



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales

**“Evaluación de las Propiedades Fluorescentes e Interfaciales de la
Proteína B-Ficoeritrina Purificada de la Microalga Roja
Rhodorus marinus”**

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIA DE MATERIALES

Por:

Guadalupe Adriana Básaca Loya

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

COMITÉ EVALUADOR DE TESIS

Presidente:	Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias
Secretaria:	Dra. Lorena Machi Lara
Vocal:	Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta
Vocal:	Dra. Yolanda Leticia López Franco
Vocal externo:	Dr. Francisco Martín Goycoolea Valencia
Suplente:	Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán

DIRECCIÓN DE TESIS

Director:	Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias
Codirectora:	Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta

Los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis de Doctorado de Guadalupe Adriana Básaca Loya la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencia de Materiales, en el programa de Doctorado en Ciencia de Materiales.

Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias

Presidente

Dra. Lorena Machi Lara

Secretaria

Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta

Vocal

Dra. Yolanda Leticia López Franco

Vocal

Dr. Francisco Martín Goycoolea Valencia

Vocal Externo

Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán

Suplente

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMEN	v
Abstract	vii
INTRODUCCIÓN	ix
CAPÍTULO 1	1
1. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1 Motivaciones del Trabajo de Investigación	1
1.2 Planteamiento del Trabajo de Investigación	3
1.3 Objetivo General	4
1.4 Objetivos Particulares	4
CAPÍTULO 2	6
2. ASPECTOS TEÓRICOS	6
2.1 Ficoeritrina	6
2.2 Espectroscopía de UV-Visible	7
2.3 Fluorescencia.....	10
2.3.1 Fluorescencia de Proteínas	12
2.4 Estudio de Proteínas en Interfases.....	15

2.5 Superficies e Interfases.....	16
2.6 Isotermas y Monocapas de Langmuir	17
2.6.1 Isotermas de Langmuir	18
2.6.2 Monocapas de Langmuir	20
2.7 Ecuación de Young-Laplace y Tensiómetro de Gota.....	20
2.7.1 Métodos Aplicados	22
2.8 Microscopía de Ángulo de Brewster	25
2.8.1 Fundamento del BAM	26
2.9 Microscopía de Fuerza Atómica	26
CAPÍTULO 3	31
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	31
3.1 Reactivos y Sustancias	31
3.2 Cepa algal y condiciones de cultivo	32
3.3 Preparación y fraccionamiento del extracto crudo	32
3.4 Cromatografía.....	33
3.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio	34
3.6 Mediciones espectroscópicas	34
3.7 Procedimientos analíticos.....	35
3.8 Mediciones de tensión superficial y reología	35
3.9 Isotermas y monocapas de Langmuir-Blodgett.....	36

3.10 Microscopía de Ángulo de Brewster.....	37
3.11 Microscopía de Fuerza Atómica	37
CAPÍTULO 4	38
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1 Extracción y purificación de la proteína B-Ficoeritrina.....	38
4.2 Propiedades fluorescentes de B-FE.....	42
4.3 Propiedades interfaciales de B-FE en la interfase líquido-líquido.....	46
4.4 Propiedades interfaciales de B-FE en la interfase aire-agua.....	55
4.4.1 Imágenes de BAM.....	61
4.5 Imágenes de AFM.....	63
CAPÍTULO 5	66
5. CONCLUSIONES	66
CAPÍTULO 6	68
6. BIBLIOGRAFÍA	68

LISTA DE ABREVIATURAS

B-FE	B-Ficoeritrina
R-FE	R-Ficoeritrina
FB	Ficobiliproteínas
FE	Ficoeritrina
FEC	Ficoeritrocianina
FC	Ficocianina
AF	Aloficocianina
FEB	Ficoeritrobilina
FUB	Ficourobilina
FCB	Ficocianobilina
FXB	Ficobiliviolina
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
UV	Ultravioleta
AFM	Microscopio de Fuerza Atómica
BAM	Microscopio de Ángulo de Brewster

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectro de absorción y fluorescencia de R-ficoeritrina comercial [4].	8
Figura 2. Espectro de absorción y fluorescencia de B-ficoeritrina comercial [4].	9
Figura 3. Diagrama de niveles de energía. Se muestran parte de los cambios que ocurren durante la absorción (a), relajación no radiante (b) y fluorescencia (c) [24].	13
Figura 4. Espectro de absorción de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano [24].	14
Figura 5. Formación de una monocapa de Langmuir y obtención de una isoterma.	19
Figura 6. Isoterma generalizada para los ácidos grasos [38].	21
Figura 7. Diagrama representativo del Ángulo de Brewster [51].	27
Figura 8. Diagrama esquemático del Microscopio de Ángulo de Brewster [45].	28
Figura 9. Sistema de detección para desviación del haz láser en el AFM [52].	30
Figura 10. Espectro de absorción del extracto crudo obtenido de la biomasa de <i>Rhodospirillum rubrum</i> .	39
Figura 11. Espectro de absorción de la proteína obtenida mediante cromatografía de intercambio aniónico (Q Sepharose), utilizando fosfato de sodio 0.01 M/NaCl 0.1 M (pH 7.0) como amortiguador.	41
Figura 12. Espectro de absorción de la B-ficoeritrina purificada mediante cromatografía de exclusión por tamaño (cromatografía líquida de alta resolución).	43
Figura 13. SDS-PAGE de la proteína B-FE purificada. De izquierda a derecha las líneas/bandas corresponden a: 1) marcadores proteicos y 2) B-FE purificada por cromatografía de filtración en gel de alta resolución.	44

Figura 14. Espectros de emisión de fluorescencia para B-FE en solución con diferente valor de pH, obtenidos a temperatura ambiente. Concentración de proteína 0.125 mg/mL.	45
Figura 15. Presión superficial de B-FE en la interfase hexadecano-agua, utilizando diferentes pH en la fase acuosa. La concentración de B-FE fue de 0.125 mg/mL y temperatura constante de 25°C.	48
Figura 16. Módulo elástico dilatacional de B-FE en la interfase hexadecano-agua para diferente pH en la fase acuosa en diferentes frecuencias. La concentración de B-FE fue de 0.125 mg/m y la temperatura de 25°C. Las mediciones fueron realizadas después de 9000 s.	53
Figura 17. Módulo viscoso de B-FE en la interfase hexadecano-agua para diferente pH en la fase acuosa en diferentes frecuencias. La concentración de B-FE fue de 0.125 mg/mL y la temperatura de 25°C .Las mediciones fueron realizadas después de 9000 s.	54
Figura 18. Isotermas de B-FE en la interfase aire-agua para diferentes soluciones de pH en la fase acuosa.	56
Figura 19. Módulos de compresibilidad para diferentes soluciones de pH en la fase acuosa.	58
Figura 20. Ciclos de compresión y expansión de monocapas de B-FE en la interfase aire-agua utilizando diferentes soluciones de pH en la subfase. Los ciclos fueron iniciados 30 minutos después de dispersar la proteína.	60
Figura 21. Imágenes de BAM en la interfase aire-agua, variando el pH de la fase acuosa. Imagen a), c) y e) obtenidas durante la compresión del primer ciclo a una presión de 18 mN/m y pH de 2.5, 4.5 y 10, respectivamente. Imágenes b), d) y f)	

obtenidas después de varios ciclos de compresión-expansión y pH 2.5, 4.5 y 10, respectivamente.62

Figura 22. Imágenes de AFM de monocapas de Langmuir-Blodgett de B-FE observadas 1h y 48h después de ser obtenidas sobre mica a 20 mN/m en la interfase aire-agua, utilizando diferente pH en la subfase. a) pH 7, 1 h; b) pH 7, 48 h; c) pH 4.5, 1 h ; d) pH 4.5 48 h; e) pH 2.5, 1 h; f) pH 2.5, 48 h.65

RESUMEN

En este trabajo se describe la extracción y purificación de la proteína B-ficoeritrina (B-FE) de la microalga roja *Rhodospirillum rubrum* y el estudio de las propiedades fluorescentes e interfaciales de esta proteína, utilizando diferentes valores de pH en la fase acuosa: 2.5, 4.5, 7 y 10. El estudio de las propiedades interfaciales se realizó en la interfase aire-líquido, líquido-líquido y aire-sólido.

Inicialmente se extrajeron las ficobiliproteínas (FB) de las células microalgales mediante fragmentación manual y sonicación. La proteína B-FE fue purificada mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de exclusión por tamaño e intercambio aniónico. La pureza de B-FE se determinó a través de estándares de pureza y electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). La caracterización espectroscópica de B-FE se realizó mediante espectroscopia UV-visible y espectroscopia de fluorescencia.

Rhodospirillum rubrum presentó tres tipos de ficobiliproteínas: ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina. La proteína B-FE es el pigmento predominante en la microalga *R. rubrum*, la cual purificada mostró un alto índice de pureza ($A_{540}/A_{280} = 4.8$) y picos característicos a 540 y 562 nm con un hombro a 498 nm. Esta microalga roja podría ser una opción viable para la obtención de esta cromoproteína.

El comportamiento de la adsorción de la proteína a tiempos cortos y largos en la interfase hexadecano-agua se obtuvo midiendo la tensión interfacial y el módulo elástico dilatacional. Las moléculas de proteína en pH 4.5 y 7 fueron adsorbidas en menor tiempo que las moléculas de proteína en pH 2.5 y 10, probablemente debido a interacciones hidrofóbicas

favorecidas por moléculas menos cargadas. Similarmente, la proteína en pH 4.5 y 7 mostró valores altos de módulo elástico, probablemente como consecuencia de la conformación globular. Un comportamiento similar fue observado en la interfase aire-agua, donde el área molecular fue dependiente del valor del pH en la subfase, obteniendo un mayor tamaño en pH 2.5. Por el contrario las monocapas de proteína fueron inestables en pH 10. Los módulos de compresibilidad mostraron la existencia de fases similares a la de líquido expandido y líquido condensado en equilibrio y mostraron una rigidez relativamente mayor que las monocapas a pH 4.5 y 7. Los resultados de los ciclos de compresión/expansión realizados a las monocapas mostraron que después de diez ciclos, el área se mantiene constante.

Las imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) fueron analizadas en diferentes tiempos, estas imágenes muestran también la influencia del pH en la homogeneidad de la monocapa y la existencia de un fenómeno de agregación-cristalización después de 48 h. El espectro de emisión de fluorescencia de B-FE en diferente pH mostró comportamiento similar con B-FE obtenida de otras especies de microalgas, al presentar un pico de intensidad máximo en pH cerca de su punto isoeléctrico y disminuir progresivamente en los extremos del rango de pH probado.

Abstract

In this study we report the extraction and purification of B-phycoerythrin (B-PE) protein from red microalgae *Rhodospirillum rubrum* and the study of fluorescent and interfacial properties of this protein, using different values of pH in the aqueous phase: 2.5, 4.5, 7 and 10. The study of the interfacial properties was carried out at the air-liquid, liquid-liquid and air-solid interfaces.

Initially, phycobiliproteins were released from microalgal cells by manual cellular fragmentation and sonication. B-PE was extracted with ammonium sulfate precipitation, and purified by anionic and size exclusion chromatography. Its purity was tested using standards and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Spectroscopic characterization of B-PE was performed by UV-visible spectroscopy and fluorescence spectroscopy.

Rhodospirillum rubrum showed three types of phycobiliproteins: phycoerythrin, phycocyanin, and allophycocyanin. The purified B-PE showed a high purity ratio (A_{545}/A_{280}) of 4.8, characteristic peaks at 540 and 562 nm with a shoulder at 498 nm. B-PE was found to be the predominant pigment in *R. rubrum* and these red microalgae could be a viable option for the recovery of this chromoprotein.

The short and long term behavior were investigated for the protein adsorption at the hexadecane-water interface by measuring the interfacial tension and the dilatational elastic modulus. For pH 4.5 and 7 protein molecules were adsorbed faster than at pH 2.5 and 10, probably due to the enhancement of hydrophobic interactions favored by less charged molecules. Similarly, for pH 4.5 and 7 higher elastic modulus values were obtained as a

consequence of a globular conformation. Similar behavior was observed at the air-water interface. The molecular area was dependent on the pH of the subphase, attaining a larger size for pH 2.5, in accordance with previous studies. On the contrary, protein monolayers were unstable for pH 10. Compressibility modulus showed the existence of phases similar to liquid expanded and liquid condensed phases and exhibited a relative higher rigidity of monolayers for pH 4.5 and 7. Results of compression/expansion cycles performed on monolayers, demonstrated that after 10 cycles the area at pH 2.5, 4.5 and 7 remained constant.

Atomic force microscopy images of Langmuir-Blodgett protein monolayers were registered at different times and demonstrated also the influence of pH on the homogeneity of the monolayer and the existence of an aggregation-crystallization like phenomenon after 48 h. Fluorescence emission spectra of B phycoerythrin at different pH showed similar behavior with other B phycoerythrins from other sources.

INTRODUCCIÓN

La proteína ficoeritrina (FE) pertenece al grupo de las FB, las cuales actúan como pigmentos accesorios en el proceso de fotosíntesis en algas marinas. Se encuentran organizadas en estructuras celulares llamadas ficobilisomas, los cuales están unidos en conjuntos regulares en la superficie exterior de los tilacoides de cianobacterias, algas rojas y criptomonadas [1-3]. En su configuración nativa, la luz absorbida por las FB en un rango de longitud de onda de 495-655 nm es eficientemente transferida a la clorofila [2, 4-6]. Cuando las FB son aisladas y purificadas son altamente fluorescentes debido a que las moléculas no tienen un vecino aceptor a quien transferir la energía absorbida. Las FB se dividen en tres clases de acuerdo a sus propiedades de absorción: ficoeritrina (FE) y ficoeritrocianina (FEC) las cuales absorben luz principalmente en un rango de 480 a 580 nm, ficocianina (FC) la cual tiene su principal absorción en el rango de 600 a 640 nm y aloficocianina (AF) de 620 a 660 nm [2, 3, 6-8].

Las FB son solubles en agua y están compuestas de α , β y γ subunidades (la subunidad γ solo se encuentra en FE), cada una de las cuales está constituida por una apoproteína y uno o más clases de grupos prostéticos tetrapirrol incluyendo: ficoeritrobilina (FEB), ficourobilina (FUB), ficocianobilina (FCB) y ficobiliviolina (FXB). Los grupos prostético tetrapirrol están covalentemente unidos a las apoproteínas, las cuales son proteínas muy estables mostrando diferentes propiedades de absorción y fluorescencia [7, 8]; estos cromóforos están localizados en regiones hidrofóbicas de la molécula de proteína.

Las propiedades espectrales de la proteína FE depende de la estructura nativa del polipéptido y su interacción con diferentes cromóforos. La alteración de la conformación

nativa por calentamiento o desnaturalización química, resulta en una pérdida parcial o completa de la fluorescencia debido a cambios en la estructura de los cromóforos [1].

Excepto las aloficocianinas, las otras dos clases de ficobiliproteínas están representadas por varios tipos: B-, b-, R- y C-ficoeritrina y C- y R-ficocianina las cuales difieren considerablemente en su estructura y propiedades espectroscópicas [3, 9], por lo cual estas proteínas son utilizadas como marcadores en una gran variedad de diagnósticos e investigaciones que involucran marcadores celulares, análisis de células e inmunoensayos [3, 8].

Koller y Wehrmeyer [10] encontraron dos isoproteínas de B-FE nativa de la microalga roja *Rhodella violacea*. El espectro de emisión de fluorescencia mostró una emisión máxima a 575 nm para B-FE I y 578 nm para B-FE II. Ambos espectros mostraron un hombro a 630 nm. Encontraron que B-FE I tiene un peso molecular aproximado de 280,000 Da y su punto isoeléctrico a pH 4.39, B-FE II tiene un peso molecular cerca de 265,000 Da y su punto isoeléctrico en pH 4.23. Basados en mediciones de espectroscopia de UV-Visible, mediciones viscosimétricas y de sedimentación. Owaga *et al.*, [9] concluyeron que FE toma tres formas dependiendo del cambio de pH: una forma moderadamente expandida en pH mayor de 9, una forma agregada a pH menor de 5 y una forma compacta en pH entre 5 y 9.

El comportamiento de FB en interfases ha sido muy poco investigado. Samuelson *et al.*, [11] encontraron que la proteína ficoeritrina pura es inestable en la interfase aire-agua, por lo tanto usaron un complejo biotina-ficoeritrina-estreptavidina para unir ficoeritrina a monocapas de fosfolípidos. Otros autores [12, 13] han investigado las propiedades interfaciales de aloficocianina y C-ficocianina en la interfase aire-agua y estimaron el tamaño promedio de estas FB. Bermejo *et al.*, [14] introdujeron B-FE (de la microalga

Porphiridium cruentum) en microemulsiones. Recientemente Li *et al.*, [15] trabajaron con monocapas de complejos de tilacoides-ficobilisomas aislados de *Spirulina platensis* en la interfase aire-agua utilizando el método de Langmuir-Blodgett y demostraron que las ficobiliproteínas conservaron sus propiedades fluorescentes.

En este trabajo reportamos las propiedades fluorescentes e interfaciales de la proteína B-FE de la microalga roja *Rhodospirillum rubrum*. Se analizó el comportamiento de las isothermas y ciclos de compresión-expansión de monocapas de B-FE, obtenidas en la interfase aire-agua variando el pH de la subfase acuosa. Para analizar la adsorción de B-FE en la interfase hexadecano-agua utilizamos el tensiómetro de gota y las películas de Langmuir-Blodgett fueron analizadas con Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) en diferentes tiempos.

CAPÍTULO 1

1. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

En este capítulo se describen de manera breve las motivaciones que nos llevaron a realizar este trabajo de investigación y el planteamiento de las técnicas y experimentos a realizar. Finalmente se plantea el objetivo general y los objetivos particulares.

1.1 Motivaciones del Trabajo de Investigación

El estudio del comportamiento de surfactantes, proteínas, polisacáridos y ácidos desoxirribonucléicos en interfases es de gran importancia en diversas áreas tales como biotecnología, medicina, farmacia y biofísica. Con la aplicación de diferentes técnicas en interfases es posible construir biosensores, incorporando moléculas biológicas en sustratos sólidos y conservando la actividad biológica para detectar otras moléculas [16]. Uno de los ejemplos de biosensores más conocidos es el de glucosa, con grandes implicaciones en medicina [17].

Las proteínas son macromoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos, las cuales generalmente se presentan en interfases celulares, jugando un papel importante en desarrollo de procesos biológicos tales como, en el mecanismo de cicatrización, formación de coágulos de sangre, integración de biomateriales y adhesión de microorganismos infecciosos [18].

La proteína FE, es un pigmento extraído de cianobacterias y algunas microalgas. Esta proteína participa en el proceso fotosintético de estos organismos y es fluorescente. La FE se puede unir fácilmente a anticuerpos y otras proteínas sin que se alteren apreciablemente sus características espectrales y ha sido utilizada en numerosos ensayos inmunológicos como marcadores fluorescentes en células [19].

