



Casa abierta al tiempo

**ESTUDIOS CINÉTICOS DE LA  
DESNATURALIZACIÓN  
TÉRMICA DE LA CARICAÍNA**

TESIS QUE PRESENTA  
**LETICIA LÓPEZ ARENAS**  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN QUÍMICA**

Matricula : 97380491

MAYO 2000

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**Unidad Iztapalapa**  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
ÁREA DE BIOFISICOQUÍMICA

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. D. Silvia Solís Mendiola en el Área de Biofísicoquímica, Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco el apoyo económico brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, a través de la beca de Maestría con número de registro 124872/131551 y del convenio No. 400200-5-29124E.

A la Dra. D. Silvia Solís Mendiola y al Dr. Maximiliano Asomoza Palacios, por su ayuda y motivación.

Al Dr. Andrés Hernández Arana por su apoyo durante el desarrollo del trabajo.

A la Maestra A. Jaqueline Padilla Zúñiga por proporcionarnos la estructura tridimensional de la caricaína.

A todos mis compañeros del Área de Biofísicoquímica por su estímulo.

# ÍNDICE

<b>Capítulo 1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Introducción general	2
1.2 Desnaturalización	6
1.3 Dicroísmo circular (DC)	7
1.4 El estado de transición	9
1.5 Caricaína	9
1.6 Objetivos	15
<b>Capítulo 2. Análisis de datos</b>	<b>16</b>
2.1 Curvas de desnaturalización	17
2.2 Dicroísmo circular	17
2.3 Modelos de dos estados	18
2.4 Cinéticas del modelo de dos estados	21
2.5 Modelos para procesos irreversibles	26
2.6 Titulación potenciométrica	28
<b>Capítulo 3. Desarrollo experimental</b>	<b>33</b>
3.1 Materiales	34
3.2 Dicroísmo circular (DC)	34
3.3 Titulación potenciométrica	36

<b>Capítulo 4. Resultados y discusión</b>	37
4.1 Espectros nativo y desnaturalizado	38
4.2 Desnaturalización térmica de la caricaína por dicroísmo circular	40
4.3 Desnaturalización irreversible	46
4.4 Parámetros de activación	48
4.5 Estructuras secundaria y terciaria	51
4.6 Efecto de la velocidad de calentamiento en la desnaturalización térmica	53
4.7 Energía de activación	56
4.8 Titulación potenciométrica	62
<b>Capítulo 5. Conclusiones y perspectivas</b>	66
5.1 Conclusiones	67
5.2 Perspectivas	67
<b>Referencias</b>	68

# **Capítulo 1**

## **Introducción**

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Los aminoácidos son los monómeros de las moléculas proteicas. Generalmente, en los hidrolizados de proteínas están presentes 20 aminoácidos diferentes. Estos contienen por lo menos un grupo primario de (-NH<sub>2</sub>) y un grupo carboxílico (-COOH). Estos aminoácidos tienen en su cadena lateral diversos grupos funcionales que pueden diferir en su carácter aromático o alifático, así como en su carga eléctrica, volumen y polaridad [1, 2]. En los aminoácidos derivados de las proteínas el grupo amino primario ocupa una posición  $\alpha$  con relación al grupo carboxílico.

Aunque ninguno de los 20 aminoácidos hallados en las proteínas absorben luz en la zona del espectro visible, tres de ellos (la tirosina, el triptófano y la fenilalanina) absorben luz significativamente en el espectro ultravioleta. Puesto que muchas proteínas contienen restos de tirosina, las medidas de absorción de la luz a 280 nm en un espectrofotómetro constituye un medio conveniente y extremadamente rápido de determinar el contenido de proteína de una disolución [1].

En los aminoácidos libres, los grupos ionizables son el carboxilo y el amino alfa [3]. Además, dependiendo de la cadena lateral presente, algunos aminoácidos tienen un grupo carboxilo extra, como los ácidos aspártico y glutámico, o un grupo básico adicional, como el grupo amino épsilon de la lisina, el grupo guanidino de la arginina, etc.

