicas, electrostáticas e hidrofóbicas, principalmente.²⁹ Los signos y magnitud de los parámetros fisicoquímicos de la reacción de la proteína pueden calcularse por medio de las fuerzas que contribuyen a la estabilidad proteica.²⁹ Si se considera que el cambio de entalpía (ΔH^0) no varía significativamente en el rango de temperatura, en el cual se trabaja, es posible determinar el cambio de entropía (ΔS^0) mediante la ecuación de van't Hoff:

$$\ln K_{sv} = -\Delta H^0 / RT + \Delta S^0 / R$$

en donde K_{SV} es la constante de apagamiento de Stern-Volmer a la

Tabla 6, Constante de apagamiento de Stern-Volmer y parámetros termodinámicos relativos de N-dea-BSA en agua.

| T (K) | K_{SV} (Lmol ⁻¹) | ΔH^0 (kJmol ⁻¹) | ΔG^0 (kJmol ⁻¹) | ΔS^0 (Jmol ⁻¹) |
|-------|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| 293 | 693.230 | -10.74 | -15.85 | 17.46 |
| 299 | 634.800 | | -15.96 | |
| 305 | 550.591 | | -16.06 | |
| 311 | 515.636 | | -16.17 | |

temperatura correspondiente y R es la constante universal de los gases, (Figura 19). Las temperaturas utilizadas en este trabajo son las siguientes 293, 299,305 y 311 K. El cambio de entalpía (ΔH^0) se calculó a partir de la pendiente de la relación de van'Hoff, y el cambio de energía libre se estimó de la ecuación:

$$\Delta G = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

De la Tabla 6, se observa que el valor K_{SV} disminuye conforme se incrementa la temperatura, sugiriendo que la interacción que se origina entre el carcinógeno y BSA disminuye con el aumento de la temperatura, por otra parte se observa un valor negativo para ΔG^0 , indicando que la interacción de N-dea y BSA es espontáneo, las magnitudes y signos calculados para ΔH^0 y ΔS^0 sugieren que la interacción de BSA y N-dea es favorable. Se sabe que el signo y la magnitud de los parámetros fisicoquímicos (ΔH^0 y ΔS^0) se asocian con los diferentes tipos de interacción que tienen lugar durante el proceso de la asociación de la proteína. Generalmente, valores positivos en los parámetros de ΔH^0 indican interacciones hidrofóbicas, mientras que interacciones electrostáticas se caracterizan por un valor negativo para ΔH^0 y positivo para ΔS^0 ,^{29, 30} por lo tanto, el tipo de interacción que se origina entre las moléculas de albúmina y N-nitrosodietilamina son interacciones tipo electrostáticas, de acuerdo a lo descrito anteriormente y con base en los resultados obtenidos para ΔH^0 y ΔS^0 .

4.4.0 Dicroísmo Circular. Para establecer la posible influencia de la interacción de N-dea sobre la estructura secundaria de BSA, se realizaron estudios de CD en presencia de N-dea a diferentes concentraciones de este carcinógeno. En la Figura 20 se muestran los espectros de dicroísmo circular de BSA y sus complejos con N-dea, en la cual se muestran las características típicas de un espectro de una proteína globular. A 190 nm se observó una banda positiva, que se incrementó en presencia de N-dea, sin

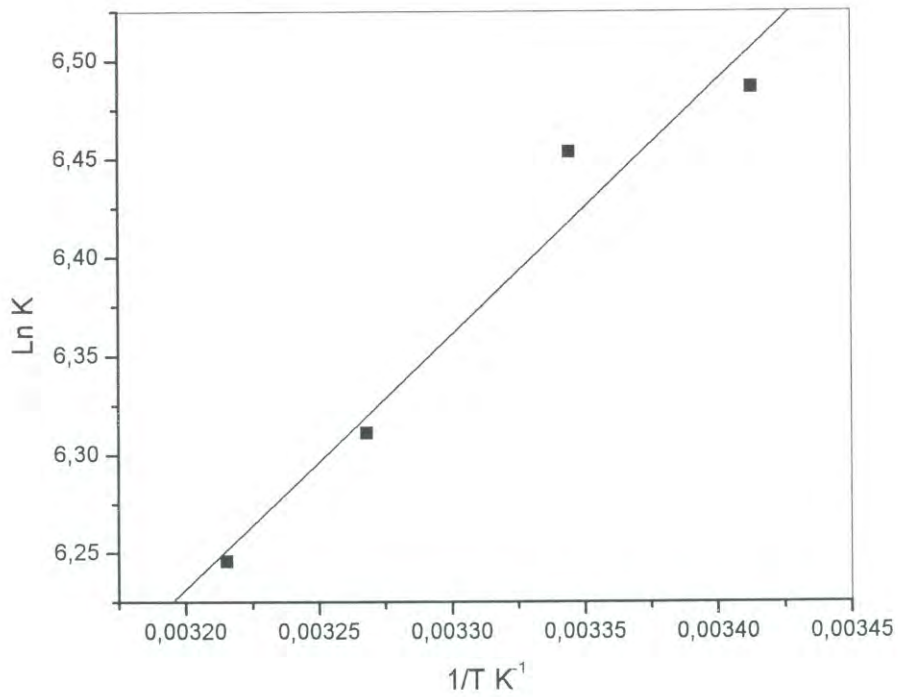


Figura 19. LnK contra T^{-1} para los diferentes valores de K_{sv} a 296.15, 299.15, 305.15 y 311.15 K

embargo, si se comparan los resultados entre los complejos, este valor disminuye paulatinamente conforme se incrementa la concentración de carcinógeno, lo que indica que ocurre cambios de la estructura secundaria de BSA. Por otra parte, a 208 y 222 nm, tanto en BSA como en el complejo N-dea/BSA, corresponden bandas negativas, presentándose una excepción a 222 nm para los complejos 6000 y 12500. El enlace de N-dea provoca un incremento en la intensidad de estas bandas, lo que significa y confirma un cambio en el contenido de la estructura secundaria de BSA. Los valores correspondientes a las diferentes tipos de estructura secundaria se obtuvieron bajo el análisis de los datos experimentales por un software en línea, DICRHOWEB y los resultados se muestran en la Tabla 7, en donde se observa que a ciertas concentraciones de N-dea (4.5×10^{-4} , 9×10^{-4} , 1.35×10^{-3} , 2.25×10^{-3} y 3×10^{-3}) se incrementa la elipticidad de la proteína, que se traduce como un incremento en el contenido de α -hélices, principalmente. Sin embargo a una mayor concentración de N-dea (9×10^{-3} y 0.01875 M), aunque se observa un aumento en la intensidad de la banda a 190 nm, comparado con BSA, también se observa una fuerte disminución en las intensidades de las bandas a 208 y 222 nm, en la que la banda de 222 nm adquiere valores positivos, sugiriendo que existe una pérdida de la estructura secundaria de BSA, Tabla 7.

Los valores de la estructura secundaria obtenidos por CD presentados en la Tabla 7, muestran que para los complejos 300-2000 N-dea/BSA existe un aumento en el ordenamiento de la proteína, ya que se observa un contenido mayor de α -hélice para estos complejos comparados con BSA, esto puede explicarse debido a que N-dea origina una transición, principalmente, de regiones desordenadas de BSA a α -hélice (desordenado \rightarrow α -hélice), mientras que el contenido de β -hojas y vueltas permanece casi constante. Para los complejos de 6000 y 12500 se puede observar una transición importante que implica el cambio de α -hélice \rightarrow β -hojas, principalmente y otra transición más, aunque menos

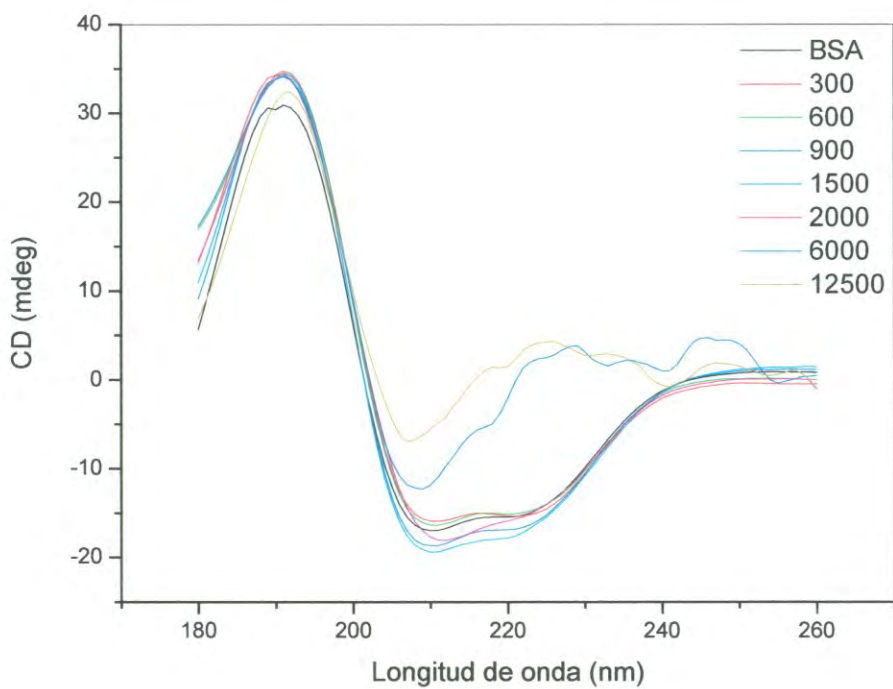


Figura 20. Espectros de dicroísmo circular de BSA y complejo N-dea/BSA, 300, 600, 900, 1500, 2000, 6000, 12500 moléculas de N-dea por molécula de BSA.

Tabla 7 Contenido de los diferentes tipos de estructura secundaria, obtenidos por análisis de los datos experimentales por medio del software DICHROWEB*.

| N-dea | α -hélice | β -hojas | Vueltas | desordenadas | Total |
|-------|------------------|----------------|---------|--------------|-------|
| 0 | 0.56 | 0.11 | 0.10 | 0.23 | 1.00 |
| 300 | 0.57 | 0.12 | 0.11 | 0.19 | 0.99 |
| 600 | 0.57 | 0.11 | 0.11 | 0.22 | 1.01 |
| 900 | 0.61 | 0.11 | 0.09 | 0.20 | 1.01 |
| 1500 | 0.62 | 0.10 | 0.09 | 0.19 | 1.00 |
| 2000 | 0.57 | 0.15 | 0.09 | 0.19 | 1.00 |
| 6000 | 0.05 | 0.47 | 0.15 | 0.30 | 0.97 |
| 12500 | 0.06 | 0.37 | 0.18 | 0.38 | 0.99 |

*Ref. <http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html>

significativa, de α -hélice \rightarrow desordenado, conduciendo a una pérdida casi completa del contenido de estructura en α -hélice.