La estructura de la proteína FE ha sido estudiada desde hace tiempo mediante la técnica de dicroísmo circular [20], también existen estudios de estructura cristalina de la proteína y de sus propiedades ópticas [21], pero actualmente no existen estudios detallados del comportamiento de esta proteína en interfases, como son: aire-líquido, líquido-líquido y aire-sólido. Estos estudios permitirán conocer y analizar las modificaciones en la estructura de la proteína en interfases al variar el pH del medio en el que se encuentre, lo cual es muy importante para poder usar estas proteínas como transportadores de otras moléculas a través de membranas celulares. Es por esto que nuestro interés principal es estudiar las modificaciones de la proteína FE y la alteración en sus propiedades interfaciales. Así mismo el estudio de la estabilidad de la proteína en sustratos sólidos es esencial para poder usar estas moléculas como biosensores o soporte de otras moléculas sensoras.

B-FE tiene un alto costo comercial, debido a sus características espectroscópicas e importantes aplicaciones en el área biotecnológica. En este trabajo realizamos la extracción y purificación de ésta proteína en el laboratorio de Biomoléculas de la Universidad de Sonora. En este laboratorio actualmente se cultiva la microalga *Rhodospirillum rubrum*, fuente de FE y otras biomoléculas importantes en estudios antiproliferativos.

1.2 Planteamiento del Trabajo de Investigación

En este trabajo se estudiaron las propiedades interfaciales y algunas características físico-químicas de la proteína ficoeritrina. Esta proteína es extraída de la microalga roja *Rhodospirillum rubrum*.

Al inicio de este trabajo se describe la estandarización de la metodología de extracción y purificación de la proteína FE, con el fin de optimizar el tiempo de obtención, rendimiento y pureza de esta proteína. La determinación de pureza de la proteína extraída se evaluó utilizando espectroscopía de UV-visible y electroforesis en gel de poliacrilamida.

Para estudiar las propiedades interfaciales de la proteína FE se utilizó la técnica de Langmuir y Langmuir-Blodgett. Estas técnicas nos permitieron conocer el cambio de fase de las moléculas de proteína en la interfase aire-agua. Para realizar estos experimentos se varió el pH de la subfase. Mediante la utilización de la técnica de microscopía de ángulo de Brewster, se observó la modificación de las monocapas de proteína al cambiar la presión de la superficie. Se obtuvieron monocapas de proteína sobre mica, con el fin de determinar su ordenación y estructura por medio de microscopía de fuerza atómica.

Existen estudios realizados por Samuelson *et al.*, [11] en los cuales utilizan la técnica de Langmuir-Blodgett y moléculas de anclaje (biotina-avidina y biotina-estreptoavidina) para formar complejos, ya que no obtienen resultados satisfactorios al tratar de formar monocapas de ficoeritrina. Sin embargo, en estudios preliminares que realizamos de B-FE, obtenida de la microalga *R. rubrum*, pudimos observar que si es posible formar monocapas utilizando la técnica de Langmuir.

Por medio de tensión interfacial utilizando la técnica de la gota colgante (pendant drop) estudiamos las propiedades de adsorción de B-FE en la interfase líquido-líquido con el fin de conocer sus propiedades en interfases hidrofóbicas.

1.3 Objetivo General

Determinar las propiedades fluorescentes e interfaciales de la proteína B-Ficoeritrina purificada de la microalga roja *Rhodosorus marinus*, en la interfase aire-líquido, líquido-líquido y aire-sólido.

1.4 Objetivos Particulares

1. Extraer la proteína B-FE de la microalga roja *Rhodosorus marinus* cultivada en el laboratorio.
2. Purificar la proteína B-FE mediante cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel en HPLC.
3. Caracterizar la proteína B-FE mediante espectroscopia de UV-Visible y fluorescencia.
4. Estudiar las isoterms de Langmuir de B-FE en la interfase aire-agua, variando el pH de la subfase.
5. Obtener imágenes de microscopia de ángulo de Brewster de las monocapas de proteína en diferentes presiones, variando el pH de la subfase.
6. Obtener monocapas de Langmuir-Blodgett de B-FE y realizar su análisis por Microscopia de Fuerza Atómica en diferentes tiempos.

7. Determinar las propiedades de adsorción de B-FE mediante el análisis axisimétrico de gota en la interfase hexadecano-agua, variando el pH de la fase acuosa.
8. Analizar los cambios en las propiedades de fluorescencia de B-FE al variar el pH.

CAPÍTULO 2

2. ASPECTOS TEÓRICOS

En este capítulo se introdujeron algunos conceptos importantes y los aspectos teóricos de las técnicas utilizadas en este trabajo. En la primera parte se describen algunas características importantes de la proteína FE y la importancia del estudio de proteínas en interfases, posteriormente se describen conceptos importantes de superficies e interfases y finalmente se describen los aspectos teóricos de las técnicas realizadas en este trabajo.

2.1 Ficoeritrina

La proteína ficoeritrina es un pigmento accesorio fotosintético encontrado en cianobacterias, algas rojas y criptomonadas [14]. Esta proteína muestra un característico color rojo y es altamente fluorescente. La pigmentación roja de la ficoeritrina es debida a la presencia de grupos cromóforos tetrapirrol líneal llamados bilinas, los cuales se encuentran covalentemente unidos a la apoproteína. La proteína ficoeritrina contiene dos diferentes tipos de cromóforos ficoeritrobilina y ficourobilina. Estos cromóforos se encuentran localizados en regiones hidrofóbicas de la molécula de proteína [22].

La proteína FE puede clasificarse en cuatro grupos principales dependiendo del espectro de absorción: R-FE (hombro a 498 nm, un pico a 565 nm y un pico máximo a 545 nm) (Figura 1)), B-FE (hombro a 499 nm, un pico a 545 nm y un pico máximo a 565 nm)

(Figura 2), b-FE (un pico a 545 nm y un pico máximo a 565 nm) y C-ficoeritrina (pico máximo a 565 nm) [4, 7, 22].

B-FE está formada por tres subunidades α , β y γ , con pesos moleculares de 17,500 Da para las subunidades α y β y para las diferentes subunidades γ 29,000, 29,500 y 30,000 Da, asociados de la siguiente manera $(\alpha\beta)_6\gamma$ [7].

2.2 Espectroscopía de UV-Visible

Los grupos funcionales orgánicos que absorben radiación en la región ultravioleta visible se denominan cromóforos. Los espectros de absorción son representaciones de la absorción o absorptividad molar en función de la longitud de onda, estos espectros son relativamente específicos de cada especie química [23].

La ley de Lambert-Beer establece que la absorbancia está directamente relacionada con las propiedades intrínsecas de la molécula, con su concentración y con la longitud de la trayectoria del haz de radiación al atravesar la muestra. La expresión matemática de la ley de Lambert-Beer es la siguiente [23]:

$$A = C \cdot \varepsilon \cdot L \quad (1)$$

donde:

A = Absorbancia de la muestra

C = Concentración del cromóforo

L = Longitud del paso óptico que contiene la muestra

ε = Absortividad molar

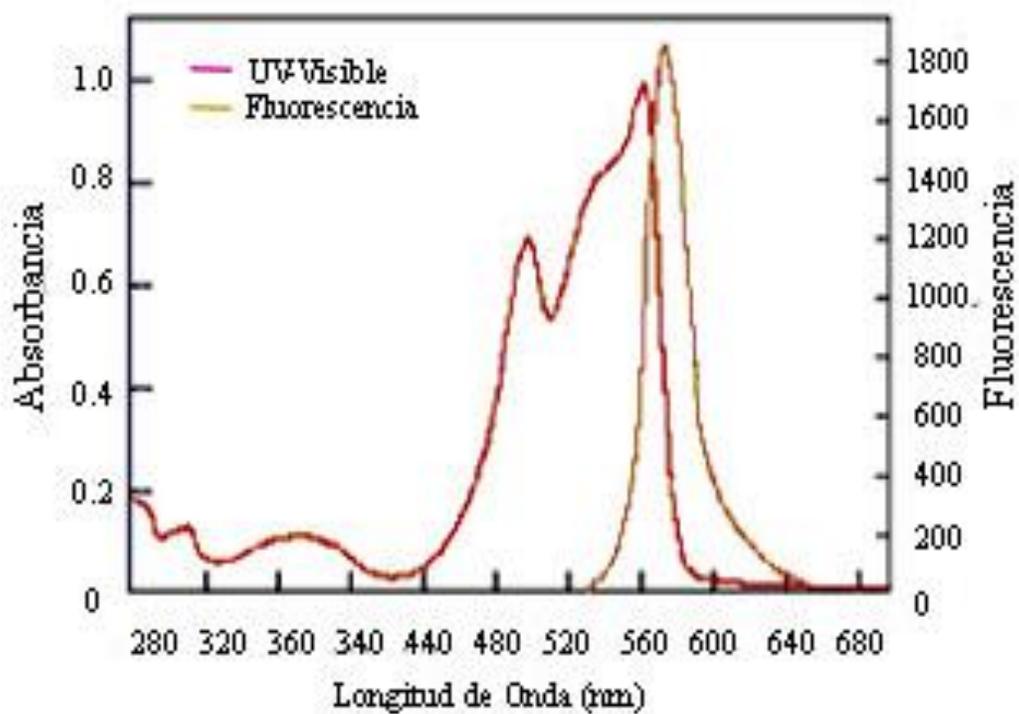


Figura 1. Espectro de absorción y fluorescencia de R-ficoeritrina comercial [4].

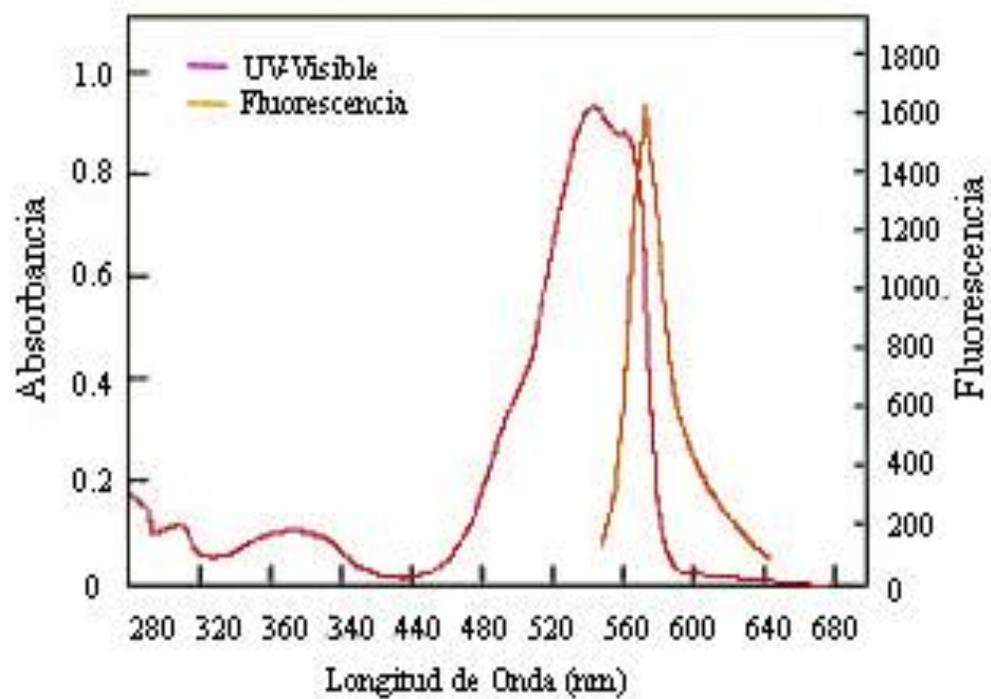


Figura 2. Espectro de absorción y fluorescencia de B-ficoeritrina comercial [4].

El triptófano, la tirosina y la fenilalanina son aminoácidos que se encuentran presentes en proteínas y absorben luz en la región ultravioleta, debido a esta característica, la mayoría de las proteínas absorben luz a 280 nm.

2.3 Fluorescencia

La fluorescencia es un proceso luminiscente en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones con mayor longitud de onda [23]. La fluorescencia es una herramienta ampliamente utilizada para el estudio de diversos procesos biológicos debido a su alta sensibilidad [24].

Las dos principales ventajas de los métodos de fluorescencia sobre los de absorción son: 1) una sensibilidad entre 1 y 3 órdenes de magnitud mayor, y 2) mayor intervalo de respuesta lineal. No obstante, los métodos de fluorescencia se aplican menos que los de absorción, ya que no todos los sistemas químicos son capaces de fluorescer [23].

La luminiscencia se divide en dos tipos, dependiendo de la naturaleza del estado basal y excitado. En un estado singulete excitado, la orientación del spin del electrón en el orbital de más alta energía, tiene una dirección opuesta al spin de un segundo electrón que se encuentra en el orbital de menor energía, por lo que se dice que estos electrones están apareados. En un estado triplete los electrones están desapareados, es decir, los electrones tienen la misma orientación. Para regresar al estado basal de un estado singulete excitado, no es necesario que el electrón cambie su orientación de spin, mientras que para un estado triplete, es necesario un cambio de la orientación de spin para regresar al estado singulete basal. Por lo tanto, la fluorescencia es la emisión de fotones que resulta del regreso de un

orbital de mayor energía a un orbital de menor energía de un electrón apareado. El tiempo de vida media de la fluorescencia es aproximadamente 10^{-8} s o 10 ns. La fosforescencia es la emisión que resulta de la transición entre estados de diferente multiplicidad, generalmente, en el regreso del estado triplete excitado al estado singulete basal, presentando una velocidad de emisión menor que en el caso de la fluorescencia. Los tiempos de vida media típicos para fosforescencia están en el rango de milisegundos o segundos [24].

El tiempo de vida media de una especie excitada es breve porque hay diversas formas en las cuales un átomo o una molécula excitada liberan su exceso de energía y se relajan a su estado fundamental. El camino más probable hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida del estado excitado. Por tanto, si la desactivación por fluorescencia es rápida con respecto a los procesos sin radiación, se observará tal emisión [24].

En la mayoría de las especies químicas, la desactivación por relajaciones no radiactivas (choques moleculares de la especie excitada con el solvente) es la ruta cinéticamente favorecida, ya que el número de especies fluorescentes es muy pequeño en comparación con las especies no fluorescentes. El fenómeno de fluorescencia está restringido a un número relativamente pequeño de sistemas que poseen características estructurales y ambientales que hacen que la velocidad de los procesos de relajación o desactivación sin radiación se reduzca hasta el punto que la reacción de emisión puede competir cinéticamente [24].

La Figura 3 muestra un diagrama de energía parcial para una especie molecular hipotética. Se presentan un nivel energético basal (E_0) y dos excitados (E_1 y E_2). Cada uno de estos estados excitados muestran cuatro niveles vibracionales. Cuando la molécula se

irradia con ondas electromagnéticas cuya energía coincide con las diferencias de energía entre los diferentes niveles, se producen las transiciones electrónicas que se muestran en la Figura 3a. La relajación molecular, señalada por las flechas cortas entre niveles de energía vibracionales, tiene lugar durante las colisiones entre moléculas excitadas y las moléculas del disolvente (Figura 3b). También puede ocurrir el relajamiento no radiante entre el nivel vibracional inferior de un estado excitado y el nivel vibracional superior de otro estado electrónico. Este tipo de relajación se produce por una conversión interna, como se ilustra en la Figura 3b. La fluorescencia es otro proceso de relajación que se muestra en la Figura 3c. La radiación fluorescente se emite cuando las moléculas electrónicamente excitadas se relajan a cualquiera de los estados vibracionales del estado electrónico basal [23].

2.3.1 Fluorescencia de Proteínas

Las proteínas están formadas por aminoácidos, los cuales absorben en la región del ultravioleta cercano del espectro electromagnético. Las proteínas contienen tres aminoácidos que contribuyen a sus propiedades fluorescentes: tirosina, triptófano y fenilalanina. El espectro de absorción de estos aminoácidos se muestra en la Figura 4.

La excitación de las proteínas fluorescentes, generalmente se realiza a la absorción máxima, a 280 nm o a longitudes de onda mayores. Debido a que el rendimiento cuántico de la fenilalanina en proteínas es muy pequeño, la emisión de este aminoácido se observa raramente. La absorción de las proteínas a una longitud de onda de 280 nm es debido a los residuos de tirosina y triptófano [25].

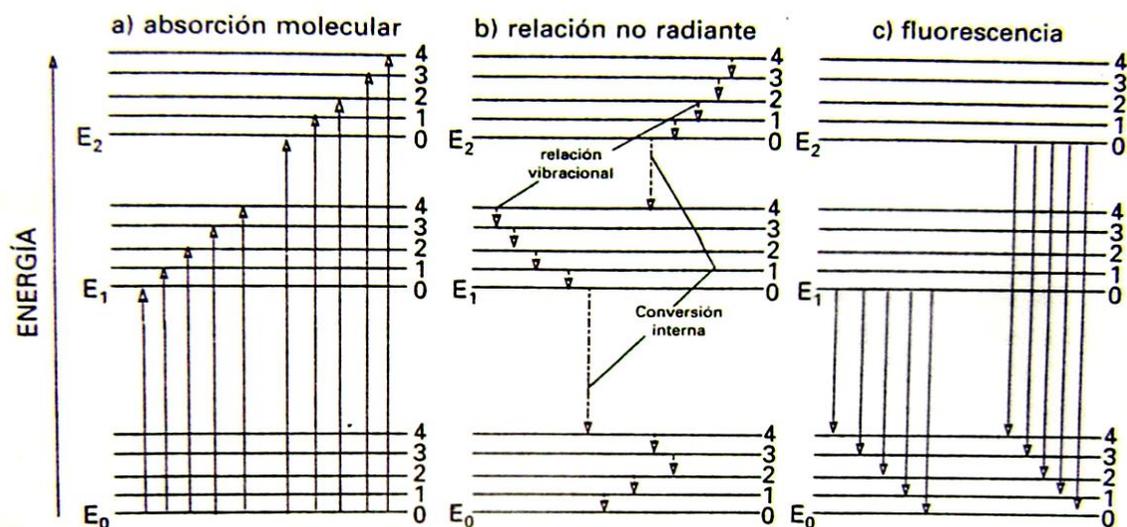


Figura 3. Diagrama de niveles de energía. Se muestran parte de los cambios que ocurren durante la absorción (a), relajación no radiante (b) y fluorescencia (c) [24].

