

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estabilidad de albúmina sérica bovina en solución acuosa en presencia de sales de tetraalquilamonio

Juan Carlos Sanabria Montealegre

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2022

Estabilidad de albúmina sérica bovina en solución acuosa en presencia de sales de tetraalquilamonio

Juan Carlos Sanabria Montealegre

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ciencias – Química

Directora:

Doctora, Carmen María Romero Isaza

Línea de Investigación:

Termodinámica de soluciones

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Termodinámica Clásica

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2022

“Nos movemos en nuestro ambiente diario sin entender casi nada acerca del mundo. Dedicamos poco tiempo a pensar en el mecanismo que genera la luz solar que hace posible la vida, en la gravedad que nos ata a la Tierra y que de otra forma nos lanzaría al espacio, o en los átomos de los que estamos constituidos y de cuya estabilidad dependemos de manera fundamental”

Carl Sagan.

Introducción del libro: “Historia del tiempo. Del big bang a los agujeros negros” de Stephen Hawking.

Editorial Planeta. Bogotá, Colombia. Octava edición. 2020.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Juan Carlos Sanabria Montealegre

07/10/2022

Agradecimientos

A mi madre, sin cuyo ejemplo y apoyo constante hubiera sido imposible mi formación académica. Su título de maestría en la Universidad Nacional fue decisivo para empezar mis estudios de posgrado.

A mi familia en primer grado: mis hermanas Adriana y Lyda, a mi padre Delio, a mi pareja Mayra y al destino que me permite mantenerlos cerca.

A mi tutora, la profesora Carmen María Romero cuya trayectoria dedicada a la investigación y docencia, sostiene aún vigente al grupo de Termodinámica Clásica. Toda una generación de científicos egresados de esta escuela, constituyen su legado.

Al profesor Luis H. Blanco, mi primer tutor. Bastaban breves instantes de tiempo para reconocer al gran ser humano que dejaría para siempre una huella en todos los que tuvimos la fortuna de coincidir con su camino.

Al doctor Juan Sebastián Abella, quién contribuyó con su experiencia y fue fundamental en algunas secciones de este escrito.

Al doctor Alejandro Beltrán, colega y amigo. Su influencia directa en este trabajo será siempre reconocida.

Al Laboratorio de Investigaciones Básicas y a todos los miembros de los grupos de investigación de Química Teórica y de Termodinámica Clásica. Mi larga estancia en el edificio B9 de la unidad Camilo Torres lo convirtieron en mi segundo hogar.

A mis compañeros y amigos: David Oviedo, Ginna Trujillo, Yadhi Cruz, Jaime López y a todos los integrantes que pasaron por el grupo. A los profesores: Julio Clavijo y Miguel Ángel Montero. Sus innumerables aportes académicos y personales constituyen un buen porcentaje de esta investigación.

A la profesora Gloria Inés Giraldo y el grupo de Alimentos Frutales de la Universidad Nacional de Colombia de la sede de Manizales, por compartir sus instalaciones para realizar una parte del trabajo experimental. A la profesora Nohora Vega Castro y el grupo de Investigación en Proteínas de la Universidad Nacional de Colombia, su experiencia, laboratorio y apoyo también hicieron parte del desarrollo de este escrito.

A los compañeros del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia quienes compartían el mismo interés en la ciencia, y en especial a los asistentes al grupo de ajedrez fundado entre otros por el profesor Pinilla, quienes soportaban mi mal juego y con quienes tuvimos buenos momentos de esparcimiento.

Al profesor Jesús Sigifredo Valencia, que brindó amablemente y de manera continua su conocimiento y consejo durante mi pregrado y posgrado. Al profesor Fernando Augusto Gómez, quien me invitó al examen de admisión de la carrera.

A Jairo Cobos comprometido profesional que me brindó su sabiduría en la corrección de estilo y el manejo del formato.

A la Fundación Universidad Agraria de Colombia que me ayudó a crecer profesionalmente como docente durante todos estos años y a todos los compañeros de esta importante institución, dentro de los que me permito nombrar a: Juan Paulo, Orlando, Eduardo, Tomás, Alberto, Johanna, Carlos, Doriana, Giovanna, Martha y Luz Myriam.

A todos aquellos formadores que contribuyen con su destreza, competencias y conocimiento a la Universidad Pública, infinitos agradecimientos por crear un mejor país.

A todas aquellas personas que me rodearon durante este camino y que sería imposible nombrar en dos páginas.

Resumen

Estabilidad de albúmina sérica bovina en solución acuosa en presencia de sales de tetraalquilamonio

Se ha determinado que la estabilidad y, por tanto, la funcionalidad de las proteínas en solución depende de delicados equilibrios, los cuales son fácilmente perturbables por cambios en el entorno proteico. Dicha estabilidad reducida limita su posible uso en diversas aplicaciones, por ejemplo, en la industria farmacéutica y de alimentos.

Los estudios termodinámicos son una herramienta fundamental para caracterizar tanto al proceso de plegamiento como a los cambios generados por factores externos cuantificables. Dentro de este contexto, se analiza en este trabajo una de las proteínas más usadas y conocidas en el ámbito general de la bioquímica, la albúmina sérica bovina (BSA). Se analiza el efecto que tiene sobre el sistema la adición de sales de tetraalquilamonio, teniendo en cuenta y aprovechando que se puede elegir aumentar el tamaño de su región alifática para realizar un estudio sistemático.

Inicialmente se evaluó la estabilidad térmica de la BSA en solución acuosa usando la calorimetría diferencial de barrido y evaluando el efecto de la adición de: bromuro de tetrametilamonio (Me_4NBr), bromuro de hexiltrimetilamonio ($\text{Met}_3\text{HexNBr}$), bromuro de octiltrimetilamonio ($\text{Met}_3\text{OctNBr}$), bromuro de deciltrimetilamonio ($\text{Met}_3\text{DecNBr}$) y bromuro de dodeciltrimetilamonio ($\text{Met}_3\text{DodecNBr}$), determinando que el Me_4NBr actúa como un estabilizador, mientras que las demás sales generan un efecto desestabilizante sobre la proteína, el cual crece con el aumento de la región alifática y la concentración de las sales. Ahora bien, utilizando medidas de tensión superficial se determinaron los regímenes cinéticos del proceso de adsorción de la BSA en la interfase líquido-aire, encontrando que se puede modelar el proceso a través de tres etapas consecutivas de difusión, penetración y reordenamiento. Estas dos últimas se caracterizaron usando constantes cinéticas asociadas al proceso y encontrando que la etapa determinante del proceso corresponde a la de penetración y adsorción en la interfase, caracterizada con la constante cinética k_1 .

Al evaluar el efecto de la adición de las sales se encuentra también que las moléculas con colas hidrofóbicas más largas ejercen un mayor aumento de la constante k_1 , debido a la adsorción competitiva entre la proteína y los tensoactivos sobre la interfase.

Finalmente, a partir de determinaciones densitométricas se calcularon los parámetros de interacción preferencial, los cuales permiten decir que el Me_4NBr es excluido de la vecindad de la superficie proteica debido a una hidratación preferencial, que aumenta la estabilidad de la estructura nativa de la BSA y que concuerda con la tendencia obtenida por las medidas con DSC.

Por su parte el $\text{Met}_3\text{OctNBr}$, $\text{Met}_3\text{DecNBr}$ y $\text{Met}_3\text{DodecNBr}$ muestran una interacción preferencial con la proteína que genera un efecto desestabilizante, siendo más pronunciado este efecto a medida que se aumenta la cadena alifática de la sal, siendo el $\text{Met}_3\text{DodecNBr}$ la sal de tetraalquilamonio más desestabilizante.

Palabras clave: (albúmina sérica bovina, sales de tetraalquilamonio, calorimetría diferencial de barrido, tensión superficial, interacción preferencial).

Abstract

Stability of bovine serum albumin in aqueous solution in the presence of tetraalkylammonium salts

It has been determined that the stability and, therefore, the functionality of proteins in solution depends on delicate equilibrium, which are easily modified by changes in their environment. The reduced stability limits their possible use in various applications, for example, in the pharmaceutical and food industry.

Thermodynamic studies are a fundamental tool to characterize the folding process and its changes due to external quantifiable factors. Within this context, one of the most used and well-known proteins in the general field of biochemistry, bovine serum albumin (BSA), is analyzed in this study. The addition of tetraalkylammonium salts were analyzed considering, and taking advantage of the fact that it is possible to choose to increase the size of their aliphatic region in order to perform a systematic study.

Initially, the thermal stability of BSA in aqueous solution was evaluated using differential scanning calorimetry and assessing the effect of the addition of: tetramethylammonium bromide (Me_4NBr), hexyltrimethylammonium bromide ($\text{Met}_3\text{HexNBr}$), octyltrimethylammonium bromide ($\text{Met}_3\text{OctNBr}$), decyltrimethylammonium bromide ($\text{Met}_3\text{DecNBr}$) and dodecyltrimethylammonium bromide ($\text{Met}_3\text{DodecNBr}$), determining that Me_4NBr acts as a stabilizer, while the other salts generate a destabilizing effect on the protein, which grows with the increase of the aliphatic region and the concentration of the salts.

Now, using surface tension measurements, the kinetic regimes of the adsorption process of BSA at the liquid-air interface were determined, finding that the process can be modeled through three consecutive stages of diffusion, penetration and rearrangement. These last two were characterized using kinetic constants associated to the process and finding that the stage that controls the process corresponds to the penetration and adsorption at the interface, with kinetic constant k_1 . When evaluating the effect of the addition of salts, it is

also found that molecules with longer hydrophobic tails exert a greater increase of the k_1 constant, due to competitive adsorption at the interface between the protein and surfactants.

Finally, from densitometric determinations the preferential interaction parameters were calculated, which allow us to say that Me_4NBr is excluded from the vicinity of the protein surface due to preferential hydration, which increases the stability of the native structure of BSA and is in agreement with the trend obtained by DSC measurements.

On the other hand, $\text{Met}_3\text{OctNBr}$, $\text{Met}_3\text{DecNBr}$ and $\text{Met}_3\text{DodecNBr}$ show a preferential interaction with the protein that generates a destabilizing effect, this effect being more pronounced as the aliphatic chain of the salt increases, with $\text{Met}_3\text{DodecNBr}$ being the most destabilizing tetraalkylammonium salt.

Keywords: (bovine serum albumin, tetraalkylammonium salts, differential scanning calorimetry, surface tension, preferential interaction).

Contenido

	Pág.
Resumen	IXI
Lista de figuras.....	XVII
Lista de tablas	XX
Lista de símbolos y abreviaturas	XXIII
Introducción	23
1. Aspectos teóricos.....	3
1.1 Estructura proteica.....	3
1.1.1 Estructura primaria.....	4
1.1.2 Estructura secundaria	6
1.1.3 Estructura terciaria	12
1.1.4 Estructura cuaternaria.....	14
1.2 Plegamiento de proteínas.....	15
1.3 Estabilidad de proteínas	19
1.3.1 Interacciones que determinan la estabilidad de las proteínas	20
1.3.1.1 Interacciones hidrofóbicas	20
1.3.1.2 Interacciones de van der Waals.....	21
1.3.1.3 Puentes de hidrógeno.....	21
1.3.1.4 Interacciones electrostáticas.....	22
1.3.1.5 Puentes disulfuro	22
1.3.2 Factores que modifican la estabilidad de las proteínas	22
1.3.2.1 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las proteínas	23
1.3.2.2 Efecto del solvente en la estabilidad de proteínas.....	26
1.3.2.3 Efecto del pH sobre la estabilidad de proteínas	28
1.3.3 Aspectos termodinámicos de la estabilidad de proteínas	29
1.3.3.1 Determinación de los parámetros de desnaturalización	30
1.4 Modelos acerca del proceso de estabilización de proteínas	36
1.4.1 Modelo de interacción e hidratación preferencial	36
1.4.1.1 Medida de los parámetros de interacción preferencial	42
1.4.2 Tensión superficial y estabilidad de proteínas.	46
1.5 Albúmina sérica bovina.....	51
1.5.1 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la BSA.....	54
1.5.2 Efecto de los cosolventes sobre la estabilidad de la BSA	55
1.5.3 Efecto del pH sobre la estabilidad de la BSA.....	57
1.6 Sales de tetraalquilamonio	58

1.6.1	Efecto de tensoactivos y sales de amonio en la estabilidad de proteínas	60
2.	Métodos experimentales	63
2.1	Reactivos y equipos	63
2.1.1	Reactivos	63
2.1.1	Equipos	63
2.1.2	Preparación de soluciones	64
2.2	Espectroscopía UV-VIS	65
2.3	Calorimetría diferencial de barrido DSC	66
2.4	Tensión superficial	67
2.5	Parámetros de interacción preferencial	68
2.5.1	Volumen parcial específico	69
2.5.2	Interacción preferencial	70
3.	Resultados y análisis	71
3.1	Estabilidad térmica de la BSA	71
3.1.1	Estudio del plegamiento y reversibilidad del proceso de desnaturalización de la proteína	71
3.1.2	Efecto de las sales de tetraalquilamonio sobre la estabilidad térmica de la BSA	75
3.1.3	Curvas de estabilidad de la BSA	82
3.2	Tensión superficial de las STAA	86
3.2.1	Adsorción de la BSA en la interfase aire-agua	89
3.2.2	Influencia de las sales de tetraalquilamonio en la adsorción de la BSA en la interfase aire-agua	95
3.2.3	Relación de la tensión superficial de las STAA con la estabilidad de la BSA en solución	102
3.3	Parámetros de interacción preferencial	104
4.	Conclusiones y recomendaciones	115
4.1	Conclusiones	115
4.2	Recomendaciones	119
	A. Anexo: Desnaturalización térmica de la BSA en soluciones acuosas de STAA	120
	B. Anexo: Tensión superficial	131
	C. Anexo: Parámetros de interacción	137
	D. Anexo: Incertidumbres	144
	Referencias bibliográficas	147

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Niveles estructurales de las proteínas [14].	4
Figura 2. Cadena peptídica: Ser-Gly-Tyr-Ala-Leu, enlaces peptídicos resaltados en amarillo y grupos laterales en rojo [14].	4
Figura 3. Enlace peptídico: A. Estructuras resonantes B. Estructura plana [14].	5
Figura 4. Representación esquemática de las distancias de enlace y de los ángulos phi y psi que se encuentran presentes en una cadena lineal de residuos de aminoácidos [14].	6
Figura 5. Representación tridimensional y bidimensional de varillas y esferas del α -hélice [14], [16].	7
Figura 6. Representaciones de diferentes tipos de hélices. De izquierda a derecha hélice π y hélice 3_{10} [17].	8
Figura 7. Representación de varillas y esferas de la hoja β . (A) Paralela. (B) Antiparalela [16].	9
Figura 8. A. Diagrama de Ramachandran. B. Parámetros representativos de cada estructura secundaria dentro del diagrama A [17].	9
Figura 9. Representaciones de organizaciones de barriles beta [16].	10
Figura 10. Representación de giros beta y giros alfa [17].	11
Figura 11. Interacciones que estabilizan la estructura terciaria [16].	12
Figura 12. Organización de proteínas basada en motivos. (a) Todas α . (b) Todas β . (c) α/β . (d) $\alpha+\beta$ [14].	13
Figura 13. Estructura cuaternaria de la hemoglobina representada por: A. Modelos de cintas y B. Modelos de espacios lleno. Las subunidades α se muestran en gris y azul celeste, y las subunidades β se muestran en rosado y azul oscuro. Se puede notar que los grupos hemo (rojo), están relativamente separados [14].	15
Figura 14. Hipersuperficie de energía de la RNasa. A. Representando la reducción de entropía conformacional a través de un camino que involucra un intermediario. B. Perfil de la energía libre de reacción de la RNasa donde N corresponde a la conformación nativa, I es un intermediario y U representa a la proteína desnaturalizada [20].	16
Figura 15. Termodinámica del plegamiento de proteínas visualizado como un embudo o paisaje de energía libre [14].	18
Figura 16. Curva de estabilidad térmica para β -lactoglobulina A (β -LG) en buffer 0,1 M de KCl-HCl, pH 2,0 a diferentes concentraciones de urea; se señala la temperatura de desnaturalización T_m . (a) Sin urea; (b) 2.0 M; (c) 4.0 M [38].	24
Figura 17. Cambio de entalpía en función de la temperatura de desnaturalización de β -lactoglobulina A, no modificada (símbolos negros) y glucosilada (símbolos grises). Los datos se	

obtienen usando UV a 293 nm para diferentes concentraciones de desnaturizante (0-3,2 M de urea) [36].....	25
Figura 18. Representación general del comportamiento de la señal espectrofotométrica durante el proceso de desnaturización de una proteína [12]	32
Figura 19. Representación esquemática de la estabilización de proteínas mostrando la zona de exclusión [60].	37
Figura 20. Representación esquemática de interacciones en la disolución de una proteína en un solvente mixto [60].	39
Figura 21. Etapas del proceso de adsorción dinámica de proteínas en la interfase líquido-aire [89].	49
Figura 22. A. Estructura primaria y homología de la BSA y la albúmina sérica humana (HSA) [94]. B. Representación esquemática de la estructura primaria de la BSA, que incluye los puentes disulfuro [91].	52
Figura 23. Modelo de cigarrillo de la BSA, la terminación amino está en la izquierda, la carga neta esta encima de cada dominio de la proteína [5].	53
Figura 24. Estructura terciaria y cuaternaria de la BSA. Los dominios se representan en números romanos (I,II,III) y los subdominios con letras A y B; las hélices alfa con la letra h (PDB id: 3V03) [5].	54
Figura 25. Transiciones conformacionales de la BSA, con respecto al pH [6].	57
Figura 26. Representaciones estructurales de: A. bromuro de tetrametilamonio B. bromuro de hexiltrimetilamonio C. bromuro de deciltrimetilamonio D. bromuro de dodeciltrimetilamonio.....	59
Figura 27. A. Representación esquemática de la desnaturización de la BSA inducida por el SDS. B. Complejo proteína-surfactante siguiendo el modelo “necklace and bead” [121].	61
Figura 28. Perfiles de desnaturización térmica de la BSA durante calentamientos sucesivos.	72
Figura 29. Termogramas de desnaturización de albúmina sérica bovina 3,0 mg/mL en buffer fosfatos 10mM a pH 7,0 y rampa de calentamiento de 1,0 K/min.	73
Figura 30. Perfiles de desnaturización térmica de la BSA.	74
Figura 31. Efecto de la concentración de las STAA sobre la desnaturización térmica de BSA a pH 7,00 mediante medidas de calorimetría diferencial de barrido.....	76
Figura 32. Temperatura media de desnaturización y entalpía calorimétrica para el proceso de desnaturización térmica de la BSA en función de las concentraciones de sales de tetraalquilamonio a pH 7,00	81
Figura 33. Curvas de estabilidad para la BSA en presencia de sales de tetraalquilamonio calculadas a partir de los parámetros termodinámicos obtenidos por DSC	83
Figura 34. Cambio en la estabilidad de la BSA en buffer a pH 7,00 determinado usando calorimetría diferencial de barrido.....	86
Figura 35. Modelamiento del comportamiento experimental de una proteína globular	92
Figura 36. Perfil de adsorción de BSA en agua a 298,15K.....	93
Figura 37. Efecto del bromuro de hexiltrimetilamonio sobre el perfil de adsorción de BSA en solución acuosa a 298,15 K.....	97
Figura 38. Efecto de las sales de tetraalquilamonio sobre el perfil de adsorción de BSA en solución acuosa a 298,15 K.....	98

Figura 39. Cambio en la temperatura de desnaturalización en función de la tensión superficial de soluciones albúmina sérica bovina en presencia de sales de tetraalquilamonio a 298,15 K	103
Figura 40. Diagrama del uso de las ecuaciones para la determinación del parámetro de interacción preferencial.....	104
Figura 41. Volumen específico aparente de las STAA en función de la concentración C (g mL ⁻¹) a 298,15 K	106
Figura 42. Volumen específico aparente de la BSA en soluciones acuosas de Me ₄ NBr (a) molalidad constante (ϕ_2) y (b) potencial químico constante (ϕ_2') a 298,15 K	108
Figura 43. Volumen específico aparente de la BSA en soluciones acuosas de Met ₃ HexNBr (a) molalidad constante (ϕ_2) y (b) potencial químico constante (ϕ_2') a 298,15 K	109
Figura 44. Volumen específico aparente de la BSA en soluciones acuosas de Met ₃ OctNBr (a) molalidad constante (ϕ_2) y (b) potencial químico constante (ϕ_2') a 298,15 K	110
Figura 45. Volumen específico aparente de la BSA en soluciones acuosas de Met ₃ DecNBr (a) molalidad constante (ϕ_2) y (b) potencial químico constante (ϕ_2') a 298,15 K	111
Figura 46. Volumen específico aparente de la BSA en soluciones acuosas de Met ₃ DecNBr (a) molalidad constante (ϕ_2) y (b) potencial químico constante (ϕ_2') a 298,15 K	112
Figura 47. Parámetro de interacción preferencial en función de la concentración de STAA...	114

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Temperaturas de desnaturalización de la BSA a pH neutro determinadas usando DSC	55
Tabla 2. Temperaturas de desnaturalización y entalpía de desnaturalización de la BSA al 2% y 0,1M de NaCl en función del pH, determinadas usando DSC	57
Tabla 3. Parámetros termodinámicos para el proceso de desnaturalización térmica de BSA obtenidos por calorimetría diferencial de barrido y espectroscopía UV-VIS.....	73
Tabla 4. Reportes de los parámetros de desnaturalización térmica de BSA obtenidos por calorimetría diferencial de barrido	75
Tabla 5. Concentraciones micelares críticas de las sales de tetraalquilamonio.....	76
Tabla 6. Temperatura media de desnaturalización y entalpía calorimétrica para el proceso de desnaturalización térmica de la BSA en soluciones acuosas de diferentes concentraciones de sales de tetraalquilamonio a pH 7,00	79
Tabla 7. Diferencia en la energía de Gibbs de estabilización $\Delta\Delta G$ de la BSA en soluciones acuosas de STAA a pH 7,00.	84
Tabla 8. Tensión superficial (γ) de las soluciones acuosas de sales de tetraalquilamonio a 298,15K.	87

Tabla 9. Pendientes límite de tensión superficial de soluciones acuosas de sales de tetraalquilamonio a 298,15K.....	88
Tabla 10. Parámetros de adsorción del modelo cinético de tres pasos para BSA en agua a 298.15K	94
Tabla 11. Parámetros de adsorción del modelo cinético de tres pasos para BSA en solución acuosa de sales de tetraalquilamonio a 298,15 K.....	99
Tabla 12. Temperatura de desnaturalización de la BSA en presencia de las sales de tetraalquilamonio a pH= 7,00 y tensión superficial de la BSA en presencia de las STAA en solución acuosa a 298,15 K	102
Tabla 13. Densidad (ρ) de las soluciones de sales de alquilamonio y volumen específico aparente (v) y en función de la molalidad (m) a 298,15 K.....	105
Tabla 14. Volumen parcial específico a dilución infinitesimal de las diferentes de STAA a 298,15 K.....	106
Tabla 15. Volúmenes parciales específicos a molalidad constante, potencial químico constante y valores de parámetros de interacción e hidratación preferencial de la BSA en soluciones acuosas de Me_4NBr a 298,15 K.....	108
Tabla 16. Volúmenes parciales específicos a molalidad constante, potencial químico constante y valores de parámetros de interacción e hidratación preferencial de la BSA en soluciones acuosas de $\text{Met}_3\text{HexNBr}$ a 298,15 K	109
Tabla 17. Volúmenes parciales específicos a molalidad constante, potencial químico constante y valores de parámetros de interacción e hidratación preferencial de la BSA en soluciones acuosas de $\text{Met}_3\text{OctNBr}$ a 298,15 K.....	110

Tabla 18. Volúmenes parciales específicos a molalidad constante, potencial químico constante y valores de parámetros de interacción e hidratación preferencial de la BSA en soluciones acuosas de Met₃DecNBr a 298,15 K 111

Tabla 19. Volúmenes parciales específicos a molalidad constante, potencial químico constante y valores de parámetros de interacción e hidratación preferencial de la BSA en soluciones acuosas de Met₃DodecNBr a 298,15 K 112

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI
$\Delta G^{\circ}_{N \rightarrow D}$	Cambio en la energía de Gibbs durante el proceso de desnaturalización	kJ
G°_D	Energía de Gibbs en el estado desplegado	kJ
G°_N	Energía de Gibbs en el estado nativo	kJ
R	Constante de los gases ideales	J mol ⁻¹ K ⁻¹
T	Temperatura	K
ΔH	Cambio de entalpía durante el proceso de desnaturalización	kJ
ΔS	Cambio de entropía durante el proceso de desnaturalización	kJ K ⁻¹
K_D	Constante de equilibrio (proceso de desnaturalización)	----
X_N	Fracción proteína nativa	----
X_D	Fracción proteína desnaturalizada	----
Y	Señal observable durante el proceso de desnaturalización	----
Y_N	Señal en el estado nativo	----
Y_D	Señal en el estado desnaturalizado	----
$\Delta H^{\circ}(T_m)$	Cambio de entalpía en la temperatura media de desnaturalización	kJ
$\Delta S^{\circ}(T_m)$	Cambio de entropía en la temperatura media de desnaturalización	kJ K ⁻¹
$\Delta G^{\circ}_D(T_m)$	Cambio de la energía de Gibbs en la temperatura media de desnaturalización	kJ
ΔC_p	Cambio en la capacidad calorífica	kJ mol ⁻¹ K ⁻¹
m	molalidad	mol kg ⁻¹
M	Peso molecular	g mol ⁻¹
D	Difusividad	m ² s ⁻¹
t	Tiempo	s
k	Constante cinética primer orden	s ⁻¹
A	Absorbancia	----
b	Paso óptico	cm
$\Delta\Delta G$	Cambio en la energía de Gibbs de estabilidad	kJ mol ⁻¹

Estabilidad de albúmina sérica bovina en solución acuosa en presencia de sales
de tetraalquilamonio

Símbolo	Término	Unidad SI
ΔG^{sal}	Cambio en la energía de Gibbs por presencia de sales de tetraalquilamonio	kJ mol^{-1}
ΔG^{buffer}	Cambio en la energía de Gibbs por presencia de buffer	kJ mol^{-1}
ΔG_w	Cambio en la energía de Gibbs de la proteína en agua.	kJ mol^{-1}

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI
Γ	Concentración superficial de exceso	mol m^{-2}
π	Presión superficial	$\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$
γ^o	Tensión superficial disolvente referencia	$\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$
γ	Tensión superficial disolución	$\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$
ξ	Parámetro de interacción preferencial	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
ρ_o	Densidad disolvente de referencia	kg m^{-3}
ϕ_2^o	Volumen parcial específico a molalidad constante de sal	$\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$
ϕ_2^{i0}	Volumen parcial específico a potencial químico constante de sal	$\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$
ρ	Densidad solución	kg m^{-3}
\bar{v}_3	Volumen parcial específico de la sal	$\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$
ϕ	Volumen específico aparente	$\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$

Subíndices

Subíndice	Término
D	Desplegada o desnaturalizada
N	Nativa
w	Agua
n	Calentamiento n-ésimo
0	Disolvente de referencia
1	Agua
2	Proteína
3	Sal de tetraalquilamonio

Superíndices

Superíndice	Término
o	Estado estándar
0	Propiedad a dilución infinitesimal
'	Potencial químico constante

Abreviaturas

Abreviatura	Término
BSA	Albúmina sérica bovina
Rev	Reversibilidad
TMAB	Bromuro de tetrametilamonio
Met ₄ NBr	Bromuro de tetrametilamonio
HTAB	Bromuro de hexiltrimetilamonio
Met ₃ HexNBr	Bromuro de hexiltrimetilamonio
OTAB	Bromuro de octiltrimetilamonio
Met ₃ OctNBr	Bromuro de octiltrimetilamonio
DETAB	Bromuro de deciltrimetilamonio
Met ₃ DecNBr	Bromuro de deciltrimetilamonio
DTAB	Bromuro de dodeciltrimetilamonio
Met ₃ DodecNBr	Bromuro de dodeciltrimetilamonio
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
PIP	Parámetro de interacción preferencial

Introducción

Es bien sabido que, a nivel celular, una vez sintetizadas las proteínas en los ribosomas, a partir de estructuras primarias dadas por sus aminoácidos constituyentes, se forman luego estructuras secundarias y se pliegan hasta obtener una conformación estructural tridimensional única. Se denomina a esta conformación final como el estado nativo y este tipo de estado es estable termodinámicamente y proporciona a la proteína sus funciones específicas.

Esta disposición estructural es fruto de un balance entre: las interacciones intermoleculares de la proteína con su entorno y las interacciones intramoleculares entre los grupos funcionales que posee la proteína, siendo esto un proceso cooperativo [1], [2].

Se tiene entonces una estabilidad estructural limitada, donde pequeños cambios sobre la estructura pueden tener graves consecuencias en su funcionalidad [3]. La reducida estabilidad de las proteínas constituye así en una de las mayores limitaciones para el uso de estas biomoléculas, en un gran número de aplicaciones en la industria farmacéutica y de alimentos [4]–[6].

Debido a su particularidad e importancia, el proceso por el cual una proteína se pliega para adquirir su funcionalidad ha sido objeto de estudio a través de los años; desde los estudios iniciales realizados por Anfinsen, donde plantea que: “Toda la información necesaria para el correcto plegamiento de una proteína se encuentra codificada en su secuencia de aminoácidos” [7], pasando por la paradoja con relación al tiempo de plegamiento planteada por Levinthal y llegando hasta los

paisajes energéticos con forma de embudo [8]. Ahora bien, aunque no existe aún un mecanismo específico, el uso de simulaciones de las fuerzas implicadas en el proceso y la información detallada de la estructura proteica, a través de técnicas como la cristalografía y la resonancia magnética nuclear, permiten modelar algoritmos que simulan con algún éxito el proceso de plegamiento [9].

Para algunos investigadores la estabilización por efecto de cosolventes ocurre por interacción directa entre ellos y la proteína, mientras que para otros el proceso es consecuencia del efecto que ellos producen sobre la estructura del agua o del solvente [10].

El análisis termodinámico que permite determinar el proceso de plegamiento a diferentes condiciones fisicoquímicas que alteran la estructura y funcionalidad de la proteína, ha ocupado el interés de numerosos investigadores y continúa hoy siendo objeto de debate e investigación [11], [12].

Con el fin de aportar datos novedosos a la discusión antes planteada, se propone como objetivo central de esta investigación realizar un estudio termodinámico de la estabilidad de la albúmina sérica bovina, analizando la influencia que ejercen algunas sales de tetraalquilamonio en la conformación nativa de la proteína, a través de técnicas como la calorimetría diferencial de barrido, la espectroscopía en UV-Vis, la tensiometría de volumen de gota y la densimetría que permiten determinar los parámetros termodinámicos y característicos del sistema de estudio.

El trabajo desarrollado durante la tesis se encuentra en el marco de las investigaciones realizadas por el Grupo de Termodinámica Clásica de la Universidad Nacional de Colombia, liderado por la Doctora Carmen María Romero Isaza, quien tiene como una de sus líneas de investigación el estudio del comportamiento termodinámico de proteínas en presencia de diferentes tipos de compuestos que modifican su entorno.

1. Aspectos teóricos

1.1 Estructura proteica

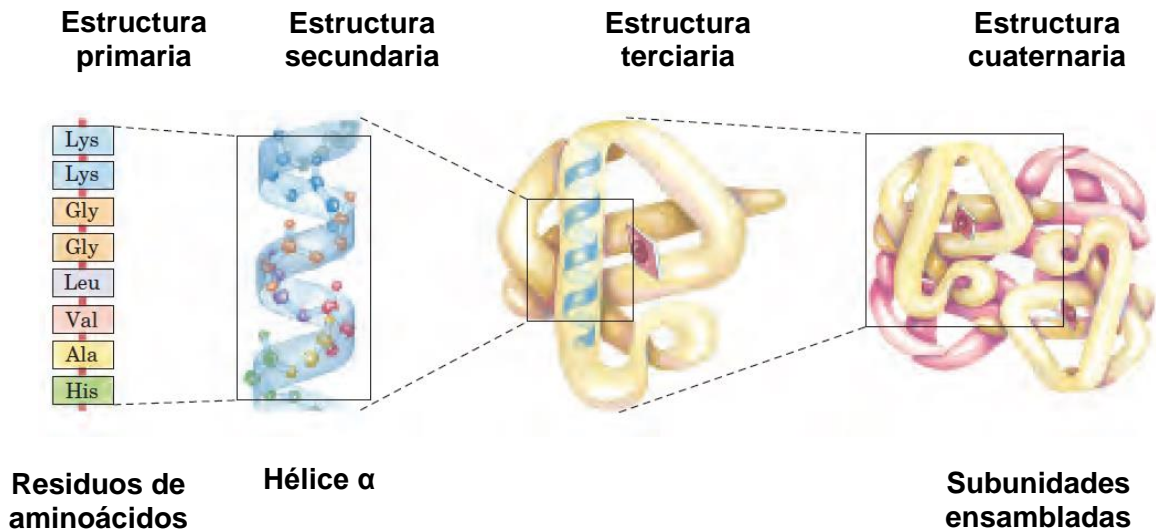
Dentro del conjunto de macromoléculas que constituyen a los organismos con vida, las proteínas juegan un papel fundamental, tanto para organismos simples como los virus y bacterias como para los altamente complejos, los mamíferos. Las proteínas suelen tener una gran abundancia, para una célula común pueden representar más del 50% de su peso y, más importante aún, son piezas fundamentales para el desarrollo de sus múltiples funciones.

Desde un punto de vista químico, las proteínas son polímeros formados por aminoácidos, unidos a través de enlaces peptídicos. Se observa que una vez sintetizadas en los ribosomas, las interacciones de sus diferentes moléculas con el medio que las rodea generan un plegamiento único, otorgando un estado funcional o nativo por el cual adquieren sus funciones específicas. Esta conformación nativa es determinada por la secuencia de aminoácidos, los cuales constituyen la proteína, que a su vez es codificada genéticamente [13], [14].

Dentro de las funciones de las proteínas es primordial señalar: proporcionar soporte estructural a las células, catalizar reacciones celulares, transportar sustancias a través de membranas, regular la función celular, intervenir en procesos de reconocimiento molecular como la interacción hormona-receptor o antígeno-anticuerpo, entre otras.

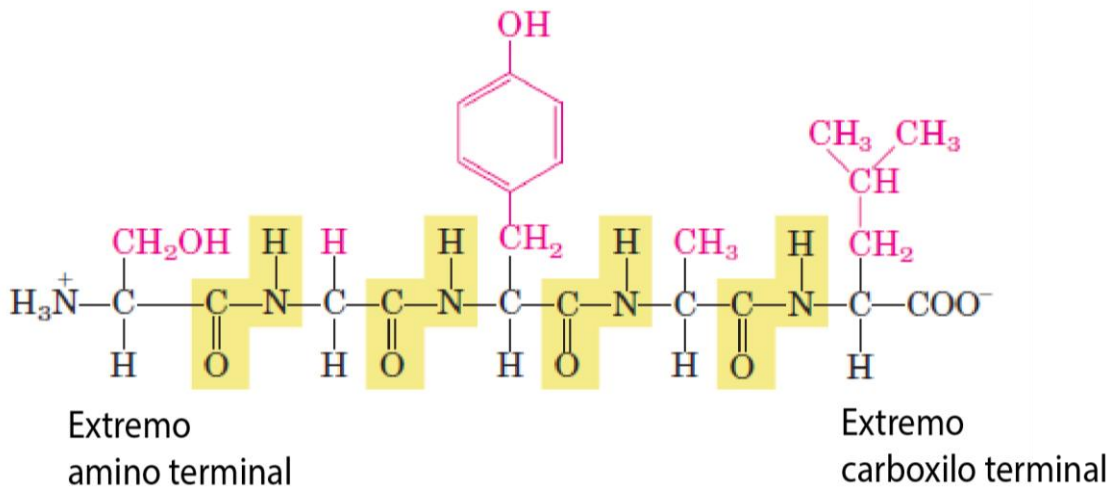
Además, los organismos han podido generar una gran variedad de productos proteicos como: enzimas, hormonas, anticuerpos, fibras musculares, plumas, telarañas, antibióticos, así como variedad de utilidades, con funciones especiales y características diferenciables [15].

Es posible clasificar la estructura de las proteínas en cuatro niveles diferentes de organización estructural, como se representa de modo sintético en la figura 1.

Figura 1. Niveles estructurales de las proteínas [14].

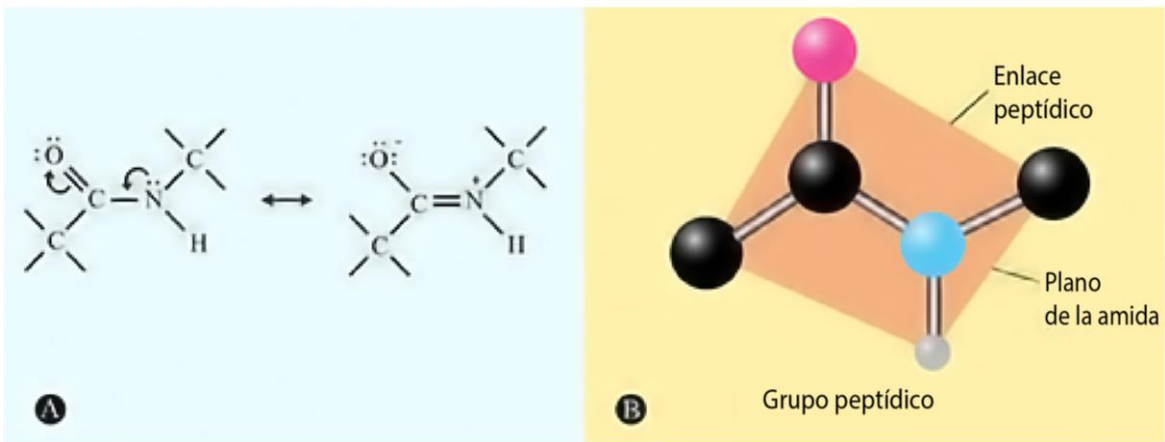
1.1.1 Estructura primaria

Está constituida por una secuencia lineal de L- α -aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Como se observa en la figura 2, se forma una cadena principal o esqueleto que se repite regularmente del cual se desprenden cadenas laterales simbolizadas en rojo, que son diferentes en cada aminoácido.

Figura 2. Cadena peptídica: Ser-Gly-Tyr-Ala-Leu, enlaces peptídicos resaltados en amarillo y grupos laterales en rojo [14].

La secuencia de aminoácidos se lee a partir del aminoácido N-terminal hacia el aminoácido C-terminal. Esta secuencia está determinada por todos los enlaces covalentes, incluyendo los puentes disulfuro formados entre los residuos de cisteína. Estudios de difracción de rayos X, realizados inicialmente a pequeños péptidos por Linus y Corey, plantearon la existencia de resonancia entre el grupo carbonilo y el átomo de nitrógeno de la unión peptídica como se observa en la figura 3, otorgándole a la unión peptídica una forma plana determinante en las estructuras más complejas de la proteína.

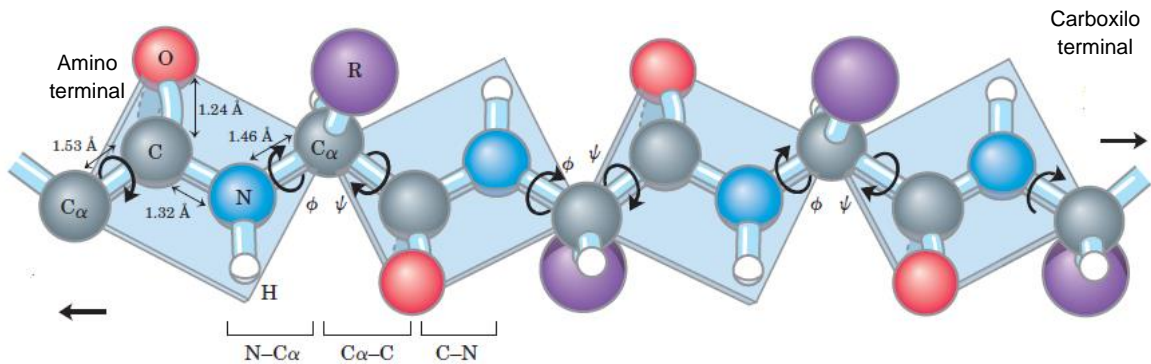
Figura 3. Enlace peptídico: A. Estructuras resonantes B. Estructura plana [14].



Debido a la resonancia, el enlace C-N no puede rotar libremente sobre su eje. Por el contrario, los enlaces de carbono alfa ($C\alpha$)-C y N- $C\alpha$ (ver figura 4), rotan sin mayores limitaciones, restringidos en su movimiento, únicamente por efectos estéricos.

El ángulo que se forma por la rotación del enlace $N-C\alpha$ se denomina ángulo phi (φ) y el que se forma por el movimiento rotacional del enlace $C\alpha$ -C se designa como ángulo psi (ψ). Los valores de phi y psi, que suelen llamarse ángulos de Ramachandran en honor al científico G.N. Ramachandran, pueden tomar valores de -180° a 180° . Entonces se podría ver el esqueleto de aminoácidos de la cadena peptídica como una "baraja de naipes" (ver figura 4), unidos por sus esquinas diagonalmente opuestas, donde cada carta representa el grupo peptídico plano [14].

Figura 4. Representación esquemática de las distancias de enlace y de los ángulos phi y psi que se encuentran presentes en una cadena lineal de residuos de aminoácidos [14].



Debido al gran número de conformaciones en la forma desplegada, se favorece el efecto entrópico que se opone al plegamiento y debe ser compensado por interacciones que favorezcan la forma plegada. La rigidez de la unidad peptídica y los límites de los ángulos de enlace ϕ y ψ , limitan el número de estructuras desplegadas posibles.

La estructura primaria determina las estructuras siguientes, y por ende la funcionalidad y forma de la proteína.

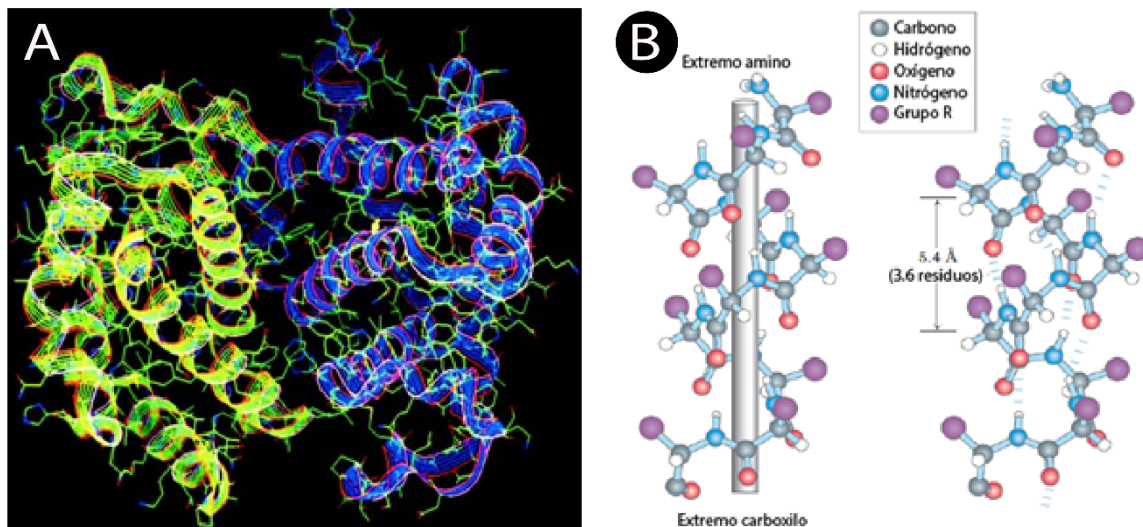
1.1.2 Estructura secundaria

Se refiere a una estructura obtenida por el plegamiento espacial de la estructura primaria pero determinada localmente. Así que cada cierto intervalo de la cadena existe una estructura secundaria local, que está conformada básicamente por: hélices, hojas plegadas, giros y bucles. La estructuración se debe a puentes de hidrógeno intramoleculares formados por los grupos amida. Las hélices α , las hebras β y los giros se deben a una disposición regular de los puentes de hidrógeno entre los grupos amino N-H y carbonilo C=O de aminoácidos que están próximos el uno al otro en la secuencia lineal.

- **Hélices:** A partir de observaciones de rayos X de la queratina, Pauling y Corey proponen la hélice alfa como una estructura probable, la cual tiene forma de cilindro. Posee un esqueleto helicoidal muy firmemente plegado en el interior del

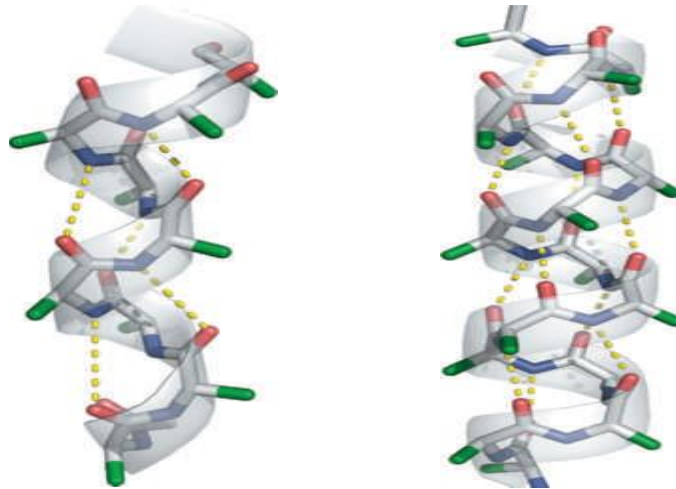
cilindro y cadenas laterales que salen de la forma helicoidal. Los puentes de hidrógeno se forman entre el oxígeno del grupo carbonilo de un aminoácido y el nitrógeno del grupo amida del aminoácido situado cuatro residuos más adelante en la cadena principal (*ver figura 5*); los puentes se repiten en cada enlace peptídico, generando una gran estabilidad de la estructura. La estructura adquiere un carácter hidrofóbico ya que las regiones hidrofílicas del esqueleto peptídico están formando los puentes. La hélice es la conformación de menor energía y se forma naturalmente en las proteínas, también se sabe que las hélices dextrógiras son más favorables energéticamente porque hay menos choques estéricos entre las cadenas laterales y el esqueleto.

Figura 5. Representación tridimensional y bidimensional de varillas y esferas del α -hélice [14], [16].



Como se observa en la figura 5B se tienen 3,6 residuos de aminoácidos por vuelta y la distancia entre puntos similares después de la vuelta es de 5,4 Å. También se encuentran otro tipo de hélices no tan comunes, similares a la alfa hélice, pero su diferencia radica en el número de residuos por vuelta y átomos por cada puente de hidrógeno como se observa en la figura 6.

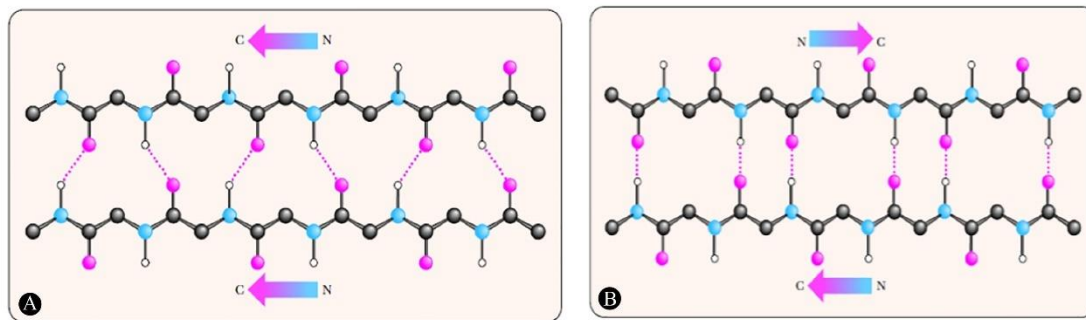
Figura 6. Representaciones de diferentes tipos de hélices. De izquierda a derecha hélice π y hélice 3_{10} [17].



La hélice 3_{10} y hélice π giran de manera dextrógira. En la 3_{10} cada aminoácido corresponde a un giro de 120° en la hélice y una traslación de $2,0 \text{ \AA}$ a lo largo del eje de la hélice, mientras que en la hélice π el giro es de 87° y la traslación es de $1,15 \text{ \AA}$. El grupo amino N-H de un residuo forma un puente de hidrógeno con el grupo carbonilo C=O del aminoácido que se encuentra cinco residuos antes en la hélice π y tres residuos antes en la hélice 3_{10} . La ubicación de los puentes de hidrógeno determina el tipo de estructura formada

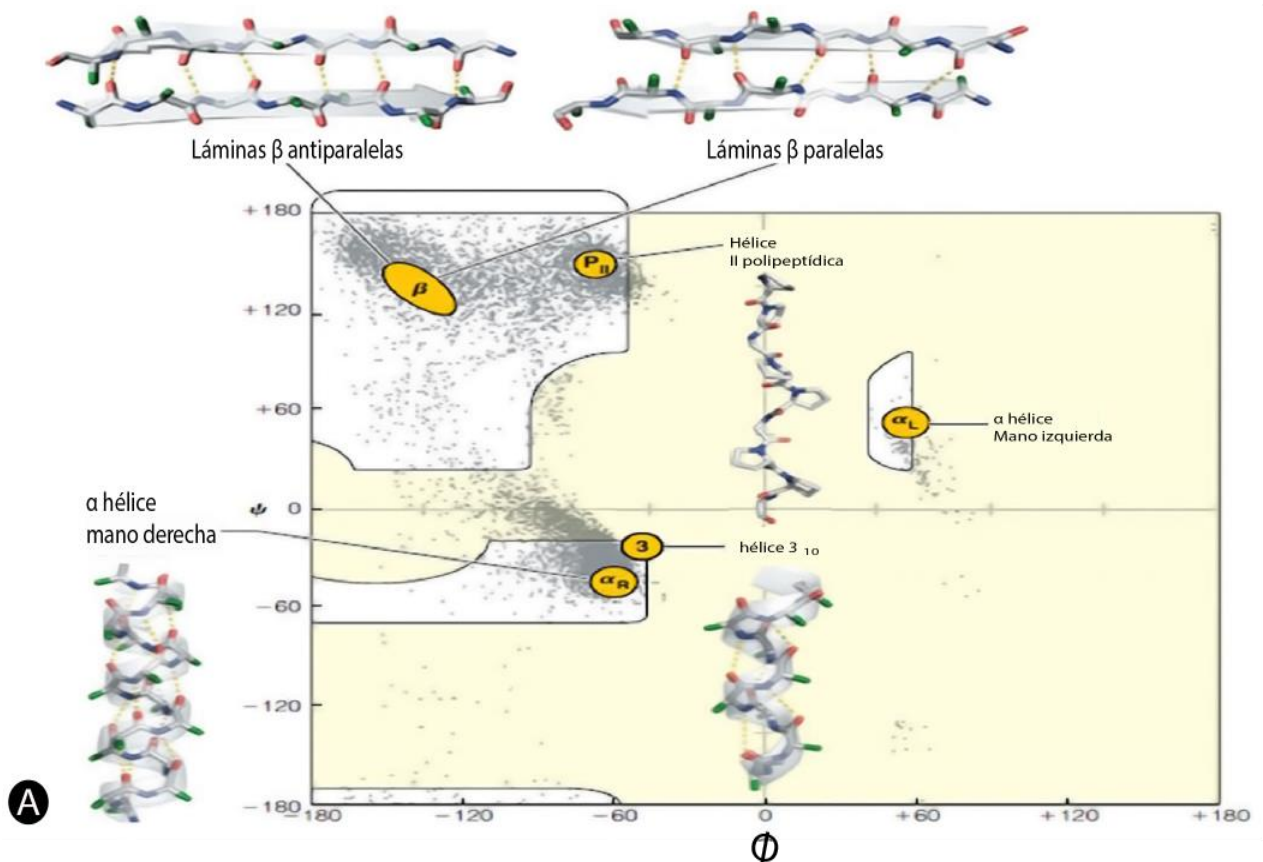
- **Hojas plegadas:** La hoja plegada β está formada por dos o más cadenas polipeptídicas llamadas hebras β , unidas por puentes de hidrógeno, las cuales están casi completamente extendidas en vez de estar enrolladas y empaquetadas como la hélice α . Se forman por el posicionamiento paralelo de dos cadenas de aminoácidos dentro de la misma proteína, en la que los grupos N-H de una de las cadenas forman puentes de hidrógeno con los grupos C=O de la opuesta. Los grupos R de esta estructura están colocados por encima y por debajo del plano de las láminas. Para no producir ningún efecto adverso sobre la estructura de la lámina, los grupos R no suelen ser muy grandes, ni tampoco generar un impedimento estérico importante. Las cadenas adyacentes de una hoja β pueden dirigirse en sentidos opuestos (antiparalela) o en el mismo sentido (paralela) como se muestra en la figura 7.

Figura 7. Representación de varillas y esferas de la hoja β . (A) Paralela. (B) Antiparalela [16].



Debido a que las hojas β y hélices α son estructuras secundarias que mantienen una distancia y ángulo definido con respecto a los enlaces propuestos en la figura 4, se pueden agrupar las conformaciones de los diferentes polipéptidos de acuerdo con estos ángulos de torsión, en el diagrama de Ramachandran.

Figura 8. A. Diagrama de Ramachandran. B. Parámetros representativos de cada estructura secundaria dentro del diagrama A [17].

