



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Estudio del efecto de diferentes modificaciones post-traduccionales sobre la capacidad adherente de la albúmina bovina.

Jonadab Barceló Molina

Grau de Química

Any acadèmic 2018-19

Treball tutelat per Miquel Adrover Estelrich
Departament de Química

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

Glicación, albúmina sérica, productos finales de la glicación, agentes glicantes, capacidad adherente.

ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
1 La glicación de proteínas y agentes glicantes.....	3
1.1 Glucosa.....	5
1.2 Fructosa.....	6
1.3 Ribosa.....	7
1.4 Glioxal.....	7
1.5 Metilglioxal.....	8
2 Propiedades de la albúmina	9
2.1 Glicación de la albúmina	10
3 Propiedades adherentes de las proteínas	10
OBJETIVO	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
1 Materiales	13
2 Preparación de tampones	13
3 Preparación de las mezclas de reacción.....	13
4 Preparación de maderas	14
5 Protocolo para el estudio de la adhesión.....	15
6 Medida de la fuerza de adhesión	15
7 Análisis estadístico de los datos experimentales.....	16
RESULTADOS Y DISCUSIONES	17
1 Estudio de los diferentes agentes glicantes sobre el espectro UV-Vis de la albúmina.....	17
2 Investigación de las condiciones para obtener una mejor adherencia	18
2.1 Tiempo de incubación	18
2.2 Relación de concentración	19
2.3 Concentración de proteína.....	20
3 Efecto del pH sobre la adherencia.....	22
4 Comparación entre diferentes agentes glicantes.....	23
5 Efecto de adición de metales y/o oxidantes.....	23
6 Efecto de tiempo y la temperatura de contacto sobre la adherencia	24
7 Efecto del agua sobre la capacidad de adhesión.....	25
8 Comparación con pegamentos comerciales.....	26
9 Otras muestras biológicas que contienen proteínas: la yema de huevo.....	26
10 Estudio comparativo de las adherencias con las de otras proteínas modificadas.....	27
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFÍA	29

RESUMEN

La glicación no enzimática, implica la reacción entre aminoácidos y azúcares reductores. En el campo de la nutrición, este proceso se conoce desde el año 1912 y se denomina reacción de Maillard. Esta reacción conlleva la formación de compuestos muy estables, conocidos como productos de la glicación avanzada (AGEs), los cuales se acumulan sobre las proteínas y son los responsables de dar color y sabor a los alimentos. Sin embargo, si estos AGEs se acumulan en el organismo, facilitan el desarrollo de diferentes eventos patológicos. Hasta la fecha, son muchos los aspectos que se conocen sobre las proteínas glicadas, aunque todavía no se ha estudiado si dicha modificación les podría conferir propiedades adherentes. Por ello, en este trabajo, se han estudiado las reacciones de glicación de la albúmina sérica bovina (BSA) con diferentes agentes glicantes: ribosa, glucosa, fructosa, glioxal y metilglioxal. Las muestras obtenidas, fueron utilizadas para evaluar si la BSA glicada tenía propiedades adherentes superiores a las de la BSA nativa. Se comprobó que la glicación confiere a la BSA la capacidad de pegar madera. Se investigaron las mejores condiciones experimentales para obtener una mejor adherencia con cada agente glicante. Por último, se comparó la capacidad adherente de las diferentes muestras de BSA glicada, con la de adhesivos comerciales derivados del petróleo. Dicha comparación demuestra que la BSA glicada presenta una capacidad adherente similar a la de los pegamentos comerciales, lo que abre las puertas a una ruta alternativa para la fabricación de adhesivos de bajo coste, de origen natural y por tanto, respetuosos con el medio ambiente.

INTRODUCCIÓN

1 La glicación de proteínas y agentes glicantes.

El proceso de glicación no enzimática de proteínas, implica la reacción entre aminoácidos y azúcares reductores (los cuales incluyen la presencia de un grupo aldehído). En el campo de la nutrición, este proceso conocido desde el año 1912 y se denomina reacción de Maillard. La reacción de Maillard es la responsable del oscurecimiento que tiene lugar durante la cocción de los alimentos con contenido proteico. La reacción de Maillard implica tres etapas (Figura 1), las dos primeras secuenciales y la tercera, aparece como consecuencia de reacciones paralelas (**Romay, 1987**).

La **primera etapa** se inicia con la reacción nucleófila entre un grupo amino de un aminoácido con el grupo aldehído de un azúcar reductor acíclico para formar una base de Schiff o aldimina. Esta unión, bastante lábil y fácilmente dissociable, sufre una posterior reordenación, denominada de Amadori, la cual implica la formación de una cetoamina, que puede ciclarse intramolecularmente para adquirir una estructura más estable (**Grande, 1992**).

Cuando la glicación se da *in vivo* implica la participación simultánea de un gran número de azúcares los cuales se unen covalentemente a las proteínas. La reactividad del monosacárido depende de la proporción de su forma acíclica y de la electrofilia intrínseca de su grupo carbonilo, siendo la de los aldehídos mayor que la de las cetonas.

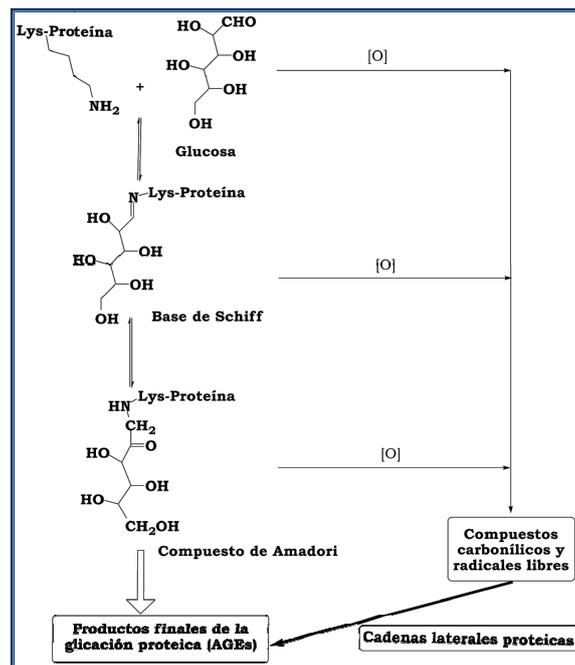


Figura 1. Mecanismo general de la glicación proteica.

La **segunda etapa** implica la evolución del compuesto de Amadori mediante reacciones de enolización, deshidratación, ciclación y/o fisión, las cuales generan productos secundarios como hidroximetilfurfural, reductonas, aldehídos y dicarbonilos. A su vez, estos pueden contribuir de nuevo a la glicación proteica, reaccionando con otros grupos amino proteicos. Estos compuestos carbonílicos generados, son mucho más reactivos que los azúcares reductores que iniciaron la glicación.

La **tercera etapa** incluye reacciones de condensación y polimerización, las cuales conllevan a la formación final de un conjunto heterogéneo de compuestos, cuya naturaleza química depende del entorno proteico y del tipo de agente glicante. A estos compuestos, altamente estables, se les denomina productos de la glicación avanzada (AGEs; en inglés).

Los AGEs se caracterizan por su elevada estabilidad y son responsables de modificaciones estructurales y funcionales en enzimas y proteínas, las cuales desencadenan el desarrollo de patologías asociadas a la diabetes mellitus. Hasta la fecha, no todos los AGEs formados *in vitro* (durante la cocción de alimentos) o *in vivo* han podido ser identificados y los mecanismos de formación siguen sin estar claros. Sin embargo, estos AGEs pueden clasificarse en dos tipos, los entrecruzados y los no entrecruzados.

Los AGEs no entrecruzados se forman debido a la acción de azúcares reductores o compuestos carbonílicos sobre la cadena lateral de un residuo proteico (Figura 2). La pirralina ha sido detectada en la piel humana, en el plasma y en el cerebro. La CML se forma durante la degradación oxidativa de los compuestos de Amadori y durante la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados. A su vez, la CML es uno de los principales AGEs formados *in vivo*, y ha sido detectada en cantidades importantes en el colágeno de la piel, especialmente en pacientes diabéticos (Ahmed, 2004).

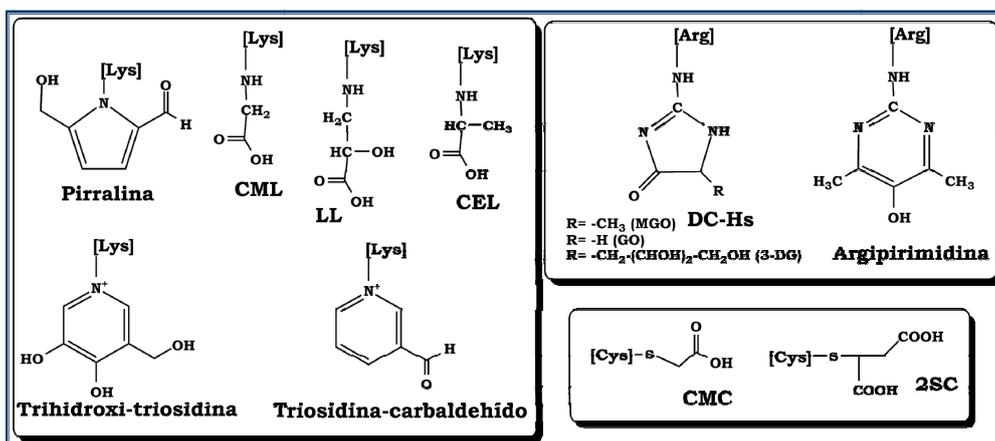


Figura 2. Estructura de algunos AGEs no entrecruzados.

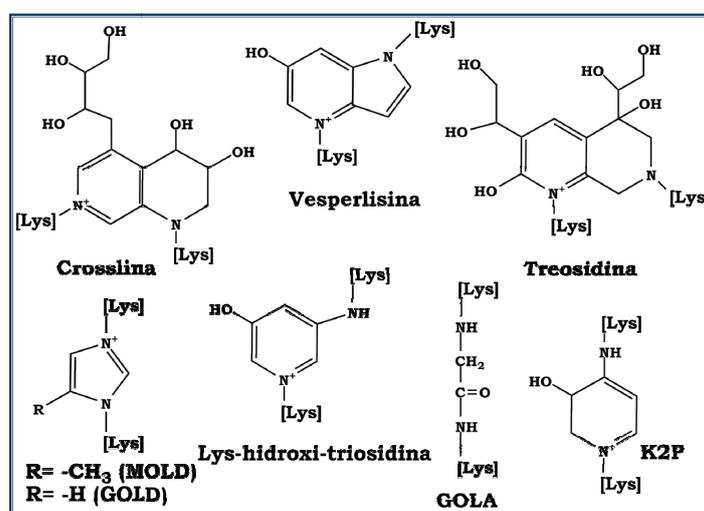


Figura 3. Estructura de los AGEs no entrecruzados formados a partir de dos residuos proteicos.

Otro grupo importante de AGEs son los formados a consecuencia de la reacción de un segundo grupo nucleófilo sobre alguno de los intermedios formados durante el proceso de glicación. La crosslina se identificó por primera vez en los riñones de ratas diabéticas y ha sido detectada tanto *in vitro* como *in vivo*. El GOLD y el MOLD, se forman a raíz de las reacciones del glicoxal y/o metilglicoxal con residuos lisina. (Figuras 3 y 4).

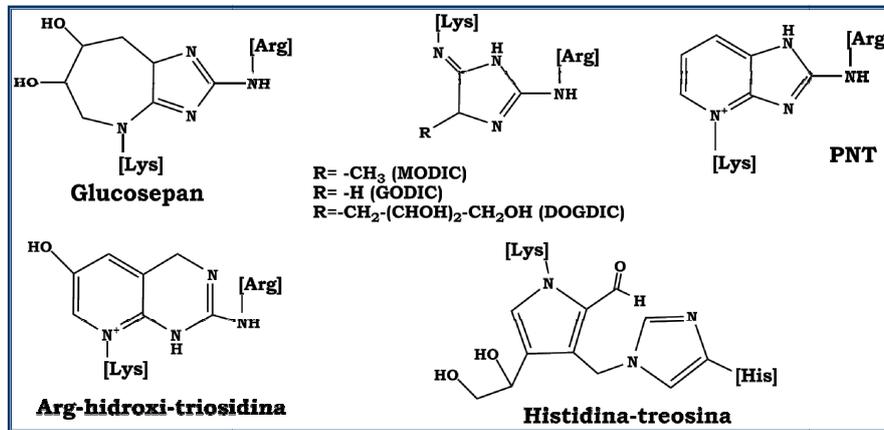


Figura 4. Estructura de los AGEs entrecruzados.