5.0.0 CONCLUSIONES

La disminución del periodo de inducción, que se observó en la cinética de adsorción de N-dea/BSA en interfase aire-agua, a bajas concentraciones de N-dea, se debe a los cambios en la estructura secundaria y terciaria de BSA (resultados que se confirman por espectroscopia de fluorescencia y CD), en donde la reorientación de los dominios hidrofóbicos y dominios hidrofílicos de la proteína, permiten que la emigración de la subinterfase a la interfase aire-agua de BSA, sea más rápida y además de que la saturación y gelación de la interfase se observó a tiempos mas cortos comparados con los tiempos obtenidos para BSA, alcanzando una mayor presión superficial al término del experimento. Mientras que la desnaturalización de BSA, debido a las altas concentraciones de N-dea, provocaron una disminución del contenido de α -hélice y un incremento tanto, en el periodo de inducción, como en la fase de saturación de la monocapa, lo que condujo a una fase de gelación a una menor presión interfacial comparada con la observada en BSA y BSA con bajas concentraciones de N-dea.

El tiempo de inducción de BSA y sus complejos, en presencia de DPPC en interfase cloroformo-agua, no se observó debido a que el aumento de la presión superficial (caída de la tensión superficial), estuvo determinado por la penetración de moléculas de DPPC en la interfase cloroformo-agua. El incremento en la adsorción de N-dea/BSA bajo las mismas condiciones, se explica una vez más en base a los cambios de conformación de BSA, los cuales son originados por el acomplejamiento con N-dea, que permitió una interacción mas fuerte entre las moléculas de BSA y dppc, en donde la exposición de los grupos hidrofóbicos juegan un papel muy importante.

Los valores de la tensión superficial en equilibrio para BSA y N-dea/BSA, γ a tiempo ∞ , en interfase aire-agua y cloroformo agua, a bajas concentraciones de N-dea no mostraron una tendencia, sin embargo, se observa que a altas concentraciones de carcinógeno existe un incremento en el valor de γ_{∞} , debido a una menor adsorción de proteína en la interfase. La rigidez de la estructura de la albúmina se observó mediante el análisis de los módulos elástico (G') y viscoso (G''), en donde G' presenta una mayor contribución al módulo complejo (G), comparado con la, contribución que realiza G'' . En interfase aire-agua se observó una disminución en el valor de G' en los complejos N-dea/BSA, que se traduce como una disminución en la rigidez de la interfase de debido a cambios conformacionales en BSA por efecto de la unión con moléculas de N-dea. Sin embargo, en interfase cloroformo-agua en presencia de DPPC, la elasticidad de la interfase disminuyó cuando BSA se acomplejó con N-dea a bajas concentraciones, mientras que a altas concentraciones de N-dea G' aumentó, en interfase cloroformo-agua, esto se debe a que las interacciones proteína-proteína son mas fuertes, además de que probablemente existen otros factores que están involucrados en el aumento del modulo elástico.

De acuerdo a los resultados obtenidos por espectroscopia de fluorescencia N-dea provocó cambios conformacionales en la estructura de BSA que trajo como resultado el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la albúmina. La interacción de N-dea y BSA es exotérmica ($\Delta H < 0$), y espontánea ($\Delta G < 0$). El tipo de interacciones intermoleculares que gobiernan el acomplejamiento de N-dea/BSA son interacciones electrostáticas y puentes de hidrogeno, principalmente.

El aumento de la cantidad de N-dea (300-2000 molécula de N-dea por 1 molécula de BSA) provocó un aumento en el contenido de α -hélice en la estructura secundaria de BSA, en las que se observó una transición de estructura de desordenado \rightarrow α -hélice. Por otra parte, a altas concentraciones

de carcinógeno (6000 y 12500 N-dea/BSA), disminuyó la estructura α -hélice y aumentó el contenido de β -hojas, las transiciones que se dan son α -hélice $\rightarrow\beta$ -hoja y α -hélice \rightarrow desordenado.

6.0.0 BIBLIOGRAFÍA

1. D. Möbius and R. Millar, Proteins at liquid Interfaces, ELSERVIER, 1998, pp 303-339.
2. Ind. Eng. Chem. Res. 41, 2002, 1489-1495.
3. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 5, 1995, 1-9.
4. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 6, 1996, 679-689.
5. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 37, 2004, 963-968.
6. Biomacromolecules, 5, 2004, 1956-1961.
7. Langmuir 16, 2000, 922-927.
8. Biophysical Journal, 80, 2001, 2898-2911.
9. Food Chemistry, 96, 2005, 323-333.
10. Food Chemistry, 2005, article in press.
11. Chemico-Biological Interactions, 156, 2005, 101-111.
12. Fitoterapia, 76, 2005, 549-555.
13. Desalination, 176, 2005, 37-45.
14. Toxicology Letters, 145, 2003, 36-45.
15. Arthur W. Adamson, Physical Chemistry of Surfaces, 5^{ta} Edición, A Wiley Interscience Publication, 1990.
16. BLPC 2000/235
17. Biochimica et Biophysica Acta, 126, 1996, 274-285.
18. Brazilian Journal of Physics, 34, 2004, 58-63.
19. Journal of Physics: Condensed Matter, 15, 2003, 219-224.
20. Langmuir, 17, 2001, 8104-8111.
21. J. Braz. Chem. Soc., 16, 2005, 969-977.
22. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 143, 1998, 461-466.
23. Journal of Colloid Interface Science, 154, 1992, 316-326.
24. Langmuir, 20, 2004, 771-777.
25. Journal of Theoretical Society Interface, 2005, 1-19.
26. Journal of Colloid and Interface Science 176, 1995, 408-417.

27. Journal of Colloid and Interface Science, 179, 1996, 57-65.
28. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 190, 2001, 319-332.
29. Food Hydrocolloids, 2005, 1-9, Article In Press.
30. Bernard Valeur, Molecular Fluorescence principles and applications, WILEY-VCH, 2002.
31. Joseph R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press 1986.
32. Stephen G. Schulman, Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy: Physicochemical Principles and Practice, PERGAMON PRESS, 1979.
33. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 36, 2004, 915-919.
34. Biopolymers, 79, 2005, 48-57.
35. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 56, 2004, 1-7.
36. Chinese Journal of Chemistry, 23, 2005, 1151-1156.
37. Chinese Journal of Chemistry, 23, 2005,
38. Nina Beronva, Koji Nakanishi, and Robert W. Woody, Circular Dichroism: Principles and Applications, 2th edition, 2000.
39. Biochimica et Biophysica Acta, 1338, 1997, 161-185.
40. Langmuir 19, 2003, 2349-2356.
41. J. Phys. Chem. B, 108, 2004, 3835-3844.
42. J. Phys. Chem. B, 109, 2005, 17608-17616.

Carpeta actual: **ENTRADA****Desconectarse**

Componer Direcciones Carpetas Opciones Buscar Ayuda

SquirrelMail

[Lista de mensajes](#) | [Borrar](#) [Anterior](#) | [Siguiente](#) [Reenviar](#) | [Reenviar como adjunto](#) | [Responder](#) | [Responder a todos](#)**Asunto:** Notification of Manuscript Receipt at The Journal of Physical Chemistry Editorial Office jp066061m**De:** ParagonSystem@acs.org**Fecha:** Sab, 16 de Septiembre de 2006, 5:13 pm**Para:** valdez@fisica.uson.mx**Prioridad:** Normal**Opciones:** Ver encabezado completo | Vista preliminar

Dear Dr. valdez:

Your manuscript

Manuscript Title: Interfacial behavior of n-nitrosodiethylamine/bovine serum albumin complexes at the air-water and the chloroform-water interfaces by axisymmetric drop tensiometry

Manuscript Number: jp066061m

Author Security Key: AKVJ4

was received in the editorial offices of The Journal of Physical Chemistry on 16-SEP-06.

Thank you for submitting your work to the The Journal of Physical Chemistry.

Submission of a manuscript to the The Journal of Physical Chemistry implies that the work reported therein has not received prior publication and is not under consideration for publication elsewhere in any medium, including electronic journal and computer databases of a public nature. This manuscript is being considered with the understanding it is submitted on an exclusive basis. If otherwise, please advise.

When your manuscript has been assigned an editor, you will receive a second email containing the fax number or mailing address to which you should send your copyright form.

If you submitted this manuscript as the Corresponding Author, you may find it convenient to share your security key. The security key allows one other person to submit a revision to the manuscript and/or track the manuscript's status on their own Paragon home page.

If the manuscript was submitted on your behalf, its status does not currently display on your Paragon home page. Use the security key to add this manuscript to your Paragon home page.

Please remember that only the Corresponding Author and one other person may track a manuscript's status at one time.

Sincerely,

George C. Schatz, EIC
Editor-in-Chief, The Journal of Physical Chemistry

**Interfacial behavior of n-nitrosodiethylamine/bovine serum albumin complexes at
the air-water and the chloroform-water interfaces by axisymmetric drop
tensiometry**

J. Juárez¹, J. G. Galaz², L. Machi¹, M. Burboa^{1,3}, L. E. Gutiérrez^{1,3}, F. G. Goycoolea⁴,
M. A. Valdez^{1,2}

¹Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, ²Departamento de Física,
³Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora
Rosales y Transversal

83000 Hermosillo Sonora, México

⁴Departamento de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, España.