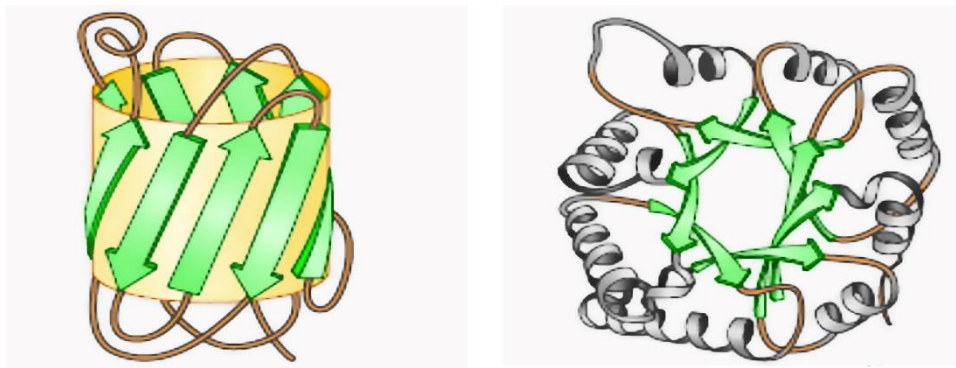


Tipo de Estructura	ϕ	ψ
Láminas β	-150° to -100°	$+120^\circ$ to $+160^\circ$
α hélice	-70° to -60°	-50° to -40°
Hélice 3_{10}	-70° to -60°	-30° to -10°
Hélice II polipeptídica	-80° to -60°	$+130^\circ$ to $+160^\circ$

En el diagrama de la figura 8 podemos ver que las configuraciones secundarias antes expuestas adoptan su forma a valores específicos de los parámetros ϕ y ψ , las zonas blancas son regiones no permitidas porque los ángulos llevarían a los átomos a superar el radio de van der Waals. Las zonas grises claras son regiones permitidas y que no presentan impedimento estérico donde se adoptarían estructuras estables y las zonas más oscuras también son permitidas, pero tienen impedimento estérico siendo accesibles solo para algunos aminoácidos.

Las hojas beta tienen una tendencia a girar en la dirección de la mano derecha. Esto conduce a la formación de hojas retorcidas o sillas de montar, así como barriles beta que se muestran en la figura 9.

Figura 9. Representaciones de organizaciones de barriles beta [16].

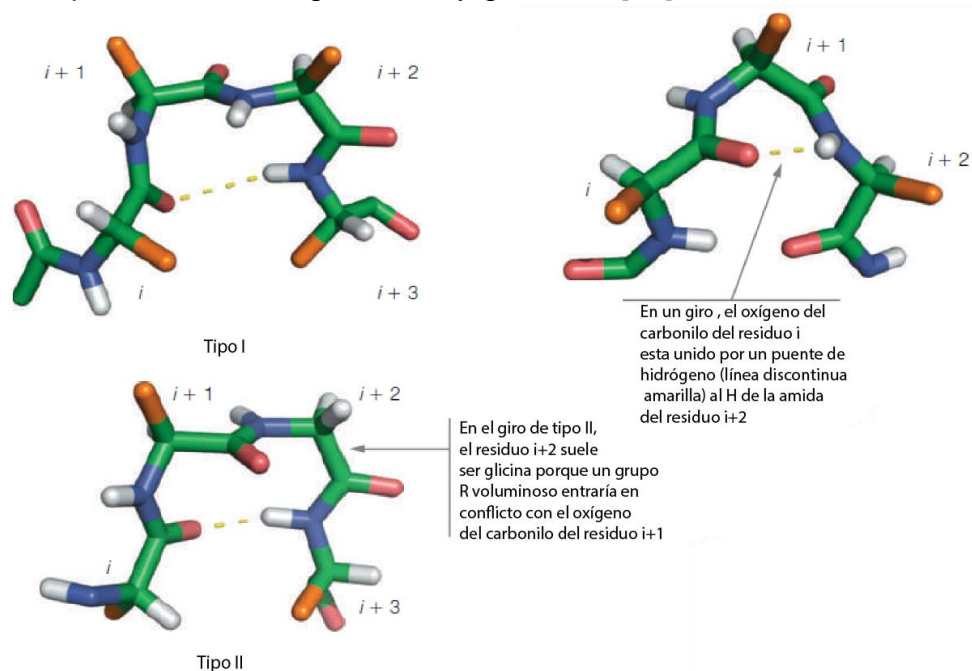


Giros y bucles. Es frecuente encontrar glicina y prolina en los giros, los cuales básicamente constan de 3 o 4 residuos que se unen por un puente de hidrógeno dando una forma de U; los bucles son un poco más largos y menos definidos.

Los giros inversos son regiones del polipéptido con un puente de hidrógeno entre el grupo carbonilo CO (i) y el grupo amino NH ($i+3$) (se excluyen las hélices 3_{10}). Hay dos tipos principales (*I* y *II*) (ver figura 10), que se diferencian en los ángulos phi y psi de los residuos $i+1$ e $i+2$. Los giros que conectan hebras de una lámina beta antiparalela tienen ángulos distintos y se denominan giros beta de tipo *I'* y *II'*. Los bucles son las regiones de la proteína sin un valor repetido de los ángulos phi y psi contienen un número variable de aminoácidos. Estas conformaciones son enrolladas al azar (random coil) por ello no tienen ángulos característicos como las anteriores.

Las cadenas polipeptídicas pueden cambiar de dirección por medio de giros inversos y bucles, se encuentran en la superficie de las proteínas, razón por la que participan en interacciones entre las proteínas y otras moléculas además de mejorar la solvatación. Es posible que una porción considerable de proteína exista en esta conformación.

Figura 10. Representación de giros beta y giros alfa [17].

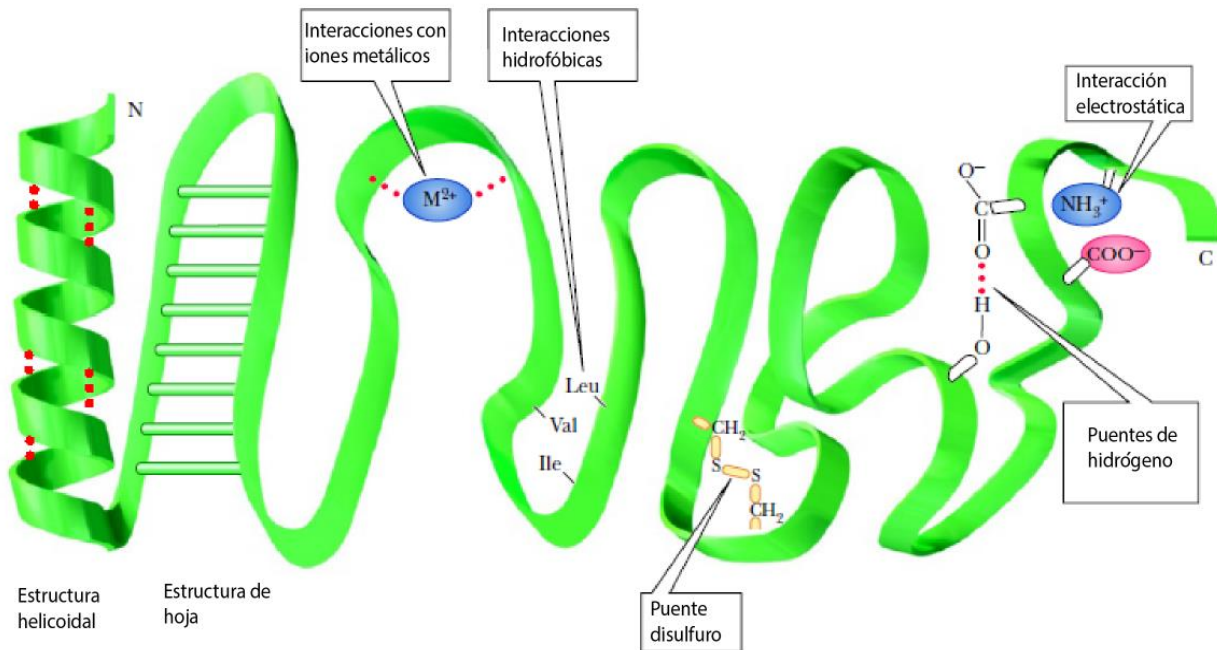


1.1.3 Estructura terciaria

La conformación espacial (tridimensional) de todos los aminoácidos en una cadena polipeptídica en un dominio único se denomina estructura terciaria. Esta estructura es más compleja que la secundaria porque incluye más interacciones que compactan a las diferentes formas de la secundaria, pero es menos compleja que la cuaternaria ya que la cadena polipeptídica forma un sólo dominio. Esta estructura es la responsable directa de las propiedades biológicas de las proteínas.

Entre los tipos de interacciones que estabilizan la estructura terciaria son: atracciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, interacción de cadenas apolares, fuerzas de van der Waals y puentes disulfuro como está representado en la figura 11.

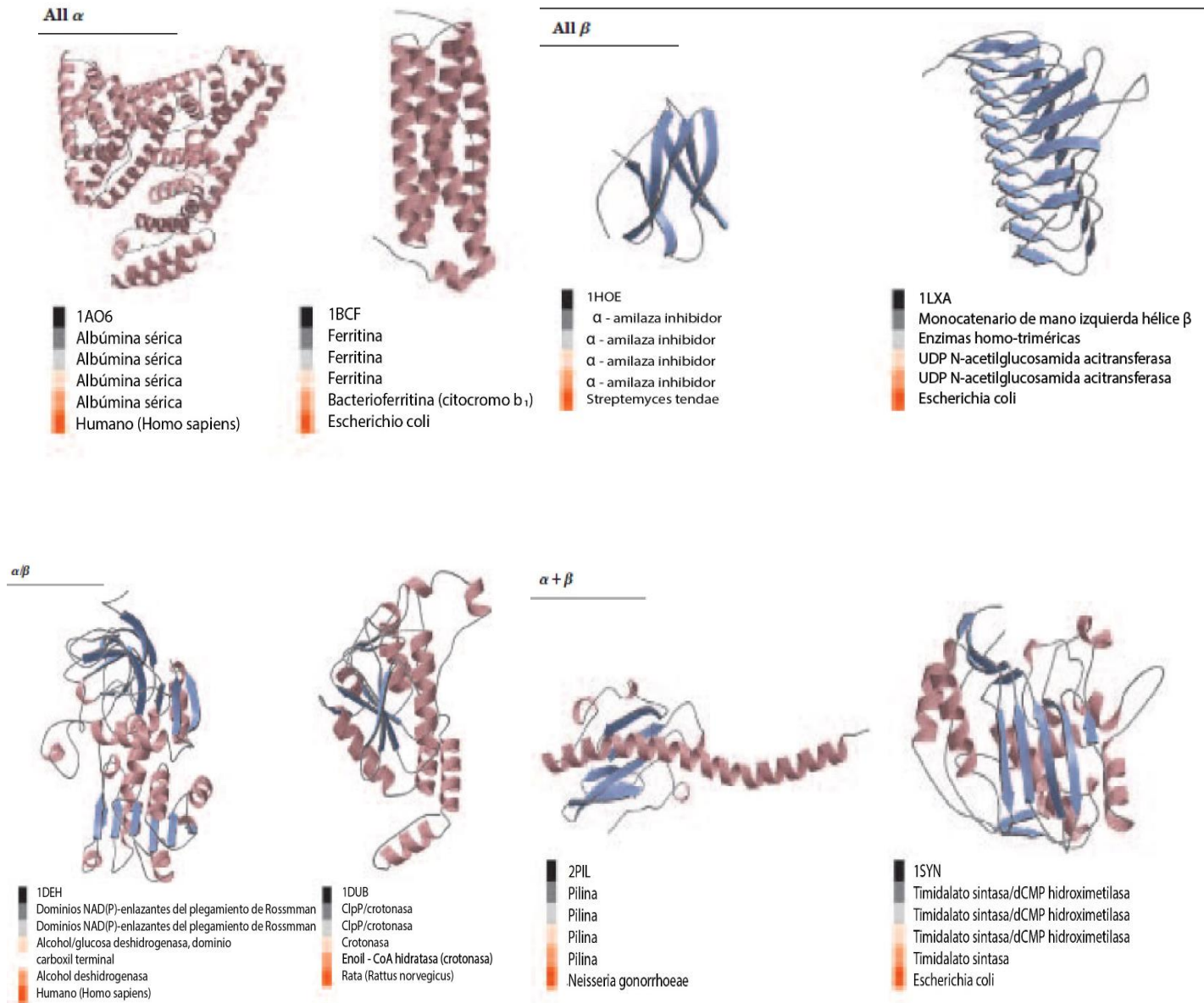
Figura 11. Interacciones que estabilizan la estructura terciaria [14].



Levitt [16] encuentra patrones estructurales en las estructuras terciarias de algunas proteínas globulares, por lo que genera una clasificación de cuatro grupos, a saber: proteínas α , cuyo armazón está formado exclusivamente por hélices α ; proteínas β , constituidas por hebras β en orientación preferentemente antiparalela; proteínas

α/β , formadas por la alternancia regular de hélices α y hebras β a lo largo de la secuencia; y proteínas $\alpha+\beta$, caracterizadas por la alternancia de ambos tipos de estructura secundaria de forma no secuencial.

Figura 12. Organización de proteínas basada en motivos. (a) Todas α . (b) Todas β . (c) α/β . (d) $\alpha+\beta$ [14]



También se podrían clasificar las proteínas como fibrosas, que presentan cadenas polipeptídicas dispuestas en largas hebras u hojas y las proteínas globulares, con las cadenas polipeptídicas plegadas en formas globulares o esféricas.

Las estructuras de proteínas globulares tienen cadenas laterales con carácter apolar que se orientan hacia el interior de la molécula, formando un núcleo compacto con carácter hidrofóbico. Las cadenas de los aminoácidos polares se localizan en la superficie de la molécula, lo que permite la interacción con el agua a través de puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas.

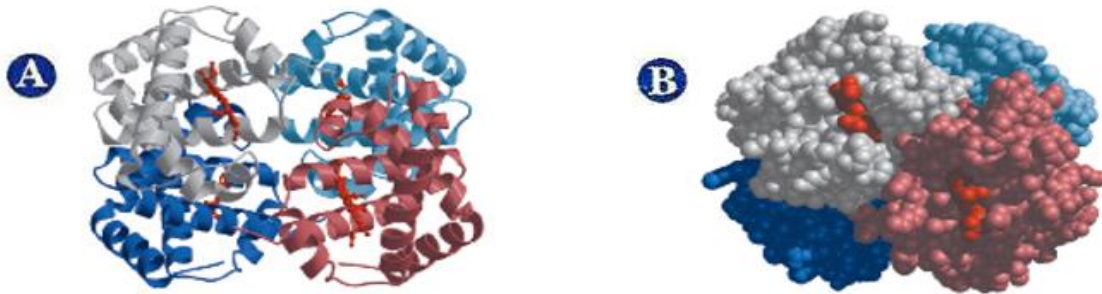
El plegamiento proteico está dirigido entonces por la fuerte tendencia de los residuos hidrofóbicos a ser excluidos del agua, de tal manera que la cadena polipeptídica se orienta para que sus partes hidrofóbicas laterales estén en el interior y los grupos polares o cargados estén en la superficie [17].

1.1.4 Estructura cuaternaria

Es la forma en la que se asocian las distintas subunidades constituyentes de una proteína, si es que existen. Es decir, para poder hablar de estructura cuaternaria es necesario que la proteína esté formada por varias subunidades. Las proteínas con este grado de organización estructural se denominan oligoméricas y las cadenas polipeptídicas individuales que la integran se denominan: monómeros, protómeros o subunidades. Los enlaces que mantienen esta estructura son del mismo tipo que mantienen la estructura terciaria excepto por los enlaces covalentes. La estructura cuaternaria está íntimamente ligada a las propiedades reguladoras proteicas, particularmente en los sistemas llamados alostéricos.

Como ejemplo de una proteína con esta estructura tenemos la hemoglobina, a la cual se le determinó la estructura tridimensional (figura 13). Las subunidades de hemoglobina están dispuestas en pares simétricos y cada par tiene una subunidad α y una subunidad β . Por consiguiente, la hemoglobina puede ser descrita o como un tetrámero o como un dímero de $\alpha\beta$ protómeros. Esta proteína contiene cuatro cadenas de polipéptido y cuatro grupos prostéticos hemo, los cuales son átomos de hierro en estado ferroso (Fe^{2+}). La porción de proteína llamada globina consiste en dos cadenas (con 141 residuos cada una) y dos cadenas (146 residuos cada una). Las denominaciones α y β no se refieren a estructuras secundarias.

Figura 13. Estructura cuaternaria de la hemoglobina representada por: A. Modelos de cintas y B. Modelos de espacios llenos. Las subunidades α se muestran en gris y azul celeste, y las subunidades β se muestran en rosado y azul oscuro. Se puede notar que los grupos hemo (rojo), están relativamente separados [14].



1.2 Plegamiento de proteínas

El proceso por el cual una proteína se pliega para adquirir su funcionalidad ha sido objeto de estudio a través de los años debido a su particularidad e importancia. Inicialmente Anfinsen estudió la Ribonucleasa pancreática bovina A, logrando que se replegara luego de ser desnaturalizada, recobrando su actividad enzimática. Sus investigaciones sobre plegamiento le valieron un premio Nobel en 1972 y a partir de estas propone un planteamiento conocido como la hipótesis de Anfinsen que dice: “Toda la información necesaria para el correcto plegamiento de una proteína se encuentra codificada en su secuencia de aminoácidos”[7]. La estructura nativa de una proteína corresponde a la conformación que sea termodinámicamente más estable, es decir aquella que tenga el mínimo de energía libre de Gibbs. Por consiguiente, el postulado de Anfinsen sirvió como pilar en el estudio del control termodinámico del plegamiento proteico.

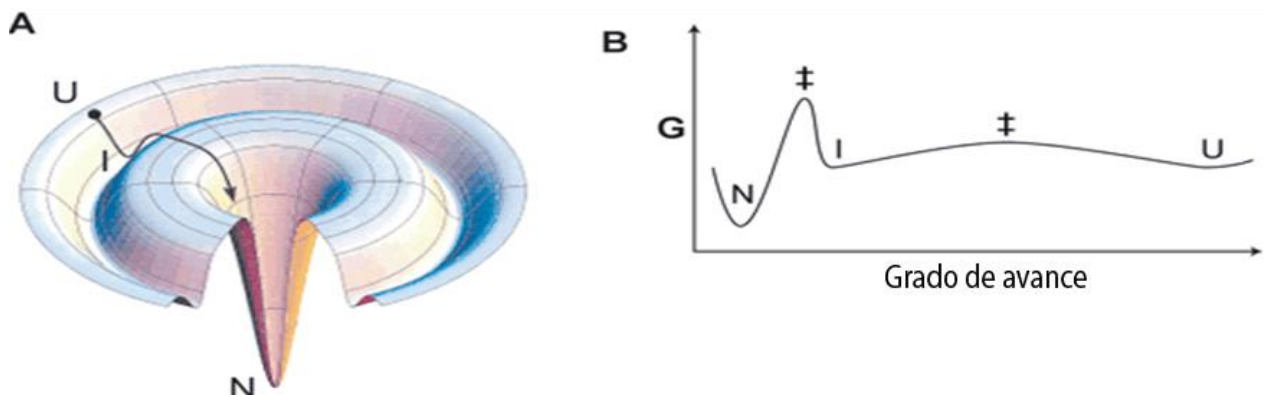
Levinthal [18] observó que para una proteína integrada por N aminoácidos, en la que cada uno de estos puede adquirir un número v de configuraciones espaciales, el número C de posibles configuraciones totales estaría dado por $C = v^N$, lo cual genera un gran número de conformaciones posibles. Siguiendo esta línea, una proteína necesitaría un tiempo superior a la edad del universo para explorar todas y cada una de estas conformaciones.

Teniendo en cuenta que las proteínas alcanzan su estructura plegada en tiempos que van desde los milisegundos hasta algunas decenas de segundos, Levinthal planteó que el proceso de plegamiento debería estar orientado por las condiciones fisicoquímicas dadas durante la biosíntesis para tener direcciones preferenciales que limiten la búsqueda aleatoria dentro de todo el espacio de posibles conformaciones. Esto se logra por la formación rápida de interacciones locales de grupos de aminoácidos que alcanzan cierta estabilidad y sirven como puntos de nucleación del proceso, generando rutas específicas [8].

Otra hipótesis que se plantea para explicar tanto la velocidad de plegamiento, como las altas velocidades de reacción de enzimas se basa en el efecto de túnel. Así la proteína puede adoptar una estructura definida, debido a la necesidad de ubicar sus centros de oxidación y reducción a distancias favorables para que se dé el efecto túnel (esencialmente de electrones y protones) [19].

Por mucho tiempo se pensó que la transición entre la proteína plegada y desplegada se trataba de un proceso que involucra el equilibrio entre dos estados, concernientes a la especie nativa o plegada y la especie desnaturalizada o desplegada. Los estudios cinéticos hechos en aras de explicar la paradoja de Levinthal evidenciaron la presencia de intermediarios estables de plegamiento; los intermediarios de plegamiento proteico corresponden a mínimos locales de la energía libre de Gibbs que guían la reacción a través de un control cinético, tal y como se puede ver en la figura 14.

Figura 14. Hipersuperficie de energía de la RNasa. A. Representando la reducción de entropía conformacional a través de un camino que involucra un intermediario. B. Perfil de la energía libre de reacción de la RNasa donde N corresponde a la conformación nativa, I es un intermediario y U representa a la proteína desnaturalizada [20]



A partir de observaciones experimentales se han postulado diversos modelos de plegamiento dentro de los cuales tenemos los modelos denominados clásicos [21], que tienen dos grandes grupos:

a) Los modelos que tienen en cuenta una estructura inicial como base del proceso, dentro de los cuales tenemos: 1) el modelo de nucleación-propagación en el que se consolidan núcleos estructurales, sobre los cuales crece la estructura; 2) el modelo de tipo armazón “*framework*” donde posterior a la nucleación, se conforman las estructuras secundarias, que posteriormente se asocian para formar estructuras supra secundarias que suscitan los dominios y consecuentemente al monómero activo; 3) el modelo de difusión-colisión, en el que la nucleación acaece sincrónicamente en distintas partes de la cadena polipeptídica, ocasionando microestructuras y el plegamiento se da a través de varios pasos de difusión-colisión.

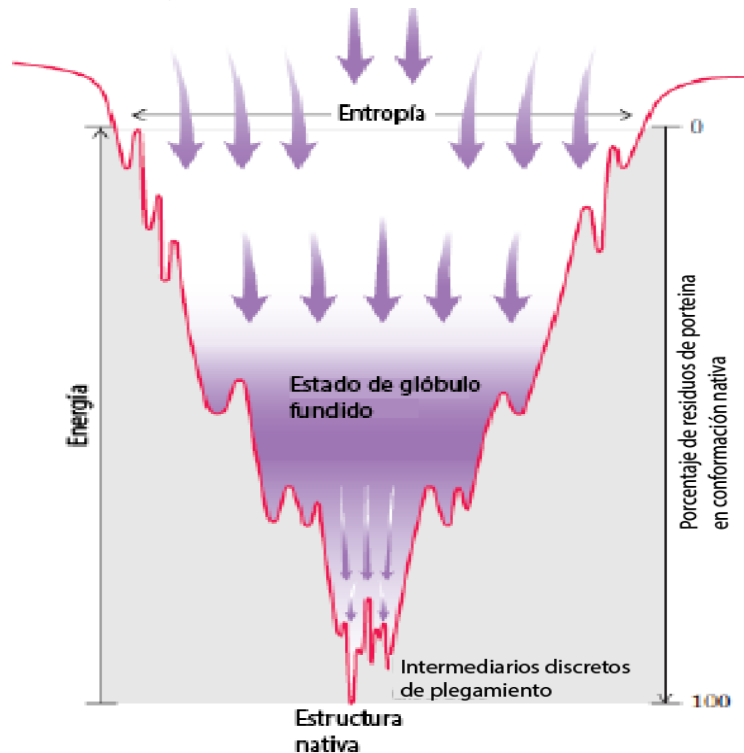
b) El modelo fundamentado en el colapso hidrofóbico, en el que el primer evento del plegamiento estriba en el colapso del polipéptido provocado por la interacción de residuos hidrofóbicos, para luego generar la estructura secundaria de los intermediarios que van hacia el estado nativo.

Biológicamente se desarrollaron las proteínas denominadas como chaperonas, que ayudan al correcto plegamiento e impiden fenómenos como el de agregación, capturando las conformaciones no plegadas y degradando los priones que no se plegaron correctamente [17].

Una visión más contemporánea nos plantea los embudos de energía libre y paisajes de plegamiento. Dobson et al.[2], realizaron estudios teóricos en los que revelaron que, de todas las posibles conformaciones dadas al azar, solo unas pocas hallan su estado nativo sencillamente. Lo cual implica a su vez que, gran parte de estas conformaciones azarosas nunca lo hallan, en virtud del significativo salto energético que deben dar para sobrepasar la barrera existente entre el mínimo local que ellas presentan y el mínimo energético global del estado nativo.

En el esquema de la figura 15, observamos que el estado no plegado se caracteriza por tener un alto grado de entropía conformacional y así como una considerable energía libre; una vez que el proceso de plegado avanza el embudo comienza a estrecharse, lo que indica la disminución del número de especies conformacionales y por ende de su entropía. Pequeñas depresiones laterales a lo largo del embudo de energía libre se convierten en intermediarios metaestables que hacen el proceso de plegado más lento. En el fondo del embudo se encuentra la conformación más estable, las estructuras o estructura nativa con mínima energía libre y menor entropía.

Figura 15. Termodinámica del plegamiento de proteínas visualizado como un embudo o paisaje de energía libre [14].



En diferentes proteínas se han detectado estados intermedios del plegamiento de proteínas parcialmente desdoblados, que presentan una estructura compacta con una cantidad importante de estructuras secundarias, pero que muestran una estructura terciaria perturbada parcialmente desordenada. Estos estados intermedios se han denominado glóbulo fundido. En la β -lactoglobulina, por ejemplo, se puede observar un estado de glóbulo fundido que corresponde a una

conformación con un contenido alto de estructura secundaria que actúa como intermedio estable a la formación del estado plegado [22].

1.3 Estabilidad de proteínas

Como se mencionó antes, cada proteína tiene un estado nativo, el cual se define como: el momento en que la estructura de la proteína en solución acuosa hace que esta sea funcional y biológicamente activa, convirtiendo a las estructuras nativas en únicas, altamente específicas y perfectamente definidas para cada proteína. El desdoblamiento parcial o total de la estructura nativa, por ruptura de los enlaces intramoleculares que la estabilizan, es el proceso que se denomina desnaturalización. Los cambios son conformacionales y pueden llevar a la agregación de la proteína.

Las fuerzas que vuelven estable la conformación de las proteínas incluyen: puentes disulfuro, interacciones electrostáticas, puente de hidrógeno, interacciones tipo van der Waals e interacciones hidrofóbicas (*ver figura 11*). Pero adicionalmente se presentan contribuciones como el entrecruzamiento (cross-linking), la complejación con metales y la unión de iones y cofactores. La estructura del agua es protagonista en la estabilidad de las proteínas y cualquier alteración afecta su estabilidad; cualquiera que sea el factor que altere la estructura de la red de enlaces de hidrógeno del agua debe inducir modificaciones en la estabilidad de las proteínas [23], [24].

Se ha probado tras años de investigación que la estabilidad de una proteína es el resultado de un delicado balance en las interacciones entre los grupos funcionales de la macromolécula y las interacciones con el medio en el que se encuentra disuelta [2]. Es de gran importancia entonces estudiar las fuerzas que la estabilizan la proteína y los factores que las modifican.

1.3.1 Interacciones que determinan la estabilidad de las proteínas

La estabilidad conformacional de una proteína se define cuantitativamente a partir de la diferencia de energía libre entre sus conformaciones nativa y desnaturalizada [25]. Se pueden encontrar valores de 40-90 kJ mol⁻¹ que conciernen a la energía de algunos puentes de hidrógeno. La mínima disparidad de energía libre de Gibbs entre los estados desnaturalizado y nativo de las proteínas es consecuencia de la compensación entre la contribución entrópica y la contribución entálpica las cuales, al tener signos opuestos prácticamente se cancelan.

Las interacciones responsables de que las proteínas se plieguen y adopten una conformación nativa individualmente son débiles, pero son capaces de estabilizar la conformación nativa porque actúan de forma simultánea, por intermedio de un proceso cooperativo [26]. De este modo, la ruptura de una o más de estas interacciones desestabiliza las otras, incrementa la energía libre y la proteína puede perder su conformación nativa.

1.3.1.1 Interacciones hidrofóbicas

Cuando un grupo apolar entra en contacto con el agua se origina una interacción desfavorable mediante un proceso denominado hidratación hidrofóbica. En este existe un reordenamiento o fortalecimiento de la estructura del agua vecina debido a la conformación de puentes de hidrógeno, lo que da paso a una estructura tetraédrica. Para minimizar la interacción grupo apolar-agua, los grupos no polares tienden a interactuar entre sí, dando lugar al proceso conocido como interacción hidrofóbica [26].

Como se observa en el modelo de colapso hidrofóbico, las interacciones hidrofóbicas son las principales contribuciones a la estabilidad de las proteínas [27]. Siendo Kauzmann el primero en establecer esta teoría, seguido por Tanford [28] en 1962 y reafirmada por Dill [29] en 1990.

Las proteínas globulares tienden a plegarse ubicando los residuos hidrofóbicos dentro de la proteína, con el objeto de minimizar las interacciones con el agua, dejando que los grupos hidrofílicos queden expuestos y formen puentes de hidrógeno [26], [28].

Las interacciones hidrofóbicas se caracterizan porque el termino entrópico domina al termino entálpico es decir en una mezcla $|T\Delta S| > |\Delta H|$ [27].

1.3.1.2 Interacciones de van der Waals

Refieren a una fuerza transitoria débil, bien sea de atracción o repulsión, dada entre moléculas o átomos, ocasionada por una nube de electrones que produce un dipolo eléctrico temporal. La distancia apropiada para las interacciones de van der Waals se basa en el tamaño de cada nube de electrones, nombrándose el radio de van der Waals a la distancia en que ocurre la interacción. Participan tanto en la formación de la estructura secundaria y terciaria, siendo importantes por la cantidad de este tipo de fuerzas presentes.

Se presentan interacciones atractivas de tipo van der Waals debido a las fuerzas de dispersión de London. Este tipo de interacciones son más importantes cuando la proteína se encuentra compactada en el estado nativo, puesto que los dipolos serán más cercanos, lo cual habla de una fuerza de tipo estabilizante.

1.3.1.3 Puentes de hidrógeno

Como se mencionó previamente, los puentes de hidrógeno son fundamentales para la formación de las estructuras secundaria y terciaria, dando una contribución tanto entálpica como entrópica a su estabilidad. Los datos experimentales muestran que el enlace de hidrógeno estabiliza la proteína en aproximadamente $35,02 \text{ kJ mol}^{-1}$ [30]. En gran medida la estabilidad de la conformación nativa es resultado de fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno entre residuos polares, pues 11 de los 20 aminoácidos esenciales cuentan con cadenas laterales con grupos donores o aceptores [31], [32].

1.3.1.4 Interacciones electrostáticas

Las proteínas gozan de diversidad de grupos ionizables que producen fuerzas repulsivas y atractivas que coadyuvan a estabilizar la estructura de estas [33]. La energía de interacción entre dos residuos viene dada por la ley de Coulomb y es dependiente de la constante dieléctrica del medio que los separa. De acuerdo con esto, la contribución de las interacciones electrostáticas a la estabilidad de las proteínas depende del pH y la fuerza iónica. Mientras el pH determina la carga total sobre la proteína, las sales fijan el grado de interacción entre estas cargas, ya que las apantallan. En la medida en que el pH se aleja del punto isoeléctrico, la carga neta se incrementa aumentando las cargas de repulsión lo que genera una desestabilización de la estructura de la proteína nativa [29].

1.3.1.5 Puentes disulfuro

La formación de puentes entre residuos de cisteína (puentes disulfuro), restringe la cantidad de estructuras proteicas posibles contribuyendo a su estabilización. En este sentido, moléculas con 5 a 7 puentes disulfuro por cada centenar de aminoácidos son demasiado estables y se vuelven resistentes a condiciones que provocarían una desnaturalización irreversible en la mayor parte de las proteínas [1], [29].

1.3.2 Factores que modifican la estabilidad de las proteínas

Muchos factores fisicoquímicos contribuyen a la desnaturalización de las proteínas, por ejemplo: la temperatura, la presión, los procesos mecánicos y en general la presencia de cualquier compuesto que altere su entorno (ácidos, bases, metales, urea, hidrocloreuro de guanidina (GuHCl), alcoholes etc.). La correspondiente pérdida de la estructura provoca una variación en las funciones biológicas regulares de las proteínas.

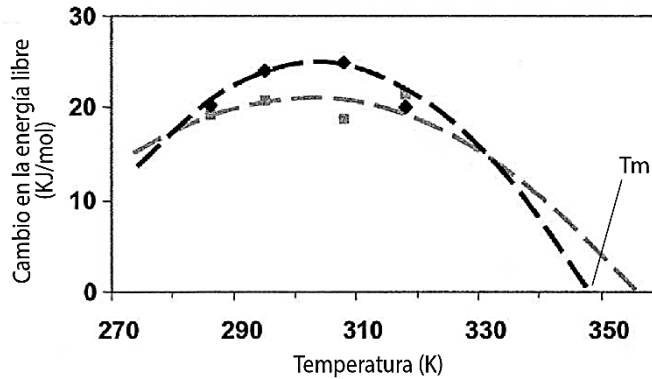
El proceso de modificación estructural puede ser reversible si en su transcurso la estructura química no cambia radicalmente y al contrarrestar las condiciones desnaturizantes, la proteína puede replegarse nuevamente. El desdoblamiento de las proteínas en solución se analiza haciendo seguimiento al comportamiento de una propiedad determinada de la solución de proteína susceptible de modificaciones en su estructura. El seguimiento de la desnaturización térmica, por lo general, se realiza midiendo una propiedad espectroscópica, como la fluorescencia o absorbancia o bien haciendo uso de técnicas calorimétricas que posibilitan la obtención directa tanto de la entalpía como de la temperatura media de desnaturización. También se manifiesta por variaciones en las propiedades de las soluciones como: viscosidad, volumen específico y tensión superficial [32].

1.3.2.1 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las proteínas

Las proteínas han sido diseñadas evolutivamente para cumplir funciones específicas en ambientes determinados y a las temperaturas fisiológicas, conforme al organismo al que pertenezcan. Poseen entonces una estructura nativa en estas condiciones y tienen limitados intervalos de funcionamiento alrededor de los cuales van perdiendo su funcionalidad. El estudio de la pérdida de estabilidad proteica con el cambio de temperatura se hace además importante para determinar su uso en diferentes aplicaciones tecnológicas [34], [35].

La temperatura es un factor desnaturizante que puede considerarse como crítico en la estabilidad. Es posible determinar una temperatura de máxima estabilidad en la que la energía libre es más alta y que suele estar alrededor de las condiciones fisiológicas. Si los demás factores desnaturizantes se conservan constantes y la única alteración se debe a la temperatura, la energía libre de Gibbs disminuye luego de haber alcanzado su máximo (*ver figura 16*).

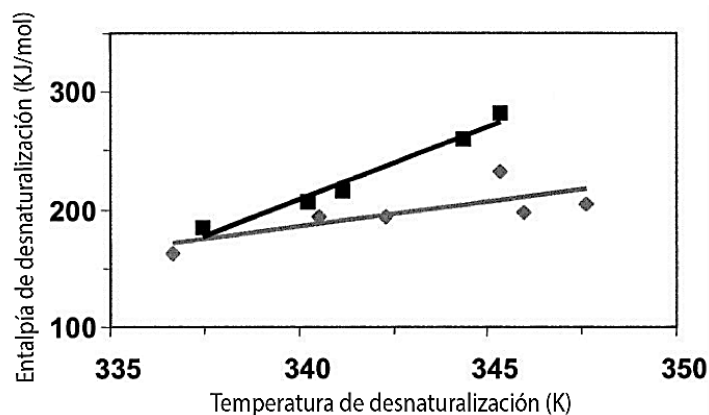
Figura 16. Curva de estabilidad térmica para β -lactoglobulina A (β -LG) en buffer 0,1 M de KCl-HCl, pH 2,0 a diferentes concentraciones de urea; se señala la temperatura de desnaturalización T_m . (a) Sin urea; (b) 2.0 M; (c) 4.0 M [38]



Durante la desnaturalización inducida por temperatura, una proteína cambia de una estructura organizada o nativa (N) a una de tipo desdoblada o desplegada (D), en la cual los grupos apolares de los aminoácidos que se ubicaban en el interior de la proteína, entran en contacto con el agua ocasionando la formación de "icebergs" dada la hidratación de estos grupos apolares. Dichas estructuras se caracterizan por una baja entalpía y entropía debido a la buena alineación de los enlaces hidrógeno, los cambios están asociados con una elevación de la capacidad calorífica, ya que la fusión de estas estructuras requiere energía.

En consecuencia, la modificación en la capacidad calorífica para la transición (ΔC_p) es $\Delta C_p = C_{pD} - C_{pN}$, es generalmente positiva, en acuerdo con la evidencia experimental [36]. La diferencia de entalpía ΔH , entre los estados nativo y desnaturalizado, aumenta frente al incremento de la temperatura de conformidad con la ecuación de Kirchhoff a presión constante (ver figura 17).

Figura 17. Cambio de entalpía en función de la temperatura de desnaturalización de β -lactoglobulina A, no modificada (símbolos negros) y glucosilada (símbolos grises). Los datos se obtienen usando UV a 293 nm para diferentes concentraciones de desnaturalizante (0-3,2 M de urea) [36].



Al mismo tiempo la diferencia en entropía ΔS , se incrementa también con la temperatura, puesto que las estructuras ordenadas del solvente se “funden”.

A una temperatura específica en la que $T=T_m$ donde T_m es la temperatura de desnaturalización térmica, el término entálpico (ΔH) y el entrópico ($T\Delta S$) tienden a cancelarse, y consecuentemente la variación de energía libre de Gibbs ΔG tiende a cero. También ocurre cuando se presenta una T_c que corresponde a la temperatura de desnaturalización en frío, la cual se observa en algunos sistemas como el que se presenta en la figura 16. A esta temperatura la transición de desnaturalización tiene lugar pues el estado desdoblado se hace energéticamente más favorable [12].

Durante la desnaturalización en frío al disminuir la temperatura el término entálpico disminuye, así que eventualmente el término se hace negativo y puede compensar el término entrópico ($T\Delta S$), que en este caso es positivo debido a la disminución de entropía.

Al perder la estructura compacta, el interior no polar de la proteína se expone al solvente. En consecuencia, las moléculas de agua se estructuran de tal manera que solvatan a estos grupos, por lo que la mayor C_p en la proteína desnaturalizada refleja la energía extra que se requiere para romper la estructura del agua alrededor de los grupos no polares [37].

1.3.2.2 Efecto del solvente en la estabilidad de proteínas

La conformación estable de la proteína depende tanto de los aminoácidos que la constituyen como del solvente que la rodea y todas sus interacciones. El agua es el medio natural en el que se encuentra la proteína en su estado nativo, por ello, el efecto de los cosolventes en la estructura del agua y, por ende, sobre la hidratación de la macromolécula, tiene una incidencia directa en la estabilidad de la proteína. Este efecto se revela en variaciones en la energía libre de la proteína solvatada. Tanford [38] estudió el efecto de desnaturizantes como urea, etanol y guanidina en la estabilidad de varias proteínas encontrando que cada desnaturizante produce estados desdoblados característicos.

Cuando los cosolventes no modifican la funcionalidad de la proteína son llamados cosolventes compatibles y se denominan incompatibles los que inducen la desnaturización. Dentro de los cosolventes compatibles que se encuentran en ambientes naturales hay varias clases: polioles como sorbitol y glicerol; azúcares como glucosa, aminoácidos y sus derivados (glicina, taurina, ácido glutámico), algunas sales inorgánicas (NaCl, MgCl₂, MgSO₄); y combinaciones de metilaminas con urea (betaina, sarcosina, glicerolfosforil colina) [10], [39].

Los reactivos tradicionalmente utilizados para desnaturizar proteínas son la urea, alcoholes monohidroxilados de cadena alquilo pequeña y el cloruro de guanidinio. Sin embargo, los surfactantes aniónicos llegan a ser 1000 veces más eficientes que estos, siendo los agentes desnaturizantes más potentes generalmente conocidos [40]. Los surfactantes iónicos actúan sobre las proteínas generando un gran efecto desnaturizante que va aumentando a medida que nos acercamos a su concentración micelar crítica (CMC), pero que puede ser significativo incluso a concentraciones bajas.

El influjo de la fuerza iónica y del pH sobre la estabilidad de la proteína es importante al determinar la carga neta y el rango de interacciones electrostáticas.

Teniendo en cuenta que la energía de las interacciones es función de la permitividad del medio, el efecto de cualquier variable que la modifique produce cambios en las fuerzas fisicoquímicas que forman la estructura de la proteína y por lo tanto en el mecanismo de desdoblamiento [23]. Las sales de amonio suelen tener poco efecto en la fuerza iónica del medio lo cual es acentuado además si se propone el uso de bajas concentraciones [41].

Los mecanismos de interacción proteína-cosolvente continúan aún en discusión. Se han propuesto algunos mecanismos como la interacción de contacto directo de la proteína con las moléculas de cosolvente (interacción preferencial) y el efecto indirecto a través de la perturbación de la capa de hidratación. También es posible la combinación de los dos anteriores donde se da un rompimiento de la estructura del agua en la capa de hidratación, liberando las moléculas de agua y permitiendo luego una interacción directa entre las moléculas del cosolvente y la proteína.

Un enfoque general de la evolución del estudio de la desnaturalización por solvente, ha sido presentado por Schellman [10], quien hace un resumen de la desnaturalización inducida por solvente durante 50 años en los cuales él ha trabajado en el tema, enfocándolo hacia el desarrollo de los modelos de la termodinámica molecular para interpretar el desdoblamiento y estabilización de la estructura de las proteínas. El autor muestra los diferentes modelos que se han desarrollado con posterioridad a los estudios de Kauzmann [26], estos incluyen la teoría de sitios de enlace. Luego este modelo fue presentado en una forma más general y se aplicó a los diferentes ligandos que interactuaban con la proteína, sin restricción de los sitios independientes. Después se desarrolló el modelo de la linealidad, donde se hacía una extrapolación a concentración cero de desnaturalizante para determinar la energía estándar de desnaturalización hasta llegar a las últimas aproximaciones que incluyen la teoría del volumen excluido, la divergencia en: la exclusión estérica, el aumento de la tensión superficial del solvente, la interacción preferencial entre los estados nativo y desnaturalizado de la proteína, entre otras.

1.3.2.3 Efecto del pH sobre la estabilidad de proteínas

Podemos considerar a las proteínas como polielectrolitos en los que su estabilidad es muy sensible al pH, esto debido por ejemplo a que la carga de los aminoácidos constituyentes cambia con la proporción de iones hidrónio en el medio, modificando así las interacciones electrostáticas. La actividad enzimática se puede ver seriamente afectada por el cambio en la carga de alguna de las cadenas laterales de la proteína [42], por ejemplo, los grupos carboxilo (COOH) del ácido aspártico y ácido glutámico y los grupos amino (NH₂) de la lisina y arginina.

Tanto la estabilidad como la actividad de las proteínas son fuertemente influidas por el pH del medio que las rodea, siendo todos los procesos biológicos dependientes además del pH. Talley [43] demuestra cómo el pH óptimo para alcanzar una máxima actividad corresponde al pH de máxima estabilidad y plantea que debe ser así para que las proteínas soporten pequeñas fluctuaciones de pH.

El efecto que el pH ejerce sobre las proteínas es de gran interés pues las contribuciones electrostáticas a la estabilidad de estas macromoléculas son de gran importancia. Si se cambia lo suficiente el pH la proteína se puede desdoblarse, agregar e incluso llegar a hidrolizar los enlaces peptídicos, ocasionando irreversibilidad en los cambios estructurales. La variación en la estabilidad de la proteína como resultado de un cambio de pH fue estudiado inicialmente por Tanford [44] que propuso que es gobernado según la ecuación:

$$\frac{\delta \Delta G_D}{\delta pH} = 2,303 RT (q_D - q_N) \quad (1)$$

Donde ΔG_D es la energía libre de desplegamiento, q_D y q_N son las cargas netas medias de la proteína en sus estados desplegado y nativo respectivamente, R corresponde a la constante universal de los gases y T es la temperatura.

A valores de pH alejados del punto isoeléctrico ocurre el desdoblamiento, mientras que no hay contribución electrostática a la estabilidad de la proteína en las cercanías del punto isoeléctrico [45].

No es posible modelar aun completamente el medio y su efecto en la estabilidad, pero se encuentran estudios interesantes al respecto para proteínas globulares que predicen muy bien los resultados experimentales [46], [47].

1.3.3 Aspectos termodinámicos de la estabilidad de proteínas

Durante la desnaturalización de proteínas globulares pequeñas se puede tener un proceso cooperativo de dos estados y si ocurre reversiblemente, puede ser representado por el equilibrio:



Donde el estado nativo (N) está en equilibrio con el estado desnaturalizado (D). Bajo estas condiciones las concentraciones de las especies presentes están determinadas por el proceso termodinámico [48].

La estabilidad conformacional de la proteína se representa entonces por la diferencia entre la energía libre de Gibbs del estado nativo (G_N) y del estado desnaturalizado o desdoblado (G_D), como se observa en la ecuación 3.

$$\Delta G_{N \rightarrow D} = G_D - G_N = -RT \ln K_D \quad (3)$$

Donde K_D es la constante de equilibrio de la transición. T es la temperatura absoluta y R es la constante universal de los gases.

Usando la ecuación del cambio de energía de Gibbs a temperatura constante es posible determinar las relaciones energéticas involucradas en el desdoblamiento de las proteínas, así:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

Donde ΔG , ΔH y ΔS corresponden a las variaciones de energía libre de Gibbs, entalpía y entropía del proceso de desnaturalización.

Los cambios en las propiedades termodinámicas debidos a las interacciones que están involucradas en el proceso son:

- a. Variación de la entalpía (ΔH) debido al quiebre de interacciones internas de van der Waals, enlaces hidrógeno e interacciones electrostáticas. Sumado a la entalpía de hidratación de grupos polares y apolares antes inmersos en la estructura nativa.
- b. Variación de la entropía (ΔS): debido a transformaciones en la entropía conformacional, ahunado a la entropía de hidratación de grupos polares y apolares antes inmersos en la estructura nativa [49].

Se pueden encontrar valores en el cambio de energía de Gibbs de 40-90 kJ mol⁻¹ [48], lo que concierne a la energía de algunos puentes de hidrógeno. La pequeña diferencia es consecuencia de la compensación entre la contribución entrópica y la contribución entálpica, las cuales al tener signos opuestos prácticamente se cancelan.

1.3.3.1 Determinación de los parámetros de desnaturalización

El seguimiento del proceso de desnaturalización de las proteínas se realiza generalmente a través de la medición de una propiedad física Y , tal como: fluorescencia, absorbancia UV, dicroísmo circular, parámetros de RMN, calorimetría, etc. Las cuales cambian por efecto de variables como la temperatura, presión, pH o la concentración del cosolvente.

Para el caso de una transición reversible entre dos estados, el proceso de desnaturalización térmica puede representarse como un equilibrio entre el estado nativo y el estado desdoblado [11].

La constante aparente de equilibrio se expresa como:

$$K_{D(T)} = \frac{X_N}{X_D} = \frac{Y - Y_N}{Y_D - Y} \quad (5)$$

En donde X_D , X_N representan la fracción de la proteína en estado desplegado y en estado nativo, correspondientemente, Y refiere a la propiedad experimental u observada a una temperatura T ; Y_D , Y_N aluden al valor de la propiedad de los estados desnaturalizado y nativo, respectivamente.

La variación de la propiedad que se observa durante la transición se da por:

$$Y = Y_N X_N + Y_D X_D \quad (6)$$

Donde Y_N y Y_D refieren al valor de la propiedad en el estado nativo y desplegado correspondientemente.

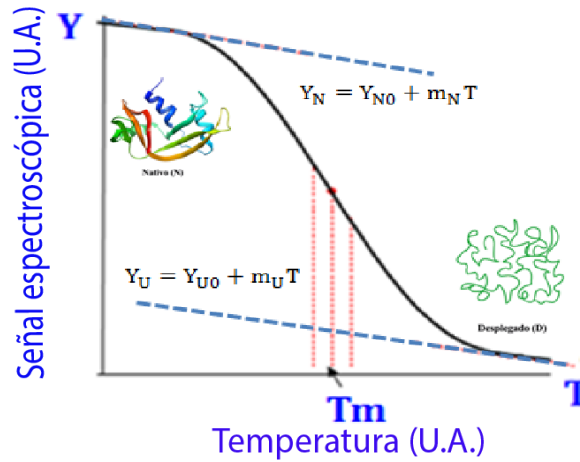
Cuando la propiedad física seleccionada es una propiedad espectroscópica, los valores de las señales correspondientes a los estados nativo y desnaturalizado (Y_N y Y_D) suelen depender de la temperatura [12]. Para su determinación a partir de las curvas de desnaturalización, usualmente se piensa que tienen un comportamiento lineal en función de la temperatura en las regiones previas y posteriores a la transición:

$$Y_N = Y_{N0} + m_{N0} T \quad (7)$$

$$Y_D = Y_{D0} + m_{D0} T \quad (8)$$

Donde, Y_{N0} y Y_{D0} representan los valores de la propiedad espectroscópica a temperatura de 273,15 K para la proteína nativa y desnaturalizada, respectivamente, m_{N0} y m_{D0} son las pendientes de las líneas de ajuste de la propiedad espectroscópica para la proteína nativa y desnaturalizada. El comportamiento general se evidencia en la figura 18.

Figura 18. Representación general del comportamiento de la señal espectrofotométrica durante el proceso de desnaturalización de una proteína [12]



Se define la temperatura media de desnaturalización T_m , como: la temperatura en la que las concentraciones de la proteína nativa y la proteína desnaturalizada son iguales y la energía libre de Gibbs, ΔG^0 es cero:

$$\Delta G^0(T_m) = \Delta H^0(T_m) - T\Delta S^0(T_m) = -RT\ln(K_D) = 0 \quad (9)$$

Si se identifica la constante de equilibrio del proceso de desnaturalización y su variación con la temperatura, se puede determinar la entalpía del proceso de desnaturalización ΔH^0 , por medio de la ecuación de van't Hoff [12]:

$$\frac{\delta(\ln K)}{\delta\left(\frac{1}{T}\right)} = -\frac{\Delta H^0}{R} \quad (10)$$

Se pueden ajustar los datos de la curva de van't Hoff a una ecuación de primer orden, así:

$$\ln K = -\frac{\Delta H^0}{RT} + Z \quad (11)$$

Donde z es un término proveniente de la integración y la pendiente corresponde a $(-\Delta H/R)$. Cuando se ha alcanzado el 50% de desnaturalización, $T = T_m$ (temperatura de desnaturalización), $\ln K = 0$, por lo tanto $\Delta H = \Delta H_m$ y entonces la ecuación 11 se convierte en:

$$T_m = \frac{\Delta H_m}{RZ} \quad (12)$$

Por lo tanto, se puede determinar también el cambio de entropía correspondiente, usando la ecuación 9:

$$\Delta S^0(T_m) = \frac{\Delta H^0(T_m)}{T_m} \quad (13)$$

Para determinar los parámetros termodinámicos con esta metodología se asume que ΔH no varía en un amplio rango de temperatura.

A una temperatura diferente a T_m , la variación de energía libre se representa por la relación [50]:

$$\Delta G(T) = -RT \ln(Kd) = -RT \ln\left(\frac{[D]}{[N]}\right) = -RT \ln\left(\frac{F_T - F_N}{F_D - F_T}\right) = \Delta H(T) - T\Delta S(T) \quad (14)$$

Si se supone que la variación en la capacidad calorífica de desnaturalización ΔC_p es invariable en el rango de temperatura, la variabilidad de entalpía y entropía pueden calcularse a partir de:

$$\Delta H(T) = \Delta H^0(T_m) + \Delta C_p(T - T_m) \quad (15)$$

$$\Delta S(T) = \Delta S^0(T_m) + \Delta C_p \ln\left(\frac{T}{T_m}\right) \quad (16)$$

Si Y es un parámetro espectroscópico monitoreado (fluorescencia, absorbancia, dicroísmo), durante el desdoblamiento a una temperatura T , la ecuación 6 puede expresarse:

$$K_{D(T)} = \frac{[D]}{[N]} = \frac{Y_N(T) - Y(T)}{Y(T) - Y_D(T)} \quad (17)$$

Donde K_D es la constante de equilibrio aparente, $Y(T)$ es el parámetro medido a la temperatura T , Y_N y Y_D corresponden al valor de la propiedad para la proteína nativa y desnaturalizada respectivamente. Estos valores se obtienen de la curva en las regiones de pre y post-transición [51].

Reemplazando las ecuaciones 7 y 8, en la ecuación 17, y despejando $Y(T)$ tenemos:

$$Y(T) = \frac{(Y_{NO} + m_N T) + (Y_{DO} + m_N T)K_D}{1 + K_D} \quad (18)$$

Reemplazando la ecuación 9 en la 18 tenemos:

$$Y(T) = \frac{(Y_{NO} + m_N T) + (Y_{DO} + m_N T)e^{-\frac{\Delta G(T)}{RT}}}{1 + e^{-\frac{\Delta G(T)}{RT}}} \quad (19)$$

Los estados nativo y desplegado de las proteínas difieren en sus capacidades caloríficas, su diferencia con el valor en el equilibrio se relaciona con su cambio de entalpía (ΔH) y de entropía (ΔS) mediante la expresión:

$$\Delta C_p = \frac{\delta(\Delta H)}{\delta(T)} = T \frac{\delta(\Delta S)}{\delta(T)} \quad (20)$$

Integrando desde T hasta T_m , y combinándola con las ecuaciones 9 y 13 se obtiene:

$$\Delta G(T) = \Delta H_{T_m} \left(\frac{1-T}{T_m} \right) - \Delta C_p \left[(T_m - T) + T \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right] \quad (21)$$

Donde ΔC_p y ΔH_m son los cambios en la capacidad calorífica y entalpía a la temperatura de desnaturalización T_m . Esta expresión es conocida como ecuación de Gibbs-Helmholtz.