La acumulación de AGEs ha sido relacionada con las complicaciones diabéticas, ya que estos pueden alterar la estructura y función proteica. Además los radicales libres que aparecen a consecuencia de las reacciones colaterales asociadas a la glicación, pueden contribuir al deterioro proteico, ya que pueden causar la fragmentación de proteínas y la oxidación de ácidos nucleicos y lípidos (Aparicio, 2016).

1.1 Glucosa

La glucosa es la fuente de energía de los organismos vivos. Se absorbe en el intestino mediante transporte activo y posteriormente, pasa al hígado, donde se transforma en glucógeno o en grasas dependiendo de la demanda energética del organismo. Los niveles de glucosa en el plasma sanguíneo se controlan mediante dos hormonas, la insulina y el glucagón. El metabolismo de la glucosa, conocido como glicólisis, tiene lugar en las células, más concretamente en el citosol donde se da la formación de ATP (Raghav, 2017).

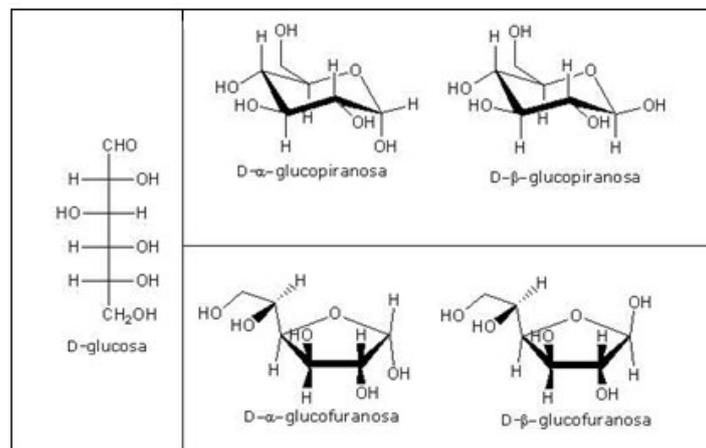


Figura 5. Estructuras químicas de la D-glucosa.

La estructura química de la glucosa fue determinada por Brown y Levy mediante experimentos de difracción de neutrones. En disolución acuosa presenta equilibrio entre su forma aldehídica y sus formas cíclicas, las cuales presentan a su vez equilibrio de mutarrotación entre sus formas α,β -piranosa y α,β -furanosa (Figura 5). Estos equilibrios se encuentran desplazados hacia las formas cíclicas y el porcentaje de forma aldehídica es únicamente de un 0,002 % del total. El aumento de la temperatura provoca un incremento en el porcentaje de la forma lineal.

La glucosa es el azúcar reductor que inicia el proceso de glicación proteica. Inicialmente reacciona con aminoácidos para formar glucosaminas y productos de Amadori. Además, su autoxidación genera compuestos carbonílicos altamente reactivos que nuevamente pueden reaccionar con otros aminoácidos, contribuyendo al deterioro proteico. Es por ello, que la hiperglucemia asociada a la diabetes, favorece las reacciones de glicación, lo que conduce al desarrollo de complicaciones agudas o crónicas en pacientes diabéticos. Los AGEs formados *in vivo* procedentes de la glucosa, actúan como un factor de envejecimiento y contribuyen a la fisiopatología de las enfermedades degenerativas, como la insuficiencia renal crónica o el Alzheimer (Chen, 2019).

1.2 Fructosa

La fructosa es uno de los principales componentes de las dietas humanas. La fructosa libre, en forma de monosacárido, se encuentra de forma natural en la miel y en algunas frutas y verduras. En diferentes productos alimenticios, la fructosa está presente como componente de la sacarosa. Se absorbe en el intestino delgado, aunque en menor proporción que la glucosa o la sacarosa, si bien la presencia de glucosa la facilita.

La fructosa absorbida se metaboliza principalmente en el hígado. La mucosa del intestino delgado y del riñón contiene las enzimas necesarias para metabolizar la cetohexosa, aunque este hecho es una excepción, puesto que la utilización de fructosa (o sus derivados) en los tejidos extrahepáticos es mínima. Inicialmente la fructosa es fosforilada por ATP a 1-fosfato de fructosa, mediante un proceso catalizado por fructoquinasa. Posteriormente, la aldolasa hepática B divide la 1-fosfato de fructosa en gliceraldehído y fosfato de dihidroxiacetona. Estos metabolitos participan en diferentes rutas metabólicas como la glucólisis, gluconeogénesis, liponeogénesis y lipogénesis (Levi, 1998).

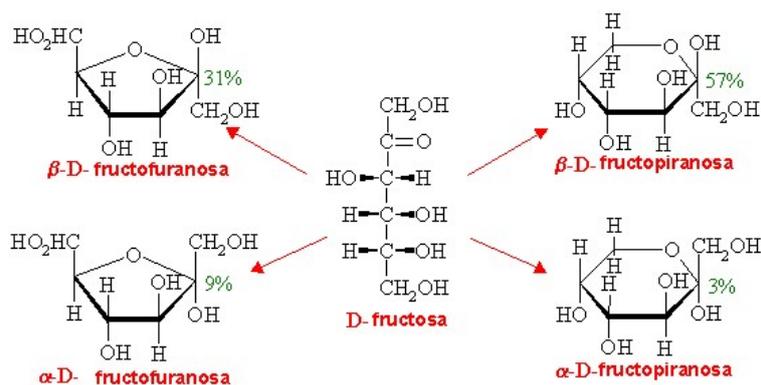


Figura 6. Estructuras químicas de la D-fructosa.

La fructosa en disolución acuosa presenta equilibrio entre su forma lineal y sus formas cíclicas, las cuales presentan a su vez equilibrio de mutarrotación entre sus formas α,β -piranosa y α,β -furanosa. Las formas predominantes son la β -furanosa (31%) y la β -piranosa (57%), siendo la forma abierta insignificante (Figura 6).

El grupo carbonilo libre de la fructosa, como es el caso de la glucosa, puede reaccionar de manera no enzimática con grupos amino proteicos, induciendo así la glicación proteica. Si bien la glucosa es el azúcar más abundante en la sangre también es el de menor reactividad. En comparación con la glucosa, la fructosa es un iniciador mucho más potente de la reacción de Maillard.

1.3 Ribosa

La D-ribosa fue descubierta en el año 1891 por Emil Fischer. Esta, es una aldopentosa presente en los ribonucleósidos, ribonucleótidos y en sus derivados. La ribosa es abundante en los tejidos musculares, donde se encuentra asociado con los ribonucleótidos, en particular con el trifosfato de adenosina o ATP, que es esencial para el funcionamiento muscular.

En disolución presenta equilibrio entre su forma aldehídica y sus formas cíclicas, las cuales presentan a su vez equilibrio de mutarrotación entre sus formas α,β -piranosa y α,β -furanosa (Figura 7).

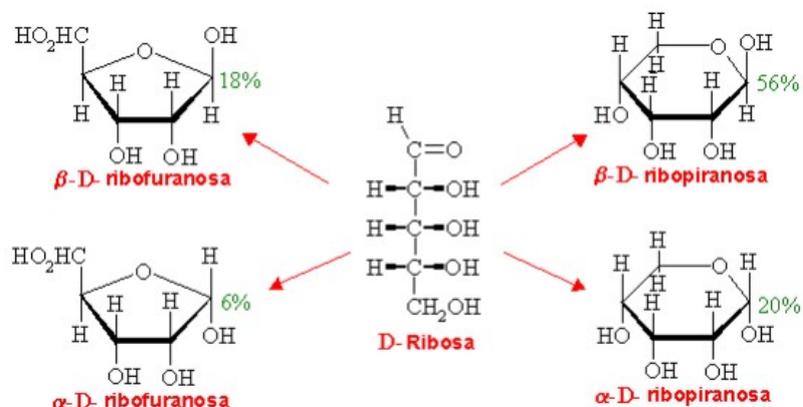


Figura 7. Estructuras químicas de la D-ribosa.

La ribosa participa activamente en el proceso de glicación proteica *in vivo*. Su mecanismo de acción es similar al de la glucosa, y se inicia mediante la reacción del grupo aldehído libre con aminoácidos para formar glucosaminas y productos de Amadori, si bien la ribosa es más reactiva que la glucosa o la fructosa. Las reacciones de glicación con ribosa conducen a la rápida formación de productos finales de glicación. Hasta la fecha, se ha visto que la ribosa es capaz de modificar las propiedades químicas de un amplio abanico de proteínas, entre las que destacan la albúmina o la alfa-sinucleína (Chen, 2019).

1.4 Glioxal

El glioxal presenta estado líquido a temperatura ambiente. Cristaliza en su forma monomérica formando cristales amarillos irregulares. Generalmente se comercializa y utiliza en forma de disolución acuosa con un porcentaje de glioxal de entre el 30 y 50%. El glioxal isomeriza entre las conformaciones *cis* y *trans*, siendo su isómero *trans* el más estable.

El glioxal se genera de forma endógena durante el metabolismo celular normal, esencialmente durante la glicólisis, y a raíz de otros procesos independientes, como la glicación proteica, oxidación de azúcares, la oxidación de ADN y otros (Figura 8). Menos del 10% del glioxal presente en el organismo se encuentra libre en disolución acuosa. La mayoría se encuentra

unido a cisteínas, lisinas y argininas proteicas. Su baja concentración en tejidos y fluidos corporales se debe a su elevada reactividad y sus niveles vienen regulados por las glioxalidas. Los niveles de glioxal en plasma sanguíneo son mucho más elevados en pacientes de diabetes, seguramente a causa de la hiperglucemia (Kielhorn, 2004).

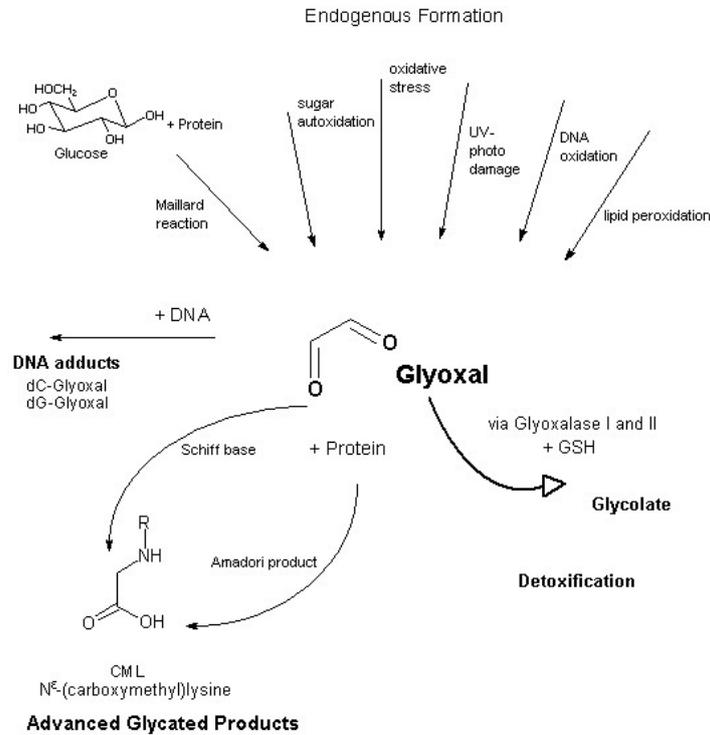


Figura 8. Formación, desintoxicación y formación de aductos con proteína y ADN del glioxal.

Los grupos carbonilo del glioxal son altamente reactivos y conducen a reacciones de glicación mediante el ataque sobre residuos Lys y Arg. Sin embargo, el principal AGE formado a raíz de la acción del glioxal, es la N^ε-(carboximetil)lisina (CML) (Brings, 2012).