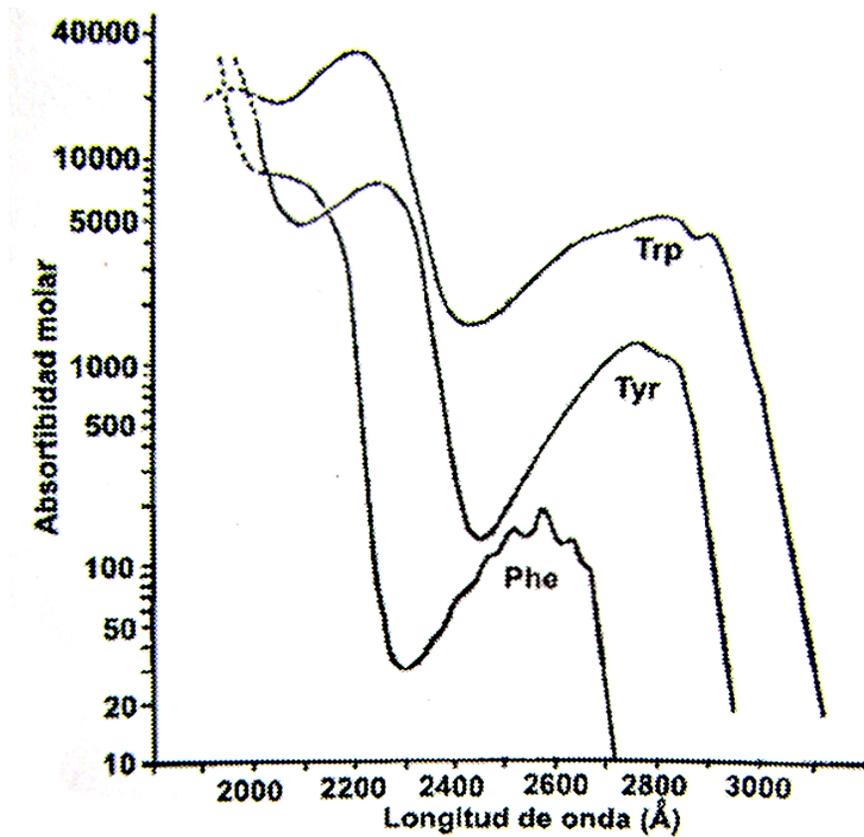


Figura 4. Espectro de absorción de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano [24].

2.4 Estudio de Proteínas en Interfases

El fenómeno de la adsorción de proteínas en interfases presenta muchas complicaciones para su estudio, debido a la probable desnaturalización de las proteínas y el proceso de desdoblamiento, generando un número elevado de configuraciones posibles. Otro de los problemas latentes en la adsorción de proteínas es la reversibilidad de la adsorción, que constituye hasta ahora un problema a resolver. Los primeros intentos para entender la adsorción de macromoléculas en interfases se deben a Frish, Shima y Eirich [26]. Recientemente, los estudios de De Gennes [27], Mac Ritchie [28] y Fainerman *et al.*, [29] han contribuido al entendimiento de los mecanismos de adsorción de proteínas en interfases. Para muchas proteínas, es posible que una vez adsorbidas en interfases líquido-líquido, surja el proceso contrario, es decir la des-adsorción. Las primeras mediciones cuantitativas de la cinética de des-adsorción fueron reportadas por González y Mac Ritchie [30] para la albúmina, en la cual se presenta un proceso de relajamiento manifestado en una caída de la presión interfacial si la monocapa de proteína es comprimida hasta un valor crítico, lo cual origina en muchos casos la expulsión de proteína, o de segmentos de ella, al disminuir la presión. Este proceso, en muchos casos reversible, de compresión y expansión de la monocapa de proteína en la interfase aire-agua, ha sido observado por Lopez-Franco *et al.*, [31] en los complejos proteína-polisacárido que conforman la goma arábica y la goma de mezquite.

Las técnicas más usadas para determinar la adsorción de proteínas en interfases son:

a) La técnica de la placa de Wilhelmy [32], el tensiómetro de Du Noüy [33] y la técnica de la gota colgante [34]. Estas técnicas han sido utilizadas para investigar el arreglo de moléculas en interfases, además de algunas variables termodinámicas, a través de la

ecuación de Gibbs [35] para conocer la concentración de la monocapa de moléculas adsorbidas en la interfase.

Una de las técnicas más utilizadas desde hace algunas décadas para obtener monocapas y multicapas de moléculas en superficies sólidas es la Técnica de Langmuir–Blodgett (LB), consistente en la obtención de monocapas de moléculas anfifílicas depositadas en la superficie del agua y recogidas en un sustrato sólido como mica, vidrio o cuarzo. La técnica es de especial importancia por la posibilidad de simular membranas biológicas en la superficie del agua. También se ha podido utilizar para estudiar la actividad biológica (enzimas, anticuerpos, etc.) y el reconocimiento específico de moléculas biológicas, de tal manera que ha sido posible construir biosensores [16]. El mayor interés en esta técnica reside en crear la organización de dos o más componentes a nivel molecular en sustratos sólidos con propiedades específicas de reconocimiento de ciertas moléculas.

2.5 Superficies e Interfases

El objetivo de estudiar superficies e interfases es describir los fenómenos interfaciales en base a la estructura e interacciones moleculares.

La tensión superficial (γ) se define como la fuerza por unidad de longitud que se ejerce tangencialmente sobre la superficie de separación entre un líquido y un gas, o un líquido y un sólido. Esta fuerza representa la energía de cohesión que posee el líquido. Energéticamente hablando, se puede definir como el exceso de energía existente en la interfase de los dos fluidos en contacto [36].

Dicho fenómeno se observa bajo dos terminologías, se denomina tensión superficial cuando se trabaja con un líquido y un gas; cuando se trata de dos líquidos, recibe el nombre de tensión interfacial. Las unidades más utilizadas para medir la tensión superficial son miliNewtons/metros (mN/m) o dinas/centímetros (dinas/cm) [36].

La termodinámica de superficies ha sido determinada por Gaines [37]. La tensión superficial de una interfase plana está dada por la derivada parcial [36]:

$$\gamma = \left[\frac{\partial G}{\partial s} \right]_{T,P,n} \quad (2)$$

donde G es la energía libre de Gibbs del sistema, s es el área de la superficie. T es la temperatura, P la presión y n es la composición, las cuales se mantienen constantes.

Para el cálculo de esta propiedad existen diferentes métodos, entre los cuales se destacan el del ascenso capilar, la placa de Wilhelmy, la máxima presión de burbuja, el peso de la gota y el método de la gota colgante [37].

La balanza de Langmuir utiliza el método de la placa de Wilhelmy para monitorear la tensión superficial de las isothermas.

2.6 Isothermas y Monocapas de Langmuir

La presión superficial en la balanza de Langmuir se determina suspendiendo la placa de Wilhelmy en agua, la cual mide la fuerza con la que es atraída hacia abajo del líquido. Esta fuerza, 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 [38].

La presión superficial es el análogo bidimensional de la presión, se denota por la letra griega Π y se define de la siguiente manera [36]:

$$\Pi = \gamma - \gamma_0 \quad (3)$$

donde γ es la tensión superficial en presencia de la monocapa y γ_0 es el valor de la tensión superficial del agua pura. Cuando las moléculas anfifílicas son depositadas en la superficie del agua, éstas no se mantendrán unidas, sino que se dispersarán cubriendo toda el área y por lo tanto formarán un gas en dos dimensiones que tendrá un mínimo efecto sobre la tensión superficial del agua. Posteriormente cuando se comprime la superficie por medio del sistema barreras en la balanza de Langmuir, disminuyendo de esta forma el área disponible por molécula, las moléculas se compactan hasta adquirir un alto orden molecular y la presión superficial aumenta. En la Figura 5 se muestra la deposición de moléculas anfifílicas sobre la superficie de agua, las moléculas al inicio se esparcen por toda la superficie. Posteriormente las barreras móviles que se encuentran en los extremos comprimen la monocapa. Las moléculas se compactan hasta ordenarse de tal manera que sus grupos hidrofílicos están en contacto con el agua y orientadas hacia el aire se encuentran los grupos hidrofóbicos, incrementando de esta manera la presión superficial de la monocapa formada.

2.6.1 Isotermas de Langmuir

Una isoterma proporciona información sobre el estado termodinámico que presenta una monocapa a una temperatura dada. A través de las isotermas es posible identificar transiciones de fase que indican cambios termodinámicos que ocurren en la monocapa, además de saber el área aproximada que ocupan las moléculas [38].

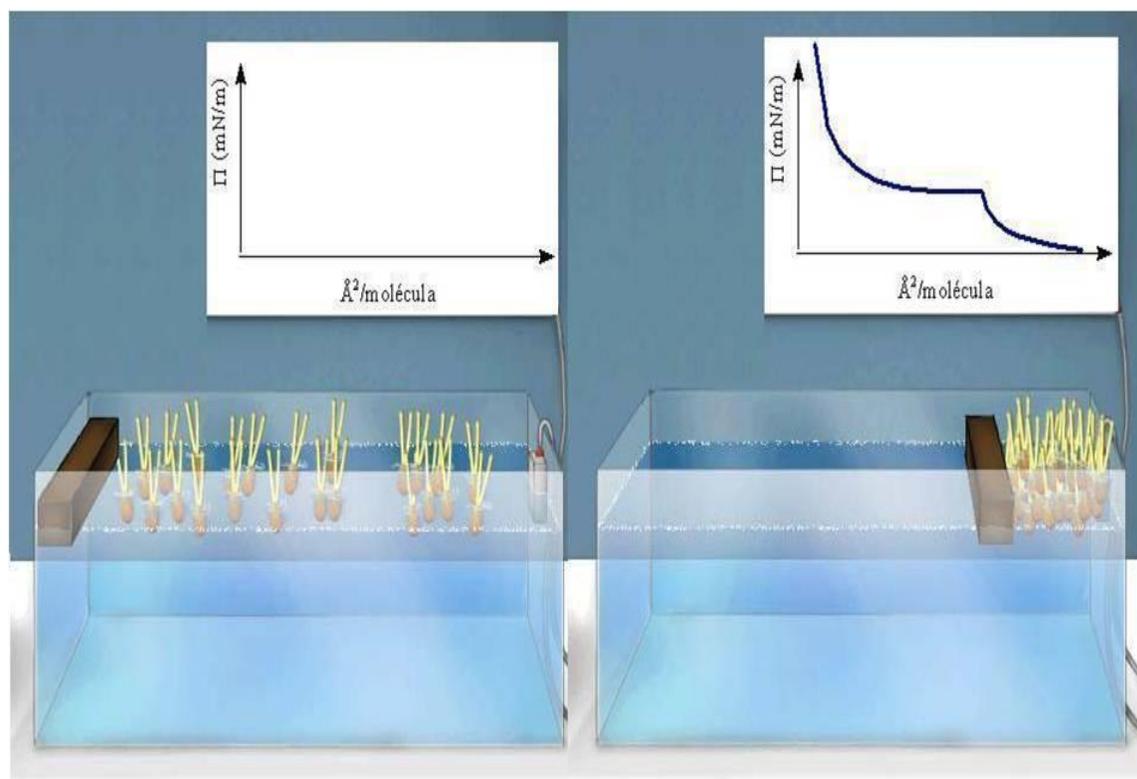


Figura 5. Formación de una monocapa de Langmuir y obtención de una isoterma.

En la Figura 6 se muestra una isoterma generalizada para un ácido graso. La monocapa es muy diluída, cuando el área por molécula está en el rango de cientos de Å^2 , en este caso se tiene un gas en dos dimensiones. Cuando el área por molécula decrece, la monocapa se encuentra en una fase llamada líquido expandido (LE o L1) [38].

Una futura compresión de la monocapa produce un cambio en la isoterma indicando una transición de fase de líquido expandido (LE) a una fase condensada (LC), usualmente una meseta indica una transición de primer orden. La monocapa es menos compresible en la fase condensada (LC) que en la fase líquido expandido (LE) [38].

2.6.2 Monocapas de Langmuir

Una monocapa de Langmuir es una película delgada de grosor molecular, insoluble en agua que se encuentra en la interfase aire-agua. Las moléculas que forman las monocapas de Langmuir son anfifílicas, por lo tanto estas moléculas al ser depositadas sobre la superficie del agua tenderán a cubrir la superficie disponible esparciéndose y orientándose de manera conveniente en la interfase aire-agua manteniendo al grupo hidrofílico en contacto o sumergido en el agua y al grupo hidrofóbico con su cadena hidrocarbonada tratando de evitar el contacto con el agua [38].

2.7 Ecuación de Young-Laplace y Tensiómetro de Gota

El estudio de la tensión superficial mediante el método de la gota colgante ha demostrado ser bastante exitoso dentro de la gama de los existentes para este propósito; esto se basa en el hecho de que, al igual que el concepto de la tensión superficial, dicho

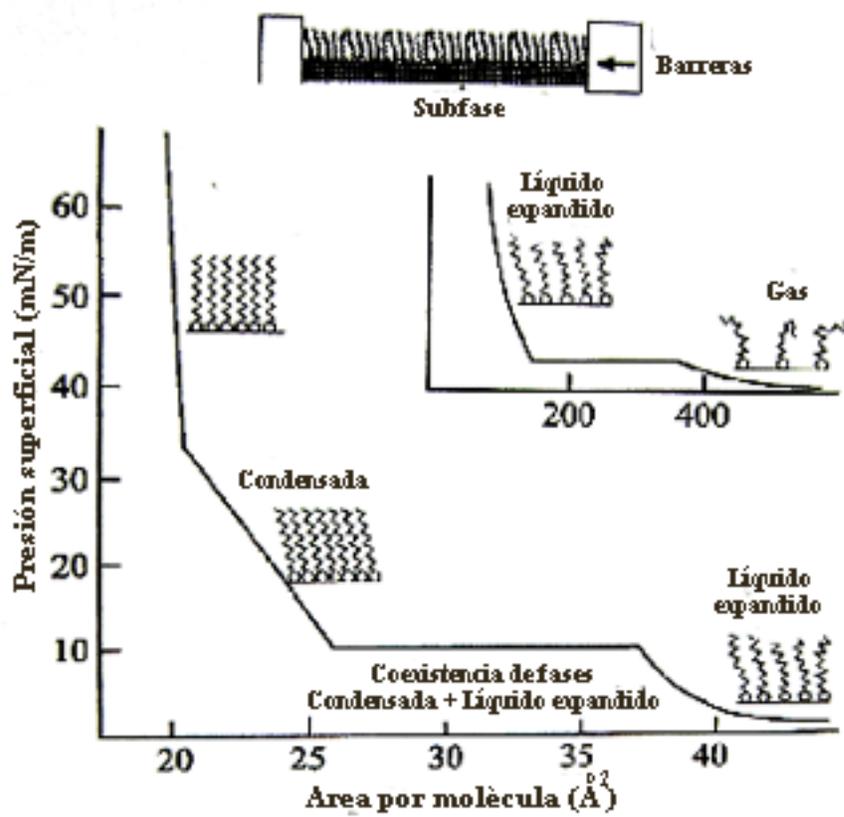


Figura 6. Isotherma generalizada para los ácidos grasos [38].

método se fundamenta en un verdadero y visible equilibrio termodinámico entre ambas fases.

Este método consiste en la formación de una gota bajo condiciones ajenas a perturbaciones. Una vez formada la gota, se procede a capturar una imagen de la misma; a partir de esa imagen se obtiene el llamado perfil de la gota, que representa su contorno. Con la ayuda de ecuaciones que relacionan la tensión superficial con el perfil o contorno de la gota, se logra obtener el valor de la misma.

La ecuación de Laplace-Young (ecuación 4) es una ecuación diferencial para la forma de un menisco en equilibrio que se encuentra entre dos fluidos de densidad uniforme. Expresa la diferencia en presión (ΔP), entre la interfase de dos fluidos, en donde la presión de superficie es proporcional a la curvatura promedio, el coeficiente de proporcionalidad es la tensión superficial (γ), y R_1 y R_2 representan dos radios de curvatura del área superficial [35].

$$\Delta P = \gamma \cdot \left[\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right] \quad (4)$$

2.7.1 Métodos Aplicados

La difusión de la proteína a tiempos cortos en la interfase hexadecano-agua fue obtenida por la solución asintótica para $t \rightarrow 0$ del coeficiente de difusión descrito por Miller *et al.*, [39], la cual está dada por:

$$D_{h-w} = \frac{\pi}{4} \left[\frac{1}{RTC_0} \left(\frac{d\gamma}{d\sqrt{t}} \right)_{t \rightarrow 0} \right]^2 \quad (5)$$

donde D_{h-w} es el coeficiente de difusión cerca de la interfase hexadecano-agua (m^2/s), R la constante universal de los gases ($Jmol^{-1}k^{-1}$), T la temperatura en K, t el tiempo en segundos, C_0 la concentración de proteína en el bulto (mol/m^3) y γ la tensión superficial en N/m.

El comportamiento en la región de tiempo $t \rightarrow \infty$ de la función γ vs $t^{-1/2}$ fue obtenida asumiendo una difusión controlada de la adsorción y está dada por la relación Joos [40-42]:

$$\gamma - \gamma_\infty = \frac{RT\Gamma^2}{2C_0} \left(\frac{\pi}{D_0 t} \right)^{1/2} \quad (6)$$

donde γ_∞ es la extrapolación de la tensión superficial en el equilibrio a $t \rightarrow \infty$, Γ es la concentración de proteína en la superficie a tiempos largos y D_0 es el coeficiente de difusión.

La cinética de la tensión superficial fue evaluada con el comportamiento de la presión interfacial. Se obtuvo el mejor ajuste de la presión superficial contra el tiempo de los valores experimentales para obtener los módulos de relajación a través de la siguiente relación [43]:

$$\frac{\Pi(t) - \Pi_\infty}{\Pi_0 - \Pi_\infty} = A_0 \exp(-t/\tau_1) + A_1 \exp(-t/\tau_2) \quad (7)$$

Donde τ_1 y τ_2 son el primer y segundo tiempo de relajación, respectivamente, A_0 y A_1 son parámetros ajustables. $\Pi_\infty = \gamma_s - \gamma_\infty$, $\Pi_0 = \gamma_s - \gamma_0$ y $\Pi(t) = \gamma_s - \gamma(t)$, donde γ_s es la tensión interfacial en la interfase hexadecano-agua para diferente pH y γ_∞ es la

extrapolación de la tensión interfacial en el equilibrio a $t \rightarrow \infty$ obtenido con la ecuación (6).

Para una determinada pulsación sinusoidal de la gota de frecuencia ω producida por el tensiómetro en cualquier tiempo t , obtenemos el valor de la tensión superficial $\gamma(t)$ por el análisis axisimétrico de la forma de la gota y el área de la gota, los cuales son utilizados para calcular los módulos de elasticidad dilatacional complejos, definidos como [44]:

$$E = -A \frac{d\gamma}{dA} \quad (8)$$

Ésta también puede ser definida como una función compleja la cual puede ser escrita de la siguiente manera:

$$E = E'(\omega) + iE''(\omega) \quad (9)$$

Donde $E'(\omega)$ y $E''(\omega)$ corresponden, respectivamente, a los componentes real e imaginario del módulo de elasticidad. Están relacionados con el cambio de $\gamma(t)$ y $A(t)$ en la interfase con un el ángulo de fase ϕ entre $d\gamma(t)$ y $dA(t)$. Las partes real e imaginaria están relacionadas con los módulos complejos por $E' = E \cos(\phi)$ y $E'' = E \sin(\phi)$, respectivamente.