Autorship

Miguel Angel Valdez

Departamento de Física

Universidad de Sonora

Rosales y Transversal

83000 Hermosillo Sonora, México

e mail valdez@fisica.uson.mx

Fax: +6622592109

Abstract. Interfacial properties of N-nitrosodiethylamine/Bovine Serum Albumin (NDA/BSA) complexes were investigated at the air-water interface. The interfacial behavior at the chloroform –water interface of the interaction of the phospholipid 1,2-dipalmitoyl-sn-Glycero-3-phosphocholine (DPPC), dissolved in the chloroform phase and the NDA/BSA molecules, in the aqueous phase, were also analyzed by using a drop tensiometer. The secondary structure changes of BSA with different NDA concentrations were monitored by circular dichroism spectroscopy at different pH and the NDA/BSA interaction was investigated by Fluorescence spectroscopy. Different NDA /BSA mixtures were formed to get 0, 7.5×10^{-5} , 2.2×10^{-4} , 3.7×10^{-4} , 5×10^{-4} , 1.6×10^{-3} and 3.1×10^{-3} M NDA concentrations in order to produce 0, 300/1, 900/1, 1500/1, 2000/1, 6000/1 and 12500/1 NDA/ BSA molecular proportions, respectively in the aqueous solutions. α – helix content increments of BSA were obtained up to the 2000/1 NDA/BSA proportion, but for the 6000 and 12500 NDA/BSA proportions, the α – helix content practically disappeared. These BSA structure changes produced an enhancement of the surface pressure at the air-water interface, as the α – helix content increased with the NDA molecules. On the contrary, when α – helix content decreased, the surface pressure also appeared lower than the one obtained with pure BSA solutions. The interaction of DPPC with NDA/BSA molecules at the chloroform –water interface produced also a small, but measurable, pressure increment with the addition of NDA molecules. Dynamic Light scattering measurements of the NDA/BSA molecular sizes at pH 4.6, 7.1 and 8.4 indicated that the size of extended BSA molecules at pH 4.6 increased in a higher proportion with NDA molecules than for the other pH analyzed. Diffusion coefficients calculated from dynamic surface tension values, using a short-term solution of the general adsorption model of Ward and Tordai, also showed

differences with pH and the NDA concentration. Both, the storage and loss dilatational elastic modulus were obtained at the air-water and at the chloroform-water interfaces. The interaction of NDA/BSA with DPPC at the chloroform water produced a less rigid monolayer than the one obtained with pure DPPC (1×10^{-5} M), indicating a significant penetration of NDA/BSA at the interface. At short times and pH 4.6, the values of the storage elastic modulus were higher and more sensible to the NDA addition than the ones at pH 7.1 and 8.4, probably due to a gellike net formation at the air-water interface.

Keywords: BSA, interfaces, surface tension, elastic modulus, carcinogen

Introduction

Investigation of macromolecules (proteins and DNA) adducts has become in one of the most important research fields since time ago due to the direct or indirect connection with the carcinogenesis phenomenon. The protein and DNA adducts measurement is a form of chemical dosimetry which can be used to know the history of exposure to genotoxic substances¹. Albumin is one of the most investigated proteins and albumin adducts have been investigated long time ago, Bahl and Gutman in 1964 performed in vivo experiments to analyze the binding of rat serum albumin with N-2 fluorenylacetamide². Due to the biological importance of serum albumin and the facility to obtain it, many investigations of serum albumin adducts have been performed^{3,4}. Recently Boysen and Hecht have reviewed the DNA and protein adducts of Benzo(a)pyrene⁵. Protein interacting with water soluble carcinogens have also received attention since long time ago; Bemis *et al.* in 1966 investigated the effect of N-Nitrosodiethylamine and N-Nitrosomethylamine in the protein denaturing by using optical rotation, circular dichroism and light scattering techniques⁶.

N-Nitrosodiethylamine is present in foods, beverages, tobacco smoke, herbicides, pesticides, drinking water and industrial pollution⁷. Gorsky and Hellenberg investigated the labeling of Albumin secreted from isolated rat hepatocytes during the metabolism of N-Nitrosodiethylamine (NDA)⁸. However, most of the techniques used to investigate protein adducts are related to understand their biochemical and physicochemical properties in solution^{9,10,11}, leaving the surface and interfacial properties of these complexes. On the contrary, investigations of surface properties of pure proteins, like bovine serum albumin¹², α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin¹³, Lysozyme and others¹⁴ have received reasonable attention. For this reason, we think it would be

important to understand the influence of adducts on the surface properties of biomacromolecules and the interactions of protein adducts with different phospholipids at interfaces. In this paper we investigate the effect of the carcinogen NDA on the interfacial properties of bovine serum albumin (BSA) at the interface air-water and chloroform-water. For this purpose, we perform axial symmetric drop tensiometer measurements of the complexes NDA/BSA with different NDA concentrations. Due to the fact that BSA takes different conformations at different pH¹², we analyze the short time behavior of the influence of NDA on the BSA adsorption at the air- water interface and measure the complex dilatational elastic modulus of the adsorbed complexes at the interface for different pH. Also, by dynamic light scattering (DLS), we compared the change of hydrodynamic radius of the NDA/BSA complexes at different pH. Circular dichroism of the NDA/BSA complexes was performed to investigate the change of BSA secondary structure in pure water and in presence of a buffer solution. The kind of the NDA/BSA bonding was estimated by using fluorescence measurements and the van't Hoff equation¹¹. At times when both the surface tension¹¹ and the elastic modulus were practically constant, we measured the effect of NDA on the BSA adsorption at the air-water interface and, at the chloroform-water interface we analyzed the interaction with the phospholipid 1,2-dipalmitoyl-sn-Glycero-3-phosphocholine (DPPC) dissolved in the chloroform phase. The characterization of the phospholipids/protein adsorption at the aqueous solution/chloroform interface was analyzed by Li *et al.*¹⁵ with different proteins and demonstrated the important role of the kind of the lipid head group and the lipid concentration, however they did not measure the elastic modulus of the interaction between lipids and the adsorbed proteins. In this work we used the Maxwell model¹⁶ and determined the relaxation times of the NDA/BSA complexes at both interfaces.

Experimental

Bovine serum albumin (BSA) was obtained from BD Biosciences (99 %, delipidized, and globulins free), 1,2-dipalmitoyl-sn-Glycero-3-phosphocholine (DPPC) was obtained from Avanti Polar Lipids. Both were used without further treatment. N – Nitrosodylethylamine (NDA) was obtained from TCI America (99 %) and NaCl (reagent grade) was purchased from Sigma, U. S. A.). Chloroform (HPLC grade) and ethyl alcohol (reactive grade) were purchased from SIGMA-ALDRICH (U. S. A.). Water used through the experiments was filtered by an Easy pure/Barnstead instrument with a resistivity of 18.3 M Ω -cm.

Dynamic light scattering measurements. The size of BSA molecules and NDA/BSA complexes was estimated with the dynamic light scattering technique. Measurements were performed using an ALV-5000 digital correlator system (Langen-GmbH, Germany) fitted with a temperature control set at 25 ± 0.1 °C. The incident light was vertically polarized with a $\lambda_0 = 632$ nm Argon laser (30 mW) and the scattered light was measured at 90° . The hydrodynamic radius, R_H , was obtained for diluted samples through the Stokes–Einstein relation $D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}$, where k_B is the Boltzmann constant, T is the absolute temperature, η the viscosity of the solvent and D_0 the diffusion coefficient at infinite dilution.

Average hydrodynamic radius of BSA diluted solutions and two different NDA/BSA proportions were determined at pH 4.6, pH 7.1 and pH 8.4 in a 10 mM phosphate buffered solution. All measurements were done three times, each one in a time interval of 100 s and averaged with the software of the instrument (ALV 5000/E/WIN Software). The average size of the NDA/BSA molecules was measured about 30

minutes after the NDA solution was added to the BSA solution. All solutions were filtered with a 0.2 μ m filter.

Surface tension and rheology measurements. Pendant bubble tensiometry was used to determine the dynamic interfacial tension and the interfacial dilatational rheology measurements at the air-water interface with the air bubble in the upward direction. The bubble was formed at the tip of a U shaped stainless steel needle (0.5 mm i. d.) immersed in the aqueous BSA or the NDA/BSA complexes solutions. The equipment used was a 'Tracker' tensiometer (I. T. Concept, France) capable of real time measurements. For the analysis of the chloroform water interface, a vertical stainless steel needle (0.5 mm i. d.) mounted on a syringe produces a pendant drop and allows to change the drop size by a mechanically controlled system. The needle is immersed into a quartz cuvette (103.051F-Og, 20-10, Hellma, Germany), filled with the BSA or the NDA/BSA complexes solutions, to produce the chloroform/water interface. The measurement of the interfacial tension and the rheological measurements is based on the digital profile of the drop image and the solution of the Gauss-Laplace equation. The software used for the axisymmetric drop shape analysis is the Win Drop software (I. T. concept, France).

BSA concentration was kept constant (2.5×10^{-7} M) in all performed experiments. Different NDA /BSA mixtures were formed to get 0, 7.5×10^{-5} , 2.2×10^{-4} , 3.7×10^{-4} , 5×10^{-4} , 1.6×10^{-3} and 3.1×10^{-3} M NDA concentrations in order to produce 0, 300/1, 900/1, 1500/1, 2000/1, 6000/1 and 12500/1 NDA/ BSA molecular proportions, respectively in the aqueous solutions.

For the analysis of the interfacial tension (γ), the dilatational elastic modulus (G') and viscous modulus (G'') at the air-water interface, we started the measurements after 1800 s. The used frequencies were 1, 0.5, 0.25, 0.1 0.05 and 0.033 s^{-1} . After this time,

minutes after the NDA solution was added to the BSA solution. All solutions were filtered with a $0.2 \mu\text{m}$ filter.

Surface tension and rheology measurements. Pendant bubble tensiometry was used to determine the dynamic interfacial tension and the interfacial dilatational rheology measurements at the air-water interface with the air bubble in the upward direction. The bubble was formed at the tip of a U shaped stainless steel needle (0.5 mm i. d.) immersed in the aqueous BSA or the NDA/BSA complexes solutions. The equipment used was a 'Tracker' tensiometer (I. T. Concept, France) capable of real time measurements. For the analysis of the chloroform water interface, a vertical stainless steel needle (0.5 mm i. d.) mounted on a syringe produces a pendant drop and allows to change the drop size by a mechanically controlled system. The needle is immersed into a quartz cuvette (103.051F-Og, 20-10, Hellma, Germany), filled with the BSA or the NDA/BSA complexes solutions, to produce the chloroform/water interface. The measurement of the interfacial tension and the rheological measurements is based on the digital profile of the drop image and the solution of the Gauss-Laplace equation. The software used for the axisymmetric drop shape analysis is the Win Drop software (I. T. concept, France).

