

UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ingeniería

Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales

**“Interacción de Albúmina de Suero Bovino
y N-nitrosodietilamina con Monocapas de
Dipalmitoilfosfatidil-colina en Interfase
Agua-Aire”**

Tesis

Para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN POLÍMEROS Y MATERIALES

Presenta:

Dora Edith Valencia Rivera

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

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	VI
RESUMEN	VII
OBJETIVOS	VIII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Historia	4
Contribuciones en el campo de la ciencia de las monocapas	4
Estructura Molecular y Propiedades de las Monocapas	7
Formación y estabilidad de las monocapas	7
Isotermas	12
Colapso en las Monocapas de Langmuir	15
Parámetros que Modifican la Isoterma	15
Estudio de las Monocapas de Langmuir	16
Técnica de Langmuir-Blodgett (LB)	18
Deposición de las Películas de Langmuir sobre un Sustrato Sólido	18
Tipos de Sustratos	20
Tipos de Deposición	24
Microscopía de Fuerza Atómica	28
Microscopio de Fuerza Atómica	29
Aplicaciones de la Microscopia de Fuerza Atómica	31
Microscopia de Ángulo de Brewster	32
Dicroísmo Circular	37
Comportamiento de la Adsorción de Proteínas en Interfase Agua/Aire	39
DESARROLLO EXPERIMENTAL	42
Reactivos y Sustancias	42
Preparación de las muestras	42
Balanza de Langmuir	43
Preparación y limpieza de la balanza de Langmuir	43
Formación de Monocapas de DPPC en interfase agua/aire	43

Penetración de BSA en la monocapa de DPPC (22hr)	44
Área ocupada por BSA en una monocapa de DPPC a 10 mN/m	45
Estimación del área de la proteína pura	45
Estimación del área ocupada por los complejos	46
Obtención de Isotermas de DPPC a diferentes tiempos de compresión	46
Ciclos de compresión y expansión	47
Preparación de las películas de Langmuir-Blodgett	47
Caracterización de las películas de Langmuir-Blodgett por Microscopía de Fuerza Atómica	48
Obtención de imágenes por Microscopía de Ángulo de Brewster	50
RESULTADOS Y DISCUSIONES	51
Isotermas de Langmuir	51
Ciclos de Compresión y Expansión	58
Microscopía de Ángulo de Brewster	76
Microscopía de Fuerza Atómica	79
CONCLUSIONES	83
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ARTICULO CORRESPONDIENTE AL TRABAJO	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de una Monocapa de Langmuir	9
Figura 2. Formación de la monocapa de Langmuir y obtención de la isoterma correspondiente	11
Figura 3. Diagrama general de una isoterma de ácidos grasos	13
Figura 4. Efecto del incremento de la temperatura sobre la forma de una isoterma	17
Figura 5. Diagrama General de la transferencia de una monocapa sobre un sustrato sólido	19
Figura 6. Deposición de una monocapa de Langmuir sobre un sustrato de naturaleza hidrofóbica	21
Figura 7. Transferencia de una monocapa de Langmuir a un sustrato hidrofílico	22
Figura 8. Esquema general de la deposición tipo Y	25
Figura 9. Proceso de la formación de multicapas utilizando la técnica de deposición tipo X	26
Figura 10. Técnica de deposición tipo Z	27
Figura 11. Esquema general del funcionamiento de un Microscopio de Fuerza Atómica	30
Figura 12. Representación esquemática de un haz de luz en el ángulo de Brewster	33
Figura 13. Principio físico del BAM	35
	36
Figura 14. Componentes de un BAM	
Figura 15. Esquema general de los componentes de un haz de luz en un plano polarizado.	38
Figura 16. Isoterma típica de DPPC en interfase agua/aire a 25 °C	52
Figura 17. Efecto de la adsorción de BSA sobre una monocapa de DPPC a diferentes tiempos	53

Figura 18. Efecto de la adsorción de BSA+25000 moléculas de carcinogénico sobre una monocapa de DPPC a diferentes tiempos	54
Figura 19. Incremento relativo en el área molecular de DPPC a una presión de 10 mN/m y 20 mN/m sobre una subfase de BSA $1.49 \times 10^{-9} \text{M}$ y complejos respectivamente a diferentes tiempos, tomando como referencia el área molecular de DPPC sobre una subfase de agua pura a un tiempo de 15 minutos después de el esparcimiento	57
Figura 20a. Se muestran los ciclos de compresión/expansión de una monocapa de DPPC sobre una subfase de BSA ($1.49 \times 10^{-9} \text{M}$) iniciados a los 15 minutos y a las 5 horas después de la deposición de las moléculas de DPPC	59
Figura 20b. Se muestran los ciclos de compresión/expansión de una monocapa de DPPC sobre una subfase de BSA/NDEA (1:12500) iniciados a los 15 minutos y a las 5 horas después de la deposición de las moléculas de DPPC	60
Figura 21a. Se muestra el primer y el sexto ciclo de una monocapa de DPPC sobre una subfase de BSA 15 minutos y 5 horas después de la deposición, respectivamente	61
Figura 21b. Se muestra el primer y el sexto ciclo de una monocapa de DPPC sobre una subfase de BSA/NDEA 15 minutos y 5 horas después de la deposición, respectivamente.	63
Figura 22. Se muestra el cambio del área en los ciclos de compresión-expansión obtenidos utilizando BSA y/o BSA/NDEA (1:12500 y 1:25000) como subfase	64
Figura 23. Módulos de Compresibilidad de DPPC y DPPC/BSA a diferentes tiempos.	66
Figura 24. Módulos de Compresibilidad de DPPC y DPPC/BSA/NDEA a diferentes tiempos.	68

Figura 25. Incremento de presión en el tiempo partiendo de una presión inicial de 12 mN/m	70
Figura 26. Variación de la presión superficial en la monocapa de DPPC a diferentes presiones debido a la inyección de BSA y sus complejos (BSA/NDEA) en la subfase (1.49×10^{-9} M)	73
Figura 27a. Imágenes de BAM de una monocapa de DPPC a 15 minutos después de la inyección de BSA	77
Figura 27b. Imágenes de BAM de una monocapa de DPPC a 4 horas después de la inyección	77
Figura 27c. Imágenes de BAM de una monocapa de DPPC a 15 minutos después de la inyección de BSA/N-DEA	78
Figura 27d. Imágenes de BAM de una monocapa de DPPC a 4 horas después de la inyección de BSA/N-DEA	78
Figura 28a. Imagen de BSA sobre mica clivada	81
Figura 28b. Imagen de BSA sobre una bicapa de DPPC	81
Figura 28c. Imagen del complejo BSA/NDEA (1:200) sobre mica clivada	82
Figura 28d. Imagen del complejo BSA/NDEA (1:12500) sobre mica clivada	82

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores (mN/m) de C_s^{-1} correspondientes a los picos que indican la formación de una nueva fase en la monocapa de DPPC debido a la penetración de la BSA y los complejos BSA/N-DEA a diferentes tiempos de adsorción	69
Tabla 2. Parámetros de adsorción de BSA en interfase agua/aire para diferentes concentraciones de NDEA	75

Resumen

En este trabajo reportamos el efecto de la N-nitrosodietilamina (N-DEA) en la adsorción de albúmina de suero bovino (BSA) sobre monocapas de dipalmitoilfosfatilcolina (DPPC) en interfase agua/aire. Se obtuvieron modificaciones en las isothermas debido a la interacción de BSA y/o BSA/NDEA con las moléculas de DPPC presentes en la monocapa, estas modificaciones dependen de la concentración de NDEA presente en el complejo y se encontraron modificaciones significantes en las áreas moleculares debido a la difusión de la proteína y/o el complejo a la interfase. Los valores de los módulos de compresibilidad mostraron una dependencia a la concentración de carcinogénico presentes en el complejo. La monocapa de DPPC aumenta su rigidez cuando se utilizan bajas concentraciones de NDEA en el complejo, debido probablemente a un mayor contenido de hélices-alfa en la estructura de la proteína. Los cambios de fase fueron monitoreados por BAM y las películas de Langmuir-Blodgett fueron analizadas por AFM.

Objetivo general

Estudiar el efecto de la interacción de la albúmina de suero bovino (BSA) y los complejos BSA/N-nitrosodietilamina en monocapas de Langmuir del fosfolípido DPPC

Objetivos específicos

- ✓ Obtener las isotermas de DPPC y Albúmina en interfase agua/aire.

- ✓ Estudiar el efecto de diferentes soluciones de BSA y BSA/N-DEA utilizadas como subfase, en las isotermas de DPPC.

- ✓ Obtener monocapas de Langmuir-Blodgett de complejos Albúmina-carcinogénico adsorbidos en una monocapa de DPPC y realizar su análisis por Microscopía de Fuerza Atómica

- ✓ Estudiar los cambios de fase mediante Microscopía de Ángulo de Brewster

Introducción

Desde el punto de vista fisiológico, la albúmina sérica es una de las proteínas sanguíneas más importantes, es una excelente proteína de transporte, activa para una gran variedad de sustancias con diferentes propiedades (hidrofílicas o hidrofóbicas, aniónicas o cationicas, etc)¹. Es una proteína globular con un peso molecular promedio de 67000 Da, constituida de una cadena de 583 residuos de amino ácidos. Contiene 17 puentes disulfuro lo que le confiere estabilidad a la molécula, además de un grupo sulfhidrilo (SH) libre, por lo cual es capaz de formar dímeros en solución; en su estructura secundaria predominan las alfa hélice aproximadamente en un 67%. Las modificaciones en las estructuras secundaria y terciaria se dan en dependencia principalmente de pH, temperatura y la unión a varios desnaturalizantes². La albúmina representa del 50 al 60 % de las proteínas totales del plasma, por lo cual, una de sus funciones principales es mantener la presión osmótica en el organismo. Como proteína acarreadora, la albúmina juega un papel importante en el transporte y deposición de ligandos endógenos y exógenos presentes en la sangre³. La distribución y metabolismo de muchos compuestos biológicamente activos (drogas, productos naturales, carcinógenos, etc.) en el cuerpo están relacionados con su afinidad hacia la albúmina sérica, por lo que la investigación sobre la unión de estas moléculas a la albúmina es de suma importancia.

Las monocapas de fosfolípidos son modelos idóneos para estudiar una gran variedad de propiedades fisicoquímicas y biológicas. Algunas de estas relacionadas con su estructura, morfología y los cambios causados por la unión e interacción con proteínas y polímeros. Especialmente las interacciones en interfase de fosfolípidos/proteínas son de gran importancia ya que estos son los componentes más importantes de las membranas biológicas⁴. De esta

manera, el comportamiento de proteínas en interfases, la formación y características de sistemas de lípidos/proteínas han sido estudiados con gran interés en los últimos años⁵. En particular, las interacciones lípido/proteína en monocapas son de gran importancia para entender los procesos de las membranas biológicas y para futuros diseños de superficies biológicas funcionales⁶. Una monocapa de Langmuir es una manera fácil de modelar una biomembrana, a pesar de la gran diferencia entre un modelo tan simple y un sistema biológico complejo. La información que se obtiene acerca de la orientación y empaquetamiento, así como de la estabilidad es de gran valor para el entendimiento de ciertos fenómenos o procesos, tales como la interacción de algunas sustancias con las membranas celulares. La incorporación de proteína en la monocapa o la adsorción debajo de la monocapa, depende de varios parámetros, tales como: peso molecular de la proteína, presión superficial, estado y carga de la monocapa, pH de la subfase, temperatura, etc.

Las nitrosaminas es un grupo de compuestos químicos que se conoce hace más de 100 años. En 1956 John Barnes y Meter Magee reportaron el efecto carcinogénico que tiene la N-nitrosodimetilamina en ratas. En la actualidad se conocen aproximadamente 300 compuestos de esta naturaleza química que muestran efectos carcinogénicos⁷. Los compuestos N-nitroso son conocidos como agentes hepatocarcinogénicos y están implicados en la etiología de algunos cánceres humanos. Estos compuestos son considerados dañinos para la salud del hombre. La presencia de este tipo de compuestos y sus precursores en el medio ambiente, en algunos lugares de trabajo, en la dieta y en el uso de tabaco, cosméticos y productos farmacéuticos, así como su formación endógena en el cuerpo humano a partir de componentes dietarios, puede ser un factor potencial para desarrollar algún tipo de cáncer. La N-nitrosodietilamina (NDEA) es uno de los compuestos ambientales más

importantes de esta clase, y se ha sugerido que causa la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS), lo que resulta en estrés oxidativo y daño celular⁸.

Las proteínas tienen la capacidad de adsorberse espontáneamente en la interfase agua/aire debido a su comportamiento anfifílico. Este proceso es termodinámicamente favorable y es ampliamente utilizado en emulsiones, espumas y películas delgadas⁹. A tiempos cortos la adsorción de proteínas en interfaces está controlada principalmente por un proceso de difusión¹⁰; en general, está demostrado que la adsorción de proteínas en la interfase agua/aire ocurre en dos pasos principales^{11, 12}: primero la difusión a la interfase, lo cual se manifiesta en incrementos en la presión superficial y posteriormente, ocurre un rearrreglo en las moléculas de proteína seguido probablemente de un proceso de desdoblamiento. Se ha reportado un periodo de inducción, el cual es el tiempo necesario para el desdoblamiento y la adsorción de la proteína¹³. La adsorción de proteínas sobre lípidos en interfase agua/aire ha sido extensamente estudiada con la balanza de Langmuir mediante la medición de incrementos en la presión superficial de las monocapas del sistema lípido-proteína a tiempos largos^{14, 15}. En la literatura, los trabajos se enfocan en las propiedades de las películas de proteínas en interfase agua/aire y el efecto inducido por la incorporación de pequeñas cantidades de compuestos de bajo peso molecular; en contraste en este trabajo monocapas de Langmuir han sido utilizadas como un modelo de membranas para estudiar el efecto que produce la incorporación de pequeñas cantidades de BSA y BSA/NDEA sobre la estabilidad de películas de DPPC.

ANTECEDENTES

Historia

Muchos conceptos fundamentales en la ciencia son universalmente aceptados y son incluidos dentro del lenguaje popular. Algunos nos vienen a la mente de manera aleatoria, tales como, los gases reales y el vacío, átomos, gravedad, radiación electromagnética, ondas sonoras y muchos otros. Sin embargo, el concepto de monocapa aunque es también ampliamente aplicable, no es un término popular. Donde quiera que un gas o un líquido este en contacto con otro líquido o una superficie sólida hay una capa de moléculas, a menudo regularmente orientadas hacia la interfase, siendo entonces, diferentes estas de las otras en el bulto¹⁶. Este es el concepto de monocapa, el cual es uno de los más interesantes relatos de la historia de la ciencia y conforma la piedra fundamental en la ciencia moderna de coloides e interfases.

Contribuciones en el campo de la ciencia de las monocapas

Durante muchos siglos han sido conocidos los efectos producidos por el aceite sobre el agua. En el siglo XVIII, A.C., los babilonios concedían un carácter divino a la observación del esparcimiento de aceites sobre el agua. Una de las primeras aplicaciones realizadas con este tipo de capas las llevaron a cabo los japoneses, quienes practicaban el arte de la impresión sumi-nagashi, la cual consistía en el uso de tintas negras conformadas por partículas de carbón en suspensión y proteínas, las cuales eran transferidas a hojas de papel que depositaban abajo de éstas¹⁷. El primero en darle una interpretación científica a la formación de capas de líquidos atrapadas en la interfase agua/aire fue Benjamín Franklin (1706-1790), quien en una de sus visitas a Europa observó que la superficie de un estanque de agua estaba casi

completamente cubierta por una sola cucharada de aceite de oliva; Franklin escribió una carta a la Royal Society de Londres en 1774 reportando la particularidad de su experimento, haciendo la observación de que la capa de aceite que cubría la superficie del agua debía ser extremadamente delgada. Así dio inicio la ciencia de las monocapas en la interfase agua/aire. Con este importante descubrimiento otros científicos de la época se mostraron interesados en analizar el fenómeno, entre ellos Shields (1822-1890) y Aitken (1839-1919), quienes fueron unos de los pioneros en estudiar y tratar de explicar el efecto producido por aceites o grasas sobre el agua¹⁶.

Posteriormente, los estudios realizados por Lord Rayleigh (1842-1919)¹⁶ sobre la dinámica del movimiento de los líquidos y las ondas producidas por éstos fue el inicio de un estudio más detallado sobre los líquidos dispersos sobre otros líquidos formando capas. Fue Rayleigh el primero en proponer que el espesor de la capa formada al esparcir aceite sobre una extensa superficie de agua, debía ser aproximadamente de orden molecular; sin embargo, él no contaba con una técnica experimental que le permitiera llevar a cabo las mediciones, por lo cual la obtención de las propiedades fundamentales de dichas monocapas tuvo que esperar por un tiempo. Fue hasta que Anger Pockels (1862-1935) de origen alemán llevará a cabo los primeros experimentos de mayor relevancia en el estudio de las monocapas de tal manera que la investigación de superficies adquirió un carácter cuantitativo. Desde los 18 años de edad Pockels comenzó a trabajar en la cocina de su casa con un recipiente pequeño de forma rectangular con poca profundidad con forma de cubeta, el cual es el precursor de la actual Balanza de Langmuir que hoy en nuestros días es usada para el estudio de las monocapas de Langmuir. La cubeta de Pockels era llenada con el líquido a investigar, para después con un listón atado a un extremo barrer completamente la superficie del líquido para eliminar las impurezas atrapadas en la interfase agua/aire. Por medio de

un botón suspendido en la interfase del líquido Pockels fue capaz de medir la tensión superficial del agua pura y el agua contaminada por algún agente como el aceite de oliva esparcido en la superficie. Pockels observó que la tensión superficial del agua disminuía conforme aumentaban las impurezas sobre su superficie, obteniendo así la primera relación entre la tensión superficial y el área ocupada por la monocapa¹⁶. Por medio de esta técnica Pockels obtuvo la primera isoterma área-presión superficial, la cual hoy en día es una de las bases de la ciencia de las monocapas de Langmuir. Fue entonces cuando Anger Pockels mediante una carta dirigida a Rayleigh logró publicar sus hallazgos, los cuales dieron inicio a estudios posteriores de este mismo método.

La mayor contribución al estudio de las monocapas la realizó Irving Langmuir (1881-1957) a inicios del siglo XX^{16, 18}, quien desarrollo toda una teoría del proceso termodinámico de adsorción y de la interacción atractiva entre las moléculas e la interfase de un líquido y un sólido. En 1917, publicó "*The constitution and fundamental properties of solids and liquids*"¹⁶ sus hallazgos de los efectos superficie. Esta publicación fue una de sus mayores contribuciones científicas por lo cual se le otorgó el premio Nobel en 1932. El éxito logrado por la teoría de Langmuir se debió en gran parte a la comprobación de la hipótesis de Rayleigh: "Las monocapas formadas en la interfase debían de ser del orden molecular", por lo que hoy en día se les conoce como Monocapas de Langmuir. Los últimos estudios realizados por Langmuir sobre monocapas flotando sobre líquidos lo llevaron a desarrollar técnicas experimentales para estudiar proteínas, formando así películas delgadas del orden molecular con características importantes para el estudio de la interacción de enzimas y toxinas en las membranas celulares.

En 1935 Katherine Blodgett (1898-1979) quien trabajaba en la compañía General Electric bajo la dirección de Langmuir, logró transferir las monocapas de Langmuir de diferentes materiales de la subfase líquida a un sustrato sólido¹⁶, siendo ella fue la primera persona en desarrollar el método para la fabricación de múltiples capas cada una de grosor molecular sobre sólidos. Esto lo logró sumergiendo un sustrato sólido en la interfase líquido/gas en la balanza de Langmuir y depositando después la sustancia que formaría la monocapa, dejándola alcanzar un equilibrio con la interfase, posteriormente se comprimía la monocapa con una barrera rígida que podía ser controlada, a la misma razón con la que se extraía el sustrato de la interfase. Mediante el uso repetitivo de este método Blodgett fue capaz de obtener multicapas cada una de grosor del orden molecular, logrando con ello lo que hoy en día conocemos como Películas de Langmuir-Blodgett¹⁹.