Reemplazando 19 en 21 se tenemos:

$$Y(T) = \frac{(Y_{NO} + m_N T) + (Y_{DO} + m_N T)e^{-\frac{\Delta H^0}{RT} \left[\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right] + \frac{\Delta C_p}{R} \left[\frac{T_m - T}{T} + \ln \left(\frac{1}{T_m} \right) \right]}}{1 + e^{-\frac{\Delta H^0}{RT} \left[\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right] + \frac{\Delta C_p}{R} \left[\frac{T_m - T}{T} + \ln \left(\frac{1}{T_m} \right) \right]}} \quad (22)$$

La ecuación 22 ajusta los datos espectroscópicos al modelo de dos estados. Este ajuste proporciona valores precisos de T_m y de ΔH_m pero los valores de ΔC_p que se obtienen no son confiables, sin embargo se puede determinar con buena precisión utilizando calorimetría diferencial de barrido DSC [51].

Este modelo de ajuste de datos mediante las curvas de desnaturalización térmica se ajusta solo a una transición de dos estados que no incluye intermediarios.

Cuando aparecen estados intermediarios suficientemente estables como para ser estudiados en el equilibrio [49], el modelo termodinámico se vuelve más complejo, pero puede ser analizado utilizando ecuaciones análogas [51]. Empero, de acuerdo con la información reportada en literatura, se espera que con la albúmina sérica bovina no se presenten intermedios bajo las condiciones de estudio, lo cual se verificará por el comportamiento de las propiedades espectroscópicas.

Se puede verificar la reversibilidad del proceso de desnaturalización si durante calentamientos continuados se obtiene una reproducibilidad en el termograma, o lo que sería equivalente si las entalpías obtenidas son iguales. La reversibilidad (*Rev*) se puede determinar como se plantea en la siguiente ecuación:

$$Rev = \frac{\Delta H_n}{\Delta H_1} \quad (23)$$

Donde ΔH_n es la entalpía de desnaturalización del n-ésimo calentamiento de la muestra y ΔH_1 la entalpía del proceso preliminar, si el valor de la relación es cercano a uno se estaría verificando la reversibilidad del proceso.

Para el estudio termodinámico del efecto de cosolventes sobre la transición, la energía libre de desnaturalización se muestra en relación de la concentración del cosolvente [52], [53]. Experimentalmente se ha encontrado que con frecuencia esta dependencia es lineal y en ese caso se puede representar por la relación:

$$\Delta G_{N \rightarrow D}(C) = \Delta G_w - mC \quad (24)$$

Donde ΔG_w refiere a la energía libre de desnaturalización en ausencia de desnaturalizante, C es la concentración del desnaturalizante empleado y m es la pendiente de la curva que sería una constante de proporcionalidad [39], [47].

1.4 Modelos acerca del proceso de estabilización de proteínas

El proceso de estabilización ha sido estudiado experimental y teóricamente de manera extensa, pero existen todavía vacíos. Uno de los aspectos en que la mayoría coincide acerca del influjo de cosolventes dentro de la estabilidad térmica de proteínas, es que aumentan la temperatura y la entalpía de desnaturalización, casi no afectan la capacidad calorífica de la transición y no se altera la estructura de la proteína [54], [55].

Con la finalidad de entender el efecto de cosolventes en la estabilidad de proteínas, se han propuesto varias teorías como: las funciones de unión de Wyman, la teoría de interacción preferencial, la exclusión estérica, el estrés osmótico y el incremento de la tensión superficial del solvente. Con todo, ninguna explica en su totalidad los comportamientos observados. Se observa que las más generales y comúnmente usadas son la diferencia en la interacción preferencial de los cosolventes con la proteína y el cambio en la tensión superficial del solvente por los cosolventes adicionados[23], [56]–[59].

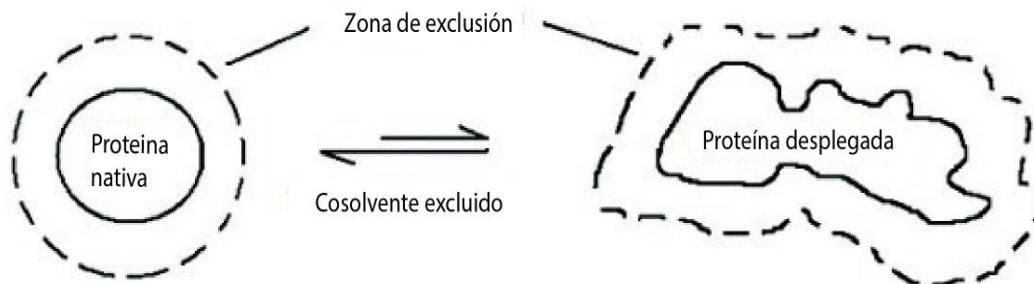
1.4.1 Modelo de interacción e hidratación preferencial

La agregación de un cosolvente a la solución acuosa de una proteína se cuantifica determinando si interacciona de manera preferencial con la proteína o el agua. En caso de que el cosolvente sea excluido de los dominios de la superficie proteica, presentaría una mayor interacción con las moléculas de agua. Se favorece entonces la conformación nativa en vista del logro de una estabilización, a través del aumento de energía de Gibbs de desnaturalización. Por lo que se puede concluir que la proteína tiene hidratación preferencial.

Investigadores como Timasheff han descrito estas interacciones preferenciales utilizando la teoría de Wyman de funciones acopladas [60]. Timasheff estudió osmolitos como polioles y azúcares y determinó una exclusión de estos de la

superficie de las proteínas, debido a la incompatibilidad termodinámica entre la proteína y el osmolito [61]. Estos cosolventes favorecen el estado más compacto es decir el estado nativo, sobre el estado desnaturalizado como se observa en la figura 19.

Figura 19. Representación esquemática de la estabilización de proteínas mostrando la zona de exclusión [60].



La alteración de energía libre relacionada con el proceso de desnaturalización, ΔG_D , aumenta en presencia de este tipo de cosolventes, y el proceso se puede cuantificar a través del exceso o falta del cosolvente frente a la proteína o macromolécula en cuestión. En la hidratación preferencial las proteínas excluyen algunos cosolventes de su esfera de hidratación, consiguiendo su estabilización. Pero sí en cambio, la presencia del cosolvente desestabiliza la proteína, induce al despliegue de esta, interactuando favorablemente con el estado desplegado de la proteína.

La observación general ha sido que los cosolventes que estabilizan la estructura de la proteína son preferencialmente excluidos de la superficie de la proteína, mientras que los que inducen el despliegue en general interactúan favorablemente con el estado desplegado de la proteína [60]–[69].

En cuanto al proceso de desnaturalización si el proceso es reversible la energía libre de desnaturalización se expresa:

$$\Delta G_{desn} = \Delta G_D - \Delta G_N = \mu_D - \mu_N \quad (25)$$

Donde los potenciales químicos μ_D y μ_N no son para Wyman una cantidad constante para cada grado de avance de la reacción sino variables en función de

la concentración de los cosolventes, que regulan el valor de los potenciales químicos. La energía libre de desnaturalización se expresa:

$$\Delta\bar{G}_{desn} = \left(\frac{\partial\mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2}^D - \left(\frac{\partial\mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2}^N \quad (26)$$

Según la nomenclatura de Scatchard [67] cada número corresponde a las especies: agua (1), proteína (2) y cosolvente (3); mientras que m_i refiere a la molalidad del componente i y μ_i al potencial químico del componente i .

Además, como es sabido:

$$\Delta\bar{G}_{desn} = \Delta\bar{G}_{desn}^0 + RT\ln K_D \quad (27)$$

En el equilibrio combinando las ecuaciones 26 y 27 tenemos:

$$-\Delta\bar{G}_{desn}^0 = RT\ln K_D = \left(\frac{\partial\mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2}^D - \left(\frac{\partial\mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2}^N \quad (28)$$

El interés está centrado en ver la variación de la energía libre al tener la presencia del cosolvente (3) que cambia el potencial químico μ_3 por la variación en la concentración molal de cosolvente m_3 :

$$\mu_3 = \mu_3^0 + RT\ln m_3 \quad (29)$$

$$-\left(\frac{\partial\Delta\bar{G}_{desn}^0}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} = RT\left(\frac{\partial\ln K_D}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} \quad (30)$$

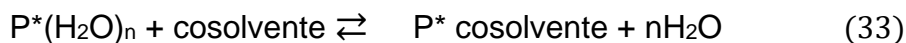
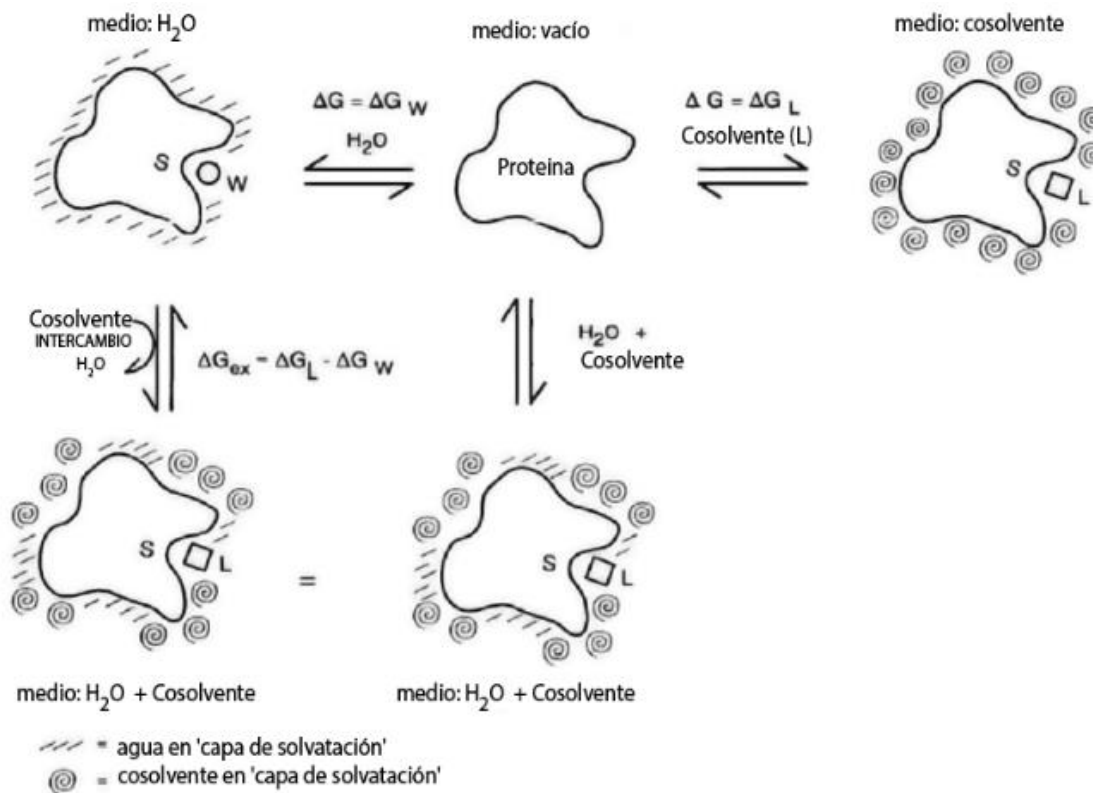
$$\left(\frac{\partial\Delta\bar{G}_{desn}^0}{\partial \mu_3}\right)_{T,P,m_2} * \left(\frac{\partial\mu_3}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} = -RT\left(\frac{\partial\ln K_D}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} \quad (31)$$

$$-\left(\frac{\partial\Delta\bar{G}_{desn}^0}{\partial \mu_3}\right)_{T,P,m_2} = \frac{\left(\frac{\partial\mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2}^D - \left(\frac{\partial\mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2}^N}{\left(\frac{\partial\mu_3}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2}} \quad (32)$$

Lo anterior indica que es posible controlar el proceso de estabilización o desnaturalización de proteínas modificando la cantidad $(\partial\mu_2/\partial m_3)_{T,P,m_2}$, llamada parámetro de interacción preferencial (PIP).

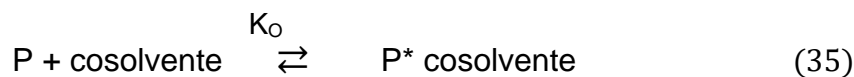
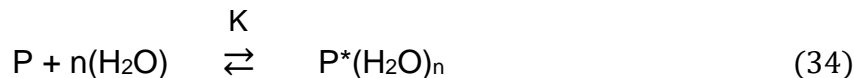
La proteína, bien en su estado nativo o bien en su estado desnaturalizado, puede rodearse de agua o de cosolvente en función de la afinidad relativa entre el agua y el cosolvente, tal y como se evidencia en la figura que sigue:

Figura 20. Representación esquemática de interacciones en la disolución de una proteína en un solvente mixto [60].



Determinando el signo de las derivadas de la expresión (31), se obtiene información sobre el tipo de interacción: inclusión o exclusión preferencial del dominio de la proteína.

A su vez la expresión 33 puede descomponerse en:



Con lo cual la constante de unión preferencial (K_b) sería:

$$K_b = \frac{K_o}{K_w} = K_{ex} \quad (36)$$

Y el cambio de energía libre asociado:

$$\Delta G_b = \Delta G_o - \Delta G_w \quad (37)$$

En toda la macromolécula se presentarán muchos sitios activos donde pueda ocurrir esto, así que habrá que sumar todas las contribuciones para obtener la expresión energética total:

$$\sum \Delta G_b = \sum_{i=1}^n (\Delta G_o - \Delta G_w)_i \quad (38)$$

Cada uno de los términos ($\Delta G_o - \Delta G_w$) está en posibilidad de ser negativo, positivo o cero en función de la afinidad relativa por el sitio i .

En términos prácticos, hay que recordar que las medidas termodinámicas se realizan con respecto a un estado de referencia convenientemente definido. Aquí los estados de referencia convenientes para el solvente en que esté disuelta la proteína pueden ser dos:

1. *Estado de referencia solvente puro.* La energía libre de interacción está dada por la energía libre molar de transferencia o, lo que es equivalente al potencial químico de transferencia $\Delta\mu_{2,tr}$ implicado en el paso de la proteína de agua pura a la solución acuosa de cosolvente de una composición determinada.

$$\Delta\mu_{2,tr} = \mu_{2(en\ sistema\ cosolvente)} - \mu_{2(en\ agua)} = \sum \Delta G_b \quad (39)$$

2. *Estado de referencia el solvente en el cual está disuelta la proteína.* En el momento en que la proteína y el cosolvente se mezclan en agua cada uno perturba el potencial químico del otro. Esta perturbación se describe mediante el parámetro de interacción preferencial:

$$\left(\frac{\partial\mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} = \left(\frac{\partial\mu_3}{\partial m_2}\right)_{T,P,m_3} \quad (40)$$

Siendo m_i la concentración molal de la especie i . Para devolver el sistema al equilibrio después de esta perturbación se debe agregar cosolvente y/o agua. Termodinámicamente esta cantidad restauradora sería:

$$\Gamma_{2,3} = \left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2} \right)_{T,P,\mu_3} \quad (41)$$

Conocida como parámetro de interacción preferencial ($\Gamma_{2,3}$); haciendo la suposición que:

$$\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2} \right)_{T,P,\mu_3} \cong \left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2} \right)_{T,\mu_1,\mu_3} \quad (42)$$

Esta cantidad medible experimentalmente permite el cálculo del parámetro preferencial de interacción, pues:

$$\left(\frac{\partial \mu_3}{\partial m_2} \right)_{T,P,m_3} = \left(\frac{\partial \mu_2}{\partial m_3} \right)_{T,P,m_2} = - \left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2} \right)_{T,P,\mu_3} = - \left(\frac{\partial \mu_3}{\partial m_3} \right)_{T,P,m_2} \quad (43)$$

Donde:

$$\left(\frac{\partial \mu_3}{\partial m_3} \right)_{T,P,m_2} = nRT \left[\frac{1}{m_3} + \left(\frac{\partial \ln \gamma_3}{\partial m_3} \right) \right]_{T,P,m_2} \quad (44)$$

Siendo γ_3 el coeficiente de actividad de 3 (cosolvente). Además:

$$\Delta \mu_{2,tr} = \int_0^{m_3} (\partial \mu_2 / \partial m_3)_{T,P,m_2} dm_3 \quad (45)$$

$$\Delta \mu_{3,tr} = \int_0^{m_2} (\partial \mu_2 / \partial m_2)_{T,P,m_3} dm_2 \quad (46)$$

aplicando la relación de Gibbs-Duhem se obtiene la siguiente expresión que expresa el parámetro de hidratación preferencial (PHP).

$$\left(\frac{\partial m_1}{\partial m_2} \right)_{T,P,\mu_3} = - \frac{m_1}{m_3} \left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2} \right)_{T,P,\mu_3} \equiv \frac{m_1}{m_3} \left(\frac{\partial \mu_2}{\partial \mu_3} \right)_{T,P,m_2} \quad (47)$$

La ecuación 47 expresa la perturbación de μ_2 por el cambio en μ_3 , en función de una cantidad fácilmente medible por equilibrio dialítico:

$$-\frac{m_1}{m_3} \left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2} \right)_{T,P,\mu_3} \quad (48)$$

De las ecuaciones (43), (44) y (47), se sigue que la relación existente entre el parámetro preferencial de interacción (PIP) y el parámetro preferencial de hidratación (PHP) es:

$$\left(\frac{\partial \mu_3}{\partial m_2} \right)_{T,P,m_2} = \left(\frac{\partial \mu_2}{\partial m_3} \right)_{T,P,m_2} = n \left(\frac{RT}{55.56} \right) \left(\frac{\partial m_1}{\partial m_2} \right)_{T,\mu_1,\mu_3} * \left[1 + \left(\frac{\partial \ln \gamma_3}{\partial m_3} \right)_{T,P,m_2} \right] \quad (49)$$

Recientemente se han publicado resultados de PIP calculados a partir de simulaciones dinámicas moleculares [39], los cuales se aproximan a los parámetros determinados experimentalmente.

1.4.1.1 Medida de los parámetros de interacción preferencial

Timasheff y otros, diseñaron el modelo experimental para emplear la ventajosa presentación de Wyman de funciones acopladas, en lo que se ha denominado PIP. El cual cuantifica la variación del número de moléculas de cosolvente por molécula de proteína (ecuación 53) y la variación del número de moléculas de agua por molécula de proteína (ecuación 54), a potencial químico del agua y del cosolvente constantes, que es la forma experimental o práctica de evaluar la variación del potencial químico de la proteína μ_2 con respecto a la cantidad de cosolvente a concentración de proteína constante (ecuación 55); que a su vez se refleja en la variación del potencial químico del cosolvente con respecto a la cantidad de proteína a concentración de cosolvente constante.

La determinación de estos parámetros se basa en su totalidad en la determinación de volúmenes específicos aparentes (ecuación 50) y (ecuación 51) que se calculan directamente mediante las medidas de densidad de las soluciones involucradas a molalidad constante y a potencial químico constante, a través de medidas de densidad.

Se tendrá en cuenta en adelante el uso de las siguientes convenciones: el superíndice 0 denota extrapolación a dilución infinita, el superíndice $'$ denota las medidas de densidad de las soluciones después de ser sometidas a diálisis y se utiliza la nomenclatura de Scatchard y Stockayer donde: 1 corresponde al agua, 2 a la proteína y 3 al cosolvente.

El volumen parcial específico aparente de la proteína a molalidad constante (ϕ_2) lo podemos obtener a partir de medidas de densidad. Se realiza luego una extrapolación de los valores obtenidos para calcular el valor del parámetro a dilución infinita (ϕ_2^0).

$$\phi_2 = \left(\frac{1}{\rho_3}\right) \left[1 - \frac{(\rho_{3,2} - \rho_3)}{c_2}\right] \quad (50)$$

donde $\rho_{3,2}$ corresponde a la densidad de la solución que contiene proteína y sales, ρ_3 simboliza la densidad de la solución de sales y c_2 se refiere a la concentración de proteína en gramos por mililitro.

El volumen parcial específico aparente de la proteína a potencial químico constante (ϕ_2^0) lo podemos obtener a partir de medidas de densidad, posteriores al dializado de muestras y con el tratamiento correspondiente a la extrapolación a dilución infinita (concentración de proteína igual a cero).

$$\phi_2' = \left(\frac{1}{\rho_3}\right) \left[1 - \frac{(\rho_{3,2} - \rho_3)}{c_2}\right] \quad (51)$$

El volumen parcial específico aparente de la solución de sales de amonio (ϕ_3) lo podemos obtener a partir de medidas de densidad y la ecuación 52.

$$\phi_3 = \left(\frac{1}{\rho_1}\right) \left[1 - \frac{(\rho_3 - \rho_1)}{c_3}\right] \quad (52)$$

El parámetro de interacción preferencial vendría dado por la ecuación:

$$\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{T, \mu_1, \mu_3} = \rho_{1,3} \left(\frac{\phi_2^0 - \phi_2'^0}{1 - \rho_{1,3} \bar{v}_3}\right) \quad (53)$$

Donde g_3 corresponde a la concentración del cosolvente en gramos por cada gramo de agua, \bar{v}_3 es el volumen parcial específico del componente 3 a dilución infinita (cosolvente que en esta investigación corresponde a las sales de amonio), ϕ_2° y $\phi_2'^\circ$ los volúmenes parciales específicos de la proteína con la misma molalidad del componente 3 y de la solución de proteína con el mismo potencial químico del solvente de referencia. La referida condición se puede conseguir haciendo la aproximación del equilibrio químico de la solución de proteína con el solvente por diálisis, para mantener idéntico potencial químico de la proteína y la solución.

Un valor positivo de $(\partial g_3/\partial g_2)_{T,\mu_1,\mu_3}$ significa un exceso de componente 3 en la vecindad de la proteína a una concentración determinada en el seno de la solución; existirá entonces una interacción preferencial de la proteína por el componente 3 (cosolvente). En cambio, un valor negativo de $(\partial g_3/\partial g_2)_{T,\mu_1,\mu_3}$ significa deficiencia del componente 3 y por tanto exceso de agua en el dominio de la proteína. Tendremos en consecuencia una hidratación preferencial de la proteína.

El parámetro de hidratación preferencial $(\partial g_1/\partial g_2)_{T,\mu_1,\mu_3}$ se obtiene de la siguiente relación:

$$\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} = -\frac{1}{g_3} \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} \quad (54)$$

En unidades de molalidad, el parámetro de interacción preferencial $(\partial m_3/\partial m_2)_{T,\mu_1,\mu_3}$ viene dado por:

$$\Gamma_{23} \equiv \left(\frac{m_3}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} = (M_2/M_3)(\partial g_3/\partial g_2)_{T,\mu_1,\mu_3} \quad (55)$$

Donde m_i es la concentración molal del componente i , y M_2 y M_3 , son los pesos moleculares de los componentes 2 y 3 respectivamente.

Los parámetros de interacción preferencial están directamente relacionados con los cambios en el potencial químico de la proteína, inducidos por la adición sucesiva del componente 3. Por tanto, para soluciones acuosas de proteínas:

$$\left(\frac{m_3}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} = \frac{(\partial\mu_2/\partial m_3)_{T,P,m_2}}{(\partial\mu_3/\partial m_3)_{T,P,m_2}} \quad (56)$$

donde el potencial químico del componente i está dado por $\mu_i = \mu_i^\circ + RT \ln m_i + R \ln \gamma_i$, T es la temperatura en Kelvin, P es la presión y γ_i refiere al coeficiente de actividad del componente i , y R es el producto de la constante de Boltzman por la constante de Avogadro. Obviando el término de interacción media, $(\partial \ln \gamma_3 / \partial m_3)_{T,P,m_2}$,

$$\left(\frac{\partial\mu_3}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} = \frac{RT}{m_3} \quad (57)$$

En el caso en que la proteína y el cosolvente se mezclen en agua, cada uno provoca en el otro, alteraciones en el potencial químico. Mientras que cuando se logra equilibrio dentro del sistema, se logra [70], [71]:

$$\left(\frac{\partial\mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} = \left(\frac{\partial\mu_3}{\partial m_2}\right)_{T,P,m_3} \quad (40)$$

En la que m_i refiere a la molalidad del componente i , μ_i al potencial químico del componente i de conformidad con la notación de Scatchard y Stockmayer. Despejando la ecuación 56 y reemplazando en la expresión anterior se obtiene:

$$\left(\frac{\partial\mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} = - \left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} \left(\frac{\partial\mu_3}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} \quad (58)$$

Es posible substituir el último término de la igualdad así:

$$\left(\frac{\partial\mu_3}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} = \frac{RT}{m_3} + \left(\frac{\partial \ln \gamma_3}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} \quad (44)$$

Donde γ_3 corresponde al coeficiente de actividad del cosolvente. Reemplazando en la expresión 58 se obtiene:

$$\left(\frac{\partial\mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} = - \left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} \left[\frac{nRT}{m_3} + \left(\frac{\partial \ln \gamma_3}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} \right] \quad (59)$$

Tanto el parámetro de interacción preferencial como el parámetro de hidratación preferencial se pueden expresar en mol mol⁻¹ por medio de estas ecuaciones:

$$\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} = \frac{M_2}{M_3} \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} \quad (55)$$

$$\left(\frac{\partial m_1}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} = \frac{M_2}{M_1} \left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} \quad (60)$$

Donde M_1 es el peso molecular del agua, M_2 es el peso molecular de la proteína y M_3 es el peso molecular del cosolvente. Dentro de la ecuación 59, puede obviarse el término diferencial dado que empíricamente se ha revelado que para concentraciones bajas de cosolvente el valor diferencial es menor que el factor $1/m_3$. El término diferencial se evalúa a través del cálculo de los coeficientes osmóticos, haciendo uso de la osmometría y aplicando el método isopiéstico [72], [73].

Ulteriormente, a fin de evaluar el cambio dentro del potencial químico de la proteína en relación al cambio de molalidad de cosolvente a temperatura, presión y concentración constante de proteína, se sustituye cada término de la expresión 60 por términos previamente analizados, omitiendo el término diferencial. Lo que da como resultado esta ecuación:

$$\left(\frac{\partial \mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} = - \frac{M_2}{M_3} \left(\frac{\rho_o(\phi_2^0 - \phi_2'^0)}{(1 - \rho_o \bar{v}_3)} \right) \left[\frac{RT}{m_3} \right] \quad (61)$$

Dentro de la ecuación inmediatamente anterior, cada uno de los términos se puede determinar experimentalmente mediante medidas de densidad. Así, es posible evaluar los parámetros de interacción preferencial.

1.4.2 Tensión superficial y estabilidad de proteínas.

Las propiedades termodinámicas de una solución varían según la naturaleza e interacciones de las moléculas que las componen y en el caso específico de la

tensión superficial, ésta se constituye en una medida muy sensible a estas interacciones.

Las proteínas son agentes que transforman la tensión superficial del solvente en el que se encuentren debido a su carácter anfifílico, y propenden a adsorberse en la interfase líquido-aire, asumiendo el comportamiento de tensoactivos, por esta razón son usadas en dispersiones y estabilizantes.

Cuando una proteína en solución alcanza la interfase, sufre un cambio conformacional exponiendo preferiblemente sus residuos hidrofóbicos a la fase no polar, mientras los hidrofílicos van hacia la fase acuosa. Una vez ubicada en la interfase la proteína puede sufrir una desnaturalización.

La adsorción de proteínas se trata de un proceso de gran complejidad que depende de diferentes factores, tales como: la estructura de la proteína, las fuerzas intermoleculares entre las moléculas adsorbidas y el disolvente, las interacciones solvente-solvente y soluto-soluto y las condiciones experimentales como temperatura y la adición de cosolventes. El estudio de la relación entre la tensión superficial y la estabilidad de la proteína requiere entonces un reconocimiento de los factores de la adsorción de las proteínas en la interfase, teniendo en cuenta que este proceso depende de la estabilidad conformacional dada por la estructura de la proteína y de las fuerzas intermoleculares entre las especies presentes.

Una mayor comprensión del proceso se obtiene estudiando macromoléculas modelo como las proteínas globulares [74], donde se reporta que los cambios en la tensión superficial del solvente ejercidos por los cosolventes están relacionados con la estabilidad térmica de las proteínas, siendo consistentes en la correlación notificada en la variación de la tensión superficial del agua por osmolitos y el equilibrio visualizado de proteínas en relación con la desnaturalización térmica.

En estudios realizados para sistemas de proteínas globulares, en presencia de diferentes cosolventes [75]–[78], se ha determinado que para cada proteína se presenta una relación entre la estabilidad térmica y la tensión superficial. Sin embargo no se ha determinado una correlación generalizada entre las dos como

afirman algunos investigadores [66], y en determinados casos el comportamiento que se presenta es confuso; de ahí la necesidad de realizar estudios con diferentes sistemas proteína-cosolvente que den cuenta de algún modelo que describa esta correlación.

Dentro de los investigadores que afirman que hay una correlación general entre la tensión superficial y la adición de cosolventes que modifiquen la estabilidad de la proteína están Timasheff y otros [61], [67], [79]. Ellos muestran que el aumento de la tensión superficial del agua tiene una correlación con la estabilización de las proteínas y que el parámetro de interacción preferencial se puede relacionar con el incremento en la tensión superficial del solvente. Se plantea que, si un cosolvente no interactúa con la proteína, el efecto es independiente de su naturaleza [75]. En este caso si aumenta la tensión superficial del agua su efecto será estabilizante y si disminuye la tensión superficial, actuará como desnaturalizante. El cambio que ocurre en el potencial químico de estas moléculas, inducido por cambios en la tensión superficial que se producen cuando un cosolvente se encuentra presente en la disolución, es:

$$\left(\frac{\partial \mu_3}{\partial m_3}\right)_{T,P,c_{j \neq 3}} = A \left(\frac{\partial \gamma}{\partial c_3}\right)_{T,P,c_{j \neq 3}} \quad (62)$$

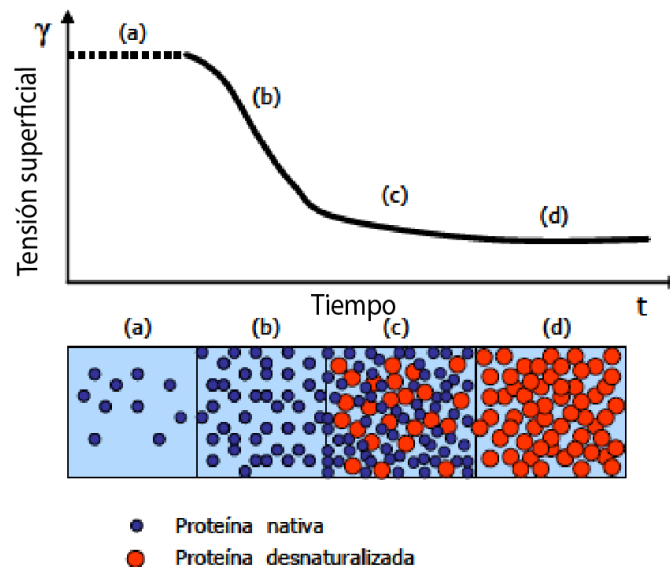
Donde A es el área de superficie molar de la proteína y γ es la tensión superficial [80]. Sin embargo, se observan excepciones y no se puede concluir que un incremento en la tensión superficial sea el factor responsable en la interacción o hidratación preferencial. Una ejemplificación de esto es el estudio reportado [81] para la BSA y Lisozima en presencia de sales de aminoácidos, en el que se halla que no en todos los casos hay una relación directa entre las dos propiedades.

La determinación de la tensión superficial de las soluciones de proteína en agua y en los cosolventes es una forma de analizar el proceso de adsorción de la proteína en la interfase líquido-aire. La dinámica de adsorción de proteínas en superficies, involucra diversidad de procesos que pueden tener lugar de modo consecutivo o competitivo, a saber: (i) procesos de difusión de la macromolécula desde el seno

de la solución hasta la interfase y vinculación a la misma, (ii) penetración de nuevas moléculas en la capa adsorbida y redistribución de las moléculas adsorbidas [82].

Hay autores que suman un cuarto paso de desnaturalización de la proteína en la interfase; así como en algunas proteínas, adicionan una etapa inicial de inducción, en la que no se dan cambios en la tensión superficial de la solución. Esto se ha puesto a prueba en varios sistemas y se ha discutido de modo extendido dentro de la literatura. Conforme a los estudios realizados en nuestro laboratorio, dicho estado de inducción no se presenta para proteínas globulares pequeñas [76]–[78], [83]. El tiempo de cada etapa y el número de etapas involucradas en el proceso de adsorción, obedece a las propiedades físicas de la proteína y de las condiciones experimentales: temperatura, concentración de proteína, pH, temperatura y propiedades del solvente [84].

Figura 21. Etapas del proceso de adsorción dinámica de proteínas en la interfase líquido-aire [89].



De acuerdo con lo expuesto, se pueden describir las etapas del proceso de adsorción de la proteína en los estos términos:

a) Difusión de moléculas de soluto desde el seno de la solución a la región interfacial.

b) Penetración y adsorción de moléculas desde la superficie a la interfase aire-agua.

c) y d) Rearreglos conformacionales de las moléculas de proteínas adsorbidas.

La primera etapa, relativa a la difusión de las moléculas de proteína a la interfase es generalmente rápida. Se representa así:

$$\pi = 2RTC_b \left(\frac{Dt}{3.14} \right)^{1/2} \quad (63)$$

Donde C_b corresponde a la concentración de proteína en el seno de la solución, D refiere al coeficiente de difusión de la proteína en la solución, t es el tiempo, R la constante de los gases y π es la presión superficial (diferencia entre la tensión superficial del solvente γ_0 , y la tensión superficial de la solución de proteína γ).

La adsorción y el rearreglo de las moléculas adsorbidas en una o dos etapas se simbolizan mediante ecuaciones de carácter semiempírico de primer orden, a saber:

$$\pi = \pi_f - \pi_0 e^{-k(t-t_0)} \quad (64)$$

Donde π_f y π_0 corresponden con las presiones superficiales en el tiempo final e inicial de adsorción de cada etapa, correspondientemente: π es la presión a cualquier tiempo, t_0 es el tiempo inicial, t es el tiempo medido de formación de la interfase y k es la constante de velocidad de primer orden.

Dentro del grupo de investigación se ha realizado un análisis de la adsorción de tres proteínas globulares: la β -lactoglobulina β -LG [83], la α -lactoalbúmina [75] y el quimotripsinógeno [76,77]. Los resultados muestran que se ajustan a un modelo conformado por tres etapas fundamentalmente: (i) difusión rápida, (ii) proceso de penetración y adsorción de la proteína en la interfase líquido-aire, y (iii) alteraciones

en la estructura tridimensional y reordenamiento molecular de la proteína adsorbida.

1.5 Albúmina sérica bovina

La albúmina sérica bovina BSA se halla tanto en el suero de la leche como en el plasma sanguíneo de los bovinos. Las proteínas del suero de la leche se definen como las que lo componen después de remover las caseínas por precipitación a pH 4,6. Dentro de este grupo de proteínas tenemos a la β -LG, la α -lactoalbúmina, la BSA y algunas inmunoglobulinas [6], [85].

La BSA es la proteína más cuantiosa en el sistema circulatorio 50 gL^{-1} , contribuye en un 80% al mantenimiento de la presión osmótica sanguínea y es la gran responsable de mantener el pH sanguíneo [86]. Se enlaza a compuestos tanto lipofílicos como hidrofílicos, endógenos y exógenos. Siendo responsable del transporte de una gran cantidad de esteroides, ácidos grasos, bilirrubina, hormonas, anestésicos y medicamentos [87], tiene un amplio rango de aplicaciones químicas y farmacéuticas ya que participa en diferentes funciones fisiológicas.

La BSA es sintetizada en el hígado como preproalbúmina siendo un polipéptido de 607 residuos de aminoácidos, que tiene un péptido señal de 18 residuos el cual es removido posteriormente para formar la proalbúmina, que es lanzada del retículo endoplasmático; esta cuenta con un propéptido de 4 residuos de aminoácidos. En la vesícula de Golgi se produce la proteína madura que va desde el residuo 25 hasta el 607 de su predecesor inicial.

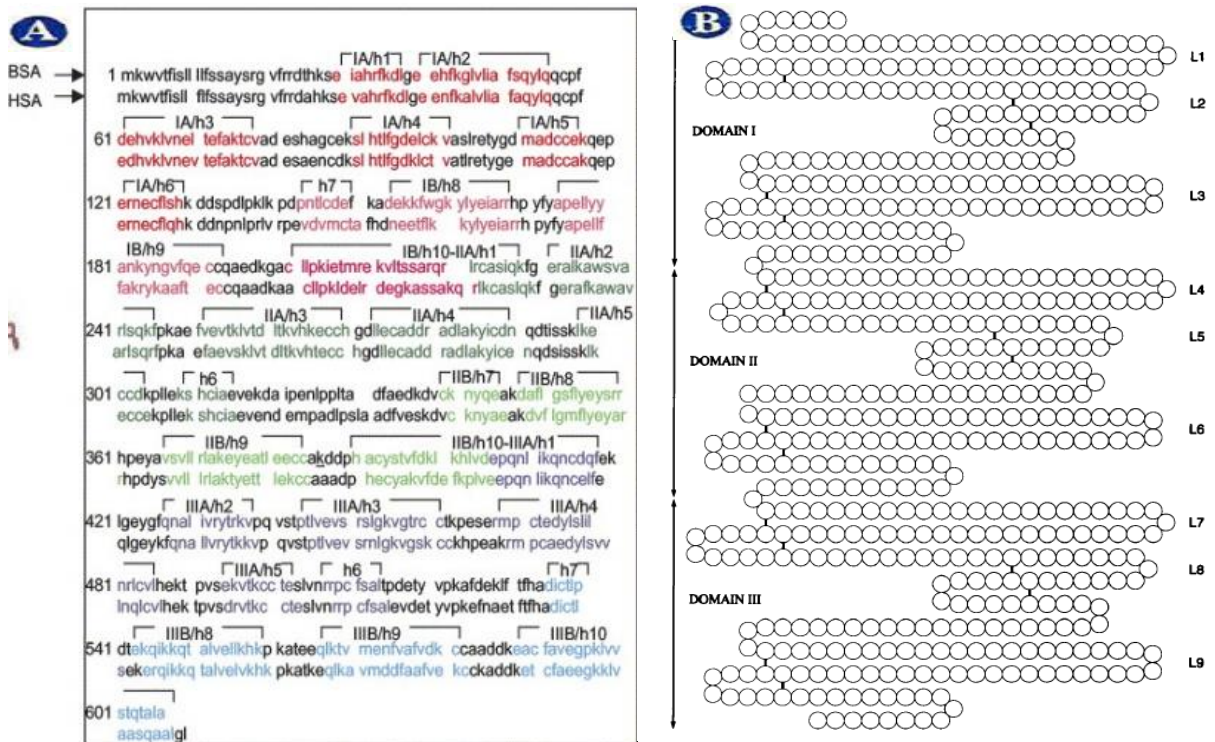
La proteína de 582 residuos se trata de una proteína globular con un peso molecular de 66287 g mol^{-1} y un punto isoeléctrico de 4,7 unidades de pH [88]. Sus características y comportamientos han sido objeto de amplios estudios pues la proteína proveniente de bovino es fácilmente aislada.

Ha sido usada como una proteína estándar junto a la β -LG, la ovoalbúmina y la α -lactalbúmina en muchos estudios bioquímicos y biofísicos. Se ha utilizado como un

ingrediente en comidas debido a su valor nutricional y ventajas funcionales [85]. Dada su estabilidad se usa como medio de cultivo microbiológico.

La secuencia de la BSA es de alrededor del 76% idéntica a la Albúmina sérica humana (HSA) figura 22a [89].

Figura 22. A. Estructura primaria y homología de la BSA y la albúmina sérica humana (HSA) [94]. B. Representación esquemática de la estructura primaria de la BSA, que incluye los puentes disulfuro [91]

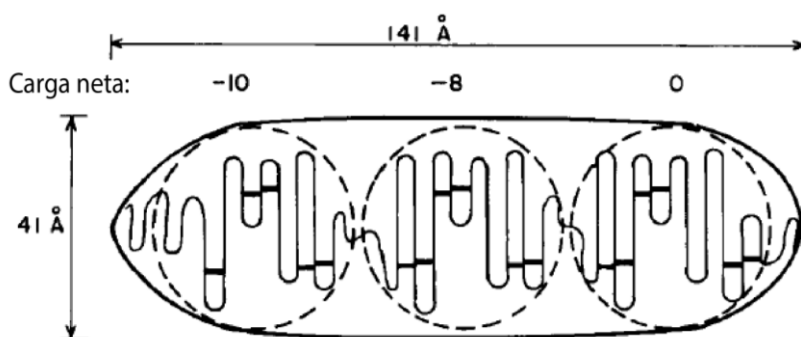


Las albúminas se caracterizan por bajos contenidos de triptófano y metionina y por altos contenidos de cistina, ácidos aspártico y glutámico, lisina y arginina. En la figura 22B, se pueden diferenciar los bucles representados de la L1 a L9, y los tres dominios característicos de la proteína; la BSA tiene hasta 17 puentes disulfuro intracaterianos entre pH 5-7 y un grupo sulfhídrico (Cys-34). Ningún puente disulfuro es accesible a agentes reductores en este intervalo de pH. No obstante, mientras el pH del medio aumenta o disminuye, estos puentes quedan expuestos [90].

Se encuentra registrado en literatura que la estructura secundaria de la BSA tiene 50-55% de α -hélice, 15-18% de hojas beta y un 27-35% estructuras desordenadas (random coil) [91]. En general se acepta que su estructura secundaria está compuesta por 67% de hélices, 10% de giros; el 23% restante es de cadena extendida y no contiene entonces hojas beta [86], [92].

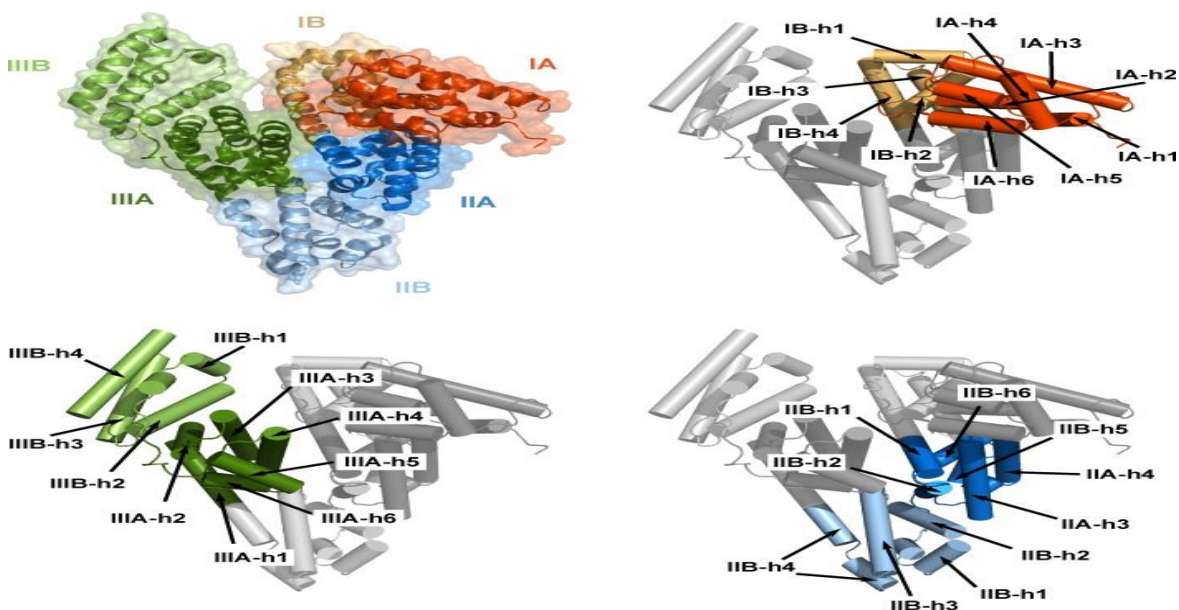
Usando experimentos hidrodinámicos, así como dispersión de rayos X, se plantea que la BSA es una proteína elipsoide con dimensiones de $140 \times 40 \text{ \AA}$ y usando una diversa variedad de medidas físicas se construye un modelo inicial de la albúmina en la forma de cigarrillo [5], [92], [93] figura 23.

Figura 23. Modelo de cigarrillo de la BSA, la terminación amino está en la izquierda, la carga neta esta encima de cada dominio de la proteína [5].



La estructura espacial de la BSA figura 24, ha sido determinada usando difracción de rayos X, con una resolución de $2,7 \text{ \AA}$ [5]. Está compuesta por tres dominios similares (*I, II, III*) tomando aparentemente la forma de un corazón. Cada dominio se puede dividir en dos subdominios uno denominado A con 6 α -hélices y otro B con 4 α -hélices. Las hélices del subdominio A son denominadas *A-h1* hasta *A-h6* y *B-h1* hasta *B-h4* para el subdominio B.

Figura 24. Estructura terciaria y cuaternaria de la BSA. Los dominios se representan en números romanos (I,II,III) y los subdominios con letras A y B; las hélices alfa con la letra h (PDB id: 3V03) [5].



Es importante resaltar que la BSA tienen dos residuos de triptófano ubicados en los dominios (I-III); el residuo *Trp-134*, sobre la superficie del subdominio *IB* y el residuo *Trp-212* en el dominio *IIA* [94]. Estos residuos permiten los estudios de fluorescencia de triptófano en la proteína.

1.5.1 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la BSA

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de BSA depende del proceso que puede ser reversible o irreversible, dependiendo de las condiciones del medio como: temperatura, pH, fuerza iónica, concentración de proteína y presencia de cosolventes.

Usando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier se reportó [95] que calentamientos por encima de los 70°C generan la formación irreversible de hojas beta en la BSA. Otro estudio [96] muestra que, usando dicroísmo circular se tiene un porcentaje de formas hélice de 66% de a 25°C, el cual va disminuyendo con la temperatura perdiendo la mitad a 80°C y conservando solo un 16% a 130°C; la

reversibilidad del proceso mejora con la adición de dodecil sulfato de sodio SDS. El análisis del efecto de la concentración de HSA es reportado [97] indicando que se forman estructuras tipo beta a 70°C con concentración de 50 mgml⁻¹ y 80°C con concentraciones de 1,4 mgml⁻¹; incluso a 0,05 mgml⁻¹ y 75°C se encuentran estas estructuras. Se concluye que la conformación de hojas beta depende principalmente de la concentración e involucra asociaciones intermoleculares, debido al desdoblamiento del bolsillo que incluye al residuo Cys-34, el cual está disponible entonces para formar puentes disulfuro llevando a agregados estables.

En la tabla 1, se expone una síntesis de las determinaciones de temperatura de desnaturalización hechas usando DSC, donde se observan cambios debido a la concentración de la proteína.

Tabla 1. Temperaturas de desnaturalización de la BSA a pH neutro determinadas usando DSC [90]

Concentración de proteína (% p/v)	Velocidad de calentamiento (°C/min)	Temperatura de desnaturalización (°C)
2	1,0	64,3
1	1,5	72,9
0,5	1,5	72,5
0,14	0,66	63,8
0,3	1,5	66,2
0,07	0,5	64,5
20	5	63,4
2	0,5	64,2
5	6	70,3
5	6	70,8

1.5.2 Efecto de los cosolventes sobre la estabilidad de la BSA

Usando refractometría y dispersión de la luz (LS) y volumetría con equilibrios dialíticos se reportan los parámetros de interacción preferencial de la Albúmina

sérica bovina en solución acuosa de cloruro de guanidina [98]. El estudio establece que la BSA interactúa preferencialmente con el solvente, se hidrata preferencialmente.

Otro reporte [99] que utiliza densimetría demuestra que los aminoácidos glicina, α y β alanina y betaína, estabilizan la conformación nativa de la Albúmina sérica bovina y determinan su interacción preferencial concluyendo que se hidratan preferencialmente excluyéndose preferencialmente de la superficie de la proteína.

El efecto protector del SDS sobre la estructura helicoidal de BSA en la desnaturalización térmica ha sido reportado [96], [100]. Por encima de 30°C, el contenido de α -hélice de la proteína (66%) disminuye marcadamente con el aumento de la temperatura, y como consecuencia, las proporciones de estructuras desordenadas (random coil) y estructura β aumentan. La proporción de α -hélice y estructura β , a 65°C es de 44% y 13% respectivamente. La proporción máxima de α -hélice a 65°C mantiene un 58% de la estructura helicoidal, incrementándose a 64% cuando se enfría a 25°C. Este efecto protector se hace mayor con un incremento en la longitud de la cadena alquilo del ión sulfato.

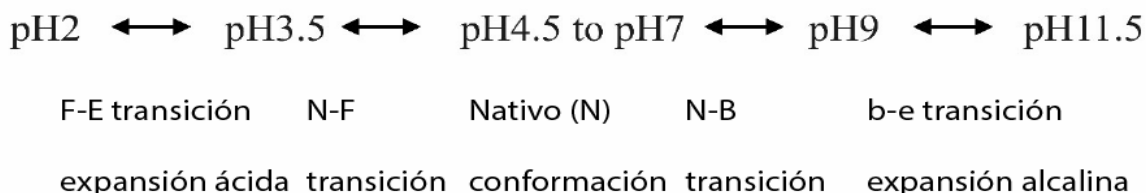
Se ha estudiado el impacto de glicerol y el sorbitol [100], [101] en la estabilidad térmica y la gelificación inducida por calor de la BSA. Mientras que con el sorbitol se incrementa la T_m , no hay un cambio significativo en T_m cuando la concentración de glicerol se incrementa de 0 a 40%; sugiriendo que el glicerol interactúa de manera similar con la formas nativa y desnaturalizada de la proteína, mientras que el sorbitol es un agente estabilizante de la proteína. Tanto el glicerol como el sorbitol aumentan la temperatura de gelificación y además disminuye la velocidad del proceso, hecho que es atribuido a su habilidad para disminuir la frecuencia de las colisiones proteína-proteína, por el obvio incremento en la viscosidad de la solución.

El estado de agregación de la proteína depende fundamentalmente del pH y la fuerza iónica. La agregación aumenta conforme se acercan las condiciones al punto isoeléctrico y se aumente la fuerza iónica [102].

1.5.3 Efecto del pH sobre la estabilidad de la BSA

Se encuentran reportes [6], [88], [103], [104] de una isomerización conformacional que depende de los cambios de pH.

Figura 25. Transiciones conformacionales de la BSA, con respecto al pH [6].



Como se observa en la figura 25, existen cuatro transiciones de cuatro posibles conformaciones de la proteína, denominadas: nativa (N), rápida (F), expandida (E) y forma básica (B). La diferencia en sus formas modificará sus funciones biológicas como por ejemplo al tipo de ligando al que se pueda unir para su transporte.

Usando DSC se reportan algunos parámetros de la desnaturalización de la BSA [103].

Tabla 2. Temperaturas de desnaturalización y entalpía de desnaturalización de la BSA al 2% y 0,1M de NaCl en función del pH, determinadas usando DSC [85]

pH	Temperatura de desnaturalización (°C)	Entalpía de desnaturalización (kJ mol ⁻¹)
3,51	46,8	155
4,05	53,1	185
4,20	44,2	510
4,49	51,8	620
4,99	59,8	783
5,25	61,8	786
5,61	63,9	785
7,00	64,3	839
8,01	60,9	709

9,03	61,2	607
10,01	60,8	----

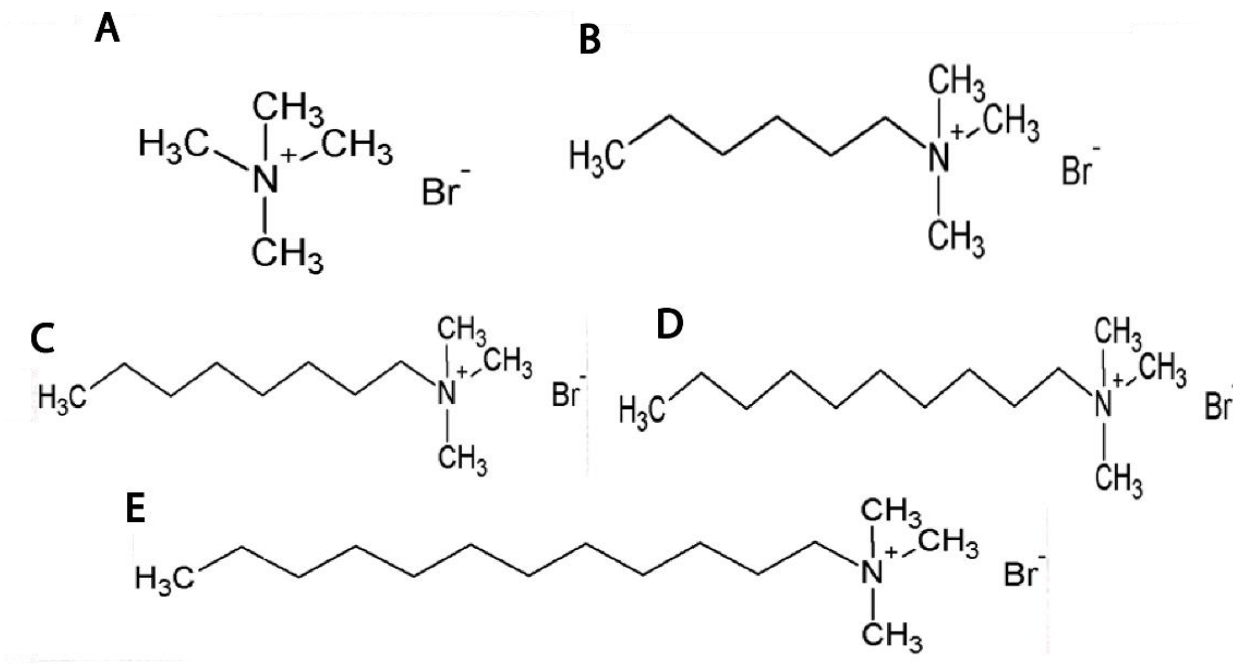
De acuerdo con lo reportado por Kongraksawech [85] se puede observar que se presentan hombros o incluso dos temperaturas de desnaturalización, lo cual se explica porque los diferentes dominios de la proteína pueden llegar a comportarse de manera diferencial. Como se observa en la tabla 2, existe una fuerte influencia del pH en los parámetros termodinámicos del proceso de desnaturalización. Esto no es sorpresa ya que como se señaló anteriormente, el pH determina la carga total sobre la proteína, mientras las sales determinan el grado de interacción entre estas cargas, dado que las apantallan. En el presente análisis también se evaluó el efecto de la fuerza iónica concluyendo que unido al pH también son determinantes en la entalpía y la temperatura de desnaturalización.