BSA concentration was kept constant ($2.5 \times 10^{-7} \text{M}$) in all performed experiments. Different NDA /BSA mixtures were formed to get 0 , 7.5×10^{-5} , 2.2×10^{-4} , 3.7×10^{-4} , 5×10^{-4} , 1.6×10^{-3} and $3.1 \times 10^{-3} \text{M}$ NDA concentrations in order to produce 0 , $300/1$, $900/1$, $1500/1$, $2000/1$, $6000/1$ and $12500/1$ NDA/ BSA molecular proportions, respectively in the aqueous solutions.

For the analysis of the interfacial tension (γ), the dilatational elastic modulus (G') and viscous modulus (G'') at the air-water interface, we started the measurements after 1800 s . The used frequencies were 1 , 0.5 , 0.25 , 0.1 , 0.05 and 0.033 s^{-1} . After this time,

all parameters were measured in a time interval of 400 s of the different oscillations with a 1 μ L air bubble. All measurements were repeated three times. For the behavior of γ vs time and G' vs time with different pH, we averaged five measurements with an average error of 1 %.

For the measurements of γ , G' and G'' at the chloroform water interface, we used a 1×10^{-5} M DPPC dissolved in chloroform and the same aqueous BSA and NDA/BSA solutions mentioned above.

Spectroscopic methods.

Fluorescence spectra were performed with a Perkin Elmer Luminescence Spectrometer LS 50B. The emission spectra were recorded from 300 to 500 nm (excitation wavelength 280 nm) and the obtained intensity at 340 nm, for the different samples of BSA solutions (2.5×10^{-7} M) and the different NDA /BSA complexes, was plotted for the different NDA /BSA proportions at different temperatures. The NDA concentrations were 7.5×10^{-5} , 1.5×10^{-4} , 2.2×10^{-4} and 3.7×10^{-4} M. All experiments were measured at four temperatures (293, 299, 305 y 310 K). The temperature sample was maintained by recycled water.

Circular dichroism (CD) measurements were performed in a JASCO J-810 spectropolarimeter at room temperature. A base line was obtained under the same experimental conditions as the samples and subtracted from the spectra of the samples. The BSA concentration was 0.1 mg/ml and the molecular proportion of NDA/BSA was the same as in the experiments at interfaces. The molecular weight of BSA used for the secondary structure calculations was 66500. Both sample and reference were run three times and averaged. The wavelength range used was 180-260 nm and the cell path length was 0.1 cm. The secondary structure was determined by using the DICHROWEB software with the program CDSSTR (<http://public-1.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/>)

Results.

CD and Fluorescence of NDA/BSA complexes.

In Fig. 1 we show the CD spectra of BSA and some NDA/BSA complexes in water without using any buffer. As can be noticed from the ellipticity values at 208 and 222 nm, the α -helix content of BSA increases for the 1500 NDA/BSA molecular proportion and it is almost lost for the 6000 and 12500 NDA/BSA proportions. On the contrary, for these NDA concentrations, the β sheet and the unordered structures increase. In Table 1 the secondary structure of BSA with all NDA concentrations used, is shown. We also show the secondary structure of BSA with different NDA concentrations for three different pH. The highest α -helix content was obtained for pH 4.6 and also, the changes of BSA secondary structure were more sensitive to the NDA concentration than the ones observed for other pH. For the 1500 NDA/BSA molecular proportion, the α -helix content decreased more than 20 %. The secondary structure did not show important variations at pH 7.1 and 8.4 for the same NDA concentrations. These differences could be due to the extended structure shown by the BSA molecule at pH 4.6, also found by other authors¹⁴, producing more interaction sites with NDA molecules and, as we will show, a larger molecular size. We find important to compare the highest NDA concentration used by us (3.1×10^{-3} M) and the urea concentration used by Itri *et al.*¹⁰ (3M) to diminish the α -helix content from 66 % to 64 %. This would mean a high NDA/BSA interaction that induces a strong α -helix content decrement.

Fluorescence of NDA/BSA complexes. The intensity of fluorescence decreased in an approximately regular form, named quenching, with the increasing of the NDA concentration (quencher). We analyzed the intensities with the Stern-Volmer equation¹¹

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] \quad (1)$$

Where, F_0 and F are the steady-state fluorescence intensities in absence and presence of the quencher, respectively. K_{sv} is the Stern-Volmer constant and $[Q]$ is the concentration of the quencher (NDA). The results of K_{sv} for the different temperatures used are shown in Table 2. Contrary to the tendency observed for K_{sv} to grow for increasing temperatures by Hu *et al.*¹¹, we obtained a decreasing effect, which is interpreted as a static quenching mechanism¹⁷. Assuming that the enthalpy change (ΔH^0) does not vary significantly in the range of temperatures analyzed, we determined the entropy change (ΔS^0) with the Van't Hoff equation

$$\ln(K_{sv}) = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (2)$$

Where K_{sv} is the Stern-Volmer quenching constant at the corresponding temperature and R is the ideal constant gas. The data and the adjusted line with a 0.98 linear correlation are shown in Fig. 2. From the slope and the ordinate at the origin we obtained a negative enthalpy change and a positive entropy change. Finally, with the known thermodynamic relationship we get the free energy change (ΔG^0)

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (3)$$

As can be deduced from the results in Table 2, the negative sign of ΔG^0 means that the NDA/BSA interaction is spontaneous, mainly entropic and the enthalpy is favorable. This probably would mean that not only the hydrophobic interactions are relevant, but also the hydrogen bond forces play an important role. As Kandagal *et al.*¹⁷ mention, electrostatic interactions are very small, so that we think the main interactions present in the NDA/BSA complexes are hydrogen bond and hydrophobic interactions.

Rheology of NDA/BSA complexes at the air-water and chloroform-water interface. For a given drop oscillation frequency ω produced by the tracker at every time t , we obtain a surface tension value $\gamma(t)$ and a drop area $A(t)$ which are used to calculate the complex elasticity modulus $G(\omega)$, defined as

$$G(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) \quad (4)$$

where $G'(\omega)$ and $G''(\omega)$ correspond respectively, to the real part and the imaginary part of the elasticity modulus. They are related with the change of $\gamma(t)$ and $A(t)$ in the

interface by $G = -A \frac{d\gamma}{dA}$ and the phase angle ϕ between compression and expansion.

The real and imaginary parts are related with the complex modulus by $G' = G \cos(\phi)$ and $G'' = G \sin(\phi)$.

The imaginary part component is reflected in the phase difference between the stress $d\gamma$ and the strain $d \ln(A)$. If the phase difference approaches to zero, then the surfaces can be considered elastic, otherwise, the surface shows a viscoelastic behavior¹⁸.

Assuming that the mechanical properties of the interface follows the Maxwell Model, the conservative part in eq. (4) is represented by

$$G'(\omega) = G'_0 + \Delta G' \frac{\omega^2 \tau^2}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (5)$$

and the viscous part (loss part) is written

$$G''(\omega) = \Delta G'' \tau \omega \frac{1}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (6)$$

where G_0' is the extrapolated value of the elastic modulus at the limit $\omega = 0$. $\Delta G'$ and $\Delta G''$ are values which are adjusted to the corresponding experimental data. τ is the relaxation time characteristic of the Maxwell model¹⁶. The last three parameters were found by fitting the experimental values with the Origin 7.0 software adjusting the parameters given in equations (5) and (6).

The behavior of the real part of the complex elastic modulus vs time is shown in Fig. 3 for different pH and short times at the air-water interface. We also show the effect of the 1500 NDA/BSA concentration (3.7×10^{-4} M of NDA) for the three pH analyzed. We observe the influence of the extended BSA molecules at pH 4.6 on the elastic modulus at very short times (100 s), when the elastic modulus reaches almost 70 mN/m. On the contrary for pH 7.1 and 8.4, we observe very small elastic modulus values. This would mean that extended BSA molecules seem to be strong attracted at the air water interface and probably could build a protein net with large elastic modulus values. On the contrary for pH 7.1 and 8.4, BSA molecules remain less extended and almost independent at the air water interface. It is also interesting to observe the influence of the NDA molecules on the elastic modulus. The elastic modulus remain almost insensible with the influence of the NDA molecules for pH 7.1 in comparison with the effect on the elastic modulus for pH 4.6 and 8.4, which means that for these cases, the protein membrane at the air-water interface is more flexible with the presence of NDA molecules attached to the BSA molecules.

The behavior of the modulus for BSA and NDA/BSA complexes at the air-water interface and the DPPC/BSA in the chloroform –water interface at long times is resumed in Table 3, where the parameters of the Maxwell model are given for different NDA concentrations. We observe that the relaxation times do not show appreciable changes with the NDA concentration, except for the highest NDA concentration used at

the air-water interface. The value 0 in columns 2 and 4 means that the behavior of the elastic modulus for BSA at the air water interface does not follow the Maxwell model when the proportion of NDA/BSA molecules is 12500. However, when using eq. (6) to fit the experimental data of G''/ω , we found a relaxation time around 27 s. For this NDA concentration the α -helix secondary structure of BSA is lost as was seen in Table 1. This could be one reason of the anomalous behavior of G' for this NDA concentration.

The relaxation time of DPPC at the chloroform water interface is similar to the one found by Saulnier *et al.*¹⁶ by using a dichloromethane –water interface (10 s), however, they used a higher DPPC concentration (7.5×10^{-3} mg/ml), close to the DPPC c.m.c.. A slight increase of the relaxation time was observed due to the DPPC-NDA interaction for the highest NDA concentration used, varying from 11 s for DPPC alone to 13 s with the 3.1×10^{-3} M NDA concentration.

Notice that the presence of BSA in the water phase produces an increase of τ , indicating a DPPC/BSA interaction at the chloroform-water interface. However, the presence of different NDA concentrations produces changes in the relaxation time which seems to be not monotonic.