Estructura Molecular y Propiedades de las Monocapas

Formación y estabilidad de las monocapas

La superficie de un líquido siempre tiene energía libre en exceso, esto debido a la diferencia en el ambiente entre las moléculas de la superficie y las moléculas del bulto (subfase). En particular, en el agua las fuerzas de puentes de hidrógeno tienden a establecer redes definidas que pueden ser modificadas cerca de la superficie del agua. La termodinámica de superficies líquidas que ha sido descrita por Gines²⁰. **La tensión superficial** (γ) de una interfase plana está dada por la derivada parcial:

$$\gamma = (\delta G / \delta s)_{T,P,n_i} \quad (1)$$

donde G es la energía libre de Gibbs del sistema, s es el área de la superficie, y T la temperatura, P la presión y n_i es la composición las cuales se mantienen constantes. La tensión superficial del agua pura es 73 mNm^{-1} (dyn cm^{-1}) a 20°C y presión atmosférica; estos valores son superiores a los de la mayoría de los líquidos ordinarios, por lo cual, el agua ultra pura es considerada la mejor subfase para formar monocapas de Langmuir.

Una monocapa de Langmuir es una película delgada de grosor molecular insoluble en agua que se encuentra en la interfase agua/aire. Las moléculas que forman las monocapas de Langmuir tienen la importante característica de tener dos regiones distintas, una región hidrofóbica (insoluble en agua) la cual generalmente esta conformada por cadenas hidrocarbonadas y, otra región hidrofílica (soluble en agua) formada por grupos de ácidos carboxílicos, aminas, sulfatos o alcoholes, entre otros grupos funcionales. Las moléculas que poseen estas características son llamadas moléculas anfifílicas. Las fuerzas predominantes sobre la región del grupo hidrofóbico son del tipo de Van der Waals ($1/r^{12}$ y $1/r^6$), mientras que la interacción molecular predominante en el grupo hidrofílico es de tipo coulombico ($1/r^2$). Por lo tanto, éstas moléculas al ser depositadas sobre la superficie del agua tenderán a cubrir la superficie disponible esparciéndose y orientándose de manera conveniente en la interfase agua/aire, manteniendo el grupo hidrofílico en contacto o sumergido en el agua y al grupo hidrofóbico tratando de evitar el contacto con el agua²¹. En la Figura 1 se muestra una representación general de una monocapa de Langmuir en la interfase agua/aire. Cuando se deposita una pequeña cantidad de una solución de moléculas anfifílicas sobre la superficie el agua, las moléculas no se mantendrán unidas sino que la solución se dispersará rápidamente hasta cubrir toda el área disponible, como la distancia entre las moléculas es muy grande (se encuentran separadas a distancias de varios diámetros moleculares) las interacciones entre ellas son pequeñas por lo cual éstas formarán un gas en

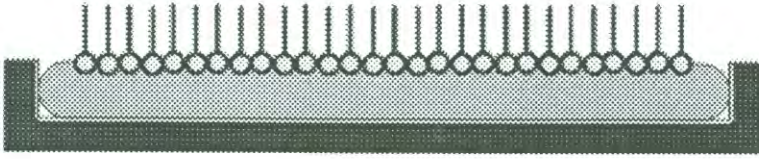


Figura 1. Representación esquemática de una Monocapa de Langmuir

dos dimensiones y bajo estas condiciones la monocapa tendrá un efecto mínimo sobre la tensión superficial del agua. Cuando el sistema de barreras es usado para reducir el área de la superficie disponible, las moléculas experimentan un efecto repulsivo entre ellas; por medio de la compresión las moléculas comienzan a compactarse hasta adquirir un alto orden molecular, al estar cada vez más cerca las moléculas unas de otras la densidad de las moléculas y la presión superficial se incrementan. La Presión Superficial es el análogo bidimensional de la presión, la cual se denota por la letra griega π (Π) y se define como¹⁶:

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (2)$$

donde γ_0 es la tensión superficial del agua pura y γ es el valor de la tensión superficial en presencia de la monocapa a un área determinada.

En la Figura 2 se muestra la deposición de moléculas anfifílicas sobre la superficie del agua y la formación de una monocapa de Langmuir, así como la obtención de la isoterma correspondiente. Las moléculas en un inicio se esparcen por toda la superficie hasta alcanzar los bordes exteriores de la Balanza de Langmuir la cual contiene al agua. Posteriormente, las barreras que se encuentran en los extremos “barren” la superficie, comprimiendo la monocapa; las moléculas se compactan hasta ordenarse de tal manera que los grupos hidrofílicos quedan en contacto con el agua y los grupos hidrofóbicos quedan orientados hacia el aire, incrementando de esta manera la presión superficial de la monocapa formada.

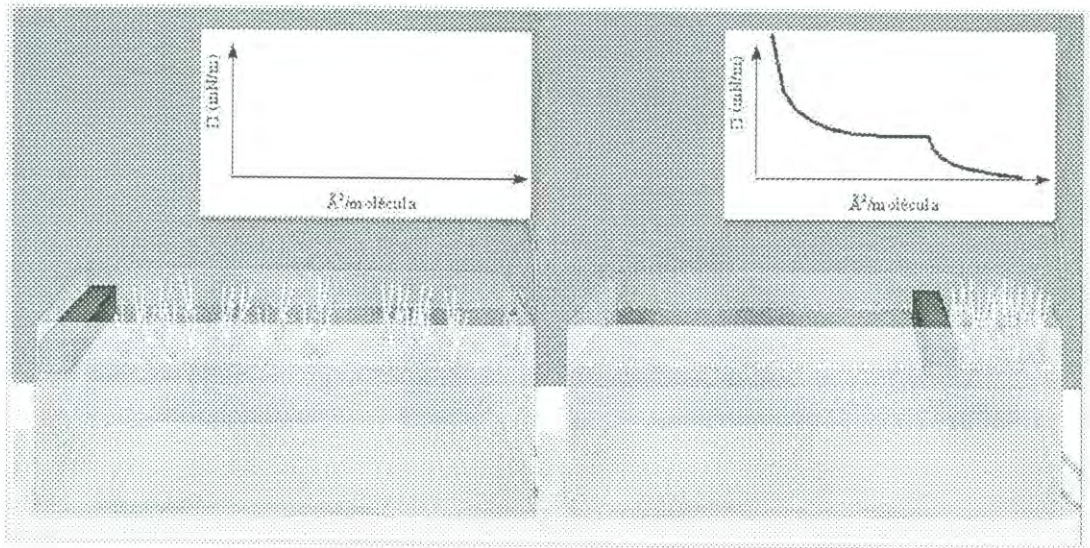


Figura 2. Formación de la monocapa de Langmuir y obtención de la isoterma correspondiente

Isotermas

La isoterma es el mejor método para obtener información sobre el estado termodinámico que presenta una monocapa a una temperatura dada, ya que a través de ellas se pueden identificar transiciones de fase que nos indican cambios termodinámicos que ocurren en la monocapa y a la vez obtener información sobre el área aproximada que ocupan las moléculas. Desde la primera isoterma obtenido por Anger Pockels²², se aceptó la importancia de su técnica en la comunidad científica y se consideró como fundamental en el estudio de las propiedades termodinámicas de las monocapas de Langmuir. Esto se debe principalmente a la capacidad de controlar la velocidad de la compresión de las barreras y poder medir simultáneamente la presión superficial presente en la monocapa. Al comprimir las moléculas anfifílicas, éstas comienzan a ordenarse, incrementando de esta manera la presión superficial haciendo que la monocapa presente diferentes fases que indican cambios termodinámicos en la superficie. La presión superficial es determinada suspendiendo una pequeña lámina de un material caracterizado (Placa de Wilhelmy) en el agua, entonces se mide la fuerza con la que es jalada hacia abajo del líquido; esta fuerza que jala un pequeño brazo metálico es medida por medio de la deflexión de luz infrarroja que emite un diodo para después ser traducida a una señal eléctrica por un sensor electrónico^{19, 23}.

La figura 3 muestra una isoterma generalizada para un ácido graso. La monocapa es muy diluida cuando el área por molécula está en el rango de los cientos de Å^2 , en este caso se tiene un gas en dos dimensiones. Cuando el área por molécula disminuye (incremento en la presión superficial) se presentan una meseta que denota la coexistencia entre la fase gas y una fase que tradicionalmente se le conoce como líquido expandido (LE o L1). En esta nueva

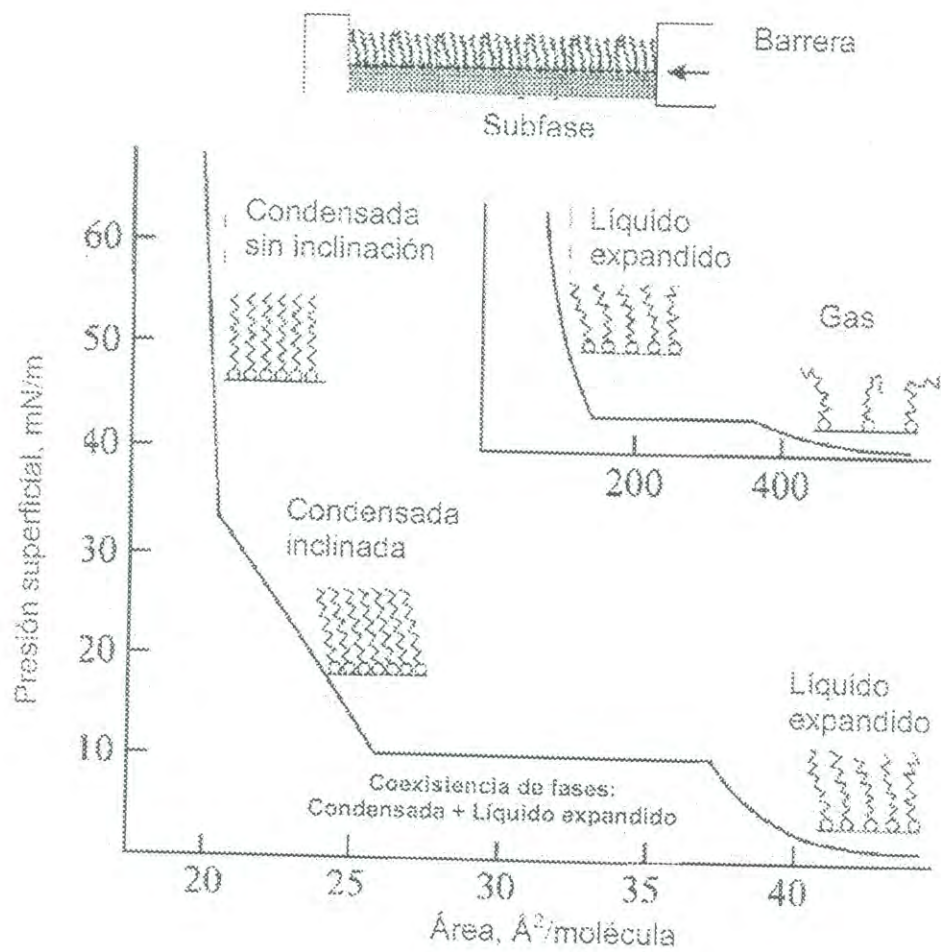


Figura 3. Diagrama general de una isoterma de ácidos grasos.²¹

fase, al igual que en la fase gaseosa, no hay señal detectable por medio de difracción de rayos X, debido probablemente a que las cabezas de las moléculas son translacionalmente desordenadas y las cadenas hidrocarbonadas son conformacionalmente desordenadas. Una futura compresión en la monocapa produce un cambio brusco en la isoterma indicando una transición de fase de líquido expandido (LE) a una fase más condensada (LC); usualmente una meseta o plato indica una transición de primer orden, en muchos sistemas esta meseta no es perfectamente horizontal, lo cual hacía pensar que se estaba violando la regla de las fases de Gibbs, ésto fue fuente de muchas controversias con respecto a la existencia de una transición, orden y número de transiciones. Esta controversia fue resuelta directamente mediante la observación óptica de la coexistencia de fases²⁴ utilizando la técnica de microscopía de fluorescencia de luz polarizada. La monocapa es menos compresible en la fase condensada (LC) que en la fase líquido expandido (LE). En el rango de área de 20 a 25 Å² por molécula, la monocapa posee el mismo grado de orden traslacional en ambas regiones de la isoterma, la cual puede ser, dependiendo de la temperatura, cualquiera de las dos fases sólidas, las cuales tienen un orden de corto alcance traslacional. Los rayos X muestran que las cadenas hidrofóbicas de las moléculas están alineadas paralelamente una a otra en ambas secciones de la isoterma, y la diferencia puede deberse a la orientación de sus cadenas hidrocarbonadas; las cuales pueden estar inclinadas o perpendiculares a la superficie del agua. Otra diferencia en las fases puede deberse a la dirección de la inclinación, la cual puede ser hacia los vecinos cercanos, hacia los vecinos más cercanos o hacia una inclinación intermedia de las dos anteriores. A bajas temperaturas, los experimentos de rayos X han revelado la existencia de fases bidimensionales. Las fases gas (G) y líquido expandido (LE) son fluidos bidimensionales, las fases líquido condensado (LC) y sólido (S) son mesofases, ahora se sabe que son fases únicas, y dependiendo de la presión y temperatura se pueden tener

mesofases análogas a las mesofases tridimensionales de cristales líquidos.

Colapso en las Monocapas de Langmuir

Las monocapas de Langmuir y las películas de Langmuir-Blodgett (LB, las cuales se obtienen al transferir la monocapa de Langmuir a un sustrato sólido) son de gran interés en biología para modelar membranas²⁵, tienen una potencial aplicación en electrónica²⁶, en la fabricación de electrodos²⁷ o biosensores²⁸. Sin embargo, la mayoría del trabajo sobre las películas de Langmuir se ha enfocado en la parte de la isoterma donde hay solo una película monomolecular, de baja o moderada presión superficial $\leq 35 \text{ mNm}^{-1}$. Solamente en las últimas tres décadas se han empezado a estudiar monocapas colapsadas. El colapso en la monocapa a menudo se identifica en las isotermas como el punto donde la presión superficial alcanza un máximo y es posible observar un pico o una meseta²¹. A este punto se le conoce normalmente como Presión de colapsado.

Se ha reportado que el colapso también se presenta a bajas presiones superficiales, donde se cree que el sistema está cerca de la llamada presión de equilibrio de esparcimiento (ESP)²¹. Ésta es la presión donde la monocapa bidimensional coexiste con una fase en bulto (cristales), por lo tanto cerca de la ESP todas las monocapas son metaestables y el colapsado debería ocurrir como una relajación de la película hacia la ESP.

Parámetros que Modifican la Isotherma

La forma de una isoterma depende de la naturaleza del material y de la temperatura, principalmente, ya que se puede observar un número diferente de transiciones de fase al variar la temperatura. A partir de estudios realizados con

moléculas similares al ácido esteárico se ha encontrado que otro parámetro que modifica la forma de la isoterma es la longitud de la cadena hidrocarbonada, ya que una reducción en la cadena puede ser interpretada como un incremento en la temperatura¹⁶. En la figura 4 se muestra un diagrama general de los cambios en la forma de una isoterma debido al incremento de la temperatura.

Otro parámetro que modifica la forma de la isoterma es la velocidad a la cual se lleva a cabo la compresión, ésto se debe a que entre mayor sea la velocidad de compresión, el sistema se aleja del equilibrio termodinámico. Por esta razón, es importante comprimir la monocapa a bajas velocidades¹⁶.

Estudio de las Monocapas de Langmuir

La morfología, estructura y texturas que presentan las monocapas de Langmuir pueden ser estudiadas a través de diferentes técnicas experimentales como son: Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)²⁹, Microscopía de Ángulo de Brewster (BAM)³⁰, Elipsometría³¹, difracción de Rayos X a ángulos restantes (GIXD)³² y espectroscopia de infrarrojo. La técnica de elipsometría se basa en el análisis de los cambios de polarización producidos por la reflexión de la luz al atravesar el medio³³, ya que la elipsometría depende sólo de la entrada y salida de fotones de luz, ésta técnica por lo tanto no requiere que el sistema se encuentre al vacío. Gracias a esta técnica se pueden realizar estudios de películas del orden molecular, así como de multicapas depositadas en sustratos sólidos, debido a que su resolución puede llegar a ser del orden de 0.01 nm.

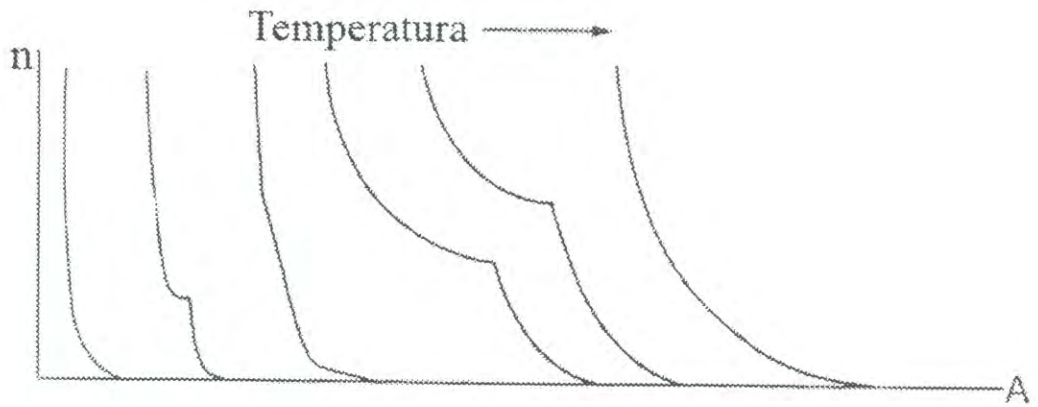


Figura 4. Efecto del incremento de la temperatura sobre la forma de una isoterma¹⁶

La difracción de rayos X es la principal técnica utilizada para estudiar la estructura de monocapas que se encuentran directamente sobre la superficie del agua. Fue por medio de esta técnica que se descubrió que en la Fase líquido condensado 1 (L_1) las moléculas mantienen sus largas cadenas hidrocarbonadas paralelas entre sí, pero formando un cierto ángulo de inclinación con respecto a la superficie del agua. Mientras que la fase líquido condensado 2 (L_2) las moléculas se encuentran aún más empaquetadas y sus cadenas hidrocarbonadas se encuentran paralelas entre sí y perpendiculares a la superficie del agua²¹.

Técnica de Langmuir-Blodgett (LB)

Deposición de las Películas de Langmuir sobre un Sustrato Sólido

La técnica de Langmuir permite fabricar películas delgadas con espesores de nivel molecular, las cuales se llevan a cabo transfiriendo la monocapa de Langmuir sobre un sustrato sólido, el cual se hace pasar varias veces a través de la interfase agua/aire; la película formada se conoce como Película de Langmuir-Blodgett. Durante el proceso de transferencia al sustrato sólido la presión de la monocapa se debe mantener constante con la finalidad de que no ocurra una transición de fase durante la deposición y de esta manera obtener una película homogénea. En la Figura 5 se muestra un diagrama general de la transferencia de una monocapa sobre un sustrato sólido. Una buena medida de que tan eficiente ha sido el proceso de transferencia, el cual se mide cada vez que el sustrato pasa a través de la interfase, es la Razón de Transferencia, la cual queda indicada por la siguiente relación¹⁹:

$$TR = \frac{\text{Área de la monocapa extraída de la subfase a presión constante}}{\text{Área del sustrato sumergido en la subfase}}$$

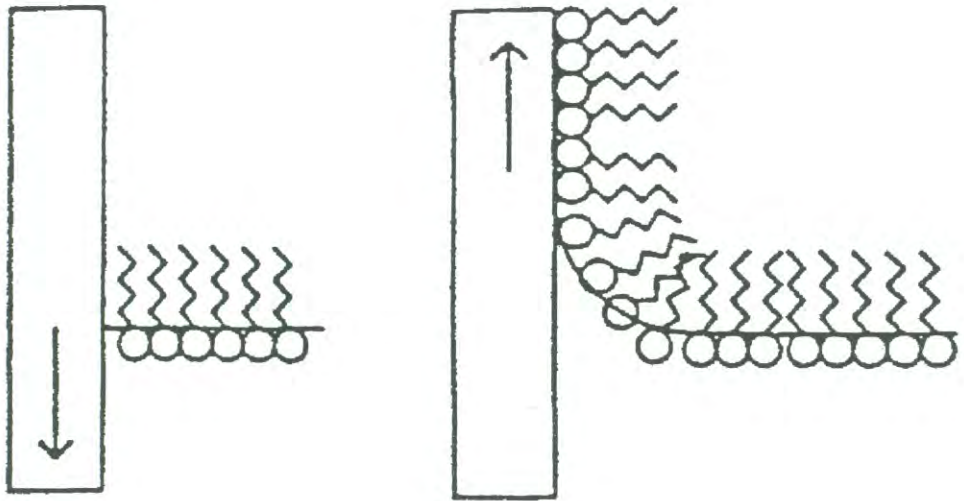


Figura 5. Diagrama general de la transferencia de una monocapa sobre un sustrato sólido

(esr.elte.hu/~noemi/labor/lb/abra5.gif)

Tipos de Sustratos

En general, existen dos clases de sustratos sobre los cuales se puede extraer la monocapa: los sustratos hidrofílicos y los sustratos hidrofóbicos. Cuando el sustrato es hidrofóbico, las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas que están formando la monocapa se adhieren al sustrato cuando éste atraviesa por primera vez la interfase, tal como se muestra en la Figura 6.a, cuando el sustrato es retirado de la subfase las terminaciones hidrofílicas de las moléculas presentes en la monocapa, se adhieren a las cabezas polares de las moléculas presentes en el sustrato tal como se muestra en la Figura 6.b. Cuando el sustrato es de naturaleza hidrofílica, la transferencia de la monocapa no se lleva a cabo durante la primera inmersión del sustrato en la subfase, debido a la naturaleza hidrofílica del sustrato causará que se forme un menisco curvado hacia arriba de este y el agua. Por lo que es necesario que el sustrato se encuentre inmerso en la subfase antes de la formación de la monocapa. Conforme es retirado el sustrato, las cabezas polares de las moléculas presentes en la monocapa se adherirán al sustrato, tal como se muestra en la Figura 7. Si este procedimiento se repite se formara un sistema de multicapas^{16, 19}.