Cada uno de los grupos ionizables presentes en los aminoácidos puede comportarse como ácido o como base, lo cual depende del pH que lo rodea, y de su constante de disociación (pKa) [3]. Cuando el pH que lo rodea es muy alto existe como un ion cargado negativamente, porque en este pH hay muy pocos protones y ello permite la disociación no sólo del grupo carboxilo que pierde su protón y consecuentemente gana una carga negativa, sino también del grupo amino que cede su protón al medio perdiendo su carga positiva [3].

La dependencia de la estabilidad de la proteína con el pH es de origen electrostático [4, 5]. Para proteínas en condiciones extremas de punto isoeléctrico, la titulación con protones provoca cambios en su carga neta, por lo que la transición de desplegamiento ácida es causada por fuerzas repulsivas entre residuos ionizados [6].

Las proteínas globulares están constituidas por cadenas polipeptídicas plegadas estrechamente, de modo que adoptan formas esféricas o globulares compactas. La mayor parte de las proteínas globulares son solubles en sistemas acuosos.

Las cadenas polipeptídicas son polímeros de longitud definida, poseen una composición química específica, una masa molecular y una secuencia ordenada de sus aminoácidos estructurales y una forma tridimensional [1].

Las proteínas tienden a adoptar, bajo ciertas condiciones, una estructura específica singular, llamada estructura nativa, aunque, en principio, sea posible un número muy elevado de configuraciones tridimensionales para una secuencia de aminoácidos.

Se sabe que el proceso de plegamiento debe estar unívocamente definido, pues sólo un sistema con una conformación tridimensional claramente definida - y, a la vez, flexible - la estructura nativa, puede desempeñar funciones tan delicadas y específicas como las de las proteínas [7].

Una proteína tiene cuatro niveles de estructura, las cuales se definen como: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. El término estructura primaria se refiere al esqueleto covalente de la cadena polipeptídica, y establece de modo específico la secuencia de sus aminoácidos.

La estructura secundaria se refiere a la ordenación regular y periódica en el espacio de las cadenas polipeptídicas a lo largo de una dirección. Las estructuras secundarias más comunes son las hélices  $\alpha$  y las hojas  $\beta$ . En la primera de éstas, la cadena se enrolla en sentido dextrógiro y los grupos laterales se colocan en el exterior de la hélice. En la segunda, la cadena de aminoácidos adopta una conformación en zig-zag, debido a los puentes de hidrógeno que se establecen entre secciones distintas de la cadena principal, estas estructuras secundarias son estabilizadas por puentes de hidrógeno y minimizan las repulsiones estéricas entre residuos [1].

La estructura terciaria es el modo como la cadena polipeptídica se curva o se pliega para formar la estructura estrechamente plegada y compacta de las proteínas globulares, es decir, se refiere a la manera en que la cadena polipeptídica se pliega en el espacio tridimensional. Los residuos hidrofóbicos se orientan preferentemente hacia el interior de la proteína, y los polares hacia el exterior, es decir, hacia el disolvente acuoso.

La estructura cuaternaria pone de manifiesto cómo se disponen en el espacio las cadenas polipeptídicas individuales de una proteína que posee más de una cadena [1]. Las estructuras terciaria y cuaternaria se estabilizan por enlaces químicos, fundamentalmente de naturaleza no covalente.

Puede obtenerse información sobre la conformación molecular de una proteína mediante el empleo de técnicas espectroscópicas tales como el dicroísmo circular, dicha técnica es empleada en este trabajo para conocer la estabilidad de la proteína estudiada.

Los estudios detallados de la estabilidad y estructura de las proteínas, son de interés médico [8] y biotecnológico [9]. Un problema fundamental consiste en descifrar el código de doblado de una proteína, es decir, la manera en la cual la conformación tridimensional nativa se encuentra codificada por la secuencia de aminoácidos.