The extrapolated values of the elastic modulus at large frequencies ($G'_0 + \Delta G'$) show differences when BSA is incorporated to the aqueous phase. This value decreases from approximately 30 mN/m, obtained with DPPC at the chloroform-water interface, to 14 mN/m, indicating a more rigid film when only DPPC are the adsorbed molecules at the interface. The variation of G'_0 , considered as the conservative elastic response of molecules at the interface¹⁶, shows a slightly decrement with the NDA concentration (around 2 mN/m for the 12500 NDA/BSA molecular proportion). On the contrary, $\Delta G'$,

characterized as the dissipative part of the rheological perturbation, shows the same slight average increment due to the NDA concentration. According to Freer *et al.*¹⁹, we could interpret G'_0 as the static response corresponding to a change in the surface pressure vs. interfacial area change and $\Delta G'$ as the dynamic contribution related to the rearrangement and reconfiguration of the protein molecules at the interface, therefore, a higher NDA concentration produces more changes in the BSA conformation, manifested also in important changes of the BSA secondary structure as mentioned before.

In Fig. 4 we show the behavior of the real and imaginary parts of the complex elasticity modulus at the air water and at the chloroform-water interface for different frequencies. The curves are the best approach to the experimental data using the Maxwell model equations (eq. 5 and eq. 6). The upper curve in Fig. 4a shows the behavior of G' of BSA and one of the NDA/BSA complexes at the air water interface, the middle curve and experimental data correspond to DPPC at the chloroform-water interface and the lower curve corresponds to the behavior of G' of the DPPC-BSA and DPPC/NDA/BSA interaction at the chloroform-water interface. The same sequence of the curves corresponds in Fig. 4b for $G''(\omega)/\omega$, which is interpreted as the viscosity at the corresponding interfaces. Notice that the Maxwell model fits better to the experimental data for low frequencies and at the chloroform-water interface, probably because of the instrument limitations for higher frequencies. The effect of NDA on the DPPC interaction at the chloroform-water interface does not seem to affect the elastic properties of the interface. However, for the concentration used of NDA, we observe a slight decrement of the G' values at both, air-water and chloroform-water interface. In Fig. 4b we observe the effect of BSA and NDA/BSA molecules on the viscosity increment of the DPPC/BSA and DPPC/NDA/BSA films.

Surface tension measurements.

We investigated the air- water interfacial behavior of aqueous BSA solutions mixed with different NDA concentrations. The results for the BSA for different pH are shown in Fig 5. We observe that at short times, γ behaves approximately linear, but for pH 4.6, there is an important slope variation at about 25 s, interpreted as an increase of the magnitude of $\frac{d\gamma}{dt^{1/2}}$ and therefore, as an increment of the diffusion coefficient, according to the Ward –Tordai equation^{20,21}.

The short time diffusion at the air-water interface can be approached by the asymptotic solution for $t \rightarrow 0$ of the diffusion coefficients, described by Miller and Fainerman²², which is given by

$$D_{a-w} = \frac{\pi}{4} \left[\frac{1}{RTC_0} \left(\frac{d\gamma}{d\sqrt{t}} \right)_{t \rightarrow 0} \right]^2 \quad (7)$$

where D_{a-w} is the diffusion coefficient near the air-water interface (m^2/s), R the universal gas constant ($Jmol^{-1}K^{-1}$), T the temperature in K, t time in seconds, C_0 the bulk protein concentration (mol/m^3) and γ the surface tension in N/m.

The results for the three pH and two different NDA concentrations are shown in table 4, where also the bulk diffusion coefficients and the average hydrodynamic radius, obtained from the DLS experiments, are compared.

The results of the calculated short time diffusion constants are slightly dependent on the pH and, for pH 4.6 and 8.4, these are similar to the values obtained by Güzey *et al.*²² ($0.5 \times 10^{-8} m^2/s$) for native BSA at the air- water interface. Also, our values of the bulk diffusion constants (D_0) for pH 4 and pH 8 are similar to the ones reported in the literature, $6 \times 10^{-11} m^2/s$ ²³, and $6.7 \times 10^{-11} m^2/s$ ²⁴. On the contrary, due to the increase of

the BSA hydrodynamic radius exhibited at pH 4.6, we obtained a lower bulk diffusion coefficient. The effect of the NDA/BSA interaction on the change of the bulk diffusion constant is interpreted as an increase of the average hydrodynamic radius. For pH 4.6, the increase of the NDA/BSA complex average radius for the 1500 NDA concentration was around 17 % higher. On the contrary, for pH 7.1 and 8.4 the change was around 6 %. Notice that for pH 4.6, the coefficient at the air water interface increases with the NDA concentration. This behavior is probably due to the conformation changes of the BSA molecule and the different molecular environment at the air-water interface. A similar increase was obtained with denatured (ultrasonicated) BSA by Güzey *et al.*²² at the air-water interface.

The protein adsorption at the air-water interface for different pH at short time, t , was determined with the Ward-Tordai equation²¹

$$\Gamma = 2C_0(D_0 / \pi)^{1/2} t^{1/2} \quad (8)$$

The concentration of the BSA and NDA/BSA films at 25 s is shown in Table 4. We notice that the surface concentration is slightly dependent on the pH and the NDA concentration. At pH 4.6 the protein adsorption is about 10 % lower in comparison with the adsorption at pH 7.1 and 8.6. The influence of the NDA molecules on the BSA adsorption is more evident at pH 4.6, where the bulk diffusion coefficient is smaller and BSA molecules are more extended. Similar results were found for human serum albumin (HSA) by Hansen and Myrvold²¹, but the same surface concentration was reached at shorter times (< 1 s) by using a HSA concentration of 10^{-2} %.

The behavior of γ for BSA aqueous solutions and NDA/BSA complexes at the air-water and the interaction of DPPC with NDA/BSA at the Chloroform-water interface were investigated at intermediate times. In fig. 6 we show the effect of the NDA concentration on the surface pressure of BSA solutions at different interfaces. Fig. 6a

shows the behavior of the surface pressure at the air-water interface as a function of time, $\Pi(t) = \gamma_0 - \gamma(t)$, with γ_0 the surface tension for the corresponding NDA solutions and $\gamma(t)$ is the surface tension at any time t . We notice that a half an hour after the bubble formation, pressure increases with the NDA concentration and then, for the concentrations 6000 and 12500, the pressure decreases in comparison with the pressure for BSA alone. This could be explained as a consequence of the drastic conformation change of BSA molecules for the NDA/BSA molecular proportions 6000 and 12500. As observed in Table 1, the α -helix content is almost eliminated in the BSA conformation and this would strongly change the hydrophobicity of BSA. The correlation between helix amphiphilicity and surface activity has also been noticed by Suttriprasit *et al.*¹³, who has assumed the helices adsorption at the air-water interface. We can also distinguish the three regimes of tension lowering observed by other researchers for many proteins¹⁹. The induction zone, which is the time when negligible changes occur and molecules start migrating. In Fig. 6a we observe a small shift with the NDA concentration and reach almost 200 s for the 6000 NDA/BSA concentration. The monolayer saturation zone, which shows the largest surface pressure increment and also is shifted at larger times with NDA. The interfacial gelation zone, which is the time when molecules rearrange and build probably gellike networks. Fig. 6b shows the behavior of the surface pressure vs time at the chloroform–water interface with DPPC dissolved in chloroform and NDA/BSA complexes dissolved in water. We noticed a clear pressure increment with the NDA concentration up to the 6000 NDA/BSA proportion and a pressure decrement for the highest NDA concentration used (not shown).

The behavior in the region time $t \rightarrow \infty$ of the function γ vs $t^{-1/2}$ was obtained, assuming a diffusion controlled adsorption and is given by the Joos relationship^{25,26,27}

$$\gamma - \gamma_{00} = \frac{RT\Gamma^2}{2C_0} \left(\frac{\pi}{D_0 t} \right)^{1/2} \quad (9)$$

Where γ_{00} is the extrapolated equilibrium interfacial tension at $t \rightarrow \infty$, R is the ideal gas constant, T is the absolute temperature and Γ is the protein surface concentration at long times. The γ_{00} values for different NDA concentrations are obtained with the intersection of the ordinate of the extrapolated straight line. In all cases the linear correlation was larger than 0.99.

In order to evaluate the surface tension kinetics, we tried to find the best fit of the surface pressure vs time from the experimental values to get the relaxation modes through the relationship²⁸

$$\frac{\Pi(t) - \Pi_{00}}{\Pi_0 - \Pi_{00}} = A_0 \exp(-t/\tau_1) + A_1 \exp(-t/\tau_2) \quad (10)$$

Where τ_1 and τ_2 are the first and the second relaxation times, respectively, A_0 and A_1 are adjustable parameters, $\Pi_{00} = \gamma_s - \gamma_{00}$, $\Pi_0 = \gamma_s - \gamma_0$ and $\Pi(t) = \gamma_s - \gamma(t)$, where γ_s is the solvent surface tension or the interfacial tension without BSA or NDA/BSA solutions. Similar attempt was made by Suttiprasit *et. al.*¹³ and Van der Vegt *et al.*¹⁴ with only one relaxation time. They used that equation to monitor penetration into the surface and configurational rearrangements of adsorbed protein molecules in a period of time beyond that of the time affected by diffusion. The results for the air- water interface are given in Table 5 for different NDA concentrations. We notice a decreasing effect of the first relaxation time for the NDA/BSA proportions 900, 1500 and 2000. It is also interesting that for these NDA concentrations, it appears a second relaxation time as a consequence of the protein rearrangement at the air water interface. Van der Wegt *et al.*¹⁴, using the sessile droplet technique and 0.01 mg/ml BSA concentration, (our BSA concentration was 0.0165 mg/ml), found a relaxation time of BSA of 937 s. On the

other hand, they found for that BSA concentration, an induction time (period of time where negligible changes of surface tension occurs) around 240 s. In our case, we obtained an average initial induction time of 60 s. The largest relaxation time was found for the 6000 NDA/BSA concentration about 50 % larger than the time without NDA molecules.

The relaxation times of DPPC at the chloroform-water interface for different NDA concentrations are also shown in Table 5. Notice the relative lower values of the relaxation times for the NDA concentrations 300, 900 and 1500. In this case, by using eq. (10), we only obtained a unique relaxation time for each NDA concentration and practically no induction time. This is consistent with the results found by Li *et al.*²⁶. They demonstrated that DPPC is adsorbed at the chloroform/water interface by a diffusive mechanism as long as the DPPC concentration is lower than the c.m.c. concentration. Our DPPC concentration used was lower (1×10^{-5} molar) but near the c.m.c. concentration and this could be a reason of the small variation of the relaxation times with the NDA concentration in the aqueous phase. However, for the 12500 NDA concentration, we found a relaxation time near 10 % higher than the relaxation time without NDA molecules.