Existe un gran número de materiales sobre los cuales se pueden extraer las monocapas de Langmuir, pero los más utilizados para llevar a cabo su caracterización utilizando Microscopio de Sonda de Barrido (Fuerza Atómica, Tunelamiento, etc) son los siguientes: Mica, vidrio pulido y cuarzo, entre otros.

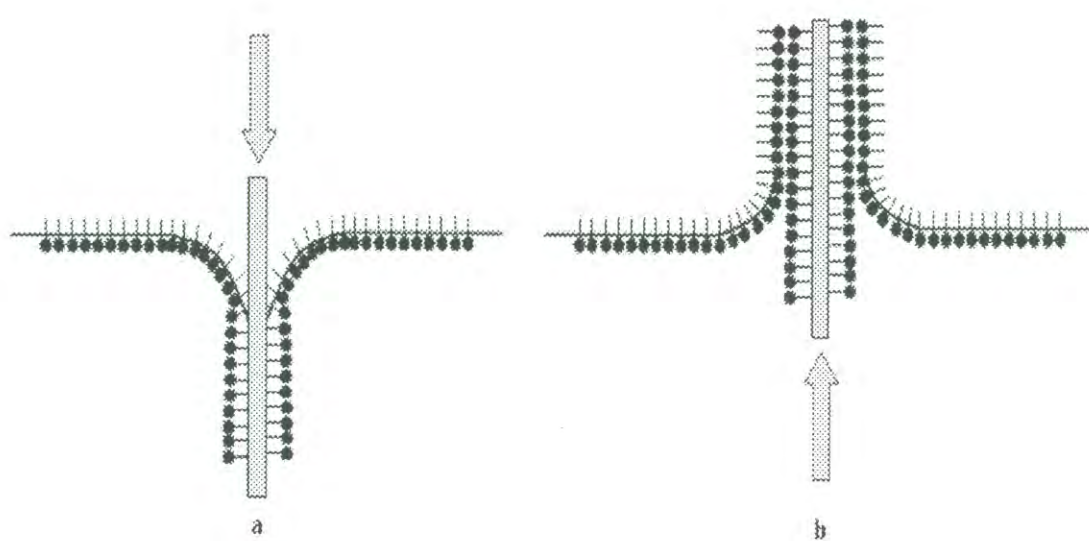


Figura 6. Deposición de una monocapa de Langmuir sobre un sustrato de naturaleza hidrofóbica

(<http://chem.ch.huji.ac.il/~eugeniiik/history/blodgett.html>)

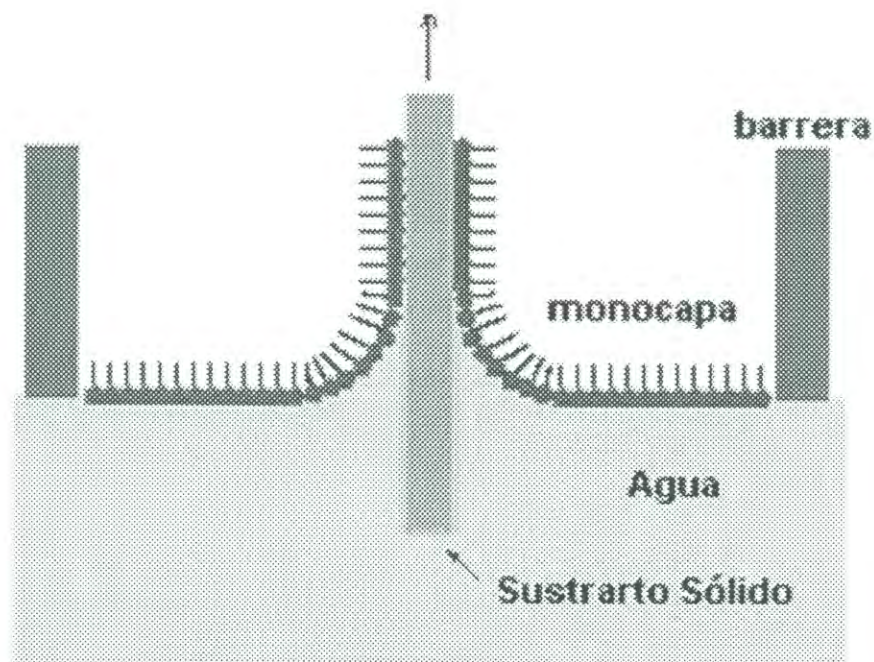


Figura 7. Transferencia de una monocapa de Langmuir a un sustrato hidrofílico

(<http://chem.ch.huji.ac.il/~eugeniik/history/blodgett.html>)

La Mica, ya que este material tiene una superficie atómicamente plana y limpia y además las moléculas se adhieren fácilmente a su superficie; por lo cual la mica es el sustrato por excelencia sobre el cual se transfieren las monocapas de Langmuir. Los cristales que forma la mica se encuentran ensamblados en estructuras de capas sobrepuestas que se pueden separar fácilmente sin una preparación que requiera métodos laboriosos. La superficie clivada de la mica es químicamente libre de impurezas y mantiene carga negativa en soluciones, lo que la transforma en un sustrato altamente hidrofílico. Otro sustrato muy utilizado, principalmente para caracterizaciones espectroscópicas, es el vidrio pulido y el cuarzo, su superficie no es completamente plana ya que presenta rugosidad del orden de algunos ángstrom (1×10^{-10} m), pero es suficientemente plana para la mayoría de sus aplicaciones. Al igual que la mica se trata de un sustrato hidrofílico pero en menor grado, ya que su densidad de carga en soluciones es menor; una desventaja de este tipo de sustratos es que debe ser sometido a un riguroso protocolo de limpieza para eliminar impurezas antes de extraer la monocapa¹⁶. Otros materiales utilizados como sustrato son placas recubiertas de oro o plata, lo que hace que el sustrato sea altamente conductivo, químicamente inerte y atómicamente plano; recubrimientos con materiales semiconductores como el arsenato de galio y silicón; y el grafito un material de naturaleza conductiva, que se encuentra altamente orientado en su superficie, es hidrofóbico e inerte y al igual que la mica se encuentra estructurado en capas que pueden ser fácilmente clivadas³⁴.

Tipos de Deposición

El proceso de deposición es controlado por la hidrofobicidad o hidrofiliidad del sustrato. El contacto entre las moléculas anfifílicas presentes en la monocapa y el sustrato es debido a interacciones del tipo Van der Waals.

Existen tres técnicas de deposición:

La deposición tipo Y es el método más común para depositar películas de Langmuir sobre un sustrato sólido, el sustrato utilizado es de naturaleza hidrofílica el cual interacciona con las cabezas polares de las moléculas anfifílicas que están formando la monocapa. El sustrato debe ser sumergido en la subfase antes de la formación de la monocapa, conforme es extraído el sustrato las moléculas serán transferidas como se ilustra en la Figura 8, si este paso se repite varias veces entonces se forma un sistema de multicapas, el cual seguirá creciendo a cada entrada y salida del sustrato en la subfase^{16, 19}. La deposición tipo X es menos utilizada que la deposición tipo Y, ya que se producen con mayor dificultad y su condición es menos favorable y casi siempre su configuración dura poco tiempo antes de que se transforme en tipo Y^{16, 19}, el sustrato utilizado en este tipo de deposición es de naturaleza hidrofóbica, el cual interacciona con las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas que forman la monocapa. En la Figura 9 se ilustra el proceso de la formación de multicapas utilizando la técnica de deposición tipo X. El último tipo de deposición es la deposición tipo Z, la cual es la menos utilizada, en este caso el sustrato es de tipo hidrofílico y al igual que la deposición tipo Y este interacciona con la parte hidrofílica de las moléculas que forman la monocapa. En la Figura 10 se muestra la técnica de deposición tipo Z.

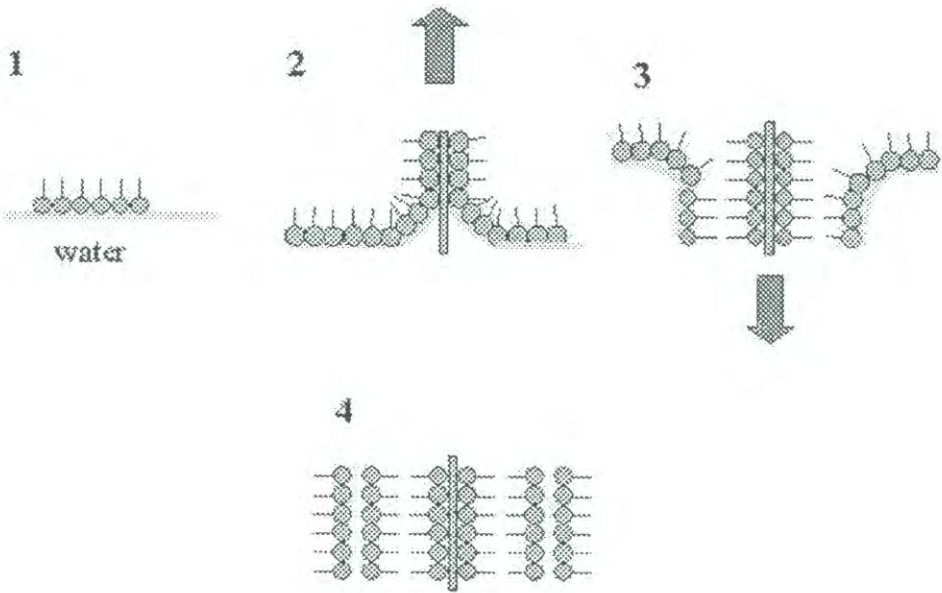


Figura 8. Esquema general de la deposición tipo Y

(www.inapg.inra.fr/.../asteq/elba/lb_tech.htm)

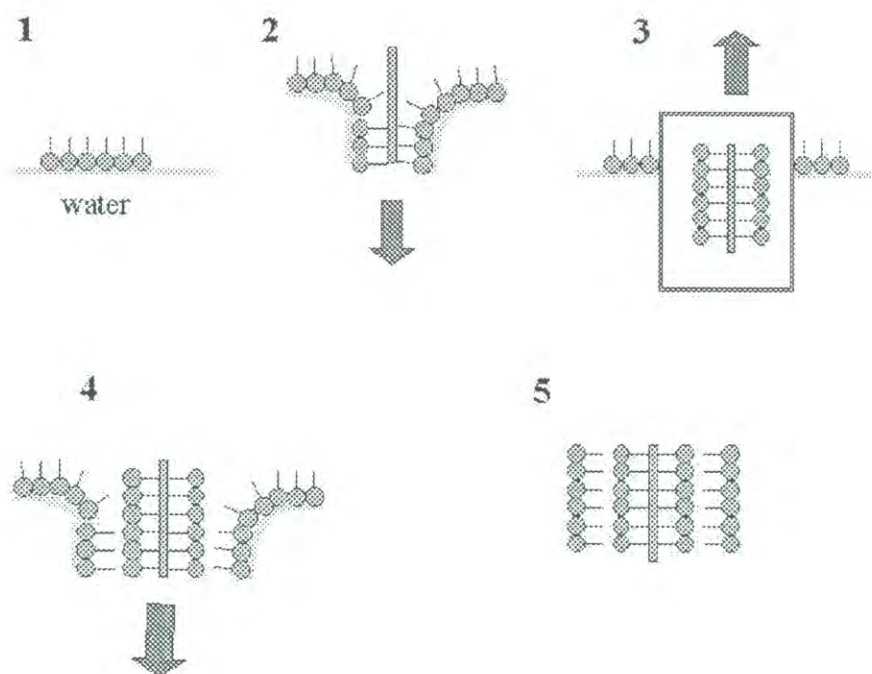


Figura 9. Proceso de la formación de multicapas utilizando la técnica de deposición tipo X

(www.inapg.inra.fr/.../asteq/elba/lb_tech.htm)

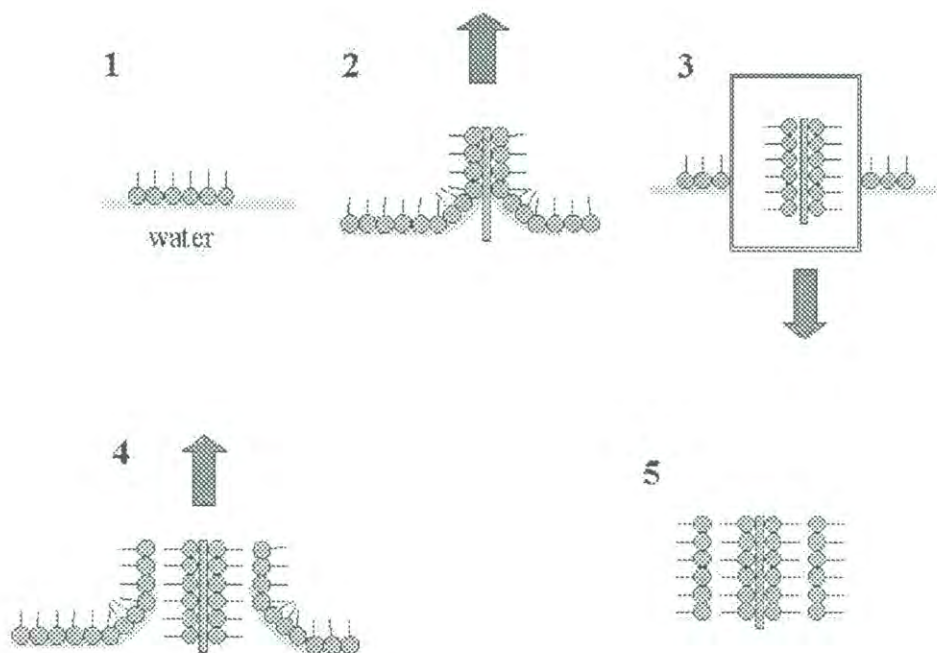


Figura 10. Técnica de deposición tipo Z

(www.inapg.inra.fr/.../asteq/elba/lb_tech.htm)

Microscopía de Fuerza Atómica

Históricamente, los microscopios han sido instrumentos ampliamente utilizados en las ciencias biológicas, desde los microscopios ópticos más sencillos hasta los más modernos microscopios de resolución atómica. El microscopio de fuerza atómica se incluye en un amplio grupo de técnicas denominadas Microscopía de sonda de barrido o Microscopías de sonda próxima (Scanning probe microscope, SPM). Todas las técnicas SPM se basan en el rastreo de la superficie de la muestra por una palanca en la que se encuentra acoplada una sonda, generalmente en forma de punta, que se desplaza sobre la muestra siguiendo líneas paralelas. Las alteraciones de la posición de esta sonda proporcionan información de las propiedades de la superficie de la muestra y dan lugar a una imagen. Estas técnicas son usadas para estudiar las propiedades físicas superficiales como los son: la conductividad superficial, distribución estática de carga, fricción localizada, campos magnéticos y módulo de elasticidad de materiales conductores y aislantes desde un nivel atómico hasta el orden de micras³⁴.

En 1986, G. Binnig y H. Rohrer fueron galardonados con el Premio Nobel de Física por idear el microscopio de efecto túnel. Durante ese mismo año, G. Benning, C.F. Quate y Ch. Gerber, desarrollaron el primer microscopio de fuerza atómica (AFM)³⁵ basado en modificaciones del microscopio de efecto túnel. El funcionamiento del AFM es muy similar al del microscopio de efecto túnel, pero en lugar de detectar una señal de diferencia de potencial, la sonda del AFM detecta la topografía de la superficie por diferencias en las fuerzas atómicas de atracción y/o repulsión. La resolución de ambos microscopios es muy similar (resolución atómica) pero la ventaja del AFM es que puede ser

utilizado para observar muestras no conductoras, como lo son las muestras biológicas. La microscopía de fuerza atómica se empezó a aplicar a muestras biológicas dos años después de ser desarrollado, en 1988, aunque debido a las dificultades en la manipulación y observación de este tipo de muestras, fue hasta 1992 cuando se estableció su uso biológico³⁶. A diferencia de otros microscopios de elevada resolución, el AFM permite la visualización de muestras sin necesidad de tinción previa y en solución, permitiendo la observación de muestras en tiempo real y la realización de variaciones de la muestra *in situ*. De forma similar a otras microscopías, las muestras para AFM deben encontrarse fijadas en un soporte sólido, el cual debe ser atómicamente plano, como por ejemplo la mica. La adhesión de la muestras al sustrato se produce generalmente debido a fuerzas del tipo electrostático o de Van der Waals.

Microscopio de Fuerza Atómica

Esta técnica se fundamenta en la medida de las fuerzas de interacción entre una punta muy fina dispuesta en el extremo de una palanca flexible (cantilever) y la superficie de la muestra, mediante realización de una serie de rastreos horizontales; la muestra debe ser depositada sobre un soporte sólido por el cual debe tener una alta afinidad. En el AFM, un rayo láser incide sobre la superficie del cantilever en el extremo en el cual se encuentra la punta; las deflexiones del cantilever producidas por la interacción entre la punta y la muestra son detectadas por un detector óptico (fotodiodo), mediante la variación del ángulo de reflexión del láser³⁷. En la Figura 11 se muestra un esquema del funcionamiento de un microscopio de fuerza atómica. El rastreo de la superficie por la punta da lugar a la obtención de imágenes topográficas tridimensionales de alta resolución, tanto lateral (x,y) como vertical (z), derivadas del movimiento del piezoeléctrico. El rastreo lateral puede realizarse

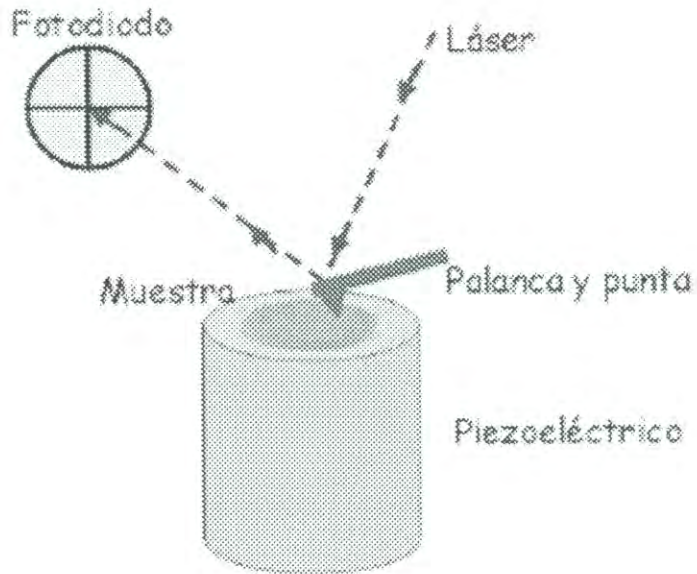


Figura 11. Esquema general del funcionamiento de un Microscopio de Fuerza Atómica

(www.uh.edu/~zcaof/afm.jpg)

desde unos pocos nm hasta más de un centenar μm , pudiendo conseguir una resolución lateral de alrededor de 1 Å. La resolución vertical puede llegar a ser inferior al Å.