El objetivo de los estudios de desnaturalización de proteínas es comprender los principios que dictan la formación de la estructura nativa a partir de la información contenida en la secuencia de aminoácidos. Estos principios son denominados código de doblado y una vez establecidos, permitirían el diseño de enzimas sintéticas y la modificación de macromoléculas naturales, optimizando o modificando sus funciones. La interpretación del código de doblado permite que una proteína adquiera la estructura tridimensional, responsable de su actividad biológica.

Se ha observado que para una gran cantidad de moléculas estudiadas, basta proporcionar las condiciones adecuadas de temperatura, pH, fuerza iónica,

etc., para que se realice *in vitro* el doblado de la cadena hasta adquirir la estructura nativa [10, 11].

La información química, biológica y fisicoquímica que se disponga sobre la proteína en estudio resulta de un gran valor para su análisis teórico. Después de muchos años de esfuerzos en el estudio de estructuras de proteínas resulta evidente que sin el conocimiento de sus características termodinámicas, cualquier estudio teórico de su geometría es sólo especulación [12].

Los estudios que se realizan en este trabajo contribuyen al conocimiento tanto de la estabilidad como de la estructura de una de las proteinasas del látex de papaya (la caricaína) a diferentes condiciones termodinámicas, lo cual probablemente pueda contribuir al estudio de su aplicación tanto científica como industrial. Se sabe que el látex de la fruta de papaya (*Carica papaya*) a sido usado como fuente de las proteinasas para uso industrial, por ejemplo, en la protección de ablandadores de carne y prevención en la formación de turbidez en bebidas. También las proteinasas han tenido gran importancia médica, por ejemplo en el tratamiento del prolapso de los discos vertebrales [13].

## 1.2 DESNATURALIZACIÓN

La desnaturalización consiste en el desplegamiento de la estructura nativa de la cadena polipeptídica. Las proteínas globulares nativas experimentan una desnaturalización para producir conformaciones desplegadas y al azar de sus cadenas polipeptídicas cuando se someten a altas temperaturas, al tratamiento con ácidos o con bases, o cuando se exponen a la

acción de disoluciones concentradas de urea o de cloruro de guanidina [1]. Puesto que los enlaces químicos covalentes del esqueleto peptídico de las proteínas no se rompen durante este tratamiento relativamente suave, se ha llegado a la conclusión que la estructura primaria permanece intacta. La consecuencia más significativa de la desnaturalización es que las proteínas pierden su actividad biológica característica [1].

Una consecuencia de la desnaturalización es la disminución en la solubilidad de la molécula, pues los grupos hidrofóbicos ubicados en el interior quedan expuestos al disolvente acuoso. La disminución en la solubilidad puede facilitar la interacción entre grupos no polares de diferentes cadenas conformadas al azar, lo que puede provocar, a su vez, la agregación [14].

Se ha encontrado que la desnaturalización de las proteínas es, en muchos casos, un proceso altamente cooperativo, que involucra a toda la macromolécula y que está acompañado por un enorme incremento en la entalpía y en la entropía [15, 16].

### 1.3 DICROÍSMO CIRCULAR

Las moléculas de proteínas experimentan con frecuencia cambios de conformación durante el proceso de desnaturalización. Tales cambios pueden ser detectados mediante ciertas medidas físicas. Una prueba sensible de los cambios conformacionales es la medida del dicroísmo circular de las proteínas [1].

La espectroscopía de dicroísmo circular ( DC ) es una técnica óptica que permite detectar la quiralidad de las estructuras moleculares, y provee información acerca de las estructuras secundaria y terciaria de una proteína molecular [17]. La quiralidad es una importante característica de la estructura de las proteínas. Las hojas  $\beta$  o hélice  $\alpha$  de la estructura secundaria del esqueleto polipeptídico tienen quiralidad, también las cadenas laterales de la estructura terciaria presentan quiralidad [17]. Cuando la luz polarizada circular o elípticamente atraviesa una disolución de proteínas, la luz transmitida puede estar polarizada en un plano por la desigual absorción de los componentes dextro y levo de la luz incidente [1]. En el equipo de DC la radiación de una fuente muy estable y de gran intensidad pasa a través de un monocromador y es polarizada en un plano por un prisma. A continuación, el modulador actúa como un retardador de la fase de uno de los componentes de la radiación. La variación en la fase depende de la señal eléctrica de alta frecuencia que el sistema electrónico del aparato emite y que es recibida por el modulador. De esta forma, el haz incidente está alternativamente formado por luz circularmente polarizada a la derecha y a la izquierda. El haz atraviesa la muestra y al emerger es convertido en una señal eléctrica por el detector. El sistema electrónico calcula la diferencia entre la absorción de la radiación circularmente polarizada en ambos sentidos, convirtiéndola en el valor numérico de la elipticidad y graficándola contra la longitud de onda en el registrador.