1.5 Metilglioxal

El metilglioxal (MGO) es un líquido de color amarillo claro, ligeramente viscoso y con un olor acre. Es un 2-oxo-aldehído, derivado del propanal. Es un compuesto orgánico utilizado frecuentemente como reactivo en síntesis orgánica, como agente saborizante y como bronceador.

El metilglioxal (MGO) es un dicarbonilo altamente reactivo, y es el principal precursor de la formación de AGEs intracelulares. Reacciona con numerosas proteínas, como la albúmina humana provocando cambios en su estructura a raíz de la formación de dichos AGEs. El MGO se forma como un subproducto de la glucólisis y se elimina mediante la acción de la glioxalasa, transformándolo a D-lacato, clave como defensa anti-glicación.

El MGO es altamente reactivo, su vida media es corta en un entorno biológico y, por lo tanto, en el momento y lugar en el que se genera, su concentración puede ser significativamente alta. El aumento de los niveles de MGO y AGEs, así como la disfunción del mecanismo de las glioxalidas, están relacionados con graves problemas de salud como la diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer y trastornos del sistema nervioso central (Ahmed, 2018). Durante la

glicólisis se forma una importante proporción del MGO endógeno. Por tanto, la hiperglucemia conduce al incremento en la concentración de MGO. Este es uno de los agentes de glicación más potentes y su acumulación puede llegar a ser muy perjudicial (Allaman, 2015). El MGO reacciona con los residuos de lisina y arginina de las proteínas para formar AGEs como la argpirimidina, la hidromidazolona, el dímero de lisina derivado de MGO y la Nε-(1-carboxietil) lisina (Figura 9) (Thornalley, 2008).

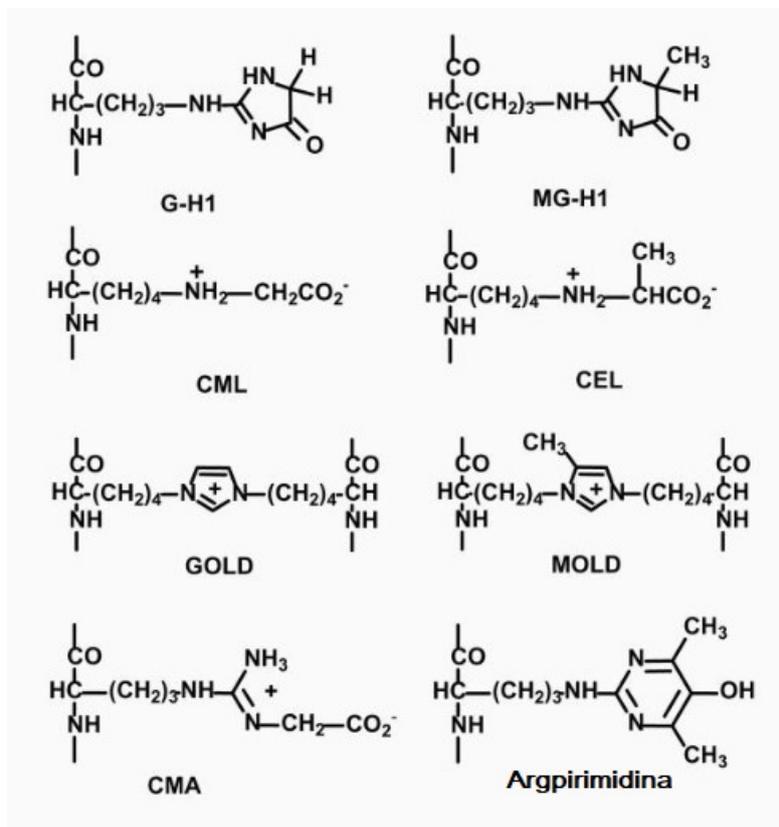


Figura 9. Estructura de los AGEs formados por la acción del glioxal y el MGO en proteínas.

2 Propiedades de la albúmina

La albúmina sérica (SA) es la proteína plasmática más abundante en mamíferos. Fue detectada por primera vez en pequeños vertebrados, siendo una proteína relativamente grande (585 aminoácidos con un peso molecular de alrededor de 66 kDa y cargada negativa). Se sintetiza principalmente en el hígado y se exporta como proteína no glicosilada al plasma, donde alcanza concentraciones elevadas, aproximadamente 0,6 mM. Su principal función es la regulación de la presión osmótica de la sangre. Por otro lado aumenta la solubilidad de los compuestos hidrófobos en el plasma y regula el suministro de estos a las células. A su vez, es la proteína circulante más importante implicada en el transporte de Ca^{2+} y Mg^{2+} en mamíferos. La SA es una proteína multifuncional con una gran capacidad de unión a diferentes ligandos, lo que la convierte en un buen transportador para una amplia variedad de metabolitos, medicamentos, nutrientes, metales y otras moléculas. Debido a la facilidad con la que se une a diferentes ligandos, la albúmina tiene amplias aplicaciones clínicas, farmacéuticas y bioquímicas. La albúmina de suero bovino (BSA) se utiliza en numerosos estudios experimentales como proteína modelo debido a su abundancia, bajo coste, facilidad de obtención y facilidad de purificación. Así, se utiliza habitualmente para estudiar la interacción proteína-ligando, siendo los resultados derivados de estos estudios, de gran interés, debido a la similitud secuencial entre la albúmina sérica humana y la bovina (Majorek, 2012).

La BSA presenta 583 aminoácidos y es una proteína globular. Presenta una estructura secundaria helicoidal, cuya disposición espacial adquiere forma de corazón la cual está formada por tres dominios I, II y III, cada uno de ellos formado por dos subdominios A y B. (Figura 10). Las partes hidrófobas de los subdominios IIA y IIIA actúan como principales sitios de unión (Yang, 2019).

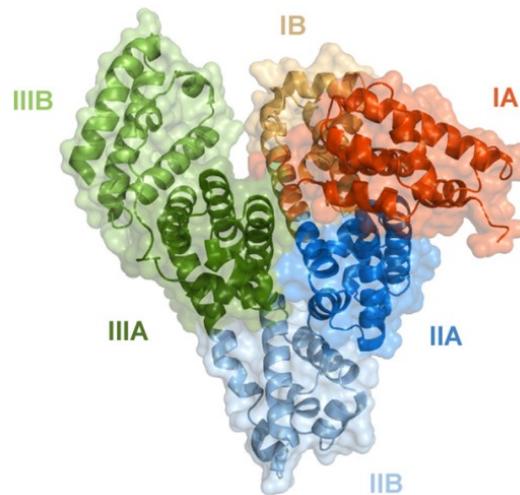


Figura 10. Estructura secundaria de la albúmina sérica. Cada dominio se encuentra marcado con un color diferente.

2.1 Glicación de la albúmina

Se ha descrito que la glicación no enzimática de la albúmina tiene un impacto significativo en su conformación y función, en especial sobre su capacidad de unión a otras proteínas o ácidos grasos. Recientemente se ha demostrado que la glicación de la albúmina sérica humana conduce al desarrollo de AGEs que modifican sus propiedades bioquímicas, electroquímicas, espectroscópicas, ópticas y de fluidez. El porcentaje de HSA glicada en personas sanas es del 6-15 % mientras que la proporción en pacientes diabéticos es dos o tres veces superior (Bai, 2012).

Hasta la fecha, se han identificado varios sitios preferentes de glicación en la HSA. Esta, ocurre comúnmente sobre los grupos amina situados en la superficie de la proteína. Sin embargo, se han identificado 29 residuos adiciones de la HSA que presentan un estado glicado *in vivo*. En comparación con otras proteínas, la HSA constituye un importante diana de glicación, ya que presenta un tiempo de vida media superior al de otras proteínas (~18 días) (Rabbani, 2019) (Garlick, 1982).

3 Propiedades adherentes de las proteínas

Los adhesivos industriales se utilizan a escala masiva, por ejemplo en Estados Unidos se producen 9 mil millones de kilogramos anualmente. La gran mayoría de estos adhesivos son derivados del petróleo, no son biodegradables y en su producción se libera formaldehído, un compuesto nocivo para la biosfera. Existe una gran demanda de nuevos adhesivos cuya obtención sea sostenible, no libere sustancias tóxicas y tenga un bajo coste.

Las proteínas pueden ser una de las mejores soluciones a este problema. Las proteínas son un buen recurso para la fabricación de adhesivos. Son baratas, biodegradables, renovables y no son

tóxicas. Durante su reacción con carbohidratos, las proteínas que reaccionan, aumentan su viscosidad y su capacidad adherente, casi inexistente en las proteínas aisladas **(Román, 2019)**.

La biología marina ha desarrollado una amplia variedad de estrategias para formar adhesivos resistentes. Un ejemplo claro son los mejillones, capaces de formar uniones adhesivas rápidas en una amplia variedad de superficies. Este adhesivo se conoce con el nombre de biso y es semejante a la seda de las arañas. Consiste en fibras poliméricas altamente insolubles generadas en tejidos especializados del organismo. Una vez formadas, estas fibras funcionan fuera del organismo vivo y no presentan un mecanismo claro de reparación o mantenimiento. Además de los mejillones, existen otros invertebrados marinos que generan adhesivos resistentes. Todos ellos tienen en común cuatro componentes distintos, resinas, fibras, un relleno y un catalizador.

Las resinas son pegajosas y flexibles formadas principalmente por 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA). La DOPA tiene un papel importante en el acoplamiento a las diferentes superficies y en la reticulación de los polímeros. La capacidad de unión es debido a enlaces de hidrógeno y reacciones de complejación con metales. La reticulación se deriva de o-quinazas producidas por la acción de la catecoloxidasa en la resina que contiene DOPA.

Las fibras son proteínas más rígidas, con forma de varilla, similares al colágeno. Los rellenos dependen de cada especie, pueden ser depósitos de minerales, gases o agua. El catalizador es una enzima, catecoloxidasa o peroxidasa, encargada de iniciar la reticulación de la resina **(Herbert, 1989)**.

OBJETIVO

En base a todo lo expuesto anteriormente, el objetivo principal de este trabajo de fin de grado, es estudiar la capacidad adherente de la BSA nativa y de la BSA glicada con diferentes azúcares reductores y con dicarbonilos sobre la madera. A su vez, pretende determinar también las condiciones experimentales más adecuadas para obtener la mejor capacidad adherente. Este estudio incluye investigar cómo afectan el pH, la temperatura, la presencia de metales y/o oxidantes y la humedad a la capacidad adherente. Finalmente, presenta también el objetivo de comparar cuantitativamente la capacidad adherente de la BSA nativa y la BSA glicada con la de otras proteínas modificadas y con pegamentos comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Materiales

Albúmina bovina (BSA) ($\geq 98\%$), D-(-)-fructosa ($\geq 99\%$), D-(-)-ribosa ($\geq 99\%$), D-(+)-glucosa ($\geq 99.5\%$), disolución de glioxal (40 wt. % en agua), Na_2HPO_4 y polvo de yema de huevo se adquirieron en Sigma Aldrich. El metilglioxal utilizado se obtuvo a partir de una purificación del adquirido comercialmente de Sigma Aldrich (metilglioxal 40 wt. % en agua) (**Martínez-Orozco, 2019**). Las maderas utilizadas, láminas de contrachapado de 3mm de grosor, se compraron en Leroy Merlin. Se utilizó agua purificada Milli-Q.

2 Preparación de tampones

Para la realización de los diferentes estudios, se prepararon tres disoluciones de tampón fosfato (Na_2HPO_4), todas ellas 50 mM, pero a diferente pH (6, 7.4 y 8). Durante su preparación se utilizó agua Milli-Q y su pH se ajustó utilizando disoluciones de HCl 1M y NaOH 1 M.

3 Preparación de las mezclas de reacción

Para el estudio del efecto de la glicación sobre la capacidad adherente de las proteínas, se prepararon diferentes disoluciones madre de albúmina bovina (BSA) 9mM (0.6 g/mL) utilizando los tampones fosfatos anteriormente descritos. Estas disoluciones se utilizaron en la preparación de todas las mezclas de reacción.

A su vez, los tampones fosfato se utilizaron para preparar las diferentes disoluciones madre de cada una de los agentes glicantes que se utilizaron en este estudio. Así, se prepararon disoluciones madre de D-(-)-fructosa, D-(-)-ribosa, glioxal, metilglioxal y D-(+)-Glucosa, todas ellas 0.9M.