1.6 Sales de tetraalquilamonio

Las sales de amonio cuaternario son usadas como antisépticos y desinfectantes, útiles para propósitos clínicos debido a su capacidad antimicrobiana. Estas son capaces de penetrar la pared celular de los microorganismos y causar la lisis celular. Son utilizadas, por ejemplo: cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio y cloruro de metilbencetonio [105]. En síntesis orgánica, son usadas como catalizadores [106].

En este estudio se utilizarán sales de tetraalquilamonio STTA que son de tipo orgánico y son clasificadas como surfactantes. Puesto que la cabeza del surfactante tiene carga positiva, son surfactantes catiónicos. Las sales de amonio cuaternarias que se utilizarán son Met₄NBr, Met₃HexNBr, Met₃DecNBr y Met₃DodecNBr en las cuales aumenta gradualmente la longitud de uno de su grupo alquilo hasta los doce carbonos como se observa en la figura 26.

Figura 26. Representaciones estructurales de: A. bromuro de tetrametilamonio B. bromuro de hexiltrimetilamonio C. bromuro de deciltrimetilamonio D. bromuro de dodeciltrimetilamonio



Las moléculas de STAA gozan de un carácter parcialmente no electrolítico, asumiendo los iones a dilución infinita. Dentro de las propiedades térmicas puede identificarse la contribución de los grupos apolares en el comportamiento total [107].

La naturaleza hidrofóbica de los iones de STAA se da cuando estos actúan como formadores de estructura en el agua, de manera análoga a la de clatratos hidratados cristalinos, lo que se puede verificar a través de medidas de dispersión [108], [109].

Usando medidas de conductividad, Oremusová [110], reporta las concentraciones micelares críticas (CMC) en función de la temperatura, reportando mínimos cercanos a la temperatura ambiente para la serie de bromuros de alquil trimetilamonio, desde bromuro de hexiltrimetilamonio hasta el bromuro de octadeciltrimetilamonio. Las concentraciones serán referentes para las sales de tipo surfactante que utilizaremos.

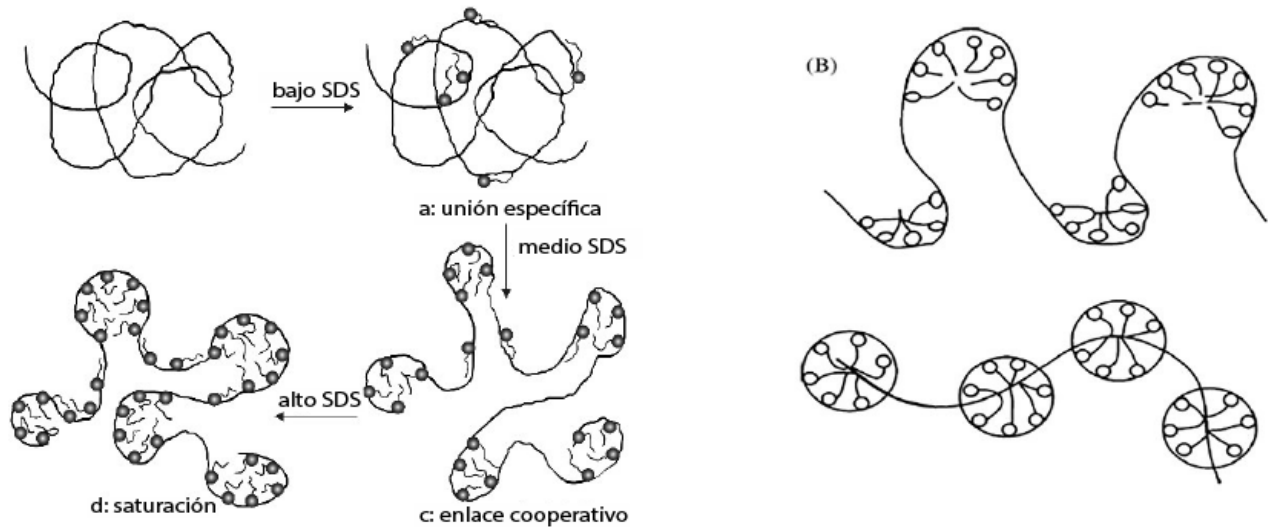
Investigaciones recientes hechas por el Grupo de Termodinámica Clásica de la Universidad Nacional de Colombia, sobre determinación de coeficientes osmóticos y de actividad de los solutos, a usar en este proyecto nos indican que tienen un rango de solubilidad que supera ampliamente a la CMC, lo cual utilizaremos como referencia de solubilidad. Rozo [41] utiliza el método isopiéstico para determinar los coeficientes de actividad de: Met₃OctNBr, Met₃DecNBr, Met₃DodecNBr y Met₃TetradecNBr en un intervalo de temperatura de 283K-303K; estos resultados pueden ser utilizados para el cálculo de los parámetros de interacción preferencial, como método de contraste a los PIP logrados en nuestra investigación.

1.6.1 Efecto de tensoactivos y sales de amonio en la estabilidad de proteínas

Los estudios de diferentes tensoactivos sobre la estabilidad de proteínas globulares se hacen importantes debido a las aplicaciones en las industria farmacéutica y alimenticia [111]–[114].

Dentro de los modelos de interacción para proteínas y surfactantes, tenemos el de collar y perlas “necklace and bead” que es planteado por ejemplo para la interacción de la BSA con el SDS figura 27B [115], el cual fue desarrollado a partir de medidas de RMN, fluorescencia dinámica y estática además de ESR. Se propone además que el surfactante se une a la proteína por interacciones iónicas e hidrofóbicas, causando que la proteína se expanda y se asocien más moléculas de surfactante incluso hasta la formación de agregados alrededor de la proteína figura 27A.

Figura 27. A. Representación esquemática de la desnaturalización de la BSA inducida por el SDS. B. Complejo proteína-surfactante siguiendo el modelo "necklace and bead" [121].



Waninge [116] estudio dos surfactantes, uno de tipo aniónico: dodecil sulfato de sodio (SDS) y otro de tipo catiónico: cloruro de dodeciltrimetilamonio DTAC, los cuales tienen una cadena alquílica de igual longitud la cual representa su parte hidrofóbica; usando calorimetría diferencial de barrido. El autor ahonda en la estabilidad térmica de la β -LG en presencia de cloruro de sodio 60 mM a pH 6. Plantea interacciones directas de los cosolventes con la β -LG y más específicamente con residuos hallados en el bolsillo de la proteína. Asume que la interacción es la suma de la contribución de la interacción hidrofóbica entre el bolsillo lipofílico de la proteína y la contribución de la interacción electrostática de los residuos de lisina ubicados en la posición 69 y 135 de la proteína. La diferencia de interacción se debería a que el tensoactivo catiónico presenta una repulsión electrostática con los residuos de lisina cargados positivamente a pH 6.

Moosavi [117] publica sobre el efecto desnaturalizante del Met₃DodecNBr o DTAB por sus siglas en inglés, sobre la albúmina sérica bovina. Usando espectroscopia UV, a una longitud de onda de 280nm, realiza curvas de desnaturalización térmica entre 25°C y 95°C, que le permiten observar cómo aumenta el efecto desnaturalizante en tanto incrementa la concentración de tensoactivo desde 1mM hasta 5mM, las cuales están por debajo de la CMC. En este estudio se plantea que

el desdoblamiento a pH neutro que empieza por la zona C-terminal de la proteína es decir por el dominio III, hace que el DTAB se una a esta zona desdoblada de la proteína y no penetre a la zona N-terminal de esta. El estudio también plantea que la transición se hace en multiestados debido a los diferentes dominios de la proteína y su desdoblamiento diferencial por efecto de la temperatura.

De estos estudios se puede tomar la forma de plantear la interacción de la BSA con las sales de amonio propuestas y se pretende evaluar el efecto de la cadena hidrofóbica de las sales sobre estas interacciones.

2. Métodos experimentales

2.1 Reactivos y equipos

2.1.1 Reactivos

Albúmina sérica bovina, fracción obtenida por choque térmico, libre de proteasas, ácidos grasos y globulina, pH 7, $\geq 98\%$ (Sigma A7030)

Bromuro de tetrametilamonio $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich 426296)

Bromuro de hexiltrimetilamonio $\geq 98\%$ (Aldrich 6484522)

Bromuro de octiltrimetilamonio $\geq 98\%$ (Aldrich 7783202)

Bromuro de deciltrimetilamonio $\geq 98\%$ (Aldrich 7647010)

Bromuro de dodeciltrimetilamonio $\geq 98\%$ (Sigma 13598362)

Fosfato ácido de sodio $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich S9763)

Fosfato diácido de sodio $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich S0751)

Agua purificada y desionizada con una conductividad menor a $1\mu\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$

2.1.1 Equipos

Balanza Mettler Toledo AT 261 de rango dual y sensibilidad de $\pm 1\times 10^{-5}\text{g}$ en el rango bajo de pesada entre 0 y 60 g.

Purificador de agua Symplicity UV system Merck Millipore, que produce agua tipo 1 con conductividad menor a $1\mu\text{S cm}^{-1}$.

Membranas de diálisis Spectra/Por^R. Membrana de celulosa. Peso molecular de corte (MWCO) 12 – 14 kDa.

Baño de ultrasonido Cole Palmer 8895-25 que permite desgasificar soluciones y disolventes.

Medidor de pH OAKTON ION 700 con una precisión de $\pm 0,01$ unidades de pH.

Espectrofotómetro UV-Vis de doble haz Lambda 20 PERKIN ELMER con rango de longitud de onda de 200 a 900 nm, con precisión de $\pm 0,003$ unidades de absorbancia acoplado a un sistema de control de temperatura tipo Peltier Perkin Elmer PTP-1, con una precisión de $\pm 0,1$ K.

Microcalorímetro Setaram Evo μ DSC7. Se utilizó una calibración utilizando como estándar primario al naftaleno con referencia S60/58180 y pureza del 99.97%, obteniendo una temperatura de fusión de 80.25 ± 0.03 °C y una entalpía de fusión de 18.923 ± 0.083 KJ/mol. Se reporta una resolución de 0,02 a 0,002 μ W, con precisión en temperatura es de $\pm 0,15$ K y precisión calorimétrica de $\pm 0,7\%$.

Densímetro de tubo vibrante Anton Paar DSA 5000M que opera a una frecuencia de 3 MHz. Se realiza una calibración con aire y agua desgasificada y ultrapura a 293,15 K antes de cada serie de medidas. La incertidumbre en la temperatura es de $\pm 0,01$ K, en la medida de densidad es de $\pm 1,5 \cdot 10^{-4}$ g·cm⁻³ y en la velocidad de sonido es de 0,5 m·s⁻¹.

Tensiómetro de volumen de gota Lauda TVT-2. La jeringa de inyección tiene un volumen de 2,50 mL y el diámetro externo de la punta equivale a 1,380 mm. El equipo se acopla a un baño termostatado de circulación LAUDA E100. Esto posibilita tener un control de la temperatura de $\pm 0,01$ K. Se lleva a cabo una calibración con agua pura desgasificada y ultrapura a 298,15 K. En las condiciones referidas la incertidumbre es $\pm 0,01$ mN/m.

2.1.2 Preparación de soluciones

La totalidad de soluciones se preparó por pesada, haciendo uso de agua purificada tipo 1, posterior a un proceso de desgasificación. Las soluciones amortiguadoras de fosfato se prepararon a partir de soluciones de las sales de fosfato de sodio, haciendo las concernientes diluciones para obtener una concentración 0,010 M y verificando con el medidor de pH para obtener un valor de pH neutro. Se preparó

una solución madre de BSA disolviendo la proteína en la solución reguladora de pH 7,00 para así alcanzar la concentración adecuada. La concentración final de proteína se verificó usando la espectroscopía UV-VIS, usando un coeficiente de extinción a 280nm, $\epsilon_{280} = 0,629 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, el cual fue encontrado para la proteína en una curva de calibración.

Las soluciones de las sales de tetraalquilamonio se prepararon por pesada utilizando como disolvente la solución amortiguadora o agua respectivamente.

Las mezclas que tenían la proteína y las sales se obtuvieron diluyendo la solución de proteína en las soluciones de sal para alcanzar la concentración final de proteína.

2.2 Espectroscopía UV-VIS

La longitud de máxima absorción de la BSA se determinó mediante UV-VIS alcanzando un valor de 280 nm. Sobre la base de este valor y usando la ley de Lambert – Beer, se corroboró la concentración de proteína en las diferentes soluciones estudiadas.

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot b} \quad (65)$$

Donde c refiere a la concentración de proteína expresada en g/mL, ϵ_{280} corresponde al coeficiente de extinción con valor de $0,629 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm, A es la absorbancia y b el paso óptico de la celda de 1,0 cm.

Se midieron perfiles de desnaturalización térmica de la proteína a 280 nm empleando un espectrofotómetro UV-Vis . Se trabajó una rampa de calentamiento desde 298,15 K hasta 353,15K usando una velocidad de calentamiento de $1,0 \text{ K min}^{-1}$. Se emplearon celdas de cuarzo y la concentración de proteína en las soluciones de estudio fue de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Los datos obtenidos se ajustaron a la ecuación 22 empleando el programa OriginPro 2021 para obtener los parámetros termodinámicos de desnaturalización.

2.3 Calorimetría diferencial de barrido DSC

Es una técnica termodinámica que mide la capacidad calorífica en función de la temperatura. Se usa comúnmente para caracterizar la estabilidad térmica de proteínas [118]. La señal proveniente de la celda de la muestra que contiene la solución proteica se compara con la señal de la celda que contiene idéntica solución carente de la proteína de estudio. Partiendo de la misma temperatura en las dos celdas, se procede a calentar suministrando un flujo de calor (dQ/dt); el instrumento procura que las dos celdas tengan igual temperatura (dT/dt) y debido a que las dos soluciones tienen diferente capacidad calorífica, se requiere una cantidad diferencial de calor. Después de sustraer la señal de la solución de referencia (amortiguadora sin proteína) y analizando el termograma obtenido es posible obtener las temperaturas de desnaturalización y las entalpías asociadas a los procesos endotérmicos o exotérmicos debido a estas transiciones.

La determinación calorimétrica para la BSA se llevó a cabo usando una solución reguladora de fosfatos a pH 7,00 y en presencia de las sales de tetraalquilamonio. La concentración de proteína en todos los ensayos fue de $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$. La concentración de Met_4NBr se trabajó en un intervalo de 0,0125 hasta $0,8000 \text{ mol kg}^{-1}$, la concentración de $\text{Met}_3\text{HexNBr}$ se trabajó en un intervalo de 0,0500 hasta $0,8000 \text{ mol kg}^{-1}$, las concentraciones de $\text{Met}_3\text{OctNBr}$ y $\text{Met}_3\text{DecNBr}$ se trabajaron en un intervalo de 0,0025 hasta $0,0150 \text{ mol kg}^{-1}$, la concentración de $\text{Met}_3\text{DodecNBr}$ se trabajó en un intervalo de 0,00075 hasta $0,00500 \text{ mol kg}^{-1}$. Los rangos de concentración se seleccionaron para no exceder la concentración micelar crítica y así prevenir los efectos causados por la agregación.

En vista de la alta sensibilidad del equipo, se hace indispensable: una limpieza exhaustiva de las celdas y todo el material usado para preparar las soluciones, el cambio constante de empaques de la celda, la verificación del flujo de líquido del termostato acoplado al equipo y la desgasificación de todas las soluciones usadas. También se debe hacer una determinación por peso que muestre un equilibrio entre los contenidos de las celdas.

Se determinan los termogramas de: las celdas vacías, celdas con agua y celdas con la solución de amortiguador repitiendo si es necesario hasta obtener una adecuada línea base, que es necesaria antes de cualquier determinación en presencia de la proteína.

Se empleó una velocidad de calentamiento de $1,00 \text{ K min}^{-1}$ y se trabajó en un intervalo de temperatura de $293,15 \text{ K}$ hasta $363,15 \text{ K}$.

2.4 Tensión superficial

Es posible determinar la adsorción superficial de proteínas en solución a través del cambio en la tensión superficial con el tiempo. Dentro de estos estudios es posible utilizar diferentes técnicas para la determinación de la tensión superficial como la determinación por volumen de gota [119]. La gota de solución que se forma en la punta de un capilar debido al continuo empuje del émbolo de la jeringa a través de un motor permite determinar el volumen de la gota al desprenderse y el tiempo en el cual ocurre, traduciendo luego estos datos a perfiles de tensión superficial en función del tiempo que permiten determinar las cinéticas de adsorción de la proteína en solución.

Las determinaciones de la tensión superficial se realizaron a una temperatura de $298,15 \text{ K}$ en solución acuosa. Cada una de las soluciones se preparó por pesada y las muestras se desgasificaron antes de introducirlas en la jeringa. La calibración del instrumento se comprobó utilizando agua pura y desgasificada a $298,15 \text{ K}$. Dadas estas condiciones la incertidumbre se hace de $\pm 0,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

Se preparó una solución madre de la proteína disolviendo una cantidad pesada de BSA en agua para alcanzar la concentración final de $1,00 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; la última concentración de proteína fue verificada mediante espectroscopia UV-VIS. Se prepararon soluciones acuosas de TMAB, HTAB, OTAB en concentraciones entre $0,025$ y $0,200 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$; las soluciones DETAB se prepararon entre $0,0025$ y $0,0200 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ y las soluciones DTAB estuvieron entre $0,0010$ y $0,0050 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Una vez inyectadas las muestras en la jeringa se garantiza el equilibrio térmico esperando al menos dos horas antes de cada medición.

La tensión superficial de las soluciones acuosas de las sales fue medida a través del método dinámico, con un tiempo de 60 segundos de formación de la gota, a fin de prevenir efectos hidrodinámicos en su formación. El valor reportado es el promedio de al menos 20 gotas.

Mediante el método cuasiestático se midió la tensión superficial de la proteína en agua y mezclada con las soluciones acuosas de sales. Usando este método, se forma rápidamente una gota en la punta del capilar con un volumen definido que equivale a cierta tensión superficial. Se mide el tiempo de desprendimiento de cada nueva gota a diferentes volúmenes cada vez menores, obteniendo así la tensión superficial en función del tiempo. Cada valor de tensión superficial corresponde al promedio de tres mediciones independientes.

La determinación de la tensión superficial requiere datos precisos de la densidad de la solución. La densidad de las soluciones se midió usando un densímetro de tubo vibrante Anton Para DSA 5000M. La calibración del instrumento, siguiendo las recomendaciones del fabricante, se realizó con aire y agua ultrapura y desgasificada a 293,15 K antes de cada serie de mediciones. Se hicieron triplicados de cada medida reportando el promedio de esas medidas. La incertidumbre en las medidas de densidad se encuentra en $\pm 1.5 \cdot 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

2.5 Parámetros de interacción preferencial

Es posible determinar las interacciones preferenciales entre grupos superficiales de la proteína en solución y su entorno. Los aditivos que hagan parte del solvente suelen modular estas interacciones cambiando la estabilidad conformacional de las proteínas [120]. Dentro de las diferentes técnicas usadas para determinar estas interacciones se encuentra la densimetría. Se determinan medidas de densidad de las soluciones antes de un equilibrio de diálisis a concentración molal constante y después del proceso de diálisis garantizando un potencial químico constante. Se

realizaron medidas de densidad usando el densímetro Anton Para DSA 5000M. La totalidad de las soluciones se hicieron por pesada y fueron desgasificadas previo a la realización de medidas.

2.5.1 Volumen parcial específico

Se determina el volumen específico aparente (ϕ) de las soluciones de BSA en solución acuosa y en cada una de las soluciones de sales de tetraalquilamonio cambiando la concentración de proteína desde 0,10 hasta 1,00 mg·mL⁻¹. Para ejecutar la determinación de este parámetro se hicieron medidas de densidad siguiendo el procedimiento propuesto por Lee [70]. El volumen específico aparente se calculó a través de la aplicación de la ecuación 50 previamente descrita.

Se determina el volumen específico aparente (ϕ_2) a partir de medidas de densidad logrando mantener constante la concentración molal de las sales de tetraalquilamonio; en cuanto al volumen específico aparente de la proteína (ϕ_2') se determinó usando medidas de densidad bajo condiciones de potencial químico constante de las sales luego de llevar a cabo una diálisis. Se usó para ello una membrana de diálisis Spectra/Por1 que fue sumergida dentro de una solución de bicarbonato de sodio al 2,0% y EDTA 1,0 mM por alrededor de dos horas, para posteriormente ser lavada con agua desionizada en repetidas ocasiones hasta que el agua de lavado alcanzó una conductividad menor a 1 μ S·m⁻¹. Dentro de la membrana de diálisis se colocó un volumen de aproximadamente 4,0 mL de la solución acuosa integrada por las sales y la proteína. Se introdujo luego la membrana en una solución acuosa de las sales de igual concentración con un volumen aproximadamente 100 veces más grande que el contenido de la membrana. Para alcanzar el equilibrio se llevó a cabo el proceso de diálisis por al menos un día completo manteniendo la temperatura de 277,15 K, para luego de ello determinar entonces el valor de su densidad. Se determinan luego el volumen parcial específico (ϕ_2^0) a concentración molal constante de sal y el volumen parcial específico ($\phi_2'^0$) a potencial químico constante de sal usando las gráficas de los volúmenes específicos aparentes en función de la concentración de proteína.

Para las sales de tetraalquilamonio se estableció el volumen parcial específico (\bar{v}_3) trabajando en los siguientes rangos de concentración: en cuanto al Me_4NBr , $\text{Met}_3\text{HexNBr}$ y $\text{Met}_3\text{OctNBr}$ desde 0,025 hasta 0,200 mol kg^{-1} para el $\text{Met}_3\text{DecNBr}$ se trabajó en un intervalo de concentración de 0,0025 hasta 0,0200 mol kg^{-1} y finalmente el $\text{Met}_3\text{DodecNBr}$ desde 0,0010 hasta 0,0100 mol kg^{-1} .

2.5.2 Interacción preferencial

Usando los volúmenes parciales específicos (\bar{v}_3) se definió el parámetro de interacción preferencial (ξ_3) usando la ecuación 50 y se expresó usando la ecuación 55 en unidades de mol.

3. Resultados y análisis

Esta sección se ha dividido en tres subsecciones organizadas de la siguiente forma: primero la estabilidad térmica de la BSA en presencia de las STAA seleccionadas para este estudio, segundo la determinación de la tensión superficial de las soluciones de STAA y análisis del proceso de adsorción de la proteína en la interfase aire-agua y finalmente la tercera correspondiente a los parámetros de interacción preferencial entre las STAA y la proteína a 298,15K.

3.1 Estabilidad térmica de la BSA

3.1.1 Estudio del plegamiento y reversibilidad del proceso de desnaturalización de la proteína

La caracterización del proceso de desnaturalización de proteínas en solución, generado por cambios de temperatura ha sido llevado a cabo usando diferentes técnicas experimentales, dentro de las que destaca la calorimetría diferencial de barrido. Sin embargo, uno de los requisitos para este tipo de estudios consiste en garantizar el equilibrio termodinámico del sistema durante el proceso de desnaturalización térmica. Se puede verificar esta condición si durante calentamientos sucesivos se logra una reproducibilidad en el termograma, o lo que sería equivalente si las entalpías obtenidas durante la calorimetría de calentamientos sucesivos son iguales.

Sin embargo, una diferencia en los termogramas luego de un calentamiento inicial no implica que no se puedan obtener los parámetros termodinámicos que caracterizan el proceso, si asumimos que el proceso irreversible ocurre a temperaturas muy superiores a la que caracteriza la transición por la desnaturalización estudiada [121].

En el caso específico de la BSA, se han reportado temperaturas de desnaturalización y entalpías [122], [123] usando la técnica de DSC a pesar de los diferentes porcentajes de

reversibilidad del proceso, que demuestran que el proceso se hace irreversible, con una dependencia fuerte de la temperatura de calentamiento final.

Se somete la solución de BSA en buffer fosfatos a una rampa de calentamiento de 1K/min hasta llegar a 75°C, para realizar luego un nuevo calentamiento obteniendo los termogramas de la figura 28. Se determina la relación de entalpías de los dos calentamientos de acuerdo con la ecuación 23, obteniendo un valor de 0,819. Este valor que corresponde al 82% de reversibilidad el cual es superior al obtenido por Michnik [123].

Para evaluar si el proceso presenta intermediarios o si corresponde solo al equilibrio entre dos estados (nativo y desplegado), se suelen comparar la entalpía calorimétrica con la obtenida usando métodos espectroscópicos, denominada entalpía de van't Hoff.

Usando la espectrofotometría UV-Vis se obtiene el perfil de desnaturalización térmica de la figura 29, que siendo ajustado con ayuda del software OriginPro a la ecuación 22, permitió la determinación de la entalpía de van't Hoff tomando un valor de 659 kJ/mol.

Figura 28. Perfiles de desnaturalización térmica de la BSA durante calentamientos sucesivos.

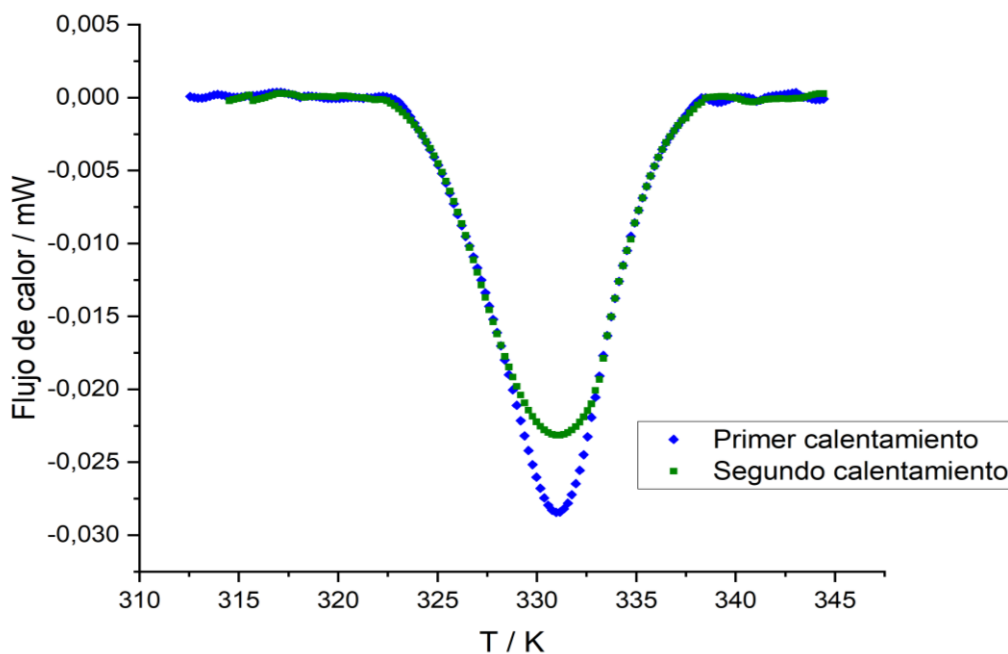
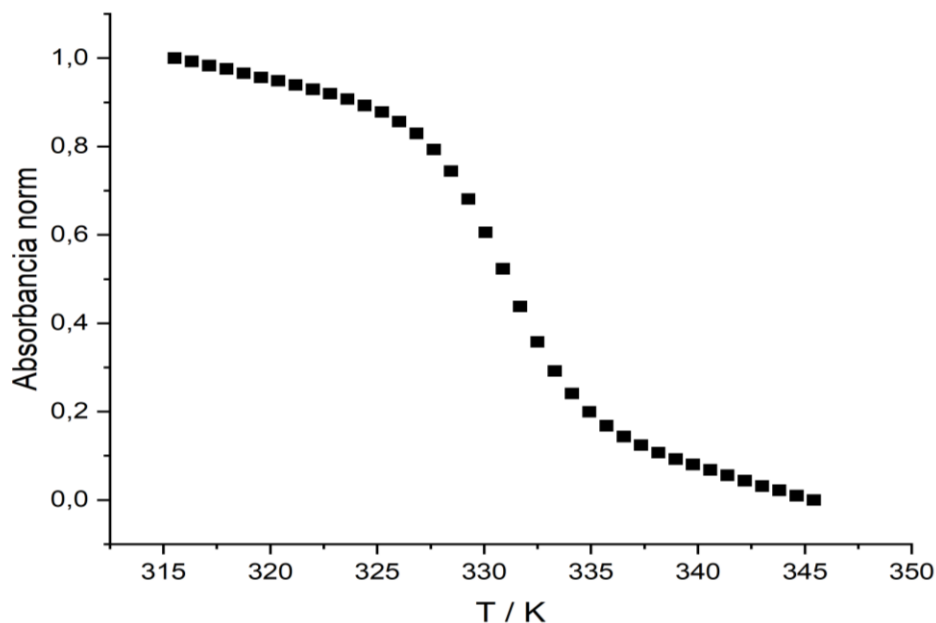


Figura 29. Termogramas de desnaturalización de albúmina sérica bovina 3,0 mg/mL en buffer fosfatos 10mM a pH 7,0 y rampa de calentamiento de 1,0 K/min.



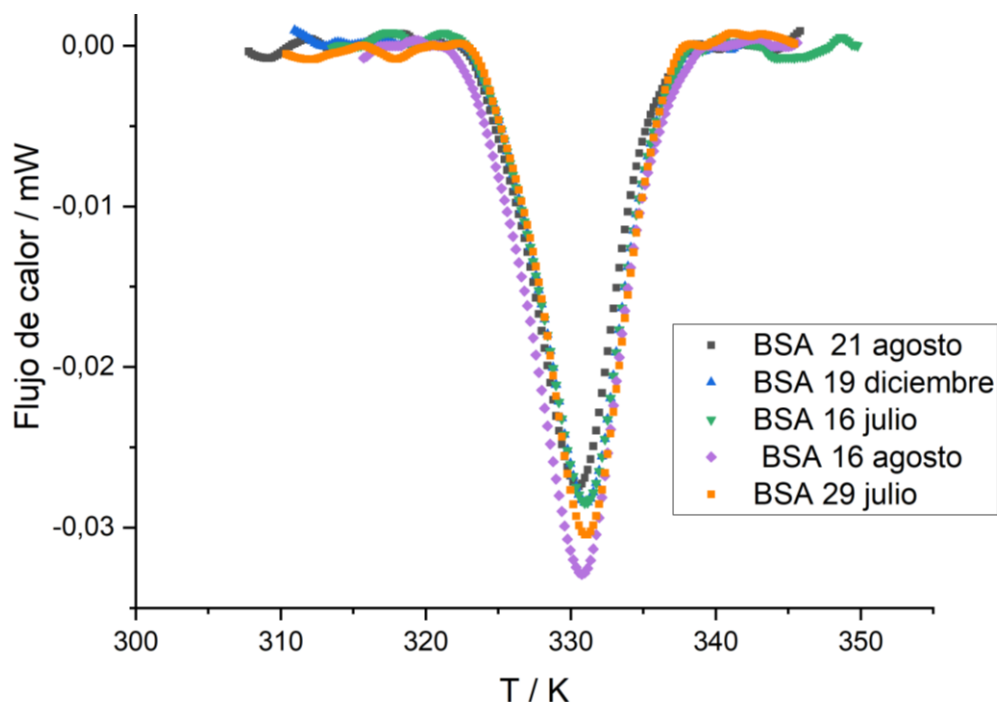
Al relacionar la entalpía calorimétrica obtenida, se obtiene una relación cercana a 1, indicando que bajo las condiciones usadas para este estudio el equilibrio entre el estado nativo y estado desplegado de la BSA en solución se lleva a cabo entre dos estados sin intermediarios.

Tabla 3. Parámetros termodinámicos para el proceso de desnaturalización térmica de BSA obtenidos por calorimetría diferencial de barrido y espectroscopía UV-VIS

	^a T_m/K	^b $\Delta H/kJ mol^{-1}$	$\Delta H^{cal} / \Delta H^{v.H.}$
UV-VIS	331,8	659,1	1,035
DSC	330,9	682,0	

^a La desviación estándar típica calculada para la temperatura y la entalpía determinada a partir de repeticiones independientes de determinaciones espectroscópicas es de 1,1 K y 45 kJ mol⁻¹ respectivamente.

^b La desviación estándar típica calculada para la temperatura y la entalpía determinada a partir de repeticiones independientes de DSC es de 0,3 K y 17,6 kJ mol⁻¹, respectivamente.

Figura 30. Perfiles de desnaturalización térmica de la BSA.

Usando los resultados de la figura 30 podemos calcular la desviación estándar típica reportada en la tabla 3, la cual se determina usando al menos 5 repeticiones independientes.

Existen diversos métodos para purificar albúminas séricas [124], dentro de los cuales resaltan para la BSA la extracción con etanol y la de choque térmico, acopladas a diversas técnicas producen una gama de diferentes productos con alta pureza. Sin embargo y debido a su procedencia suelen tener pequeños porcentajes de globulinas, proteasas y ácidos grasos. Se identifican los diferentes tipos de proteína con el número de producto y en este caso la A-7030 lote: SLBJ7347V, proveniente de la purificación con choque térmico y caracterizada como libre de globulinas, proteasas y ácidos grasos a pH 7 y de pureza mayor o igual al 98%. Observando la especificación del producto obtenida del proveedor, reporta un contenido de proteasas menor o igual a 0,005 unidades por mg y ácidos grasos con valor $\leq 0,02\%$.

Se hace importante aquí mencionar que las diferencias en los productos generan diferentes resultados en los parámetros estudiados, como lo demuestra Michnik en su estudio [123], que compara dos tipos de BSA con diferencia en la cantidad de ácidos grasos generando bajo las mismas condiciones de estudio una gran diferencia en las

temperaturas y entalpías de desnaturalización (57,3 °C y 6,62 J/g para la BSA con menos ácidos grasos y 68,0 °C y 12,75 J/g para la siguiente).

Los valores de la temperatura de desnaturalización y la entalpía asociada al proceso son similares a los obtenidos por diferentes investigadores y se encuentran resumidos en la tabla 4.

Tabla 4. Reportes de los parámetros de desnaturalización térmica de BSA obtenidos por calorimetría diferencial de barrido

Proteína y concentración	Solución amortiguadora	Rampa y velocidad de barrido	Temperatura de desnaturalización °C	Entalpía de desnaturalización J g ⁻¹	Autor
BSA a7030 3 mg mL ⁻¹	Fosfatos 10mM pH 7,0	20-75°C 1°C/min	57,7 ± 0,3	10,3 ± 0,3	Este estudio
BSA a7030 1 mg mL ⁻¹	Fosfatos 10mM pH 7,0	20-90°C 0,5°C/min	57,0	11	Norde [125]
BSA a7030 1 mg mL ⁻¹	Fosfatos 20mM pH 7,4	25-90°C 0,5°C/min	61,14	----	Chaturvedi [126]
BSA a7030 250 mg mL ⁻¹	Fosfatos 50mM pH 7,0	5°C/min	59,05	----	Elysée-Collen [127]
BSA a7030 1,5 mg mL ⁻¹	Fosfatos 10mM pH 7,0	20-90°C 0,5°C/min	55,9	11,0	Vermonden [128]

3.1.2 Efecto de las sales de tetraalquilamonio sobre la estabilidad térmica de la BSA.

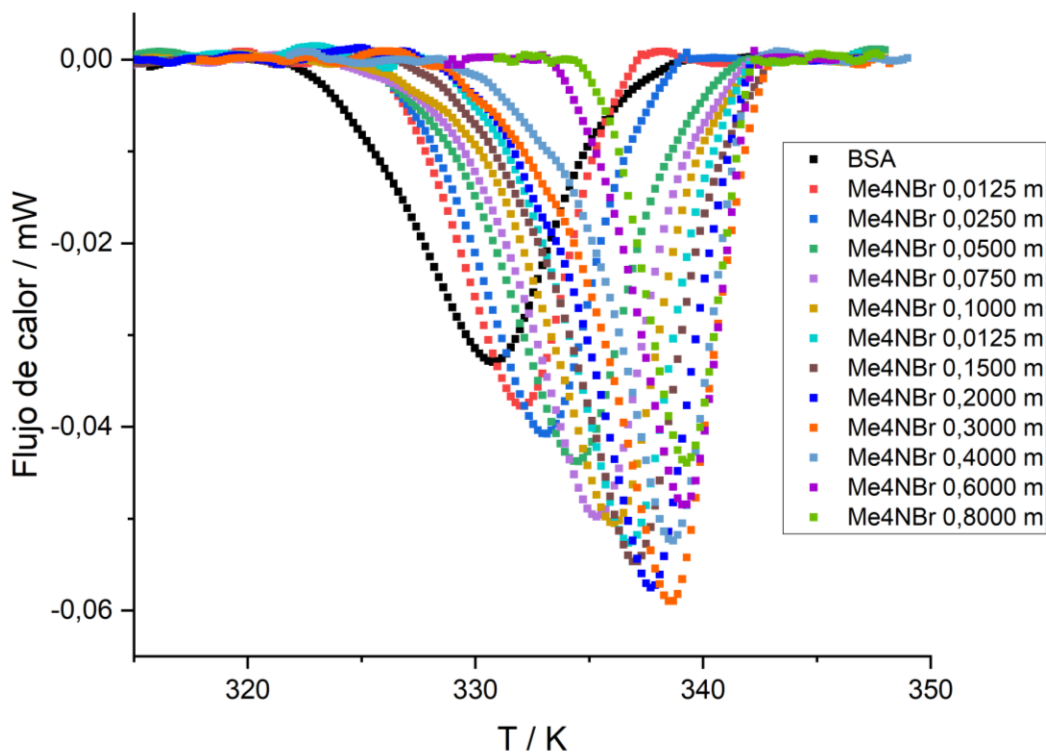
Para analizar el efecto de las sales de tetraalquilamonio sobre la estabilidad térmica de la albumina sérica bovina, se evaluaron dichas a sales a diferentes concentraciones junto con la solución de proteína. Se hace importante aquí mencionar que cuatro de ellas son tensoactivos catiónicos que generan agregados moleculares a medida que se acercan a su concentración micelar crítica (CMC), la cual se encuentra reportada en la tabla 5, los rangos de concentración trabajados fueron elegidos alejándose de la CMC y así evitando la formación de micelas que serían un factor adicional para determinar durante el proceso,

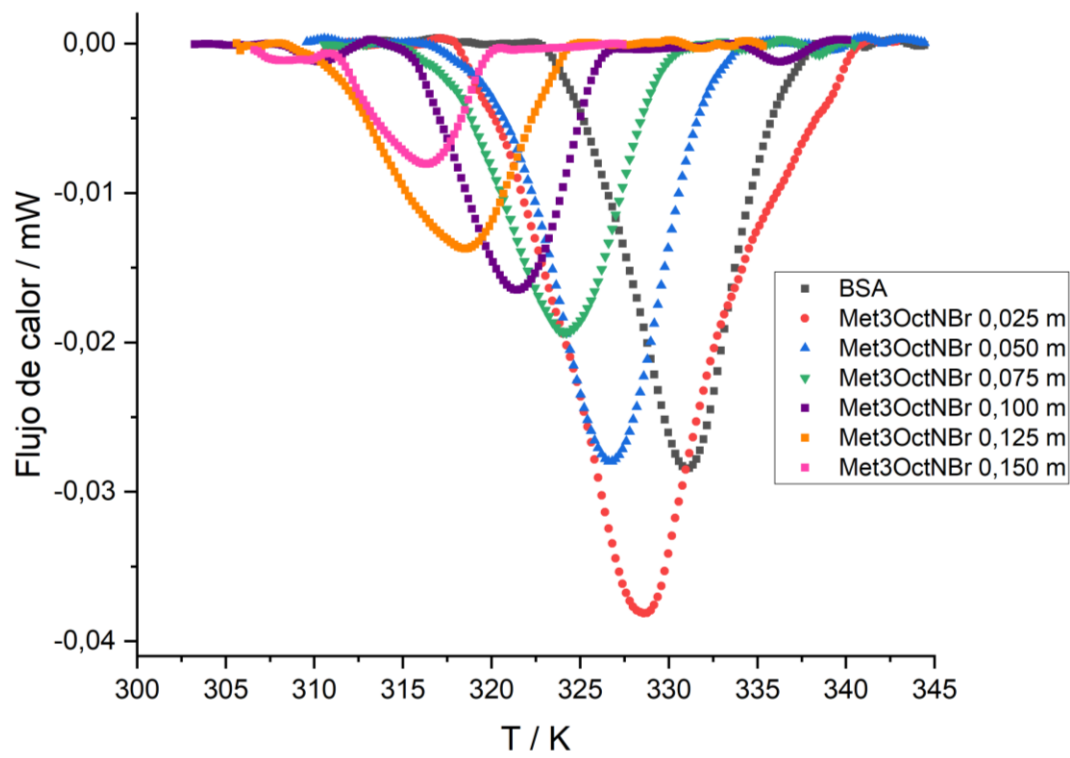
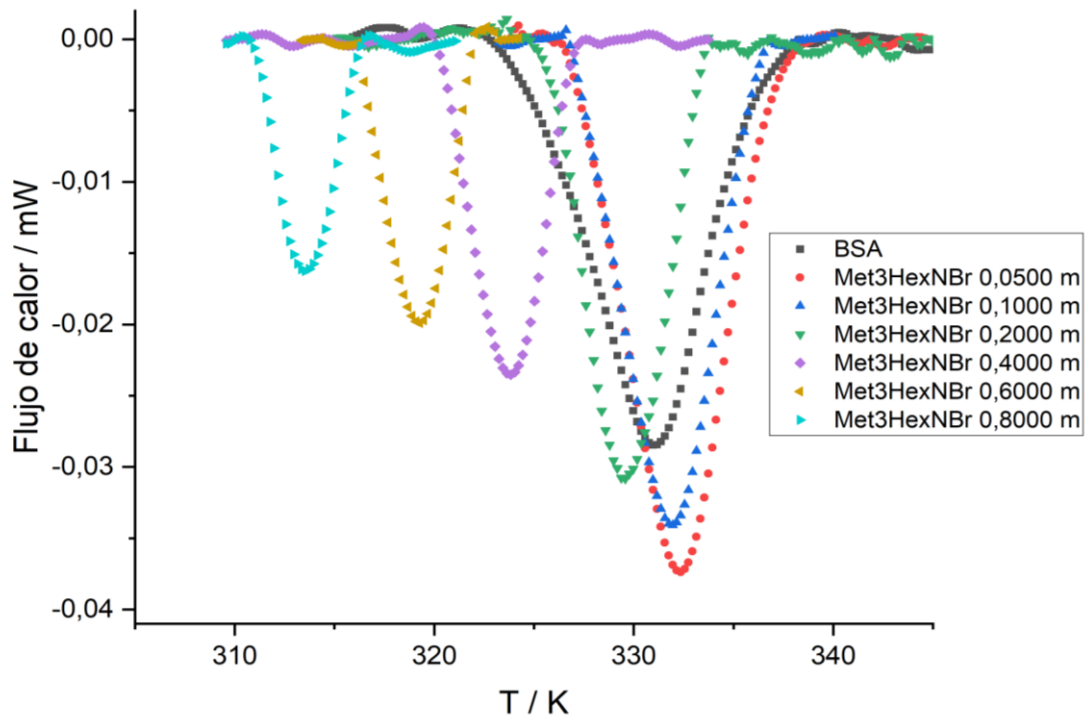
influyendo directamente en la desnaturación de la proteína y sus parámetros debido al cambio de interacciones y la formación de agregados proteicos.

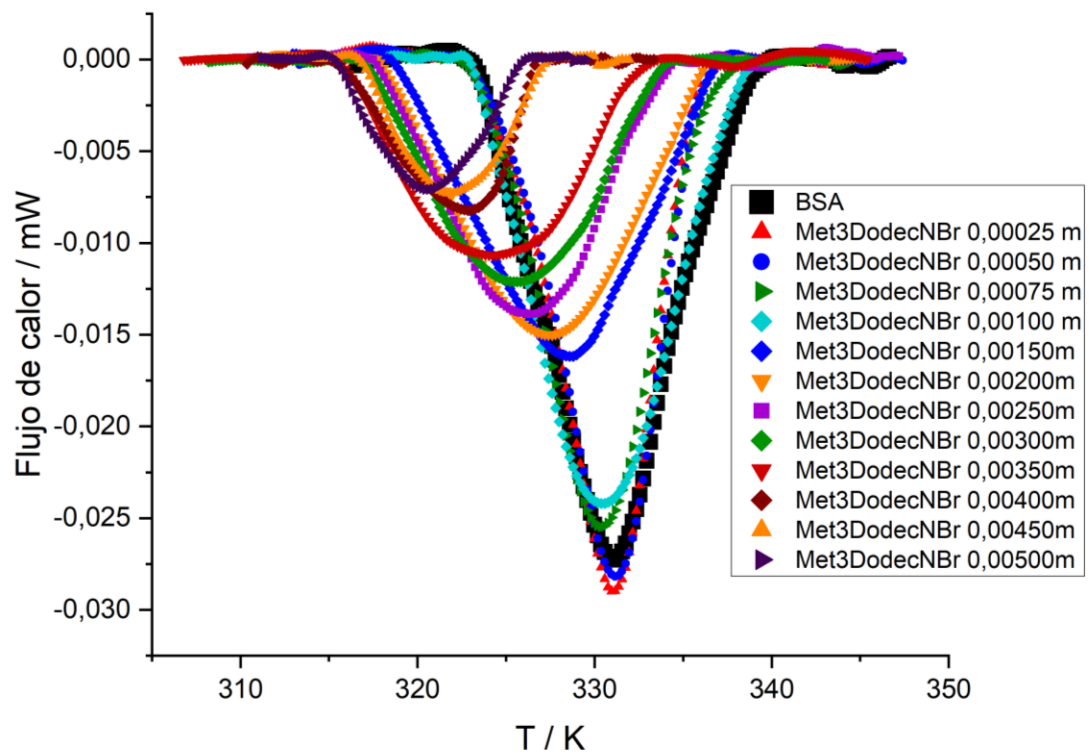
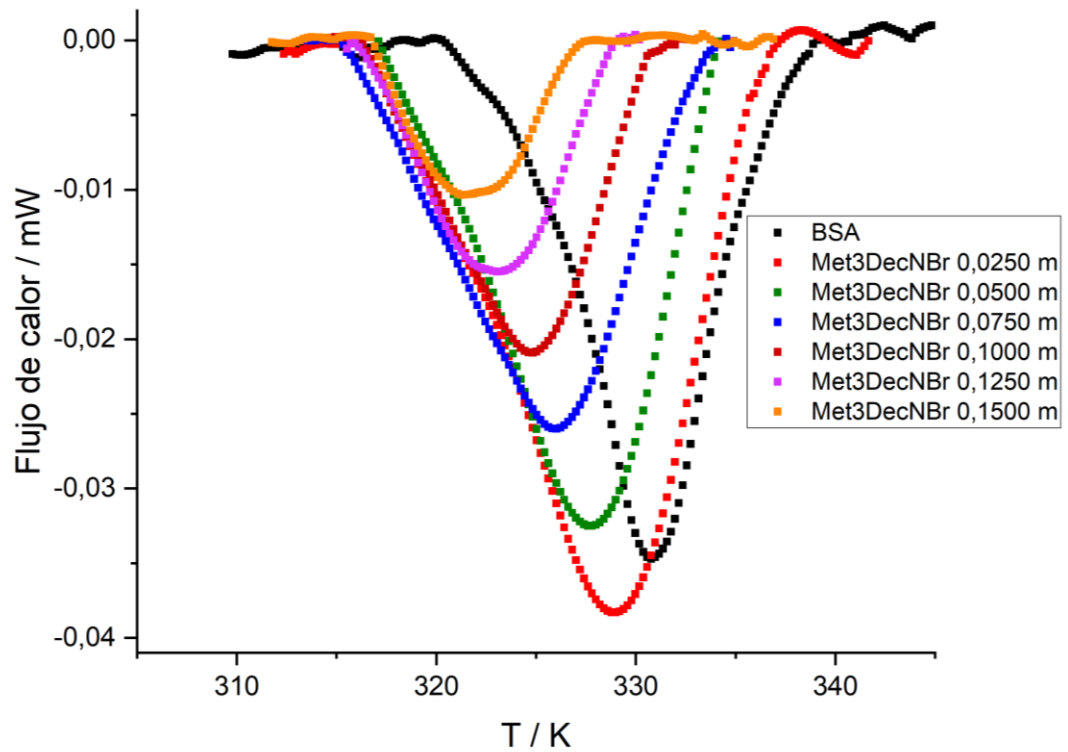
Tabla 5. Concentraciones micelares críticas de las sales de tetraalquilamonio.

	CMC mol L ⁻¹
Met₄NBr	-----
Met₃HexNBr	0,528 [135]
Met₃OctNBr	0,293 [136]
Met₃DecNBr	0,0663 [136]
Met₃DodecNBr	0,0146 [136]

Figura 31. Efecto de la concentración de las STAA sobre la desnaturación térmica de BSA a pH 7,00 mediante medidas de calorimetría diferencial de barrido.







El comportamiento de las diferentes sales varía de acuerdo con su composición y concentración en solución. El bromuro de tetrametilamonio genera un efecto estabilizante que se hace más grande a medida que aumenta su concentración. Los valores de la T_m crecen de manera rápida hasta una concentración de 0,3000m en el cual entran en una meseta en la cual ya se mantiene prácticamente igual. En cuanto a las áreas de los picos, que permiten luego calcular las entalpías se observa que crecen rápidamente, pero alcanzan un máximo a la misma concentración de 0,3000m para luego disminuir a medida que aumenta la concentración. No se encuentran reportes del cambio en la estabilidad de la BSA con el Met_4NBr , sin embargo, Tuhina [129] estudia el efecto del bromuro de tetraetilamino en diferentes proteínas globulares incluidas la BSA, encontrando que al aumentar la concentración de la sal se disminuye la temperatura de desnaturalización y por tanto la estabilidad de la proteína. Atribuye esta disminución en la estabilidad a una mayor interacción de la sal con el estado desplegado de la proteína, es decir una mayor interacción de residuos hidrofóbicos con la sal.

El efecto contrario al analizar los resultados del Met_4NBr , evidencian entonces que esta sal interactúa preferentemente con el estado nativo de la proteína seguramente a través de interacciones electrostáticas siendo poco significativa su parte apolar durante el proceso. Las demás sales generan un efecto desestabilizante, que es el esperado de acuerdo con los reportes previos [116], [117], [130], [131].

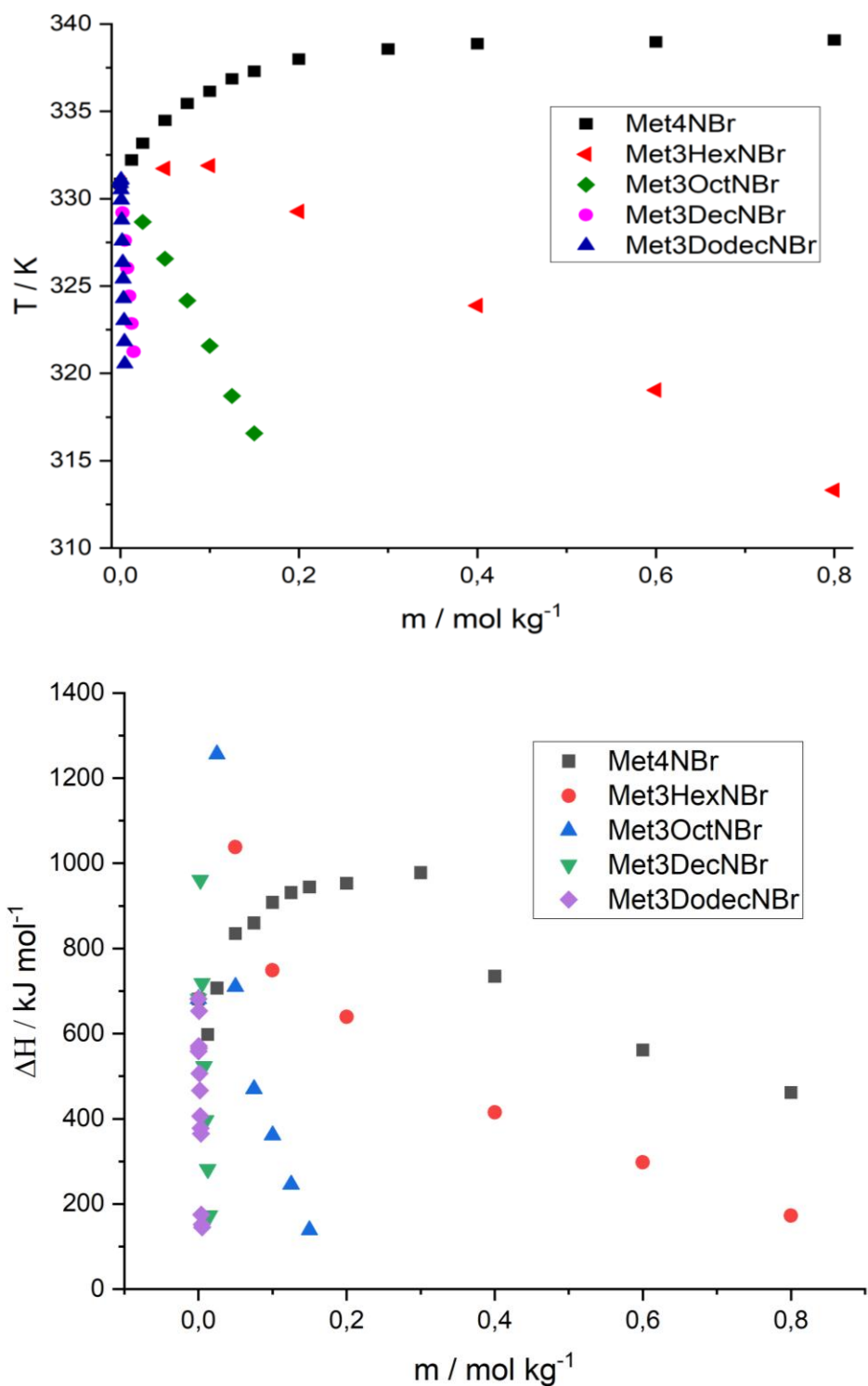
Tabla 6. Temperatura media de desnaturalización y entalpía calorimétrica para el proceso de desnaturalización térmica de la BSA en soluciones acuosas de diferentes concentraciones de sales de tetraalquilamonio a pH 7,00

STAA / mol kg ⁻¹ x 10 ³	T_m^a /K	ΔH / kJ mol ⁻¹
Met₄NBr		
0,0	330,9	682,0
12,5	332,2	597,9
25,0	333,2	706,8
50,0	334,5	835,1
75,0	335,4	860,0
100,0	336,1	908,3
125,0	336,9	931,2
150,0	337,3	944,3
200,0	338,0	952,9
300,0	338,6	978,2
400,0	338,9	734,5
600,0	339,0	561,6

800,0	339,1	461,6
Met₃HexNBr		
50,0	331,7	1038,1
100,0	331,9	748,5
200,0	329,3	639,1
400,0	323,9	414,7
600,0	319,0	297,4
800,0	313,3	172,6
Met₃OctNBr		
25,0	328,7	1256,1
50,0	326,6	710,4
75,0	324,2	470,2
100,0	321,6	361,4
125,0	318,7	246,1
150,0	316,6	139,1
Met₃DecNBr		
2,5	329,2	960,9
5,0	327,6	718,1
7,5	326,0	523,4
10,0	324,4	396,2
12,5	322,8	281,8
15,0	321,2	172,8
Met₃DodecNBr		
0,25	331,1	558,8
0,50	331,1	570,7
0,75	330,5	566,0
1,00	329,9	652,9
1,50	328,8	506,6
2,00	327,6	466,6
2,50	326,4	406,7
3,00	325,4	377,6
3,50	324,3	364,8
4,00	323,0	174,6
4,50	321,8	151,7
5,00	320,5	145,1

^a La desviación estándar típica calculada para la temperatura y la entalpía determinada a partir de repeticiones independientes de DSC es de 0,3 K y 17,6 kJ mol⁻¹, respectivamente. $u(m) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$

Figura 32. Temperatura media de desnaturalización y entalpía calorimétrica para el proceso de desnaturalización térmica de la BSA en función de las concentraciones de sales de tetraalquilamonio a pH 7,00



3.1.3 Curvas de estabilidad de la BSA

Usando la ecuación de Gibbs-Helmholtz, es posible determinar el cambio de energía de Gibbs a cualquier temperatura dentro de un rango de temperaturas [51]. Se hace uso del valor obtenido experimentalmente del cambio en la capacidad calorífica entre el estado nativo y el desnaturalizado $\Delta C_p = 23,81 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, este valor es menor al reportado por Barone [132] a pH 7 de $32,4 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

En la figura 33, se muestran las curvas de estabilidad usando los valores calculados para el cambio en la energía de Gibbs para cada STAA empleado en este estudio que se observan en el Anexo A, Tablas A1-A7.