Finally, in the same Table 5 we show the relaxation time for the chloroform/ water interface (DPPC in the chloroform phase and BSA in the aqueous phase) and different NDA concentrations. We found two relaxation times for almost all NDA concentrations used, due to the BSA-DPPC rearrangement at the interface. The largest variation of the second relaxation time occurred at the 12500 NDA concentration (25 % larger than the time obtained without NDA molecules) and the largest variation of the first relaxation time occurred for the 1500 NDA concentration (17 % smaller than the time obtained without NDA molecules).

In Fig. 7 we resume the behavior of pressure of the NDA/BSA interaction for intermediate times (time when $|d\gamma/dt| \approx 10^{-3}$) at the air/water and chloroform/water interfaces. For the air/water interface we observe a pressure increment up to the 2000 NDA/BSA concentration, and for higher NDA concentrations, the pressure decreases in almost 4 mN/m in comparison with the pressure of BSA alone. For the interface DPPC-chloroform/water we observe a small effect on the increment of pressure due to the increment of NDA concentration in the aqueous phase (near 3 mN/m for the 12500 NDA concentration). This would mean that NDA molecules could attract more DPPC molecular hydrophilic heads at the interface. The presence of NDA/BSA complexes in the aqueous phase produces a small increment of pressure (1-3 mN/m) indicating some interaction of NDA/BSA complexes with DPPC at the interface. Notice that for the 12500 NDA concentration, the pressure is lower in comparison with the pressure without BSA. This could mean an electrostatic repulsion with the interface due probably to the BSA abrupt configuration change.

Conclusions

In this paper we have investigated the effects of NDA on the interfacial properties of BSA at the air-water and at the DPPC/chloroform-water interface by axisymmetric drop tensiometer measurements. BSA molecules showed a larger size increase and larger changes in the BSA secondary structure with the NDA addition for pH 4.6 in comparison with the size increase and secondary structure changes shown at higher pH. It was possible to get almost destroyed the BSA α -helix content for relative small NDA concentrations (1.6×10^{-3} M) in comparison with the concentrations needed with other compounds. The influence of relative small NDA concentrations on the diffusion and surface tension at short times were significantly larger for pH 4.6 obtaining also a larger

elastic modulus, due probably to the exposed α -helix structures. The increase of the BSA α -helix content at up to 1500/1 and 2000/1 NDA/BSA concentrations caused a pressure increment at the air-water and at the chloroform–water interfaces. The interaction of the NDA/BSA complexes with DPPC at the chloroform–water interface was enhanced with the NDA concentration. However, due to the DPPC concentration used, near the c.m.c., the changes of the interfacial pressure influenced by the NDA/BSA molecules were not as large as the ones observed at the air-water interface.

Acknowledgments. The Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) is gratefully acknowledged for grant SEP-2004-CO1-46749 and for the scholarship of one of the participants (J. Juárez).

References

1. Gan, L. S.; Otteson, M. S.; Døxtader, M. M.; Skipper, P.L.; Dassari, R. R.; Tannenbaum, S. R. *Spectrochimica Acta* 1989, 45A (1), 81.
2. Bahl, O. P.; Gutman, H. R.; *Biochim. et Biophys. Acta* 1964, 391.
3. Islam, G. A.; Greybrokk, T.; Harvey, R. G.; Ovrebo, S. *Chemical Biological Interactions* 1999, 123, 133.
4. Rappaport, S. M.; Waidayanatha, S.; Ó Connell, Y.; Rothman, N.; Smith, M. T.; Zhang, L.; Qu, Q.; Shore, R.; Li, G.; Yin, S. *Chem Biol Interact* 2005, 153-154, 103.
5. Boysen, G.; Hecht, S. S. *Mutation Research* 2003, 543, 17.
6. Bemis, J. A.; Argus, M. F.; Arcos, J. C. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1966, 126, 274.

7. Brunnerman, K. D.; Hoffmann, D. *IARC Sci., Publ.* 1978, 19, 343.
8. Gorsky, L. D.; Hollenberg, P. F. *Chem Res Toxicol.* 1989, 2(6), 442.
9. Taboada, P.; Gutiérrez-Pichel, M.; Mosquera, V. *Biomacromolecules* 2004, 5, 1116.
10. Itri, R.; Caetano, W.; Barbosa, L. R. S.; Baptista, M. S. *Brazilian Journal of Physics* 2004, 34 (1), 58.
11. Hu, Y.; Liu, Y.; Wang, J.; Xiao, X.; Qu, S. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004, 36, 915.
12. Cascao-Pereira L. G.; Théodoly, O.; Blanch, H. W.; Radke, C. J. *Langmuir* 2003, 19, 2349.
13. Suttiprasit, P.; Krisdhasima, V.; Mcguire, J. J. *J. Colloid and Interface Science* 1992, 154, 316.
14. Van der Vegt, W.; Norde, W.; Van der Mel, H. C.; Busscher, H. J. *J. Colloid and Interface Science* 1996, 179, 57.
15. Wu, J.; Li, J. B.; Zhao, J.; Millar, R. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2000, 175, 113.
16. Saulnier, P.; Boury, F.; Malzert, A.; Hertault, B.; Ivanova, T.; Cagna, A.; Panaïotov, I.; Proust, J. E. *Langmuir* 2001, 17(26), 8104.
17. Kandagal, P. B.; Ashoka, S.; Seetharamappa, J.; Vani, V.; Shaikh, S. M. T. *J. Photoch. Photobio. A: Chem.* 2006, 179, 161.
18. Wang, L.; Atkinson, D.; Small, D. M. *The Journal of Biological Chemistry* 2003, 28, 37480.
19. Freer, E. M.; Yim, K. S.; Fuller, G. G.; Radke, C. J. *J. Phys. Chem. B.* 2004, 108, 3835.
20. Ward, A. F. H.; Tordai, L. *J. Chem. Phys.* 1946, 14, 453.

21. Hansen, F. K.; Myrvold, R.; Journal of Colloids and Interface Science 1995, 176, 408.
22. Güzey, D.; Gülseren, L.; Bruce, B.; Weiss, J. Food hydrocolloids 2006, 20(5), 669.
23. Peters, T. Advances in Protein Chemistry 1985, 37, 161.
24. Sheu, J. J. S.; Probstein, R. F. Ind. Eng. Chem. 1977, 16, 459.
25. Van den Bogaert, P.; Joos, P. J. Phys. Chem. 1979, 83, 2244.
26. Li, J.; Fainerman, V. B.; Miller, R. Langmuir 1996, 12, 5138.
27. Cabrerizo-Vílchez, M. A.; Policova, Z.; Kwok, D. Y.; Chen, P.; Newmann, A. W. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 1995, 5, 1.
28. Klebanu, A.; Kliabanova, N.; Ortega, F.; Monroy, F.; Rubio, R. G.; Starov, V. J. Phys. Chem. B. 2005, 109, 18316.

Tables

Table 1

CD secondary structure of BSA with different N – Nitrosodylethylamine/BSA molecular proportions. The analysis was performed using the DICHROWEB software with the program CDSSTR (<http://public-1.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/>)

| | NDA/BSA | α Helix | β sheets | Turns | Unordered |
|-----------|---------|----------------|----------------|-------|-----------|
| No buffer | 0 | 0.56 | 0.11 | 0.1 | 0.23 |
| | 300 | 0.57 | 0.12 | 0.11 | 0.19 |
| | 600 | 0.57 | 0.11 | 0.11 | 0.22 |
| | 900 | 0.61 | 0.11 | 0.9 | 0.20 |
| | 1500 | 0.62 | 0.1 | 0.9 | 0.19 |
| | 2000 | 0.57 | 0.15 | 0.9 | 0.19 |
| | 6000 | 0.05 | 0.47 | 0.15 | 0.30 |
| | 12500 | 0.06 | 0.37 | 0.18 | 0.38 |
| pH 4.6 | 0 | 0.59 | 0.16 | 0.10 | 0.16 |
| | 900 | 0.49 | 0.06 | 0.17 | 0.28 |
| | 1500 | 0.45 | 0.11 | 0.17 | 0.26 |
| pH 7.1 | 0 | 0.55 | 0.15 | 0.11 | 0.19 |
| | 900 | 0.56 | 0.15 | 0.09 | 0.20 |
| | 1500 | 0.57 | 0.14 | 0.09 | 0.19 |
| pH 8.4 | 0 | 0.55 | 0.17 | 0.10 | 0.17 |
| | 900 | 0.54 | 0.14 | 0.11 | 0.20 |
| | 1500 | 0.52 | 0.15 | 0.11 | 0.21 |

Table 2

Results of the Stern-Volmer constant (K_{sv}) at different temperatures and the thermodynamic functions obtained from eqs. (2) and (3) in the text.

| T (K) | K_{sv} (l/mol) | ΔH_0 (kJ/mol) | ΔG_0 (kJ/mol) | ΔS_0 (J/mol) |
|-------|------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| 293 | 693.2 | -10.73 | -15.85 | 17.48 |
| 299 | 634.8 | | -15.95 | |
| 305 | 550.6 | | -16.06 | |
| 311 | 515.6 | | -16.16 | |

Table 3

Relaxation times and elastic modulus at long times of different NDA/BSA concentrations at the air-water interface and the chloroform-water interface.

| NDA /BSA | Air/water | DPPC/BSA | Air/water | DPPC/BSA |
|-------------|---------------|---------------------------------------|--|--|
| | $\tau \pm 1s$ | Chloroform/ water $\tau \pm 1s$ | $G'_0 + \Delta G'$ mN/m $G'_0 + \Delta G'$ | Chloroform/ Water $G'_0 + \Delta G'$ |
| 0 | 19 | 15 | 80 | 14 |
| 300 | 19 | 15 | 81 | 14 |
| 900 | 18 | 16 | 81 | 13 |
| 1500 | 19 | 16 | 76 | 13 |
| 2000 | 20 | 10 | 81 | 13 |
| 6000 | 20 | 12 | 80 | 14 |
| 12500 | 0 | 15 | 0 | 15 |

Table 4

Diffusion coefficient near the air-water interface, D_{a-w} , and in bulk, D_0 , hydrodynamic radius, R_H , and surface concentration, Γ , at 25 s at the air-water interface for different pH and NDA/BSA concentrations.