## 1.4 EL ESTADO DE TRANSICIÓN.

En una reacción química de una sola etapa, el estado de transición se define como la estructura con energía libre más elevada [18, 19, 20]. En una reacción con varios intermediarios, la reacción de cada intermediario involucra un estado de transición individual. El estado de transición de toda la reacción se toma como el estado con energía de transición más elevada.

En general, se supone que el estado de transición tanto para el plegamiento como para el desplegado es, en una primera aproximación, una forma distorsionada de alta energía de la conformación nativa [21]. Esta energía elevada se debe probablemente a la necesidad de romper la cooperatividad de las interacciones que estabilizan el estado nativo. La estructura del estado de transición para el plegamiento es, por consiguiente, parecida a la del estado nativo, con una proporción elevada de estructura secundaria y con interacciones significativas en el núcleo hidrofóbico [22, 23].

## 1.5 CARICAÍNA

El látex de la papaya (*Carica papaya*) es el origen de varias proteinasas cisteínicas o tiólicas (papaína, quimopapaína y proteinasas de la papaya) que son de interés tanto científico como industrial [24]. Si bien se obtienen de una misma fuente vegetal, son tipos particulares de proteínas que pueden ser identificados tanto por su secuencia de aminoácidos como por sus propiedades fisicoquímicas.

La proteinasa  $\Omega$  fue aislada por primera vez por Schack [25] y desde entonces ha sido llamada de varias formas: peptidasa A [25, 26], peptidasa II

[27], proteinasa A [28], proteinasa III [29], proteinasa  $\Omega$  [30] y actualmente caricaína [31].

La caricaína pertenece a la familia de enzimas denominadas proteasas sulfhidrúlicas vegetales (PSV), o proteinasas cisteínicas, que tienen una actividad proteolítica que depende del grupo tiol de un residuo de cisteína [32, 33].

La familia de las proteinasas cisteínicas de la *Carica papaya* tienen masas moleculares similares (24 KDa) y puntos isoelectricos básicos (8.75 – 11.0). Los valores para las proteinasas tiólicas de la *Carica papaya* se dan en la tabla I [34].

La caricaína consta de 216 residuos de aminoácidos [35], no contiene ningún carbohidrato unido a su cadena polipeptídica [36] y contiene 7 residuos de cisteína, de los cuales se forman 3 puentes disulfuro, (22-63, 56-95 y 153-204) y un residuo de cisteína libre (25) que es esencial para la actividad catalítica [35, 37]. En la tabla II se muestra la secuencia de aminoácidos de la caricaína.

**TABLA I.** Masa molecular y punto isoelectrico de las proteinasas tiólicas de la *Carica papaya*.

**PROTEINASAS TIOLICAS DE CARICA PAPAYA**

<b>Enzima</b>	<b>Masa Molecular ( Da )</b>	<b>Punto Isoeléctrico</b>
Papaína	23,350	8.75
Quimopapaína A	24,000	10.3-10.4
Quimopapaína B	24,000	10.6-10.7
Proteinasa $\Omega$	24,000	11.0
Proteinasa $\beta$	28,000	>11.0