Revisando las tendencias de en estas tablas y gráficas tenemos que: para el Me_4NBr el ΔG aumenta con la concentración de la STAA, con excepción de las tres concentraciones mayores que salen de la tendencia debido a que la entalpía correspondiente no sigue la tendencia a aumentar con la concentración sino por el contrario disminuye como se observa en la figura 32. En cuanto a las siguientes STAA vemos una disminución del valor de ΔG con relación a la concentración. Salen de esta tendencia las tres primeras concentraciones de $\text{Met}_3\text{DodecNBr}$ cuyos valores de entalpía asociada al proceso están fuera de la tendencia general que proponen los demás valores como se observa en la figura 32.

Se puede determinar el cambio en la estabilidad de la BSA ($\Delta\Delta G$) definido como se observa en la ecuación 66, como la diferencia entre el cambio en la energía de Gibbs de la BSA en presencia de STAA y en solución de amortiguador de pH.

$$\Delta\Delta G = \Delta G^{STAA} - \Delta G^{buffer} \quad (66)$$

Los resultados obtenidos para el cambio en la energía de Gibbs de estabilización $\Delta\Delta G$ de la BSA en presencia de STAA en buffer a pH=7,00, a la temperatura media de transición de la BSA, donde $\Delta G = 0$ se encuentran consignados en la Tabla 7.

Figura 33. Curvas de estabilidad para la BSA en presencia de sales de tetraalquilamonio calculadas a partir de los parámetros termodinámicos obtenidos por DSC

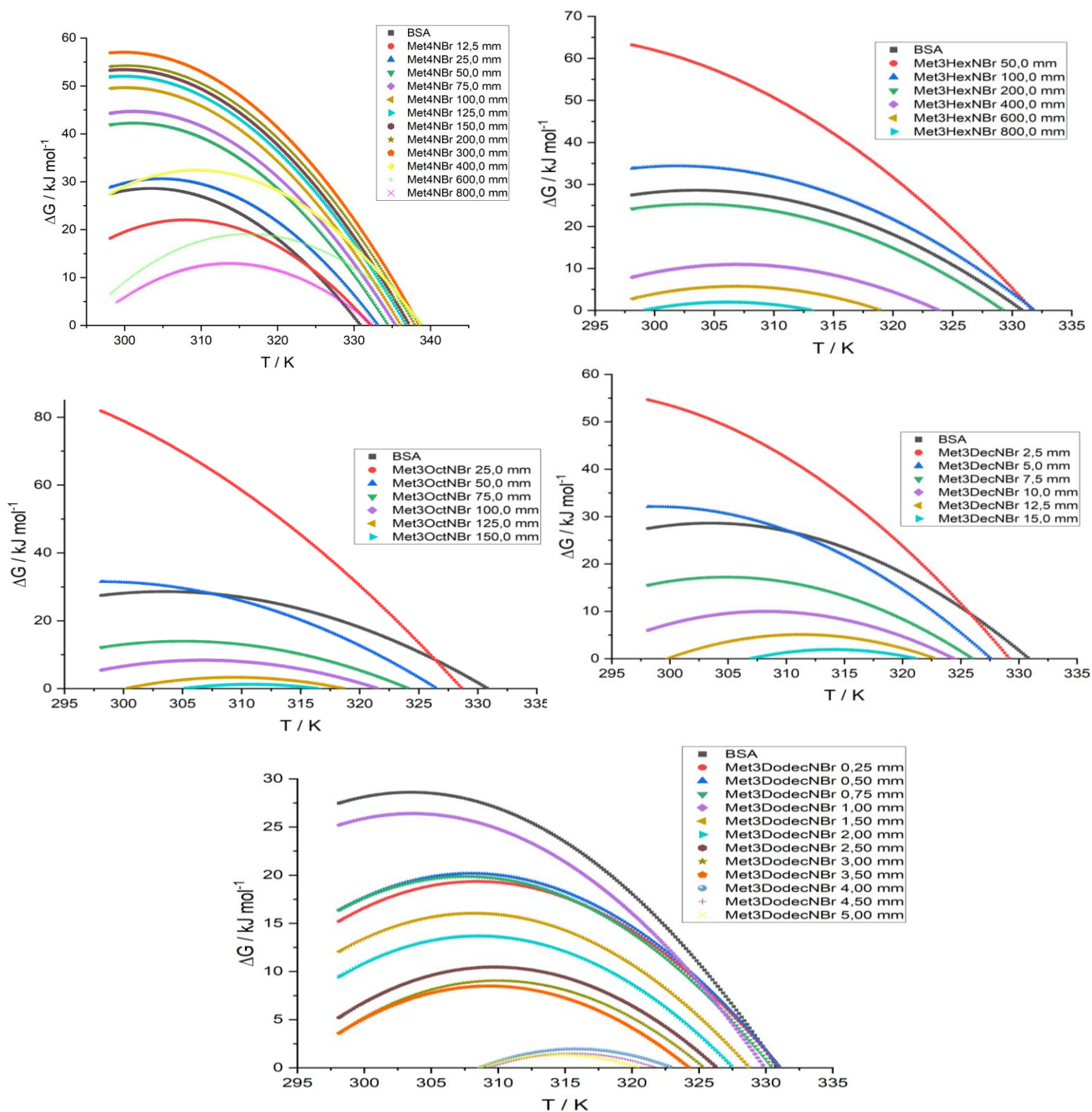


Tabla 7. Diferencia en la energía de Gibbs de estabilización $\Delta\Delta G$ de la BSA en soluciones acuosas de STAA a pH 7,00.

STAA/ mol kg ⁻¹ x 10 ³	T _m / K	$\Delta\Delta G$ / kJ mol ⁻¹
Met₄NBr		
0,0	330,9	0,0
12,5	332,2	2,5
25,0	333,2	4,9
50,0	334,5	8,8
75,0	335,4	11,2
100,0	336,1	13,5
125,0	336,9	15,5
150,0	337,3	16,8
200,0	338,0	18,5
300,0	338,6	20,4
400,0	338,9	15,2
600,0	339,0	11,2
800,0	339,1	8,9
Met₃HexNBr		
0,0	330,9	0,0
50,0	331,7	3,0
100,0	331,9	2,5
200,0	329,3	-3,0
400,0	323,9	-10,5
600,0	319,0	-16,0
800,0	313,3	-21,0
Met₃OctNBr		
0,0	330,9	0,0
25,0	328,7	-8,2
50,0	326,6	-9,8
75,0	324,2	-11,1
100,0	321,6	-13,4
125,0	318,7	-13,9
150,0	316,6	-13,7
Met₃DecNBr		
0,0	330,9	0,0
2,5	329,2	-4,6

5,0	327,6	-7,3
7,5	326,0	-8,4
10,0	324,4	-9,2
12,5	322,8	-9,2
15,0	321,2	-8,4

Met₃DodecNBr

0,00	330,9	0,0
0,25	331,1	0,5
0,50	331,1	0,6
0,75	330,5	-0,4
1,00	329,9	-1,7
1,50	328,8	-3,2
2,00	327,6	-4,9
2,50	326,4	-6,2
3,00	325,4	-7,3
3,50	324,3	-8,8
4,00	323,0	-6,4
4,50	321,8	-7,1
5,00	320,5	-8,5

La desviación estándar típica en la temperatura y en el cambio de energía de Gibbs determinada a partir de las mediciones de DSC es de 0,3 K y 2,6%, respectivamente.
 $u(m) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$

La tendencia del cambio en la estabilidad de la BSA ($\Delta\Delta G$) lleva un comportamiento similar al de la entalpía de desnaturalización.

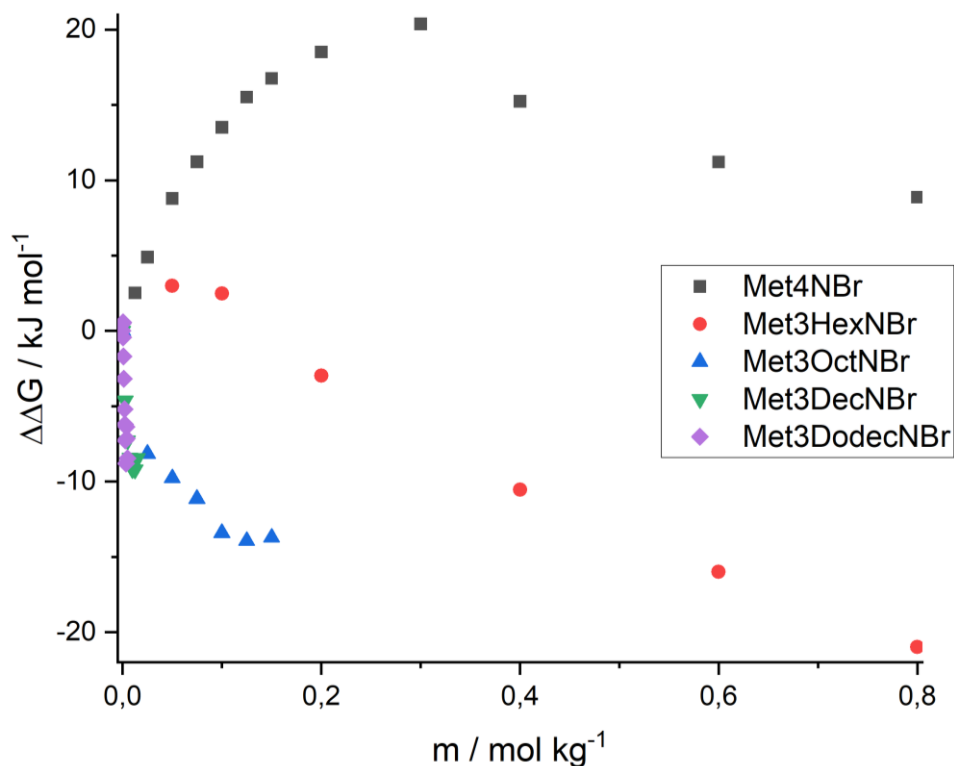
Si comparamos los resultados del cambio de estabilidad a una concentración de 0,0500 m es mayor para el Met₄NBr ya que se trata de una STAA estabilizante, luego seguiría el Met₃HexNBr y el Met₃OctNBr lo que nos mostraría un efecto desestabilizante mayor del Met₃OctNBr. Debido a las diferencias en los rangos de concentración trabajada no es posible comparar con las dos siguientes STAA, pero si usamos por ejemplo el valor de concentración de 0,0150 m encontramos que los dos solutos son desestabilizantes pero con un efecto mayor para el Met₃DodecNBr que para el Met₃DecNBr.

Sin embargo, analizando los todos los resultados obtenidos hasta aquí, podemos proponer que el efecto desestabilizante depende del largo de la cadena hidrocarbonada de la STAA siguiendo entonces el siguiente orden:

Met₃HexNBr < Met₃OctNBr < Met₃DecNBr < Met₃DodecNBr

Y este efecto se incrementa de manera general al aumentar la concentración de la sal. Mientras que el Met4NBr tiene un efecto estabilizante aumentando este efecto con la concentración de la STAA.

Figura 34. Cambio en la estabilidad de la BSA en buffer a pH 7,00 determinado usando calorimetría diferencial de barrido



3.2 Tensión superficial de las STAA

Se investigó la influencia de diferentes sales de tetraalquilmonio en el proceso de adsorción de la proteína albúmina sérica bovina en solución acuosa sobre la interfase líquido-aire a 298,15 K.

Las STAA tienen un efecto importante en la adsorción de proteínas en la interfase aire-líquido, además porque pueden ejercer una adsorción competitiva con moléculas de proteínas. La tensión superficial de las soluciones salinas se

determinó en función de la fracción molar. Los datos experimentales de densidad y tensión superficial se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Tensión superficial (γ) y densidad (ρ) de las soluciones acuosas de sales de tetraalquilamonio a 298,15K.

X_{STAA} $\times 10^3$	Me ₄ NBr		Met ₃ HexNBr		Met ₃ OctNBr		X_{STAA} $\times 10^4$	Met ₃ DecNBr		X_{STAA} $\times 10^4$	Met ₃ DodecNBr	
	$\rho / \text{g mL}^{-1}$	$\gamma /$ (mN m ⁻¹)	$\rho / \text{g mL}^{-1}$	$\gamma /$ (mN m ⁻¹)	$\rho / \text{g mL}^{-1}$	$\gamma /$ (mN m ⁻¹)		$\rho / \text{g mL}^{-1}$	$\gamma /$ (mN m ⁻¹)		$\rho / \text{g mL}^{-1}$	$\gamma /$ (mN m ⁻¹)
0,00	0,997046	72,06	0,997046	72,06	0,997046	72,06	0,0	0,997046	72,06	0,0	0,997046	72,06
0,45	0,998057	72,15	0,997823	70,44	0,997741	66,80	0,4	0,997109	70,33	0,4	0,997097	62,22
0,90	0,999054	72,23	0,998594	68,88	0,998425	62,39	0,9	0,997168	68,54	0,7	0,997133	56,41
1,35	1,000044	72,32	0,999393	66,99	0,999135	58,91	1,4	0,997229	65,84	0,9	0,997154	52,18
1,80	1,001001	72,41	1,000131	65,08	0,999822	56,04	1,8	0,997292	64,10	1,1	0,997176	48,29
3,59	1,005016	72,46	1,003070	59,03	1,002378	49,98	2,2	0,997371	61,55	1,4	0,997208	43,21
							3,6	0,997540	57,12	1,8	0,997261	38,67

^a Las incertidumbres estándar son: $u(x_2 \times 10^4) = 0,2$, $u(\gamma) = 0,06 \text{ mN m}^{-1}$, $u(\rho) = 1,50\text{E-}04 \text{ g mL}^{-1}$ (max)

Para las sales consideradas en este estudio, se observa experimentalmente que la densidad aumenta ligeramente a medida que la concentración de sal se hace más grande. La tensión superficial de la solución de bromuro de tetrametilamonio aumenta a medida que la fracción molar del electrolito se hace más grande siguiendo el comportamiento típico de los electrolitos [133]–[135]. Para el bromuro de hexiltrimetilamonio, el bromuro de octiltrimetilamonio, el bromuro de deciltrimetilamonio y el bromuro de dodeciltrimetilamonio, la tensión superficial disminuye con la fracción molar de las sales, siguiendo un comportamiento similar al reportado en la literatura para estos surfactantes [136]–[141].

La Tabla 9, presenta las pendientes límite de la tensión superficial para soluciones acuosas de sales de tetraalquilarmonio a 298,15K. $(\partial\gamma / \partial X_2)_{X_2 \rightarrow 0}$. La pendiente límite de la curva de tensión superficial del bromuro de tetrametilamonio es positiva

indicando que el exceso superficial es negativo, la naturaleza hidrófila de la sal de amonio domina su comportamiento en solución acuosa y como resultado, las moléculas de sal no tienden a ser adsorbidas en la interfase líquido-aire.

Se observa un comportamiento diferente con las otras sales. Para el bromuro de hexiltrimetilamonio, el bromuro de octiltrimetilamonio, el bromuro de deciltrimetilamonio y el bromuro de dodeciltrimetilamonio, las pendientes son negativas indicando que el exceso superficial es positivo reflejando que son fácilmente adsorbidos en la interfase; su naturaleza hidrofóbica controla su comportamiento en solución acuosa y su magnitud aumenta a medida que la longitud de los residuos alifáticos se hace mayor, como se espera para los tensoactivos con una importante cadena de hidrocarburos. Los datos de la literatura son escasos, pero la información disponible se presenta en tabla 9.

Tabla 9. Pendientes límite de tensión superficial $(\partial\gamma / \partial X_2)_{X_2 \rightarrow 0}$ de soluciones acuosas de sales de tetraalquilamonio a 298,15K

Sales de tetraalquilamonio	$(\partial\gamma / \partial X_2)_{X_2 \rightarrow 0}$ (mN m ⁻¹)	$(\partial\gamma / \partial X_2)_{X_2 \rightarrow 0}$ (mN m ⁻¹)
	Experimental	Literatura
Met ₄ NBr	197,01 ± 6.08	226 ^b [134]
Met ₃ HexNBr	-3903,38 ± 72.22	-3478 ^b [136]
Met ₃ OctNBr	-9517,98 ± 420.09	-11976 ^b [136]; -9848.8 [137]
Met ₃ DecNBr	-39081,64 ± 977.02	-36484 ^b [136]; -38618 [137]

Met ₃ DodecNBr	-218704,62 ± 2476.58	-201724 ^b [138]
---------------------------	----------------------	----------------------------

^a Incertidumbre estándar: $u(T) = 0,01$ K; $u(\partial\sigma/\partial x_{2lim}) = 0,70$ mN·m⁻¹ (max).

^b Pendiente calculada de los datos reportados.

Las pendientes límite son calculadas usando un limitado grupo de puntos en la región diluida y dependen del rango de concentración y del número de puntos usados en el cálculo, por esta razón la incertidumbre es alta y los valores pueden diferir de los reportados en la literatura.

El signo y la magnitud de las pendientes de las curvas de tensión superficial en función de la fracción molar puede ser usado para ordenar las sales de amonio de acuerdo con su carácter. Observando los resultados el Met₄NBr sería clasificado como un soluto hidrofílico, mientras el Met₃HexNBr, Met₃OctNBr, Met₃DecNBr y Met₃DodecNBr pueden ser considerados como solutos hidrofóbicos y a medida que su longitud de cadena alifática es más grande, incrementa su carácter hidrofóbico.

3.2.1 Adsorción de la BSA en la interfase aire-agua

El cambio en la tensión superficial con el tiempo de la BSA disuelta en agua y en las soluciones acuosas de sales de alquilamonio en la interfase aire-agua se midió a 298,15K. Los resultados obtenidos se utilizaron para determinar los datos de presión superficial que están de acuerdo con los encontrados en la literatura [76], [142], [143].

Los datos experimentales de presión superficial se utilizaron para construir los perfiles de adsorción de la BSA. La reducción de la tensión superficial en la interfase aire-líquido es producida porque la proteína se adsorbe en la interfase

como consecuencia de su carácter anfifílico, el exceso de tensión superficial se hace entonces positivo. Los datos experimentales se ajustaron mediante regresión no lineal utilizando el software OriginPro a dos modelos.

En los modelos, durante una etapa temprana y si la concentración de proteínas en la interfase es baja, se puede suponer que no hay convección. En estas condiciones, el transporte de proteínas desde el seno de la solución a la interfase líquido-aire está controlado por un mecanismo de difusión [77], [78], [84], [142], [144]–[146]. En algunos sistemas se ha observado experimentalmente una etapa inicial de inducción [84], [147]. Después de un rato y a medida que aumenta el tiempo, la concentración de proteínas en la interfase aumenta y la velocidad del proceso es controlado por la adsorción de la proteína y el reordenamiento de las moléculas adsorbidas con los correspondientes cambios conformacionales que incluso pueden inducir la desnaturalización; estos procesos pueden ocurrir en dos o tres pasos. El comportamiento de adsorción y el número de pasos que describen el proceso dependen de la naturaleza de la proteína y el disolvente, pH, presión, temperatura y la presencia de aditivos [146], [148]–[150].

El modelo de dos etapas consiste en un paso inicial y rápido de difusión en el cual las proteínas se mueven desde el seno de la solución hacia la interfase y es descrito con la ecuación 63, seguido por un paso lento que involucra reorganización y desnaturalización descrito por la ecuación 64.

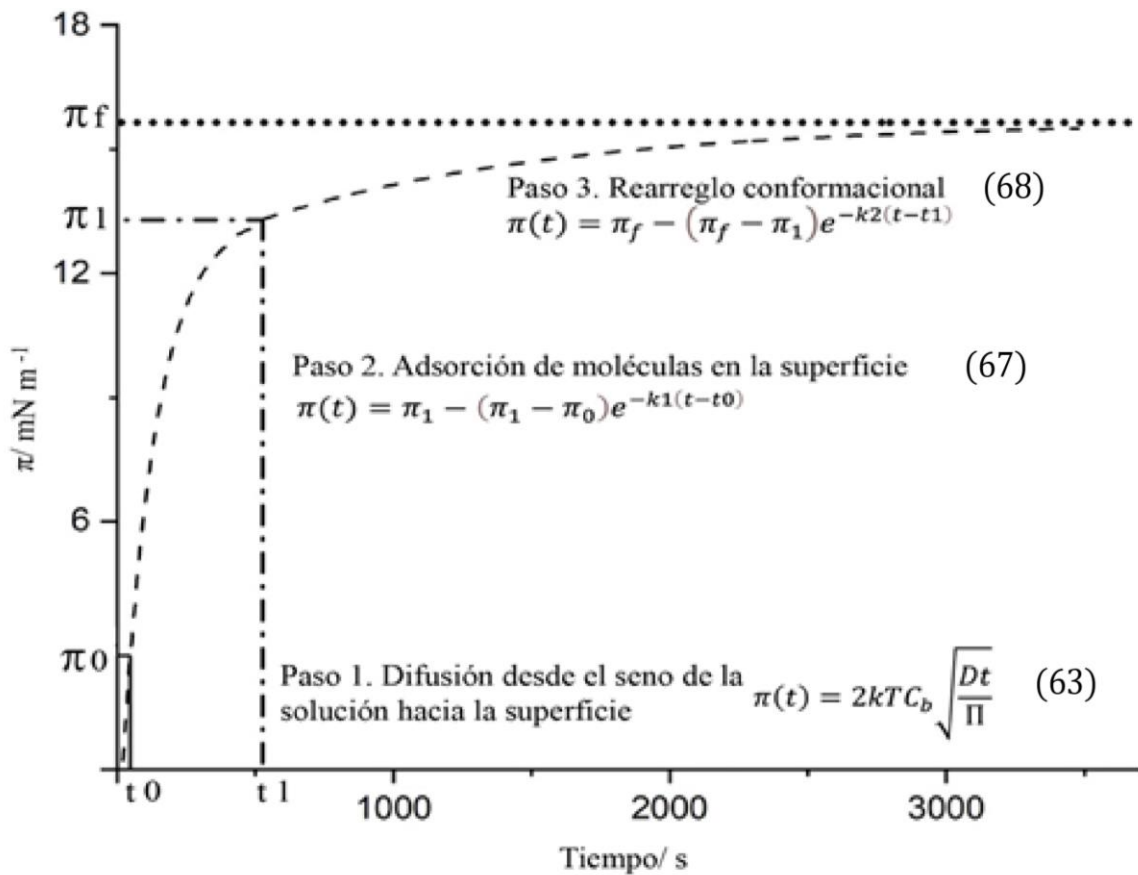
El modelo de tres etapas consiste en un paso inicial y rápido de difusión descrito con la ecuación 63, seguido por un segundo paso en el que la proteína es adsorbida

en la interfase y un tercer paso lento que involucra cambios en la estructura tridimensional de la proteína adsorbida descrita por la ecuación 67 y un rearrreglo molecular descrito por la ecuación 68 en el que la desnaturalización parcial de la proteína puede ocurrir.

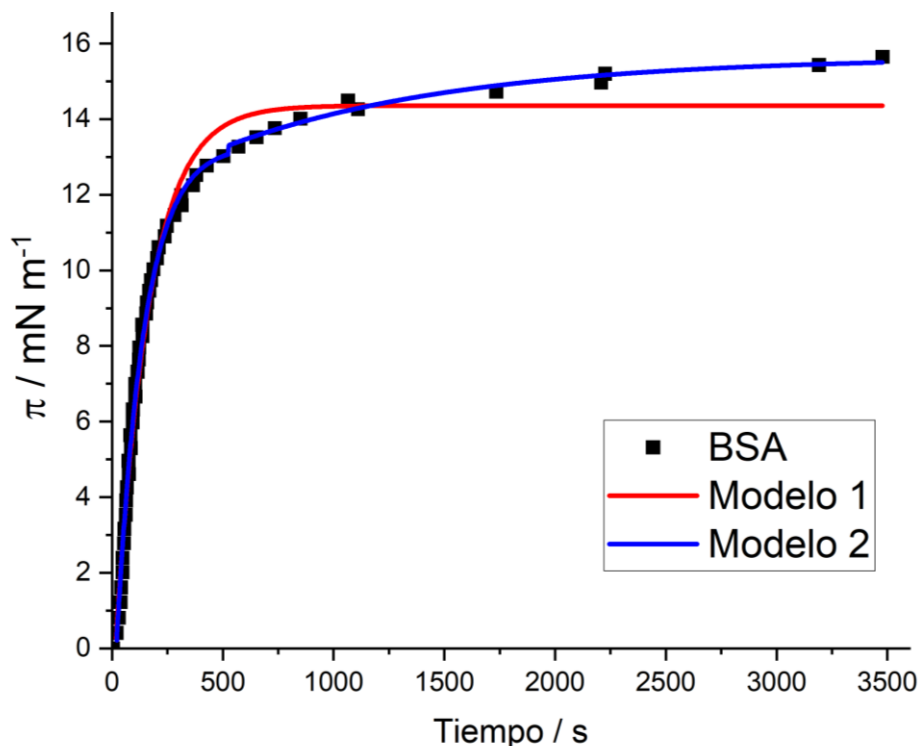
$$\pi = \pi_1 - (\pi_1 - \pi_0)e^{-k_1(t-t_0)} \quad (67)$$

$$\pi = \pi_f - (\pi_f - \pi_1)e^{-k_2(t-t_1)} \quad (68)$$

donde π_f , π_0 y π_1 son respectivamente la presión superficial en los tiempos: final e inicial del primer y segundo paso, t_0 el tiempo inicial de la primera etapa y t_1 el tiempo inicial de la segunda etapa. Las constantes k representan las constantes de velocidad de primer orden de cada proceso. Se puede observar un ejemplo del modelamiento antes planteado por el autor en la figura 35.

Figura 35. Modelamiento del comportamiento experimental de una proteína globular

La figura 36 muestra el perfil experimental de la adsorción en la interfase aire-agua de 1 mg mL^{-1} BSA en solución acuosa a $298,15\text{K}$ y las curvas que representan los dos modelos semiempíricos utilizados para describir el comportamiento cinético de la proteína. La tendencia del comportamiento experimental se ajusta a lo esperado[76]–[78]; los resultados experimentales muestran que la presión superficial aumenta progresivamente con el tiempo y no se observa un desfase temporal que indique que exista un período de inducción durante el proceso.

Figura 36. Perfil de adsorción de BSA en agua a 298,15K.

Los resultados muestran que modelo 2 que incluye tres pasos se ajusta mejor a los datos experimentales obtenidos, mientras que el modelo de dos pasos, modelo 1, no refleja bien el comportamiento experimental. Esto indica que el proceso de adsorción de BSA en la interfase aire-agua puede representarse por tres etapas.

El primer paso que corresponde al paso de difusión ocurre muy rápido y no es posible de determinar utilizando la técnica de volumen de gota como se ha observado en otros estudios [76], [142]. El segundo y tercer paso siguen un comportamiento logarítmico que corresponden a una ecuación de velocidad de primer orden y como se mencionó antes, que describe la velocidad de penetración de la proteína en la interfase aire-agua y el reordenamiento de BSA en la interfase aire-agua.

La tabla 10 presenta los parámetros de adsorción de la albúmina sérica bovina en la interfase aire-agua a 298,15K obtenidos a partir del modelo cinético de tres pasos. En la tabla, la presión final del primer y segundo pasos logarítmicos son: π_{f1} y π_{f2} respectivamente, se presenta la primera constante cinética k_1 que corresponde a la constante de adsorción y k_2 que representa la constante de reordenamiento de la proteína.

Tabla 10. Parámetros de adsorción del modelo cinético de tres pasos para BSA en agua a 298.15K

π_{f1} (mN m ⁻¹)	π_{f2} (mN m ⁻¹)	k_1 (s ⁻¹)	k_2 (s ⁻¹)
13,30	15,65	0,0080	0,0009

^a Las incertidumbres estándar son: $u(\pi) = 0,6$ mN m⁻¹, $u(k_1) = 0,0002$ s⁻¹, $u(k_2) = 0,0004$ s⁻¹

La presencia de la BSA rápidamente disminuye la tensión superficial con respecto a la del agua debido a la migración y adsorción de biomoléculas en la interfase. Como resultado, inicialmente la presión superficial aumenta y luego se observa que la pendiente disminuye mostrando luego la curva una tendencia hacia el equilibrio. El proceso de adsorción se describe a través de las constantes cinéticas de la tabla 10, donde π_{f1} representa la presión superficial al final de la primera etapa y π_{f2} representa la presión final. La primera constante logarítmica k_1 que es la constante de adsorción o penetración es mayor que k_2 que representa la constante de reordenamiento de la biomolécula.

3.2.2 Influencia de las sales de tetraalquilamonio en la adsorción de la BSA en la interfase aire-agua

Para determinar el efecto de las STAA en el comportamiento de la adsorción de la proteína se determinaron los perfiles de adsorción isotérmica de BSA en la interfase aire-líquido en presencia de las sales de alquilamonio a 298,15 K.

Las sales de amonio que tienen un importante residuo alifático: HTAB, OTAB, DTAB y DETAB son moléculas tensoactivas, mientras que el TMAB con cadenas más pequeñas no se considera que tenga una actividad superficial importante. Los surfactantes en soluciones acuosas muy diluidas están presentes como monómeros. A medida que aumenta su concentración en solución, alcanzan la concentración micelar crítica, que representa la concentración en la que se forman las micelas y es característica para cada surfactante. Por debajo de la CMC, se pueden formar agregados, sin embargo, en tensoactivos iónicos a concentraciones por debajo de la CMC, la repulsión electrostática se opone a la formación de agregados. Para evitar la formación de micelas en las soluciones acuosas proteicas, se prepararon las soluciones de HTAB, OTAB y DETAB a concentraciones inferiores a la CMC reportadas [133], [151]–[155].

Los datos experimentales para la BSA en las soluciones de STAA, se ajustan bien al modelo de tres pasos. La figura 37 muestra el perfil de adsorción de BSA en solución acuosa de $\text{Met}_3\text{HexNBr}$ a 298,15 K. Un comportamiento similar se observa en presencia de las otras sales utilizadas en este estudio. A medida que aumenta la concentración de cosolventes, aumenta la presión superficial como se observa en la figura 38.

De acuerdo con el comportamiento experimental observado, los parámetros de adsorción que describen el comportamiento de adsorción de BSA en solución acuosa de sales de tetraalquilamonio a 298,15 K. La Tabla 11 muestra los parámetros de adsorción que caracterizan el modelo cinético de tres pasos para BSA en solución acuosa de HTAB a 298,15K.

Cuando se compara el comportamiento del perfil de la BSA en agua con el de su comportamiento luego de la adición de TMAB se observa que su adición provoca una pequeña disminución de las presiones finales de equilibrio de los dos pasos logarítmicos.

Se observa un comportamiento diferente con la adición de HTAB, OTAB, DETAB y DTAB que tienen una cadena de hidrocarburos más grande.

Figura 37. Efecto del bromuro de hexiltrimetilamonio sobre el perfil de adsorción de BSA en solución acuosa a 298,15 K

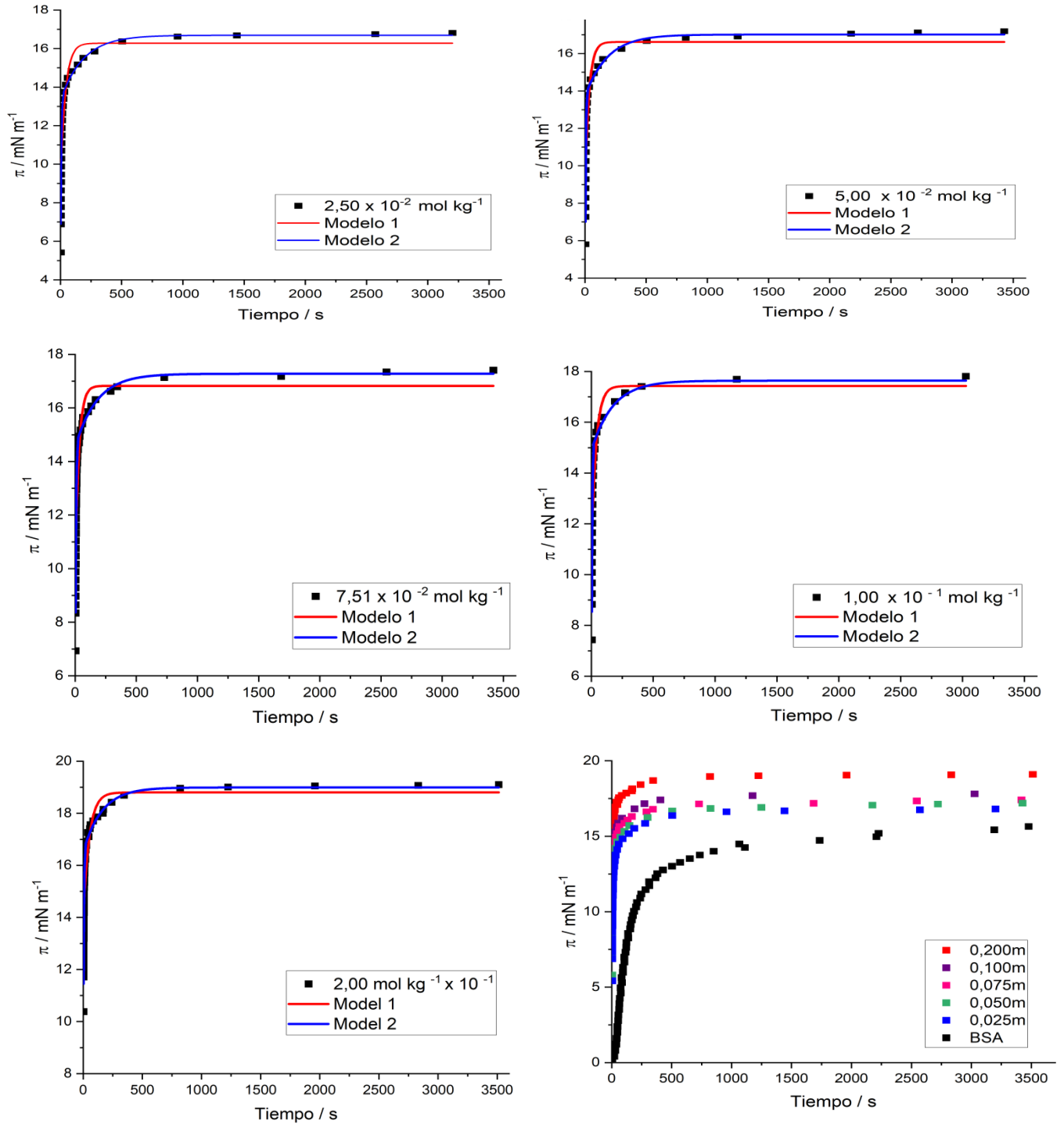


Figura 38. Efecto de las sales de tetraalquilamonio sobre el perfil de adsorción de BSA en solución acuosa a 298,15 K

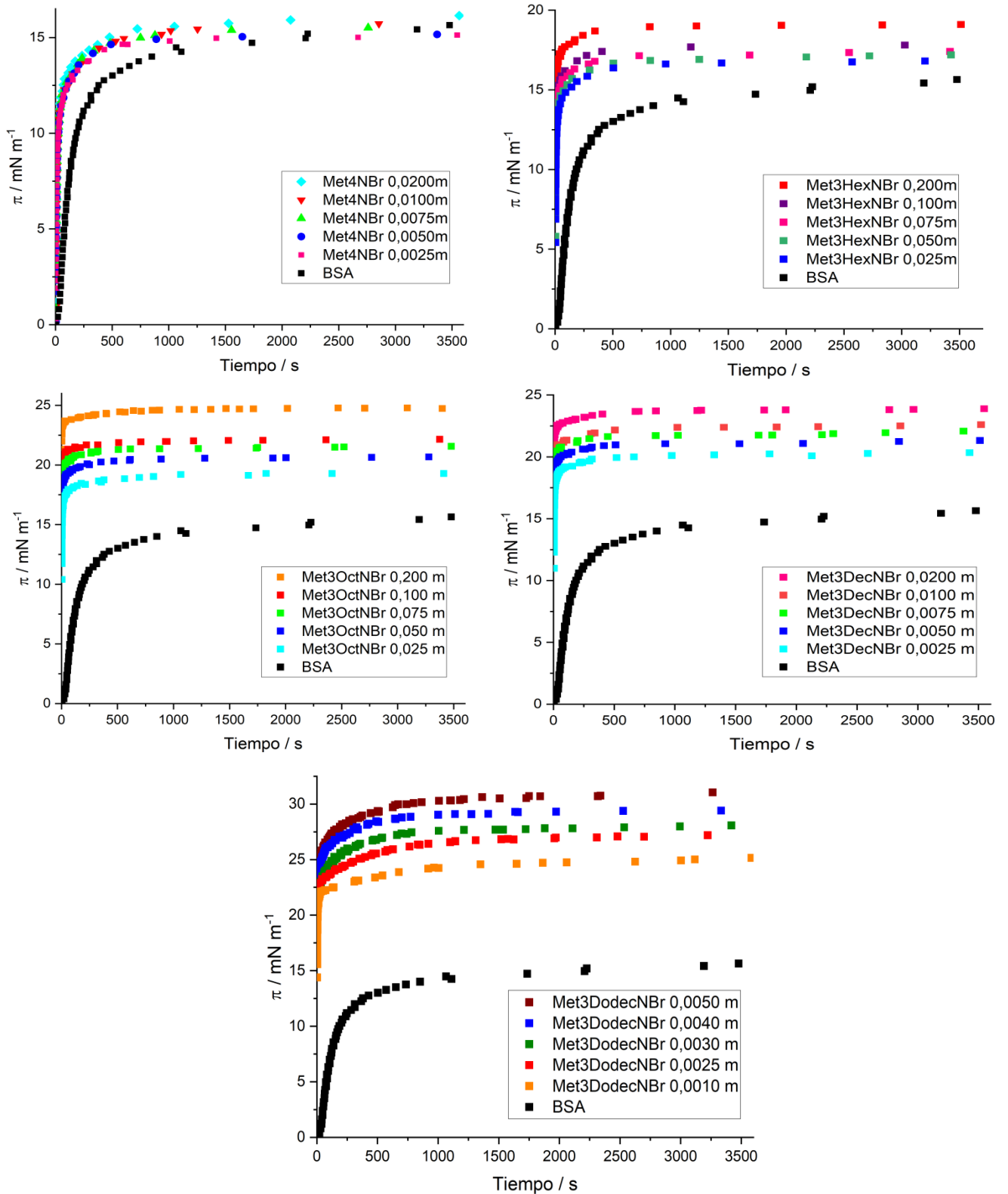


Tabla 11. Parámetros de adsorción del modelo cinético de tres pasos para BSA en solución acuosa de sales de tetraalquilamonio a 298,15 K

STAA / mol kg ⁻¹ x 10 ²	π_{f1} (mN m ⁻¹)	π_{f2} (mN m ⁻¹)	k ₁ (s ⁻¹)	k ₂ (s ⁻¹)
Bromuro de tetrametilamonio				
0,00	13,30	15,65	0,0080	0,0009
2,50	10,50	14,83	0,0150	0,0061
5,00	10,83	15,09	0,0148	0,0060
7,51	10,97	15,19	0,0146	0,0057
10,0	11,15	15,38	0,0142	0,0045
20,0	11,83	15,80	0,0131	0,0040
Bromuro de hexiltrimetilamonio				
0,00	13,30	15,65	0,0080	0,0009
2,50	13,76	16,69	0,0172	0,0057
5,00	14,08	17,01	0,0193	0,0055
7,51	14,87	17,28	0,0180	0,0054
10,0	15,15	17,64	0,0216	0,0058
20,0	16,79	18,99	0,0213	0,0063
Bromuro de octiltrimetilamonio				
0,00	13,30	15,65	0,0080	0,0009
2,50	17,42	19,16	0,0242	0,0045
5,00	19,02	20,55	0,0262	0,0056
7,51	19,85	21,42	0,0274	0,0071
10,0	20,72	22,01	0,0318	0,0072

20,0	23,72	23,72	0,0420	0,0068
Bromuro de deciltrimetilamonio				
0,00	13,30	15,65	0,0080	0,0009
0,25	18,45	20,16	0,0271	0,0053
0,50	19,53	21,12	0,0299	0,0056
0,75	20,37	21,82	0,0311	0,0053
1,00	20,70	22,40	0,0324	0,0054
2,00	22,31	23,75	0,0341	0,0045
Bromuro de dodeciltrimetilamonio				
0,00	13,30	15,65	0,0080	0,0009
0,10	21,98	24,98	0,0195	0,0049
0,25	22,94	27,01	0,0235	0,0039
0,30	23,52	27,77	0,0265	0,0037
0,40	24,98	29,19	0,0322	0,0042
0,50	26,11	30,65	0,0367	0,0055

Las incertidumbres estándar son: $u(m) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$, $u(\pi) = 0,6 \text{ mN m}^{-1}$, $u(k1) = 0,0002 \text{ s}^{-1}$, $u(k2) = 0,0004 \text{ s}^{-1}$

La diferencia en el efecto de las STAA con el TMAB puede deberse a su estructura, que tiene un pequeño dominio hidrofóbico y presenta entonces un comportamiento similar al observado para las sales de amonio simples [135], como se reporta en estudios de la tensión superficial para diferentes haluros de tetraalquilamonio [133], [134]. Las otras sales con una cadena de hidrocarburos más grande muestran el comportamiento típico de los tensoactivos.

La constante cinética k_1 , que describe la adsorción y la tasa de penetración de la proteína en la interfase aire-líquido, es mayor que la constante cinética k_2 , para todos los perfiles de adsorción, lo que sugiere que el paso limitante en el proceso de adsorción de BSA es la adsorción y penetración de la biomolécula en la interfase.

Para todos los sistemas estudiados, la constante cinética k_1 aumenta con la concentración de STAA. En el caso de TMAB, el aumento es muy pequeño y se mantiene aproximadamente constante con el aumento de la concentración de surfactante. Las sales con colas hidrofóbicas mayores ejercen un mayor aumento de la constante k_1 , siendo el aumento mayor a medida que aumenta la longitud de la cadena. Este incremento es consecuencia de la adsorción competitiva en la interfase entre la proteína y los tensoactivos; ambas sustancias disminuyen la tensión interfacial del agua y la adsorción del surfactante es mayor a medida que aumenta la longitud de la cadena de alquilo.

Los resultados muestran que la constante k_2 se hace ligeramente mayor a medida que aumenta la concentración de surfactante, pero no exhiben una tendencia clara con el cambio en la concentración de las sales, lo que sugiere que el proceso de reorganización de la proteína en la interfase no se ve afectado por la concentración de surfactante.

3.2.3 Relación de la tensión superficial de las STAA con la estabilidad de la BSA en solución

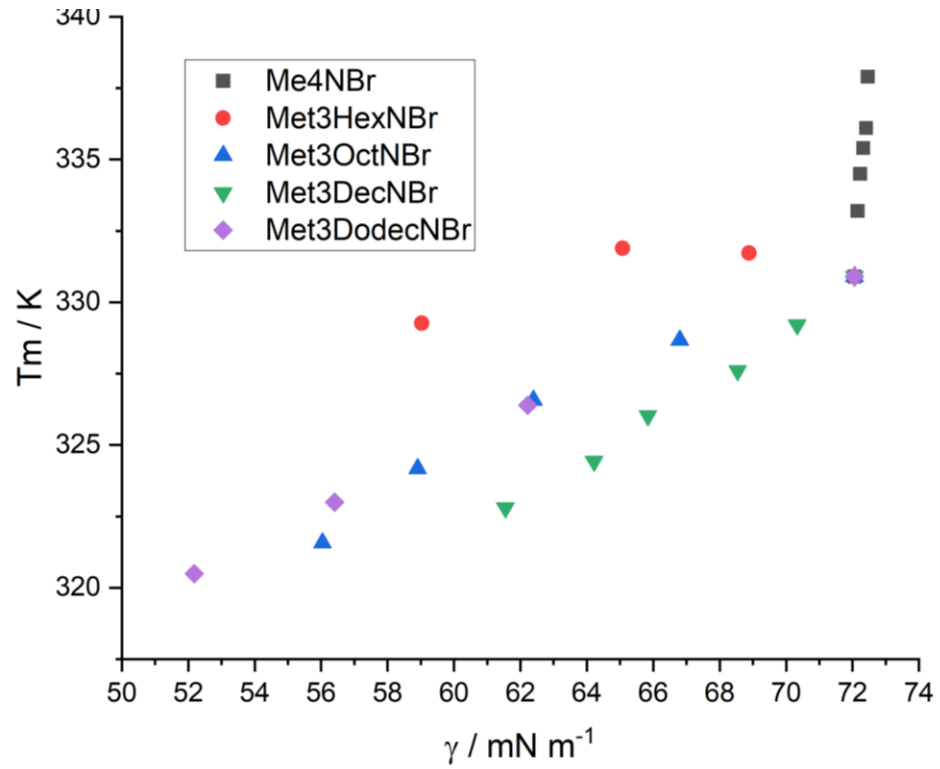
Se debe aclarar primero que las soluciones de BSA en el estudio por DSC tenían una concentración de 3 mg mL^{-1} y estaban en una solución reguladora de fosfatos 10 mM de $\text{pH}=7,00$ mientras que las soluciones para el estudio de propiedades superficiales usando el tensiómetro de volumen de gota usaban soluciones de BSA de 1 mg mL^{-1} en solución acuosa a un pH aproximado de $6,2-6,5$. Aunque las dos condiciones de estudio no son las mismas, es posible relacionarlas para observar las tendencias.

Tabla 12. Temperatura de desnaturalización (T_m) de la BSA en presencia de las sales de tetraalquilamonio a $\text{pH}=7,00$ y tensión superficial (γ) de la BSA en presencia de las STAA en solución acuosa a $298,15 \text{ K}$.

X_{sal} $\times 10^3$	Me ₄ NBr		Met ₃ HexNBr		Met ₃ OctNBr		X_{sal} $\times 10^4$	Met ₃ DecNBr		Met ₃ DodecNBr	
	T_m / K	γ (mN m ⁻¹)	T_m / K	γ (mN m ⁻¹)	T_m / K	γ (mN m ⁻¹)		T_m / K	γ (mN m ⁻¹)	T_m / K	γ (mN m ⁻¹)
0,00	330,9	72,06	330,9	72,06	330,9	72,06	0,0	330,9	72,06	330,9	72,06
0,45	333,2	72,15			328,7	66,80	0,4	329,8	70,33	326,4	62,22
0,90	334,5	72,23	331,7	68,88	326,6	62,39	0,9	327,6	68,54	323,0	56,41
1,35	335,4	72,32			324,2	58,91	1,4	326,0	65,84	320,5	52,18
1,80	336,1	72,41	331,9	65,08	321,6	56,04	1,8	324,4	64,10		
3,59	337,9	72,46	329,3	59,03				322,8	61,55		

Las incertidumbres estándar son: $u(x_2 \times 10^4) = 0,2$, $u(\gamma) = 0,06 \text{ mN m}^{-1}$, $u(T_m) = 0,3 \text{ K}$.

Figura 39. Cambio en la temperatura de desnaturalización en función de la tensión superficial de soluciones albúmina sérica bovina en presencia de sales de tetraalquilamonio a 298,15 K



3.3 Parámetros de interacción preferencial

De acuerdo con lo planteado en los métodos experimentales y haciendo uso de una medida muy precisa de densidades, es posible determinar los parámetros de interacción de la proteína en solución y del efecto de las STAA.

Inicialmente determinamos los volúmenes específicos aparentes de las soluciones de STAA, haciendo uso de la ecuación 50, los resultados se encuentran consignados en la tabla 13. Podemos ver graficados los datos en la figura 41, luego de una conversión en la concentración de las sales desde molalidad a gramos por cada mililitro de solución. Se observa una clara tendencia en la gráfica, así que haciendo un ajuste lineal y extrapolando hacia la mínima concentración, es posible obtener el volumen parcial específico a dilución infinitesimal reflejado en la tabla 14. En la figura 40, encontramos un resumen de las ecuaciones usadas para los cálculos de los parámetros de interacción preferencial.

Figura 40. Diagrama del uso de las ecuaciones para la determinación del parámetro de interacción preferencial.

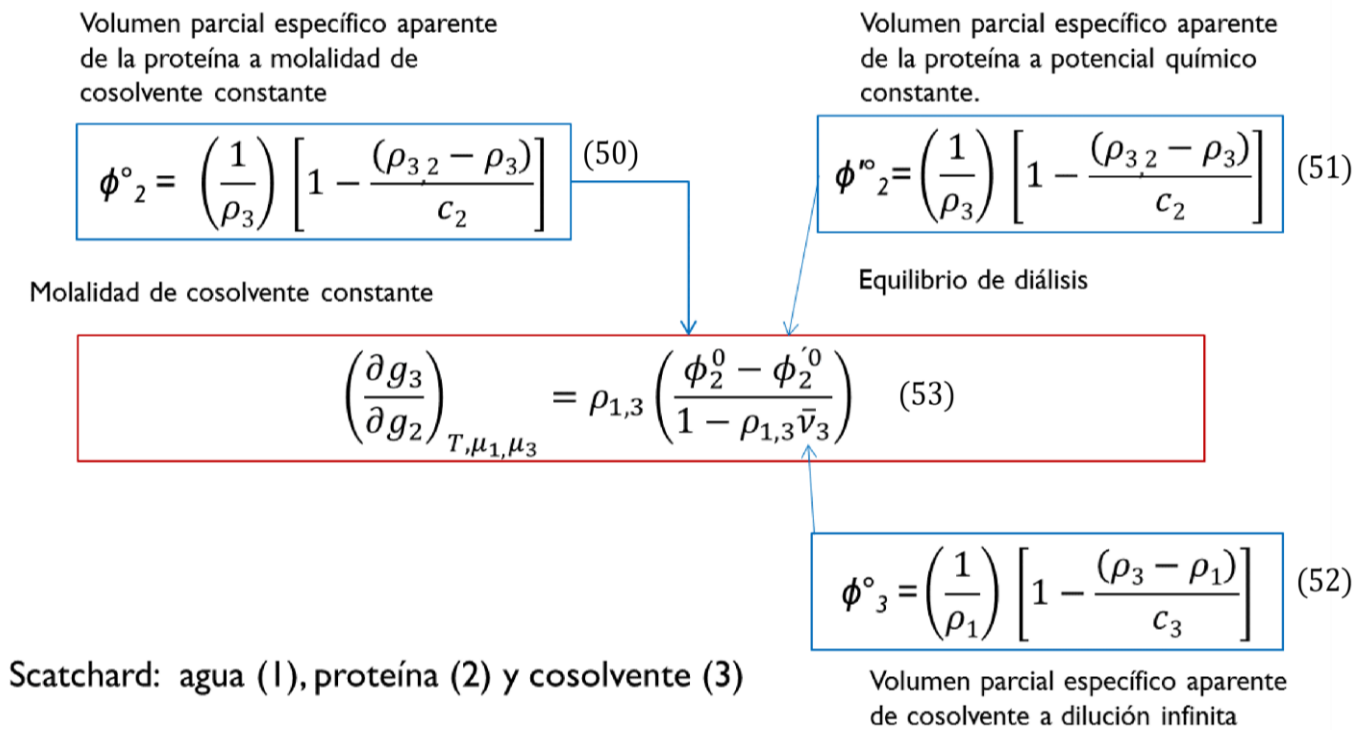
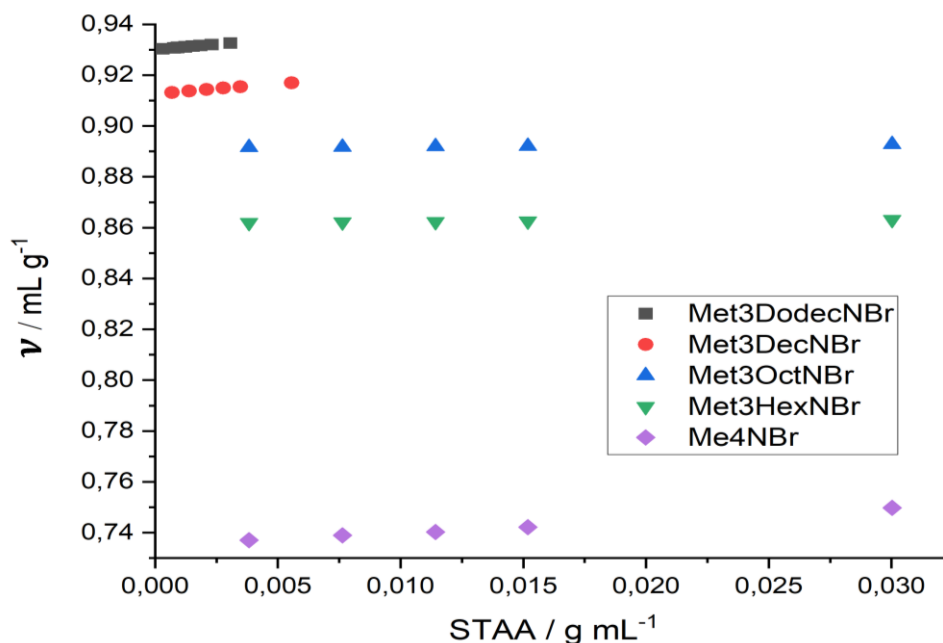


Tabla 13. Densidad (ρ) de las soluciones de sales de alquilamonio y volumen específico aparente (v) y en función de la molalidad (m) a 298,15 K.