Las disoluciones madre, se utilizaron para preparar diferentes mezclas de reacción, en las cuales se variaron las proporciones de BSA y de agente glicante, así como sus concentraciones y tiempo de incubación. Todos estos estudios se realizaron a pH 7.4 y tuvieron como objetivo evaluar cuales eran las condiciones de reacción que maximizaban la capacidad adherente de la BSA modificada. Una vez determinadas las concentraciones, relaciones BSA:agente glicante y tiempos de incubación que maximizaban la capacidad adherente de la BSA, se utilizaron conjuntamente para evaluar el efecto del pH sobre la capacidad adherente.

Para el estudio del *tiempo de incubación* se mezcló un volumen igual de disolución madre de BSA y de agente glicante (0.9mM), manteniendo así una relación 10:1 (BSA:agente glicante). Así, en la mezcla de reacción, las concentraciones de BSA y de agente glicante fueron 4.5mM y 0.45 mM respectivamente. Posteriormente, dichas mezclas se incubaron en una estufa a 37°C y se extrajeron y congelaron muestras a diferentes tiempos de incubación. El estudio fue completado con experimentos control, que incluían la incubación de BSA en ausencia de agente glicante y la incubación de agente glicante en ausencia de BSA.

Para el estudio de la mejor *relación de concentración entre BSA y los agentes glicantes* se utilizó la disolución madre de BSA y las disoluciones madre 0,9 M de cada uno de los agentes glicantes. A partir de esta última, se prepararon cinco disoluciones más diluidas de cada agente glicante (900mM, 90mM, 9mM, 0.9mM y 0.09mM). Una vez preparadas, se combinaron con un volumen igual de la disolución madre de BSA (9 mM), lo que permitió estudiar las relaciones 100:1, 10:1, 1:1, 1:10, 1:100. Las mezclas se dejaron en la estufa a 37°C, durante el tiempo de incubación determinado como óptimo en el estudio anterior. Posteriormente, fueron utilizadas para su análisis.

Para el estudio de la *concentración de proteína* óptima para maximizar el efecto adherente de la mezcla de reacción, se mantuvieron los tiempos de incubación y las relaciones BSA:agente

glicante determinados en los estudios anteriores. Así, se prepararon cuatro diluciones a partir de la disolución madre de BSA 9 mM, siendo estas 0.75 mM, 1.5 mM, 3 mM y 4.5 mM. Posteriormente, diferentes alícuotas de estas, se combinaron con diferentes alícuotas de las disoluciones madre de los distintos agentes glicantes. Las mezclas se incubaron a 37°C durante el tiempo óptimo para alcanzar una máxima capacidad adherente.

Para el estudio de **cambio de pH** se utilizaron disoluciones madre de BSA (9mM) y de agente glicante preparadas en tampones fosfato a pH 6 o 8. Las mezclas de reacción se prepararon utilizando la concentración de BSA (4.5mM) y las relaciones BSA:agente glicante determinadas como óptimas para alcanzar una máxima adherencia. En cada caso, se mezclaron volúmenes iguales de disolución madre de BSA y de disolución de agente glicante al mismo pH. Las mezclas de reacción resultantes, se incubaron a 37°C durante los tiempos de incubación determinados como óptimos en cada caso.

Para el estudio del **efecto de metales y/u oxidantes**, se prepararon dos nuevas disoluciones madre en tampón fosfato a pH 7.4. Una contenía, FeCl₃ y la otra KIO₃, ambas 90mM. Cada mezcla de reacción objeto de estudio, contenía una concentración de BSA 9mM, excepto en el caso en el que se utilizó glioxal como agente glicante, en el que la concentración de BSA fue de 4.5mM. A su vez, dichas mezclas de reacción contenían también el agente glicante correspondiente, manteniendo la relación BSA:agente glicante (10:1) que proporcionó mayor capacidad adherente. Cada una de las mezclas de reacción preparadas, se dividió en tres muestras idénticas. A la primera se le añadió 10µL de la disolución de FeCl₃, a la segunda 10µL de la disolución de KIO₃, y a la tercera 10µL de ambas. Las mezclas de reacción resultantes, se incubaron a 37°C durante los tiempos de incubación determinados como óptimos en cada caso.

Para determinar el efecto del **tiempo y temperatura de curación**, así como el **efecto del agua** sobre la capacidad de adhesión, se prepararon mezclas de reacción utilizando las condiciones experimentales que conferían una mejor capacidad adherente a las muestras. Así, la concentración de BSA fue 9mM en todos los casos, excepto para la mezcla que contenía glioxal (4.5mM).

Para estudiar las mezclas de reacción por **UV-Vis** se utilizaron todas las mezclas preparadas para el estudio del tiempo de incubación. Se analizó la absorbancia de las diferentes mezclas entre 220-500 nm utilizando un espectrofotómetro. La cubeta de referencia contenía una disolución con la misma concentración de agente glicante que la mezcla a analizar, con el fin de eliminar las posibles interferencias aparecidas durante la incubación del agente glicante. Los espectros UV-Vis de las diferentes mezclas se adquirieron a 25°C, usando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico y un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-2401-PC.

Para el estudio de **muestras biológicas** se utilizó polvo de yema de huevo como fuente de proteína. Se preparó una disolución de 0,6 g/mL de polvo de yema de huevo y disoluciones de 0,06 g/mL de cada uno de los agentes glicantes. Se mezcló un volumen igual de disolución de polvo de yema de huevo y de agente glicante. Posteriormente, dichas mezclas se incubaron en una estufa a 37°C y se extrajeron y congelaron muestras a diferentes tiempos de incubación.

4 Preparación de maderas

Todas las pruebas de adhesión se realizaron sobre láminas de contrachapado de 3mm de grosor (Leroy Merlin). Estas láminas se cortaron en rectángulos de 10cmx2cm. Para las pruebas de adherencia, se depositaron 10µL de las diferentes mezclas de reacción a estudiar sobre una de las maderas, a una altura aproximada de 1cm con respecto a la base y estas se cubrieron con una segunda lámina, superponiéndolas de manera que quedara una superficie de contacto entre ambas de 3cm x 2cm. Posteriormente se aplicó una presión sobre la superficie con unos 50g

durante 30 min (Figura 11). Pasados los 30 min, se retiró el peso y se comprobó si las maderas se mantenían adheridas. Se realizaron 5 réplicas para cada mezcla de reacción en los diferentes estudios.

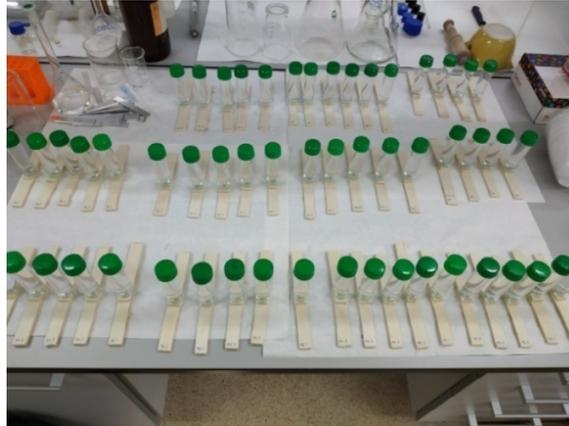


Figura 11. Preparación de las maderas previa a la curación.

5 Protocolo para el estudio de la adhesión

En los casos en los que la BSA glicada causó la adhesión de las dos maderas, estas se colocaron 24h en una estufa a 37°C. Sin embargo, se estudió también como afectaba el tiempo y la temperatura de incubación sobre la capacidad de adhesión y para ello, algunas de las muestras se incubaron durante 3h a 90°C. Transcurrido este tiempo, se pasó a medir la fuerza de adhesión de cada muestra.

Paralelamente, se estudió el efecto del agua sobre la capacidad de adhesión. Para ello, las muestras incubadas durante 24 h a 37°C, se sumergieron durante 3h en una bandeja con agua. Posteriormente, se secaron y una vez secas se midió la fuerza de adhesión.

6 Medida de la fuerza de adhesión

Para cuantificar la capacidad adherente de la BSA glicada, se utilizó equipo de ensayos estáticos de materiales Zwick/Roell Z100, el cual permitió ejercer una fuerza de tracción sobre las láminas de madera (Figura 12).



Figura 12. Medida de la fuerza mediante equipo de ensayos estáticos de materiales Zwick/Z100

La fuerza máxima o fuerza de rotura, fue medida con el software testXpert V12.0 y expresada en N. Una vez separadas, se midió el área de adhesión aproximada utilizando un pie de rey. El valor final de fuerza de adhesión se determinó en función del área y se expresa en MPa.

7 Análisis estadístico de los datos experimentales

Se utilizaron tests y gráficos de normalidad para estudiar la distribución de las variables. Las variables se expresan como media \pm desviación estándar. Para evaluar las diferencias entre 2 grupos, se utilizó el test t-student para muestras independientes. Para evaluar las diferencias entre 3 o más grupos, se utilizó la prueba ANOVA de un factor y el test de Bonferroni como post-hoc. Las asociaciones entre las variables cuantitativas se estudiaron con la correlación de Pearson. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS v 23. Se consideró indicador de una diferencia significativa un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

1 Estudio de los diferentes agentes glicantes sobre el espectro UV-Vis de la albúmina

Inicialmente, se adquirieron los espectros de absorción UV-Vis de las mezclas de reacción que contenían la BSA y cada uno de los agentes glicantes. Estas muestras se analizaron en función del tiempo de incubación. Se observó que la presencia de compuestos carbonilos inducía la formación de nuevos compuestos con capacidad para absorber radiación UV-Vis. Concretamente, se observó un aumento de la absorbancia con el tiempo de incubación en todas las mezclas de reacción (Figura 13), aunque el espectro UV-Vis de la BSA sufrió una modificación más drástica en presencia de los dicarbonilos que en presencia de los carbohidratos estudiados. La proteína en ausencia de agente glicante, presenta un máximo de absorbancia a 280 nm (Figura 14), esencialmente debido a la absorbancia de las cadenas laterales de sus Trp, cuya intensidad se incrementa durante la incubación con los agentes glicantes debido a la formación de AGEs. (Huang, 2016).

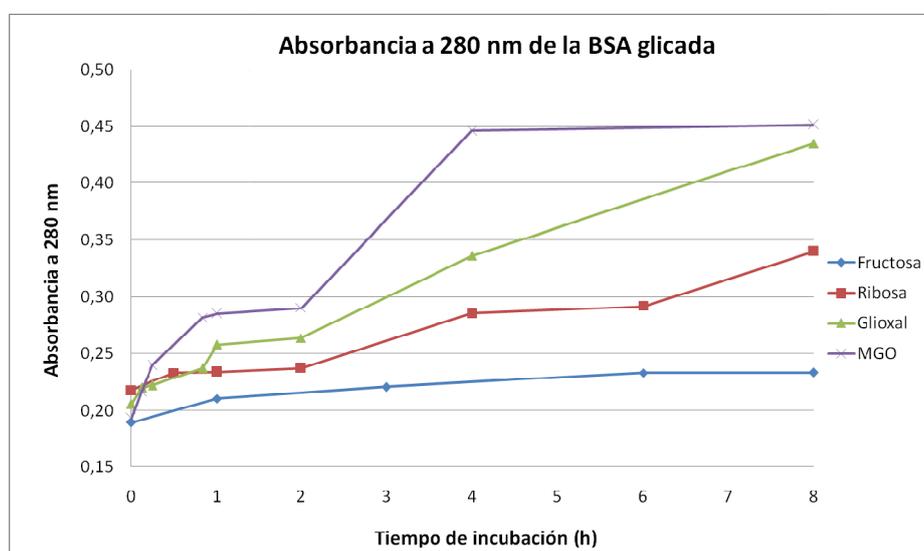


Figura 13. Absorbancia a 280 nm de la BSA glicada con diferentes agentes glicantes en función del tiempo de incubación.