Si la diferencia de fase se aproxima a cero, entonces la superficie puede ser considerada elástica, de lo contrario la superficie muestra un comportamiento viscoelástico.

Asumiendo que las propiedades mecánicas de la interfase siguen el modelo de Maxwell, la parte elástica (de almacenamiento) en la ecuación (9) está representada por:

$$E'(\omega) = E'_0 + \Delta E' \frac{\omega^2 \tau^2}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (10)$$

Y la parte viscosa:

$$E''(\omega) = \Delta E' \tau \omega \frac{1}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (11)$$

donde E' es el valor extrapolado del módulo elástico en el límite $\omega = 0$ y τ es el tiempo de relajación característico del modelo de Maxwell. Los dos últimos parámetros son encontrados por el ajuste de los valores experimentales utilizando el método de mínimos cuadrados en OriginPro 7.0 (Northampton, MA) ajustando los parámetros dados en la ecuación (10) y (11).

2.8 Microscopía de Ángulo de Brewster

Con la técnica de microscopía de ángulo de Brewster (BAM) implementada en los años 90, ha sido posible ‘visualizar’ las monocapas de surfactantes y proteínas en la interfase aire-agua [45, 46]. También se ha utilizado para la visualización de las transiciones de fase de ácidos grasos en la superficie del agua simultáneamente a la formación de isotermas. La técnica es de gran utilidad, pues ha permitido entender los fenómenos de formación de multicapas y zonas de dislocación de monocapas durante el colapso en isotermas de ácidos grasos [47]. El desplazamiento de proteínas por surfactantes ha sido observada *in situ* por Mackie *et al.*, [48] en la interfase aire agua utilizando microscopía de ángulo de Brewster.

Un experimento de BAM básicamente detecta la intensidad de luz polarizada verticalmente que es reflejada por el ángulo de Brewster debido a la presencia de una monocapa en la interfase (Figura 7). La luz incidente es dirigida sobre una cierta área de la interfase y las intensidades correspondientes reflejadas son capturadas para construir una imagen [49].

2.8.1 Fundamento del BAM

La reflectividad de una interfase plana entre dos medios de índice de refracción n_1 y n_2 , depende de la polarización de α de la luz incidente y del ángulo de incidencia Θ . Para una interfase donde el índice de refracción cambia de n_1 a n_2 y la polarización, la reflectividad está dada por el ángulo de Brewster θ_B ($\tan[\theta_B] = n_2/n_1$).

Para una interfase real, la intensidad de luz reflejada tiene un mínimo ángulo de Brewster (Figura 8). La intensidad de luz reflejada en el ángulo de Brewster depende fuertemente de las propiedades interfaciales. La reflectividad de una interfase real en el ángulo de Brewster para una polarización p , tiene tres orígenes: el grosor de la interfase, la rugosidad de la interfase debido a fluctuaciones térmicas y la anisotropía de la monocapa [45].

2.9 Microscopía de Fuerza Atómica

Una de las técnicas más modernas que han impulsado el desarrollo del estudio de superficies en general, es la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) [50].

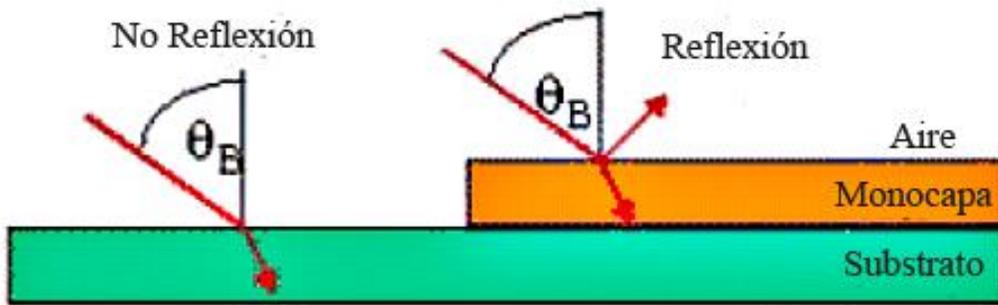


Figura 7. Diagrama representativo del Ángulo de Brewster [51].

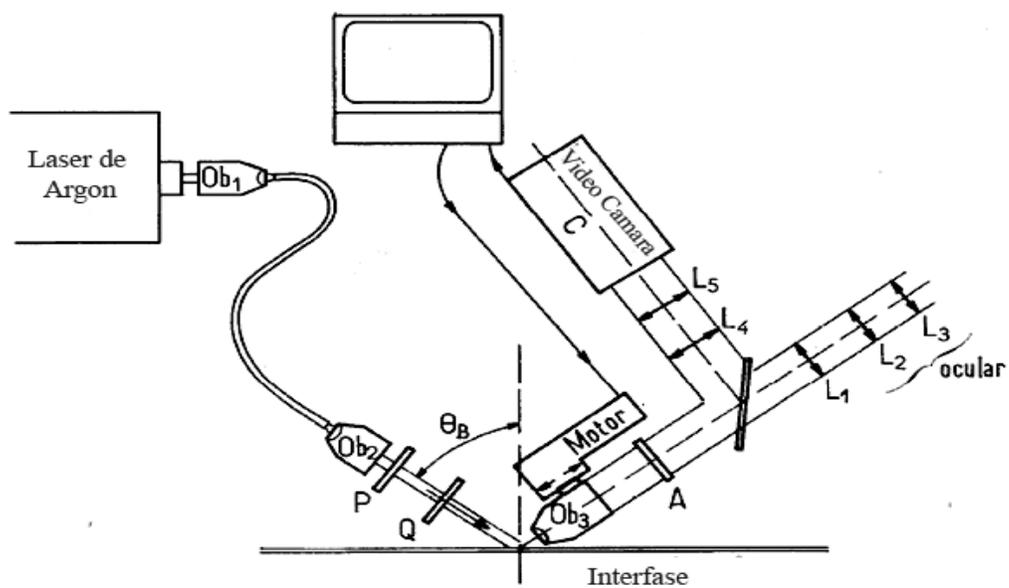


Figura 8. Diagrama esquemático del Microscopio de Ángulo de Brewster [45].

La técnica de AFM ha sido usada exitosamente para el estudio de ácidos grasos en películas de Langmuir-Blodgett en la fase de colapso, permitiendo estudiar su cinética de cristalización [45]. También ha sido muy útil, por su sencillez para preparar las muestras, en la investigación de morfologías de moléculas biológicas con resolución nanométrica. Además el utilizarse en ambiente aire-sólido, ha permitido hacer funcionar el microscopio en medio líquido para poder estudiar directamente moléculas biológicas como proteínas y ADN en ambientes biológicos, interacciones antígeno-anticuerpo y células vivas, entre otras.

En la técnica de AFM (Figura 9) una punta fina de varias micras de longitud y menos de 100 Å de diámetro barre la superficie de una muestra. La punta esta en el extremo de un soporte (cantiliver), de 100 a 200 micras de longitud y un haz de luz de un diodo láser es reflejado por la superficie del cantiliver. Las fuerzas de interacción entre los átomos de la punta y la superficie de la muestra producen deflexiones en el cantiliver que son medidas mientras la punta rastrea la muestra. La dirección del rayo de luz desviado es detectada por un fotodetector de posición, por medio de éste es posible medir las deflexiones del cantiliver. La señal del fotodetector es analizada por medio de una computadora, para posteriormente construir una imagen tridimensional de la topografía de la muestra.

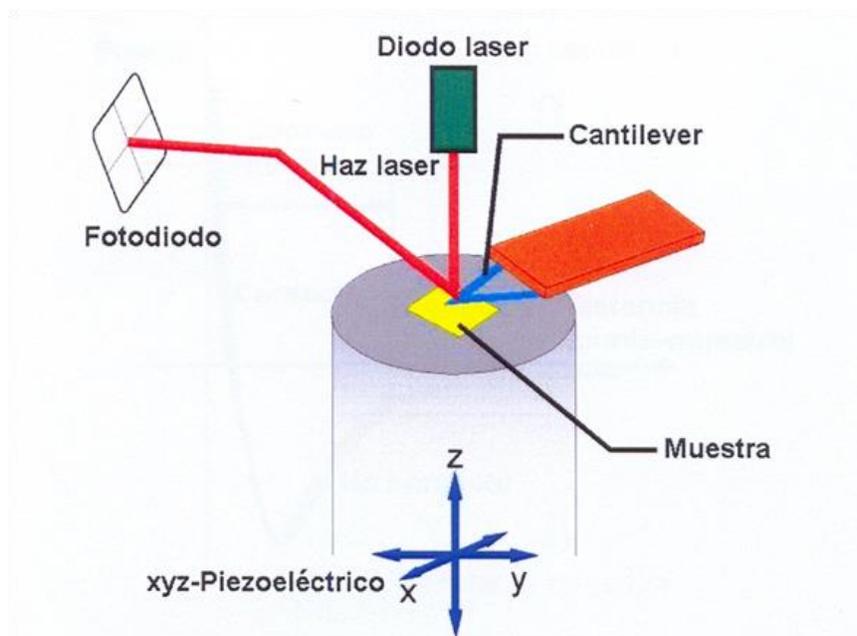


Figura 9. Sistema de detección para desviación del haz láser en el AFM [52].

CAPÍTULO 3

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se describe la metodología utilizada para la extracción y purificación de la proteína B-FE, incluyendo los materiales y reactivos utilizados, el procedimiento para mantener la cepa algal y obtener la biomasa celular, así como las diferentes técnicas utilizadas para la purificación de la proteína. Posteriormente se describen los procedimientos, las técnicas y equipos utilizados para la caracterización físico-química de la proteína en interfases.

3.1 Reactivos y Sustancias

Todos los compuestos utilizados en la preparación de las soluciones fueron grado analítico (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). El agua utilizada en todos los experimentos fue de grado Milli-Q (resistividad 18.3 M Ω –cm), la cual fue obtenida por un equipo Easy Pure/Barnstead.

Los estudios de fluorescencia, reología, tensión superficial y AFM como función de pH fueron realizados en soluciones amortiguadoras con valores de pH de 2.5, 4.5, 7.0 y 10. Para este fin se prepararon soluciones de glicina/ácido clorhídrico (pH 2.5), acetato de sodio (pH 4.5), fosfato (pH 7) y glicina/hidróxido de sodio (pH 10). En todos los casos la fuerza iónica fue menor de 1 mM [53].

3.2 Cepa algal y condiciones de cultivo

En este trabajo se utilizó la microalga roja *R. marinus* proporcionada por UTEX (1723). Las microalgas fueron cultivadas en tubos de ensayo de 10 mL y escalados a frascos Erlenmeyer de 250 mL y finalmente a garrafones de 18 L, durante 25 días, bajo las siguientes condiciones: medio de cultivo Erdschreiber (Rosowski y Parker 1971), burbujeo continuo de aire hasta el nivel de 12 L, 25°C, iluminación lateral con lámparas fluorescentes (blanco frío) a una densidad de flujo de fotones de $215 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ medida en la superficie de los frascos de 250 mL, y un ciclo circadiano de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Las microalgas fueron decantadas y cosechadas mediante centrifugación a 3000 rpm por 5 min (Marathon 8K Fisher Scientific). De acuerdo a Básaca-Loya *et al.*, [54].

3.3 Preparación y fraccionamiento del extracto crudo

Las células algales (4 g de biomasa seca) se lavaron con amortiguador de fosfato de sodio 0.01 M que contenía NaCl 0.1 M (pH 7.0) (Rossano *et al.*, 2003) y se resuspendieron en el mismo amortiguador. La suspensión fue congelada a -20°C y se realizó fragmentación celular de forma manual en un mortero de cerámica, posteriormente fue sonicada durante 30 min.

La eliminación de restos celulares se realizó mediante centrifugación a 5000 rpm a 4°C por 10 min. El sobrenadante se consideró el extracto crudo y el precipitado se descartó. El extracto crudo obtenido se mezcló con sulfato de amonio saturando al 40%, se agitó durante 3.5 h a 4°C ; posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos y se descartó el precipitado. El sobrenadante se saturó con sulfato de amonio al 60% [22], se agitó

durante 15 h a 4°C hasta su precipitación, y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. El precipitado se re-suspendió en amortiguador de fosfato de sodio/NaCl 0.01 M (pH 7.0).

3.4 Cromatografía

El sulfato de amonio restante se eliminó mediante cromatografía en una columna Sephadex G-25 (Sigma) pre-equilibrada con amortiguador de fosfato 0.01 M (pH 7.0) que contenía NaCl 0.1 M. La elución fue monitoreada por espectroscopia de UV-visible a 280 nm y recolectada en fracciones de 4 mL.

Las fracciones proteicas obtenidas se mezclaron y se introdujeron en una columna de intercambio aniónico HiPrep 16/10 Q XL (0.75 × 10 cm) (Amersham BioSciences), equilibrada previamente con amortiguador de fosfato 0.01 M (pH 7.0) con NaCl 0.1 M. Después de eluir con 40 mL de amortiguador de fosfato de sodio/NaCl 0.01 M (pH 7.0), se utilizó amortiguador de fosfato 0.01 mM que contenía NaCl 0.5 M para eluir las siguientes fracciones. Estas eluciones fueron recolectadas en fracciones de 4 mL y analizadas por espectroscopía de UV-visible. Las fracciones que mostraron las bandas características de la proteína ficoeritrina se mezclaron y posteriormente esta solución se inyectó en un sistema (Agilent 1100) de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) con una columna Zorbax GF-250 (Agilent, 0.94 × 25 cm, 4 μm), equilibrada previamente con amortiguador de fosfato 0.01 M (pH 7.0) con NaCl 0.1 M. La columna se eluyó con amortiguador de fosfato de sodio/NaCl 0.01 M (pH 7.0) y la elución se recolectó en fracciones de 1 mL.

3.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

La electroforesis vertical se realizó en un cámara Miniprotean III (Bio-Rad), usando un sistema de amortiguador discontinuo, el cual consiste en un gel de poliacrilamida al 16.5% (p/v) de 1.0 mm de grosor, que contiene SDS al 0.1% (p/v), con un gel concentrador de poliacrilamida al 4%. Las muestras fueron previamente incubadas con SDS al 2% (p/v), glicerol al 10% (v/v), β -mercaptoetanol al 4.5% (v/v), azul de bromofenol al 0.025% (p/v) y amortiguador Tris-HCl 60 mM (pH 6.8) durante 5 min a 95°C. Los geles se incubaron a temperatura ambiente y se visualizaron mediante tinción con azul brillante de Coomassie R-250 al 0.1% (p/v), metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 7% (v/v) por 30 min; se destiñeron en ácido acético diluido. Se emplearon las siguientes proteínas como marcadores de peso molecular: fosforilasa b (94 000), albúmina (67 000), ovalbúmina (43 000), anhidrasa carbónica (30 000), inhibidor de tripsina (20 100) y α -lactalbúmina (14 400).

3.6 Mediciones espectroscópicas

Los espectros de absorción fueron obtenidos en un espectrofotómetro UV-VIS DU 530 (Beckman Coulter) con un trayecto de luz/trayecto óptico de 1 cm. Se utilizó un rango de longitud de onda de 250 a 700 nm. Las concentraciones de proteínas en estos ensayos variaron entre 0.1 y 0.5 gL⁻¹. Todas las mediciones espectroscópicas se realizaron a 25°C

Las mediciones de fluorescencia fueron realizadas en un fluorómetro modelo Fluorolog, Jobin Yvon. Los espectros de emisión de fluorescencia fueron obtenidos a temperatura ambiente utilizando una concentración de proteína de 0.125 mg/mL en cada

uno de los diferentes amortiguadores. Los espectros de emisión fueron obtenidos utilizando una longitud de onda de excitación de 500 nm.

3.7 Procedimientos analíticos

La concentración de proteína en las muestras se estimó por el método de Bradford [55]. La pureza de B-PE fue determinada por la relación entre las absorbancias a 545 y 280 nm (i.e., pureza de B-PE = A_{540}/A_{280}) [7], ya que el espectro de absorción de esta proteína presenta un pico máximo a 540 nm.

3.8 Mediciones de tensión superficial y reología

Para determinar la tensión interfacial dinámica y las mediciones de reología interfacial dilatacional en la interfase hexadecano-agua de las soluciones de B-FE, se utilizó un tensiómetro de gota colgante. La gota fue formada en la punta de una aguja de acero inoxidable (0.5 mm i.d.) inmersa en hexadecano. Se utilizó un tensiómetro Tracker tensiometer (I.T. Concept, France) capaz de medir la tensión superficial en tiempo real con una precisión de 0.01 mN/m. La aguja se encuentra inmersa en una cubeta de cuarzo (103.051F-Og, 20-10, Hellma, Germany). Las mediciones de la tensión interfacial y las mediciones reológicas están basadas en el perfil digital de la imagen de la gota y la solución de la ecuación Gauss-Laplace [35]. El software utilizado para el análisis axisimétrico de la imagen de la gota fue el Win Drop software (I. T. concept, France). Los experimentos fueron realizados a temperatura constante de $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$. La concentración de B-FE se mantuvo constante en todos los experimentos (0.25mg/mL).

El análisis del módulo elástico dilatacional (E') y módulo viscoso (E'') en la interfase hexadecano-agua se inició 9000 s después. La frecuencia utilizada fue de 0.1 a 1 s⁻¹. Después de este tiempo, todos los parámetros fueron medidos promediando en un intervalo de tiempo de 400 s por oscilación de la gota con un incremento máximo del volumen de la gota del 10%.

3.9 Isotermas y monocapas de Langmuir-Blodgett

Las isotermas de B-FE fueron obtenidas en una balanza Langmuir-Blodgett modelo 601 Nima Technologies, Ltd., Coventry, England. La presión superficial fue medida utilizando el método de la placa de Wilhelmy. La presión superficial y el área molecular fueron obtenidos a una velocidad de compresión de 20 cm²/min. Todos los experimentos se realizaron controlando la temperatura a 25°C utilizando un circulador de agua (Cole-Palmer, 1268-24, USA). El proceso de deposición de la proteína en la interfase aire/agua fue llevado a cabo utilizando una microjeringa Hamilton. Sobre la subfase acuosa, conteniendo diferentes soluciones amortiguadoras, se inyectaron 50 µl de B-FE con una concentración de 1 mg/mL. Después de 30 minutos de depositar la proteína se llevo a cabo la compresión de las barreras. Los ciclos de compresión y expansión de las monocapas de B-FE fueron realizadas 30 minutos después de la deposición de la proteína sobre la subfase.

Los experimentos de cambio de área como función del tiempo, manteniendo la presión constante, fueron realizados 30 minutos después de depositar la proteína. Las monocapas fueron comprimidas hasta alcanzar una presión constante de 20 mN/m y el

cambio de área fue medido durante 2 horas para cada monocapa formada en la subfase con diferente valor de pH.