Aplicaciones de la Microscopia de Fuerza Atómica

El AFM se ha utilizado en diversos estudios con materiales biológicos. Los ejemplos principales incluyen ácidos nucleicos, proteínas en solución, células vivas, membranas, proteínas unidas a membranas, cristales bidimensionales de proteínas, entre otros³⁹.

Las ventajas que presenta el AFM con respecto a otros tipos de microscopios³⁸ son:

- Relación señal-ruido muy elevada que permite la visualización de superficies a una resolución inferior al nm
- Capacidad de estudiar la nanoestructura de la superficie de películas de lípidos y cambios conformacionales de biomoléculas en medio acuoso y en tiempo real.
- Posibilidad de manipulación de la muestra durante el proceso de visualización de la misma.
- Posibilidad de medir directamente propiedades físicas de la muestra.

Una de las primeras moléculas de tipo biológico que fue visualizada por AFM fue el ADN³⁶. La visualización se realizó en aire, aunque posteriormente se inició su estudio en medio líquido. La posibilidad de observar estructuras moleculares como el ADN en medio líquido, permitió la visualización de procesos biológicos sencillos con esta molécula, como puede ser su degradación enzimática³⁹, cambios conformacionales o incluso la observación y manipulación de los cromosomas. Además del ADN, otras moléculas han sido

estudiadas mediante AFM, como es el caso de las proteínas, de las que se ha estudiado su estructura tanto de manera aislada como sobre soportes lipídicos. Algunos ejemplos de proteínas estudiadas por esta técnica son: filamentos de actina, miosina o algunas proteínas globulares⁴⁰.

Microscopia de Ángulo de Brewster (BAM)

El desarrollo de técnicas sofisticadas para el análisis de superficies han permitido obtener en detalle los diagramas de fase, estructura y morfología de monocapas de moléculas de naturaleza anfifílica. Una de las mayores ventajas en el desarrollo de las técnicas de caracterización de superficies es que estas no son invasivas, lo cual es de suma importancia en circunstancias donde la estructura de la superficie no debe ser contaminada o perturbada. El BAM es una de las técnicas ópticas que ha sido ampliamente usada en los últimos años, sobre todo en la investigación de películas delgadas; principalmente en la caracterización de monocapas de espesor molecular en interfase agua/aire. A principios del siglo XIX, el físico escocés Sir David Brewster, descubrió el fenómeno de la polarización de la luz reflejada a ciertos ángulos específicos. En estudios de polarización de la luz, Brewster descubrió que cuando la luz incide en una superficie reflectora a cierto ángulo, la luz reflejada de esa superficie está polarizada en un solo plano, es decir, en un plano polarizado. Este ángulo se conoce comúnmente como ángulo de Brewster, el cual se define como:

$$\tan^{-1} \theta_B = n_2/n_1 \quad (3)$$

Donde n_1 es el índice de refracción del medio 1 y n_2 el índice de refracción del medio 2, lo cual se muestra en la figura 12.

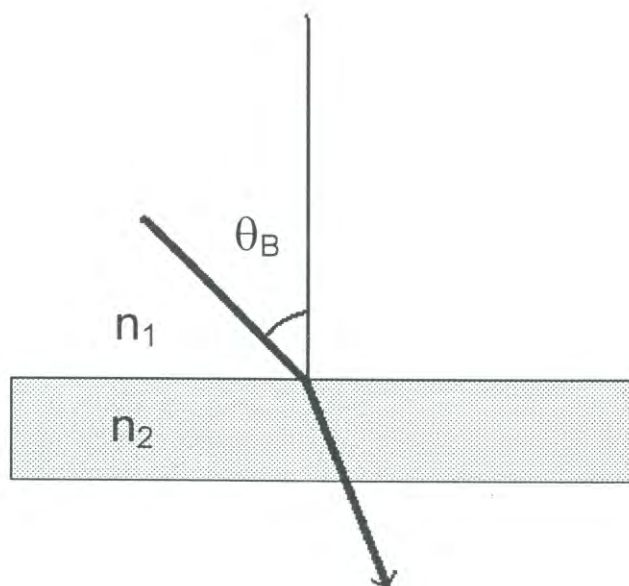


Figura 12. Representación esquemática de un haz de luz en el ángulo de Brewster

El microscopio de Ángulo de Brewster se basa en el principio de la reflectividad cero en la interfase agua/aire o en un sustrato dieléctrico para un haz de luz linealmente polarizado en dirección vertical (polarización p) en el ángulo de Brewster de incidencia. El ángulo de Brewster es determinado por los índices refractivos de los sustratos implicados. Por ejemplo, para las interfases agua/aire, aire/vidrio y aire/diamante, los ángulos de Brewster son 53, 57 y 67.5, respectivamente. Cuando se encuentra una monocapa en alguna fase condensada, con diferente índice de refracción en la interfase agua/aire, ocurrirá un cambio en la reflectividad medida. La luz reflejada puede utilizarse para formar una imagen de la morfología de la monocapa debido a la diferencia entre la monocapa y la subfase: el espesor de una monocapa en una interfase agua/aire es extremadamente pequeño, aproximadamente 5% de la longitud de onda de la luz visible. El efecto relativo que tiene el campo eléctrico reflejado de una superficie de agua es por la tanto muy pequeño y la monocapa bajo condiciones normales será absolutamente invisible. Sin embargo, si la superficie del agua está iluminada con luz linealmente p-polarizada en el ángulo de Brewster antes de depositar la monocapa en la interfase agua/aire, no hay reflexión de la superficie del agua; entonces el fondo es totalmente oscuro y después de depositar la monocapa ésta puede ser visualizada, lo cual se representa esquemáticamente en la Figura 13. En términos generales, un microscopio de ángulo de Brewster esta compuesto por un goniómetro o dos que controlan dos brazos, en uno de los cuales se encuentran un láser y un polarizador; y en el otro brazo una cámara, un analizador y un objetivo, tal como se muestra en la Figura 14.

La microscopia de ángulo de Brewster ha sido utilizada en varios estudios, ya que permite la visualización directa de transiciones de primer orden (la coexistencia de dos fases con diferentes densidades) las cuales se manifiestan como un cambio en la forma del contraste, y las transiciones de

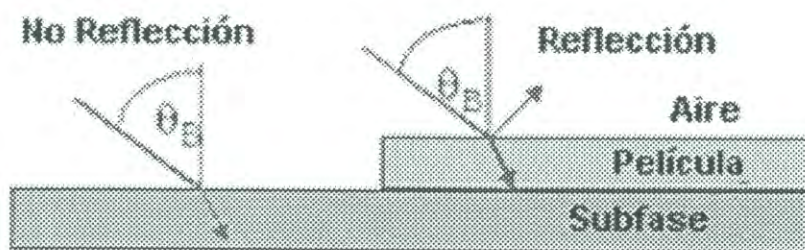


Figura 13. Principio físico del BAM
(www.nanofilm.de/uploads/pics/bam_brewster.jpg)

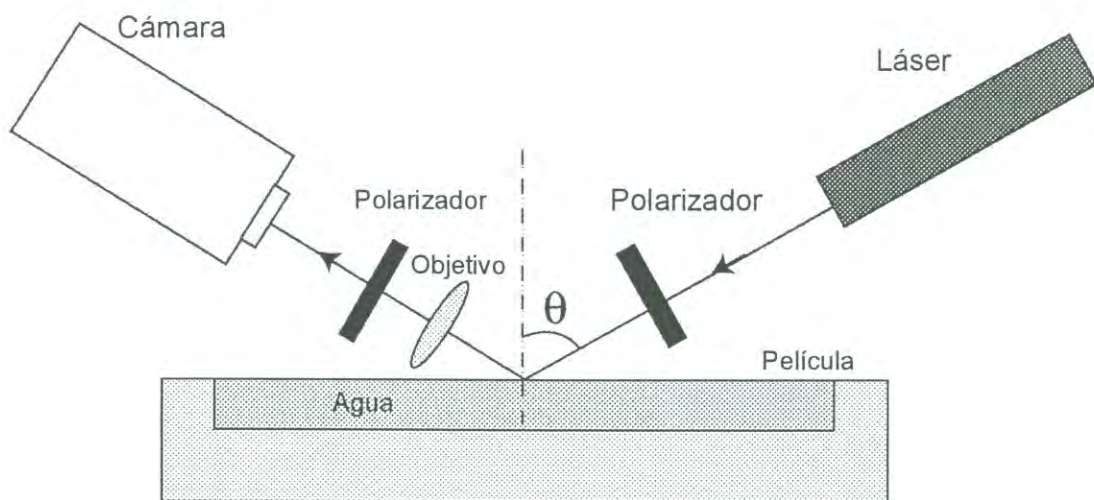


Figura 14. Componentes de un BAM
(www.inchm.bris.ac.uk/people/meldrum/BAM.html)

segundo orden pueden ser determinadas por un cambio gradual en el contraste de la imagen⁴¹. Esta técnica ha sido utilizada para comparar las propiedades de Gibbs (de adsorción) de las monocapas. Por mediciones de la reflectividad relativa, el BAM ha sido utilizado para distinguir entre dominios isotropicos de monocapas formadas por mezclas de β -caseína y monooleína⁴². Esta técnica también ha sido usada en investigaciones de interacciones lípido/proteína, en membranas celulares/surfactantes pulmonares⁴³.

Dicroísmo Circular

La teoría del dicroísmo circular fue desarrollada por Biot y Fresnel⁴⁴, un rayo de luz polarizado en un plano puede considerarse formado por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda, estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes en la muestra. La interacción de la radiación con la muestra induce un desfase y cambio de magnitudes diferenciales en ambos componentes circularmente polarizados de la luz, y estos fenómenos provocan una rotación del plano de la polarización en un ángulo α y la distorsión de este plano genera una elipse, tal como se muestra en la figura 15.⁴⁵ La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados varían de acuerdo con la longitud de onda, pudiéndose obtener espectros de estos fenómenos, es decir, gráficas de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda. Los espectros de dicroísmo circular de las proteínas están divididos en tres regiones de la radiación electromagnética: el ultravioleta lejano (de 180 a 250 nm), la región aromática de ultravioleta cercano (250 a 300 nm) y ultravioleta cercano-visible (300 a 700 nm) y diferentes cromóforos presentes en las proteínas contribuyen en estas regiones. Los espectros en la región del

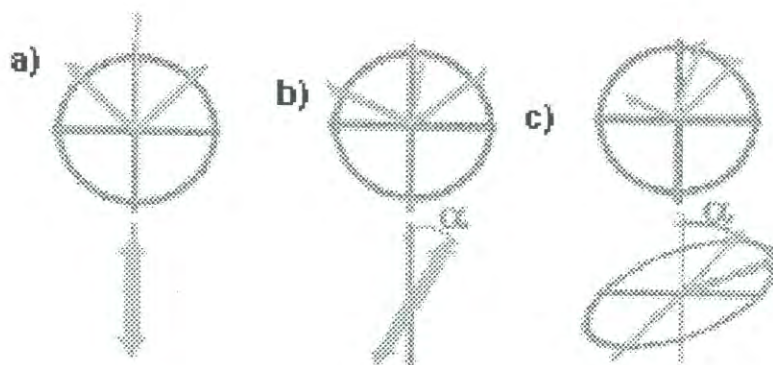


Figura 15. Esquema general de los componentes de un haz de luz en un plano polarizado. a) Se presentan los vectores de los componentes del haz antes de llegar a la muestra. b) Los mismos vectores después de interactuar con la muestra (fuera de fase). c) los mismos vectores cuando son absorbidos en forma diferencial

(<http://galeon.hispavista.com/scienceducation/Dicroismo.htm>)

UV-lejano, se deben principalmente a los enlaces amida que unen entre sí a los residuos de los aminoácidos, la asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína por lo que las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presentes en la proteína es decir del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices- α , hojas- β , giros y otros tipos estructurales de las proteínas)^{45, 46}. En la región del UV-cercano los cromóforos más importantes son los grupos disulfuro y aromáticos de las cadenas laterales de triptofano, tirosina y fenilalanina, ya que la asimetría en estos grupos químicos se debe en forma exclusiva a su entorno y como los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína, además, las señales en esta región son extremadamente sensibles a cambios en la estructura terciaria de la proteína. Además, las proteínas que poseen grupos prostéticos como cromóforos presentan bandas arriba de los 300 nm (por ejemplo, hemo-proteínas, flavo-proteínas, proteínas con grupos sulfuro o Fe), éstas bandas reflejan la conformación y el medio ambiente de estos grupos.^{45, 46}

Comportamiento de la Adsorción de Proteínas en Interfase Agua/Aire

Las proteínas son sustancias anfifílicas y poliméricas conformadas por aminoácidos conectados entre sí por enlaces peptídico. Las propiedades principales de las proteínas que son responsables de su actividad de superficie son su estructura característica, tamaño, carga, estabilidad y su naturaleza anfifílica. Desde el punto de vista de la estructura de la proteína, estas se pueden dividir en cuatro categorías: estructura primaria, la cual se refiere a la secuencia lineal de aminoácidos; estructura secundaria que hace referencia a

la configuración de las cadenas polipeptídicas en α -hélice, hojas- β u otro tipo de conformación; estructura terciaria y estructura cuaternaria⁴. Como las proteínas se adsorben en interfase agua/aire de alta energía, el desdoblamiento de las moléculas adsorbidas permitirá a las cadenas polipeptídicas orientarse con los grupos polares en la fase acuosa y los grupos no polares en la fase aire. Una molécula de proteína puede formar múltiples contactos con la superficie, lo cual incrementa la posibilidad de la adsorción. Además, la desorción de la proteína requiere de la ruptura simultánea de este múltiple número de contactos. De esta manera, las energías de activación para los procesos de adsorción desorción son considerablemente distintas⁴⁸. La densidad y distribución de carga en una molécula de proteína tiene una gran influencia en su actividad de superficie. Experimentalmente se ha encontrado que con frecuencia las proteínas exhiben mayor actividad de superficie cerca de su punto isoeléctrico. Ésto debido a la inhibición de las repulsiones electrostáticas de las moléculas adsorbidas con carga idéntica. La anfipaticidad de las proteínas también tiene una gran influencia sobre su adsorción y orientación en la interfase. La desnaturalización de la proteína conlleva a un incremento en su hidrofobicidad causando en general una depresión en su tensión superficial. Debido a ese aumento en la hidrofobicidad hay un aumento considerable de regiones no polares en la superficie, lo cual resulta en un aumento en la afinidad por la interfase agua/aire⁴⁸.

La adsorción de proteínas a la interfase puede ser considerado por tres procesos competitivos: a) difusión y acoplamiento de las moléculas del bulto a la interfase; b) penetración de nuevas moléculas dentro de la capa adsorbida y c) reordenamiento molecular o cambios conformacionales de las moléculas adsorbidas⁴⁷. El comportamiento de la dinámica de la tensión superficial de proteínas en solución ha sido medido por el método de la placa de Wilhelmy⁴⁹, gota pendiente⁴⁷ y técnicas axisimétricas de forma de gota (ADSA)⁵⁰. Varios

métodos han sido utilizados para investigar la cantidad de proteína adsorbida en la interfase, como lo es la elipsometría⁵¹, método de potencial de superficie, técnica de radioetiquetamiento⁵² y técnica de reflexión de neutrón⁵³. La elipsometría, método de potencial de superficie, mediciones de tensión superficial y la técnica de radioetiquetamiento, sólo pueden dar una estimación aproximada del nivel de adsorción. Sin embargo, la reflectividad de neutrón puede determinar la densidad y grosor de la capa de proteína⁵³. La espectroscopia de infrarrojo (IR) y dicroísmo circular (CD) proporcionan información acerca de la estructura secundaria de las proteínas (contenido de α -hélice y hojas- β). La estructura tridimensional de la proteína puede ser determinada por difracción de rayos-x⁵⁴.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se describen las metodologías experimentales usadas para el desarrollo del presente trabajo.

Reactivos y Sustancias

La Albúmina de Suero Bovino (BSA) utilizada en toda la etapa experimental fue comprada en BD Biosciences, con las siguientes características: 99% de pureza, deslipidizada y libre de globulinas. El 1,2-dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfolina (DPPC) se adquirió de la casa comercial Avanti Polar Lipids y fue utilizado sin tratamiento previo. El carcinogénico utilizado fue la N-nitrosodietilamina la cual fue comprada de TCI America con un 99% de pureza. También se utilizó cloroformo (grado HPLC, 99.9% de pureza) tanto para la limpieza del equipo como para la preparación de las muestras, este fue comprado de la casa comercial SIGMA-ALDRICH y alcohol etílico absoluto anhidro (grado reactivo) adquirido en la casa comercial J.T. BEKER. El agua utilizada en todos los experimentos fue de 18.3 M Ω -cm la cual fue obtenida por el instrumento Easy pure /Barnstead.

Preparación de las muestras

Se prepararon soluciones de DPPC con una concentración de 1 mg/mL utilizando como solvente cloroformo, las cuales fueron utilizadas para la preparación de las monocapas. Como subfase se utilizaron soluciones de BSA con distintas concentraciones, las cuales se prepararon a partir de una solución madre con una concentración de 5 mg/mL en solución acuosa. También como subfase se utilizaron soluciones de complejos las cuales se obtuvieron mezclando BSA con N-nitrosodietilamina en las siguientes proporciones

1:12500 (1 molécula de BSA por 12500 de carcinogénico) y 1:25000 (1 molécula de BSA por 25000 moléculas de carcinogénico).

Balanza de Langmuir

Preparación y limpieza de la balanza de Langmuir

Antes de cada serie de experimentos se procedió a la calibración de la balanza (nivel, área y presión). Para la manipulación de los materiales del laboratorio durante los experimentos, se requirió la utilización de guantes de polietileno los cuales son indispensables para evitar la contaminación por contacto directo de las manos. Antes de depositar la subfase a utilizar en la balanza es necesario que la superficie interna se encuentre absolutamente limpia; para lograr este objetivo se procedió a limpiar la balanza repetidamente con etanol y cloroformo aplicándolos con ayuda de un algodón hasta remover todo el polvo y grasas existentes en la superficie. Posteriormente, se procedió a obtener una isoterma de un material previamente caracterizado y catalogado en la literatura (ácido esteárico), si la isoterma obtenida bajo las mismas condiciones experimentales concuerda con la isoterma reportada en la literatura, entonces se puede afirmar que la balanza se encuentra limpia y lista para su uso.

Formación de Monocapas de DPPC en interfase agua/aire

Para la elaboración de las monocapas de Langmuir de DPPC fue necesario preparar una solución para esparcir las moléculas sobre la subfase (como subfase se utilizó agua ultra pura 18.3 M Ω -cm de resistividad), por lo cual se utilizó cloroformo como disolvente por su alta volatilidad. Una vez depositada el agua en la balanza, las moléculas de DPPC fueron depositadas

sobre la subfase con ayuda de una microjeringa, se espero el tiempo apropiado (15 min) para la evaporación del solvente y tener únicamente las moléculas de DPPC sobre la subfase. Las concentraciones utilizadas para la obtención de este tipo de isotermas siempre fue de 1 mg/mL, de la cual se depositó solamente 50 μ L de la solución y se procedió a la obtención de la isoterma correspondiente a una velocidad de compresión de 25 cm^2/min y a temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$, la cual fue controlada por un circulador de agua.

Penetración de BSA en la monocapa de DPPC (22hr)

Una vez formada la monocapa de DPPC a las presiones de 10, 12, 15, 18, 20 y 25 mN/m respectivamente, se inyectaron en el centro y penetrando la interfase 10 μ L de BSA con una concentración de 5 mg/mL para obtener una subfase de 1.49×10^{-9} M. Después de la inyección se retiró el control de presión y se monitoreó el cambio de presión (ΔP) en el tiempo durante 22 hr. Todas las monocapas fueron formadas para este tipo de experimento a una velocidad de compresión de 10 cm^2/min . Posteriormente se siguió el mismo procedimiento utilizando en la inyección complejos de proteína-carcinogénico en proporciones de 1 molécula de BSA por 12,500 carcinogénico y 1 molécula de BSA por 25,000 de carcinogénico, los cuales se obtuvieron mezclando previamente 10 μ L de BSA 5 mg/mL con 1 μ L y 2 μ L de N-nitrosodietilamina, respectivamente, a los cuales se les dio un tiempo apropiado de reacción antes de la inyección. Todos los experimentos se realizaron controlando la temperatura a 25 $^{\circ}\text{C}$.