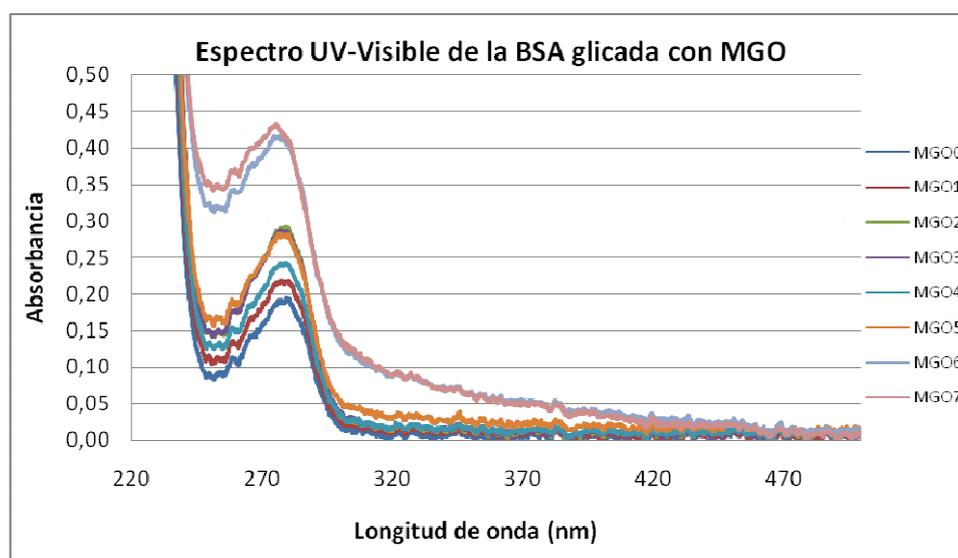


Figura 14. Espectro de absorción UV-visible de la mezcla de BSA y MGO a diferentes tiempos de incubación.

Estos resultados demuestran que la modificación de BSA mediante los agentes glicantes estudiados, induce a la formación covalente de AGEs. La reacción de glicación con compuestos dicarbonílicos es mucho más rápida que con azúcares reductores (Figura 13).

2 Investigación de las condiciones para obtener una mejor adherencia

2.1 Tiempo de incubación

La BSA incubada en ausencia de agente glicante, muestra una adhesión de entre 0.1 MPa y 0.2 MPa durante los dos primeros días de incubación. Posteriormente, va perdiendo sus propiedades adherentes. Si bien estas diferencias no son estadísticamente significativas, se puede intuir una cierta pérdida de capacidad adherente a partir del primer día de incubación. (Figura 15A)

Muchas de las maderas adheridas con BSA modificada con glucosa se despegaron después de la retirada del peso utilizado para facilitar la adhesión. Sin embargo, con los datos adquiridos durante los 15 primeros días de incubación, se puede afirmar que la fuerza de adhesión es más o menos constante durante todo este tiempo, y no hay diferencias significativas entre los diferentes grupos. Pero presenta un máximo puntual de poder adherente después de un día de incubación. (Figura 15B) En cualquier caso, los valores obtenidos son parecidos a los determinados en ausencia de glucosa, por lo que se puede concluir que la glucosa no incrementa la capacidad adherente de la BSA sobre la madera.

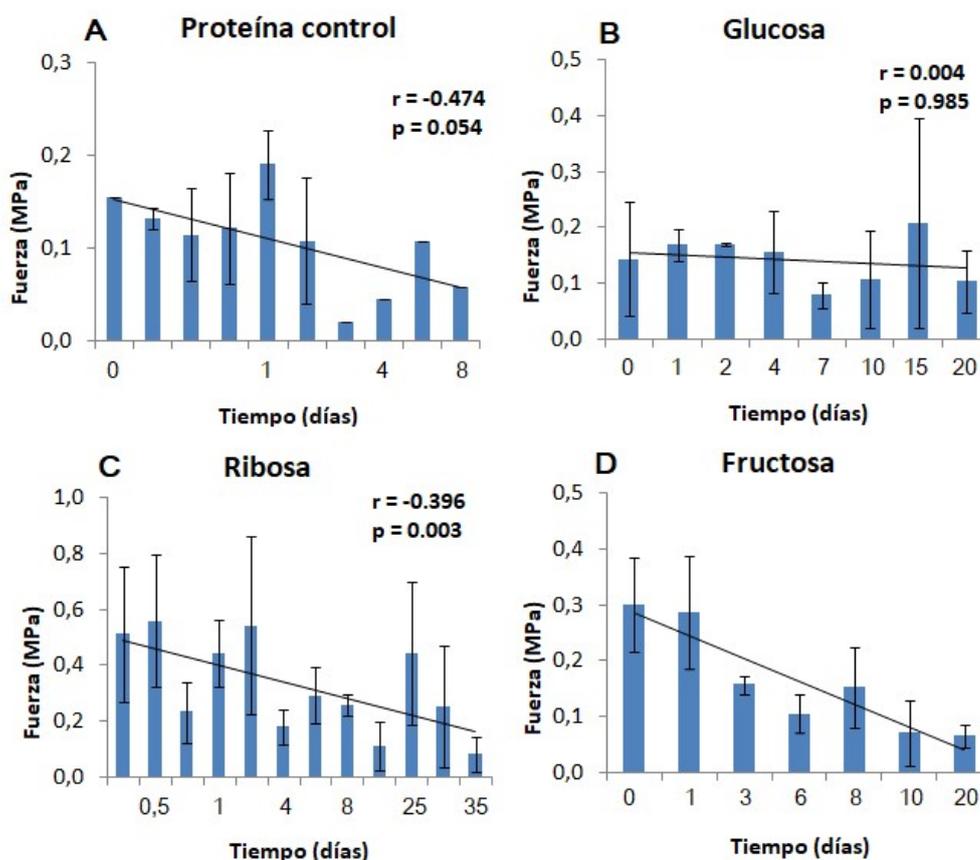


Figura 15. Poder adherente de la proteína sola (A), mezcla de BSA y glucosa (B), mezcla de BSA y ribosa (C) y mezcla de BSA y fructosa (D) en función del tiempo de incubación.

Las muestras adheridas con BSA glicada con ribosa presentan un mayor poder adherente que las glicadas con glucosa. Ninguna de las muestras preparadas se despegó al retirar el peso. Pasadas las 12 h de incubación se detectó su máximo de poder adherente. A partir de las 12 h de incubación, las muestras presentaron una clara disminución de su capacidad adherente (Figura 15C).

Las muestras de BSA modificadas con fructosa muestran su mayor poder adherente justo después de su preparación, lo que indica que los productos de glicación formados inicialmente (base de Schiff y compuesto de Amadori) confieren a la proteína una capacidad adherente superior a la que le otorgan los AGEs formados en las etapas finales. Pasadas 24 h de incubación, la capacidad adherente se va perdiendo hasta llegar a casi desaparecer pasados 10 días. Este poder adherente, es mayor que el de la BSA glicada con glucosa pero inferior al de la glicada con ribosa. (Figura 15D)

En la proteína modificada con glioxal, el poder de adherencia aumenta paulatinamente con el tiempo de incubación, alcanzando su máximo a las 3 h. Después el poder de adherencia disminuye ligeramente con la incubación, aunque se mantiene más o menos constante. La BSA incubada con MGO presenta una capacidad adherente que se incrementa con el tiempo, alcanzando su máximo a las 6 h y posteriormente va disminuyendo (Figura 16). Los resultados para estos dos compuestos no presentan diferencias significativas, los valores de mejor tiempo de incubación se seleccionaron a partir de los máximos de adherencia puntuales.

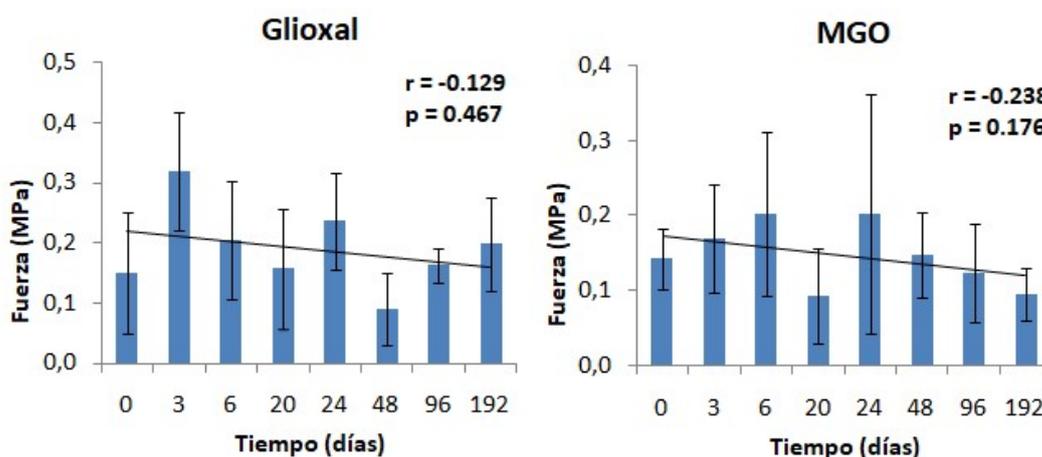


Figura 16. Poder adherente de BSA en presencia de glioxal y MGO en función del tiempo de incubación.

2.2 Relación de concentración

Una vez determinado el mejor tiempo de incubación en cada caso, este y la concentración de BSA (4.5 mM) se mantuvieron constantes y se modificó la concentración de agente glicante para estudiar las relaciones 100:1, 10:1, 1:1, 1:10, 1:100 (BSA: agente glicante).

En el caso de la BSA modificada con fructosa y la modificada con ribosa, la relación que dio la mayor adherencia fue la 10:1. En particular, la BSA glicada con fructosa presenta valores de adherencia similares en las proporciones 1:1 y 10:1, pero se tomó la relación 10:1 en los experimentos realizados a continuación, al tener esta un menor error experimental (Figura 17). La concentración óptima de estos azúcares en disolución es 0,45 mM.

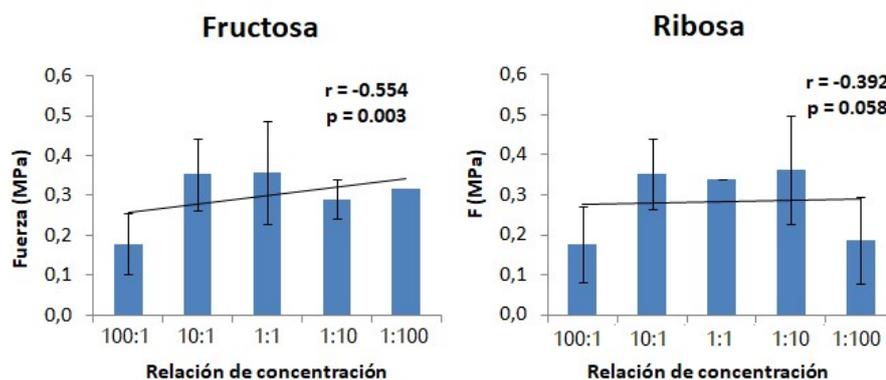


Figura 17. Poder adherente de BSA en presencia de fructosa y ribosa variando la relación de concentración BSA:agente glicante

En el caso de la BSA modificada con glucosa, la relación que dio una mayor adherencia fue la 100:1, si bien no hay diferencias significativas y el poder de adherencia es prácticamente similar en todas las demás relaciones estudiadas (Figura 18A). La concentración óptima de glucosa en disolución es 0,045 mM.

En el caso de la BSA modificada con glioxal, la proporción que dio una mayor adherencia es 1:100. No existen diferencias significativas, pero parece que el poder de adherencia es similar para el resto de relaciones y que aumenta en el caso de la relación 1:100 (Figura 18B). Por tanto, la concentración de glioxal adecuada es 450 mM.

En el caso de la BSA modificada con MGO, la proporción que dio una mayor adherencia es la 1:1. Estos datos si presentan diferencias significativas. Además, se observó que al utilizar una relación 1:100, la muestra cambió de estado de agregación, adoptando una textura en forma de gel, la cual no presentaba ninguna propiedad adherente (Figura 18C). Por tanto, la concentración de MGO óptima es 4,5 mM.