Las películas de Langmuir-Blodgett de B-FE fueron obtenidas sobre mica. Las monocapas de B-FE fueron obtenidas manteniendo la mica sumergida en la balanza con cada uno de los diferentes amortiguadores. Después de 30 minutos, la superficie fue comprimida hasta alcanzar una presión de 20 mN/m, la transferencia se realizó a una velocidad de 1 mm/min.

3.10 Microscopía de Ángulo de Brewster

Un microscopio de ángulo de Brewster MiniBam fue utilizado para obtener las imágenes de B-FE y los datos fueron almacenados en una computadora. Todas las imágenes fueron obtenidas a 25°C.

3.11 Microscopía de Fuerza Atómica

Una vez realizada la isoterma, se eligió la presión superficial de 20 mN/m para transferir la monocapa de Langmuir a un sustrato sólido (mica). La transferencia de la monocapa se realizó a una velocidad de 10 mm/min. Las monocapas de Langmuir-Blodgett se analizaron en un AFM marca JEOL, modelo JSPM 4210, utilizando el modo de no contacto.

Las monocapas de Langmuir-Blodgett de B-FE en diferente pH, fueron observadas 1, 24 y 48 h después de ser obtenidas.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se discuten los resultados de la extracción, purificación y caracterización físico-química en interfases de B-FE. En las primeras dos partes de este capítulo se presentan los resultados de la extracción y purificación de la proteína, así como la caracterización espectroscópica de la proteína B-FE purificada. Posteriormente, se discuten los resultados de la caracterización en interfases, iniciando con la interfase líquido-líquido para la cual se utilizó la técnica de la gota colgante, después la interfase aire-agua para la cual se utilizó la técnica de Langmuir y el BAM y finalmente se interpretan las imágenes de AFM.

4.1 Extracción y purificación de la proteína B-Ficoeritrina

Se obtuvieron 145 mL de extracto crudo de los cultivos microalgales. El análisis mostró que el contenido de proteína fue 1.6372 mg/mL. En la Figura 10 se muestra el espectro de absorción del extracto crudo. En tal espectro, tres picos corresponden a los máximos de B-FE (562 y 540 nm, con un hombro a 498 nm), un pico notablemente menos intenso correspondiente al máximo de R-ficocianina (620 nm) y otro atribuible a aloficocianina (650 nm). Siendo B-FE uno de los pigmentos predominantes. Para la microalga roja *Porphyridium cruentum*, Bermejo *et. al.*, [22] encontraron que el contenido de aloficocianina era insignificante o inexistente en comparación con el contenido de R-ficocianina y B-ficoeritrina.

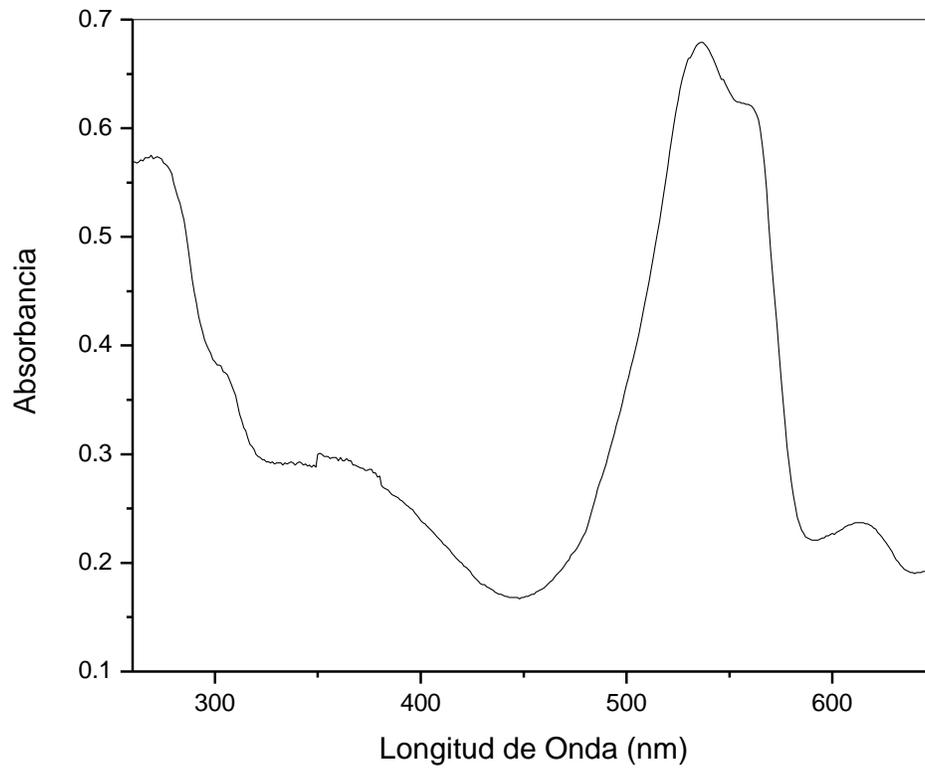


Figura 10. Espectro de absorción del extracto crudo obtenido de la biomasa de *Rhodospirillum rubrum*.

El precipitado obtenido después de la saturación con sulfato de amonio al 60% fue resuspendido en 30 mL de amortiguador de fosfato de sodio 0.01 M. La concentración de proteínas entonces fue 2.445 mg/mL. Esta solución se desalinizó en una columna Sephadex G-25 (Sigma) y las fracciones obtenidas se introdujeron en una columna Sepharose Q. En algunos ensayos se utilizaron diferentes amortiguadores para la elución en la cromatografía aniónica: un gradiente discontinuo con fosfato de sodio 0.01 M/NaCl 0.1 M (pH 7) y fosfato de sodio 0.05 M/NaCl 0.1 M, el cual no produjo resultados satisfactorios. Se obtuvieron mejores resultados usando un gradiente discontinuo con diferentes concentraciones de NaCl (0.1 y 0.5 M) en fosfato de sodio 0.01 M (pH 7.0). La mayor parte de B-FE y R-ficocianina en la solución de ficobiliproteínas se obtuvo con fosfato de sodio 0.01 M/NaCl 0.1 M (Figura 11). Por lo tanto, los resultados mostraron que la fuerza iónica fue suficiente para la separación de la ficoeritrina. La absorbancia a 280 nm (la mayoría de las proteínas absorben a 280 nm) disminuyó notablemente en relación con el extracto crudo, lo que indica una purificación considerable de la ficobilina en comparación con otras proteínas diferentes, mientras que los máximos de B-PE (540 y 562 nm) fueron los componentes principales. También se observó que la elución con fosfato de sodio 0.01 M/NaCl 0.5 M en la cromatografía de intercambio aniónico produjo B-FE; sin embargo, se obtuvieron bajas concentraciones de proteínas con menor pureza.

La fracción conjunta obtenida mediante elución con fosfato 0.01 M/NaCl 0.1 M por cromatografía aniónica se introdujo en una columna para cromatografía de exclusión por tamaño Zorbax GF-250 (Agilent, 0.94 × 25 cm, 4 μm).

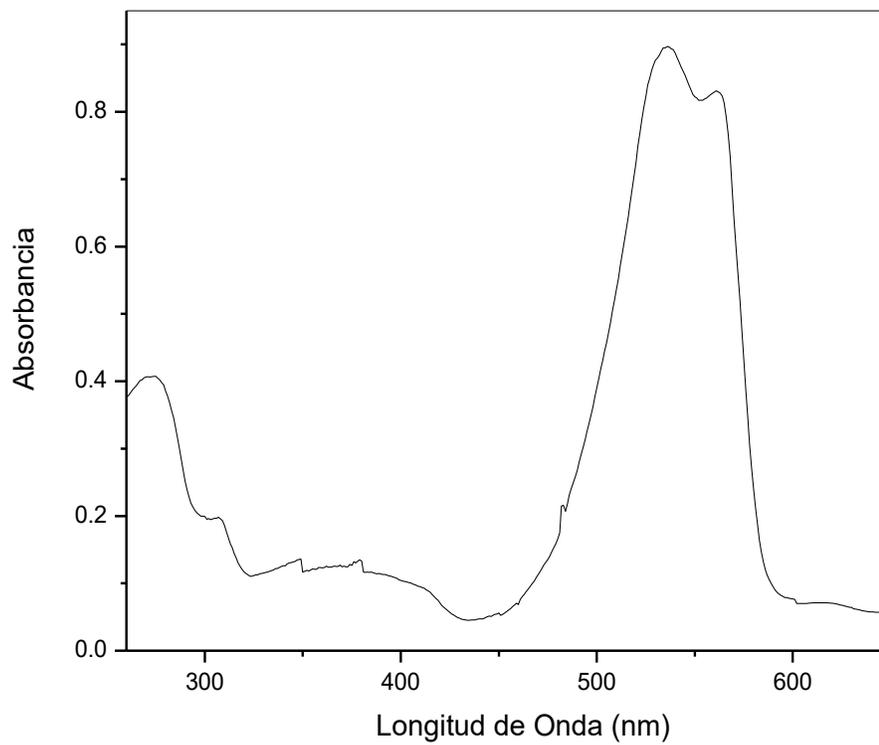


Figura 11. Espectro de absorción de la proteína obtenida mediante cromatografía de intercambio aniónico (Q Sheparose), utilizando fosfato de sodio 0.01 M/NaCl 0.1 M (pH 7.0) como amortiguador.

Los resultados obtenidos por HPLC mostraron una proteína con una pureza de 4.8 (A540/A280), adecuada para los pasos de purificación (Figura 12). La razón de la absorción a 540 nm entre la absorción a 498 nm (A545/A498) fue 2.5; este valor es aceptable para la identificación del pigmento de ficoeritrina. Se obtuvieron alrededor de 1.292 mg de B-PE de 4 g de *R. marinus* liofilizada, con la pureza antes mencionada. El criterio utilizado con mayor frecuencia para determinar la pureza de la solución de biliproteínas es la razón de absorción $A_{\text{max visible}}/A_{280}$; no obstante, se debería de confirmar la pureza con otros métodos experimentales. Se realizaron análisis espectroscópicos de las fracciones de la cromatografía de exclusión por tamaño.

Mediante la SDS-PAGE las subunidades de B-PE mostraron dos bandas (Figura 13) que contenían cantidades similares de proteína. Al comparar con estándares, las masas moleculares fueron 27 000 y 26 800, correspondiendo a las subunidades α y β de B-PE.

4.2 Propiedades fluorescentes de B-FE

Los espectros de emisión de fluorescencia de soluciones de B-FE en diferente pH, son mostrados en la Figura 14. El espectro de emisión de la proteína en pH 4.5 presentó la intensidad máxima y disminuyó notablemente para la proteína en pH 10 y 2.5. La intensidad máxima para la proteína en pH 4.5 se observó a 575 nm, mientras que para la proteína en pH 7 fue a 584 nm. La proteína en pH 10 y 2.5 mostró un desplazamiento del pico máximo de emisión a 572 y 585 nm, respectivamente. Liu *et. al.*, [6, 56] también observaron un pequeño desplazamiento al rojo para pH ácido y un desplazamiento al azul para pH básico para la proteína R-FE.

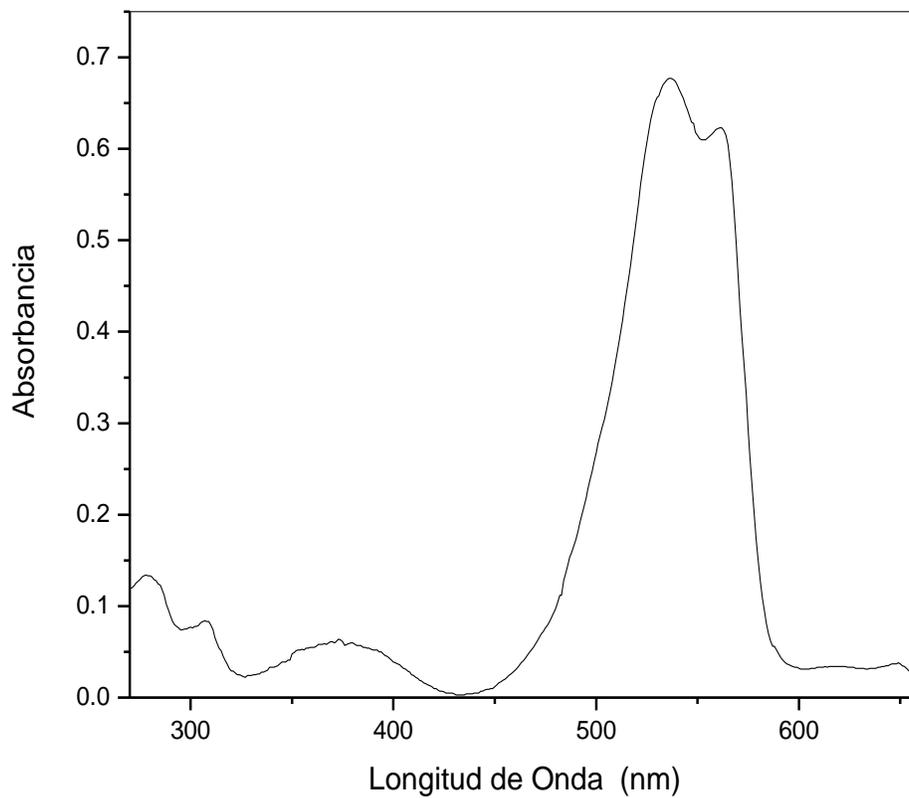


Figura 12. Espectro de absorción de la B-ficoeritrina purificada mediante cromatografía de exclusión por tamaño (cromatografía líquida de alta resolución).

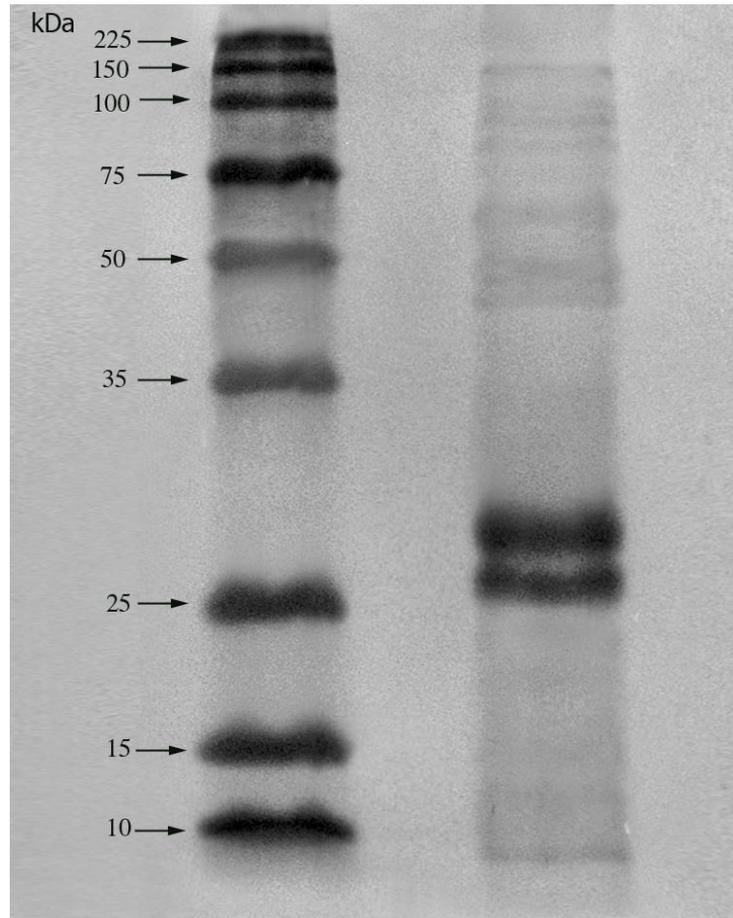


Figura 13. SDS-PAGE de la proteína B-FE purificada. De izquierda a derecha las líneas/bandas corresponden a: 1) marcadores proteicos y 2) B-FE purificada por cromatografía de filtración en gel de alta resolución.

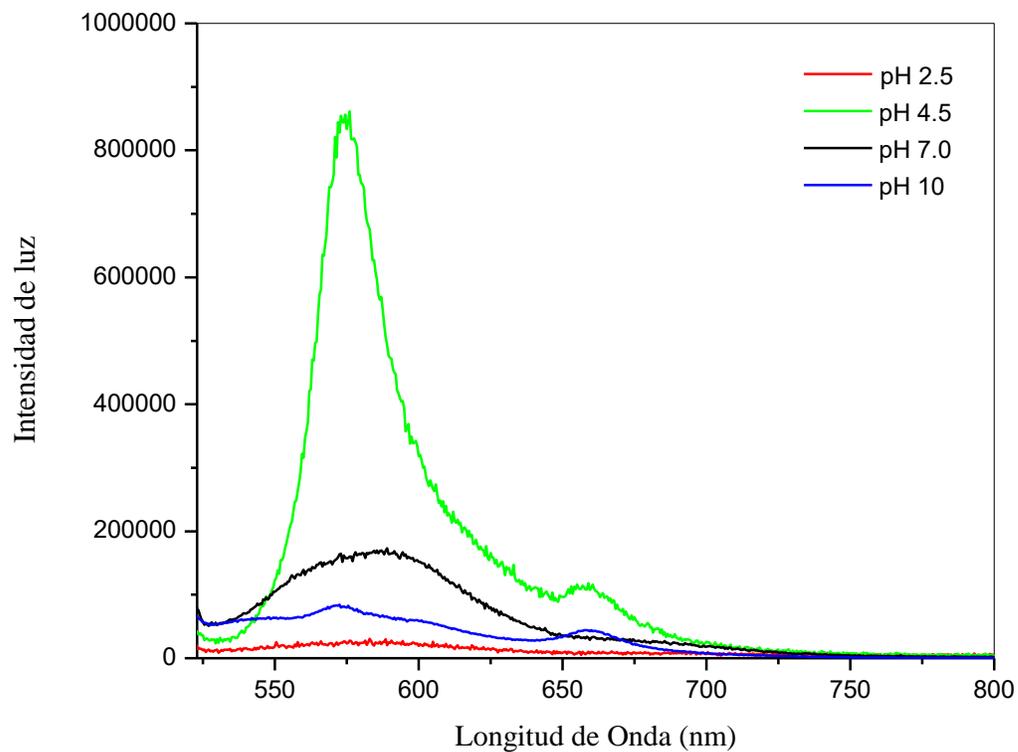


Figura 14. Espectros de emisión de fluorescencia para B-FE en solución con diferente valor de pH, obtenidos a temperatura ambiente. Concentración de proteína 0.125 mg/mL.

El espectro de emisión de B-FE probablemente está fuertemente influenciado por interacciones vecinas muy cercanas, el estado de agregación, y la conformación de la proteína como lo demostró Owaga *et. al.*, [9]. El cambio en el estado de agregación y la polarización del medio también puede explicar un cambio tan pequeño, como se ha mencionado por varios autores [6, 57]. Bermejo *et. al* [14] observaron que en B-FE de *Porphiridium cruentum*, el máximo de intensidad de fluorescencia disminuye ligeramente cuando el pH difiere de la neutralidad y desaparece progresivamente en los extremos del rango de pH probado como puede observarse en la Figura 14 para la proteína en pH 2.5 y 10. Liu *et. al.*, [56] obtuvieron resultados similares con R-FE.