**TABLA II.** Secuencia de aminoácidos de la caricaína [35].

1	5	10	15	20
-Leu-Pro- <b>Glu</b> -Asn-Val- <b>Asp</b> -Trp-Arg-Lys-Lys-Gly-Ala-Val-Thr-Pro-Val-Arg-His-Gln-Gly				
	25	30	35	40
-Ser-Cys-Gly-Ser-Cys-Trp-Ala-Phe-Ser-Ala-Val-Ala-Thr-Val- <b>Glu</b> -Gly-Ile-Asn-Lys-Ile				
	45	50	55	60
-Arg-Thr-Gly-Lys-Leu-Val- <b>Glu</b> -Leu-Ser- <b>Glu</b> -Gln- <b>Glu</b> -Leu-Val- <b>Asp</b> -Cys- <b>Glu</b> -Arg-Arg-Ser				
	65	70	75	80
-His-Gly-Cys-Lys-Gly-Gly-Tyr-Pro-Pro-Tyr-Ala-Leu- <b>Glu</b> -Tyr-Val-Ala-Lys-Asn-Gly-Ile				
	85	90	95	100
-His-Leu-Arg-Ser-Lys-Tyr-Pro-Tyr-Lys-Ala-Lys-Gln-Gly-Thr-Cys-Arg-Ala-Lys-Gln-Val				
	105	110	115	120
-Gly-Gly-Pro-Ile-Val-Lys-Thr-Ser-Gly-Val-Gly-Arg-Val-Gln-Pro-Asn-Asn- <b>Glu</b> -Gly-Asn				
	125	130	135	140
-Leu-Leu-Asn-Ala-Ile-Ala-Lys-Gln-Pro-Val-Ser-Val-Val-Val- <b>Glu</b> -Ser-Lys-Gly-Arg-Pro				
	145	150	155	160
-Phe-Gln-Leu-Tyr-Lys-Gly-Gly-Ile-Phe- <b>Glu</b> -Gly-Pro-Cys-Gly-Thr-Lys-Val- <b>Asp</b> -His-Ala				
	165	170	175	180
-Val-Thr-Ala-Val-Gly-Tyr-Gly-Lys-Ser-Gly-Gly-Lys-Gly-Tyr-Ile-Leu-Ile-Lys-Asn-Ser				
	185	190	195	200
-Trp-Gly-Thr-Ala-Trp-Gly- <b>Glu</b> -Lys-Gly-Tyr-Ile-Arg-Ile-Lys-Arg-Ala-Pro-Gly-Asn-Ser				
	205	210	215	
-Pro-Gly-Val-Cys-Gly-Leu-Tyr-Lys-Ser-Ser-Tyr-Tyr-Pro-Thr-Lys- <b>Asn</b>				