Me ₄ NBr			Met ₃ HexNBr		
$m / \text{mol kg}^{-1}$	$\rho / \text{g mL}^{-1}$	$v / \text{mL g}^{-1}$	$m / \text{mol kg}^{-1}$	$\rho / \text{g mL}^{-1}$	$v / \text{mL g}^{-1}$
0,00000	0,997046		0,00000	0,997046	
0,02500 ± 7,2E-05	0,998061	0,7370 ± 0,0071	0,02500 ± 6,5E-05	0,997828	0,8620 ± 0,0064
0,05000 ± 6,6E-05	0,999057	0,7389 ± 0,0066	0,05000 ± 6,1E-05	0,998600	0,8622 ± 0,0061
0,07500 ± 5,7E-05	1,000037	0,7403 ± 0,0060	0,07500 ± 5,7E-05	0,999362	0,8624 ± 0,0055
0,10000 ± 5,2E-05	1,000994	0,7422 ± 0,0056	0,10000 ± 5,1E-05	1,000116	0,8625 ± 0,0052
0,20000 ± 4,8E-05	1,004625	0,7498 ± 0,0052	0,20000 ± 4,5E-05	1,003044	0,8632 ± 0,0049
Met ₃ OctNBr			Met ₃ DecNBr		
$m / \text{mol kg}^{-1}$	$\rho / \text{g mL}^{-1}$	$v / \text{mL g}^{-1}$	$m / \text{mol kg}^{-1}$	$\rho / \text{g mL}^{-1}$	$v / \text{mL g}^{-1}$
0,00000	0,997046		0,00000	0,997046	
0,02500 ± 6,2E-05	0,997740	0,8916 ± 0,0062	0,00250 ± 5,3E-05	0,997109	0,9132 ± 0,0058
0,05000 ± 5,8E-05	0,998425	0,8917 ± 0,0057	0,00500 ± 4,9E-05	0,997170	0,9138 ± 0,0052
0,07500 ± 5,4E-05	0,999100	0,8919 ± 0,0052	0,00750 ± 4,4E-05	0,997231	0,9144 ± 0,0048
0,10000 ± 4,9E-05	0,999765	0,8921 ± 0,0048	0,01000 ± 4,2E-05	0,997291	0,9149 ± 0,0045
0,20000 ± 4,3E-05	1,002334	0,8928 ± 0,0044	0,01250 ± 3,9E-05	0,997350	0,9154 ± 0,0041
			0,02000 ± 3,9E-05	0,997523	0,9169 ± 0,0038
Met ₃ DodecNBr					
$m / \text{mol kg}^{-1}$	$\rho / \text{g mL}^{-1}$	$v / \text{mL g}^{-1}$			
0,00000	0,997046				
0,00100 ± 6,2E-05	0,997068	0,9304 ± 0,0056			
0,00250 ± 5,8E-05	0,997101	0,9307 ± 0,0050			
0,00300 ± 5,4E-05	0,997112	0,9309 ± 0,0047			
0,00400 ± 4,9E-05	0,997134	0,9311 ± 0,0042			
0,00500 ± 4,3E-05	0,997155	0,9314 ± 0,0038			
0,00600 ± 5,4E-05	0,997177	0,9317 ± 0,0035			
0,00750 ± 4,9E-05	0,997209	0,9320 ± 0,0031			
0,01000 ± 4,3E-05	0,997261	0,9326 ± 0,0029			

$u(\rho) = 1,50\text{E-}04 \text{ g mL}^{-1}$ (max), $u(v) = 2,2\text{E-}4 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ (max), $u(m) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$

Se graficaron las densidades de las STTA en función de la concentración molal en la gráfica C1 del anexo C, encontrando como era esperado una relación lineal.

Figura 41. Volumen específico aparente de las STAA en función de la concentración C (g mL^{-1}) a 298,15 K

Los valores del volumen parcial específico a dilución infinitesimal de las STAA a 298,15K en unidades de mL mol^{-1} son: 113,23 para el Me_4NBr , 193,20 para el $\text{Met}_3\text{HexNBr}$, 224,84 para el $\text{Met}_3\text{OctNBr}$, 255,82 para el $\text{Met}_3\text{DecNBr}$ y 286,79 para el $\text{Met}_3\text{DodecNBr}$.

Tabla 14. Volumen parcial específico a dilución infinitesimal (v^0) de las diferentes de STAA a 298,15 K

STAA	$v^0 / \text{mL g}^{-1}$
Me_4NBr	$0,7350 \pm 0,0068$
	0,7452 [156]
$\text{Met}_3\text{HexNBr}$	$0,8618 \pm 0,0065$
	0,8663 [157]
$\text{Met}_3\text{OctNBr}$	$0,8914 \pm 0,0064$
	0,8876 [137] 0,8869 [158]
$\text{Met}_3\text{DecNBr}$	$0,9127 \pm 0,0064$
	1,0925 [159] 1,0973 [137]
$\text{Met}_3\text{DodecNBr}$	$0,9301 \pm 0,0063$
	0,9353 [160] 0,9308 [158]

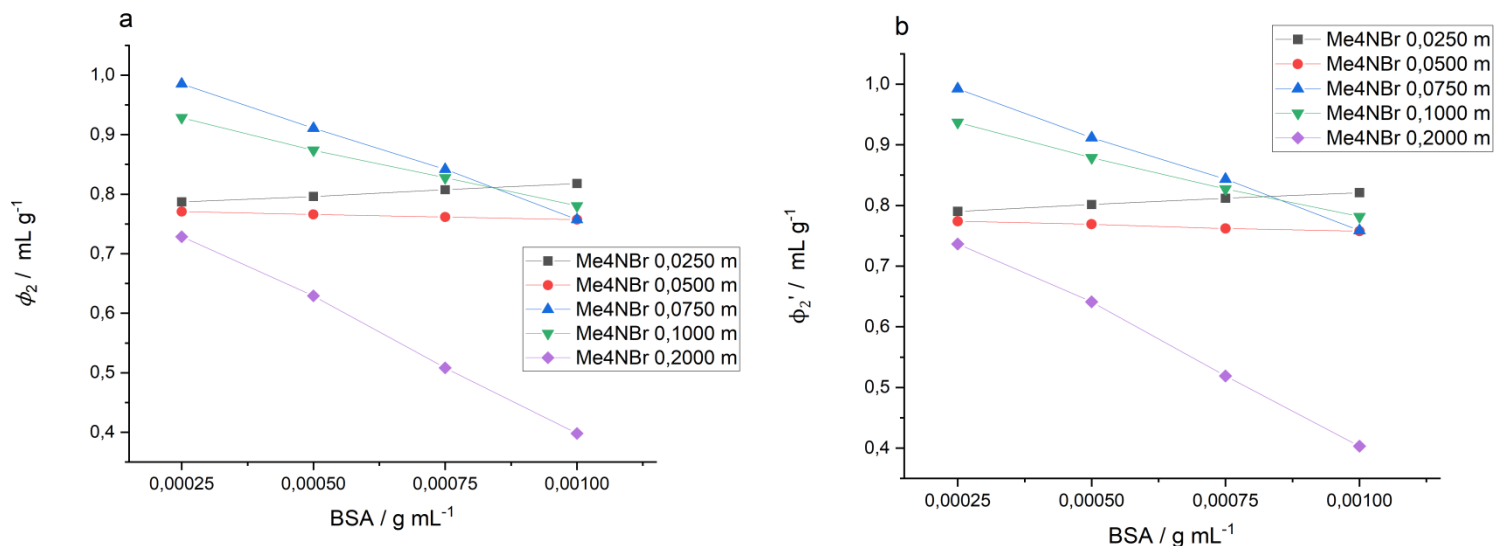
Como se observa en la tabla 14, los valores obtenidos para las STAA concuerdan de buena manera con los resultados reportados en la literatura.

Se determinaron luego los volúmenes específicos aparentes de la BSA en presencia de las STAA, usando las ecuaciones 50 y 51. Los resultados se encuentran consignados en las tablas del anexo C, de la C1 a la C5.

Se graficaron los resultados del volumen específico aparente en función de la concentración de proteína obteniendo las gráficas 42 a la 46, se ajustaron estos datos a una regresión lineal ponderada para determinar el volumen parcial específico a solución infinitesimal, los resultados de la determinación se encuentran en las tablas 15 a la 19.

Usando la ecuación 53 y los resultados hasta aquí obtenidos es posible calcular el parámetro de interacción preferencial que se encuentra graficado en función de la molidad de las STAA en la figura 47.

El parámetro de hidratación preferencial es calculado usando la ecuación 54 y los resultados obtenidos están expuestos en las tablas 15 a la 19.

Figura 42. Volumen específico aparente de la BSA en soluciones acuosas de Me₄NBr (a) molalidad constante (ϕ_2) y (b) potencial químico constante (ϕ_2') a 298,15 K**Tabla 15.** Volúmenes parciales específicos a molalidad constante (ϕ_2), potencial químico constante (ϕ_2') y valores de parámetros de interacción ξ_3 e hidratación preferencial $\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3}$ de la BSA en soluciones acuosas de Me₄NBr a 298,15 K

Me ₄ NBr m / mol·kg ⁻¹	ϕ_2^0 / mL·g ⁻¹	$\phi_2'^0$ / mL·g ⁻¹	ξ_3 / g·g ⁻¹	$\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3}$
0,0250	0,7762 ± 0,0073	0,7804 ± 0,0078	-0,01574 ± 4,2E-04	4,087 ± 0,046
0,0500	0,7751 ± 0,0074	0,7799 ± 0,0073	-0,01806 ± 6,4E-04	2,344 ± 0,026
0,0750	1,0620 ± 0,0086	1,0690 ± 0,0068	-0,02643 ± 3,2E-04	2,287 ± 0,021
0,1000	0,9752 ± 0,0082	0,9856 ± 0,0065	-0,03941 ± 2,5E-04	2,558 ± 0,025
0,2000	0,8441 ± 0,0076	0,8555 ± 0,0058	-0,04380 ± 5,1E-04	1,421 ± 0,011

$u(\rho) = 1,50E-04$ g mL⁻¹ (max), $u(\phi) = 2,2E-4$ mL·g⁻¹ (max), $u(\xi_3) = 2,5E-4$ g·g⁻¹ (max), $u(m) = 1,0 \times 10^{-4}$ mol·kg⁻¹

Figura 43. Volumen específico aparente de la BSA en soluciones acuosas de Met₃HexNBr (a) molalidad constante (ϕ_2) y (b) potencial químico constante (ϕ_2') a 298,15 K

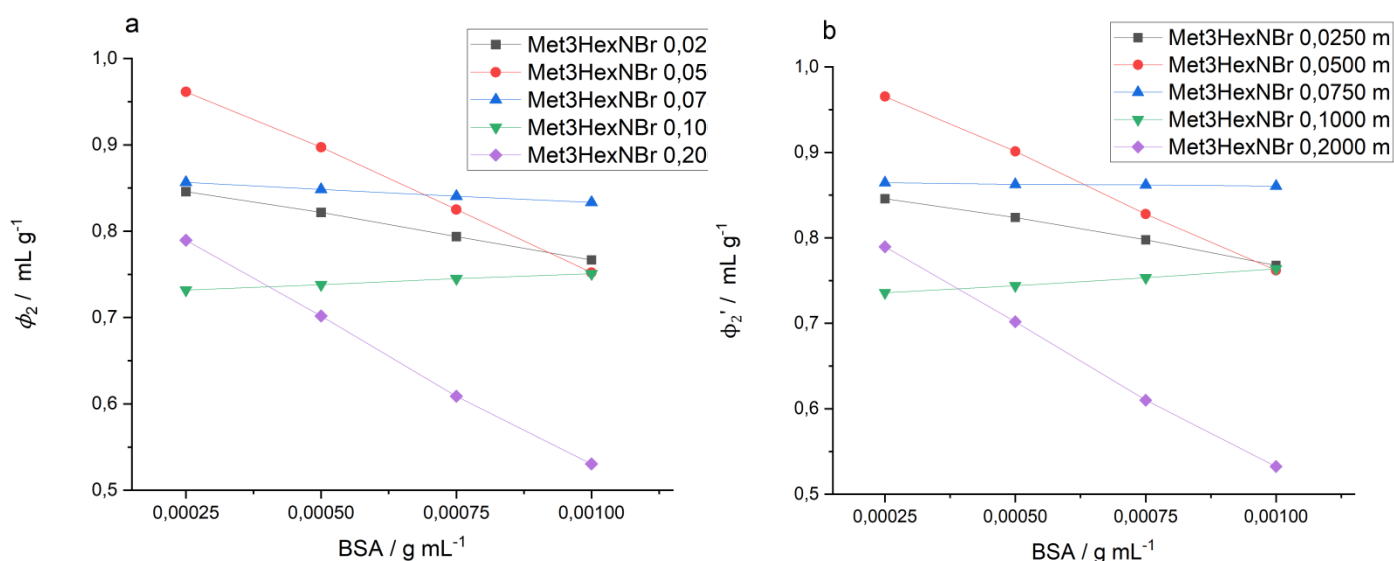


Tabla 16. Volúmenes parciales específicos a molalidad constante (ϕ_2), potencial químico constante (ϕ_2') y valores de parámetros de interacción ξ_3 e hidratación preferencial $\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3}$ de la BSA en soluciones acuosas de Met₃HexNBr a 298,15 K

Met ₃ HexNBr $m / \text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	$\phi_2^0 / \text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	$\phi_2'^0 / \text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	$\xi_3 / \text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	$\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3}$
0,0250	$0,8734 \pm 0,0078$	$0,8739 \pm 0,0077$	$-0,00356 \pm 4,7\text{E-}04$	$0,636 \pm 0,016$
0,0500	$1,0339 \pm 0,0084$	$1,0349 \pm 0,0084$	$-0,00716 \pm 7,6\text{E-}04$	$0,639 \pm 0,016$
0,0750	$0,8641 \pm 0,0077$	$0,8656 \pm 0,0077$	$-0,01080 \pm 1,2\text{E-}04$	$0,643 \pm 0,018$
0,1000	$0,7254 \pm 0,0071$	$0,7259 \pm 0,0071$	$-0,00362 \pm 4,8\text{E-}04$	$0,162 \pm 0,012$
0,2000	$0,8753 \pm 0,0077$	$0,8743 \pm 0,0076$	$0,00740 \pm 7,8\text{E-}04$	$-0,165 \pm 0,012$

$u(\rho) = 1,50\text{E-}04 \text{ g mL}^{-1} \text{ (max)}, u(\phi) = 2,2\text{E-}4 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \text{ (max)}, u(\xi_3) = 2,5\text{E-}4 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ (max)}, u(m) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$

Figura 44. Volumen específico aparente de la BSA en soluciones acuosas de Met₃OctNBr (a) molalidad constante (ϕ_2) y (b) potencial químico constante (ϕ_2') a 298,15 K

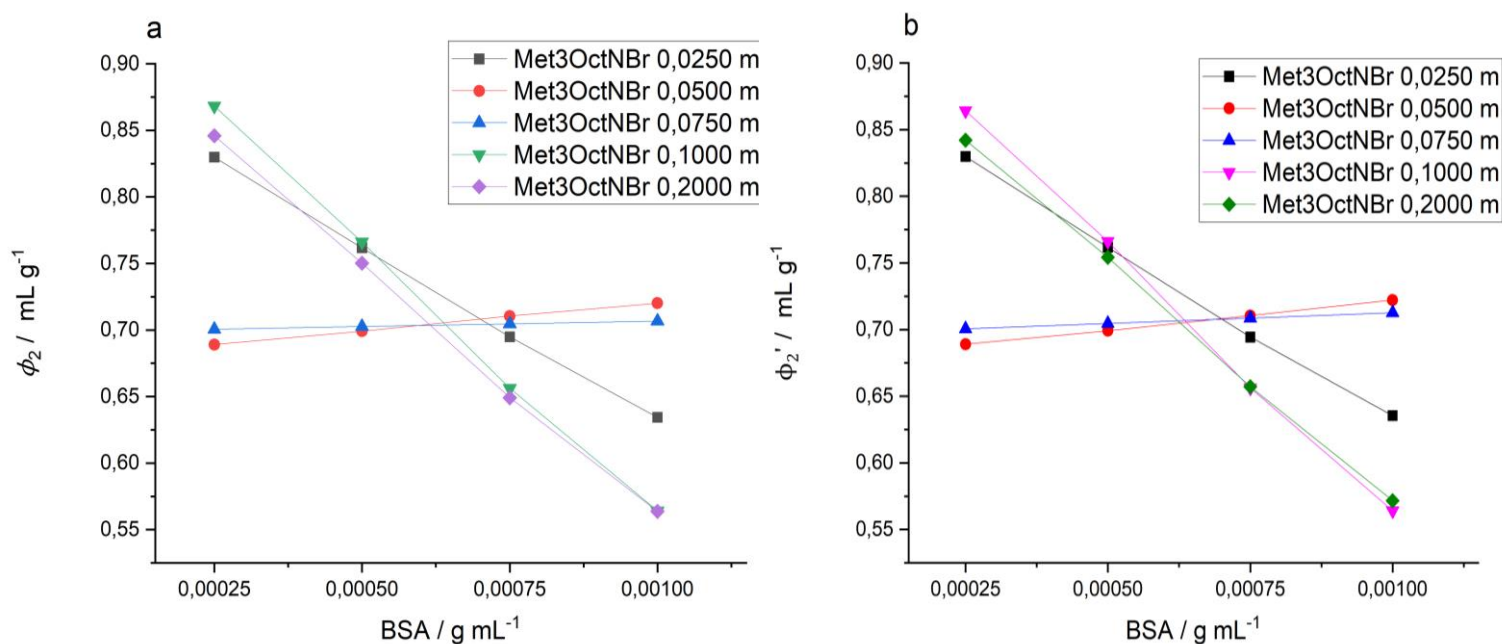


Tabla 17. Volúmenes parciales específicos a molalidad constante (ϕ_2), potencial químico constante (ϕ_2') y valores de parámetros de interacción (ξ_3) e hidratación preferencial ($\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3}$) de la BSA en soluciones acuosas de Met₃OctNBr a 298,15 K

Met ₃ OctNBr <i>m</i> / mol·kg ⁻¹	ϕ_2^0 / mL·g ⁻¹	$\phi_2'^0$ / mL·g ⁻¹	ξ_3 / g·g ⁻¹	$\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3}$
0,0250	0,8935 ± 0,0078	0,8930 ± 0,0078	0,00451 ± 5,5E-04	-0716 ± 0,016
0,0500	0,6786 ± 0,0069	0,6776 ± 0,0069	0,00908 ± 9,2E-04	-0,720 ± 0,018
0,0750	0,6986 ± 0,0070	0,6966 ± 0,0070	0,01828 ± 1,7E-04	-0,966 ± 0,020
0,1000	0,9692 ± 0,0082	0,9652 ± 0,0082	0,03679 ± 3,2E-04	-1,458 ± 0,023
0,2000	0,9389 ± 0,0080	0,9333 ± 0,0080	0,05274 ± 4,4E-04	-1,046 ± 0,019

$u(\rho) = 1,50E-04$ g mL⁻¹ (max), $u(\phi) = 2,2E-4$ mL·g⁻¹ (max), $u(\xi_3) = 2,5E-4$ g·g⁻¹ (max), $u(m) = 1,0 \times 10^{-4}$ mol·kg⁻¹

Figura 45. Volumen específico aparente de la BSA en soluciones acuosas de Met₃DecNBr (a) molalidad constante (ϕ_2) y (b) potencial químico constante (ϕ_2') a 298,15 K

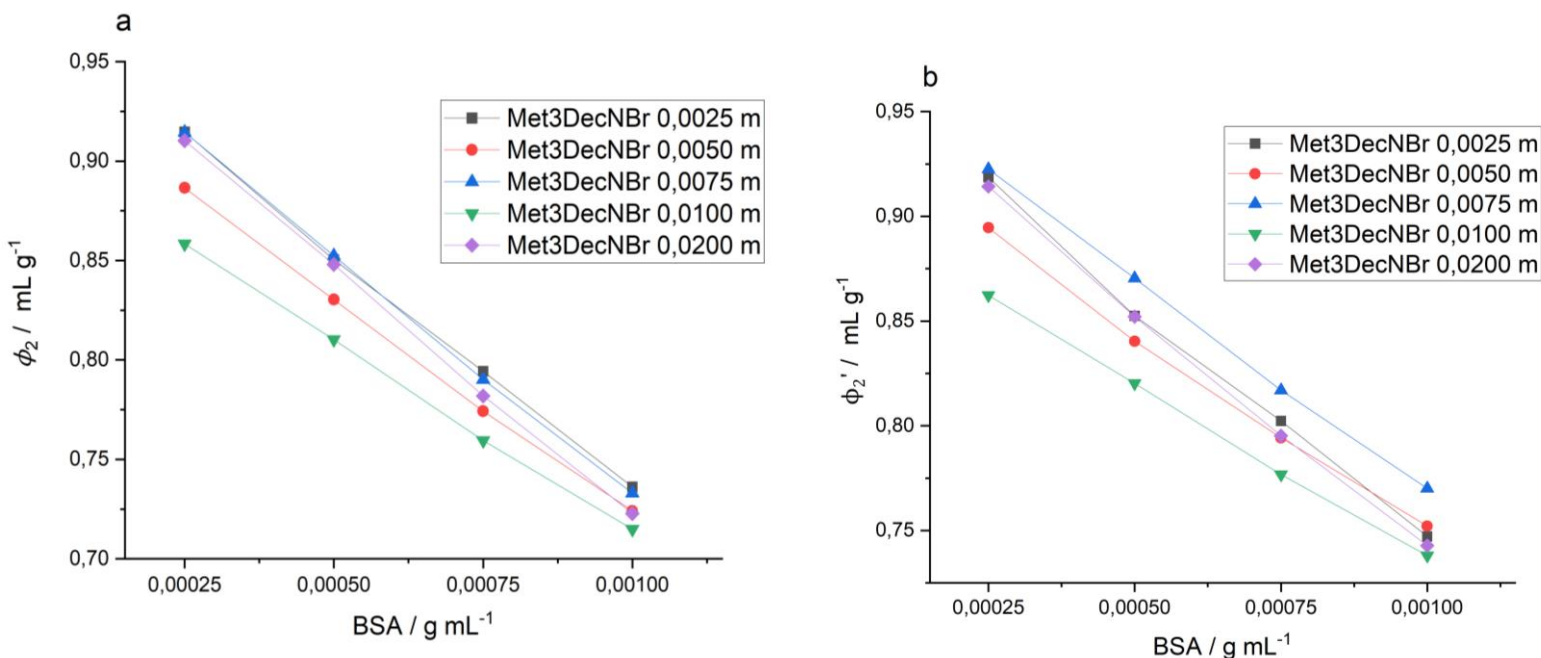


Tabla 18. Volúmenes parciales específicos a molalidad constante (ϕ_2), potencial químico constante (ϕ_2') y valores de parámetros de interacción (ξ_3) e hidratación preferencial ($\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3}$) de la BSA en soluciones acuosas de Met₃DecNBr a 298,15 K

Met ₃ DecNBr <i>m</i> / mol·kg ⁻¹	ϕ_2^0 / mL·g ⁻¹	$\phi_2'^0$ / mL·g ⁻¹	ξ_3 / g·g ⁻¹	$\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3}$
0,0025	0,9718 ± 0,0082	0,9713 ± 0,0082	0,00554 ± 6,3E-04	-7,911 ± 0,076
0,0050	0,9397 ± 0,0080	0,9387 ± 0,0080	0,01109 ± 1,1E-04	-7,916 ± 0,075
0,0075	0,9742 ± 0,0082	0,9727 ± 0,0082	0,01665 ± 1,5E-04	-7,921 ± 0,078
0,0100	0,9060 ± 0,0079	0,9034 ± 0,0079	0,02888 ± 2,5E-04	-10,305 ± 0,095
0,0200	0,9729 ± 0,0082	0,9689 ± 0,0082	0,04456 ± 3,8E-04	-7,949 ± 0,079

$u(\rho) = 1,50E-04$ g mL⁻¹ (max), $u(\phi) = 2,2E-4$ mL·g⁻¹ (max), $u(\xi_3) = 2,5E-4$ g·g⁻¹ (max), $u(m) = 1,0 \times 10^{-4}$ mol·kg⁻¹

Figura 46. Volumen específico aparente de la BSA en soluciones acuosas de Met₃DecNBr (a) molalidad constante (ϕ_2) y (b) potencial químico constante (ϕ_2') a 298,15 K

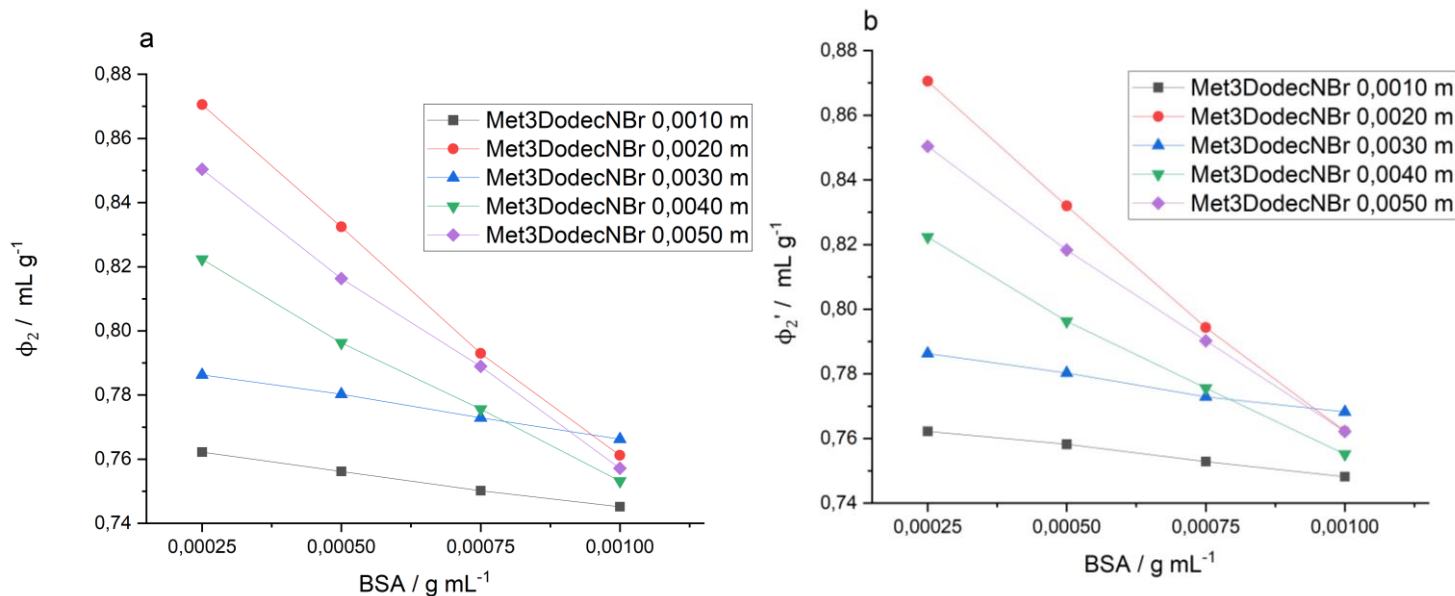


Tabla 19. Volúmenes parciales específicos a molalidad constante (ϕ_2), potencial químico constante (ϕ_2') y valores de parámetros de interacción (ξ_3) e hidratación preferencial ($\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3}$) de la BSA en soluciones acuosas de Met₃DodecNBr a 298,15 K

Met ₃ DodecNBr <i>m</i> / mol · kg ⁻¹	ϕ_2^0 / mL · g ⁻¹	$\phi_2'^0$ / mL · g ⁻¹	ξ_3 / g · g ⁻¹	$\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3}$
0,0010	0,7678 ± 0,0073	0,7672 ± 0,0073	0,00810 ± 8,4E-04	-26,282 ± 0,046
0,0020	0,9061 ± 0,0079	0,9054 ± 0,0079	0,00946 ± 9,5E-04	-15,338 ± 0,026
0,0030	0,7933 ± 0,0074	0,7923 ± 0,0074	0,01351 ± 1,3E-04	-14,610 ± 0,021
0,0040	0,8439 ± 0,0076	0,8429 ± 0,0076	0,01352 ± 1,5E-04	-10,960 ± 0,025
0,0050	0,8801 ± 0,0078	0,8785 ± 0,0078	0,02028 ± 2,8E-04	-13,156 ± 0,011

$u(\rho) = 1,50E-04$ g mL⁻¹ (max), $u(\phi) = 2,2E-4$ mL · g⁻¹ (max), $u(\xi_3) = 2,5E-4$ g · g⁻¹ (max), $u(m) = 1,0 \times 10^{-4}$ mol · kg⁻¹

Al observar en la figura 47 los diferentes valores del parámetro de interacción preferencial se determina que para el Me_4NBr y el $\text{Met}_3\text{HexNBr}$, tienen valores negativos y por tanto estas STAA serían excluidas del dominio de la BSA. En el caso del Me_4NBr los valores se hacen más negativos, como se puede observar en la tabla 15, a medida que aumenta su concentración de tal manera que se plantea que a una mayor concentración de Me_4NBr se genera una mayor exclusión de sus moléculas del dominio de la BSA en solución. Igual comportamiento siguen las tres primeras concentraciones de $\text{Met}_3\text{HexNBr}$, sin embargo, luego cambia su tendencia y en las dos soluciones más concentradas se hace más positivo el valor indicando el efecto contrario al propuesto anteriormente.

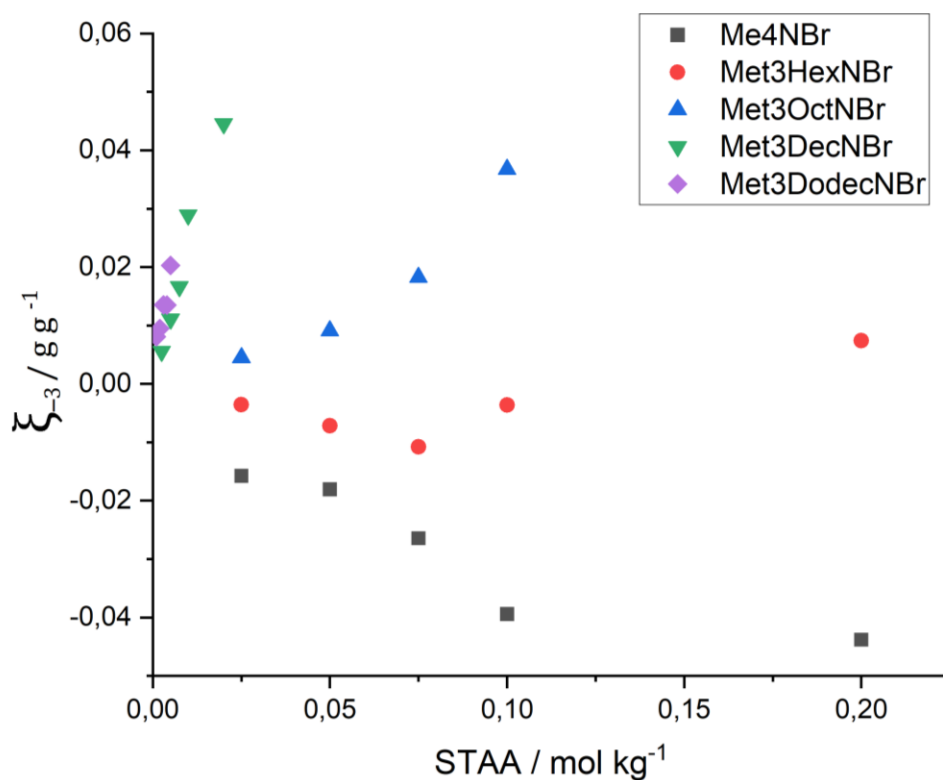
Cuando las moléculas de las STAA son excluidas se presenta una mayor estabilidad de la estructura nativa de la BSA, esta teoría es corroborada al observar los resultados en las temperaturas de desnaturalización (tabla 6 y figura 32) para el Me_4NBr y las tres primeras concentraciones de $\text{Met}_3\text{HexNBr}$, ya que estas temperaturas son mayores a las de la BSA en solución.

Un efecto opuesto se puede deducir al observar el comportamiento del resto de sales: $\text{Met}_3\text{OctNBr}$, $\text{Met}_3\text{DecNBr}$ y $\text{Met}_3\text{DodecNBr}$. Se encuentran parámetros de interacción positivos, que denotan una inclusión de las moléculas de STAA en el dominio de la BSA desplazando moléculas de agua e interactuando así con la proteína. A medida que aumenta la concentración de estas sales el parámetro se hace aún más mayor, lo que provoca una interacción más intensa y genera así una disminución en la estabilidad de la proteína. Estos resultados son también corroborados al contrastar con la tabla 6 y figura 32 en los que se observa una disminución en la temperatura de desnaturalización de la BSA. Este análisis también aplica a las concentraciones más altas del $\text{Met}_3\text{HexNBr}$ (0,1000m y 0,2000m).

Una exclusión de moléculas de STTA genera una mayor estabilidad, debido a que se favorece la hidratación preferencial ya que una interacción de las moléculas de agua con los grupos de la superficie proteica mantiene la estructura del estado nativo de la BSA, lo anterior se refleja en valores positivos del parámetro de hidratación preferencial.

Resultados similares en tendencia se observan para la BSA y otras proteínas globulares en presencia de reactivos que actúan como estabilizadores o agentes desestabilizantes en solución acuosa [69], [70], [161], [162].

Figura 47. Parámetro de interacción preferencial en función de la concentración de STAA.



4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Se estudió el proceso de desnaturalización térmica de la BSA en solución acuosa regulada con un amortiguador de fosfatos 10mM con pH 7,00 en el intervalo de temperaturas de 293,15 K a 348,15 K usando las técnicas de espectroscopía UV-vis y DSC se determina que: el proceso se genera de manera reversible y que ocurre en una transición entre los estados nativo y desplegado, en ausencia de intermediarios.

Usando calorimetría diferencial de barrido, se determinaron los parámetros termodinámicos que caracterizan al proceso obteniendo una temperatura de desnaturalización de 330,9 K, una entalpía de desnaturalización de 682,0 kJ mol⁻¹ y un cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p) que toma un valor de 23,8 kJ mol⁻¹ K⁻¹, los cuales son todos similares a los reportados en estudios previos.

La presencia de Me₄NBr aumenta el valor de la temperatura de desnaturalización del sistema y este efecto aumenta más con la concentración de la sal.

El Me₃HexNBr y Me₃DodecNBr disminuyen la temperatura de desnaturalización y este efecto aumenta más con la concentración de la sal, sin embargo tienen un periodo de transición a concentraciones bajas en el cual no se aprecia un gran cambio en este parámetro del proceso.

La adición de Me₃OctNBr y Me₃DecNBr desestabilizan a la proteína en solución, disminuyendo la temperatura de desnaturalización y este fenómeno se ve más

pronunciado con el aumento de la concentración de estas sales de tetraalquilamonio. Todas la STAA presentan un efecto desestabilizante a excepción de la Me₄NBr.

El cambio en la estabilidad de la BSA calculado usando ($\Delta\Delta G$) propone un efecto desestabilizante que depende del largo de la cadena hidrocarbonada de la STAA siguiendo entonces el siguiente orden: Met₃HexNBr < Met₃OctNBr < Met₃DecNBr < Met₃DodecNBr.

El cambio en la energía de Gibbs que describe el proceso de despliegue térmico de la proteína depende de la concentración de las STAA, confirmando efecto estabilizante del Met₄NBr y desestabilizante del resto de sales empleadas en este estudio sobre la estructura de la proteína.

Los perfiles de adsorción de la proteína en solución acuosa a 298,15 K en la interfase aire-líquido y en soluciones acuosas de sales de tetraalquilamonio se determinaron siguiendo la evolución de la presión superficial en función del tiempo, estos resultados muestran que la proteína es superficialmente activa disminuyendo la tensión superficial del agua.

El proceso de adsorción de la albúmina sérica bovina en agua en la interfase puede representarse mediante un modelo semiempírico de tres pasos y no se observa ningún período de inducción.

El paso inicial se controla por difusión y es demasiado rápido para ser determinado utilizando la técnica de volumen de gota. Un segundo paso corresponde a la adsorción de la proteína en la interfase y un tercer paso implica reordenamientos intramoleculares de la proteína adsorbida.

La adsorción de albúmina sérica bovina en presencia de las sales de tetraalquilamonio en la interfase aire-líquido presenta el mismo comportamiento

que se observa en agua y también se describe mediante un modelo semiempírico de tres pasos.

La constante cinética k_1 es mayor que la constante cinética k_2 , para todos los perfiles de adsorción, lo que sugiere que el paso determinante del proceso de adsorción de BSA en agua y en las soluciones acuosas de sales corresponde a la adsorción y penetración de la proteína en la interfase.

La constante cinética k_1 aumenta con la concentración de sal. El aumento es muy pequeño para TMAB y se mantiene aproximadamente constante con el aumento de la concentración de surfactante.

Las sales con colas hidrofóbicas más largas ejercen un mayor aumento de la constante k_1 , siendo el aumento mayor a medida que aumenta la longitud de la cadena debido a la adsorción competitiva en la interfase entre la proteína y los tensoactivos.

Se observa que la adición de sales de amonio causa un incremento en la constante k_2 con respecto a la reportada de la proteína en agua y que el cambio en la concentración de las sales no muestra una clara correlación con el cambio de la constante k_2 , sugiriendo que el rearrreglo de la proteína en la interfase no está siendo afectado por la concentración de los tensoactivos.

El Me_4NBr presenta valores negativos en el parámetro de interacción preferencial con la BSA, mostrando su exclusión de la proximidad de la proteína y propiciando una mayor estabilidad en la forma nativa de la BSA. Este efecto es incrementado con el aumento de la concentración de la sal.

Las sales de tetraalquilamonio: $\text{Met}_3\text{OctNBr}$, $\text{Met}_3\text{DecNBr}$ y $\text{Met}_3\text{DodecNBr}$ generan un valor de interacción preferencial positiva y este efecto aumenta con su concentración. El efecto desestabilizante de estas sales se hace más pronunciado

a medida que aumentan su cadena alifática, siendo el Met₃DodecNBr la STAA más desestabilizante.

El Met₃HexNBr presenta no muestra un efecto tan definido, mostrando valores negativos que luego incrementan hasta obtener un valor positivo.

De manera general se observa que un incremento en la concentración del Me₄NBr en solución acuosa genera un incremento en la tensión superficial del agua y en su temperatura de desnaturalización.

El Met₃HexNBr, Met₃OctNBr, Met₃DecNBr y Met₃DodecNBr en solución acuosa, muestran tendencia similar, a medida que aumentan su concentración, disminuyen la tensión superficial del solvente y la temperatura de desnaturalización del sistema con proteína.

A través de las diferentes técnicas usadas se confirma el efecto estabilizante sobre la estructura de la proteína al adicionar Met₄NBr. El efecto desestabilizante de las sales utilizadas en este estudio depende del largo de la cadena hidrocarbonada de la STAA siguiendo entonces el siguiente orden: Met₃HexNBr < Met₃OctNBr < Met₃DecNBr < Met₃DodecNBr.

4.2 Recomendaciones

La determinación de los coeficientes de actividad de las STAA haciendo uso de diferentes técnicas como la osmometría, nos permitiría una interpretación mas profunda del fenómeno de adición.

Un estudio del sistema utilizando dicroísmo circular con rampas de temperatura, permitiría conocer los cambios estructurales de la BSA, mientras que el uso de la espectroscopía de fluorescencia permitiría comparar los resultados hasta aquí obtenidos.

Estudiar el proceso de adsorción de la BSA utilizando la técnica del anillo de Du Nouy, permitiría determinar la tensión superficial para tiempos superiores a los que usamos en este estudio (3600 s) teniendo así una mayor confianza en la determinación de la presión de equilibrio en la interfase, mientras que usar la técnica del perfil de gota permitiría obtener datos de tensión superficial para tiempos menores a 60 segundos necesarios para caracterizar el proceso de difusión.

A. Anexo: Desnaturalización térmica de la BSA en soluciones acuosas de STAA

Tabla A1. Variación de la energía libre ΔG , durante el proceso desnaturalización térmica de la BSA en buffer pH 7,00 a diferentes concentraciones de bromuro de tetrametilamonio usando calorimetría diferencial de barrido.

T (K)	ΔG (kJ·mol ⁻¹)						
	BSA	12,5 mm	25,0 mm	50,0 mm	75,0 mm	100,0 mm	125,0 mm
298,1	27,6	18,2	28,8	41,9	44,3	49,5	51,9
299,0	27,9	18,8	29,2	42,1	44,5	49,6	52,0
300,1	28,2	19,6	29,7	42,2	44,6	49,6	52,0
301,1	28,5	20,1	30,0	42,3	44,7	49,6	52,0
302,1	28,6	20,6	30,3	42,3	44,7	49,5	51,8
303,0	28,7	21,1	30,5	42,2	44,5	49,3	51,6
304,0	28,7	21,4	30,5	42,0	44,4	49,0	51,4
305,0	28,6	21,7	30,6	41,7	44,1	48,7	51,0
306,0	28,4	21,9	30,5	41,4	43,8	48,3	50,6
307,0	28,2	22,0	30,4	41,0	43,4	47,8	50,1
308,0	27,9	22,0	30,2	40,5	42,9	47,2	49,5
309,0	27,5	22,0	29,9	39,9	42,3	46,5	48,8
310,0	27,0	21,9	29,5	39,3	41,7	45,8	48,1
311,0	26,5	21,7	29,1	38,6	41,0	45,0	47,3
312,0	25,9	21,4	28,6	37,8	40,2	44,1	46,4
313,1	25,0	21,0	27,9	36,7	39,1	43,0	45,2
314,1	24,2	20,6	27,2	35,8	38,2	41,9	44,1
315,1	23,4	20,1	26,4	34,7	37,1	40,8	43,0
316,1	22,5	19,5	25,6	33,6	36,0	39,6	41,8
317,1	21,5	18,9	24,7	32,4	34,9	38,4	40,5
318,1	20,4	18,2	23,7	31,2	33,6	37,0	39,2
319,1	19,2	17,4	22,7	29,9	32,3	35,6	37,8

320,1	18,0	16,5	21,6	28,5	30,9	34,1	36,3
321,1	16,7	15,6	20,4	27,0	29,4	32,6	34,7
322,1	15,4	14,5	19,1	25,5	27,9	30,9	33,1
323,0	13,9	13,5	17,8	23,8	26,3	29,2	31,3
324,0	12,4	12,3	16,4	22,2	24,6	27,5	29,6
325,0	10,8	11,1	14,9	20,4	22,8	25,6	27,7
326,0	9,2	9,8	13,3	18,6	21,0	23,7	25,8
327,0	7,4	8,4	11,7	16,7	19,1	21,7	23,8
328,0	5,6	6,9	10,0	14,7	17,1	19,7	21,7
329,0	3,8	5,4	8,3	12,6	15,1	17,5	19,6
330,0	1,8	3,8	6,4	10,5	13,0	15,3	17,3
331,0	-0,2	2,2	4,5	8,3	10,8	13,0	15,1
332,0	-2,3	0,5	2,5	6,1	8,5	10,7	12,7
333,1	-4,8	-1,7	0,1	3,3	5,7	7,8	9,8
334,1	-7,1	-3,6	-2,1	0,9	3,3	5,3	7,3
335,1	-9,4	-5,5	-4,3	-1,6	0,8	2,7	4,7
336,1	-11,8	-7,6	-6,5	-4,2	-1,7	0,1	2,0
337,1	-14,2	-9,7	-8,9	-6,8	-4,3	-2,6	-0,7
338,1	-16,7	-11,8	-11,3	-9,5	-7,0	-5,4	-3,5
339,1	-19,3	-14,0	-13,8	-12,2	-9,8	-8,2	-6,3
340,1	-22,0	-16,3	-16,3	-15,1	-12,6	-11,1	-9,2
341,1	-24,7	-18,7	-18,9	-18,0	-15,5	-14,1	-12,2
342,1	-27,5	-21,1	-21,6	-20,9	-18,5	-17,2	-15,3
343,0	-30,3	-23,6	-24,4	-23,9	-21,5	-20,3	-18,4
344,0	-33,2	-26,2	-27,2	-27,0	-24,6	-23,5	-21,6
345,0	-36,2	-28,9	-30,1	-30,2	-27,8	-26,7	-24,9
346,0	-39,3	-31,6	-33,0	-33,5	-31,0	-30,1	-28,2
347,0	-42,4	-34,3	-36,1	-36,8	-34,3	-33,5	-31,6
348,0	-45,6	-37,2	-39,2	-40,1	-37,7	-36,9	-35,1
349,0	-48,9	-40,1	-42,3	-43,6	-41,1	-40,4	-38,6
349,8	-51,5	-42,5	-44,9	-46,4	-43,9	-43,3	-41,5

$u(T) = 0,1K$, $u(\Delta G) = 0,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (max)

Tabla A2. Variación de la energía libre ΔG , durante el proceso desnaturalización térmica de la BSA en buffer pH 7,00 a diferentes concentraciones de bromuro de tetrametilamonio usando calorimetría diferencial de barrido.

T (K)	ΔG (kJ·mol ⁻¹)						
	BSA	150,0 mm	200,0 mm	300,0 mm	400,0 mm	600,0 mm	800,0 mm
298,1	27,6	53,3	54,1	56,9	27,5	6,5	-5,7

299,0	27,9	53,4	54,2	57,0	28,2	7,7	-4,2
300,1	28,2	53,4	54,3	57,0	29,1	9,1	-2,5
301,1	28,5	53,4	54,2	57,0	29,8	10,3	-1,0
302,1	28,6	53,2	54,1	56,8	30,4	11,5	0,4
303,0	28,7	53,0	53,9	56,6	30,9	12,5	1,8
304,0	28,7	52,7	53,7	56,3	31,3	13,5	3,0
305,0	28,6	52,4	53,4	56,0	31,7	14,3	4,2
306,0	28,4	51,9	52,9	55,5	32,0	15,2	5,3
307,0	28,2	51,4	52,5	55,0	32,2	15,9	6,3
308,0	27,9	50,8	51,9	54,4	32,4	16,5	7,3
309,0	27,5	50,1	51,3	53,8	32,4	17,1	8,2
310,0	27,0	49,4	50,5	53,0	32,4	17,6	9,0
311,0	26,5	48,6	49,8	52,2	32,3	18,1	9,7
312,0	25,9	47,7	48,9	51,3	32,2	18,4	10,4
313,1	25,0	46,5	47,8	50,1	31,9	18,7	11,1
314,1	24,2	45,5	46,7	49,1	31,6	18,9	11,6
315,1	23,4	44,3	45,6	47,9	31,2	19,0	12,0
316,1	22,5	43,1	44,4	46,7	30,7	19,1	12,3
317,1	21,5	41,8	43,2	45,5	30,2	19,1	12,6
318,1	20,4	40,5	41,9	44,1	29,5	19,0	12,8
319,1	19,2	39,1	40,5	42,7	28,9	18,8	12,9
320,1	18,0	37,6	39,0	41,2	28,1	18,5	12,9
321,1	16,7	36,0	37,5	39,6	27,3	18,2	12,9
322,1	15,4	34,3	35,8	38,0	26,3	17,8	12,8
323,0	13,9	32,6	34,1	36,2	25,4	17,3	12,7
324,0	12,4	30,8	32,4	34,5	24,3	16,8	12,4
325,0	10,8	29,0	30,6	32,6	23,2	16,2	12,1
326,0	9,2	27,0	28,6	30,7	22,0	15,5	11,7
327,0	7,4	25,0	26,7	28,6	20,7	14,7	11,3
328,0	5,6	23,0	24,6	26,6	19,4	13,9	10,7
329,0	3,8	20,8	22,5	24,4	18,0	13,0	10,1
330,0	1,8	18,6	20,3	22,2	16,5	12,0	9,5
331,0	-0,2	16,3	18,1	19,9	14,9	11,0	8,7
332,0	-2,3	13,9	15,7	17,6	13,3	9,9	7,9
333,1	-4,8	11,0	12,8	14,6	11,3	8,5	6,8
334,1	-7,1	8,5	10,3	12,1	9,5	7,2	5,9
335,1	-9,4	5,9	7,8	9,5	7,6	5,9	4,8
336,1	-11,8	3,3	5,2	6,9	5,7	4,5	3,7
337,1	-14,2	0,5	2,5	4,2	3,7	3,0	2,6
338,1	-16,7	-2,3	-0,3	1,4	1,7	1,4	1,3
339,1	-19,3	-5,1	-3,1	-1,5	-0,5	-0,2	0,0
340,1	-22,0	-8,0	-6,0	-4,4	-2,7	-1,9	-1,4

341,1	-24,7	-11,0	-9,0	-7,4	-4,9	-3,6	-2,8
342,1	-27,5	-14,1	-12,0	-10,5	-7,3	-5,4	-4,3
343,0	-30,3	-17,2	-15,1	-13,6	-9,7	-7,3	-5,9
344,0	-33,2	-20,4	-18,3	-16,8	-12,1	-9,3	-7,6
345,0	-36,2	-23,7	-21,6	-20,1	-14,7	-11,3	-9,3
346,0	-39,3	-27,1	-24,9	-23,4	-17,3	-13,4	-11,1
347,0	-42,4	-30,5	-28,2	-26,8	-19,9	-15,5	-13,0
348,0	-45,6	-33,9	-31,7	-30,3	-22,7	-17,8	-14,9
349,0	-48,9	-37,5	-35,2	-33,9	-25,5	-20,1	-16,9
349,8	-51,5	-40,4	-38,1	-36,7	-27,8	-21,9	-18,5

$u(T) = 0,1K$, $u(\Delta G) = 0,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (max)

Tabla A3. Variación de la energía libre ΔG , durante el proceso desnaturalización térmica de la BSA en buffer pH 7,00 a diferentes concentraciones de bromuro de hexiltrimetilamonio usando calorimetría diferencial de barrido.