Estas variaciones en la fluorescencia, debido a las condiciones de pH pueden ser causadas por cambios conformacionales de las moléculas de proteína y moléculas que la rodean, alterando la interacción de los cromóforos resultando en una caída secuencial de la emisión de fluorescencia. Otros autores mencionan la posibilidad de desnaturalización de las moléculas de proteína lo cual puede resultar en ciclización de cromóforos, con la consiguiente pérdida de absorbancia y fluorescencia [58, 59].

4.3 Propiedades interfaciales de B-FE en la interfase líquido-líquido

El comportamiento interfacial de B-FE en la interfase hexadecano-agua fue analizado utilizando la técnica del tensiómetro de gota. Se determinó el comportamiento de la tensión interfacial a tiempos largos y cortos para B-FE variando el pH en la fase acuosa. Observamos que a tiempos largos la tensión superficial para la proteína en pH 2.5 y pH 10 es mayor que la tensión superficial para la proteína en pH 4.5 y pH 7. Esto es probablemente consecuencia de la influencia de interacciones electrostáticas de las

moléculas de proteína cargada, disminuyendo las interacciones hidrofóbicas en la interfase para la proteína en pH más alto y más bajo. Por otra parte, la carga superficial de las moléculas de proteína en pH 4.5 y pH 7 es más pequeña, permitiendo a los sitios hidrofóbicos una interacción más fuerte con la interfase hidrofóbica. En la Figura 15 podemos visualizar tres regiones para la presión superficial, similares a las observadas por Freer *et al.*, [58] para una lizosima y β caseína en la interfase hexadecano-agua y para otras proteínas en diferentes interfases observado por otros autores [60, 61]. Incluyen (I) inducción, (II) saturación de la monocapa, y (III) gelificación interfacial. En la Figura 15 se puede observar el efecto del pH en la zona de inducción, para la proteína en pH 4.5 y 7, la presión superficial empieza a aumentar a tiempos más cortos en comparación con la presión superficial para la proteína en pH 2.5 y 10, probablemente como una consecuencia de las diferencias en la difusión en la interfase a tiempos cortos, como lo veremos más adelante. La segunda zona es muy similar para todos los valores de pH, pero para la proteína en pH 4.5 y 7 la saturación de la monocapa es ligeramente mayor. Después de 3000 s, la interfase se encuentra en la zona de gelificación para todas las soluciones de proteína con diferente valor de pH, mostrando mayor presión la proteína a pH 7 y 4.5. Ésto puede ser explicado de acuerdo con los resultados de Freer *et al.*, [58] para proteínas globulares y flexibles.

Hansen y Mirvold [62] midieron la tensión superficial de albúmina de suero bovino en la interfase aire-agua, y obtuvieron efectos similares al variar el pH. Valores de tensión superficial mínimos para una solución de 10^{-3} mg/mL fueron obtenidos para la solución a pH 4, cerca del punto isoelectrico de la proteína; mientras más bajo o más alto sea el valor de pH, es mayor la tensión superficial, de acuerdo con nuestros resultados.

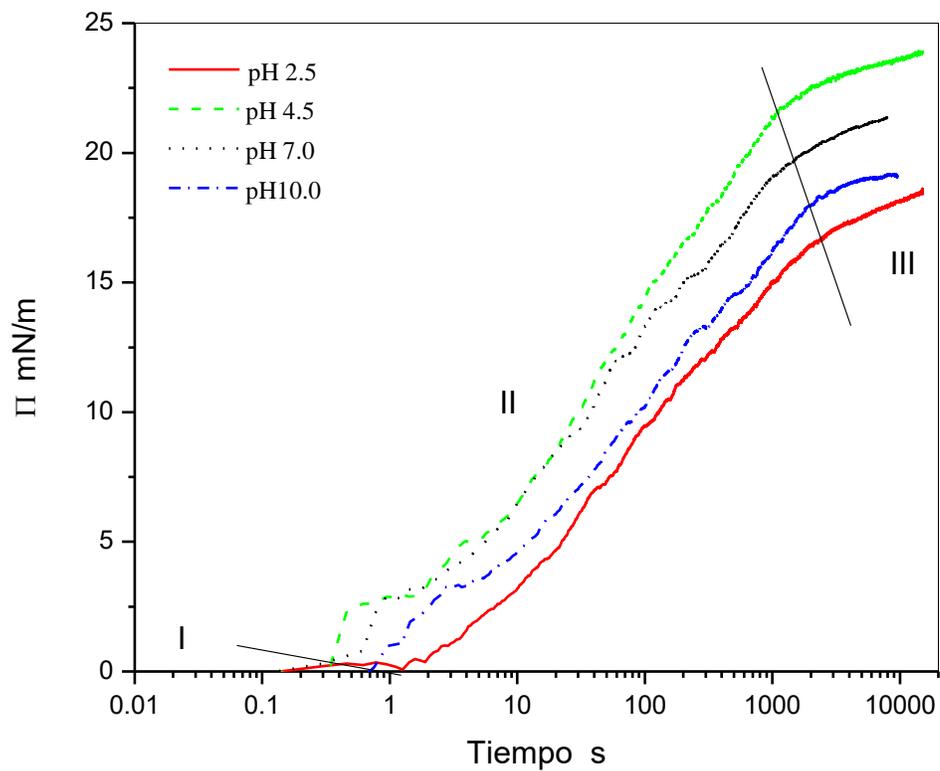


Figura 15. Presión superficial de B-FE en la interfase hexadecano-agua, utilizando diferentes pH en la fase acuosa. La concentración de B-FE fue de 0.125 mg/mL y temperatura constante de 25°C.

Según Juárez *et al.*, [63] and Cascao-Pereira *et al.*, [64] el contenido de α hélices es más alto alrededor del punto isoelectrico y las moléculas de proteína son menos compactas a valores de pH más altos y más bajos, lo cual esto significaría que B-FE cerca del punto isoelectrico se encuentra como una estructura globular en comparación con el pH 2.5 y 10, lo cual contribuye a una presión superficial mayor en la interfase hexadecano-agua.

En la Tabla 1 se muestran los resultados del comportamiento de la proteína a tiempos cortos expresado como coeficiente de difusión en la interfase, dado por la ecuación (1). Es posible observar un leve incremento del coeficiente de difusión para la proteína en pH 4.5 y 7, de acuerdo con el comportamiento de $\frac{d\gamma}{dt^{1/2}}$ a tiempos cortos, como se esperaba de acuerdo al incremento de interacciones hidrofóbicas en la interfase. Esta pequeña diferencia puede explicar el comportamiento de la proteína en la primera zona, la cual se explicó en la Figura 15. Los valores de coeficiente de difusión en la interfase hexadecano-agua de B-FE fueron aproximadamente diez veces mayores en comparación con los obtenidos para BSA en la interfase aire-agua [63], incluso cuando el peso molecular de B-FE es más de tres veces superior al peso molecular de BSA, probablemente debido a la fuerte interacción en la interfase hexadecano-agua. Esta diferencia entre las interfases aire-agua y hexadecano-agua fueron también observadas por Cabrerizo-Vilchez *et al.*, [41] con la interfase decano-agua.

Los valores de γ_{∞} fueron obtenidos con la ecuación (6) para diferentes valores de pH. A pesar de que el método γ vs $1/t^{1/2}$ ha mostrado algunas dificultades para ser aceptado [65-67], lo hemos utilizado como una guía para analizar el proceso de relajación modelado con la ecuación (7).

Los valores de γ_{∞} en la Tabla 1 fueron utilizados para obtener los tiempos de relajación de la tensión interfacial a través de la ecuación (7). El mejor ajuste de los tiempos de relajación obtenidos de la ecuación (7) es mostrado en la Tabla 1. Podemos observar un comportamiento similar para la proteína en pH 2.5 y 10 y para la proteína en pH 4.5 y 7, respectivamente. Las moléculas de proteína probablemente están menos cargadas y expandidas a pH 4.5 y 7.

Los primeros tiempos de relajación son más cortos para la proteína en pH 4.5 y 7 que para pH 2.5 y 10. Esto es probablemente debido a interacciones hidrofóbicas más fuertes en el primer caso y después por la contribución de fuerzas electrostáticas repulsivas con el correspondiente debilitamiento de las fuerzas hidrofóbicas en la interfase. Contrariamente al comportamiento del primer tiempo de relajación, el segundo es más corto para la proteína en pH 2.5 y 10 y más largo para pH 4.5 y 7. Esto podría significar que las moléculas de B-FE cargadas, necesitan más tiempo para llegar a la interfase y después, una vez que están en la interfase, el tiempo que necesitan para reorganizarse en la interfase es mucho más corto. Para las moléculas de proteína relativamente menos cargadas, la interacción en la interfase es facilitada por las interacciones hidrofóbicas y ocurren a tiempos muy cortos, después requieren tiempos largos para que las moléculas de proteína se organicen en la monocapa en la interfase hexadecano-agua. También es posible que el segundo tiempo de relajación tenga que ver con el tiempo necesario para lograr una multicapa estable en la interfase después de la segunda zona (Figura 15). Ésto fue observado por Graham y Philips [68] quienes notaron que el segundo tiempo de relajación de la adsorción de la proteína fue más largo para películas rígidas causado por proteínas globulares, similares a los observados en la Tabla 1 para pH 4.5 y 7.

Tabla 1 Parámetros obtenidos para la adsorción de B-FE en la interfase hexadecano-agua para diferente pH.

pH	$D_{h-w} \times 10^7 \text{ m}^2/\text{s}$	$\gamma_{\infty} \pm 1$ mN/m	Primer Tiempo de Relajación (s)	Segundo Tiempo de Relajación (s)	Tiempo de Relajación de Maxwell (s)	Modulo de Maxwell (Tiempos Largos) (mN/m)
2.5	1.4	6.2	1798	120	5.4	40.2
4.5	2.0	5.4	92	1093	5.8	42.5
7	3.8	5.32	51	903	7.5	40.6
10	1.0	5.8	1056	65	5.5	40.4

Los valores del coeficiente de difusión (D_{h-w}) fueron obtenidos con la ecuación 5 extrapolando los valores de tensión interfacial (γ_{∞}) de la ecuación 6. El primer y segundo tiempo de relajación fueron ajustados con la ecuación 7, el tiempo de relajación y el módulo dilatacional extrapolado fueron obtenidos ajustando Maxwell con valores experimentales de la ecuación 10 y 11.

Las propiedades elásticas y viscosas de B-FE en la interfase hexadecano-agua se determinaron por la realización de pequeñas oscilaciones de la gota como se explica en la sección experimental.

Los resultados del módulo elástico y de la viscosidad interfacial son mostrados en la Figura 16 y Figura 17, respectivamente. El comportamiento del módulo elástico para B-FE en diferente pH es similar a los encontrados para albúmina de suero bovino (BSA) [63]. En ese trabajo los valores más altos de módulo elástico encontrados fueron para la proteína en pH 4.6 y 7 en comparación con los valores obtenidos para pH 8.4. También es posible que en nuestro caso, las moléculas de B-FE construyan una red en la interfase constituida por interacciones hidrofóbicas. Este fenómeno también fue observado por Cascao-Pereira *et al.*, [64] a un pH cerca del punto isoeléctrico.

Cabrerizo-Vilchez *et al.*, [41] midieron los módulos de BSA en la interfase aire-agua para diferente pH a tiempos largos (20 h) y demostraron como la proteína formó la monocapa en diferentes etapas [58]. A este fin, dichos autores modelaron la adsorción de proteínas como esferas acompañadas por contactos o uniones entre moléculas de proteínas. Cuando las moléculas son globulares responden como esferas duras, produciendo un módulo más elástico que el esperado para moléculas flexibles las cuales responden como esferas suaves produciendo un valor de módulo elástico más bajo. En la Figura 16 podemos observar resultados similares para las moléculas de B-FE en pH 4.5, cerca del punto isoeléctrico, probablemente tienen una forma globular, resultando en un módulo elástico mayor.

Es interesante mencionar también que para este pH, el módulo de compresibilidad máximo en la interfase aire-agua es mayor que el máximo para la proteína en pH 2.5, como lo podremos ver en la siguiente sección.

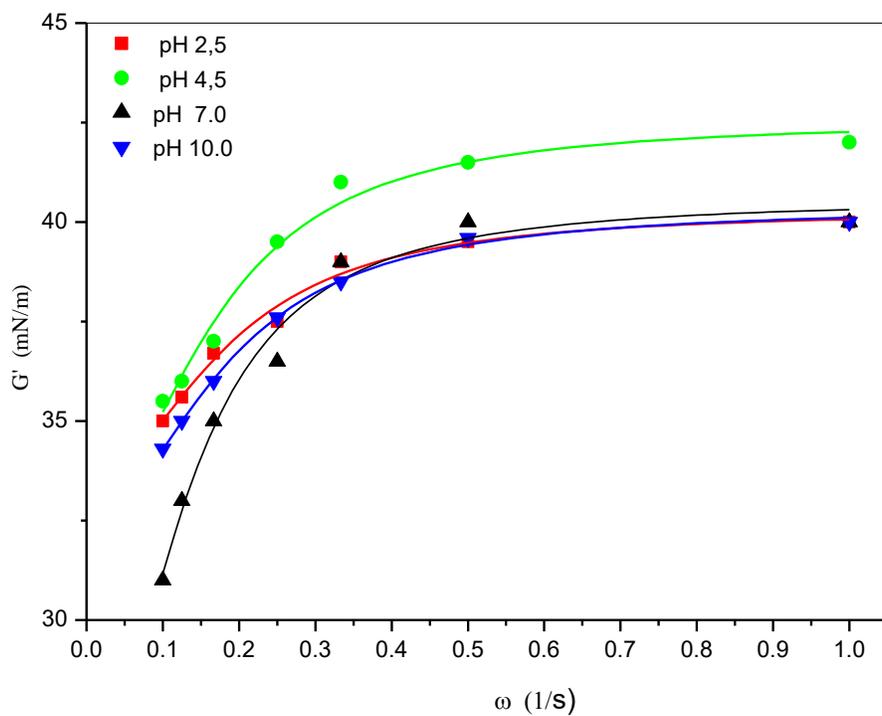


Figura 16. Módulo elástico dilatacional de B-FE en la interfase hexadecano-agua para diferente pH en la fase acuosa en diferentes frecuencias. La concentración de B-FE fue de 0.125 mg/m y la temperatura de 25°C. Las mediciones fueron realizadas después de 9000 s.

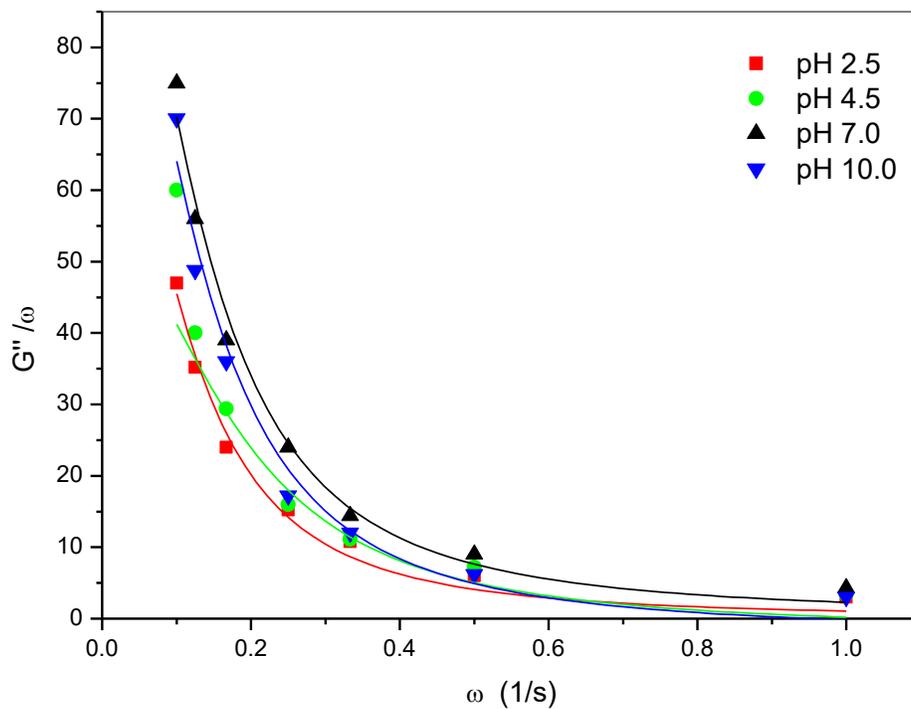


Figura 17. Módulo viscoso de B-FE en la interfase hexadecano-agua para diferente pH en la fase acuosa en diferentes frecuencias. La concentración de B-FE fue de 0.125 mg/mL y la temperatura de 25°C. Las mediciones fueron realizadas después de 9000 s.

En general, el modelo ajusta mejor los puntos experimentales a bajas frecuencias, probablemente debido a las limitaciones del instrumento a altas frecuencias. También observamos que a bajas frecuencias, la viscosidad es muy alta para pH 4.5 y 7 y disminuye drásticamente a medida que aumenta la frecuencia (Figura 17).

Por el contrario, a frecuencias más altas $E'(\omega)$ parece llegar a un valor más alto que el obtenido para $E''(\omega)/\omega$. Este comportamiento es similar a la formación estructuras que forman redes tipo gel debido a la interacción de algunos polisacáridos y proteínas [69].

Los parámetros de mejor ajuste del modelo de Maxwell dados en las ecuaciones (10) y (11) se muestran en la Tabla 1. Los tiempos de relajación encontrados para B-FE son más cortos que los encontrados para BSA en la interfase aire-agua [63]. Las diferencias encontradas en los tiempos de relajación son mínimas probablemente debido a una estructura tipo gel formada por B-FE cerca del punto isoeléctrico. Se Observó también que el ajuste preserva el valor más alto del módulo elástico a mayor frecuencia para la proteína en pH 4.5.