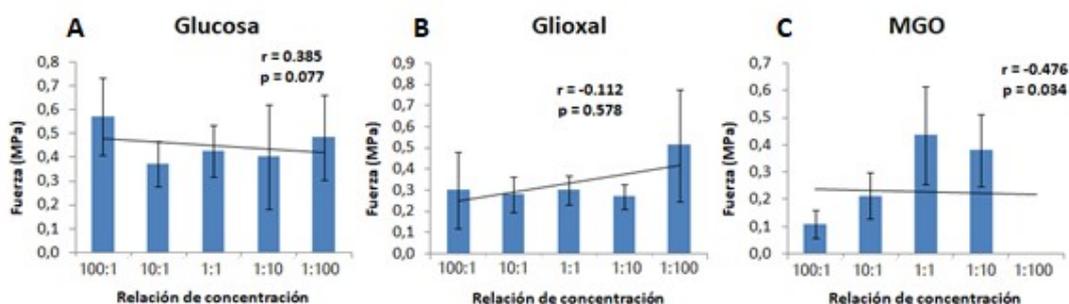


Figura 18. Poder adherente de BSA en presencia de glucosa, glioxal y MGO variando la relación de concentración BSA:agente glicante

2.3 Concentración de proteína

Manteniendo el mejor tiempo de incubación en cada caso y la relación proteína:agente glicante, se estudió el efecto de la variación de la concentración de proteína sobre las propiedades adherentes de la mezcla de reacción.

En todos los casos, a mayor concentración de proteína, mayor capacidad de adherencia. Los resultados de las mezclas de BSA con fructosa, ribosa, glucosa y MGO presentan diferencias significativas entre muestras con diferente concentración de proteína. La mejor capacidad adherente se consigue para una concentración de BSA 9 mM. Se observa un aumento considerable en la capacidad de adhesión, alcanzando los 0.8 MPa en el caso de la fructosa, glucosa y MGO, y los 1.3 MPa en el caso de la ribosa. En el caso particular del glioxal, con una concentración de BSA 9 mM, se forma un gel que disminuye la capacidad de adherencia de la mezcla. Por tanto, en este caso, la mejor capacidad adherente se consigue para una concentración de proteína 4.5 mM. (Figura 19)

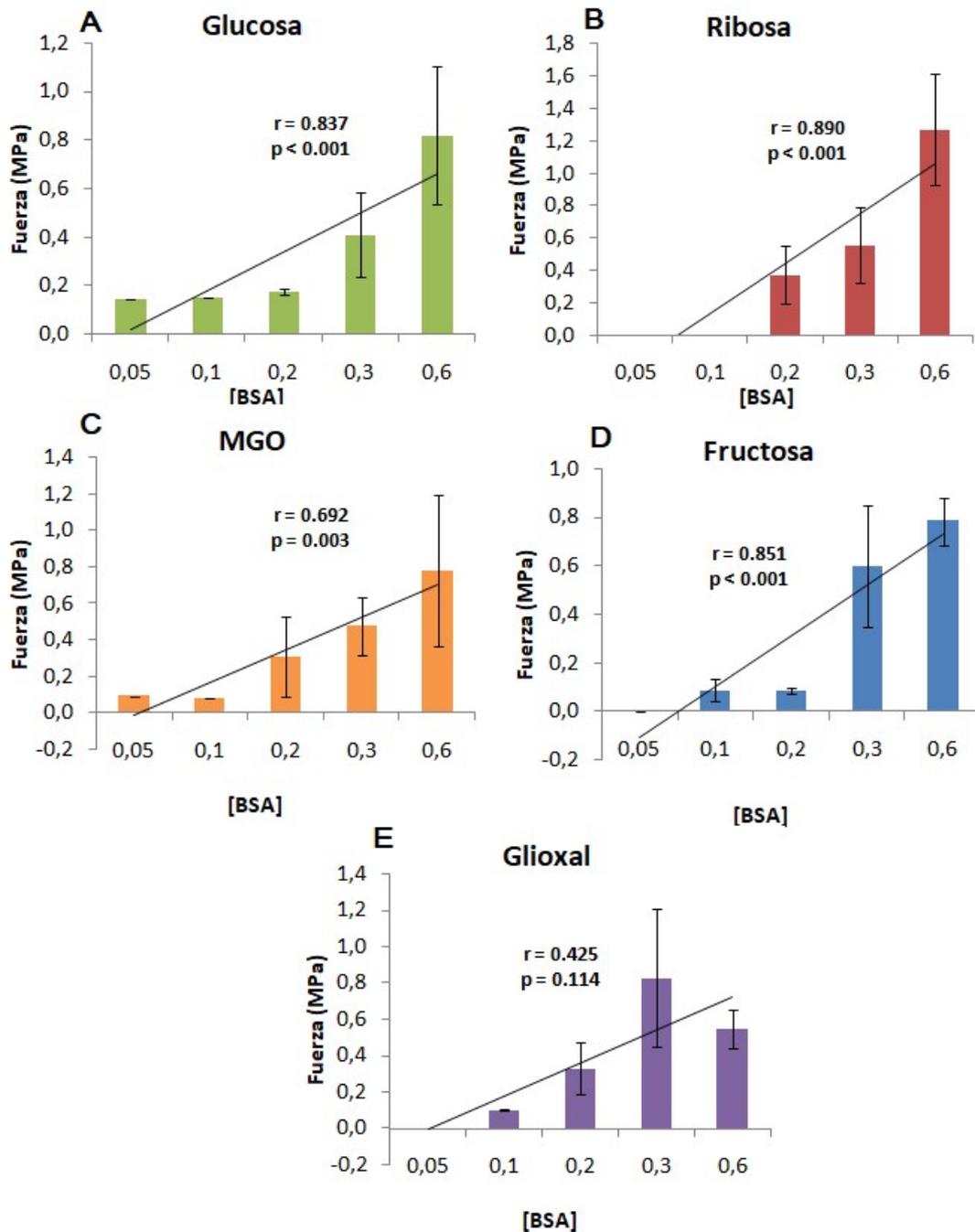


Figura 19. Poder adherente de BSA a diferentes concentraciones en presencia de glucosa (A), ribosa (B), MGO (C), fructosa (D) y glioxal (E).

3 Efecto del pH sobre la adherencia

Manteniendo el mejor tiempo de incubación en cada caso, la mejor relación proteína:agente glicante y una concentración de proteína 4.5 mM, se estudió cómo afectaba la variación del pH a la fuerza de adhesión.

Los resultados obtenidos en presencia de los diferentes azúcares no muestran diferencias significativas. No se puede asegurar que el pH tenga un efecto directo en la capacidad adherente de la proteína, pero parece darse una disminución de esta en las muestras preparadas a pH 8, mientras que las muestras preparadas a pH 6 y 7.4 mostraron una capacidad de adhesión similar (Figura 20).

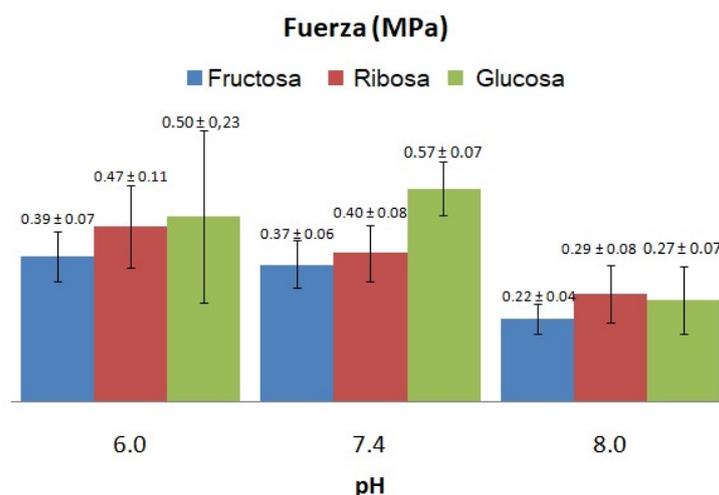


Figura 20. Poder adherente de BSA en presencia de diferentes azúcares variando el pH de reacción

En el caso de la glicación con los dicarbonilos, la BSA glicada con metilglioxal presentó un poder adherente parecido a pHs 6, 7.4 y 8. Por otra parte, la BSA modificada con glioxal si presenta diferencias significativas entre los diferentes pHs estudiados. La máxima capacidad adherente se observó a pH 7.4, y disminuyó de forma considerable tanto a pH 6 como a pH 8 (Figura 21). Este hecho indica que el pH puede cambiar la naturaleza química de los AGEs formados en el caso de la reacción con glioxal, y por ello la capacidad adherente de la BSA glicada (Brings, 2012).

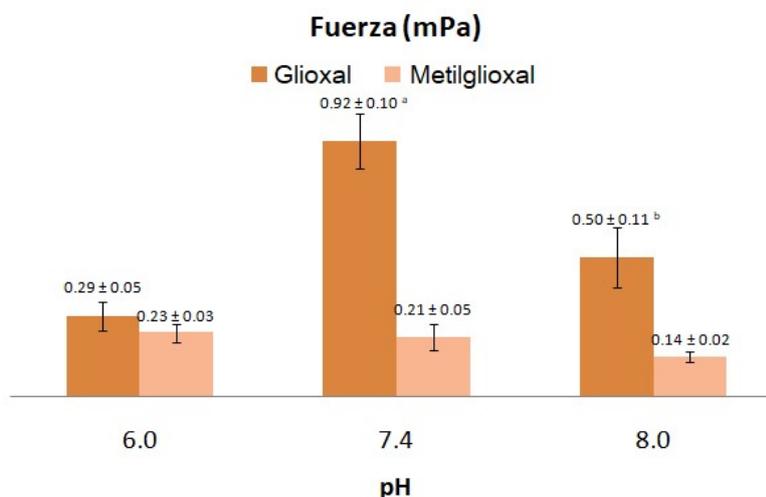


Figura 21. Poder adherente de BSA en presencia de dicarbonilos variando el pH de reacción

4 Comparación entre diferentes agentes glicantes

Tal y como ha podido observarse, las mejores condiciones de adherencia varían en función de la naturaleza química del agente glicante. Las mejores condiciones encontradas en cada caso se muestran en la tabla 1.

Agente glicante	Tiempo de incubación	Relación	[BSA]	pH
Glucosa	24 h	100:1	9 mM	7.4
Fructosa	24 h	10:1	9 mM	7.4
Ribosa	12 h	10:1	9 mM	7.4
Glioxal	3 h	1:100	4.5 mM	7.4
MGO	6 h	1:1	9 mM	7.4

Tabla 1. Condiciones para obtener una mejor capacidad de adhesión.

El poder adherente de la BSA en presencia de cada uno de los agentes glicantes, en las mejores condiciones encontradas para cada uno de ellos, es muy similar. Cuantitativamente estas muestras tienen una capacidad adherente de unos 0.8 MPa, con la excepción de la proteína modificada con ribosa que presenta un mayor poder adherente, alrededor de 1.3 MPa.

La capacidad de adhesión depende del tiempo de incubación, de la relación de concentración proteína:agente glicante, de la concentración de proteína y del pH. Estas variables dependen únicamente del tipo de reacción de glicación que se lleva a cabo, la cual depende del agente glicante.

5 Efecto de adición de metales y/o oxidantes

Los metales iónicos están implicados en muchas reacciones de entrecruzamiento, como por ejemplo en las de formación de bioadhesivos marinos. Por ello, se estudió el efecto de la adición de diferentes iones como el Na^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^+ y Fe^{3+} . No se observó ningún efecto para la mayoría de ellos, a excepción del Fe^{3+} , en una relación 100: proteína:metal aumentó la capacidad adherente de la BSA modificada con ácido ascórbico en 0,5 MPa.

También es común el uso de oxidantes fuertes, como el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, en este tipo de reacciones con proteínas. El estudio del efecto del NaIO_4 sobre la BSA y la proteína de soja modificada demostró que, a medida que se aumentaba la concentración de oxidante, más muestras se despegaban al retirar los pesos colocados para facilitar la adhesión de las maderas. Este oxidante en proporción 10:1 proteína:agente oxidante, provocó un gran aumento en la capacidad adherente de la BSA glicada con ácido ascórbico, pero disminuyó la capacidad adherente de la proteína de soja glicada con ácido ascórbico (Román, 2019).

El efecto de los iones Fe^{3+} y IO_3^- sobre la capacidad adherente de la BSA modificada se estudió manteniendo las condiciones de mejor capacidad de adhesión para cada mezcla de reacción (Tabla 1). En general no se observa una mayor capacidad adherente en presencia de Fe^{3+} y/o de agente oxidante. De hecho, en muchos casos no se observa ningún efecto. Para la BSA glicada con glucosa, fructosa y MGO, los valores se mantienen más o menos constantes en presencia de Fe^{3+} y/o IO_3^- . Para la proteína glicada con ribosa y glioxal la presencia de Fe^{3+} y IO_3^- hace disminuir la capacidad adherente (Figura 22).