Área ocupada por BSA en una monocapa de DPPC a 10 mN/m

Para la formación de la monocapa de DPPC se depositaron con ayuda de una microjeringa 25 μ L de una solución de DPPC con una concentración de 1 mg/mL sobre una subfase de agua ultra pura, se esperó el tiempo necesario para la evaporación del solvente (15-20 min), posteriormente se procedió a la compresión de la monocapa a una velocidad de 25 cm²/min hasta alcanzar una presión de 10 mN/m. Una vez alcanzada y estabilizada la monocapa a la presión deseada se inyectaron en el centro y penetrando la interfase 10 μ L de BSA con una concentración de 5 mg/mL para obtener una subfase de trabajo de 1.49 x10⁻⁹ M y finalmente se procedió a monitorear el cambio de área con respecto al tiempo manteniendo la presión constante aproximadamente durante 24 h, ésto con la finalidad de determinar el cambio de área en la monocapa debido a la adsorción de la proteína sobre la monocapa y para poder estimar las constantes de adsorción. Posteriormente, se siguió la misma metodología pero utilizando en la inyección complejos de BSA-carcinogénico con las siguientes proporciones 1:12500 y 1:2500, los cuales se obtuvieron mezclando 10 μ L de BSA con una concentración de 5 mg/mL con 1 μ L y 2 μ L del carcinogénico, respectivamente. Para este tipo de experimentos se trabajo a temperatura ambiente procurando mantener la misma temperatura en el cuarto de trabajo.

Estimación del área de la proteína pura

Para estimar el área ocupada por una molécula de BSA, se utilizó el siguiente protocolo: como subfase se utilizó una solución de NaCl 1M con la cual se llenó la balanza, se dejó 1 h a una temperatura de 25°C (controlada por un circulador) e inmediatamente después se depositaron 100 μ L de BSA con

una concentración de 1 mg/mL y se dejó reposar durante 1 h para lograr un equilibrio; finalmente se obtuvo la isoterma correspondiente a una velocidad de compresión de 25 cm²/min. Se procedió a realizar los cálculos correspondientes para estimar el área por molécula de proteína.

Estimación del área ocupada por los complejos

Como subfase se utilizó una solución de NaCl 1 M se dejó a 25 °C durante 1 h, se depositó sobre la subfase 100 µL del complejo (1:12500 y 1:2500). Se esperó 1 h para llegar a un equilibrio y se procedió a obtener la isoterma correspondiente a una velocidad de compresión de 25 cm²/min y se realizaron los cálculos necesarios para la estimación de las áreas ocupadas por los complejos.

Obtención de Isotermas de DPPC a diferentes tiempos de adsorción de la proteína

En esta parte experimental para la obtención de las isotermas de DPPC se depositaron sobre la subfase 50µL de una solución de DPPC con una concentración de 1 mg/mL y la velocidad de compresión fue siempre de 25 cm²/min. Una vez depositada la solución de DPPC antes de llevar a cabo la compresión para obtener la isoterma correspondiente se esperaron los siguientes tiempos respectivamente: 15 min, 1 h, 3h, 5h y 12, como subfase fueron utilizadas: BSA con una concentración de 1.49×10^{-8} M y 1.49×10^{-9} M, también fueron utilizadas como subfase soluciones de complejos con las mismas proporciones de los experimentos anteriores. Cada una de esas subfases fue utilizada para obtener la isoterma correspondiente a los diferentes tiempos de compresión mencionados. La temperatura fue controlada por un circulador de agua a 25 °C.

Ciclos de compresión y expansión

Para la obtención de los ciclos de compresión y expansión de las monocapas de DPPC se depositaron 50 μ L del fosfolípido sobre una subfase de BSA con una concentración de 1.49×10^{-9} M, una solución de complejo en proporción de 1:12500 y 1:25000 conservando la molaridad de BSA. Para iniciar los ciclos se esperaron 15 min y 5 h para cada una de las subfases utilizadas, la temperatura siempre fue controlada y mantenida a 25°C durante todo el proceso. Los ciclos se realizaron a una velocidad de compresión de 25 cm²/min y la presión máxima de compresión fue de 25 mN/m.

Preparación de las películas de Langmuir-Blodgett

Una vez determinada la isoterma, se eligen presiones superficiales a las cuales las monocapas de Langmuir se transferirán a un sustrato sólido. Como sustrato sólido se eligió la mica, la cual es un material con grandes áreas superficiales planas a nivel atómico, antes de ser utilizada se le debe desprender una pequeña capa de cada lado para garantizar que la mica este libre de impurezas. Estas consideraciones son importantes para obtener buenas imágenes por AFM; la transferencia de la película se realizó a una velocidad de 1 mm/min, se utiliza una velocidad baja durante la transferencia para tratar de asegurar que el proceso de transferencia no afecte el arreglo molecular o textura de fase de la monocapa en el agua cuando se transfiera al sustrato sólido.

Caracterización de las películas de Langmuir-Blodgett por Microscopía de Fuerza Atómica

Bicapa de DPPC

Para obtener la bicapa del fosfolípido se depositaron 50 μL de una solución de DPPC con una concentración de 1 mg/mL. Se esperaron 15 min para la evaporación del solvente y se comprimió hasta alcanzar una presión de 20 mN/m, la transferencia de la monocapa se realizó a una velocidad de 1mm/min.

Monocapa de BSA

Para obtener la monocapa de BSA pura sobre mica se depositaron 100 μL de una solución de BSA con una concentración de 1 mg/mL sobre una subfase de agua pura. Se dejó reposar durante 40 minutos para lograr el equilibrio; posteriormente se procedió a comprimir hasta alcanzar una presión de 20 mN/m y la transferencia se realizó a una velocidad de 1 mm/min.

Monocapa de complejo BSA:N-DEA (1:2000)

Para obtener la monocapa del complejo se mezclaron 100 μL de BSA con una concentración de 1mg/mL con 16 μL de una solución de N-DEA (la cual se preparó diluyendo 2 μL del carcinogénico puro en 100 μL de agua) esta mezcla fue depositada sobre una subfase de agua pura y se esperó aproximadamente 40 minutos para lograr el equilibrio; se comprimió hasta alcanzar una presión de 20 mN/m y se procedió a extraer la monocapa sobre mica con una velocidad de 1 mm/min.

Monocapa de complejo BSA:N-DEA (1:12500)

Para obtener la monocapa del complejo se mezclaron 100 μL de BSA con una concentración de 1mg/mL con 2 μL de N-DEA puro, esta mezcla fue depositada sobre una subfase de agua pura y se espero aproximadamente 40 minutos para lograr el equilibrio; se comprimió hasta alcanzar una presión de 20 mN/m y se procedió a extraer la monocapa sobre mica con una velocidad de 1 mm/min.

Monocapa de BSA sobre una bicapa de DPPC

Una vez formada la bicapa de DPPC a una presión de 20 mN/m se extrajo sobre la mica, se limpio la superficie del agua hasta detectar una presión cercana a cero; posteriormente se depositó sobre la subfase de agua pura 100 μL de BSA con una concentración de 1 mg/mL se esperaron 40 minutos para alcanzar el equilibrio y se comprimió hasta alcanzar una presión de 20 mN/m y se extrajo la monocapa de BSA sobre la bicapa de DPPC previamente formada a una velocidad de 1 mm/min.

Se siguió el mismo procedimiento para extraer las monocapas de los complejos sobre la bicapa de fosfolípido. Una vez formada la bicapa de DPPC y aspirada la superficie se depositaron las mezclas de los complejos, en las proporciones anteriormente citadas.

Una vez formada la película se procede a analizarla utilizando un microscopio de fuerza atómica (AFM) marca JEOL modelo JSPM 4210 utilizando el modo de no contacto.

Obtención de imágenes por Microscopía de Ángulo de Brewster

Se depositaron 33.5 μL de una solución de DPPC con una concentración de 1 mg/mL sobre una subfase de agua pura, se esperaron 15 minutos para la evaporación del solvente y se procedió a la formación de la monocapa a una presión de 10 mN/m con una velocidad de compresión de 33.5 cm^2/min ; una vez formada la monocapa se esperaron aproximadamente 5 minutos para la estabilización de la misma. Posteriormente se inyectaron 14 μL de una solución de BSA con una concentración de 5 mg/mL, la inyección se hizo en el centro y penetrando la interfase con la finalidad de alcanzar una concentración de proteína en la subfase de aproximadamente $1.49 \times 10^{-9}\text{M}$, el mismo procedimiento se siguió para el complejo de 1 molécula de BSA por 12500 de carcinogénico siempre manteniendo la misma concentración molar de proteína en el bulto. A partir del tiempo de inyección se obtuvieron imágenes por BAM a diferentes tiempos (15 minutos, 1 h, 3h y 4 h) y se monitoreó el cambio de espesor en la monocapa con respecto al tiempo; estos experimentos se realizaron en una balanza Langmuir-Blodgett modelo 601, Nima Technology LTD, convertir England y las mediciones se llevaron a cabo con un BAM modelo I-Elli2000 Nanofilm Technology, germany.

Ris T. 978

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Isotermas de Langmuir

En este capítulo se discuten los resultados experimentales del estudio de la penetración de la BSA y BSA/NDEA sobre una monocapa de DPPC, así como el cambio en la estructura secundaria de la proteína debido a la presencia de la N-nitrosodietilamina y la influencia de la formación del complejo sobre las propiedades de adsorción de la albúmina de suero bovino.

En la figura 16 se muestra una isoterma típica (π -A) de DPPC sobre una subfase de agua pura obtenida a una temperatura de 25 °C, la cual ha sido utilizada en este trabajo como isoterma de referencia; en esta figura puede observarse las fases características de este fosfolípido: la fase gaseosa-LE (en donde las moléculas ocupan en promedio toda el área de trabajo disponible y se considera un gas en dos dimensiones) en donde el área promedio por molécula encontrada está en valores mayores a 100 Å², la fase Líquido-Expandida (LE) valores comprendidos entre 75 Å² y 100 Å², posteriormente puede observarse un cambio de pendiente en la región entre 50 Å² y 75 Å² correspondiente a la transición de LE-LC (líquido expandido-líquido condensado) y por debajo de los 50 Å² se observa un incremento de presión en la curva que indica la fase LC. Valores similares fueron obtenidos por Diociaiuti y colaboradores⁵⁵. En las figuras 17 y 18 se muestra el efecto sobre las isotermas de DPPC debido a la incorporación de las moléculas de BSA y BSA/NDEA, respectivamente, presentes en la subfase a diferentes tiempos de adsorción. Como se puede observar hay un cambio a áreas grandes dependiendo del tiempo de adsorción de las moléculas de BSA y/o BSA/NDEA presentes en la subfase. En la figura 17 se observan las isotermas de DPPC utilizando como subfase una solución de BSA con una concentración de 1.49 x10⁻⁹ M obtenidas a diferentes tiempos, donde se muestra claramente que a

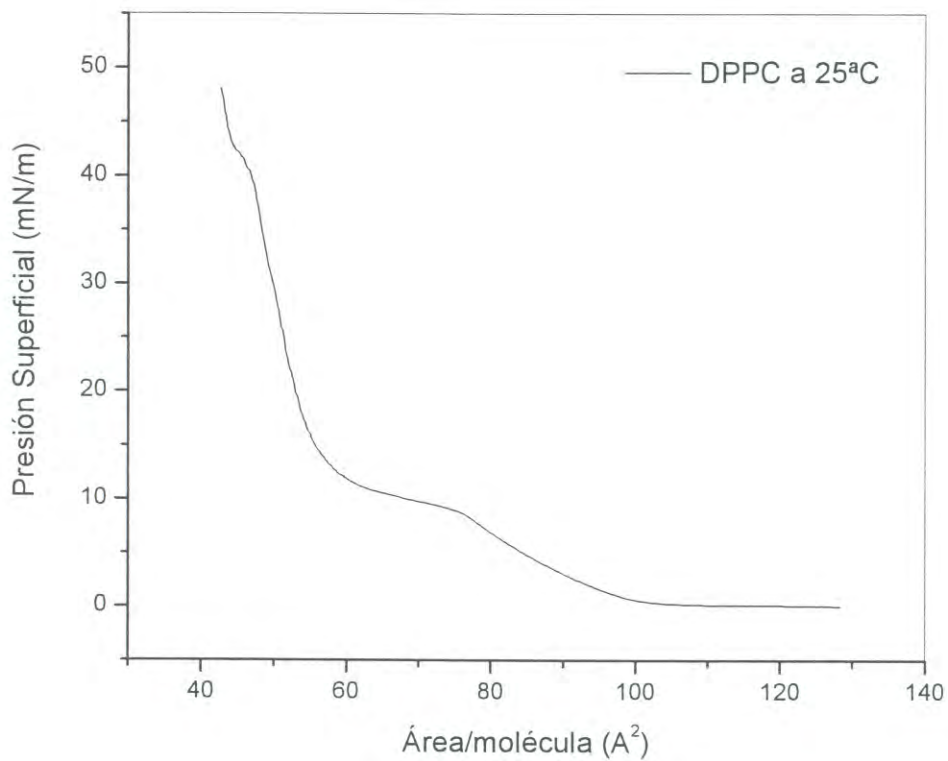


Figura 16. Isotherma típica de DPPC en interfase agua/aire a 25 °C

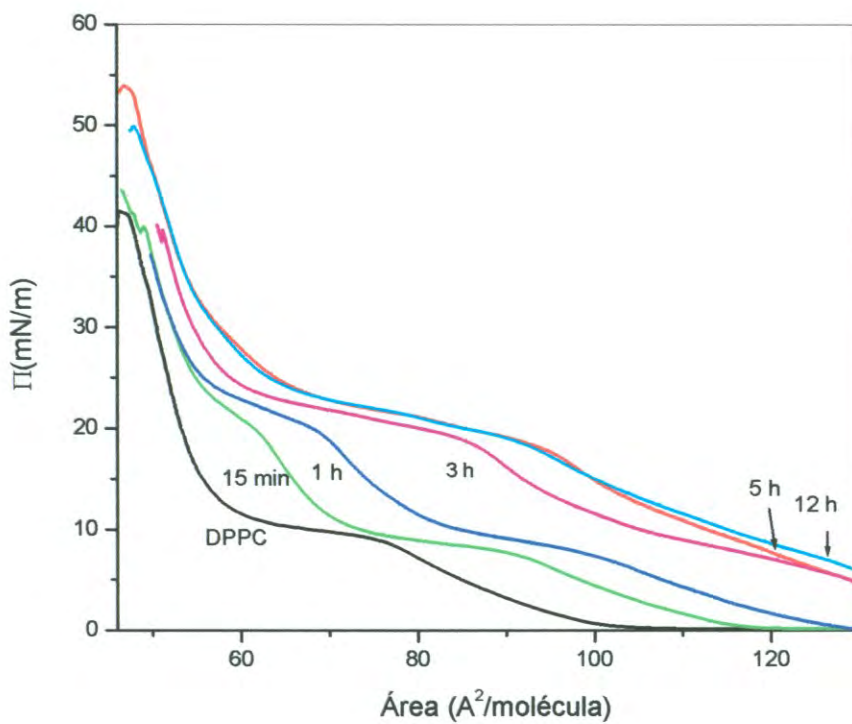


Figura 17. Isothermas de DPPC las cuales muestran el efecto de la adsorción de BSA sobre una monocapa de DPPC a diferentes tiempos

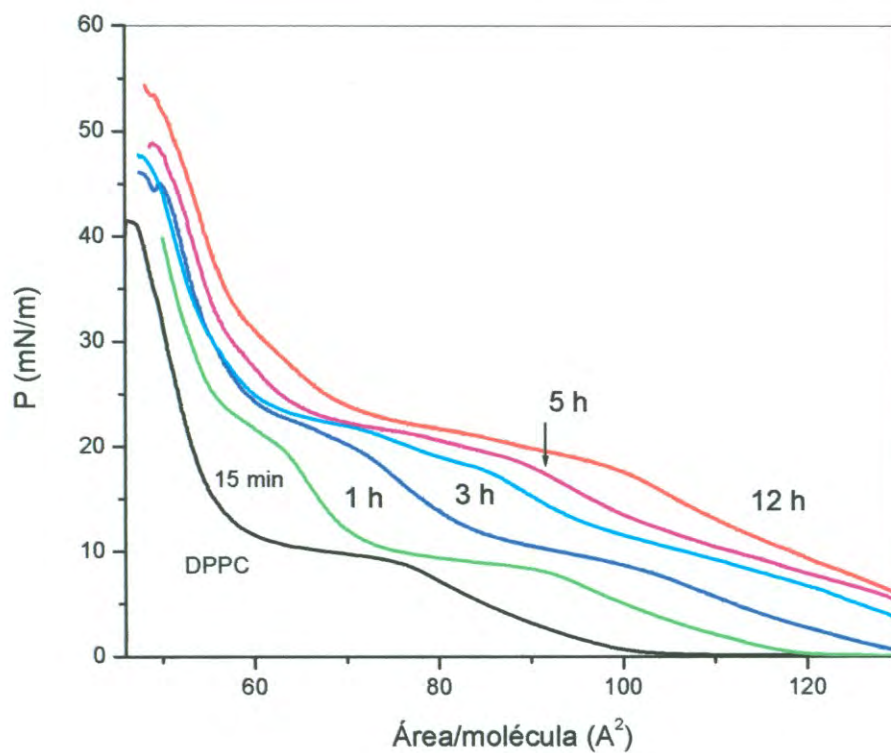


Figura 18. Isothermas de DPPC las cuales muestran el efecto de la adsorción de BSA+25000 moléculas de carcinogénico sobre una monocapa de DPPC a diferentes tiempos

tiempos mayores la capacidad de la proteína de migrar a la interfase es mayor, lo cual se ve reflejado en un aumento de área por molécula a una presión determinada. Se puede observar que la adsorción de la BSA en la monocapa de DPPC produce una nueva fase de transición alrededor de los 20 mN/m la cual no se observa en la isoterma típica de DPPC. Esa nueva fase encontrada para las isotermas de DPPC/BSA a tiempos largos también fue obtenida por Xicotencatl-Cortéz y colaboradores¹¹ quienes utilizaron apolipoproteínas en la subfase. Por otra parte, la transición de fase a los 79 Å² (7.5 mN/m) en la isoterma del DPPC, donde coexisten las fases LE/LC y ocurre una transición de fase cooperativa^{56, 10}, este desplazamiento a grandes áreas moleculares y bajas presiones desaparece a tiempos más largos que 3 h después del esparcimiento de la BSA en la subfase. Aparentemente, después de las 12 h de la adsorción de la BSA, las isotermas permanecen estables y más expandidas, indicando la saturación de la monocapa. Cambios similares en las isotermas han sido obtenidos por Wang y colaboradores utilizando albúmina de suero humano (HSA) con un fosfolípido diferente (DPPS) en la interfase agua-aire⁵⁶, ellos también muestran la aparición de una nueva fase que no se observa en la isoterma del DPPS puro.

Al extrapolar el área por molécula a una presión de cero, por ejemplo, en la fase condensada antes del colapso, obtuvimos una variación en el área molecular de 57.8 Å² para la monocapa de DPPC y 66 Å² para la monocapa formada 12 h después de la deposición de DPPC sobre la subfase de BSA. Esta variación puede ser entendida como la penetración de la BSA en la monocapa de DPPC y suponiendo que todas las moléculas de BSA penetraron en la monocapa de DPPC con un radio hidrodinámico promedio de 4 nm⁽⁵⁸⁾ en la interfase agua/aire, por lo cual se deduce que hay alrededor de 1 molécula de BSA por 6×10^4 moléculas de DPPC en la monocapa. Para el caso de la adsorción del complejo BSA/NDEA en la monocapa de DPPC a diferentes

tiempos, se muestra el comportamiento de las isothermas en la Figura 18 para una concentración de NDEA de 25000 moléculas por 1 molécula de BSA (1:25000).