T (K)	ΔG (kJ·mol ⁻¹)						
	BSA	50,0 mm	100,0 mm	200,0 mm	400,0 mm	600,0 mm	800,0 mm
298,1	27,6	63,2	33,8	24,2	7,9	2,8	-0,5
299,0	27,9	62,7	34,0	24,5	8,5	3,4	0,0
300,1	28,2	61,9	34,2	24,9	9,1	4,0	0,5
301,1	28,5	61,1	34,3	25,1	9,6	4,5	1,0
302,1	28,6	60,3	34,4	25,3	10,0	4,9	1,3
303,0	28,7	59,3	34,3	25,3	10,4	5,2	1,6
304,0	28,7	58,3	34,2	25,3	10,6	5,5	1,8
305,0	28,6	57,3	34,0	25,3	10,8	5,6	1,9
306,0	28,4	56,1	33,7	25,1	10,9	5,7	2,0
307,0	28,2	54,9	33,3	24,9	11,0	5,7	2,0
308,0	27,9	53,6	32,9	24,6	10,9	5,7	1,8
309,0	27,5	52,2	32,4	24,2	10,8	5,6	1,7
310,0	27,0	50,7	31,8	23,7	10,6	5,4	1,4
311,0	26,5	49,2	31,1	23,2	10,3	5,1	1,1
312,0	25,9	47,6	30,4	22,6	10,0	4,7	0,7
313,1	25,0	45,5	29,4	21,7	9,5	4,2	0,1
314,1	24,2	43,7	28,5	21,0	9,0	3,7	-0,5
315,1	23,4	41,9	27,6	20,1	8,4	3,1	-1,1
316,1	22,5	40,0	26,5	19,2	7,7	2,4	-1,8
317,1	21,5	38,0	25,4	18,2	7,0	1,7	-2,6
318,1	20,4	35,9	24,2	17,1	6,2	0,8	-3,5
319,1	19,2	33,8	22,9	16,0	5,3	0,0	-4,4
320,1	18,0	31,5	21,6	14,8	4,3	-1,0	-5,5

321,1	16,7	29,2	20,2	13,5	3,3	-2,0	-6,5
322,1	15,4	26,9	18,7	12,1	2,2	-3,1	-7,7
323,0	13,9	24,4	17,1	10,7	1,0	-4,3	-8,9
324,0	12,4	21,9	15,5	9,2	-0,2	-5,6	-10,2
325,0	10,8	19,4	13,8	7,6	-1,5	-6,9	-11,6
326,0	9,2	16,7	12,0	5,9	-2,9	-8,3	-13,1
327,0	7,4	14,0	10,2	4,2	-4,4	-9,8	-14,6
328,0	5,6	11,2	8,2	2,4	-5,9	-11,3	-16,2
329,0	3,8	8,3	6,2	0,6	-7,5	-12,9	-17,8
330,0	1,8	5,4	4,2	-1,4	-9,2	-14,6	-19,6
331,0	-0,2	2,4	2,1	-3,4	-10,9	-16,4	-21,4
332,0	-2,3	-0,7	-0,1	-5,5	-12,7	-18,2	-23,2
333,1	-4,8	-4,5	-2,9	-8,1	-15,0	-20,5	-25,6
334,1	-7,1	-7,7	-5,2	-10,3	-17,0	-22,4	-27,6
335,1	-9,4	-11,0	-7,7	-12,6	-19,0	-24,5	-29,7
336,1	-11,8	-14,4	-10,2	-15,0	-21,1	-26,6	-31,9
337,1	-14,2	-17,8	-12,7	-17,4	-23,3	-28,8	-34,1
338,1	-16,7	-21,3	-15,4	-19,9	-25,5	-31,0	-36,4
339,1	-19,3	-24,9	-18,1	-22,5	-27,8	-33,4	-38,8
340,1	-22,0	-28,6	-20,8	-25,1	-30,2	-35,8	-41,2
341,1	-24,7	-32,3	-23,7	-27,9	-32,7	-38,2	-43,7
342,1	-27,5	-36,1	-26,6	-30,6	-35,2	-40,8	-46,3
343,0	-30,3	-39,9	-29,6	-33,5	-37,8	-43,4	-49,0
344,0	-33,2	-43,9	-32,6	-36,4	-40,4	-46,0	-51,7
345,0	-36,2	-47,8	-35,7	-39,4	-43,2	-48,8	-54,5
346,0	-39,3	-51,9	-38,9	-42,5	-45,9	-51,6	-57,3
347,0	-42,4	-56,0	-42,1	-45,6	-48,8	-54,4	-60,2
348,0	-45,6	-60,2	-45,5	-48,8	-51,7	-57,4	-63,2
349,0	-48,9	-64,5	-48,8	-52,0	-54,7	-60,4	-66,3
349,8	-51,5	-67,9	-51,6	-54,7	-57,2	-62,8	-68,8

$u(T) = 0,1K$, $u(\Delta G) = 0,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (max)

Tabla A4. Variación de la energía libre ΔG , durante el proceso desnaturalización térmica de la BSA en buffer pH 7,00 a diferentes concentraciones de bromuro de octiltrimetilamonio usando calorimetría diferencial de barrido.

T (K)	ΔG (kJ·mol ⁻¹)						
	BSA	25,0 mm	50,0 mm	75,0 mm	100,0 mm	125,0 mm	150,0 mm
298,1	27,6	81,9	31,5	12,2	5,5	6,2	-5,0
299,0	27,9	80,5	31,5	12,6	6,0	6,6	-4,1
300,1	28,2	78,8	31,3	13,1	6,6	7,0	-3,2

301,1	28,5	77,1	31,1	13,4	7,1	7,3	-2,4
302,1	28,6	75,3	30,9	13,7	7,5	7,5	-1,7
303,0	28,7	73,5	30,5	13,9	7,9	7,7	-1,0
304,0	28,7	71,6	30,1	14,0	8,1	7,8	-0,5
305,0	28,6	69,6	29,6	14,0	8,3	7,8	0,0
306,0	28,4	67,5	29,0	14,0	8,4	7,7	0,4
307,0	28,2	65,4	28,3	13,9	8,4	7,5	0,7
308,0	27,9	63,2	27,6	13,7	8,3	7,3	1,0
309,0	27,5	60,9	26,8	13,4	8,2	7,0	1,2
310,0	27,0	58,5	25,9	13,1	8,0	6,6	1,3
311,0	26,5	56,1	24,9	12,7	7,7	6,1	1,3
312,0	25,9	53,6	23,9	12,2	7,4	5,6	1,2
313,1	25,0	50,5	22,5	11,5	6,8	4,9	1,1
314,1	24,2	47,8	21,3	10,8	6,3	4,2	0,8
315,1	23,4	45,0	20,1	10,1	5,7	3,4	0,6
316,1	22,5	42,2	18,7	9,3	5,0	2,6	0,2
317,1	21,5	39,3	17,3	8,4	4,3	1,6	-0,2
318,1	20,4	36,3	15,8	7,5	3,5	0,6	-0,8
319,1	19,2	33,3	14,2	6,4	2,6	-0,4	-1,3
320,1	18,0	30,2	12,6	5,3	1,6	-1,6	-2,0
321,1	16,7	27,0	10,9	4,2	0,6	-2,8	-2,7
322,1	15,4	23,7	9,1	2,9	-0,5	-4,1	-3,5
323,0	13,9	20,4	7,2	1,6	-1,7	-5,4	-4,4
324,0	12,4	16,9	5,3	0,2	-3,0	-6,9	-5,4
325,0	10,8	13,5	3,3	-1,3	-4,3	-8,4	-6,4
326,0	9,2	9,9	1,2	-2,8	-5,7	-9,9	-7,5
327,0	7,4	6,3	-1,0	-4,4	-7,2	-11,6	-8,6
328,0	5,6	2,6	-3,2	-6,1	-8,7	-13,3	-9,9
329,0	3,8	-1,2	-5,5	-7,8	-10,3	-15,1	-11,2
330,0	1,8	-5,0	-7,8	-9,6	-12,0	-16,9	-12,6
331,0	-0,2	-8,9	-10,3	-11,5	-13,8	-18,9	-14,0
332,0	-2,3	-12,9	-12,8	-13,5	-15,6	-20,9	-15,5
333,1	-4,8	-17,8	-15,9	-15,9	-17,9	-23,4	-17,4
334,1	-7,1	-21,9	-18,5	-18,0	-19,9	-25,5	-19,1
335,1	-9,4	-26,1	-21,2	-20,2	-21,9	-27,7	-20,9
336,1	-11,8	-30,4	-24,0	-22,5	-24,0	-30,0	-22,7
337,1	-14,2	-34,8	-26,9	-24,8	-26,2	-32,4	-24,5
338,1	-16,7	-39,2	-29,8	-27,2	-28,5	-34,8	-26,5
339,1	-19,3	-43,7	-32,9	-29,7	-30,8	-37,3	-28,5
340,1	-22,0	-48,2	-35,9	-32,2	-33,2	-39,9	-30,6

341,1	-24,7	-52,8	-39,1	-34,8	-35,7	-42,5	-32,8
342,1	-27,5	-57,5	-42,3	-37,5	-38,2	-45,2	-35,0
343,0	-30,3	-62,3	-45,6	-40,2	-40,8	-48,0	-37,3
344,0	-33,2	-67,1	-48,9	-43,0	-43,5	-50,9	-39,6
345,0	-36,2	-72,0	-52,3	-45,9	-46,2	-53,8	-42,1
346,0	-39,3	-77,0	-55,8	-48,8	-49,0	-56,8	-44,6
347,0	-42,4	-82,0	-59,4	-51,8	-51,9	-59,8	-47,1
348,0	-45,6	-87,1	-63,0	-54,9	-54,8	-62,9	-49,8
349,0	-48,9	-92,2	-66,7	-58,0	-57,8	-66,1	-52,5
349,8	-51,5	-96,4	-69,7	-60,6	-60,3	-68,7	-54,7

$u(T) = 0,1K$, $u(\Delta G) = 0,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (max)

Tabla A5. Variación de la energía libre ΔG , durante el proceso desnaturalización térmica de la BSA en buffer pH 7,00 a diferentes concentraciones de bromuro de deciltrimetilamonio usando calorimetría diferencial de barrido.

T (K)	ΔG (kJ·mol ⁻¹)						
	BSA	2,5 mm	5,0 mm	7,5 mm	10,0 mm	12,5 mm	15,0 mm
298,1	27,6	54,6	32,0	15,5	6,0	-1,6	-7,9
299,0	27,9	54,1	32,1	15,9	6,7	-0,7	-6,8
300,1	28,2	53,4	32,0	16,4	7,4	0,3	-5,6
301,1	28,5	52,7	31,9	16,7	8,0	1,1	-4,6
302,1	28,6	51,8	31,6	17,0	8,5	1,9	-3,6
303,0	28,7	50,9	31,3	17,1	8,9	2,5	-2,7
304,0	28,7	50,0	31,0	17,2	9,3	3,1	-1,9
305,0	28,6	48,9	30,5	17,3	9,6	3,6	-1,2
306,0	28,4	47,8	30,0	17,2	9,8	4,1	-0,5
307,0	28,2	46,6	29,4	17,1	9,9	4,4	0,0
308,0	27,9	45,3	28,7	16,9	10,0	4,7	0,5
309,0	27,5	43,9	28,0	16,6	10,0	4,9	1,0
310,0	27,0	42,5	27,1	16,2	9,9	5,0	1,3
311,0	26,5	41,0	26,2	15,8	9,7	5,1	1,6
312,0	25,9	39,4	25,3	15,3	9,4	5,1	1,8
313,1	25,0	37,4	24,0	14,5	9,1	5,0	1,9
314,1	24,2	35,7	22,8	13,9	8,6	4,8	1,9
315,1	23,4	33,8	21,6	13,1	8,2	4,5	1,9
316,1	22,5	31,9	20,3	12,3	7,6	4,2	1,8
317,1	21,5	30,0	19,0	11,4	7,0	3,8	1,6
318,1	20,4	27,9	17,5	10,4	6,3	3,3	1,3
319,1	19,2	25,8	16,0	9,4	5,5	2,8	1,0
320,1	18,0	23,6	14,4	8,3	4,6	2,1	0,6
321,1	16,7	21,4	12,8	7,1	3,7	1,4	0,1

322,1	15,4	19,0	11,0	5,8	2,7	0,7	-0,5
323,0	13,9	16,6	9,2	4,5	1,6	-0,2	-1,1
324,0	12,4	14,1	7,4	3,1	0,5	-1,1	-1,8
325,0	10,8	11,6	5,4	1,6	-0,7	-2,1	-2,6
326,0	9,2	9,0	3,4	0,0	-2,0	-3,1	-3,4
327,0	7,4	6,3	1,3	-1,6	-3,4	-4,3	-4,3
328,0	5,6	3,5	-0,9	-3,3	-4,8	-5,5	-5,3
329,0	3,8	0,7	-3,1	-5,1	-6,3	-6,7	-6,4
330,0	1,8	-2,3	-5,4	-6,9	-7,9	-8,1	-7,5
331,0	-0,2	-5,2	-7,8	-8,8	-9,5	-9,5	-8,7
332,0	-2,3	-8,3	-10,2	-10,8	-11,2	-11,0	-10,0
333,1	-4,8	-12,0	-13,2	-13,3	-13,4	-12,9	-11,6
334,1	-7,1	-15,2	-15,8	-15,4	-15,3	-14,5	-13,0
335,1	-9,4	-18,5	-18,5	-17,6	-17,2	-16,2	-14,5
336,1	-11,8	-21,9	-21,2	-19,9	-19,2	-18,0	-16,1
337,1	-14,2	-25,3	-24,1	-22,2	-21,3	-19,8	-17,7
338,1	-16,7	-28,8	-26,9	-24,6	-23,4	-21,7	-19,4
339,1	-19,3	-32,3	-29,9	-27,1	-25,6	-23,7	-21,2
340,1	-22,0	-35,9	-32,9	-29,6	-27,9	-25,8	-23,0
341,1	-24,7	-39,6	-36,0	-32,3	-30,3	-27,9	-24,9
342,1	-27,5	-43,4	-39,1	-34,9	-32,7	-30,1	-26,9
343,0	-30,3	-47,2	-42,3	-37,7	-35,2	-32,4	-28,9
344,0	-33,2	-51,1	-45,6	-40,5	-37,7	-34,7	-31,1
345,0	-36,2	-55,1	-49,0	-43,4	-40,4	-37,1	-33,2
346,0	-39,3	-59,1	-52,4	-46,4	-43,1	-39,5	-35,5
347,0	-42,4	-63,2	-55,9	-49,4	-45,8	-42,1	-37,8
348,0	-45,6	-67,3	-59,5	-52,5	-48,6	-44,7	-40,2
349,0	-48,9	-71,6	-63,1	-55,6	-51,5	-47,3	-42,6
349,8	-51,5	-75,0	-66,0	-58,2	-53,9	-49,5	-44,6

$u(T) = 0,1K$, $u(\Delta G) = 0,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (max)

Tabla A6. Variación de la energía libre ΔG , durante el proceso desnaturalización térmica de la BSA en buffer pH 7,00 a diferentes concentraciones de bromuro de dodeciltrimetilamonio usando calorimetría diferencial de barrido.

T (K)	ΔG (kJ·mol ⁻¹)						
	BSA	0,25 mm	0,50 mm	0,75 mm	1,00 mm	1,50 mm	2,00 mm
298,1	27,6	15,2	16,4	16,4	25,2	12,1	9,4
299,0	27,9	15,9	17,0	17,0	25,6	12,7	10,1
300,1	28,2	16,6	17,7	17,7	25,9	13,5	10,9

301,1	28,5	17,2	18,3	18,2	26,1	14,1	11,5
302,1	28,6	17,8	18,8	18,7	26,3	14,6	12,0
303,0	28,7	18,2	19,2	19,1	26,4	15,0	12,5
304,0	28,7	18,6	19,6	19,4	26,4	15,4	12,9
305,0	28,6	18,9	19,8	19,6	26,3	15,7	13,2
306,0	28,4	19,1	20,0	19,8	26,2	15,9	13,4
307,0	28,2	19,3	20,1	19,9	25,9	16,0	13,6
308,0	27,9	19,3	20,2	19,9	25,6	16,0	13,7
309,0	27,5	19,3	20,1	19,8	25,3	16,0	13,7
310,0	27,0	19,2	20,0	19,7	24,8	15,9	13,6
311,0	26,5	19,1	19,8	19,4	24,3	15,7	13,5
312,0	25,9	18,9	19,6	19,1	23,7	15,5	13,2
313,1	25,0	18,5	19,1	18,7	22,9	15,1	12,9
314,1	24,2	18,1	18,7	18,2	22,1	14,7	12,5
315,1	23,4	17,6	18,2	17,7	21,3	14,2	12,0
316,1	22,5	17,1	17,6	17,1	20,3	13,6	11,5
317,1	21,5	16,4	17,0	16,4	19,4	13,0	10,9
318,1	20,4	15,8	16,3	15,6	18,3	12,3	10,2
319,1	19,2	15,0	15,5	14,8	17,2	11,5	9,5
320,1	18,0	14,2	14,6	13,9	15,9	10,7	8,6
321,1	16,7	13,2	13,6	12,9	14,7	9,7	7,7
322,1	15,4	12,3	12,6	11,9	13,3	8,7	6,8
323,0	13,9	11,2	11,5	10,8	11,9	7,7	5,7
324,0	12,4	10,1	10,4	9,6	10,4	6,5	4,6
325,0	10,8	8,9	9,1	8,3	8,8	5,3	3,4
326,0	9,2	7,6	7,8	7,0	7,2	4,0	2,1
327,0	7,4	6,3	6,4	5,6	5,5	2,6	0,8
328,0	5,6	4,8	5,0	4,1	3,7	1,2	-0,6
329,0	3,8	3,3	3,5	2,5	1,8	-0,3	-2,1
330,0	1,8	1,8	1,9	0,9	-0,1	-1,9	-3,6
331,0	-0,2	0,2	0,2	-0,8	-2,1	-3,5	-5,2
332,0	-2,3	-1,5	-1,5	-2,5	-4,2	-5,2	-6,9
333,1	-4,8	-3,7	-3,7	-4,7	-6,8	-7,4	-9,0
334,1	-7,1	-5,5	-5,6	-6,6	-9,0	-9,3	-10,9
335,1	-9,4	-7,4	-7,5	-8,6	-11,3	-11,2	-12,8
336,1	-11,8	-9,4	-9,5	-10,7	-13,6	-13,2	-14,8
337,1	-14,2	-11,5	-11,6	-12,8	-16,1	-15,3	-16,8
338,1	-16,7	-13,6	-13,8	-15,0	-18,6	-17,4	-19,0
339,1	-19,3	-15,8	-16,0	-17,3	-21,1	-19,6	-21,1
340,1	-22,0	-18,1	-18,3	-19,6	-23,8	-21,9	-23,4
341,1	-24,7	-20,4	-20,7	-22,0	-26,5	-24,3	-25,7

342,1	-27,5	-22,8	-23,2	-24,5	-29,3	-26,7	-28,1
343,0	-30,3	-25,3	-25,7	-27,0	-32,1	-29,2	-30,6
344,0	-33,2	-27,9	-28,2	-29,6	-35,0	-31,8	-33,1
345,0	-36,2	-30,5	-30,9	-32,3	-38,0	-34,4	-35,7
346,0	-39,3	-33,2	-33,6	-35,0	-41,0	-37,1	-38,4
347,0	-42,4	-35,9	-36,4	-37,8	-44,2	-39,8	-41,1
348,0	-45,6	-38,7	-39,2	-40,7	-47,3	-42,7	-43,9
349,0	-48,9	-41,6	-42,1	-43,7	-50,6	-45,6	-46,8
349,8	-51,5	-43,9	-44,5	-46,1	-53,2	-47,9	-49,1

$u(T) = 0,1K$, $u(\Delta G) = 0,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (max)

Tabla A7. Variación de la energía libre ΔG , durante el proceso desnaturalización térmica de la BSA en buffer pH 7,00 a diferentes concentraciones de bromuro de dodeciltrimetilamonio usando calorimetría diferencial de barrido.

T (K)	ΔG (kJ·mol ⁻¹)						
	BSA	2,50 mm	3,00 mm	3,50 mm	4,00 mm	4,50 mm	5,00 mm
298,1	27,6	5,2	3,6	3,6	-10,0	-10,2	-9,0
299,0	27,9	6,0	4,4	4,3	-8,9	-9,0	-7,9
300,1	28,2	6,8	5,3	5,1	-7,5	-7,7	-6,7
301,1	28,5	7,6	6,0	5,8	-6,3	-6,5	-5,6
302,1	28,6	8,2	6,6	6,4	-5,2	-5,4	-4,6
303,0	28,7	8,7	7,2	7,0	-4,2	-4,5	-3,7
304,0	28,7	9,2	7,7	7,4	-3,3	-3,5	-2,8
305,0	28,6	9,6	8,1	7,8	-2,4	-2,7	-2,1
306,0	28,4	9,9	8,5	8,1	-1,7	-1,9	-1,4
307,0	28,2	10,2	8,7	8,3	-1,0	-1,3	-0,8
308,0	27,9	10,3	8,9	8,4	-0,3	-0,7	-0,2
309,0	27,5	10,4	9,0	8,5	0,2	-0,1	0,2
310,0	27,0	10,5	9,1	8,5	0,7	0,3	0,6
311,0	26,5	10,4	9,0	8,4	1,1	0,7	0,9
312,0	25,9	10,3	8,9	8,2	1,4	1,0	1,1
313,1	25,0	10,0	8,7	7,9	1,7	1,3	1,3
314,1	24,2	9,7	8,4	7,6	1,9	1,4	1,4
315,1	23,4	9,3	8,0	7,2	1,9	1,5	1,4
316,1	22,5	8,9	7,6	6,7	2,0	1,5	1,3
317,1	21,5	8,4	7,1	6,2	1,9	1,4	1,1
318,1	20,4	7,8	6,5	5,6	1,8	1,2	0,9
319,1	19,2	7,1	5,9	4,9	1,6	1,0	0,6
320,1	18,0	6,4	5,1	4,1	1,3	0,7	0,2
321,1	16,7	5,6	4,3	3,2	0,9	0,3	-0,2

322,1	15,4	4,7	3,5	2,3	0,5	-0,1	-0,8
323,0	13,9	3,7	2,5	1,3	0,0	-0,6	-1,4
324,0	12,4	2,7	1,5	0,3	-0,6	-1,2	-2,0
325,0	10,8	1,6	0,4	-0,8	-1,2	-1,9	-2,8
326,0	9,2	0,4	-0,7	-2,0	-1,9	-2,6	-3,6
327,0	7,4	-0,8	-1,9	-3,3	-2,7	-3,4	-4,5
328,0	5,6	-2,1	-3,2	-4,7	-3,6	-4,3	-5,4
329,0	3,8	-3,5	-4,6	-6,1	-4,5	-5,3	-6,4
330,0	1,8	-5,0	-6,1	-7,6	-5,5	-6,3	-7,5
331,0	-0,2	-6,5	-7,6	-9,1	-6,6	-7,4	-8,7
332,0	-2,3	-8,1	-9,1	-10,8	-7,7	-8,5	-9,9
333,1	-4,8	-10,1	-11,1	-12,8	-9,2	-10,0	-11,5
334,1	-7,1	-11,9	-12,9	-14,6	-10,5	-11,3	-12,9
335,1	-9,4	-13,7	-14,7	-16,4	-11,9	-12,7	-14,4
336,1	-11,8	-15,6	-16,6	-18,4	-13,3	-14,2	-15,9
337,1	-14,2	-17,5	-18,5	-20,4	-14,8	-15,7	-17,5
338,1	-16,7	-19,6	-20,5	-22,4	-16,4	-17,3	-19,2
339,1	-19,3	-21,7	-22,6	-24,5	-18,0	-19,0	-20,9
340,1	-22,0	-23,8	-24,8	-26,7	-19,7	-20,7	-22,7
341,1	-24,7	-26,1	-27,0	-29,0	-21,5	-22,5	-24,6
342,1	-27,5	-28,4	-29,3	-31,3	-23,3	-24,4	-26,5
343,0	-30,3	-30,8	-31,6	-33,8	-25,3	-26,3	-28,6
344,0	-33,2	-33,2	-34,1	-36,2	-27,3	-28,3	-30,6
345,0	-36,2	-35,7	-36,5	-38,8	-29,3	-30,4	-32,8
346,0	-39,3	-38,3	-39,1	-41,4	-31,4	-32,5	-35,0
347,0	-42,4	-40,9	-41,7	-44,0	-33,6	-34,7	-37,3
348,0	-45,6	-43,6	-44,4	-46,8	-35,9	-37,0	-39,6
349,0	-48,9	-46,4	-47,2	-49,6	-38,2	-39,3	-42,1
349,8	-51,5	-48,7	-49,5	-51,9	-40,1	-41,3	-44,0

$u(T) = 0,1K$, $u(\Delta G) = 0,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (max)

B. Anexo: Tensión superficial

Figura B1. Tensión superficial de las soluciones acuosas de STAA determinadas a 298,15 K.

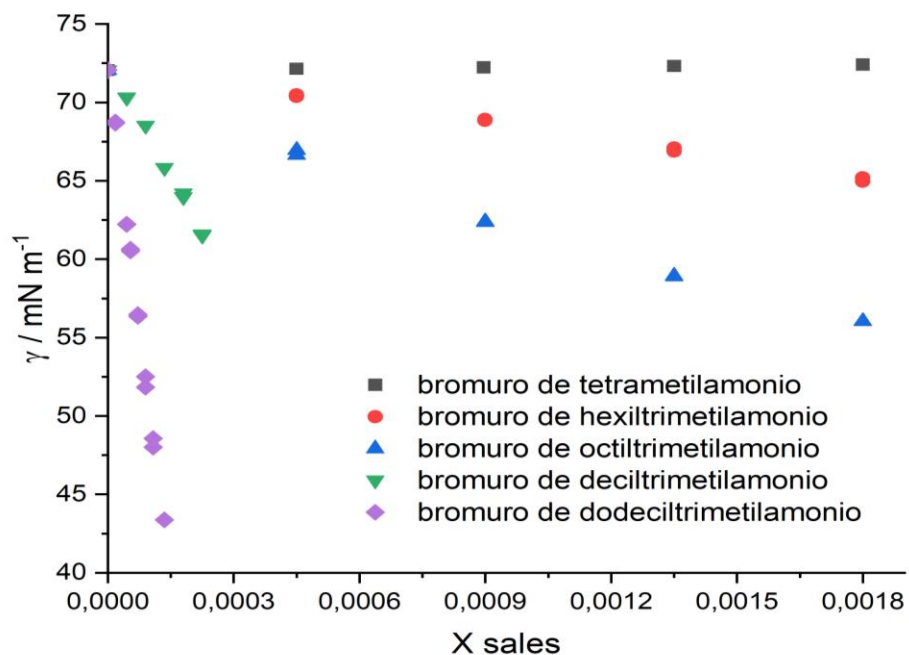


Figura B2. Efecto de Me_4NBr sobre el perfil de adsorción de BSA en solución acuosa a 298,15 K y su ajuste a los dos modelos propuestos.

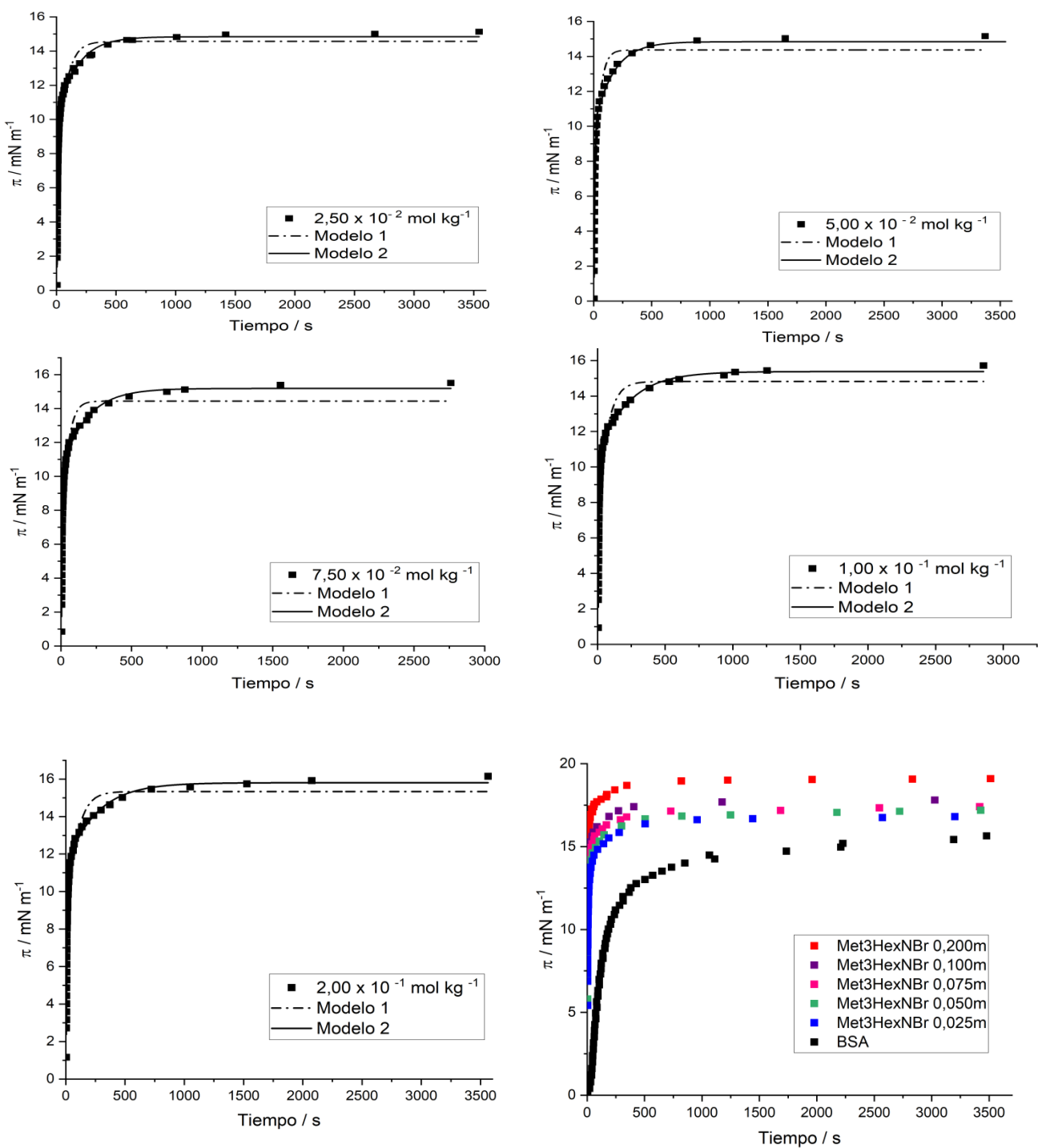


Figura B3. Efecto de Met₃HexNBr sobre el perfil de adsorción de BSA en solución acuosa a 298,15 K y su ajuste a los dos modelos propuestos.

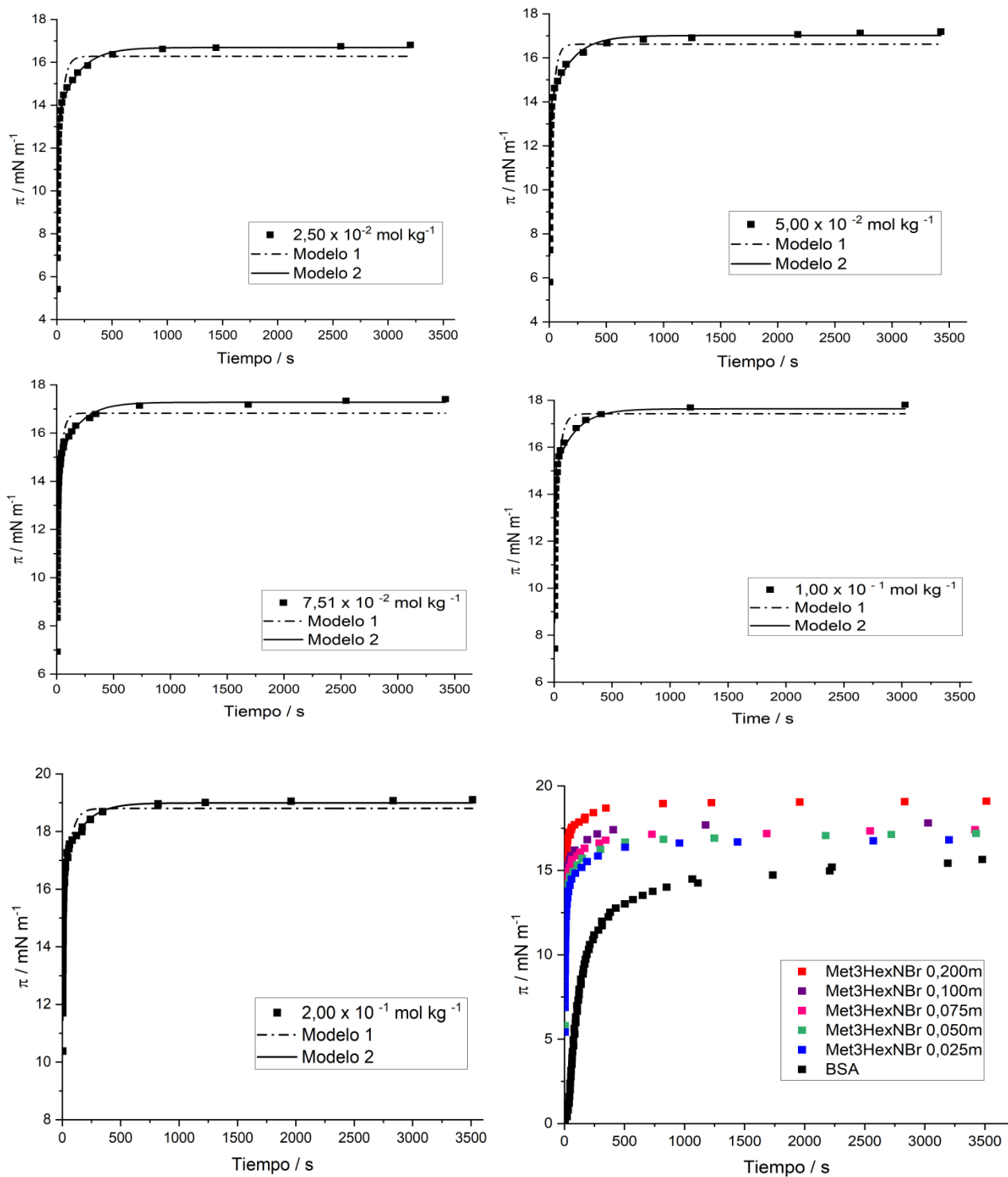


Figura B4. Efecto de Met₃OctNBr sobre el perfil de adsorción de BSA en solución acuosa a 298,15 K y su ajuste a los dos modelos propuestos.

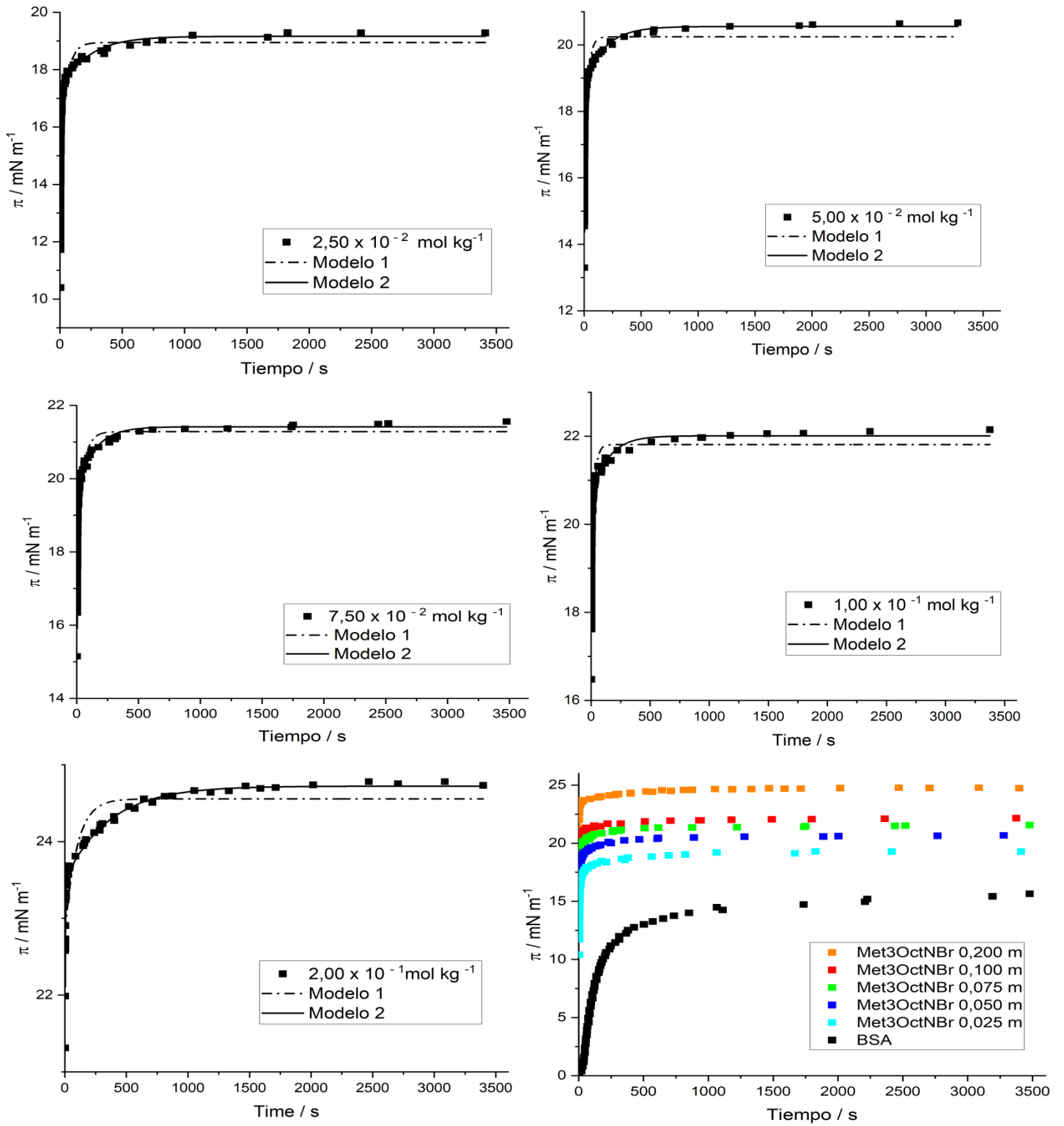


Figura B5. Efecto de Met₃DecNBr sobre el perfil de adsorción de BSA en solución acuosa a 298,15 K y su ajuste a los dos modelos propuestos.

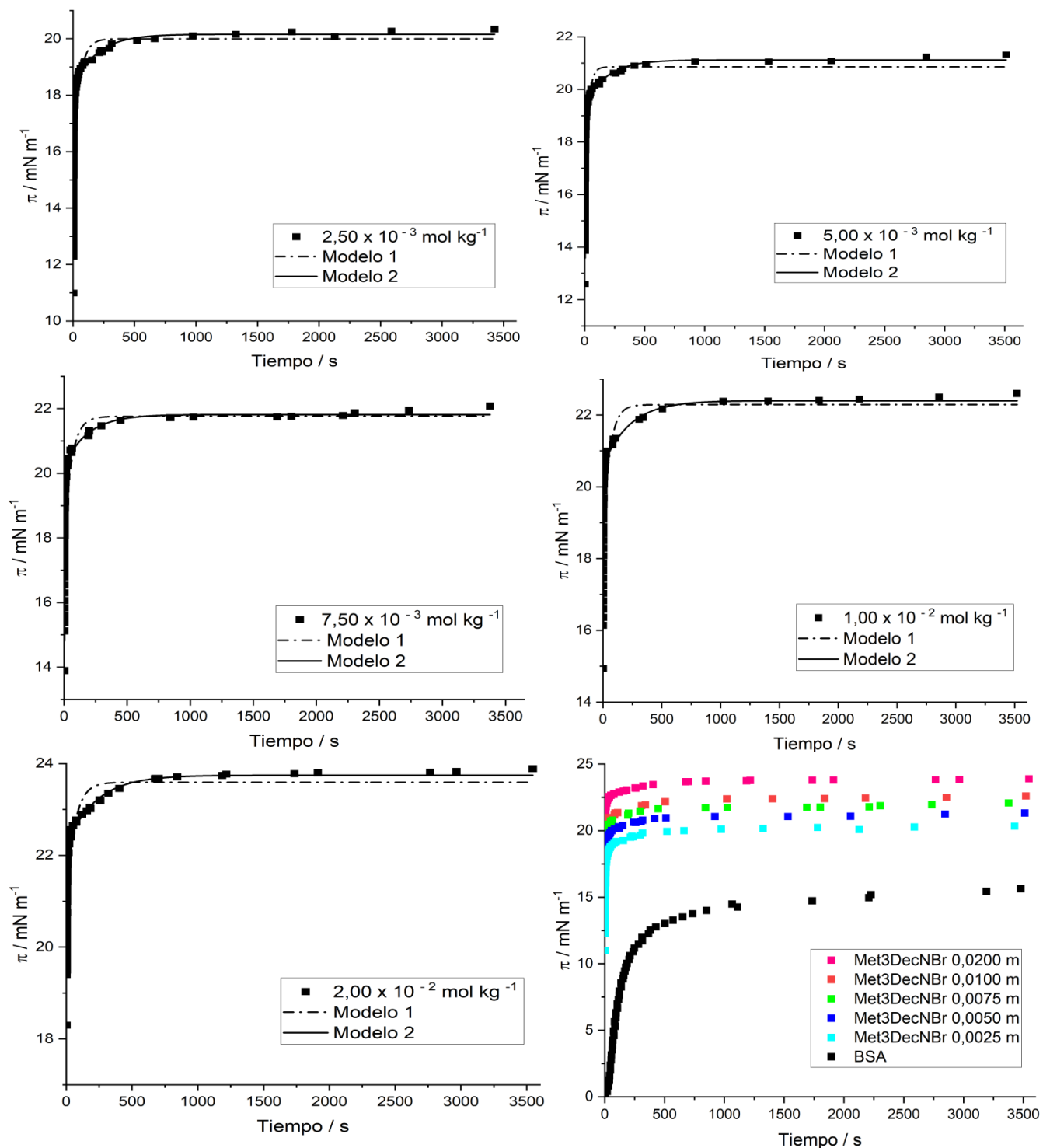
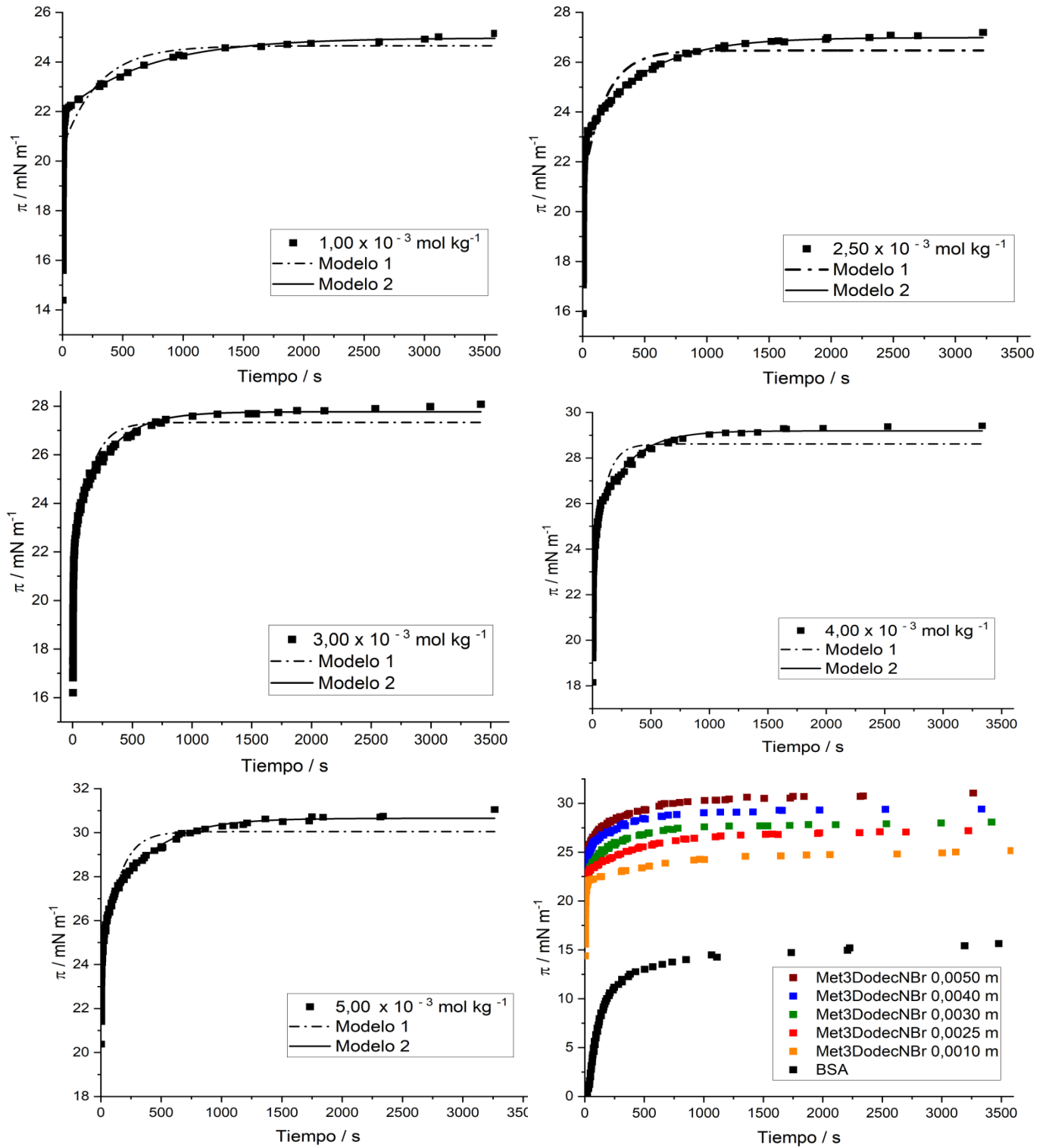


Figura B6. Efecto de Met₃DodecNBr sobre el perfil de adsorción de BSA en solución acuosa a 298,15 K y su ajuste a los dos modelos propuestos.



C. Anexo: Parámetros de interacción

Figura C1. Densidades de las STAA en función de la concentración a 298,15 K.

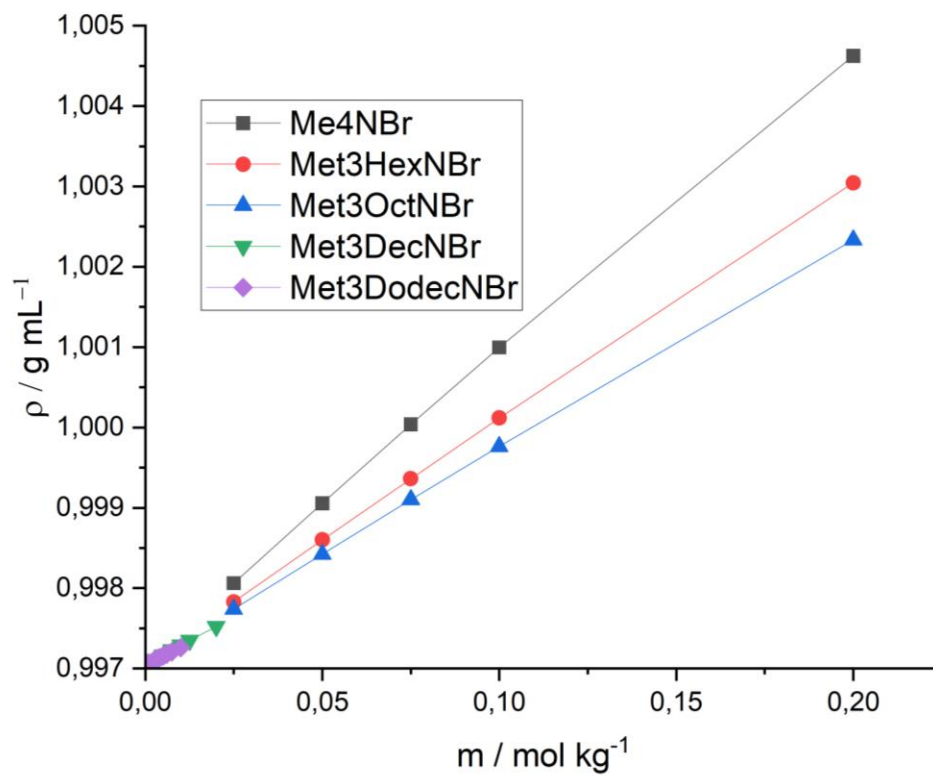


Tabla C1. Densidades y volúmenes específicos aparentes de las soluciones de BSA en presencia de Me₄NBr en condiciones de molalidad y potencial químico constante a 298,15K.

Me ₄ NBr 0,025 mol kg ⁻¹				
BSA C /g mL ⁻¹	m (cte)		μ(cte)	
	ρ / g mL ⁻¹	φ ₂ mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	φ' ₂ / mL g ⁻¹
0,00025	0,998115	0,7870 ± 0,0066	0,998114	0,7902 ± 0,0072
0,00050	0,998164	0,7963 ± 0,0057	0,998161	0,8015 ± 0,0065
0,00075	0,998207	0,8074 ± 0,0050	0,998203	0,8119 ± 0,0062
0,00100	0,998245	0,8180 ± 0,0048	0,998241	0,8211 ± 0,0058
Me ₄ NBr 0,050 mol kg ⁻¹				
BSA C /g mL ⁻¹	m (cte)		μ(cte)	
	ρ / g mL ⁻¹	φ ₂ mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	φ' ₂ / mL g ⁻¹
0,0001	0,999114	0,7708 ± 0,0054	0,999113	0,7741 ± 0,0053
0,0003	0,999174	0,7658 ± 0,0058	0,999172	0,7690 ± 0,0059
0,0005	0,999236	0,7614 ± 0,0056	0,999235	0,7620 ± 0,0057
0,0007	0,999300	0,7572 ± 0,0044	0,999299	0,7575 ± 0,0043
Me ₄ NBr 0,075 mol kg ⁻¹				
BSA C /g mL ⁻¹	m (cte)		μ(cte)	
	ρ / g mL ⁻¹	φ ₂ mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	φ' ₂ / mL g ⁻¹
0,0001	1,000041	0,9854 ± 0,0034	1,000039	0,9924 ± 0,0032
0,0003	1,000082	0,9107 ± 0,0042	1,000081	0,9118 ± 0,0041
0,0005	1,000156	0,8418 ± 0,0049	1,000154	0,8436 ± 0,0049
0,0007	1,000280	0,7573 ± 0,0057	1,000278	0,7586 ± 0,0056
Me ₄ NBr 0,100 mol kg ⁻¹				
BSA C /g mL ⁻¹	m (cte)		μ(cte)	
	ρ / g mL ⁻¹	φ ₂ mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	φ' ₂ / mL g ⁻¹
0,0001	1,001012	0,9286 ± 0,0040	1,001009	0,9371 ± 0,0039
0,0003	1,001057	0,8739 ± 0,0046	1,001053	0,8787 ± 0,0044
0,0005	1,001123	0,8277 ± 0,0050	1,001121	0,8273 ± 0,0050
0,0007	1,001213	0,7806 ± 0,0059	1,001209	0,7818 ± 0,0058
Me ₄ NBr 0,200 mol kg ⁻¹				
BSA g mL ⁻¹	m (cte)		μ(cte)	
	ρ / g mL ⁻¹	φ ₂ mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	φ' ₂ / mL g ⁻¹
0,0001	1,004692	0,7286 ± 0,0061	1,004690	0,7366 ± 0,0060
0,0003	1,004809	0,6291 ± 0,0075	1,004803	0,6410 ± 0,0074
0,0005	1,004992	0,5083 ± 0,0084	1,004984	0,5189 ± 0,0085

$$\frac{0,0007 \quad 1,005225 \quad 0,3982 \pm 0,0098 \quad 1,005220 \quad 0,4031 \pm 0,0093}{u(\rho) = 1,50E-04 \text{ g mL}^{-1} \text{ (max)}, u(\phi)=2,2E-4 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \text{ (max)}, u(m) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}}$$

Tabla C2. Densidades y volúmenes específicos aparentes de las soluciones de BSA en presencia de Me₃HexNBr en condiciones de molalidad y potencial químico constante a 298,15K.

Me ₃ HexNBr 0,025 mol kg ⁻¹				
BSA	<i>m</i> (cte)			μ (cte)
C /g mL ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	$^a\rho$ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,00025	0,997867	0,8458 ± 0,0049	0,997867	0,8458 ± 0,0049
0,00050	0,997918	0,8218 ± 0,0053	0,997917	0,8238 ± 0,0052
0,00075	0,997984	0,7937 ± 0,0055	0,997981	0,7977 ± 0,0056
0,00100	0,998063	0,7667 ± 0,0058	0,998062	0,7677 ± 0,0057
Me ₃ HexNBr 0,050 mol kg ⁻¹				
BSA	<i>m</i> (cte)			μ (cte)
C /g mL ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	$^a\rho$ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	0,998610	0,9613 ± 0,0035	0,998609	0,9654 ± 0,0034
0,0003	0,998652	0,8973 ± 0,0043	0,99865	0,9013 ± 0,0044
0,0005	0,998732	0,8252 ± 0,0052	0,998730	0,8278 ± 0,0053
0,0007	0,998849	0,7521 ± 0,0044	0,998839	0,7621 ± 0,0056
Me ₃ HexNBr 0,075 mol kg ⁻¹				
BSA	<i>m</i> (cte)			μ (cte)
C /g mL ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	$^a\rho$ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	0,999398	0,8565 ± 0,0048	0,999396	0,8646 ± 0,0047
0,0003	0,999438	0,8485 ± 0,0050	0,999431	0,8626 ± 0,0047
0,0005	0,999482	0,8405 ± 0,0049	0,999466	0,8619 ± 0,0048
0,0007	0,999529	0,8335 ± 0,0051	0,999502	0,8605 ± 0,0048
Me ₃ HexNBr 0,100 mol kg ⁻¹				
BSA	<i>m</i> (cte)			μ (cte)
C /g mL ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	$^a\rho$ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	1,000183	0,7319 ± 0,0063	1,000182	0,7359 ± 0,0062
0,0003	1,000247	0,7379 ± 0,0062	1,000244	0,7439 ± 0,0061
0,0005	1,000307	0,7452 ± 0,0061	1,000301	0,7532 ± 0,0060
0,0007	1,000365	0,7509 ± 0,0060	1,000352	0,7639 ± 0,0059
Me ₃ HexNBr 0,200 mol kg ⁻¹				
BSA	<i>m</i> (cte)			μ (cte)

g mL ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	$^a\rho$ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	1,003096	0,7896 ± 0,0056	1,003096	0,7896 ± 0,0056
0,0003	1,003192	0,7019 ± 0,0067	1,003192	0,7019 ± 0,0067
0,0005	1,003336	0,6088 ± 0,0076	1,003335	0,6101 ± 0,0077
0,0007	1,003512	0,5304 ± 0,0058	1,003510	0,5324 ± 0,0058

$u(\rho) = 1,50E-04$ g mL⁻¹ (max), $u(\phi) = 2,2E-4$ mL·g⁻¹ (max), $u(m) = 1,0 \times 10^{-4}$ mol·kg⁻¹

Tabla C3. Densidades y volúmenes específicos aparentes de las soluciones de BSA en presencia de Me₃OctNBr en condiciones de molalidad y potencial químico constante a 298,15K.