4.4 Propiedades interfaciales de B-FE en la interfase aire-agua

Las isothermas de Langmuir de B-FE fueron obtenidas por la dispersión de soluciones acuosas sobre la subfase de agua con diferente pH. En la Figura 18 observamos que para la subfase con pH 2.5 la isoterma comienza a elevarse a un área límite mayor A_0 (A_0 indica el área límite, la cual es determinada por extrapolación en la intersección del eje de abscisas con la tangente de la isoterma a 0.2 mN/m) que el área límite observada para la subfase con pH 4.5 y 7. Esto podría significar que las moléculas de proteína cargadas positivamente en la interfase aire-agua son repelidas por el exceso de iones H^+ en la

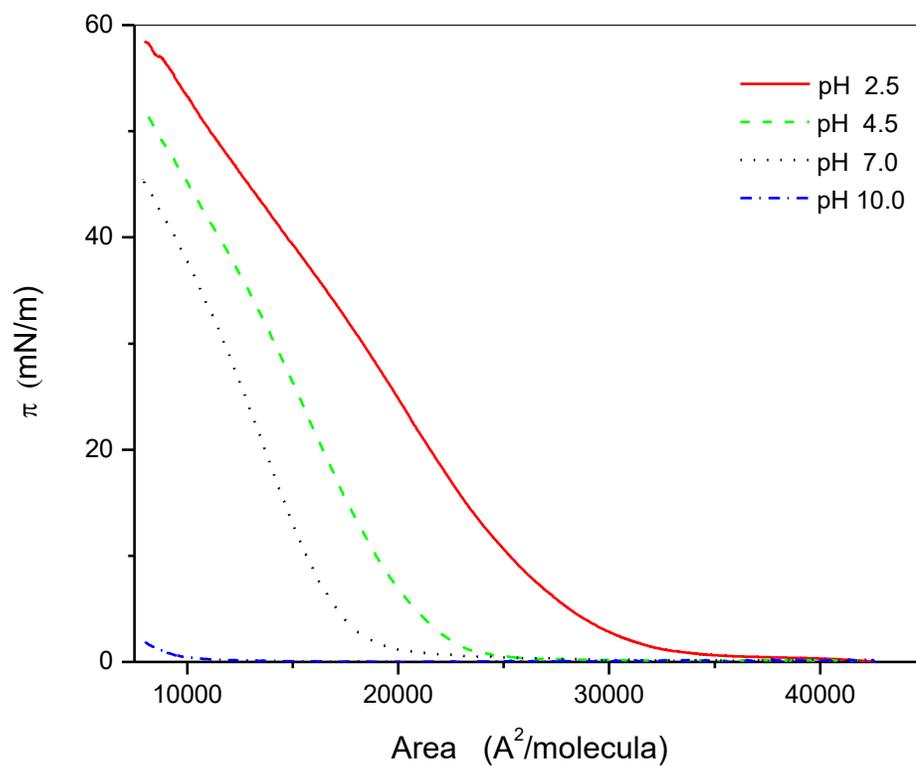


Figura 18. Isotermas de B-FE en la interfase aire-agua para diferentes soluciones de pH en la fase acuosa.

subfase, logrando una mayor presión y un mayor volumen de ocupación medio asociado con un mayor diámetro molecular, alrededor de 229 Å para pH 4.5 y 193 Å para pH 7. En la fase más condensada, el área extrapolada a presión cero, el diámetro promedio para las moléculas a pH 2.5, 4.5 y 7 fue de 187, 163 y 158 Å, respectivamente.

Estos diámetros moleculares promedio en la interfase son mayores que los encontrados por He *et al.*, [70] (110 Å) para aloficocianina la cual consiste de sólo dos subunidades α y β . Es interesante mencionar que Li *et al.*, [15] obtuvieron un diámetro promedio de ficobilisomas en la interfase aire-agua de alrededor de 60 Å. Por lo tanto, proponemos que B-FE permanece extendida en la interfase aire-agua.

El comportamiento de diferentes proteínas en la interfase aire-agua para diferente pH en la subfase fue también investigado por Sánchez-Gonzalez *et al.*, [71]. Ellos encontraron un valor alto de A_0 para pH 2 y 4.7 y valores bajos para otro pH. Similar comportamiento encontraron para pH 10 donde la isoterma alcanza presión muy baja y un área límite pequeña. El hombro encontrado para diferentes proteínas en la interfase aire-agua fue alrededor de 20 mN/m [71-73] causado por hélices α de las especies de proteína migrando al aire o a la subfase donde no las hemos encontrado, probablemente debido a que el contenido de hélices α de B-FE es más bajo comparado con otras proteínas.

El comportamiento de los módulos de compresibilidad $C_s^{-1} = -A(d\pi/dA)$ para las monocapas en subfases acuosas con diferente pH se muestra en la Figura 19. En todos los casos los módulos alcanzan un máximo, correspondiente a la aparición de un equilibrio de fase líquido expandido-líquido condensado, mostrado por otras monocapas [72]. El valor máximo es ligeramente menor para pH 2.5 que para otro pH.

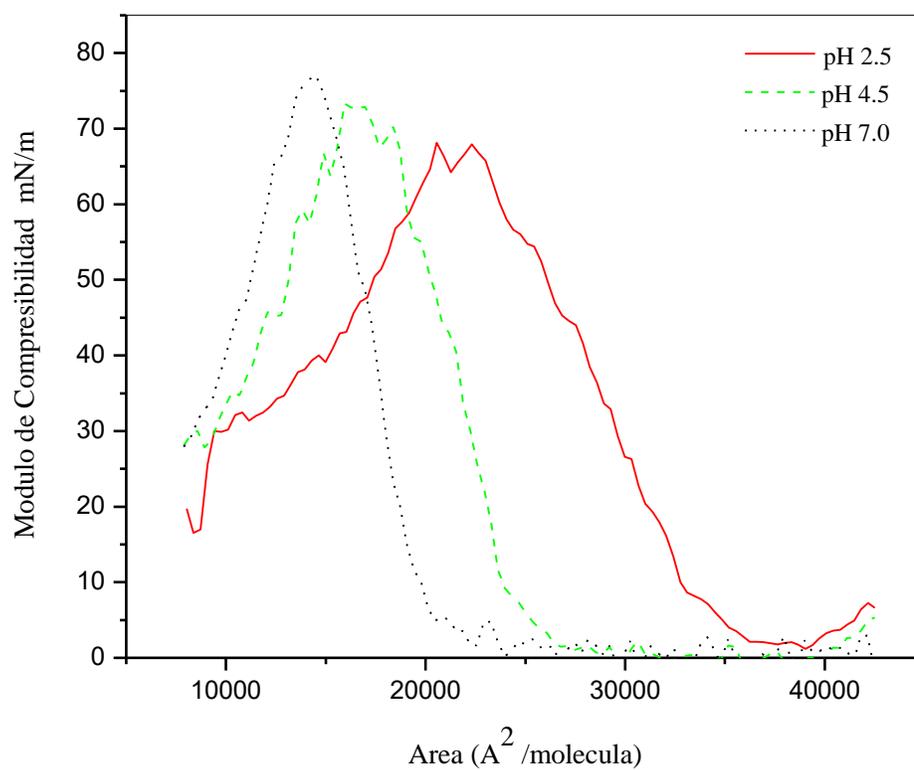


Figura 19. Módulos de compresibilidad para diferentes soluciones de pH en la fase acuosa.

El comportamiento es similar al encontrado para BSA cerca del punto isoeléctrico, donde las moléculas de proteína están menos cargadas, mostrando una conformación compacta [66], interacciones intermoleculares fuertes y así como para la construcción de películas más rígidas [71].

Owaga *et al.*, [74] estudiaron una ficoeritrina extraída de la microalga roja *Nori porphyra* a diferente pH y encontraron que la ficoeritrina adopta tres conformaciones en las soluciones como se mencionó anteriormente. También sugieren que a pH mayor de 9 la ficoeritrina participa en una reacción reversible de auto asociación disociación produciendo pequeños componentes.

Estos resultados de una ficoeritrina similar pueden explicar el comportamiento de las isothermas a pH 2.5 y 4.5 en la Figura 18. El comportamiento de las isothermas para pH 10 es también comprensible, donde la presencia de moléculas pequeñas en la interfase son observadas.

En la Figura 20 se muestra el comportamiento de los ciclos de compresión y expansión a diferente pH en la subfase. Podemos observar que el área de histéresis para cada ciclo es mayor a pH 2.5. Esto significaría, de acuerdo con otros autores [75-77], que muchas moléculas pasan al fondo de la subfase y regresan, debido a la repulsión electrostática de la subfase. Es posible que la mayor pérdida de área en los primeros dos ciclos sea debido a la migración irreversible de agregados a la subfase. El comportamiento del área en los ciclos para pH 7 y 4.5 es similar probablemente debido a la similitud de conformación para estos valores de pH [9]. Además para estos valores de pH las áreas en los ciclos son más pequeñas que para el caso del pH 2.5, probablemente porque en el primer caso menos moléculas entran y salen en la interfase y por lo tanto es más estable.

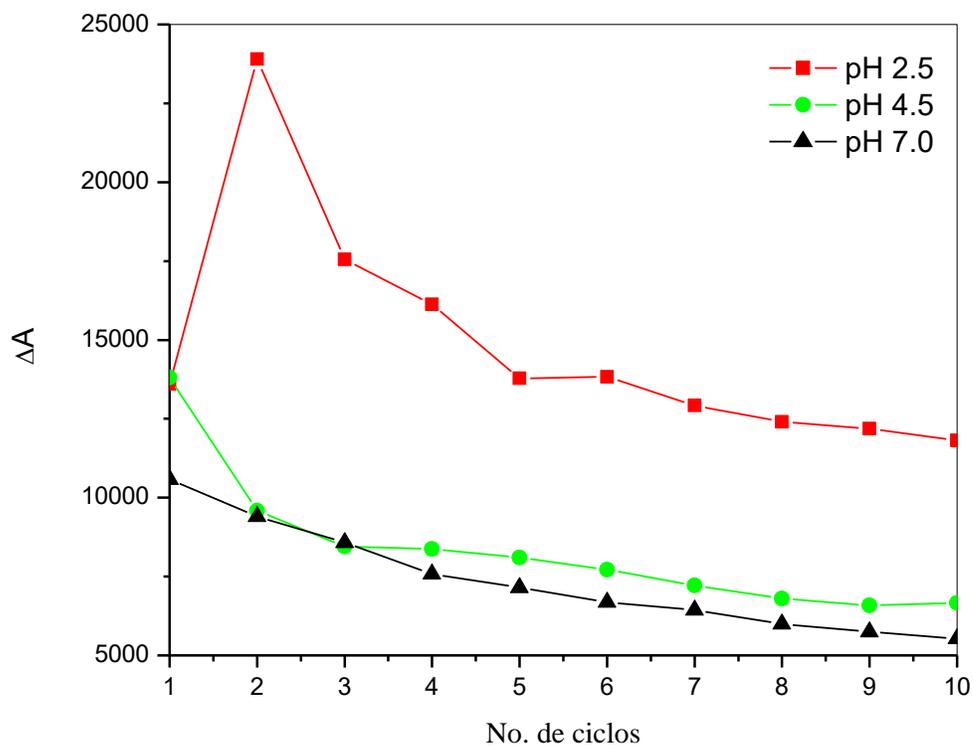


Figura 20. Ciclos de compresión y expansión de monocapas de B-FE en la interfase aire-agua utilizando diferentes soluciones de pH en la subfase. Los ciclos fueron iniciados 30 minutos después de dispersar la proteína.

Yu et al., [78] trabajaron con una proteína muy activa en la superficie, realizando ciclos de compresión y expansión y encontraron que el área límite fue reducida cerca del 58 % después de ocho ciclos, lo cual fue explicado por un alineamiento molecular en la interfase aire-agua demostrado por mediciones de AFM. En nuestro caso, el área límite se desplazó alrededor del 30 % en todos los casos, sin embargo, en la parte superior del ciclo de compresión, el área se redujo sólo el 4 % para el pH 2.5 y 2 % para los otros casos. Esto podría significar que las moléculas de B-FE deberían ser más ordenadas en la interfase después de diez ciclos, tal como se observó en las imágenes de BAM.

Finalmente es importante mencionar que se midió la estabilidad de las monocapas de B-FE manteniendo la presión superficial constante a 20 mN/m. Se observó que después de 2 h, la reducción del área fue sólo del 15 % para pH 2.5 y 10 % para los otros casos (no se muestra). Por lo tanto, podemos concluir que podríamos tener una disolución o un proceso de formación de multicapas en la interfase y simultáneamente un ordenamiento molecular en la interfase aire-agua. Las pequeñas diferencias para el pH 2.5 pueden deberse a la presencia de agregados y/o a la extensión molecular como lo sugiere Owaga *et al.*, [74].

4.4.1 Imágenes de BAM

La morfología de las monocapas de B-FE fue observada en la interfase aire-agua, variando el pH de la fase acuosa mediante BAM. Las imágenes obtenidas por esta técnica fueron tomadas durante la compresión y expansión de la monocapa en diferentes ciclos. En la Figura 21 se muestran dichas imágenes de BAM tomadas durante la compresión del primer ciclo a una presión de 18 mN/m y después de diez ciclos de compresión y

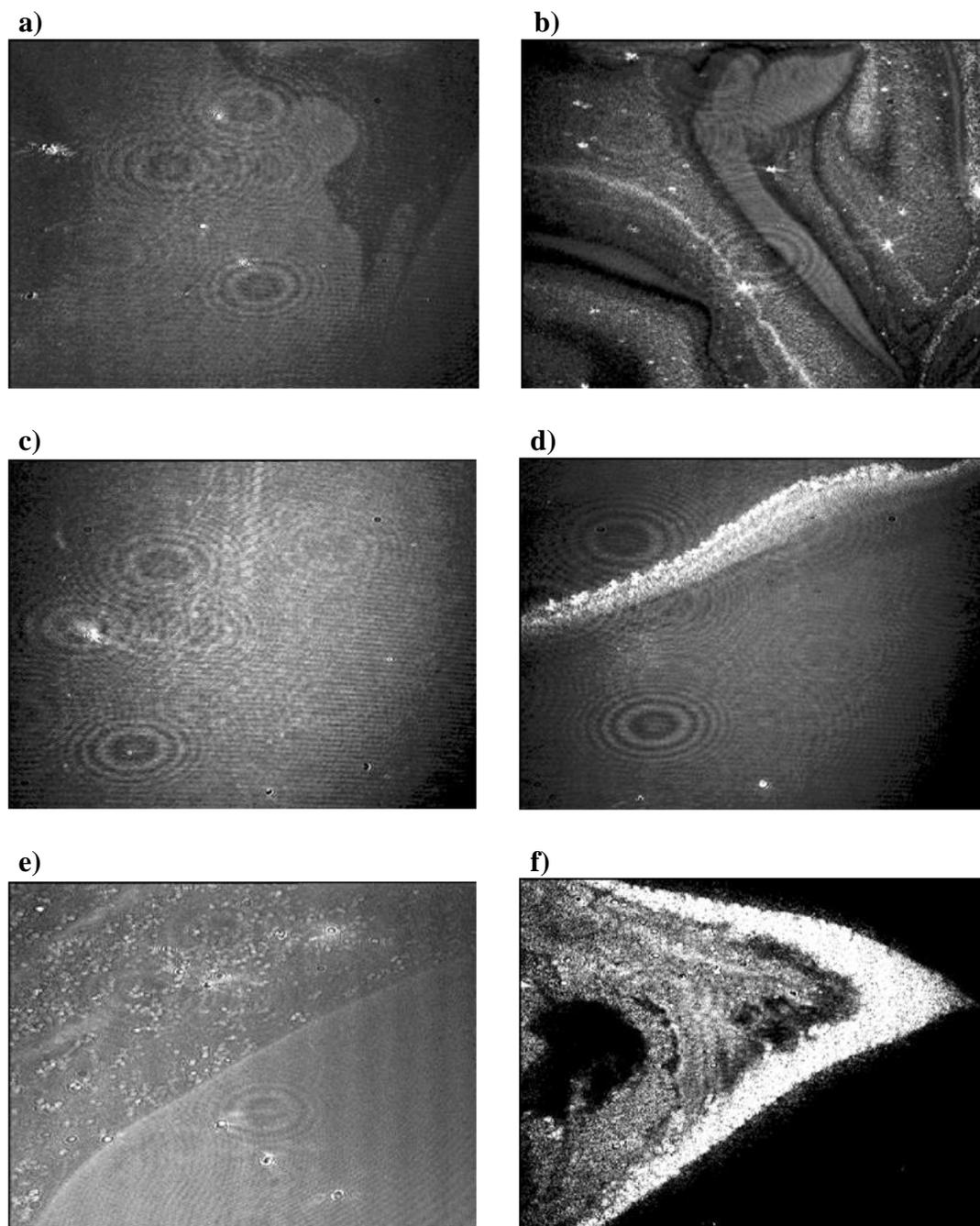


Figura 21. Imágenes de BAM en la interfase aire-agua, variando el pH de la fase acuosa. Imagen a), c) y e) obtenidas durante la compresión del primer ciclo a una presión de 18 mN/m y pH de 2.5, 4.5 y 10, respectivamente. Imágenes b), d) y f) obtenidas después de varios ciclos de compresión-expansión y pH 2.5, 4.5 y 10, respectivamente.

expansión. A presión superficial menor de 10 mN/m se observó que las monocapas de B-FE eran homogéneas, oscuras y con poco contraste para los diferentes pH (no mostradas), debido a que aun se encontraban en fase desordenada.

Después de seguir comprimiendo, aumento la densidad de las monocapas aunque no cambió su homogeneidad (Figura 21a, 21c y 21e). Las imágenes tomadas después de diez ciclos de compresión-expansión se muestran en la Figura 21b, 20d y 20f. Estas imágenes muestran que después de varios ciclos de compresión y expansión las moléculas de B-FE se mantienen en la interfase, también es posible observar dominios brillantes, por lo cual probablemente las moléculas aumenten su ordenamiento al comprimir y expandir la monocapa.

4.5 Imágenes de AFM

Las películas de Langmuir-Blodgett de B-FE fueron obtenidas sobre mica en la interfase aire-agua como se explicó en la sección experimental y fueron observadas a 1, 24 y 48 h después de ser obtenidas sobre mica. En la Figura 22a se muestra la imagen de B-FE obtenida de la subfase con pH 7. Podemos observar una estructura uniforme con pequeños agregados irregulares cerca uno de otro. La altura promedio de estos agregados fue de 1.8 ± 0.1 nm, su tamaño promedio entre 100 y 130 nm y la rugosidad promedio alrededor de 0.5. Esta monocapa observada 24 y 48 h después, muestra estructuras más aisladas alcanzando alturas de hasta 100 nm, como se puede observar en la Figura 22b. Es interesante mencionar que después de 24 h, las zonas planas cambian a granulares con una altura promedio de 6 nm. Por otra parte, los agregados aumentaron a 150-205 nm después de 24 h y 250-500 después de 48 h. Este fenómeno de agregación es similar al fenómeno de

cristalización observado por Valdés *et al.*, [47] para películas de diferentes ácidos carboxílicos obtenidas en la fase de colapso en la interfase aire-agua. Comportamiento similar mostraron las monocapas obtenidas de la interfase aire-agua de la subfase con pH 4.5. En la Figura 22c se observa una imagen de una monocapa después de una hora con una estructura planar y regular y una altura promedio de 1.8 nm con una rugosidad de 0.6, el tamaño característico de los agregados fue alrededor de 60-80 nm. Después de 24 y 48 h la estructura mostró agregados muy grandes alcanzando alturas de hasta 40 nm. Después de 48 h (Figura 22d) el tamaño de los agregados creció hasta 500 nm. También notamos agregados pequeños con tamaños de 5-6 nm después de 24 h.