El comportamiento de las isothermas es similar que el obtenido para la adsorción de BSA, en este caso las áreas moleculares extrapoladas a la presión de cero en la fase condensada es más grande que las obtenidas de las isothermas de la figura 17 a tiempos idénticos. Para la isoterma obtenida 12 h después de la deposición del DPPC utilizando como subfase el complejo (BSA/NDEA) se encontró en promedio un área por molécula de 71 \AA^2 , esto puede significar una mayor penetración del complejo en la monocapa a altas presiones o a tamaños mayores en las moléculas de proteínas causados por la interacción BSA/N-DEA y a cambios en la estructura secundaria producidos por las moléculas de N-DEA⁵⁸. También se observó que las isothermas de 5 h y 12 h no se sobreponen como en el caso de la adsorción de la BSA, probablemente debido a que la adsorción del complejo en la monocapa de DPPC es más lenta.

En la Figura 19 puede visualizarse el efecto del incremento del área de las isothermas a diferentes tiempos debido a la adsorción de BSA y BSA/NDEA. Se observó que la razón entre el incremento del área a una presión fija de 10mN ($\Delta A/A_0$) incrementa monotónicamente al pasar el tiempo de inyección de la proteína. A_0 es el área de referencia del DPPC obtenido de una isoterma en interfase agua/aire a 25°C la cual se midió a dos presiones diferentes 10 mN/m y 20 mn/m. Este incremento monotónico a tiempos largos de espera también fue observado por Cateano y colaboradores⁵⁹ usando BSA en concentraciones pequeñas en la subfase (10^{-9} M). Se observa que para ambas presiones cuando se utiliza concentraciones grandes de N-DEA (1:25000) se produce un incremento en el área relativa y estos cambios aparentemente siguen creciendo a tiempos más grandes de 12 horas. De forma contraria, en incremento de área

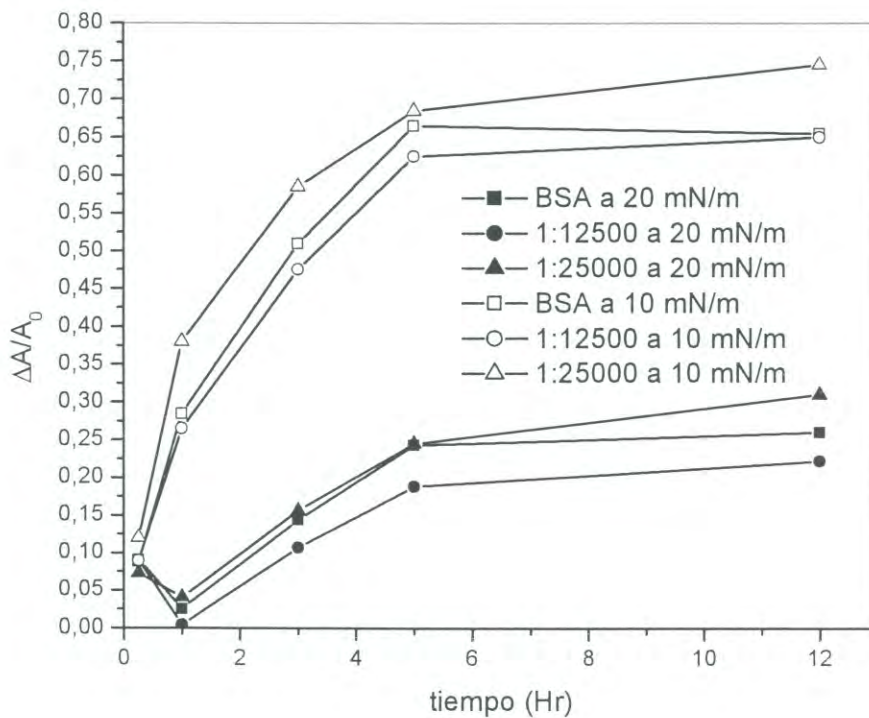


Figura 19. Incremento relativo en el área molecular de DPPC a una presión de 10 mN/m y 20 mN/m sobre una subfase de BSA $1.49 \times 10^{-9} \text{M}$ y complejos respectivamente a diferentes tiempos, tomando como referencia el área molecular de DPPC sobre una subfase de agua pura a un tiempo de 15 minutos después del esparcimiento

para BSA y para BSA/N-DEA en proporciones 1:12500 se detiene o se mantiene estable cerca de las 5 horas para ambas presiones.

Ciclos de Compresión y Expansión

Se analizó la estabilidad de las monocapas de DPPC/BSA y DPPC/BSA/NDEA por medio de la formación de ciclos de compresión y expansión a diferentes tiempos después de la deposición de DPPC utilizando como subfase BSA y/o BSA/NDEA y se midió la histéresis para seis ciclos consecutivos. En la Figura 20a y 20b puede observarse el comportamiento de los ciclos de compresión y expansión a 15 minutos y 5 horas, después de que DPPC fue depositado sobre soluciones acuosas de BSA y BSA/NDEA. En la Figura 21a se muestra solo el primer y sexto ciclo para ambos tiempos monitoreados (15 minutos y 5 horas). Hay importantes diferencias entre el ciclo realizado a los 15 minutos (curvas de la izquierda) y los ciclos obtenidos a las 5 horas (curvas de la derecha) después que el DPPC fue depositado. Los ciclos obtenidos 15 minutos después se recorren a áreas mayores indicando un proceso continuo de adsorción. Es interesante la observación que la obtención de las isothermas de compresión son obtenidas a presiones más altas que las isothermas de expansión, lo que significa que cuando la monocapa regresa a áreas idénticas después de la compresión, algunas moléculas de proteína han penetrado en la monocapa de DPPC, en lugar de ser expulsadas de la monocapa. De forma contraria, en los ciclos iniciados 5 hrs después, están desplazados (a la izquierda) para cada ciclo subsiguiente a áreas más pequeñas como es usual para muchas monocapas^{59,60} como una evidencia de la expulsión de las moléculas de la monocapa o a la baja estabilidad de la monocapa. En nuestro caso, después de pocos ciclos consecutivos el desplazamiento del área se detiene, y el área de histéresis permanece casi

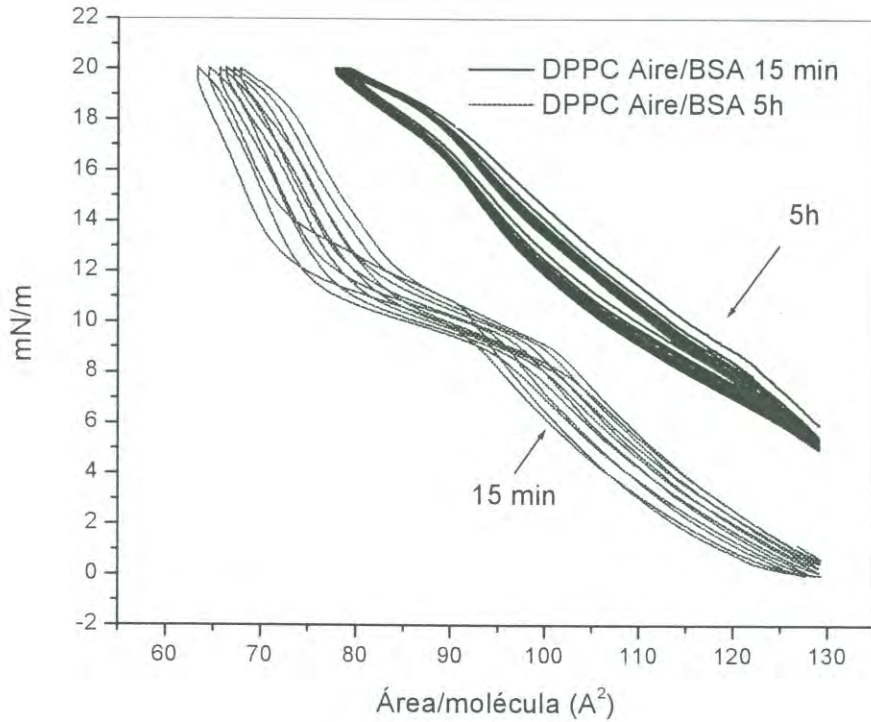


Figura 20a. Se muestran los ciclos de compresión/expansión de una monocapa de DPPC sobre una subfase de BSA ($1.49 \times 10^{-9}M$) iniciados a los 15 minutos y a las 5 horas después de la deposición de las moléculas de DPPC

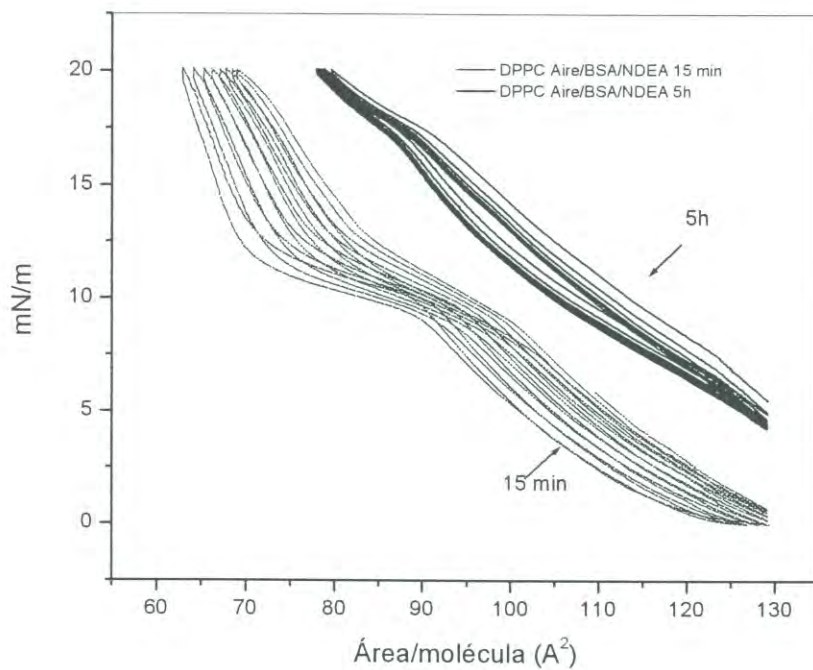


Figura 20b. Se muestran los ciclos de compresión/expansión de una monocapa de DPPC sobre una subfase de BSA/NDEA (1:12500) iniciados a los 15 minutos y a las 5 horas después de la deposición de las moléculas de DPPC

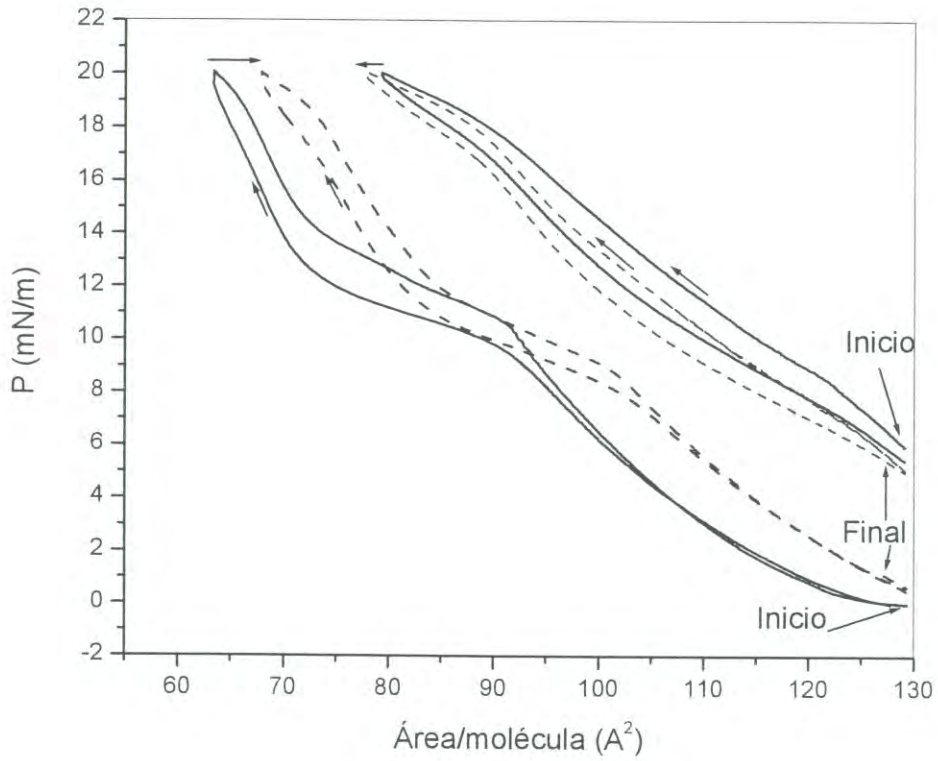


Figura 21a. Se muestra el primer y el sexto ciclo de una monocapa de DPPC sobre una subfase de BSA 15 minutos y 5 horas después de la deposición, respectivamente

constante y por lo tanto se obtienen ciclos reversibles. En la Figura 21b se muestran los ciclos a los mismos tiempos de inicio del DPPC utilizando como subfase de BSA/NDEA. El comportamiento es similar al encontrado en la adsorción de la BSA. La diferencia más notable está en los ciclos realizados 15 minutos después de la deposición; como se puede observar el primer ciclo está completamente separado del sexto, indicando áreas grandes para las mismas presiones, lo cual puede significar aumento en el tamaño de las moléculas adsorbidas y/o más moléculas de proteína adsorbidas en la interfase. Las mediciones del área de histéresis de los ciclos obtenidos para la adsorción de BSA y para dos proporciones de complejos BSA/NDEA (1:12500 y 1:25000) en una monocapa de DPPC en la interfase agua/aire se muestran en la Figura 22 para tiempos de inicio después de la deposición del DPPC de 15 minutos y 5 horas. Se puede notar que a tiempos cortos las áreas de los ciclos son más pequeñas que las áreas obtenidas a tiempos largos y son más grandes para el caso de los monocapas DPPC/BSA que para las monocapas DPPC/BSA/NDEA. Se puede ver que para los dos últimos ciclos de las monocapas de DPPC y DPPC/BSA el área es prácticamente la misma para ambos tiempos de inicio, indicando la estabilidad de la monocapa. De forma contraria, para las monocapas DPPC/BSA/NDEA esta estabilidad es lograda solo a tiempos largos. También es interesante observar que para los ciclos que iniciaron 15 minutos después de la deposición, todas las áreas tienden a crecer después del segundo ciclo, indicando inestabilidad en el número de moléculas entrantes contra el número de moléculas de proteína que salen. La histéresis en el área de los ciclos obtenidos 5 horas después disminuye con el número de ciclos y tiende a mantenerse constante después del cuarto ciclo. En casi todos los casos, la histéresis de las curvas DPPC/BSA fueron más grandes que las obtenidas para los complejos BSA/NDEA, probablemente porque las moléculas de BSA penetran más en la monocapa de DPPC que las moléculas de BSA/NDEA.

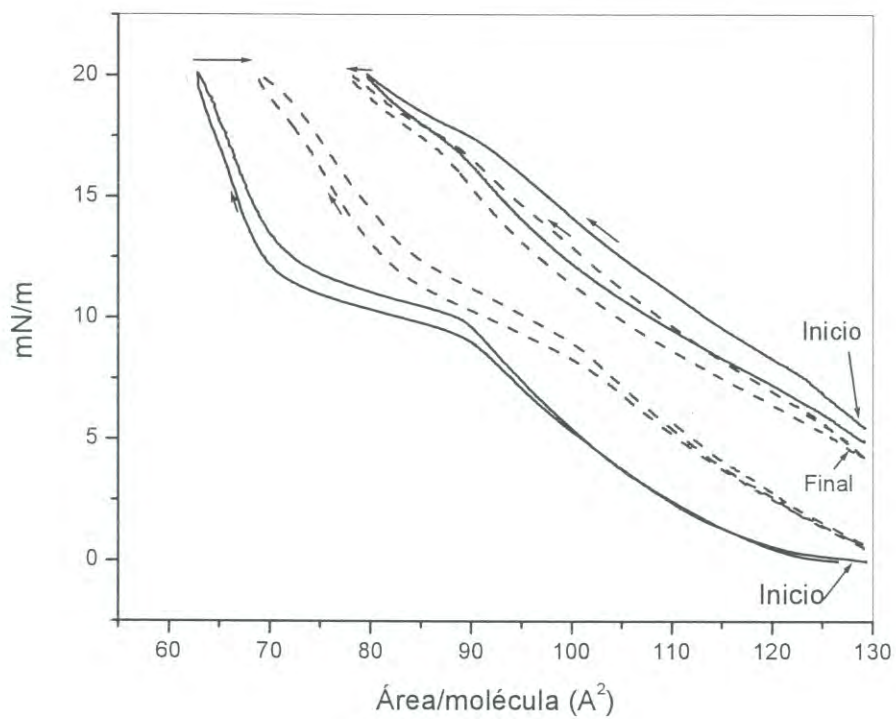


Figura 21b. Se muestra el primer y el sexto ciclo de una monocapa de DPPC sobre una subfase de BSA/NDEA 15 minutos y 5 horas después de la deposición, respectivamente.

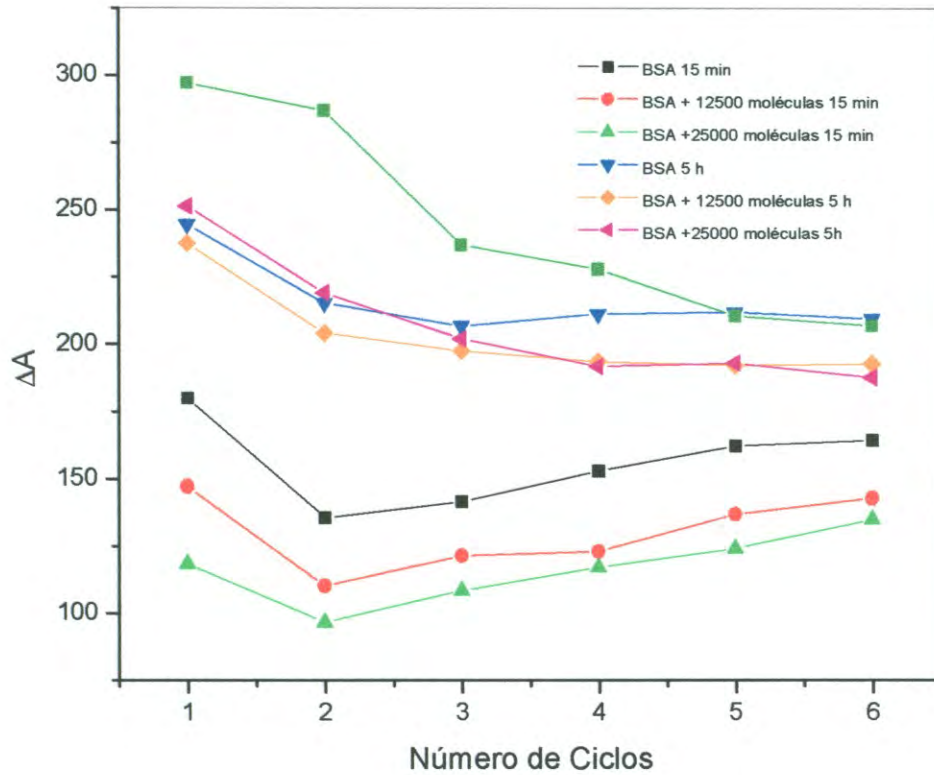


Figura 22. Se muestra el cambio del área en los ciclos de compresión-expansión obtenidos utilizando BSA y/o BSA/NDEA (1:12500 y 1:25000) como subfase

El módulo de compresibilidad se define como $C^{-1} = -A d\pi/dA$ para cada presión (π) y área (A) de una isoterma, ha sido utilizado por varios autores^{60,61,62} para caracterizar la flexibilidad de las monocapas en interfase agua/aire. La presencia de mezclas en monocapas de fosfolípidos⁶⁵ y la adsorción de algunas macromoléculas en monocapas de ácido esteárico y colesterol⁶⁴ produce mayor flexibilidad en las monocapas, dependiendo del tamaño molecular y de la hidrofobicidad de las moléculas. En la figura 23 se muestra el comportamiento de los módulos de compresibilidad de una monocapa de DPPC puro a diferentes áreas y los módulos correspondientes para la monocapa de las mezclas de DPPC/BSA obtenidas a diferentes tiempos. El pico del módulo de compresibilidad de la monocapa de DPPC inicia aproximadamente a 100 \AA^2 alcanzando el máximo a 80 \AA^2 , el cual corresponde al hombro dentro de la fase LE y el inicio de la transición de fase LE-LC en la isoterma correspondiente (fig. 17); el segundo pico ocurre cerca de los 50 \AA^2 en la fase LC antes de que inicie la coexistencia con el colapso. Los módulos de compresibilidad de las monocapas DPPC/BSA, que se midieron 15 minutos después de la deposición del DPPC sobre una subfase de BSA se observan que los dos picos a 64 y 95 \AA^2 coinciden con los dos hombros observados en la isoterma correspondiente (fig. 17) y el otro es obtenido en el inicio del equilibrio LC-colapso. Como se mencionó antes, a este tiempo aparece una nueva fase cerca de los 64 \AA^2 que no es observada en las isotermas de DDPC puro. Para la isoterma obtenida tres horas después, los módulos de compresibilidad muestran los tres mismos picos, dos de ellos muestran un desplazamiento a 89 y 129 \AA^2 en coincidencia con los hombros en la respectiva isoterma.