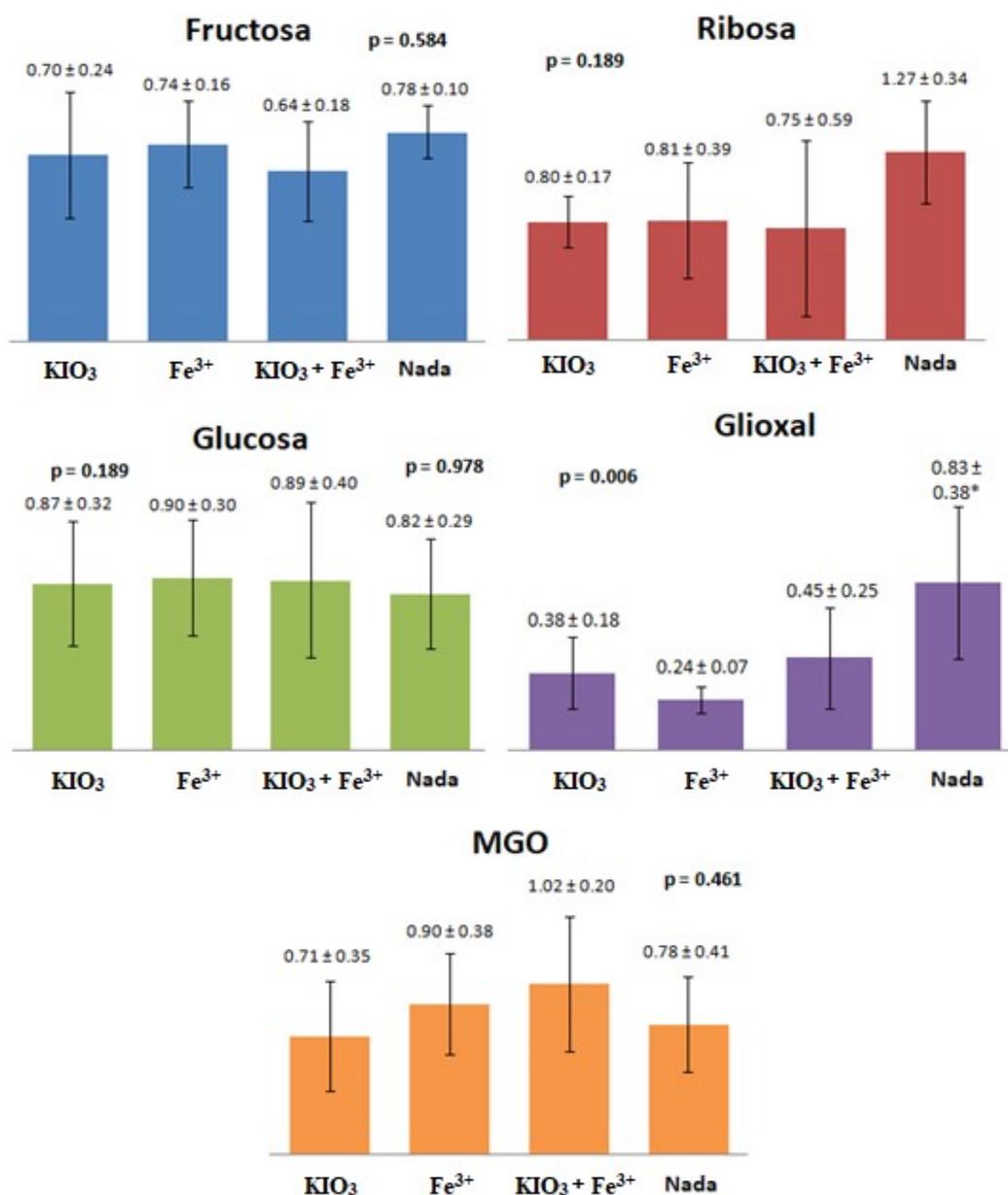


Figura 22. Capacidad adherente de la BSA glicada en presencia de metales y/o oxidantes

6 Efecto de tiempo y la temperatura de contacto sobre la adherencia

Manteniendo las condiciones de mejor capacidad de adhesión para cada agente glicante (Tabla 1) se varió el tiempo y la temperatura de adhesión de las muestras de 37 °C a 90°C y de 24 h a 3h. La comparación de los resultados obtenidos no muestra diferencias significativas, aunque parece que el incremento de la temperatura disminuye ligeramente la adhesión de las muestras de azúcares y aumenta la de los dicarbonilos (Figura 23). Esto podría deberse a que los mecanismos de glicación y por tanto, la naturaleza química de los AGEs formados son sensibles a la temperatura. Puede que el tipo de AGEs formados varíe de 37°C a 90°C y por ello también la capacidad adherente.

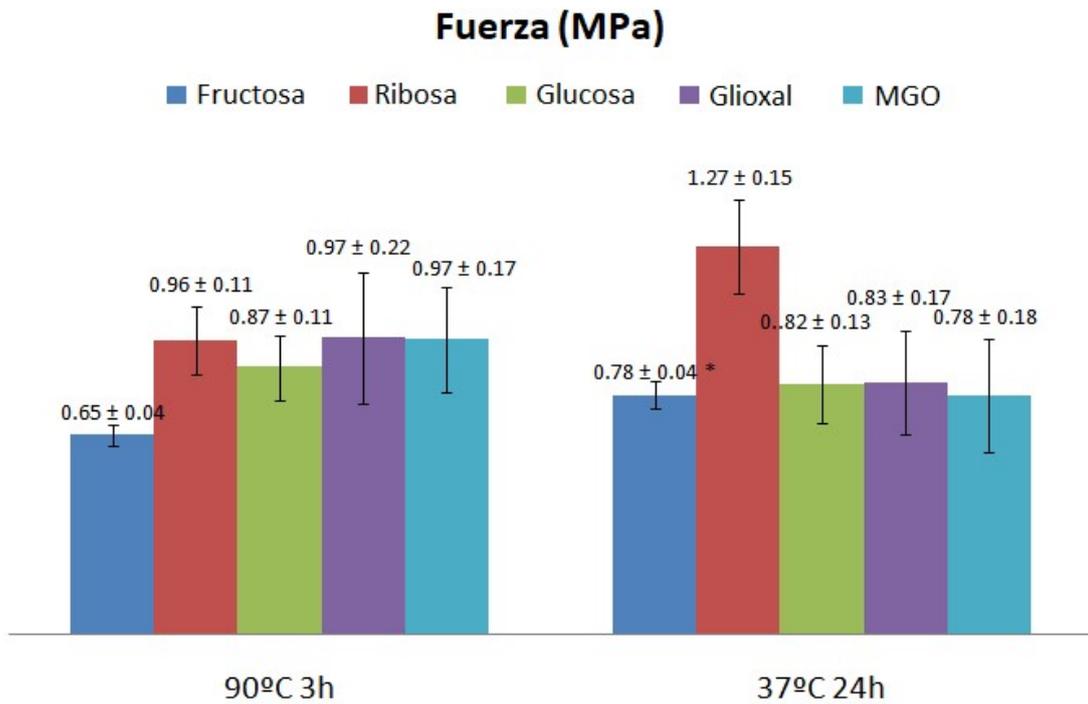


Figura 23. Poder adherente de las mezclas a diferente temperatura y tiempo de curación

7 Efecto del agua sobre la capacidad de adhesión

Manteniendo las condiciones de mejor capacidad de adhesión para cada agente glicante (Tabla 1), se procedió a la adhesión de las láminas de madera. Una vez pasado el período de incubación (24h a 37°C) necesario para facilitar la adhesión, se sumergieron las láminas de madera 2h en agua mili-Q. Casi todas las láminas se despegaron por efecto del agua, lo que demuestra que el agua es capaz de disolver la proteína modificada que actuaba de adhesivo. Sin embargo, las láminas adheridas con BSA glicada con glioxal se mantuvieron unidas, aunque su resistencia frente una fuerza de tracción, disminuyó notablemente (Figura 24).

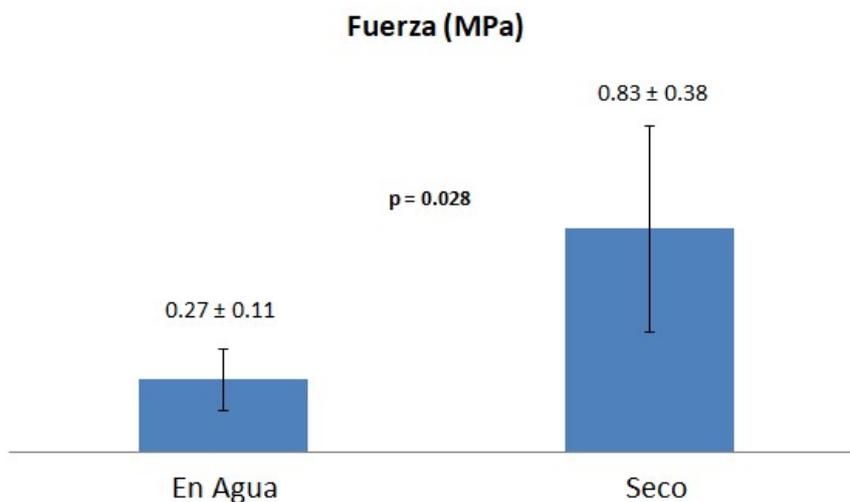


Figura 24. Poder adherente de la BSA glicada con glioxal, seca y en agua.

8 Comparación con pegamentos comerciales

Con el fin de comparar el efecto adherente de la BSA modificada, con el mostrado por diferentes adhesivos comerciales, se determinó la capacidad adherente de tres pegamentos comerciales diferentes. En todos los casos, se repitió el mismo procedimiento utilizado para el estudio de las mezclas de reacción formadas por BSA y el agente glicante.

Los resultados obtenidos mostraron que no había diferencias significativas entre la capacidad adherente de los pegamentos comerciales (Tabla 2) respecto a la adherencia mostrada por parte de la BSA modificada por los diferentes agentes glicantes (Figura 25). La capacidad adherente de las muestras experimentales parece ligeramente inferior, a excepción de la mezcla de BSA glicada por ribosa, la cual sigue mostrando la máxima capacidad adherente. Por tanto, la BSA modificada es tan buen pegamento como los comerciales.

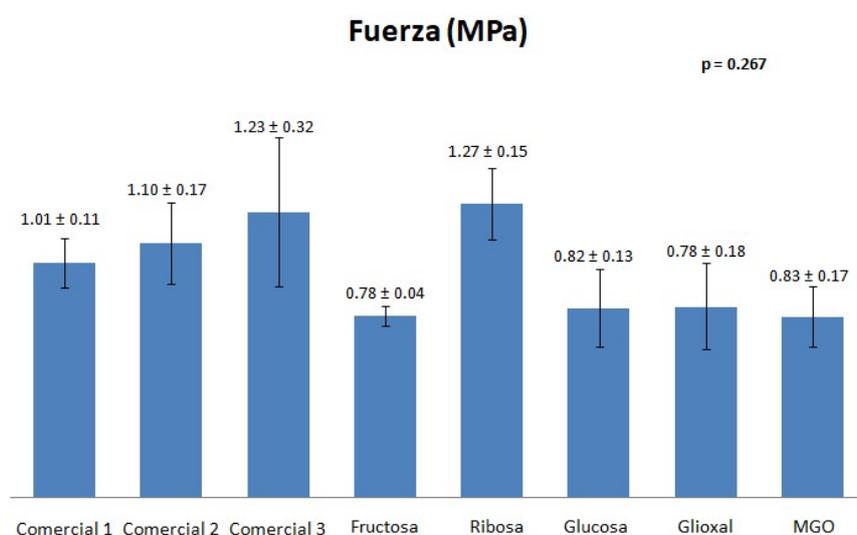


Figura 15. Capacidad adherente de pegamentos comerciales y BSA en presencia de diferentes agentes glicantes

Muestra	Marca	Componente mayoritario
Comercial 1	Pattex	N-(3-(trimetoxisilil)propil)etilenodiamina
Comercial 2	Supertite	Etil 2-cianoacrilato
Comercial 3	Multiforte	Cianoacrilato

Tabla 2. Marca y composición de pegamentos comerciales

9 Otras muestras biológicas que contienen proteínas: la yema de huevo

Las mezclas preparadas a partir de polvo de yema de huevo presentaron una cierta adherencia justo antes de su incubación. Sin embargo, justo después de ella, esta se pierde por completo (Figura 26). Este hecho puede atribuirse a que en presencia de una elevada concentración de agente glicante la reacción de glicación proteica se da de manera rápida y posteriormente los productos de glicación se van degradando, lo que explicaría la pérdida de la capacidad adherente.