| pH | NDA/BSA | D_0 m ² /s x10 ⁻¹¹ | D_{a-w} m ² /s x10 ⁻⁸ | R_H nm | Γ (25 s) mg/m ² |
|-----|---------|---|--|-------------|--------------------------------------|
| 4.6 | 0 | 5.2 | 0.5 | 4.7 | 0.67 |
| | 900 | 4.5 | 0.8 | 5.4 | 0.62 |
| | 1500 | 4.4 | 7.4 | 5.5 | 0.61 |
| 7.1 | 0 | 6.6 | 1.5 | 3.7 | 0.76 |
| | 900 | 6.4 | 0.5 | 3.8 | 0.74 |
| | 1500 | 6.3 | 0.9 | 3.9 | 0.73 |
| 8.4 | 0 | 6.4 | 0.5 | 3.8 | 0.74 |
| | 900 | 6.1 | 0.7 | 4.0 | 0.73 |
| | 1500 | 6.0 | 0.5 | 4.1 | 0.72 |

Table 5

Relaxation times (in seconds) of the adsorption of NDA/BSA complexes at the air-water and the chloroform-water interface. The experimental data were adjusted to the eq. (10)

in the text by using the Origin 7 software.

| NDA/BSA | BSA Air-water | DPPC Chloroform/water | DPPC/BSA | DPPC/BSA |
|---------|------------------|--------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | | | Chloroform/water Relaxation time 1 | Chloroform/water Relaxation time 2 |
| 0 | 439 | 25.9 | 10.5 | 118 |
| 300 | 550 | 22.8 | 10.3 | 112 |
| 900 | 251, 2553 | 23.9 | 9.5 | 104 |
| 1500 | 377, 1264 | 24 | 8.7 | 69 |
| 2000 | 208, 2422 | 24.1 | 9.1 | 78.4 |
| 6000 | 659 | 24.5 | 11.5 | |
| 12500 | 582 | 28.4 | 10.8 | 148 |

Figure captions.

Fig.1 CD spectra of BSA (0.1 mg/ml) mixed with different N-Nitrosodylethylamine/BSA molecular proportions. The secondary structure analysis was performed using the DICHROWEB software with the program CDSSTR (<http://public-1.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/>). Measurements were performed at room temperature. Numbers indicate the NDA/BSA proportions.

Fig. 2 Calculated $\ln(K_{sv})$ against $1/T$ (T , absolute temperature) and adjusted line for different temperatures. The enthalpy and entropy changes of the NDA/BSA interaction are obtained from the slope and the ordinate at the origin of the Van't Hoff equation (eq. (2)).

Fig. 3. Behavior of G' vs time for the different pH used. BSA concentration was kept constant (2.5×10^{-7} M). Dark symbols correspond to BSA alone and open symbols to the 1500 NDA/BSA molecular proportion (3.75×10^{-4} M concentration of N – Nitrosodylethylamine). Squares correspond to pH 4.6, triangles to pH 7.1 and circles to PH 8.4. measurements were performed at 25 ± 0.1 C.

Fig. 4. Behavior of G' (4a) and the two dimensional viscosity G''/ω (4b) for different frequencies and different interfaces of aqueous BSA solutions. Filled symbols correspond to BSA solutions and open symbols to 3.7×10^{-4} NDA concentration solutions. Squares correspond to BSA at the air-water interface, circles to DPPC at the chloroform –water interface and triangles correspond to DPPC/BSA at the chloroform-water interface. BSA concentration was the same (2.5×10^{-7} M) and the concentration of DPPC dissolved in chloroform was 1×10^{-5} M.

Fig. 5. Surface tension of BSA aqueous solutions vs $t^{1/2}$ in phosphated buffered solutions at different pH. BSA concentration was the same used. Experiments were carried on at 25 ± 0.1 C.

Fig. 6. Surface pressure vs time for different NDA/BSA molecular proportions in the aqueous phase. a) Air-water interface and b) chloroform-water interface with DPPC in chloroform 1×10^{-5} M. Temperature was kept at 25 ± 0.1 C. Numbers indicate the NDA/BSA proportions.

Fig. 7. Π_{00} vs NDA concentration at different interfaces. Squares correspond to NDA/BSA complexes at the air-water interface, circles correspond to DPPC at the chloroform-water interface and triangles correspond to Π_{00} due to the interaction DPPC with NDA/BSA at the chloroform-water interface.