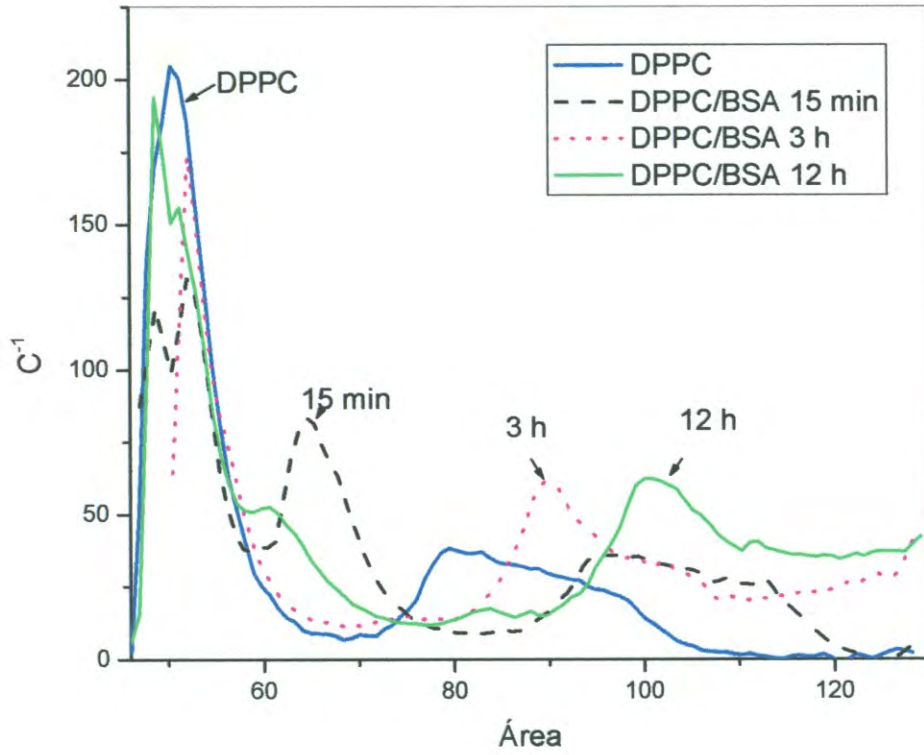


Figura 23. Módulos de Compresibilidad de DPPC y DPPC/BSA a diferentes tiempos.

A tiempos mayores de tres horas, la transición LE-LC es desplazada a área más grandes que 130 \AA^2 y esto es reflejado en solo dos picos de los módulos de compresibilidad observados a 5 y 12 horas en los rangos de áreas analizadas. En todos los casos, los valles en las curvas de C^{-1} corresponden aproximadamente a la mitad del equilibrio de las fases LE-LC y LE-G en las isothermas correspondientes. En la Figura 24 se muestra el comportamiento de los módulos de compresibilidad de los monocapas DPPC/BSA/NDEA (con una proporción de 1:2500 de BSA:NDEA) medidos a los mismos tiempos que la figura 23. El comportamiento es muy similar al observado para el DPPC/BSA, pero con picos menores a los observados en las mismas fases de la figura 23. En la tabla 1 se muestran los valores de C^{-1} s para los picos observados en las diferentes proporciones de NDEA utilizadas. Puede notarse que la presencia de moléculas de NDEA en la BSA, interaccionan con el DPPC en la interfase agua/aire, produciendo películas más rígidas cuando la proporción utilizada es de 1:2000. Como ha sido previamente determinado a esta concentración de NDEA se produce un aumento en el contenido de hélice- α ⁶⁰. Cuando las moléculas de BSA y BSA/NDEA son inyectadas debajo de la monocapa de DPPC a una presión de inicio específica, éstas penetran e incrementan la presión, alcanzando estabilidad a tiempos largos. El tiempo que toma la proteína para penetrar y estabilizarse en la monocapa depende del coeficiente de difusión¹¹ y de los cambios en la estructura secundaria de la proteína, como recientemente se ha demostrado por mediciones del contenido de α -hélice modificando la proteína con diferentes concentraciones de NDEA⁵⁸. Estas modificaciones en la estructura produce una disminución de las interacciones hidrofóbicas con la monocapa de DPPC, probablemente originado por repulsiones electrostáticas. En la Figura 25 se muestra el incremento de presión a diferentes tiempos después de la inyección de una solución de BSA y dos soluciones de complejos BSA/NDEA con diferentes concentraciones de NDEA. Para una presión inicial de 12 mN/m de la monocapa de DPPC, el

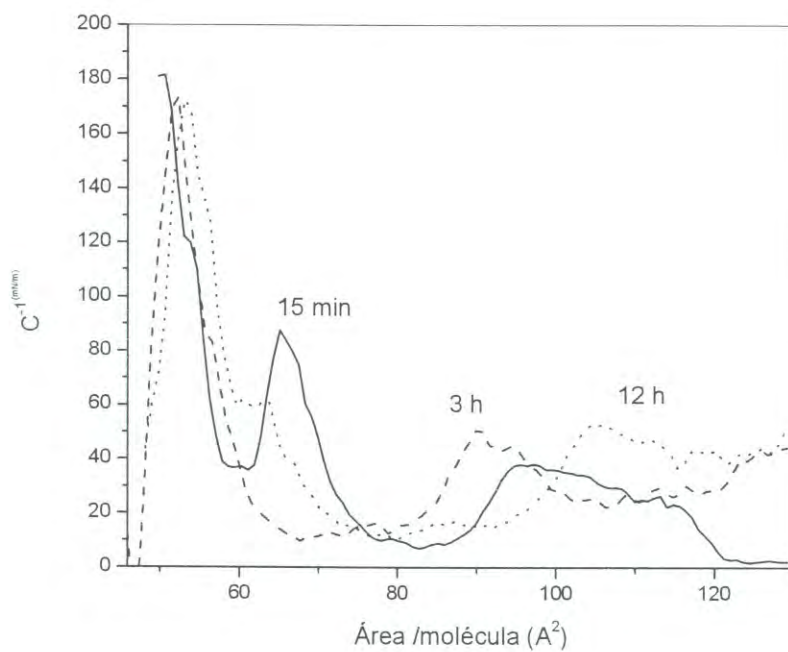


Figura 24. Módulos de Compresibilidad de DPPC y DPPC/BSA/NDEA a diferentes tiempos.

Tabla 1. Valores (mN/m) de C_s^{-1} correspondientes a los picos que indican la formación de una nueva fase en la monocapa de DPPC debido a la penetración de la BSA y los complejos BSA/N-DEA a diferentes tiempos de adsorción

Proporción NDA/BSA	15 min	3 h	12 h
0	82.7	60.8	62
2000	92	75	83
12500	84	45	48
25000	86	50	53

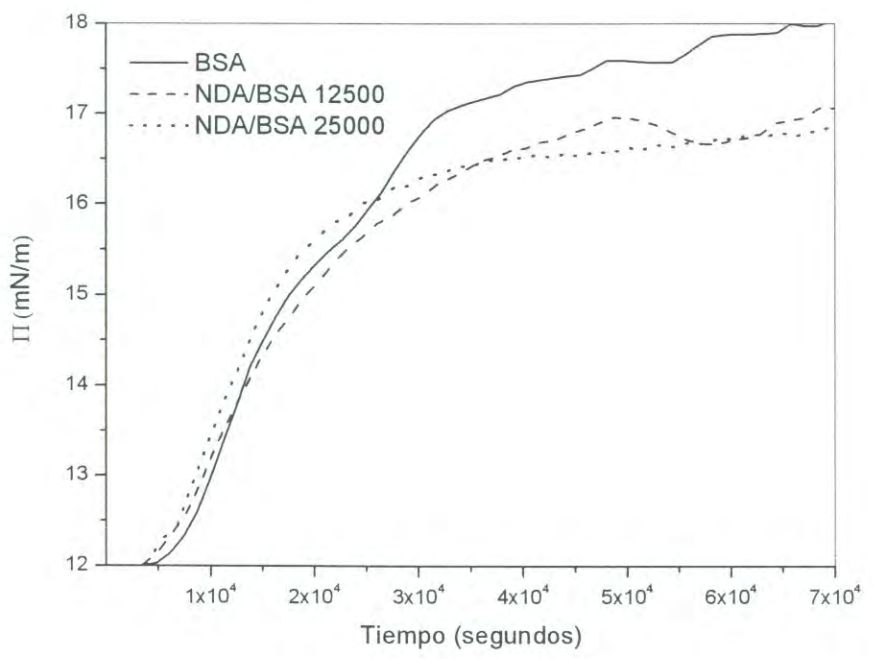


Figura 25. Incremento de presión en el tiempo partiendo de una presión inicial de 12 mN/m

incremento de presión es más alto con la inyección de BSA pura y del complejo BSA/NDEA en una proporción 1:2000, que con los complejos BSA/NDEA en las proporciones de 1:12500 y 1:2500.

Una pequeña meseta aparece para la adsorción de BSA cerca de los 50000 segundos con 17.5 mN/m, aproximadamente, la cual corresponde al hombro en la región inicial del equilibrio de las fases LE-LC observado en la figura 17 en la isoterma obtenida 12 horas después de la deposición. El incremento de presión de los complejos BSA/NDEA con una concentración de 25000 moléculas de NDEA por 1 de BSA se muestra más monotonico en comparación con el comportamiento de otras muestras, este complejo también muestra un decremento en la presión a largos tiempos lo cual indica un proceso de desorción.

También pueden distinguirse tres regímenes de incremento de presión observados para muchas proteínas en otras investigaciones⁶⁵. La zona de inducción, la cual es el tiempo en el que ocurren cambios despreciables y las moléculas empiezan a migrar. En la Figura 25 este tiempo corresponde a los primeros 7000 segundos cuando la presión muestra cambios de presión no significativos. La zona de saturación de la monocapa muestra un incremento de presión superficial más grande y también se desplaza a tiempos más grandes con la adición de NDEA. Esto también ha sido demostrado utilizando experimentos axisimétricos de gota⁵⁸. La zona de gelación interfacial, la cual es el tiempo cuando las moléculas se rearreglan y forman probablemente redes similares a la de un gel. En la figura 25 este tiempo corresponde aproximadamente a más de 32000 segundos para la curva de BSA y arriba de 35000 segundos para las curvas de presión producidas cuando moléculas de BSA/NDEA son inyectadas. Estas tres regiones pueden visualizarse mejor en una grafica semilogarítmica. El máximo incremento de presión ($\Delta\pi$) alcanzado

después de más de 20 horas debido a la adsorción de BSA y de BSA/NDEA (Figura 26) se grafican a diferentes presiones iniciales manteniendo un área constante. $\Delta\pi$ muestra un comportamiento casi lineal con la presión inicial de la monocapa DPPC/BSA y la proteína es prácticamente excluida de la monocapa de DPPC a presiones iniciales mayores que 25 mN/m. Se observó que el incremento de la presión alcanzada por los complejos BSA/NDEA es más baja en comparación con el incremento de presión alcanzada por la inyección de la solución de BSA pura y esta diferencia es mas notable a una presión inicial de 10 mN/m, cuando la monocapa de DPPC se encuentra en la fase de equilibrio LE-LC. Es importante notar que estos incrementos de presión son más pequeños que los observados en la isoterma correspondiente (Figura 17) debido al método utilizado. Otros investigadores, también han investigado la penetración de la BSA sobre monocapas de lípidos^{64, 65} obteniendo un comportamiento lineal y han demostrado que la BSA no puede penetrar la monocapa a presiones iniciales mayores de 20 mN/m⁶⁶.

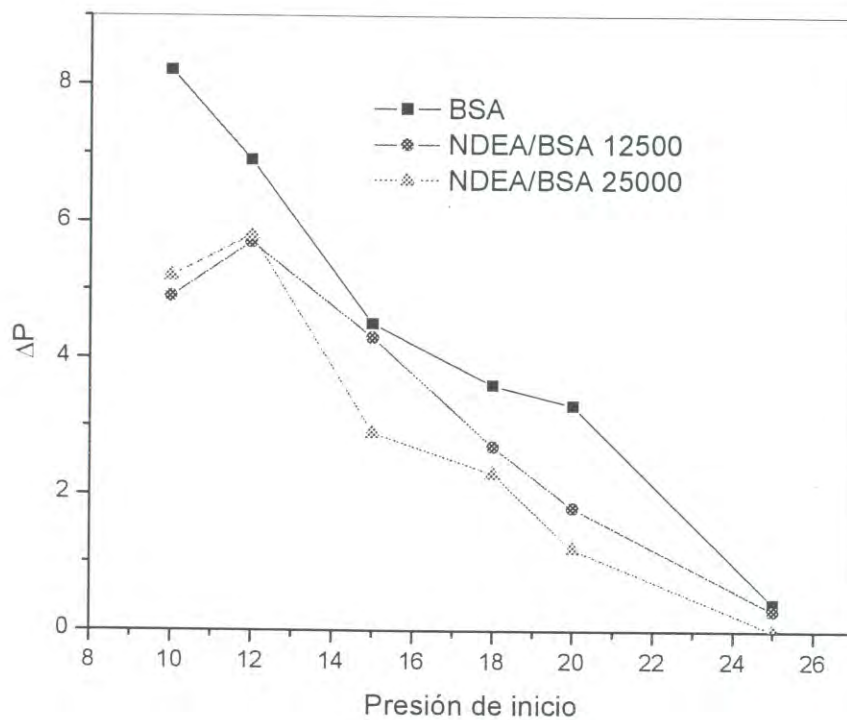


Figura 26. Variación de la presión superficial en la monocapa de DPPC a diferentes presiones debido a la inyección de BSA y sus complejos (BSA/NDEA) en la subfase ($1.49 \times 10^{-9} \text{ M}$) después de 20 hrs

La penetración de la proteína, medida por la velocidad del incremento del área, dA^p/dt , es proporcional a la concentración de proteína en la subfase,

$$\frac{dA^p}{dt} = K[P_{sub}] \quad (4)$$

donde $[P_{sub}] = N_{sub} / V_{sub}$ es la concentración de la proteína en la subfase N_{sub} es el número de proteínas en la subfase y V_{sub} es el volumen de la subfase. El número total de proteínas en el sistema, N_t , es la suma de las proteínas en la subfase más las que se encuentran en la monocapa de DPPC, $N_t = N_{sub} + N_{dppc}$

La solución de la ecuación en función del tiempo¹¹ es:

$$A^p(t) = a_s N_T + a_s (N_0 - N_T) \exp\{-\{K/(a_s V_{sub})\}t\} \quad (5)$$

donde N_0 es el número de moléculas de proteína en la monocapa de DPPC a un $t=0$, a_s es el área por molécula de proteína y esta relacionado con el incremento de la penetración de la proteína por medio de la relación, $A^p = a_s N_{mono}$, K es la medida de la capacidad de la proteína para incorporarse a la interfase. El incremento del área debido a la penetración de la BSA y BSA/NDEA fue comparada con el área que podría ocupar la proteína pura depositada en agua con alta concentración de sal como se explicó en la parte experimental a una presión de 10 mN/m.

Los valores obtenidos para K se muestran en la Tabla 2. Los resultados para BSA pura son similares a los obtenidos por Xicotencalt-Cortes y colaboradores¹¹ quienes analizaron la penetración de apolipoproteínas en monocapas de DPPC. Se observa que el tamaño del valor de K para BSA es más grande que los obtenidos para los dos complejos BSA/NDEA, indicando una mayor penetración de la proteína. Estos resultados fueron demostrados por

Tabla 2. Parámetros de adsorción de BSA en interfase agua/aire para diferentes concentraciones de NDEA

<u>NDA/BSA</u>	<u>$K \times 10^{25}$</u> <u>$A^{0.5}/s$</u>	<u>% BSA</u>
<u>0</u>	<u>15</u>	<u>6.5</u>
<u>12,500</u>	<u>9.5</u>	<u>4.5</u>
<u>25,000</u>	<u>0.1</u>	<u>2.7</u>

mediciones realizadas por análisis axisimétrico de gota, debido a un mayor contenido de α -hélice en las moléculas de BSA pura. Es interesante observar que el porcentaje de penetración de la proteína es relativamente bajo debido a la presión inicial de DPPC, las cuales dificultan la penetración de las moléculas de BSA en la monocapa de DPPC a altas presiones.

Microscopía de Ángulo de Brewster

Las imágenes de BAM fueron tomadas sobre una monocapa de DPPC a una presión fija de 10 mN/m en el equilibrio de la fase de transición LE-LC, después de que las soluciones de BSA y BSA/NDEA fueron inyectadas en la subfase de agua. En la figura 27a y 27b se muestran las imágenes de la monocapa DPPC/BSA a 15 minutos y 4 horas después de la inyección de BSA, respectivamente. En la figura 27a observamos la coexistencia de fases LE-LC. Es interesante que la fase LC está limitada y llena de pequeñas esferas, probablemente constituidas de moléculas de DPPC, rodeados de moléculas de BSA adsorbidas en la interfase. Después de 4 horas en la figura 27b se observó que las moléculas de DPPC se reorganizan en dominios microscópicos más ordenados rodeados por moléculas de BSA y DPPC desordenadas en la fase LE. En la figura 27c y 27d se muestran las imágenes de la monocapa de DPPC/BSA/NDEA a 15 minutos y 4 horas después de la inyección, respectivamente. Después de 15 minutos se observaron estructuras brillantes no tan definidas como las observadas para la monocapa de DPPC/BSA, debido probablemente a un proceso de difusión más lento de las moléculas BSA/NDEA o a su menor hidrofobicidad. Sin embargo, a tiempos largos como se observa en la figura 28d, las esferas aparecen y se interconectan y rodean la fase LE. También se observó algunos agregados de DPPC.