Me ₃ OctNBr 0,025 mol kg ⁻¹				
BSA	m (cte)		μ (cte)	
C /g mL ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,00025	0,997783	0,8299 ± 0,0050	0,997783	0,8299 ± 0,0050
0,00050	0,997860	0,7617 ± 0,0059	0,997860	0,7617 ± 0,0059
0,00075	0,997970	0,6949 ± 0,0067	0,997970	0,6944 ± 0,0066
0,00100	0,998107	0,6344 ± 0,0074	0,998106	0,6354 ± 0,0074
Me ₃ OctNBr 0,050 mol kg ⁻¹				
BSA	m (cte)		μ (cte)	
C /g mL ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	0,998503	0,6891 ± 0,0068	0,998503	0,6891 ± 0,0071
0,0003	0,998576	0,6991 ± 0,0069	0,998576	0,6991 ± 0,0066
0,0005	0,998643	0,7105 ± 0,0065	0,998643	0,7105 ± 0,0060
0,0007	0,998706	0,7201 ± 0,0064	0,998704	0,7221 ± 0,0056
Me ₃ OctNBr 0,075 mol kg ⁻¹				
BSA	m (cte)		μ (cte)	
C /g mL ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	0,999175	0,7006 ± 0,0063	0,999175	0,7006 ± 0,0063
0,0003	0,999249	0,7026 ± 0,0066	0,999248	0,7046 ± 0,0066
0,0005	0,999322	0,7046 ± 0,0066	0,999319	0,7086 ± 0,0062
0,0007	0,999394	0,7066 ± 0,0066	0,999388	0,7126 ± 0,0062
Me ₃ OctNBr 0,100 mol kg ⁻¹				
BSA	m (cte)		μ (cte)	
C /g mL ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	0,999798	0,8682 ± 0,0066	0,999799	0,8642 ± 0,0067
0,0003	0,999882	0,7662 ± 0,0061	0,999882	0,7662 ± 0,0061

0,0005	1,000023	0,6562 ± 0,0056	1,000023	0,6562 ± 0,0056
0,0007	1,000201	0,5641 ± 0,0048	1,000201	0,5641 ± 0,0048
Me ₃ OctNBr 0,200 mol kg ⁻¹				
BSA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
g mL ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	1,002372	0,8460 ± 0,0048	1,002373	0,8420 ± 0,0047
0,0003	1,002458	0,7502 ± 0,0061	1,002456	0,7542 ± 0,0061
0,0005	1,002596	0,6492 ± 0,0073	1,00259	0,6571 ± 0,0072
0,0007	1,002769	0,5637 ± 0,0083	1,002761	0,5717 ± 0,0082
$u(\rho) = 1,50E-04$ g mL ⁻¹ (max), $u(\phi) = 2,2E-4$ mL·g ⁻¹ (max), $u(m) = 1,0 \times 10^{-4}$ mol·kg ⁻¹				

Tabla C4. Densidades y volúmenes específicos aparentes de las soluciones de BSA en presencia de Me₃DecNBr en condiciones de molalidad y potencial químico constante a 298,15K.

Me ₃ DecNBr 0,0025 mol kg ⁻¹				
BSA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
C /g mL ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,00025	0,997131	0,9146 ± 0,0041	0,99713	0,9187 ± 0,0041
0,00050	0,997185	0,8505 ± 0,0049	0,997184	0,8525 ± 0,0049
0,00075	0,997265	0,7943 ± 0,0055	0,997259	0,8023 ± 0,0052
0,00100	0,997375	0,7361 ± 0,0058	0,997364	0,7472 ± 0,0061
Me ₃ DecNBr 0,0050 mol kg ⁻¹				
BSA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
C /g mL ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	0,997197	0,8865 ± 0,0044	0,997195	0,8945 ± 0,0043
0,0003	0,997254	0,8304 ± 0,0051	0,997249	0,8404 ± 0,0050
0,0005	0,997339	0,7742 ± 0,0058	0,997324	0,7942 ± 0,0055
0,0007	0,997446	0,7241 ± 0,0063	0,997418	0,7521 ± 0,0060
Me ₃ DecNBr 0,0075 mol kg ⁻¹				
BSA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
C /g mL ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	0,997251	0,9145 ± 0,0041	0,997249	0,9226 ± 0,0040
0,0003	0,997304	0,8524 ± 0,0049	0,997295	0,8704 ± 0,0046
0,0005	0,997388	0,7902 ± 0,0056	0,997368	0,8169 ± 0,0053
0,0007	0,997498	0,7330 ± 0,0063	0,997461	0,7701 ± 0,0058
Me ₃ DecNBr 0,0100 mol kg ⁻¹				

Me ₃ DecNBr 0,0200 mol kg ⁻¹				
BSA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
C /g mL ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	$\phi_2' / \text{mL g}^{-1}$
0,0001	0,997328	0,8583 ± 0,0047	0,997327	0,8623 ± 0,0046
0,0003	0,997388	0,8102 ± 0,0054	0,997383	0,8202 ± 0,0052
0,0005	0,997474	0,7594 ± 0,0056	0,997461	0,7768 ± 0,0058
0,0007	0,997579	0,7149 ± 0,0048	0,997556	0,7380 ± 0,0062
Me ₃ DecNBr 0,0200 mol kg ⁻¹				
BSA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
g mL ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	$\phi_2' / \text{mL g}^{-1}$
0,0001	0,997563	0,9102 ± 0,0071	0,997562	0,9142 ± 0,0041
0,0003	0,997617	0,8481 ± 0,0067	0,997615	0,8521 ± 0,0049
0,0005	0,997705	0,7819 ± 0,0059	0,997695	0,7953 ± 0,0055
0,0007	0,997819	0,7228 ± 0,0053	0,997799	0,7428 ± 0,0062

$u(\rho) = 1,50\text{E-}04 \text{ g mL}^{-1} \text{ (max)}$, $u(\phi) = 2,2\text{E-}4 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \text{ (max)}$, $u(m) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$

Tabla C5. Densidades y volúmenes específicos aparentes de las soluciones de BSA en presencia de Me₃DodecNBr en condiciones de molalidad y potencial químico constante a 298,15K.

Me ₃ DodecNBr 0,0010 mol kg ⁻¹				
BSA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
C /g mL ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	$\phi_2' / \text{mL g}^{-1}$
0,00025	0,997128	0,7622 ± 0,0057	0,997128	0,7622 ± 0,0057
0,00050	0,997191	0,7562 ± 0,0060	0,997190	0,7582 ± 0,0060
0,00075	0,997257	0,7502 ± 0,0061	0,997255	0,7529 ± 0,0060
0,00100	0,997325	0,7452 ± 0,0062	0,997322	0,7482 ± 0,0061
Me ₃ DodecNBr 0,0020 mol kg ⁻¹				
BSA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
C /g mL ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	$\phi_2' / \text{mL g}^{-1}$
0,0001	0,997134	0,8705 ± 0,0046	0,997134	0,8705 ± 0,0046
0,0003	0,997186	0,8324 ± 0,0050	0,997186	0,4873 ± 0,0092
0,0005	0,997258	0,7930 ± 0,0056	0,997257	0,5668 ± 0,0082
0,0007	0,997342	0,7612 ± 0,0059	0,997341	0,6452 ± 0,0073
Me ₃ DodecNBr 0,0030 mol kg ⁻¹				
BSA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
C /g mL ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	ρ / g mL ⁻¹	$\phi_2' / \text{mL g}^{-1}$
0,0001	0,997166	0,7863 ± 0,0054	0,997166	0,7863 ± 0,0054

0,0003	0,997223	0,7803 ± 0,0057	0,997223	0,7803 ± 0,0057
0,0005	0,997284	0,7729 ± 0,0058	0,997284	0,7729 ± 0,0058
0,0007	0,997348	0,7662 ± 0,0058	0,997346	0,7682 ± 0,0058
Me ₃ DodecNBr 0,0040 mol kg ⁻¹				
BSA	<i>m</i> (cte)		<i>μ</i> (cte)	
C /g mL ⁻¹	<i>ρ</i> / g mL ⁻¹	<i>φ</i> ₂ mL g ⁻¹	<i>ρ</i> / g mL ⁻¹	<i>φ</i> ' ₂ / mL g ⁻¹
0,0001	0,997179	0,8224 ± 0,0050	0,997179	0,8224 ± 0,0050
0,0003	0,997237	0,7963 ± 0,0055	0,997237	0,7963 ± 0,0055
0,0005	0,997304	0,7756 ± 0,0058	0,997304	0,7756 ± 0,0058
0,0007	0,997383	0,7532 ± 0,0060	0,997381	0,7552 ± 0,0060
Me ₃ DodecNBr 0,0050 mol kg ⁻¹				
BSA	<i>m</i> (cte)		<i>μ</i> (cte)	
g mL ⁻¹	<i>ρ</i> / g mL ⁻¹	<i>φ</i> ₂ mL g ⁻¹	<i>ρ</i> / g mL ⁻¹	<i>φ</i> ' ₂ / mL g ⁻¹
0,0001	0,997193	0,8504 ± 0,0049	0,997193	0,8504 ± 0,0049
0,0003	0,997248	0,8163 ± 0,0053	0,997247	0,8183 ± 0,0053
0,0005	0,997315	0,7889 ± 0,0056	0,997314	0,7902 ± 0,0056
0,0007	0,997400	0,7572 ± 0,0060	0,997395	0,7622 ± 0,0059
<i>u</i> (<i>ρ</i>) = 1,50E-04 g mL ⁻¹ (max), <i>u</i> (<i>φ</i>)=2,2E-4 mL·g ⁻¹ (max), <i>u</i> (<i>m</i>) = 1,0 x 10 ⁻⁴ mol·kg ⁻¹				

D. Anexo: Incertidumbres

Las incertidumbres fueron evaluadas de la expresión general para cualquier función.

$$\Delta f = \pm \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^2 (\Delta x_i)^2}$$

Incertidumbre en la molalidad:

$$\Delta m = \sqrt{\left(\frac{1}{M_{sto}m_{ste}}\right)^2 (\Delta W)^2 + \left(\frac{m_{sto}}{M_{sto}m_{ste}^2}\right)^2 (\Delta W)^2}$$

Donde M_{sto} es la masa molecular del soluto, m_{ste} es la masa del solvente, m_{sto} es la masa del soluto y ΔW es la incertidumbre asociada al proceso de pesada.

Incertidumbre del volumen específico aparente

$$\Delta \varphi = \sqrt{\left(\frac{\rho_{sln} - c}{c\rho_{ste}^2}\right)^2 (\Delta \rho)^2 + \left(\frac{1}{c\rho_{ste}}\right)^2 (\Delta \rho)^2 + \left(\frac{\rho_{sln} - \rho_{ste}}{c^2\rho_{ste}}\right)^2 (\Delta c)^2}$$

Donde ρ_{sln} , ρ_{ste} y c es la densidad del solvente, la de la solución y la concentración del electrolito o de la proteína.

Incertidumbre en el volumen parcial específico

Para determinar la incertidumbre en el volumen parcial específico se hizo un ajuste lineal ponderado de los datos obtenidos de volumen específico aparente para las soluciones de sales y las soluciones de proteína con sales a molalidad constante y potencial químico

constante de sales. El intercepto de las gráficas corresponde al volumen parcial específico y la incertidumbre se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$\Delta\varphi^o = \frac{\left(\sum \frac{C_i}{e_i^2}\right)\left(\sum \frac{\varphi_i}{e_i^2}\right) - \left(\sum \frac{C_i\varphi_i}{e_i^2}\right)\left(\sum \frac{1}{e_i^2}\right)}{\left(\sum \frac{C_i}{e_i^2}\right)^2 - \left(\sum \frac{C_i^2}{e_i^2}\right)\left(\sum \frac{1}{e_i^2}\right)}$$

Donde C_i es la concentración de electrolito o proteína según sea el caso, φ_i es el volumen específico aparente de la sal o de la proteína a molalidad constante de electrolito (ϕ_2) o a potencial químico constante (ϕ_2').

Incertidumbre del parámetro de interacción preferencial:

$$\Delta\xi_3 = \sqrt{\left(\frac{\phi_2^0 - \phi_2'^0}{(v^0\rho_0 - 1)^2}\right)^2 (\Delta\rho_0)^2 + \left(\frac{\rho_0}{1 - v^0\rho_0}\right)^2 (\Delta\phi_2^0)^2 + \left(\frac{\rho_0}{v^0\rho_0 - 1}\right)^2 (\Delta\phi_2'^0)^2 + \left(\frac{\rho_0^2(\phi_2^0 - \phi_2'^0)}{(v^0\rho_0 - 1)^2}\right)^2 (\Delta v^0)^2}$$

Donde $\phi_2^0, \phi_2'^0$ son los volúmenes parciales específicos de la proteína en condiciones de molalidad constante y potencial químico constante de sal, ρ_0 es la densidad del disolvente de referencia (agua – sal) y v^0 es el volumen parcial específico de la sal.

Referencias bibliográficas

- [1] C. Cantor and P. Schimmel, *Biophysical Chemistry: Part I: The Conformation of Biological Macromolecules*. W. H. Freeman, 1980. ISBN: 978-0716711889.
- [2] C. Dobson and M. Karplus, 'The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment.', *Curr Opin Struct Biol*, vol. 9, no. 1, pp. 92–101, Feb. 1999. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)80012-8](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)80012-8).
- [3] D. Sidransky and M. Hollstein, 'Clinical implications of the p53 gene', *Annu Rev Med*, vol. 47, pp. 285–301, 1996. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.47.1.285>.
- [4] U. Kragh-Hansen, 'Molecular aspects of ligand binding to serum albumin', *Pharmacol Rev*, vol. 33, no. 1, pp. 17–53, Mar. 1981. ISSN: 0031-6997. Pubmed: 7027277.
- [5] K. Majorek, P. Porebski, A. Dayal, M. Zimmerman, K. Jablonska, A. Stewart, M. Chruszcz, 'Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins', *Mol Immunol*, vol. 52, no. 3–4, pp. 174–182, Oct. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.05.011>.
- [6] T. Kongraksawech, P. Vázquez-Landaverde, J. Huerta-Ruelas, and J. Torres, 'Ionic strength and pH effects on optical thermographs for bovine serum albumin (BSA)', *Cien. Technol. Aliment.*, vol. 5, no. 4, pp. 259–264, Jan. 2007. <https://doi.org/10.1080/11358120709487699>.
- [7] C. Anfinsen and H. Scheraga, 'Experimental and theoretical aspects of protein folding', *Adv Protein Chem*, vol. 29, pp. 205–300, 1975. [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60413-1](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60413-1).
- [8] K. A. Dill and H. Chan, 'From Levinthal to pathways to funnels', *Nat Struct Biol*, vol. 4, no. 1, pp. 10–9, Jan. 1997. <https://doi.org/10.1038/nsb0197-10>.
- [9] K. a Dill and J. MacCallum, 'The protein-folding problem, 50 years on.', *Science*, vol. 338, no. 6110, pp. 1042–6, Nov. 2012. <https://doi.org/10.1126/science.1219021>.

- [10] J. Schellman, 'Fifty years of solvent denaturation.', *Biophys Chem*, vol. 96, no. 2–3, pp. 91–101, May 2002, Accessed: Jul. 02, 2013, [https://doi.org/10.1016/s0301-4622\(02\)00009-1](https://doi.org/10.1016/s0301-4622(02)00009-1).
- [11] P. Privalov, 'Thermodynamics of protein folding', *J Chem Thermodyn*, vol. 29, no. 4, pp. 447–474, Apr. 1997, <https://doi.org/10.1006/jcht.1996.0178>.
- [12] G. Allen, A. Cooper, and G. Glasgow, 'Thermodynamics of Protein Folding and Stability', vol. 2, pp. 1–48, 1999, <https://doi.org/10.1007/s00249-019-01362-7>.
- [13] D. Whitford, *Proteins: structure and functions*, 1st ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2005. ISBN: 978-0-471-49894-0.
- [14] D. Nelson, A. Lehninger, and M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*, 5th ed. New York: Macmillan, 2008. ISBN: 9780716771081.
- [15] G. Petsko and D. Ringe, *Protein structure and function*. London: New Science Press, 2004. ISBN: 978-0878936632.
- [16] M. Levitt and C. Chothia, 'Structural patterns in globular proteins', *Nature*, vol. 261, pp. 552–558, 1976, <https://doi.org/10.1038/261552a0>.
- [17] V. Finkelstein and V. Galzitskaya, 'Physics of protein folding', *Phys Life Rev*, vol. 1, no. 1, pp. 23–56, Apr. 2004, <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2004.03.001>.
- [18] C. Levinthal, 'Are there pathways for protein folding?', *Journal de Chimie Physique*, vol. 65, pp. 44–45, 1968, <https://doi.org/10.1051/jcp/1968650044>.
- [19] J. Winkler, 'Electron tunneling pathways in proteins', *Curr Opin Chem Biol*, vol. 4, no. 2, pp. 192–198, Apr. 2000, [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(99\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)00074-5).
- [20] C. Cecconi, E. Shank, C. Bustamante, and S. Marqusee, 'Direct observation of the three-state folding of a single protein molecule.', *Science*, vol. 309, no. 5743, pp. 2057–60, Sep. 2005, <https://doi.org/10.1126/science.1116702>.
- [21] S. Salamanca Seguí, 'Plegamiento y funcionalidad biológica del inhibidor de metalocarboxipeptidasas LCI', *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*, Apr. 2004. ISBN: 8468841706.
- [22] X. Qi, C. Holt, and D. McNulty, 'Effect of temperature on the secondary structure of beta-lactoglobulin at pH 6.7, as determined by CD and IR spectroscopy: a test of the molten globule hypothesis.', *Biochem J*, vol. 324, pp. 341–346, May 1997, <https://doi.org/10.1042/bj3240341>.
- [23] H. Labouré, E. Cases, and Ph. Cayot, 'Heat induced β -lactoglobulin polymerization: role of the change in medium permittivity', *Food Chem*, vol. 85, no. 3, pp. 399–406, May 2004, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.017>.

- [24] R. Usha, R. Maheshwari, A. Dhathathreyan, and T. Ramasami, 'Structural influence of mono and polyhydric alcohols on the stabilization of collagen.', *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 48, no. 2, pp. 101–5, Mar. 2006, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.01.015>.
- [25] S. Woski, 'Bioorganic chemistry: Peptides and proteins', *J Am Chem Soc*, vol. 120, no. 47, pp. 12386–12386, Dec. 1998, <https://doi.org/10.1021/ja985642p>.
- [26] W. Kauzmann, 'Some factors in the interpretation of protein denaturation', *Adv Protein Chem*, vol. 14, pp. 1–63, Jan. 1959, [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60608-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60608-7).
- [27] V. Calandrini, D. Fioretto, G. Onori, and A. Santucci, 'Role of hydrophobic interactions on the stabilisation of native state of globular proteins', *Chem Phys Lett*, vol. 324, no. 5–6, pp. 344–348, Jul. 2000, [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(00\)00589-3](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(00)00589-3).
- [28] C. Tanford, 'Contribution of Hydrophobic Interactions to the Stability of the Globular Conformation', *J Am Chem Soc*, vol. 84, no. 22, pp. 4240–4247, 1962, <https://doi.org/10.1021/ja00881a009>.
- [29] K. Dill, 'Dominant forces in protein folding.', *Biochemistry*, vol. 29, no. 31, pp. 7133–55, 1990, <https://doi.org/10.1021/bi00483a001>.
- [30] T. Creamer, R. Srinivasan, and G. Rose, 'Modeling unfolded states of proteins and peptides. II. Backbone solvent accessibility.', *Biochemistry*, vol. 36, no. 10, pp. 2832–5, Mar. 1997, <https://doi.org/10.1021/bi962819o>.
- [31] P. Privalov and S. Gill, 'Stability of protein structure and hydrophobic interaction.', *Adv Protein Chem*, vol. 39, pp. 191–234, Jan. 1988, [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60377-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60377-0).
- [32] C. Scharnagl, M. Reif, and J. Friedrich, 'Stability of proteins: temperature, pressure and the role of the solvent.', *Biochim Biophys Acta*, vol. 1749, no. 2, pp. 187–213, Jun. 2005, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.03.002>.
- [33] J. Chelftel, J. Cuq, and D. Lórient, *Proteínas alimentarias: Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas*. Zaragoza, 1989. ISBN: 9788420006499.
- [34] F. Franks, 'Protein stability: The value of "old literature"', *Biophys Chem*, vol. 96, no. 2–3, pp. 117–127, 2002, [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(02\)00014-5](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00014-5).
- [35] J. Bischof and X. He, 'Thermal stability of proteins.', *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1066, pp. 12–33, Dec. 2005, <https://doi.org/10.1196/annals.1363.003>.

- [36] A. van Teeffelen, K. Broersen, and H. de Jongh, 'Glucosylation of beta-lactoglobulin lowers the heat capacity change of unfolding; a unique way to affect protein thermodynamics.', *Protein Sci*, vol. 14, no. 8, pp. 2187–94, Aug. 2005, <https://doi.org/10.1110/ps.051405005>.
- [37] R. Tilton, J. Dewan, and G. Petsko, 'Effects of temperature on protein structure and dynamics: x-ray crystallographic studies of the protein ribonuclease-A at nine different temperatures from 98 to 320K', *Biochemistry*, vol. 31, no. 9, pp. 2469–2481, Mar. 1992, <https://doi.org/10.1021/bi00124a006>.
- [38] C. Tanford, 'Protein Denaturation', *Adv Protein Chem*, pp. 121–282, 1968, [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60401-5](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60401-5).
- [39] D. Canchi and A. García, 'Cosolvent effects on protein stability.', *Annu Rev Phys Chem*, vol. 64, pp. 273–93, Jan. 2013, <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-040412-110156>.
- [40] D. Otzen, 'Protein-surfactant interactions: a tale of many states.', *Biochim Biophys Acta*, vol. 1814, no. 5, pp. 562–91, May 2011, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.03.003>.
- [41] A. Rozo Balceró, *Influencia de la temperatura y longitud de cadena en los coeficientes osmóticos y de actividad de sales de amonio cuaternario en solución acuosa*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, 2011. [Online]. Available: <http://www.bdigital.unal.edu.co/5339/1/anapatriciarozobalceró.2011.pdf>
- [42] N. v. di Russo, D. Estrin, M. Martí, and A. Roitberg, 'pH-Dependent Conformational Changes in Proteins and Their Effect on Experimental pKas: The Case of Nitrophorin 4', *PLoS Comput Biol*, vol. 8, no. 11, 2012, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002761>.
- [43] K. Talley and E. Alexov, 'On the pH-optimum of activity and stability of proteins', *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, vol. 78, no. 12, pp. 2699–2706, 2010, <https://doi.org/10.1002/prot.22786>.
- [44] C. Tanford, 'Protein denaturation: Part c. theoretical models for the mechanism of denaturation', *Adv Protein Chem*, vol. 24, no. C, pp. 1–95, 1970, [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60241-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60241-7).
- [45] A. H. Elcock, 'Realistic modeling of the denatured states of proteins allows accurate calculations of the pH dependence of protein stability.', *J Mol Biol*, vol. 294, no. 4, pp. 1051–62, Dec. 1999, <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3305>.
- [46] E. P. O'Brien, B. R. Brooks, and D. Thirumalai, 'Effects of pH on proteins: Predictions for ensemble and single-molecule pulling experiments', *J Am Chem Soc*, vol. 134, no. 2, pp. 979–987, 2012, <https://doi.org/10.1021/ja206557y>.

- [47] S. T. Whitten, J. O. Wooll, R. Razeghifard, E. B. García-Moreno, and V. J. Hilser, 'The origin of pH-dependent changes in m-values for the denaturant-induced unfolding of proteins', *J Mol Biol*, vol. 309, no. 5, pp. 1165–1175, 2001, <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4726>.
- [48] A. Cooper, 'Thermodynamic analysis of biomolecular interactions.', *Curr Opin Chem Biol*, vol. 3, no. 5, pp. 557–63, Oct. 1999, Accessed: Jun. 19, 2013, [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(99\)00008-3](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(99)00008-3).
- [49] C. Gómez-Moreno and J. Sancho, *Estructura de proteínas*, 1st ed. Barcelona: Gayban Grafic, 2003. ISBN: 9788434480612.
- [50] G. Giraldo, 'Aspectos termodinámicos de la relación entre grupos polares y apolares de alcoholes c-4 y su efecto sobre la estabilidad estructural de la β -lactoglobulina en soluciones acuosas', Universidad Nacional de Colombia, 2007. [Online]. Available: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/29997>.
- [51] J. Sancho, 'The stability of 2-state, 3-state and more-state proteins from simple spectroscopic techniques... plus the structure of the equilibrium intermediates at the same time', *Arch Biochem Biophys*, vol. 531, no. 1–2, pp. 4–13, 2013, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.10.014>.
- [52] J. Brandts and L. Hunt, 'The thermodynamics of protein denaturation. 3. The denaturation of ribonuclease in water and in aqueous urea and aqueous ethanol mixtures.', *J Am Chem Soc*, vol. 89, no. 19, pp. 4826–38, Sep. 1967, <https://doi.org/10.1021/ja00995a002>.
- [53] M. Zweifel and D. Barrick, 'Relationships between the temperature dependence of solvent denaturation and the denaturant dependence of protein stability curves.', *Biophys Chem*, vol. 101–102, pp. 221–37, Dec. 2002, [https://doi.org/10.1016/s0301-4622\(02\)00181-3](https://doi.org/10.1016/s0301-4622(02)00181-3).
- [54] I. Haque, R. Singh, A. Moosavi-Movahedi, and F. Ahmad, 'Effect of polyol osmolytes on $\Delta G(D)$, the Gibbs energy of stabilisation of proteins at different pH values.', *Biophys Chem*, vol. 117, no. 1, pp. 1–12, Aug. 2005, <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2005.04.004>.
- [55] M. Auton, A. Ferreon, and D. Bolen, 'Metrics that differentiate the origins of osmolyte effects on protein stability: a test of the surface tension proposal.', *J Mol Biol*, vol. 361, no. 5, pp. 983–92, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.jmb.2006.07.003.
- [56] P. Davis-Searles, A. Saunders, D. Erie, D. Winzor, and G. Pielak, 'Interpreting the effects of small uncharged solutes on protein-folding equilibria.', *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, vol. 30, pp. 271–306, Jan. 2001, <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.30.1.271>.

- [57] J. Wyman, 'Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: A second look.', *Adv Protein Chem*, vol. 19, pp. 223–286, 1964, [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60190-4](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60190-4).
- [58] R. Curtis, J. Newman, H. Blanch, and J. Prausnitz, 'McMillan-Mayer solution thermodynamics for a protein in a mixed solvent', *Fluid Phase Equilib*, vol. 192, no. 1–2, pp. 131–153, [https://doi.org/10.1016/S0378-3812\(01\)00635-5](https://doi.org/10.1016/S0378-3812(01)00635-5).
- [59] V. Parsegian, R. Rand, and D. Rau, 'Osmotic stress, crowding, preferential hydration, and binding: A comparison of perspectives.', *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no. 8, pp. 3987–92, Apr. 2000, <https://doi.org/10.1073/pnas.97.8.3987>.
- [60] S. Timasheff, 'Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated.', *Adv Protein Chem*, vol. 51, pp. 355–432, Jan. 1998, [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60656-7](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60656-7).
- [61] T. Arakawa and S. Timasheff, 'Stabilization of protein structure by sugars.', *Biochemistry*, vol. 21, no. 25, pp. 6536–44, Dec. 1982, <https://doi.org/10.1021/bi00268a033>.
- [62] G. Xie and S. Timasheff, 'Mechanism of the stabilization of ribonuclease A by sorbitol: preferential hydration is greater for the denatured than for the native protein.', *Protein Sci*, vol. 6, no. 1, pp. 211–21, Jan. 1997, <https://doi.org/10.1002/pro.5560060123>.
- [63] S. Shimizu and D. Smith, 'Preferential hydration and the exclusion of cosolvents from protein surfaces.', *J Chem Phys*, vol. 121, no. 2, pp. 1148–54, Jul. 2004, <https://doi.org/10.1063/1.1759615>.
- [64] R. Bhat and S. Timasheff, 'Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols.', *Protein Sci*, vol. 1, no. 9, pp. 1133–43, Sep. 1992, <https://doi.org/10.1002/pro.5560010907>.
- [65] T. Arakawa and S. Timasheff, 'The stabilization of proteins by osmolytes', *Biophys J*, vol. 47, no. 3, pp. 411–4, Mar. 1985, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(85\)83932-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(85)83932-1).
- [66] S. Timasheff, 'In disperse solution, "osmotic stress" is a restricted case of preferential interactions.', *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no. 13, pp. 7363–7, Jun. 1998, <https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7363>.
- [67] T. Lin and S. Timasheff, 'On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins.', *Protein Sci*, vol. 5, no. 2, pp. 372–81, Feb. 1996, <https://doi.org/10.1002/pro.5560050222>.
- [68] A. Taravati, M. Shokrzadeh, A. Ebadi, 'Various effects of sugar and polyols on the protein structure and function: Role as osmolyte on protein stability', *World Applied Sci. J.*, vol. 2, pp. 353–362, 2007. ISSN: 18184952.

- [69] S. Timasheff and G. Xie, 'Preferential interactions of urea with lysozyme and their linkage to protein denaturation', *Biophys Chem*, vol. 105, no. 2–3, pp. 421–448, Sep. 2003, [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(03\)00106-6](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(03)00106-6).
- [70] J. Lee, K. Gekko, and S. Timasheff, 'Measurements of preferential solvent interactions by densimetric techniques.', *Methods Enzymol*, vol. 61, pp. 26–49, 1979, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(79\)61005-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(79)61005-4).
- [71] J. Lee and S. Timasheff, 'Partial specific volumes and interactions with solvent components of proteins and guanidine hydrochloride', *Biochemistry*, vol. 13, no. 2, pp. 257–265, 1974, doi:10.1021/bi00699a005.
- [72] E. Courtenay, M. Capp, C. Anderson, and M. Record, 'Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: implications for the action of osmoprotectants in vivo and for the interpretation of "osmotic stress" experiments in vitro.', *Biochemistry*, vol. 39, no. 15, pp. 4455–71, Apr. 2000, <https://doi.org/10.1021/bi992887l>.
- [73] L. Blanco, E. Amado, and J. Avellaneda, 'Isopiestic determination of the osmotic and activity coefficients of dilute aqueous solutions of the series MeEt3NI to HepEt3NI at 298.15K', *Fluid Phase Equilib*, vol. 249, no. 1–2, pp. 147–152, Nov. 2006, <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2006.09.025>.
- [74] T. Lin and S. Timasheff, 'On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins.', *Protein Sci*, vol. 5, no. 2, pp. 372–81, Feb. 1996, <https://doi.org/10.1002/pro.5560050222>.
- [75] F. Cioci, R. Lavecchia, and L. Marrelli, 'Effect of surface tension on the conformational stability of erythrocyte carbonic anhydrase', vol. 116, pp. 118–125, 1996, [https://doi.org/10.1016/0378-3812\(95\)02879-X](https://doi.org/10.1016/0378-3812(95)02879-X).
- [76] C. Romero and A. Albis, 'Influence of polyols and glucose on the surface tension of bovine α -lactalbumin in aqueous solution', *J Solution Chem*, vol. 39, no. 12, pp. 1865–1876, 2010, <https://doi.org/10.1007/s10953-010-9554-5>.
- [77] C. Romero and J. Abella, 'Surface behavior of α -chymotrypsinogen A in aqueous solutions at 298.15 K', *J Mol Liq*, vol. 285, pp. 89–95, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.04.073>.
- [78] C. Romero, J. Abella, and Y. Beltrán, 'Influence of salts on the surface behavior of α -chymotrypsinogen A in aqueous solutions at 298.15 K', *J Mol Liq*, vol. 344, p. 117723, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117723>.

- [79] J. Lee and S. Timasheff, 'The stabilization of proteins by sucrose.', *J Biol Chem*, vol. 256, no. 14, pp. 7193–201, Jul. 1981, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)68947-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)68947-7).
- [80] P. Wiggins, 'Hydrophobic hydration, hydrophobic forces and protein folding', *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, vol. 238, no. 1–4, pp. 113–128, 1997, [https://doi.org/10.1016/S0378-4371\(96\)00431-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4371(96)00431-1).
- [81] Y. Kita, T. Arakawa, T. Lin, and S. Timasheff, 'Contribution of the Surface Free Energy Perturbation to Protein-Solvent Interactions', *Biochemistry*, vol. 33, no. 50, pp. 15178–15189, 1994, <https://doi.org/10.1021/bi00254a029>.
- [82] J. Krause, 'Surface activity of proteins: chemical and physicochemical modifications.', *Molecular nutrition food research*, vol. 41, no. 4, pp. 245–245, 1997, <https://doi.org/10.1002/food.19970410415>.
- [83] C. Romero and N. Mendieta, 'Influence of 1-butanol, 1,2-butanediol and 1,2,3,4-butanetriol on the adsorption of b-lactoglobulin at the air-water interface', *Revista Colombiana de Química*, vol. 40, no. 3, pp. 367–380, 2011. ISSN: 0120-2804.
- [84] G. Yampolskaya and D. Platikanov, 'Proteins at fluid interfaces: Adsorption layers and thin liquid films', *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 128–130, no. 2006, pp. 159–183, Dec. 2006, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.11.018>.
- [85] T. Kongraksawech, 'Characterization by optical methods of the heat denaturation of bovine serum albumin (BSA) as affected by protein concentration, pH, ionic strength and sugar concentration', Oregon State University, 2006. [Online]. Available: https://ir.library.oregonstate.edu/concern/graduate_thesis_or_dissertations/v118rh400
- [86] D. C. Carter and J. X. Ho, 'Structure of serum albumin.', *Adv Protein Chem*, vol. 45, pp. 153–203, Jan. 1994, doi: 10.1016/s0065-3233(08)60640-3.
- [87] M. Baker, 'Albumin's role in steroid hormone action and the origins of vertebrates: is albumin an essential protein?', *FEBS Lett*, vol. 439, no. 1–2, pp. 9–12, 1998, doi: 10.1016/S0014-5793(98)01346-5.
- [88] P. Relkin, 'Thermal unfolding of beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach.', *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 36, no. 6, pp. 565–601, Jul. 1996, <https://doi.org/10.1080/10408399609527740>.
- [89] B. Huang, H. Kim, and C. Dass, 'Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry', *J Am Soc Mass Spectrom*, vol. 15, no. 8, pp. 1237–1247, 2004, <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.05.004>.

- [90] L. Wu, B. Ma, D. Zou, Z. Tie, J. Wang, and W. Wang, 'Influence of metal ions on folding pathway and conformational stability of bovine serum albumin', *J Mol Struct*, vol. 877, no. 1–3, pp. 44–49, Apr. 2008, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2007.07.013>.
- [91] T. Peters, 'Serum albumin', *Adv Protein Chem*, vol. 37, pp. 161–246, 1985, [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60065-0](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60065-0).
- [92] T. Peters, 'All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications.', *America (NY)*, 1996. ISBN: 9780080527048.
- [93] D. Bendedouch and S. Chen, 'Structure and interparticle interactions of bovine serum albumin in solution studied by small-angle neutron scattering', *Journal of Physical Chemistry*, vol. 87, no. 9, pp. 1473–1477, 1983, <https://doi.org/10.1021/j100232a003>.
- [94] D. Li, M. Zhu, C. Xu, and B. Ji, 'Characterization of the baicalein-bovine serum albumin complex without or with Cu²⁺ or Fe³⁺ by spectroscopic approaches.', *Eur J Med Chem*, vol. 46, no. 2, pp. 588–99, Feb. 2011, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.11.038>.
- [95] K. Murayama and M. Tomida, 'Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier transform infrared spectroscopy.', *Biochemistry*, vol. 43, no. 36, pp. 11526–32, Sep. 2004, <https://doi.org/10.1021/bi0489154>.
- [96] Y. Moriyama, E. Watanabe, K. Kobayashi, H. Harano, E. Inui, and K. Takeda, 'Secondary structural change of bovine serum albumin in thermal denaturation up to 130 degrees C and protective effect of sodium dodecyl sulfate on the change.', *J Phys Chem B*, vol. 112, no. 51, pp. 16585–9, Dec. 2008, doi: 10.1021/jp8067624.
- [97] R. Wetzel, 'Temperature Behaviour of Human Serum Albumin', *Eur J Biochem*, vol. 104, no. 2, pp. 469–478, Mar. 1980, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb04449.x>.
- [98] M. Noelken and S. Timasheff, 'Preferential solvation of bovine serum albumin in aqueous guanidine hydrochloride.', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 242, no. 21, pp. 5080–5085, 1967, [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)99478-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)99478-0).
- [99] T. Arakawa and S. Timasheff, 'Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions.', *Arch Biochem Biophys*, vol. 224, no. 1, pp. 169–77, Jul. 1983, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(83\)90201-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90201-1).

- [100] S. Baier and D. McClements, 'Impact of sorbitol on the thermostability and heat-induced gelation of bovine serum albumin', *Food Research International*, vol. 36, no. 9–10, pp. 1081–1087, Jan. 2003, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2003.09.003>.
- [101] S. Baier, E. Decker, and D. McClements, 'Impact of glycerol on thermostability and heat-induced gelation of bovine serum albumin', *Food Hydrocoll*, vol. 18, no. 1, pp. 91–100, Jan. 2004, [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00046-8](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00046-8).
- [102] H. A. McKenzie, *Milk proteins: chemistry and molecular biology*, no. v. 2. New York: Academic Press, 1970. ISBN: 0124852025.
- [103] M. Yamasaki, H. Yano, and K. Aoki, 'Differential scanning calorimetric studies on bovine serum albumin: I. Effects of pH and ionic strength', *Int J Biol Macromol*, vol. 12, no. 4, pp. 263–268, Aug. 1990, [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(90\)90007-W](https://doi.org/10.1016/0141-8130(90)90007-W).
- [104] L. Barbosa, M. Ortore, F. Spinozzi, P. Mariani, S. Bernstorff, and R. Itri, 'The importance of protein-protein interactions on the pH-induced conformational changes of bovine serum albumin: A small-angle x-ray scattering study', *Biophys J*, vol. 98, no. 1, pp. 147–157, 2010, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.056>.
- [105] G. McDonnell and a D. Russell, 'Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance.', *Clin Microbiol Rev*, vol. 12, no. 1, pp. 147–79, Jan. 1999, <https://doi.org/10.1128/cmr.12.1.147>.
- [106] S. Duce, A. Mateo, I. Alonso, J. García Ruano, and M. Cid, 'Role of quaternary ammonium salts as new additives in the enantioselective organocatalytic β -benzylation of enals.', *Chem Commun (Camb)*, vol. 48, no. 42, pp. 5184–6, May 2012, <https://doi.org/10.1039/c2cc31451g>.
- [107] J. Kinsella and N. Melachouris, 'Functional properties of proteins in foods: A survey', *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 7, no. 3, pp. 219–280, Apr. 1976, <https://doi.org/10.1080/10408397609527208>.
- [108] F. Franks, *Water: A Matrix of Life*, 2nd ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000. Accessed: Jul. 03, 2013. ISBN: 085404583X.
- [109] R. Apenten, S. Khokhar, and D. Galani, 'Stability parameters for β -lactoglobulin thermal dissociation and unfolding in phosphate buffer at pH 7.0', *Food Hydrocoll*, vol. 16, no. 2, pp. 95–103, 2002, [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00067-4).
- [110] J. Oremusová, 'Micellization of alkyl trimethyl ammonium bromides in aqueous solutions-part 1: Critical micelle concentration (cmc) and ionization degree', *Tenside, Surfactants, Detergents*, vol. 49, no. 3, pp. 231–240, 2012, <https://doi.org/10.3139/113.110187>.
- [111] J. Boye, C. Ma, and V. Harwalkar, *Thermal denaturation and coagulation of food proteins*. New York: Marcel Dekker, 1997. ISBN: 9780203755617.

- [112] G. Kontopidis, C. Holt, and L. Sawyer, 'Invited review: β -lactoglobulin: Binding properties, structure, and function', *J Dairy Sci*, vol. 87, no. 4, pp. 785–796, 2004, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73222-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73222-1).
- [113] S. Hambling, A. McAlpine, and L. Sawyer, 'Beta-lactoglobulin', in *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*, 3rd ed., P. Fox and K. McSweeney, Eds. Kluwer Academic, 1992, pp. 141–190. ISBN: 9781461447146.
- [114] T. Nicolai, M. Britten, and C. Schmitt, ' β -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications', *Food Hydrocoll*, vol. 25, no. 8, pp. 1945–1962, 2011, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.006>.
- [115] N. Turro, X. Lei, K. Ananthapadmanabhan, and M. Aronson, 'Spectroscopic Probe Analysis of Protein-Surfactant Interaciion: The BSA/SDS System', *Langmuir*, vol. 11, no. 7, pp. 2525–2533, 1995, <https://doi.org/10.1021/la00007a035>.
- [116] R. Waninge, M. Paulsson, T. Nylander, B. Ninham, and P. Sellers, 'Binding of Sodium Dodecyl Sulphate and Dodecyl Trimethyl Ammonium Chloride to beta-Lactoglobulin : A Calorimetric Study', *Int Dairy J*, vol. 8, no. 2, pp. 141–148, 1998, doi: 10.1016/S0958-6946(98)00031-4.
- [117] A. Moosavi-Movahedi, A. Bordbar, A. Taleshi, H. Naderimanesh, and P. Ghadam, 'Mechanism of denaturation of bovine serum albumin by dodecyl trimethylammonium bromide', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 28, no. 9, pp. 991–998, Sep. 1996, [https://doi.org/10.1016/1357-2725\(96\)00044-1](https://doi.org/10.1016/1357-2725(96)00044-1).
- [118] J. Wen, K. Arthur, L. Chemmalil, S. Muzammil, J. Gabrielson, and Y. Jiang, 'Applications of Differential Scanning Calorimetry for Thermal Stability Analysis of Proteins: Qualification of DSC', *J Pharm Sci*, vol. 101, no. 3, pp. 955–964, Mar. 2012, <https://doi.org/10.1002/JPS.22820>.
- [119] B. Zhou, J. Tobin, S. Drusch, and S. Hogan, 'Interfacial properties of milk proteins: A review', *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 295, p. 102347, Sep. 2021, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102347>.
- [120] S. Timasheff, 'The control of protein stability and association by weak interactions with water: How Do Solvents Affect These Processes?', *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, vol. 22, pp. 67–97, 1993, <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.22.060193.000435>.
- [121] J. Sánchez-ruiz, J. López-lacomba, M. Cortijo, and P. Mateo, 'Differential Scanning Calorimetry of the Irreversible Thermal Denaturation of Thermolysin', *Biochemistry*, vol. 27, no. 5, pp. 1648–1652, 1988, <https://doi.org/10.1021/bi00405a039>.

- [122] C. Giancola, C. de Sena, D. Fessas, G. Graziano, and G. Barone, 'DSC studies on bovine serum albumin denaturation effects of ionic strength and SDS concentration', *Int J Biol Macromol*, vol. 20, no. 3, pp. 193–204, 1997, [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(97\)01159-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(97)01159-8).
- [123] A. Michnik, 'Thermal stability of bovine serum albumin DSC study', *J Therm Anal Calorim*, vol. 71, no. 2, pp. 509–519, 2003, <https://doi.org/10.1023/A:1022851809481>.
- [124] R. Raoufinia, A. Mota, N. Keyhanvar, F. Safari, S. Shamekhi, and J. Abdolalizadeh, 'Overview of albumin and its purification methods', *Adv Pharm Bull*, vol. 6, no. 4, pp. 495–507, 2016, <https://doi.org/10.15171/apb.2016.063>.
- [125] W. Norde and C. Giacomelli, 'BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states', *J Biotechnol*, vol. 79, no. 3, pp. 259–268, 2000, [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00242-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00242-X).
- [126] S. Chaturvedi, E. Ahmad, J. Khan, P. Alam, M. Ishtikhar, and R. Khan, 'Elucidating the interaction of limonene with bovine serum albumin: a multi-technique approach', *Mol. BioSyst.*, vol. 11, no. 1, pp. 307–316, 2015, <https://doi.org/10.1039/C4MB00548A>.
- [127] B. Elysée-Collen and R. Lencki, 'Effect of ethanol, ammonium sulfate, fatty acids, and temperature on the solution behavior of bovine serum albumin', *Biotechnol Prog*, vol. 13, no. 6, pp. 849–856, 1997, <https://doi.org/10.1021/bp9700768>.
- [128] T. Vermonden, C. Giacomelli, and W. Norde, 'Reversibility of structural rearrangements in bovine serum albumin during homomolecular exchange from AgI particles', *Langmuir*, vol. 17, no. 12, pp. 3734–3740, 2002, <https://doi.org/10.1021/la010162o>.
- [129] T. Banerjee and N. Kishore, 'Insights into the energetics and mechanism underlying the interaction of tetraethylammonium bromide with proteins', *Journal of Chemical Thermodynamics*, vol. 40, no. 3, pp. 483–491, 2008, <https://doi.org/10.1016/j.jct.2007.08.007>.
- [130] D. Kelley and D. McClements, 'Interactions of bovine serum albumin with ionic surfactants in aqueous solutions', *Food Hydrocoll*, vol. 17, no. 1, pp. 73–85, 2003, [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(02\)00040-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(02)00040-1).
- [131] M. Pramila, D. Uma, and M. Suprava, 'Investigation of bovine serum albumin-surfactant aggregation and its physicochemical characteristics', *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 483, pp. 36–44, 2015, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.06.052>.

- [132] G. Barone, 'Comparative DSC study of human and bovine serum albumin', *J Therm Anal Calorim*, vol. 40, no. 1, pp. 113–117, Mar. 1997, <https://doi.org/10.1007/s10973-005-7170-1>.
- [133] R. Zieliński, S. Ikeda, H. Nomura, and S. Kato, 'Effect of temperature on micelle formation in aqueous solutions of alkyltrimethylammonium bromides', *J Colloid Interface Sci*, vol. 129, no. 1, pp. 175–184, 1989, [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(89\)90428-1](https://doi.org/10.1016/0021-9797(89)90428-1).
- [134] K. Tamaki, 'The Surface Activity of Tetra- n -alkylammonium Halides in Aqueous Solutions. The Effect of Hydrophobic Hydration', *Bull Chem Soc Jpn*, vol. 47, no. 11, pp. 2764–2767, Nov. 1974, <https://doi.org/10.1246/bcsj.47.2764>.
- [135] K. Dopierala and K. Prochaska, 'The effect of molecular structure on the surface properties of selected quaternary ammonium salts', *J Colloid Interface Sci*, vol. 321, no. 1, pp. 220–226, 2008, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.01.049>.
- [136] D. Gómez-Díaz, J. Navaza, and B. Sanjurjo, 'Density, Kinematic Viscosity, Speed of Sound, and Surface Tension of Hexyl, Octyl, and Decyl Trimethyl Ammonium Bromide Aqueous Solutions', *J Chem Eng Data*, vol. 52, no. 3, pp. 889–891, May 2007, <https://doi.org/10.1021/je060486k>.
- [137] A. Escamilla, 'Concentración micelar crítica de bromuros de octiltrimetilamonio y deciltrimetilamonio en agua y en soluciones acuosas de 1,2-propanodiol a 298,15K', Universidad Nacional de Colombia, 2015. [Online]. Available: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/56690>
- [138] N. Mucic, 'Adsorption of equimolar aqueous sodium dodecyl sulphate/dodecyl trimethylammonium bromide mixtures at solution/air and solution/oil interfaces', *Colloid Polym Sci*, vol. 293, no. 11, pp. 3099–3106, Nov. 2015, <https://doi.org/10.1007/s00396-015-3735-0>.
- [139] J. Zawala, A. Wiertel-Pochopien, and P. Kowalczyk, 'Critical Synergistic Concentration of Binary Surfactant Mixtures', *Minerals*, vol. 10, no. 2, p. 192, Feb. 2020, <https://doi.org/10.3390/min10020192>.
- [140] V. Bergeron, 'Disjoining Pressures and Film Stability of Alkyltrimethylammonium Bromide Foam Films', *Langmuir*, vol. 13, no. 13, pp. 3474–3482, Jun. 1997, <https://doi.org/10.1021/la970004q>.
- [141] A. Olea and C. Gamboa, 'Synergism in mixtures of cationic surfactant and anionic copolymers', *J Colloid Interface Sci*, vol. 257, no. 2, pp. 321–326, 2003, [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(02\)00019-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(02)00019-X).

- [142] D. Guzey, D. McClements, and J. Weiss, 'Adsorption kinetics of BSA at air-sugar solution interfaces as affected by sugar type and concentration', *Food Research International*, vol. 36, no. 7, pp. 649–660, 2003, [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00004-8](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00004-8).
- [143] A. Medrano, C. Abirached, L. Panizzolo, P. Moyna, and M. Añón, 'The effect of glycation on foam and structural properties of β -lactoglobulin', *Food Chem*, vol. 113, no. 1, pp. 127–133, 2009, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.036>.
- [144] R. Baeza, C. Carrera Sanchez, A. Pílosof, and J. Rodríguez Patino, 'Interactions of polysaccharides with β -lactoglobulin adsorbed films at the air–water interface', *Food Hydrocoll*, vol. 19, no. 2, pp. 239–248, 2005, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.06.002>.
- [145] C. Rao and S. Damodaran, 'Is surface pressure a measure of interfacial water activity? Evidence from protein adsorption behavior at interfaces', *Langmuir*, vol. 16, no. 24, pp. 9468–9477, 2000, <https://doi.org/10.1021/la0007168>.
- [146] A. Ward and L. Tordai, 'Time-Dependence of Boundary Tensions of Solutions I. The Role of Diffusion in Time-Effects', *J Chem Phys*, vol. 14, no. 7, pp. 453–461, Jul. 1946, <https://doi.org/10.1063/1.1724167>.
- [147] V. Alahverdijeva, 'Adsorption behaviour of hen egg-white lysozyme at the air/water interface', *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 323, no. 1–3, pp. 167–174, Jun. 2008, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.12.031>.
- [148] V. Ruíz-Henestrosa, C. Sánchez, Y. Escobar, J. Jiménez, F. Rodríguez, and J. Patino, 'Interfacial and foaming characteristics of soy globulins as a function of pH and ionic strength', *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 309, no. 1–3, pp. 202–215, Nov. 2007, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.01.030>.
- [149] J. Álvarez Gómez, V. Henestrosa, C. Sánchez, and J. Rodríguez, 'The role of static and dynamic characteristics of diglycerol esters and β -lactoglobulin mixed films foaming. 1. Dynamic phenomena at the air–water interface', *Food Hydrocoll*, vol. 22, no. 6, pp. 1105–1116, 2008, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.06.002>.
- [150] D. Graham and M. Phillips, 'Proteins at liquid interfaces. I. Kinetics of adsorption and surface denaturation', *J Colloid Interface Sci*, vol. 70, no. 3, pp. 403–414, 1979, [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(79\)90048-1](https://doi.org/10.1016/0021-9797(79)90048-1).
- [151] V. Mosquera, 'A study of the aggregation behavior of hexyltrimethylammonium bromide in aqueous solution', *J Colloid Interface Sci*, vol. 206, no. 1, pp. 66–76, 1998, <https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5708>.
- [152] Z. Ryszard, 'Effect of Temperature on the Viscosity of Aqueous Solutions of Alkyltrimethylammonium Bromides', *Zeitschrift fur Physikalische Chemie*, vol. 173, no. 1, pp. 63–78, 1991, https://doi.org/10.1524/zpch.1991.173.Part_1.063.

- [153] J. Oremusová, 'Micellization of alkyl trimethyl ammonium bromides in aqueous solutions - Part 1: critical micelle concentration (CMC) and ionization degree', *Archive Tenside Surfactants Detergents*, vol. 49, no. 3, pp. 231–240, 2012, <https://doi.org/10.3139/113.110187>.
- [154] N. Matubayasi, K. Takayama, and T. Ohata, 'Thermodynamic quantities of surface formation of aqueous electrolyte solutions. IX. Aqueous solutions of ammonium salts', *J Colloid Interface Sci*, vol. 344, no. 1, pp. 209–213, 2010, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.12.018>.
- [155] P. Mukerjee and K. Mysels, 'Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems', *J Pharm Sci*, vol. 61, no. 2, p. 319, Feb. 1972, <https://doi.org/10.1002/jps.2600610254>.
- [156] W. Wen and S. Saito, 'Apparent and Partial Molal Volumes of Five Symmetrical Tetraalkylammonium Bromides in Aqueous Solutions', *J Phys Chem*, vol. 68, no. 9, pp. 2639–2644, Sep. 1964, <https://doi.org/10.1021/j100791a042>.
- [157] R. Buwalda, J. Engberts, H. Høiland, and M. Blandamer, 'Volumetric properties and compressibilities of alkyltrimethylammonium bromides and sodium alkylsulphates in aqueous solution', *J Phys Org Chem*, vol. 11, no. 1, pp. 59–62, 1998, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1395\(199801\)11:1<59::AID-POC971>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1395(199801)11:1<59::AID-POC971>3.0.CO;2-1).
- [158] J. Corkill, J. Goodman, and T. Walker, 'Partial molar volumes of surface-active agents in aqueous solution', *Transactions of the Faraday Society*, vol. 63, no. 0, pp. 768–772, 1967, <https://doi.org/10.1039/TF9676300768>.
- [159] R. de Lisi, C. Ostiguy, G. Perron, and J. Desnoyers, 'Complete thermodynamic properties of nonyl- and decyltrimethylammonium bromides in water', *J Colloid Interface Sci*, vol. 71, no. 1, pp. 147–166, 1979, [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(79\)90229-7](https://doi.org/10.1016/0021-9797(79)90229-7).
- [160] R. de Lisi, V. Liveri, M. Castagnolo, and A. Inglese, 'Mass action model for solute distribution between water and micelles. Partial molar volumes of butanol and pentanol in dodecyl surfactant solutions', *J Solution Chem*, vol. 15, no. 1, pp. 23–54, 1986, <https://doi.org/10.1007/BF00646309>.
- [161] J. Abella and C. Romero, 'Preferential Interaction of Chymotrypsinogen in Aqueous Solutions of Polyols at 298.15 K', *J Solution Chem*, vol. 48, no. 11, pp. 1591–1602, 2019, <https://doi.org/10.1007/s10953-019-00936-5>.
- [162] T. Arakawa and S. Timasheff, 'Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions', *Arch Biochem Biophys*, vol. 224, no. 1, pp. 169–177, Jul. 1983, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(83\)90201-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90201-1).