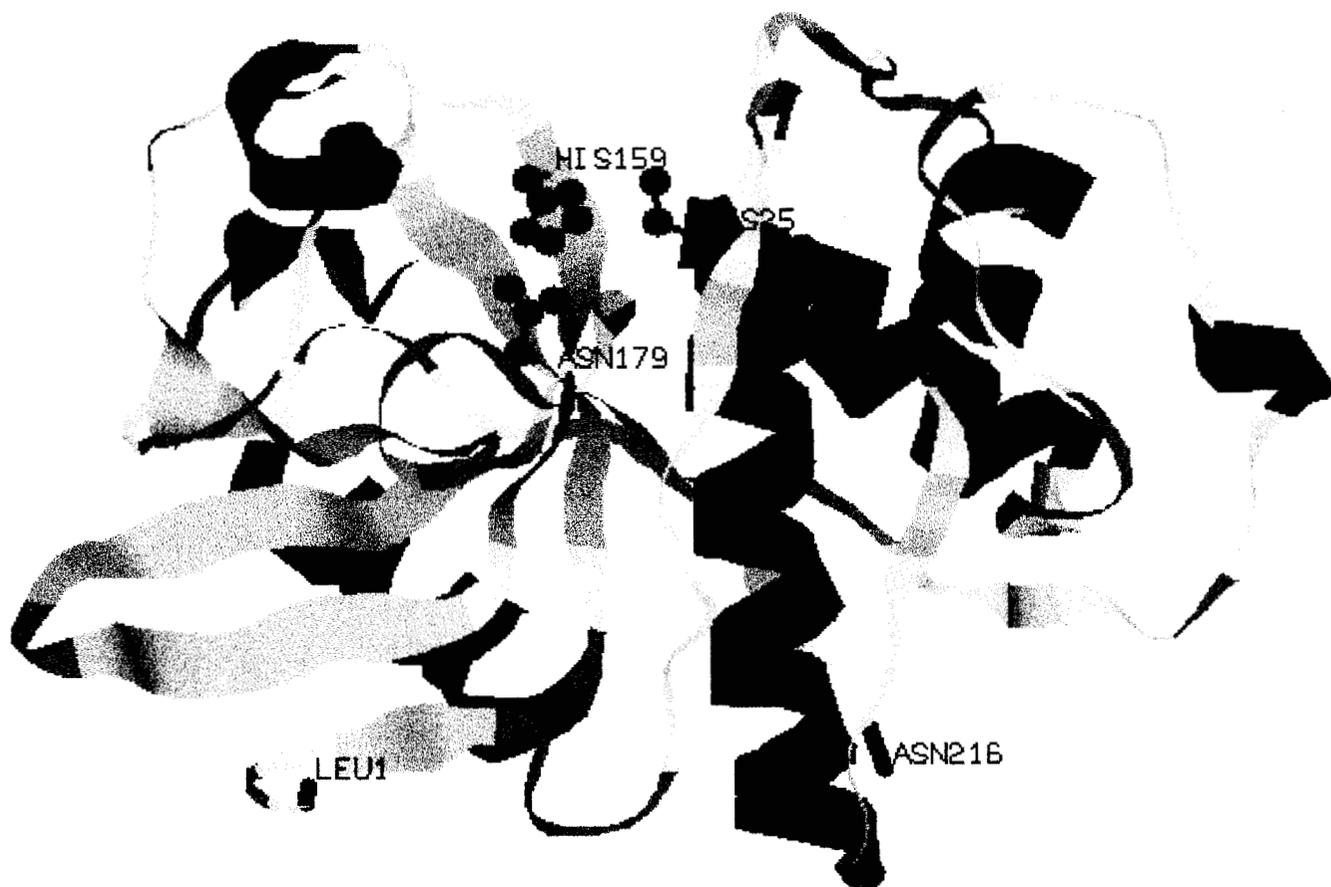
Estudios de rayos X de la estructura de papaína y caricaína, muestran que cada una de las proteínas consta de dos distintos dominios estructurales [24], los cuales son de aproximadamente 100 residuos cada uno, es decir, unos 200 por cadena polipeptídica. El sitio catalítico de la caricaína, que se localiza en la hendidura interdominio, está formada por tres aminoácidos: cisteína del

primer dominio, e histidina y asparagina del segundo [38]. Se han realizado estudios de dicroísmo circular de caricaína para obtener su contenido de estructura secundaria, en la tabla III se muestran los resultados de estos estudios [34]. En la figura 1 se representa la estructura tridimensional de la caricaína.