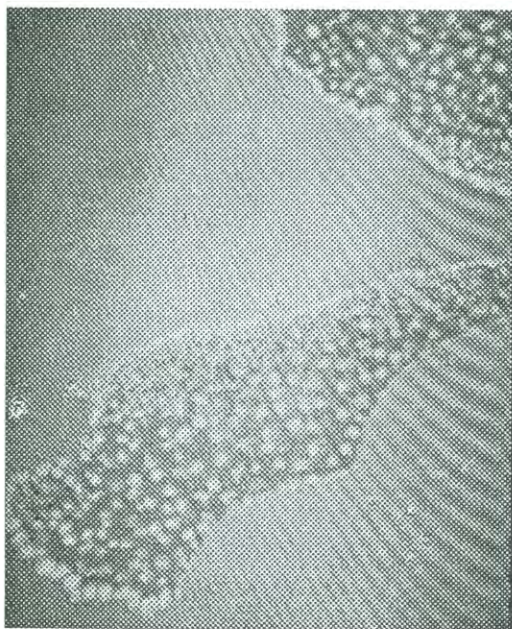


Figura 27a

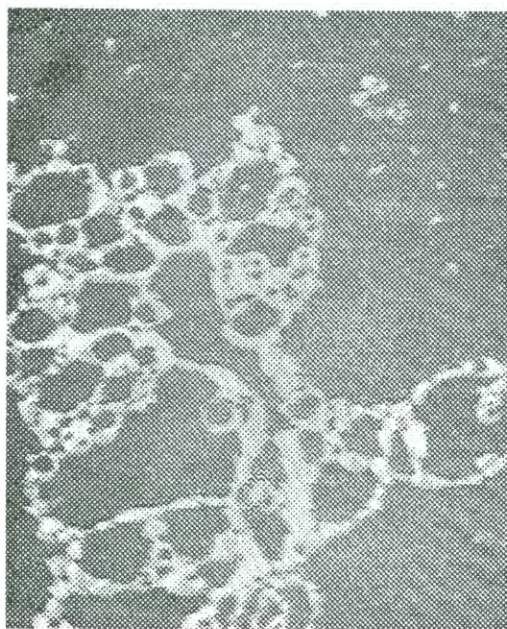


Figura 27b



Figura 27c

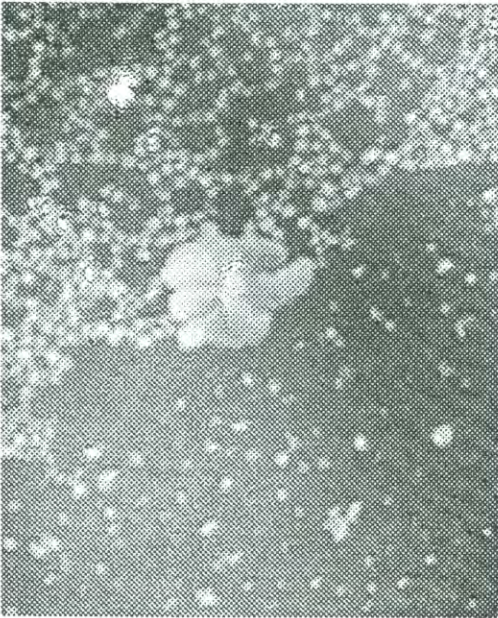


Figura 27d

Microscopía de Fuerza Atómica

Las mediciones por AFM de las monocapas de Langmuir-Blodgett de BSA y de los complejos BSA/NDEA fueron obtenidas directamente sobre mica y sobre una bicapa de DPPC previamente formada sobre mica clivada. En la Figura 28a se muestra la imagen de una monocapa de BSA obtenida directamente sobre mica, como puede observarse la BSA forma una estructura (una monocapa) uniforme con agregados pequeños y cercanos entre ellos con alturas promedio de 1.2 nm y otra población más pequeña de alturas promedio de 2.6 nm, el tamaño promedio de estos agregados oscila entre los 70 y 80 nm. Se puede hacer una estimación simple del número de moléculas que forma cada agregado, si estos se consideran un disco de 80 nm de diámetro y asumiendo que cada molécula de BSA tiene un diámetro promedio de 8 nm⁵⁸, obteniendo así un promedio de 100 moléculas de BSA por cada agregado. En contraste con esta estructura plana que forma la BSA sobre la mica, se observó que la monocapa obtenida sobre la bicapa de DPPC, tal como se muestra en la Figura 28b, las moléculas de proteínas forman agregados grandes y aislados. El histograma de alturas para este caso muestra un pico de 1.6 nm y otro pico más pequeño de 3.2 nm. Esto indica una interacción débil comparado con la interacción de la BSA con la mica. El tamaño promedio de estos agregados está en el rango de 100 a 300 nm, haciendo la misma estimación del número de moléculas de BSA presentes en cada agregado se tienen 600 moléculas de BSA por agregado. Este mismo comportamiento se ha observado para las monocapas de los complejos de BSA/NDEA utilizando las concentraciones de 2000 y 12500 moléculas de carcinogénico por 1 molécula de BSA sobre la bicapa de DPPC, mostrando imágenes con altos valores de rugosidad y más agregados con alturas promedio de 5 nm. En las Figuras 28c y 28d se muestran imágenes obtenidas por AFM de las monocapas de los complejos BSA/NDEA con concentraciones de 200 y 12500 extraídas directamente sobre mica. Como

puede observarse en la Figura 28c la estructura es menos compacta comparada con la observada para la BSA, se forman agregados con alturas promedio en el rango de 1.6-1.7 nm. Un pequeño pico aparece en el histograma de alturas de 2 a 4 nm, el tamaño promedio de los agregados es de 60 nm. Finalmente en la Figura 28d muestra la imagen de la monocapa del complejo 1:12500 de BSA/NDEA sobre mica. Las alturas promedio de los agregados están en el rango de 3.7 a 4.5 nm y el tamaño promedio está entre los 40 y 60 nm. Las alturas promedio de estos agregados son mayores que los observados para BSA y el complejo 1:2000 BSA/NDEA, probablemente debido a la concentración de NDEA. Este mismo fenómeno es observado en las monocapas de obtenidas sobre DPPC para estas concentraciones de NDEA.

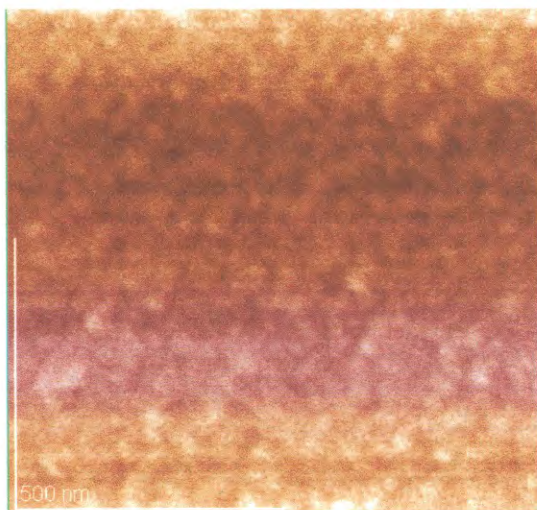


Figura 28a. Imagen de BSA sobre mica clivada

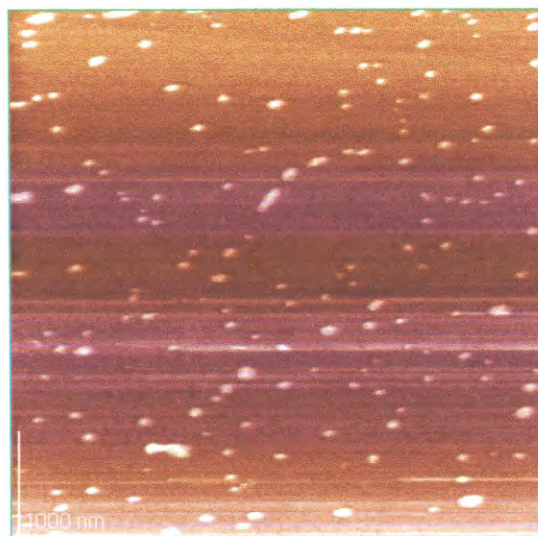


Figura 28b. Imagen de BSA sobre una bicapa de DPPC

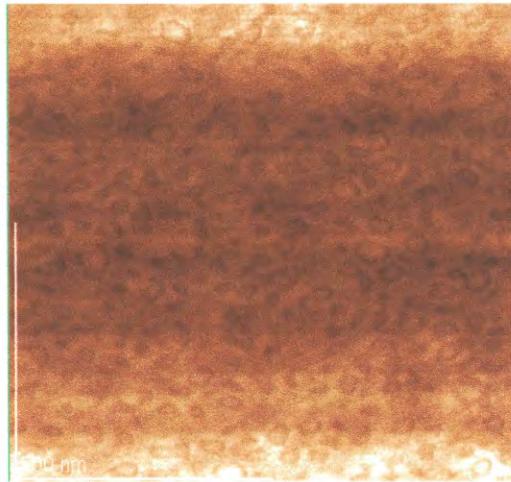


Figura 28c. Imagen del complejo BSA/NDEA (1:200) sobre mica clivada

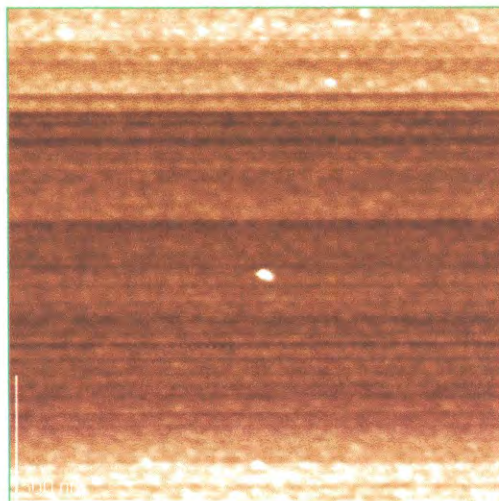


Figura 28d. Imagen del complejo BSA/NDEA (1:12500) sobre mica clivada

CONCLUSIONES

En este trabajo se investigó la interacción de BSA y complejos BSA/N-nitrosodietilamina (con diferentes concentraciones de carcinogénico) con monocapas de DPPC en interfase agua/aire. Nuestros resultados muestran las modificaciones en las isotermas de DPPC en la interfase agua/aire por el efecto de la adsorción de BSA y BSA/N-DEA, pero sobre todo la formación de una nueva fase transición alrededor de los 20 mN/m, ya que esta fase de transición no aparece en la isoterma de DPPC en interfase agua/aire. De las mediciones de las extrapolaciones de áreas a presión de cero se encontró un cambio a áreas mayores dependiendo del tiempo de adsorción de las moléculas de BSA y/o BSA/NDEA sobre la monocapa de DPPC. Se muestra que a tiempos mayores la capacidad de la proteína de migrar a la interfase es mayor, lo cual se ve reflejado en un aumento de área por molécula a una presión determinada. Después de 12 horas de la adsorción de BSA las isotermas permanecen estables y más expandidas, indicando la saturación de la monocapa. Además, se pudieron observar variaciones en el área molecular lo cual puede ser entendido como mayor penetración de la BSA en la monocapa de DPPC. Para el complejo BSA/NDEA en la fase condensada se encontraron áreas mayores que para la proteína pura, lo cual puede ser interpretado como una mayor penetración del complejo en la monocapa a altas presiones o mayor tamaño de las moléculas de BSA por la interacción con la NDEA. La rigidez de la monocapa de DPPC resultó afectada por la presencia de BSA/NDEA, ya que se observó que la presencia de moléculas de NDEA en la BSA, interaccionan con el DPPC en la interfase agua/aire, produciendo películas más rígidas cuando la proporción utilizada es de 1:2000, lo cual se refleja en valores mayores en los módulos de compresibilidad, ya que previamente se ha determinado que a esta concentración de NDEA se produce un aumento en el contenido de hélice- α , por lo tanto, entre menor sea el contenido de hélices- α mayor flexibilidad presenta la monocapa, tal como es el caso de las

proporciones de 1:12500 y 1:25000, así como para BSA pura. Se observó que el incremento de la presión alcanzada por los complejos BSA/NDEA es más baja en comparación con el incremento de presión alcanzada por la inyección de la solución de BSA pura y esta diferencia es más notable a una presión inicial de 10 mN/m, cuando la monocapa de DPPC se encuentra en la fase de equilibrio LE-LC; obteniendo en general un comportamiento lineal, además que la BSA no puede penetrar la monocapa a presiones iniciales mayores de 20 mN/m. Mediante las imágenes de BAM se logró observar una coexistencia de fases (LE-LC) notando que la fase LC está limitada y llena de pequeñas esferas brillantes probablemente constituidas de moléculas de DPPC rodeadas de moléculas de BSA adsorbidas en la interfase, a tiempos mayores se observó un rearrreglo a dominios más ordenados, apareciendo moléculas desordenadas de BSA y DPPC en la fase LE. En el caso de las imágenes de DPPC/BSA/NDEA se observaron estructuras brillantes no tan definidas debidas probablemente a un proceso de difusión más lento de las moléculas de BSA/NDEA a la interfase o a su menor hidrofobicidad. De acuerdo a las imágenes de AFM la monocapa de BSA obtenidas directamente sobre mica y la obtenida sobre la bicapa de fosfolípido muestran estructuras más homogéneas con alturas promedio menores a las obtenidas para las monocapas de BSA/NDEA, esto debido probablemente a una interacción más fuerte entre la mica y la proteína en comparación con la interacción producida en los complejos BSA/NDEA.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) Peters, T., Jr. All About Albumin, Biochemistry, Genetics and Medical Applications, Academia Press, San Diego. 1996
- (2) Joichi Murayama and Mihoko Tomida.. Biochemistry, 2004, 43, 11526-11532
- (3) Cartier, D.C., Ho, J.X. Adv Protein Chem. Macromolecules 2004. 5, 1956-1961.
- (4) Xiaoli Wang, Quiang He, Suping Zheng, Gerald Brezesinski, Helmuth Möhwalld and Junbai Li. J. Phys. Chem. B 2004, 108. 14171-14177
- (5) J.N Herron. W. Muller, M. Pauder, H. Riegler, H. Ringsdor, P.A. Suci. Langmuir 8. 1413. 1992
- (6) Amélida M. Goncalves da Silva, Rute I.S. Romano, Suzana M. Andrade, Sílvia M.B Costa. Colloids and Suffases B: Biointerfaces 30. 2003. 259-272
- (7) Andrzejewski, P., Kasprzyk-Hordern, B., Nawrocki, J. (2005). ELSEVIER 176. 37-45.
- (8) Bartsch, E. and Hietanen, C. (1989). Biol. Med 7. 637-644
- (9) Mac. Ritchie, F.; Alexander, A. E.; J. Colloid and Interface Scie. 1963, 18, 453.
- (10) Benjamins, J.; De Feijter, J. A.; Evans, M. T. A.; Graham, D. E.; Phillips, M. C. Faraday Disscusions, Chem. Soc. 1975, 59, 218.
- (11) Xicohtencatl-Cortes, J.; Mas-Oliva, J.; Castillo, R. J.(2004). Phys. Chem. B. 108, 7307-7315.
- (12) Hollars, G. W.; Dunn, R. C. Biophysical Journal 1998, 75, 342.
- (13) Cho, D.; Cornec, M. A. Bull. Korean Soc. 1999, 20 (9), 999
- (14) Zhao, H.; Dubielecka, P. M.; Söderlund, T.; Kinnunen, P. K. J. Biophysical J. 2002, 83, 954.
- (15) Kinnunen, P. K. J. Chem. Phys. Lipids 1991, 57, 375.

- (16) Lagmiur-Blodgett Films. Roberts Gareth. Plenum Publishing corporation. 1990, New York. Pp. 1
- (17) A. Barraud, C. Rosilio, and A. Ruaudel Teixier, *Thin Solid Films*, 68, 91 (1980)
- (18) Abraham Ulman *Ultrathin organic films* academic press, San Diego, New York, Boston, London, Sidney Tokyo Toronto 1991
- (19) P. Martín and M. Szablewski, *Nima technology operating manual* 6th edition, England 2002
- (20) K.B. Blodgett, *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 1007 (1935)
- (21) V.M. Kaganer, H. Mowald y P. Dutta. *Rev of Mod. Phys.* 71, 779. 1999
- (22) *Langmuir Blodgett Systems Users Manual*, Nima technology LTD. 1992
- (23) George L. Gaines *Insoluble Monolayers at Líquid-Gas Interfaces*, Intersciencie Publishers, New York, London Sidney.
- (24) M. Löshe, E. Sackmann, H. Möhwald: *Ver. Bunsenges. Phys. Chem.* 87, 848 (1983)
- (25) Ryley S, Chyla A. T. And Pterson I.R. 2000 *Thin Solid Films* 370 294
- (26) Peterson I:R. 1992 *Molecular Electrinics* Ashwell G.J Edt. 117
- (27) Bilewicz R, Sawaguchi T, Chamberlain R.V. and Majda M. 1995 *Langmuir* 11 2256
- (28) Nicolae C.A, Cantin-Riviere S., El Abed A, Peretti P, 1997 *Lagnmuir* 135507
- (29) Schwatz D.K, Garneas J. Viswanathan R, Chiruvoluan S. Zasadzinski, J.A.N. 1993, *Phys. Rev. E* 47 452
- (30) Henon S. And Meunier J. 1991 *Rev. Sci Instrum*, 62936
- (31) Qun Huo, Stoyan Russev, Takeshi Hasegawa, Jujiro Nishijo, Junzo Umemura, Germain Puccetti, K.C Rusell and Roger M. Leblanc, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 122, pp 7890-7897, 2000

- (32) Kjaer K., Als-Nielsen, Helm, C.A. Tippman-Krayer, P., 1987 Phys. Rev. Lett. 58 2224
- (33) Marc N.G. de Mul, and J. Adin Mann Jr. Langmuir 14, 2455-2466. 1998
- (34) JSPM-4210/TM-4210BU SCANNING PROBE MICROSCOPE JEOL
- (35) Binning, G, Quate, C.F. and Gerber, Ch. Atomic force microscope. Phys. Rev Letts. 56, 930-933. 1986
- (36) Bustamante, C. Vesenka, J. Tang, C.L. Rees, W, Guthold, M. and Keller, R. (1992).
- (37) Meyer ,G. and Amer, N.M. (1988). Appl. Phys. Letts. 53 1045-1047
- (38) Firtel, M. and Beveridge, T.J. (1995). Micron. 26, 347-362
- (39) Benzanilla, M, Drake, B, Nudler, E, Kashlev, M, Hansma, P.K. and Hansma, H.G. (1994). Biophys. J. 67, 2454-2459
- (40) Fritzsche, W. and Henderson, E (1996). Scanning Microscopy 10, 103-110
- (41) Overbeck, G.A., Höning, D., and Möbius, D., (1993). Langmuir 9, 555.
- (42) Rodriguez PATino, JM; et al. (1999a). Langmuir, 15, 4777.
- (43) Wu, F. Gerike, A., Flach, C.R. (1998). Biophys. J. 74, 3273.
- (44) Neumann N., Snatzke, G. (1990). El Seveir. New York. 107-117.
- (45)www.galeon.com
- (46) Berova Nina, Nakanishi Koji and Woody Robert. (2000). Circular Dichroism: Principles and Applications. Second Edition. Wiley-VCH. 601-603
- (47) Tripp, B.C., Magda, J.J., and Andrade, J.D. (1995). J. Colloids Interface Sci 173, 16.
- (48) Magdassi, S. (1996). Surface Activity of Proteins. Marcel Dekker. New York, 2-12.
- (49) Coke, M., Wilde, P.J., Russell, E.J., and Clark, D.C. (1990). J. Colloid Interface Sci. 138, 498.

- (50) Miller, R., Policova, Z., Sedev, R., and Neumann, A.W. (1993). Relaxation behavior of human albumin adsorbed at the solution/air interface. *Colloids Surf. A.* 76, 179.
- (51) Graham, D.E and Philips, M.C. (1979) Proteins at liquid interfaces. II. Adsorption isotherms. *J. Colloid Interface Sci.* 70, 415.
- (52) Damodaram, S and Song, K.B. (1999). *Biochim. Biophys. Acta* 954, 253.
- (53) Lu, J,R and Su, T.J. (1999). *Langmuir* 15, 6975.
- (54) Carter, D.C., He, X.M, Munson, S.H., Twingg, P.P., Gernet, K.M., Broom, M.B and Miller, T.Y. (1989). *Science* 24, 1195.
- (55) Diociaiuti M., Bordi, F., Motta, A., Carosi, A., Molinari, A., Arancia, G and Coluzza, C. (2002). *J. Biophysical.* 82, 3198-3206
- (56) Mac. Ritchie, F.; Alexander, A. E.; *J. Colloid and Interface Scie.* 1963, 18, 453.
- (57) Wang, X.; He, Q.; Zheng, S.; Brezinzki, G.; Möwald, H.; Li, J. *J. Phys. Chem. B.* 2004, 108, 14171.
- (58) Juárez, J.; Galaz, J. G.; Machi, L.; Burboa, M.; Gutiérrez, L. E.; Goycoolea, F. M.; Valdez, M. A. *J. Phys. Chem. B* 2006 , en revisión.
- (59) Caetano, W.; Ferreira, M.; Oliveira Jr., O. N.; Itri, R. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2004, 38, 21.
- (60) Broniatowski, M.; Sandez-Macho, I.; Miñones Jr., J.; Dinarowicz-Latka, P. *J. Phys. Chem. B* 2004, 108, 13403.
- (61) Dynarowicz-Latka, P.; Dhanabalan, A.; Oliveira Jr., O. N. *J. Phys. Chem. B.* 1999, 103, 5992.

(62) Parra-Barraza, H.; Burboa, M. G.; Sánchez-Vásquez, M.; Juárez, J.; Goycoolea, F. M.; Valdez, M. A. *Biomacromolecules* 2005, 6, 2416.

(63) Ihalainen, P. I.; Peltonen, J. *Langmuir* 2003, 19, 2226.

(64) Kouzayha, A.; Besson, F. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005, 333, 1315.