Estos datos demuestran que la naturaleza química de la proteína o del tipo de proteína, también es un factor importante para establecer la capacidad adherente de la proteína glicada.

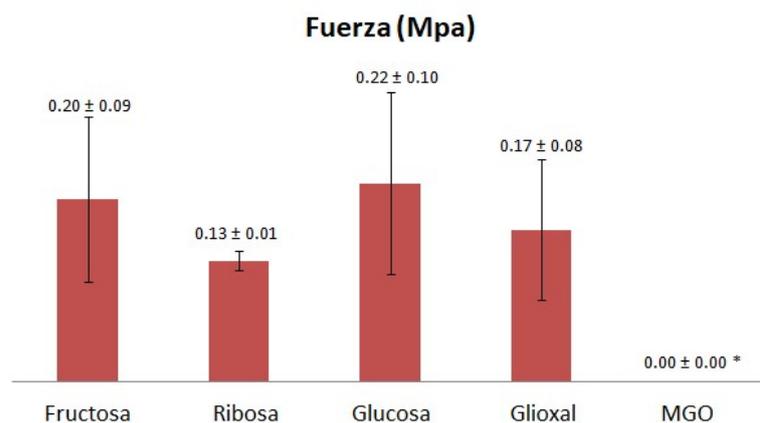


Figura 26. Capacidad adherente, a tiempo 0, de muestra biológica en presencia de diferentes agentes glicantes

10 Estudio comparativo de las adherencias con las de otras proteínas modificadas

Si se comparan los resultados experimentales obtenidos para la BSA glicada con cada uno de los diferentes agentes glicantes, con los resultados de la glicación de proteína de soja con ácido ascórbico (**Román, 2019**), se observa que el poder adherente máximo de la proteína de soja modificada con ácido ascórbico, es similar al de la BSA glicada con fructosa, glucosa, glioxal y MGO, pero inferior al de la BSA glicada con ribosa.

Por otra parte, si se comparan los resultados experimentales obtenidos para la BSA glicada con cada uno de los diferentes agentes glicantes, con los resultados de la glicación de BSA con ácido ascórbico (**Román, 2019**), se observa que el poder adherente de la BSA modificada con ácido ascórbico es muy superior al de la BSA modificada por el resto de agentes glicantes. La capacidad adherente de la BSA modificada con ácido ascórbico en las mejores condiciones alcanza los 2 MPa, en comparación con los 1,2 MPa de la BSA modificada con ribosa.

La BSA es una de las proteínas puras más baratas que se pueden comprar a gran escala en un laboratorio. La proteína aislada de soja es menos pura y no es completamente soluble pero su precio es mucho menor, lo que permitiría producir un adhesivo competente a nivel de mercado. Se analizaron las condiciones para obtener la mejor capacidad adherente de la proteína de soja modificada con ácido ascórbico y la BSA modificada con ácido ascórbico. La temperatura de incubación con la que se obtienen mejores capacidades adherentes en el caso de la incubación de proteína de soja con ácido ascórbico es de 95°C, en comparación con los 37°C a los que se incubaba la BSA con los diferentes agentes glicantes y también con el ácido ascórbico. El tiempo de incubación con el que se consigue la máxima capacidad adherente para la proteína de soja modificada es de 1 día, al igual que con la BSA modificada con glucosa y fructosa. En cambio el tiempo de incubación con el que se consigue la máxima capacidad adherente para la BSA modificada con ácido ascórbico es de 14 días, muy superior a los tiempos de incubación de la BSA con el resto de agentes glicantes. La relación proteína:ácido ascórbico que presenta mayor adherencia para la proteína de soja es la 1:1 y para la BSA la 10:1. La concentración de proteína de soja con la que se obtiene una mayor capacidad adherente es 0,05 g/mL. La concentración de BSA necesaria para obtener la mejor capacidad de adhesión es de 0,6 g/mL en el caso de la glicación con fructosa, glucosa, ribosa, y MGO y de 0,3 g/mL para la modificación con glioxal y ácido ascórbico, concentraciones notablemente superiores. El pH tiene una gran influencia en la capacidad adherente de la proteína de soja modificada, a pH superior o inferior a 7 la capacidad adherente disminuye drásticamente. En el caso de la BSA solo ocurre algo parecido en la modificada con glioxal y ácido ascórbico. El efecto de metales y/o oxidantes ya se analizó en el apartado 5 de este bloque.

CONCLUSIONES

Este trabajo ha demostrado que la reacción de los grupos amino de proteínas con azúcares reductores y compuestos dicarbonílicos da lugar a fuertes adhesivos. Esta química es análoga a la que tiene lugar al cocinar los alimentos. Las mezclas adhesivas finales presentaban un color marrón claro, comparable al que adquieren los alimentos al cocinarlos. La capacidad adherente de la BSA modificada es comparable a las de los pegamentos comerciales. Esto demuestra que se pueden usar proteínas como materia prima en la fabricación de adhesivos lo que supondría una alternativa competitiva a los pegamentos derivados del petróleo, con la ventaja de no ser tóxicos, ser biodegradables y ser renovables. Se puede concluir que las condiciones para obtener una mejor adherencia dependen de la naturaleza de la proteína, del agente glicante y de los AGEs formados. La BSA modificada con ribosa es la que presenta mayor capacidad adherente en las siguientes condiciones: 12 h de incubación a 37 °C, una relación 10:1 de proteína:ribosa y una concentración de BSA 9 mM.

Por otro lado el aumento de la glicación y, en particular, la acumulación de AGEs tisulares y séricos en el organismo tiene un papel importante en el desarrollo de diversas patologías y enfermedades como la diabetes. En particular niveles elevados de albúmina glicosilada en caso de diabetes mellitus pueden conducir a daños irreversibles asociados a trastornos metabólicos como nefropatía o neuropatía.

BIBLIOGRAFÍA

- (Ahmed, 2004) N. Ahmed. Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice* 67, 2005, 3–21
- (Ahmed, 2018) A. Ahmed, A. Shamsi, M. S. Khan, F. M. Husain, B. Bano. Methylglyoxal induced glycation and aggregation of human serum albumin: Biochemical and biophysical approach. *International Journal of Biological Macromolecules* 113, 2018, 269–276
- (Allaman, 2015) I. Allaman, M. Bélange and P.J. Magistretti. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Frontiers in Neuroscience* 9, 2015, 23
- (Aparicio, 2016) D. Aparicio, M. Durán. Más allá de la Diabetes mellitus: glicación de proteínas. Universidad Libre Seccional Barranquilla, *Biociencias I*, 2016, 105 – 111
- (Arcanjo, 2018) N.M.O. Arcanjo, C. Luna, M.S. Madruga, M. Estévez. Antioxidant and pro-oxidant actions of resveratrol on human serum albumin in the presence of toxic diabetes metabolites: Glyoxal and methyl-glyoxal. *BBA - General Subjects* 1862, 2018, 1938–1947
- (Arumugama, 2019) V. Arumugama, R. Rajamanikandan, M. Ilanchelian, K. G. Moodley, G. G. Redhi. Investigation of binding interactions between BSA and [EPMpyr][Sal] through spectroscopy studies, thermophysical and thermodynamic properties. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 210, 2019, 299–307
- (Bai, 2012) X. Bai, Z. Wang, C. Huang, Z. Wang and L. Chi. Investigation of Non-Enzymatic Glycosylation of Human Serum Albumin Using Ion Trap-Time of Flight Mass Spectrometry. *Molecules* 17, 2012, 8782-8794
- (Brings, 2012) S. Brings, T. Fleming, M. Freichel, M. U. Muckenthaler, S. Herzig and P. P. Nawroth. Dicarbonyls and Advanced Glycation End-Products in the Development of Diabetic Complications and Targets for Intervention. *Molecules* 17, 2012, 8782-8794
- (Chen, 2019) Y. Chen, L. Yu, Y. Wang, Y. Wei, Y. Xu, T. He, R. He. D-Ribose contributes to the glycation of serum protein. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 2019
- (Fatima, 2017) S. Fatima, T. Anwar, N. Ahmad, A. Islam, P. Sen. Non-enzymatic glycation enhances human serum albumin binding capacity to sodium fluorescein at room temperature: A spectroscopic analysis. *Clinica Chimica Acta* 469, 2017, 180–186
- (Garlick, 1983) R.L. Garlick and J. S. Mazer. The Principal Site of Nonenzymatic Glycosylation of Human Serum Albumin *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry* 10, 1983, 6142-6146
- (Grande, 1992) C. Grande. Glicación no enzimática de proteínas: importación en el diagnóstico y control de la gestante diabética. Memoria doctorado en farmacia, 1992
- (Herbert, 1989) J. Herbert. Marine adhesive proteins: natural composite thermosets. *International Journal of Biological Macromolecules* 12, 1990, 139-144

(Huang, 2016) Y. Huang, H. Liao, S. Wang and S. Lin. Glycation and secondary conformational changes of human serum albumin: study of the FTIR spectroscopic curve-fitting technique. *AIMS Biophysics* 3, **2016**, 247-260

(Khan, 2018) M.A. Khan, Z. Arif, Moinuddin, K. Alam (2018) Methylglyoxal produces more changes in biochemical and biophysical properties of human IgG under high glucose compared to normal glucose level. *PLOS ONE* 13, **2018**

(Kielhorn, 2004) J. Kielhorn, C. Pohlenz-Michel, S. Schmidt, and I. Mangelsdorf. Glyoxal. *Concise International Chemical Assessment Document* 57, **2004**

(Levi, 1998) B. Levi and M. J. Werman. Long-Term Fructose Consumption Accelerates Glycation and Several Age-Related Variables in Male Rats. *The Journal of Nutrition* 128, **1998**, 1442–1449

(Majoreka, 2012) K. A. Majoreka, P. J. Porebskia, A. Dayala, M. D. Zimmermana, K. Jablonskaa, A. J. Stewartd, M. Chruszcza, W. Minora. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology* 52, **2012** 174– 182

(Martínez-Orozco, 2019) H., L. Mariño, A. B. Uceda, J. Ortega-Castro, B. Vilanova, J. Frau and M. Adrover. Nitration and Glycation Diminish the α -Synuclein Role in the Formation and Scavenging of Cu²⁺-Catalyzed Reactive Oxygen Species. *ACS Chem. Neurosci* 6, **2019**, 2919-2930

(Rabbani, 2019) G. Rabbani, S. N. Ahn. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo. *International Journal of Biological Macromolecules* 123, **2019**, 979–990

(Raghav, 2017) A. Raghav, J. Ahmad, K. Alam. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin and its effect on antibodies profile in patients with diabetes mellitus. *PLOS ONE* 12, **2017**

(Román, 2019) J. K. Roman and J. J. Wilker. Cooking Chemistry Transforms Proteins into High-Strength Adhesives. *J. Am. Chem. Soc.* 141, **2019**, 1359–1365

(Romay, 1987) C. Romay y C. Pascual. Glicosilaciones no enzimáticas de proteínas. *Interferón y Biotecnología* 3, **1987**, 213-220

(Thornalley, 2008) P. J. Thornalley. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems—role in ageing and disease. *Drug Metabol. Drug Interact.* 23, **2008**, 125–150.

(Yang, 2019) Y. Yang, N. Zhang, Y. Sun, J. Li, R. Zhao, Z. Zheng, Y. Ding, X. Zhang, D. Geng, Y. Sun. Multispectroscopic and molecular modeling studies on the interaction of bile acids with bovine serum albumin (BSA). *Journal of Molecular Structure* 1180, **2019**, 89-99