Figures

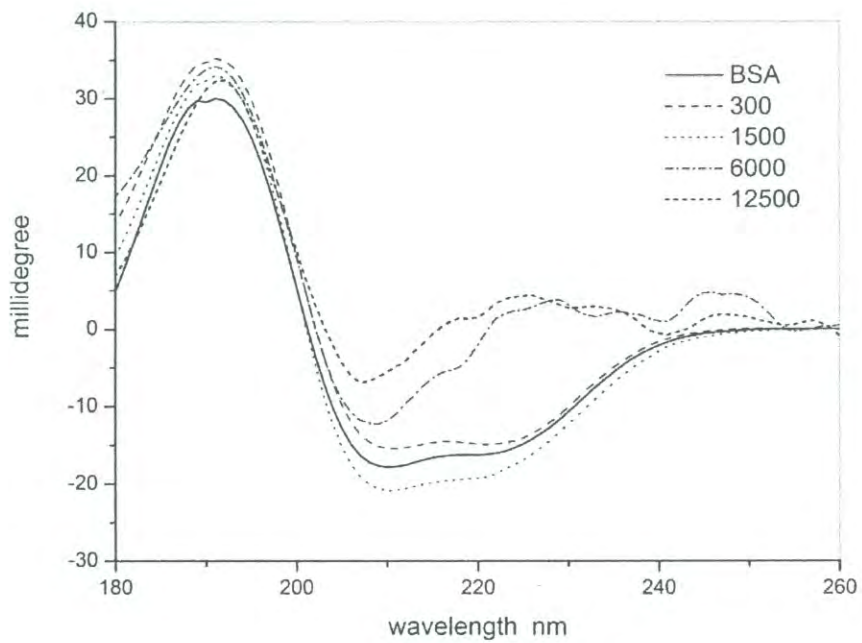


Fig. 1

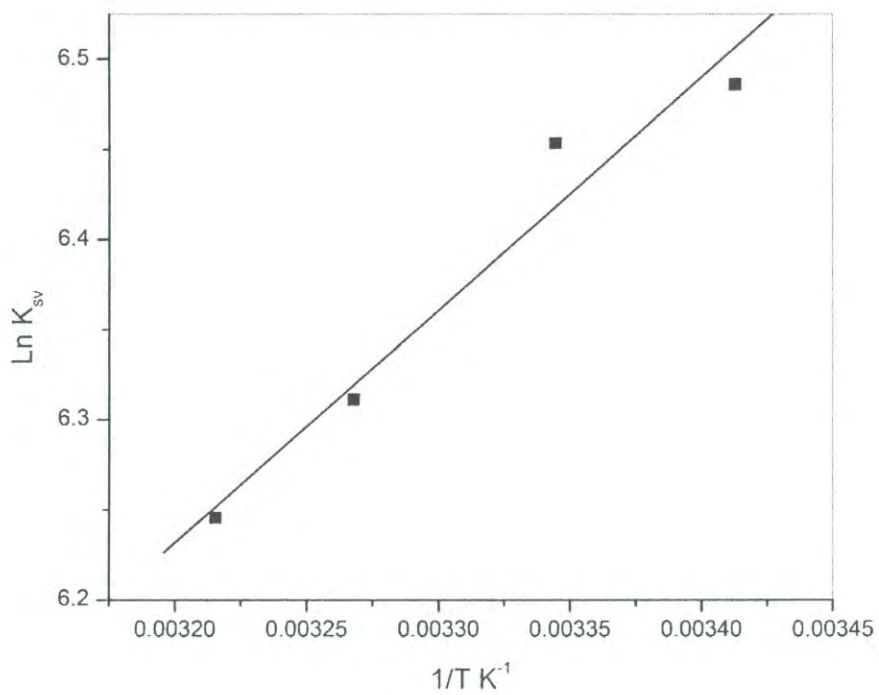


Fig. 2

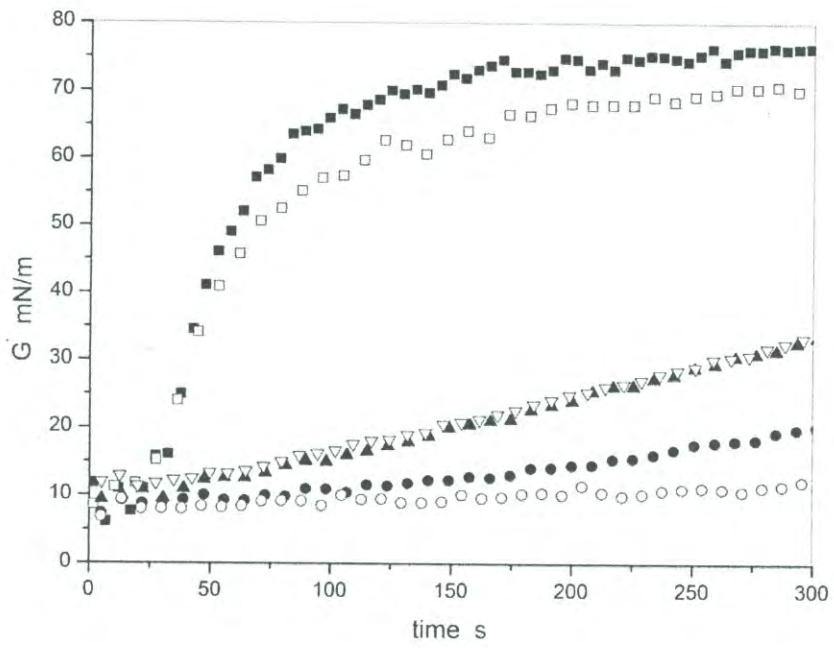


Fig. 3

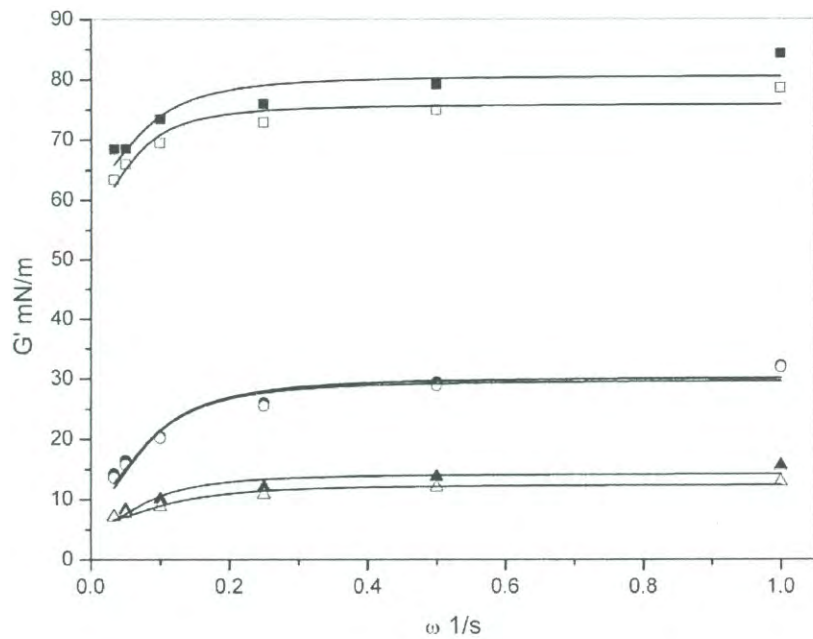


Fig. 4a

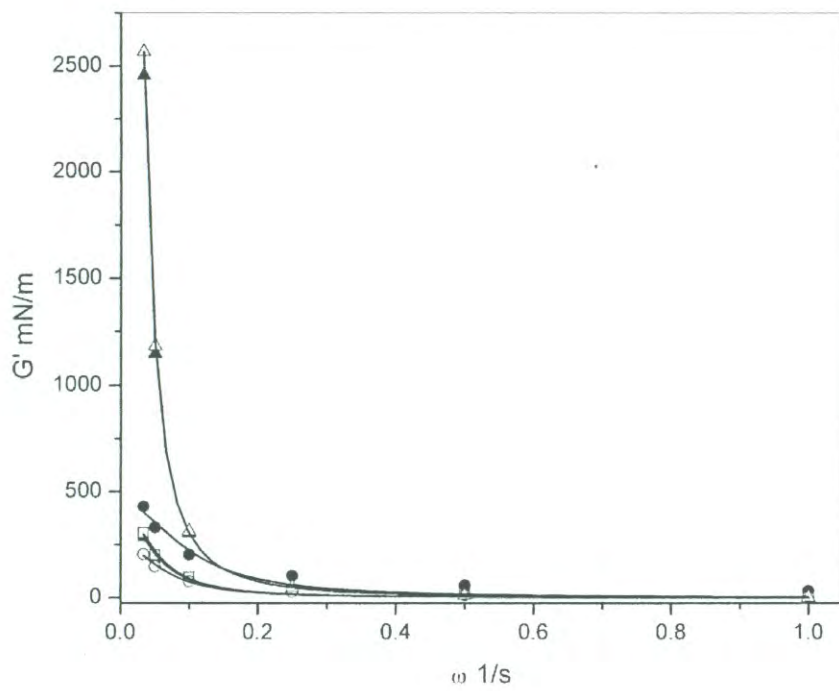


Fig. 4b

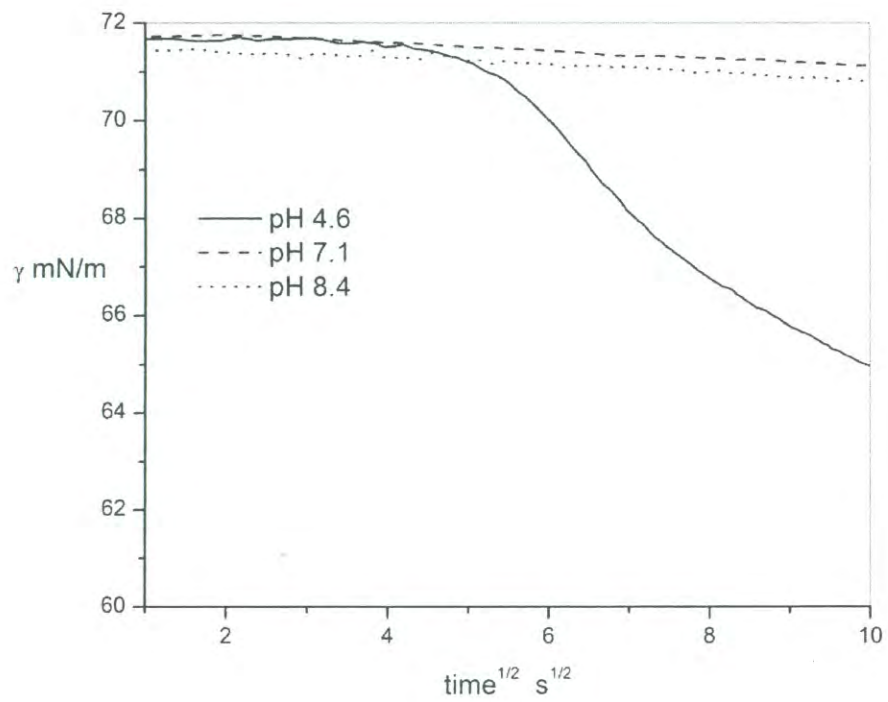


Fig. 5

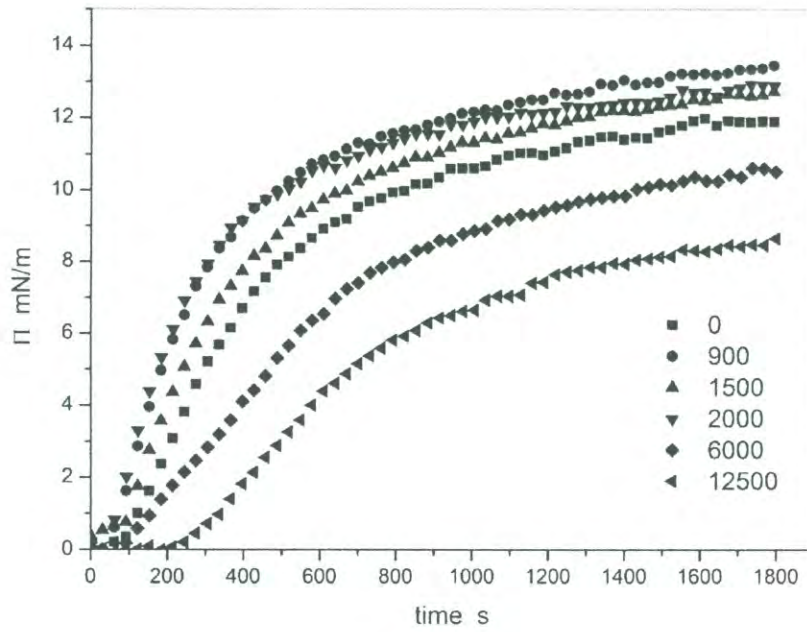


Fig.6a

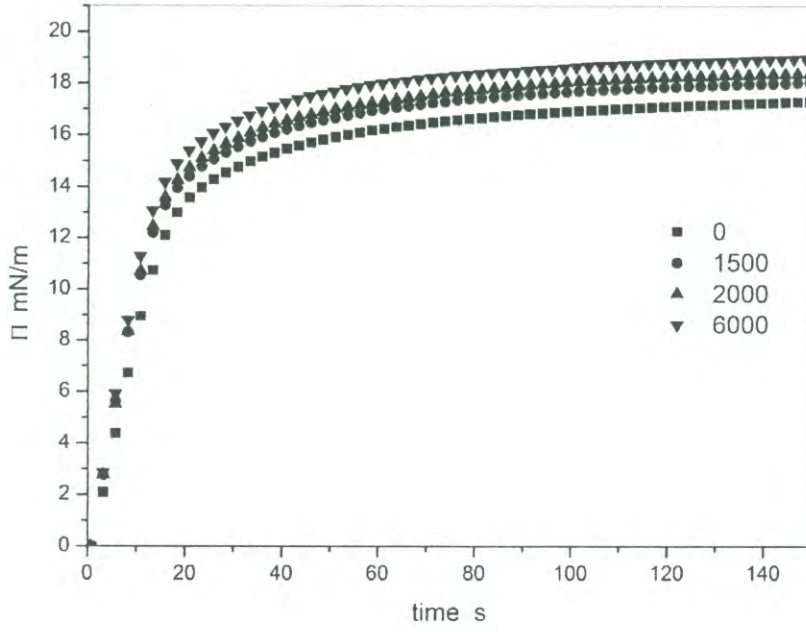


Fig. 6b

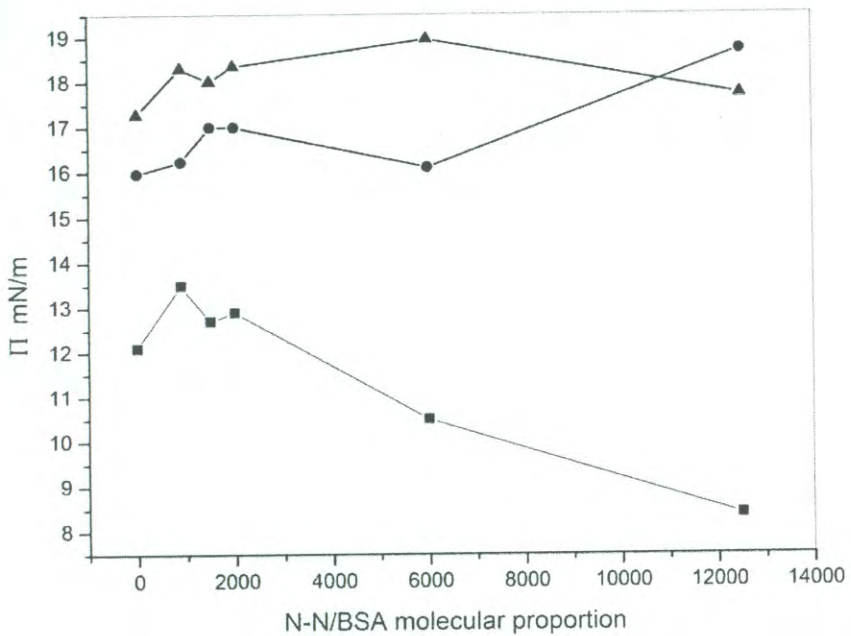


Fig. 7