Finalmente en la Figura 22e y Figura 22f se muestran las imágenes de las monocapas de B-FE obtenidas 1 y 48 h después de formar la monocapa en la subfase con pH 2.5. La imagen obtenida en la primera hora, muestra una estructura granular muy irregular alcanzando un tamaño de agregado de 200 nm y una altura de hasta 35 nm. Después de 48 h el tamaño de los agregados alcanzó hasta 500 nm y altura de hasta 40 nm.

De acuerdo a los resultados de Bermejo *et al.*, [14] y Samuelson *et al.*, [11], la estructura de B-FE es en forma de discos formados por dos $\alpha\beta$ -trómeros unidos cara a cara con la subunidad localizada en un agujero central con un espesor de 6 nm y un diámetro de 11-12 nm. Por lo cual se puede decir que para pH 4.5 y 7 la proteína está fuertemente unida a la mica cuando es medida 1 h después de ser depositada, después es probable que B-FE recupere su estructura de 6 nm de espesor, pero es factible que varias moléculas de B-FE sigan unidas construyendo agregados.

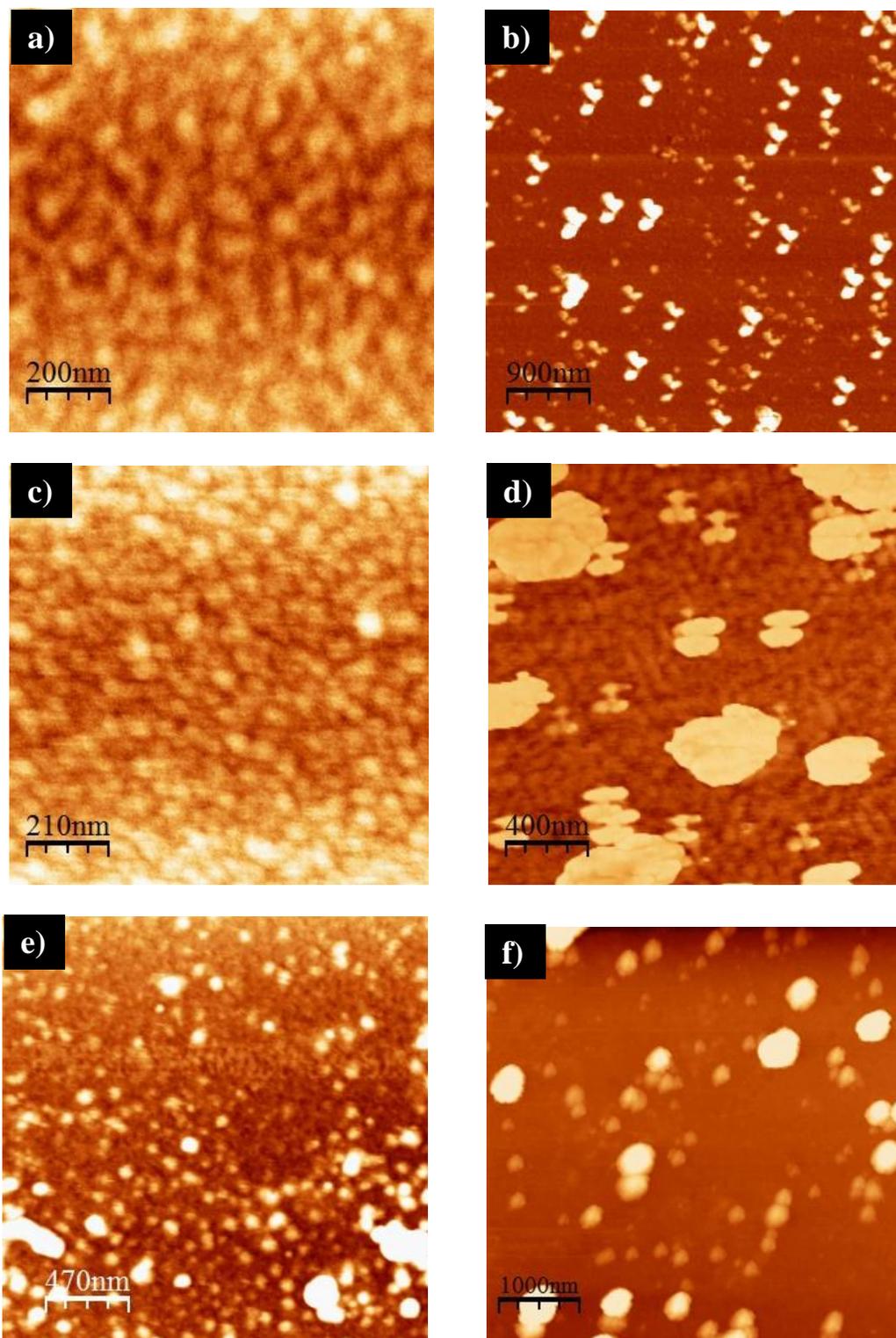


Figura 22. Imágenes de AFM de monocapas de Langmuir-Blodgett de B-FE observadas 1h y 48h después de ser obtenidas sobre mica a 20 mN/m en la interfase aire-agua, utilizando diferente pH en la subfase. a) pH 7, 1 h; b) pH 7, 48 h; c) pH 4.5, 1 h ; d) pH 4.5 48 h; e) pH 2.5, 1 h; f) pH 2.5, 48 h.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES

En este trabajo purificamos la proteína B-FE de la microalga roja *Rhodospirillum rubrum* cultivada en nuestro laboratorio e investigamos las propiedades fluorescentes en solución acuosa y las propiedades interfaciales en la interfase aire-agua y en la interfase hexadecano-agua variando el pH en la fase acuosa.

Rhodospirillum rubrum presentó tres tipos de ficobiliproteínas: ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina. La B-FE purificada de *R. rubrum* mostró dos máximos, a 540 y 562 nm, con un hombro pequeño a 498 nm. En este estudio se obtuvo B-FE con un índice de pureza de 4.8 (A540/A280), valor superior al presentado en otras investigaciones.

El espectro de emisión de B-FE en pH 4.5 presentó la intensidad máxima de fluorescencia y disminuyó notablemente en pH 2.5 y 10, probablemente el espectro de emisión de B-FE está fuertemente influenciado por cambios conformacionales de las moléculas de proteína, como ha sido demostrado en investigaciones con proteínas similares donde el máximo de intensidad de fluorescencia disminuye ligeramente cuando el pH difiere de la neutralidad y desaparece progresivamente en extremos de pH probado.

La interacción de la proteína en la interfase hexadecano-agua fue dependiente del pH. Las moléculas de proteína en pH 4.5 y 7 mostraron una presión superficial alta y un elevado módulo elástico dilatacional en la interfase, probablemente debido a la adopción de una conformación globular. Estas diferencias en hidrofobicidad también se observaron con el tiempo de relajación para cada pH. Las moléculas de proteína se adsorbieron más rápidamente en pH 7 y 4.5 en comparación con el tiempo de adsorción para pH 2.5 y 10,

probablemente debido a interacciones hidrofóbicas más débiles o interacciones electrostáticas repulsivas en la interfase hexadecano-agua.

El comportamiento de B-FE en la interfase aire-agua fue inesperado, de acuerdo con información del comportamiento de B-FE extraída de otras fuentes. Obtuvimos monocapas estables para todos los pH analizados, excepto el de 10. El área molecular en la interfase también fue dependiente del pH en la subfase y en condiciones ácidas esta área fue mayor de acuerdo con los resultados de otras investigaciones.

El pH en la subfase de agua también influyó el fenómeno de agregación de las monocapas de Langmuir-Blodgett, a pH 4.5 y 7 las monocapas de B-FE fueron más homogéneas y después de dos días mostraron un fenómeno de agregación-cristalización. Por otra parte, las monocapas de B-FE extraídas de la subfase con pH 2.5, mostraron una gran rugosidad y un proceso de agregación no homogéneo, probablemente como una consecuencia de una conformación más elongada.

CAPÍTULO 6**6. BIBLIOGRAFÍA**

1. Orta-Ramirez, A., Merrill, J.E. y Smith, D.M., *J. Food Sci.*, 2000. 65: p. 1046.
2. Sun, L., Wang, S., Gong, X., Chen, L. , *Photochem. Photobiol. B: Biology* 2004. 76: p. 1.
3. Mihova, S.G., Georgieva, D.I., Minkova, K.M., Tchernov, A.A., *J. Biotechnol*, 1996. 48: p. 251.
4. Kronick, M.N., *Journal of Immunological Methods*, 1986. 92: p. 1-13.
5. Jean-Claude, T., Passaquet, C., *The Journal of Biological Chemistry*, 1999. 274(4): p. 2472-2482.
6. Liu, L., Chen, X., Zhang, X., Zhang, Y., Zhou, B., *J. Biotechnol*, 2005. 116: p. 91.
7. Bermejo, R., Talavera, E.M., Alvarez-Pez, J.M., *J. Chromatogr*, 2001. 917: p. 135.
8. Ma, S., Wang, G., Sun, H., Zeng, C., *Plant Sci*, 2003. 164: p. 253.
9. Owaga, H., Mizuno, H., Saito, T., Yamada, Y., Oohusaand, T., *Iso Nippon Suisan Gakkaishi* 1991. 57: p. 899
10. Koller, K.P., Wehrmeyer, W., *Arch. Microbiol*, 1975. 104: p. 255.
11. Samuelson, L., Miller, P., Galotti, D., Marx, K.A., Kumaff, J., Tripathy, S. and Kaplan, *Thin Solid Films*, 1992. 210/211: p. 796.
12. Almog, R., Berns, D, *J. Colloid Interface Scie.*, 1983. 91: p. 448.
13. Almog, R., Marsilio, F., Berns, D., *Arch. Biochem. Biophys*, 1988. 260: p. 28.
14. Bermejo, R., Tobaruela, D.J., Talavera, E.M., Orte, A., Alvarez-Pez, E., *J. Colloid Interface Scie*, 2003. 263: p. 616.
15. Li, D., Yang, S., Li, J., Xie, Zhao, J., *Photosynthetica*, 2004. 42: p. 365.
16. Moriizumi, T., *Thin Solid Films*, 1988. 160: p. 413-429.
17. Okahata, Y., Tsuruta, T., Ijiro, K., Ariga, K., *Langmuir*, 1988. 4: p. 1373.
18. Möbius, D., Millar, R., *Proteins at liquid Interfaces*. 1998: ELSERVIER. 303-339.

19. Yasutomo Nomura · H.T., Lorenz Poellinger , Fumihiko Higashino , Masataka Kinjo
Cytometry 2001. 44: p. 16-23.
20. Pecci, J., Fujimori, E, Biochim Biophys Acta, 1969. 188: p. 230-236.
21. Schrimmer, T., Vincent, M.G., Biochim Biophys Acta, 1987. 893: p. 379-385.
22. Bermejo, R., Alvarez-Pez, J.M., Acién-Fernández, F.G., Molina, E.,
. J. Biotechnol., 2002. 93: p. 73-85.
23. Sogorb, S.M., Vilanova, G.E., Técnicas Analíticas de Contaminantes Químicos.
2004: Ediciones Diaz de Santos S.A.
24. Lakowicz, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy. 1986: Plenum Press.
25. Enriquez-Guevara, E.A. 2006, Universidad de Sonora. p. 65.
26. Frisch, H.L., Shima, M., Eirlich, F.R., J. Chem. Phys., 1953. 21: p. 365.
27. De Gennes, P.G., Colloid Interface Sci, 1987. 27: p. 187.
28. Ritchie, F.M., Colloid Interface Sci, 1986. 25: p. 341.
29. Fainerman, V.B., Miller, Wüstneck, R., Makievski, A.V., J. Chem. Phys., 1996: p.
7669.
30. González, G., Mac Ritchie, G., J. Colloid Interface Sci, 1970. 32: p. 55.
31. López Franco, Y.L., Valdez, M.A., Hernández, J., Calderón de la Barca, A. M.,
Rinaudo, M., Goycoolea, F.M., Macromol. Biosci., 2004. 4: p. 865-874.
32. Paulsson, M., Dejmek, P., J. Colloid Interface Sci, 1992: p. 394.
33. Suttiprasit, V.K.y.M., J., J. Colloid Interface Sci., 1992. 154: p. 316.
34. Regan, A.J.I.W.a.L.H., J. Colloid Interface Sci, 1980. 78: p. 389.
35. Adamson, A.W., Physical Chemistry of Surfaces' Quinta Edicion ed. 1990: John
Wiley, New York.
36. Hann, R.A., Phil Trans R. Soc. Lond., 1990. 330: p. 141-152.
37. Gaines, G.L., New York, London, Sidney: Intersciencie Publishers.
38. Szablewski, P.M.y.M., Nima Technology Operating Manual. Sexta Edicion ed.
2002, England.

39. Miller, R., Aksenenko, E.V., Fainerman, B.V., *J. Colloid Interface Scie.*, 2001. 236: p. 35.
40. Li, J., Fainerman, B.V., Miller, R., *Langmuir* 1996. 12: p. 5138.
41. Cabrerizo-Vílchez, M.A., Policova, Z., Kwok, D.Y., Chen, P., Newmann, A.W., *Colloids Surf.*, 1995. 5: p. 1.
42. Van, P., Bogaert, D., Joos, P., *J. Phys. Chem.*, 1979. 83: p. 2244.
43. Klebanu, A., Kliabanova, N., Ortega, F., Monroy, F., Rubio, R.G., Starov, J. *Phys. Chem. B.*, 2005. 109: p. 18316.
44. Maldonado-Valderrama, V.B., Fainerman, M.J., Gálvez-Ruiz, A., Martín- and M.A. Rodriguez, Cabrerizo-Vilchez, R. Miller *J. Phys. Chem. B* 2005. 109: p. 17608.
45. Henón, S., Meunier, J., *Rev. Sci. Instrument*, 1991. 62: p. 936.
46. Vollhardt D., F.V.B., *Adv. Colloid Intreface Sci.*, 2000. 86: p. 103.
47. Valdes-Covarrubias, M.A., Cadena-Nava, R.D., Vásquez-Martinez, E., and E. Valdez-Pérez, Ruiz-García, J., *J. Phys. Condens. Matter* 2004. 16: p. 2097.
48. Mackie, A.R., Gunning, A.P., Ridout, M.J. Wilde, P.J., y Rodriguez Patiño, J., *Biomacromolecules*, 2001. 2: p. 1001-1006.
49. Rong Xu, E.D., Brent S. Murray, *Langmuir*, 2007. 23: p. 5005-5013.
50. Binning, M., Quate, C.F., Gerber, C., *Phys. Rev. Lett*, 1986. 56: p. 930-933.
51. <http://users.otenet.gr/garof/Bam/>.
52. <http://nano.mtu.edu/afm/htm>.
53. Abelson, J.N., Simon, M.I., *Methods Enzimol*, 1990. 182: p. 31.
54. Básaca-Loya, G.A., Burboa, M.G., Valdez, M.A., Gámez, R., Goycoolea, F.M., Gutierrez-Millán, L.E., *Rev. Mex. Fís*, 2008. 54: p. 119.
55. Bradford, M.M., *Anal. Biochem*, 1976. 72(248-254).
56. Liu, L., Su, H., Yan, S., Sha, S., Xi, B., Chen, X., Zhang, X., Zhou, B., Zhang, y., *Biochim. Biophys. Acta*, 2009.
57. Gao, H., Kumar, J., Marx, K.A., Tripathy, C., *Chem. Mater*, 1995. 7: p. 1779.

-
58. Freer, E.M., Yim, K.S., Fuller, G.G., Radke, C.J., *J. Phys. Chem. B*, 2004. 108: p. 3835.
 59. Rudiger, W., *Photochem Photobiol*, 1992. 56: p. 803.
 60. Beverung, C.J., Radke, C.J., Blanch, H.W., *Biophys. Chem*, 1999. 81: p. 59.
 61. Pereira, L.G.C., Theodoly, O., Blanch, H.W., Radke, C.J., *Langmuir* 2003. 19: p. 2349.
 62. Hansen, F.K., Myrvold, R., *J. Colloid Interface Scie.*, 1995. 176: p. 408.
 63. Juárez, J.E., Galaz, J.G., Machi, L., Burboa, M.G., Gutierrez-Millan, L.E., and F.M. Goycoolea, Valdez, M.A., *J. Phys. Chem.*, 2007. 111: p. 2727.
 64. Cascao-Pereira, L.G., Théodoly, O., Blanch, H.W., Radke, C.J., *Langmuir*, 2003. 19: p. 2349.
 65. Gonzalez, G., MacRitchie, F., *J. Colloid Interface Sci.*, 1970. 32: p. 55.
 66. Wang, L., Atkinson, D., Small, D.M., *J. Biol. Chem*, 2003. 28: p. 37480.
 67. Miller, R., Kretzschmar, G., *Colloid Interface Sci.*, 1991. 37: p. 97.
 68. Graham, D.E., Phillips, G.N., *J. of Colloid Interface Sci*, 1979. 70: p. 403.
 69. Valdez, M.A., Acedo-Carrillo, J.I., Rosas-Durazo, A., Lizardi, J., Rinaudo, M., Goycoolea, F.M., *Carbohydr. Polym*, 2006. 64: p. 205.
 70. He, J., Jiang, L., Jiang, L., Bi, Z., Li, J., *Langmuir* 1996. 12: p. 1840.
 71. Sánchez-González, J., Ruiz-García, J., Gálvez-Ruiz, M.J., *J. Colloid Interface Sci*, 2003. 267: p. 286.
 72. Valencia-Rivera, D., Básaca-Loya, G.A. Burboa, M.G., Gutiérrez-Millán, L.E. and R.D. Cadena-Nava, Ruiz-García, Valdez, M.A., *J. Colloid Interface Sci*, 2007. 316: p. 238-249.
 73. Xicohtencatl-Cortes, J.M.-O., R. Castillo, *J. Phys. Chem. B*, 2004. 108: p. 7307.
 74. H. Owaga, H.M., T. Saito, Y. Yamada, T. Oohusaand, N, *Iso Nippon Suisan Gakkaishi*, 1991. 87: p. 899.
 75. Warriner, H.E.D., J., Waring, A.J., Zasadzinski, J.A., *Biophys. J*, 2002. 82: p. 835.
 76. Broniatowski, M., Sandez-Macho, I., Miñones Jr., J., Dinarowicz-Latka, P., *J. Phys. Chem. B* 2004. 108: p. 13403.

77. Caetano, W., Ferreira, M., Oliveira Jr., O.N., Itri, R., Colloids Surf. B Biointerfaces, 2004. 38: p. 21.
78. Yu, L., Zhang, B., Szilvay, G.R., Sun, R., Janis, J., Wang, Z., Feng, S., Xu, H. , Qiao Microbiology 2008. 154: p. 1677.