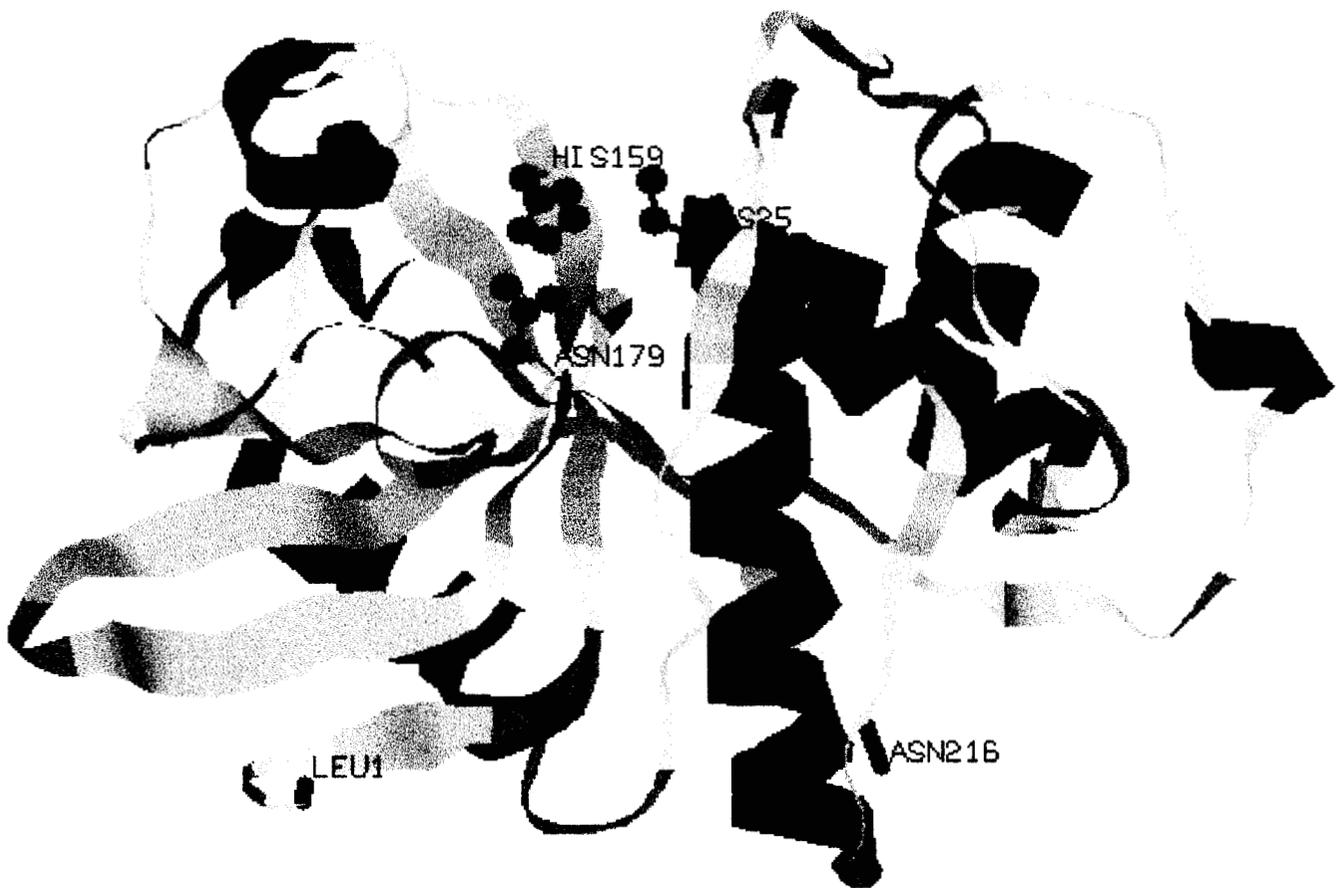
**TABLA III.** Contenido de estructura secundaria de caricaína [34].

<b>CONTENIDO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA DE CARICAÍNA</b>	
HELICES	0.27
HOJAS $\beta$ ANTIPARALELAS	0.14
HOJAS $\beta$ PARALELAS	0.02
GIROS	0.17
OTROS	0.50
TOTAL	1.10

El contenido de estructura secundaria encontrado en la caricaína por estudios de dicroísmo circular, esta de acuerdo con aquellos derivados de estudios de rayos X [34], con la excepción de la cantidad pequeña de hojas  $\beta$  paralela, un tipo estructural que se sabe está ausente en esta macromolécula [39, 40].



**Figura 1.** Esquema de la estructura tridimensional de la caricaina en la que los listones rojos son hélices  $\alpha$ , los listones amarillos hojas  $\beta$ , en verde los grupos C y N terminal y en negro se representan los aminoácidos del sitio activo.



**Figura 1.** Esquema de la estructura tridimensional de la caricaina en la que los listones rojos son hélices  $\alpha$ , los listones amarillos hojas  $\beta$ , en verde los grupos C y N terminal y en negro se representan los aminoácidos del sitio activo.

## 1.6 OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

- Por la técnica de dicroísmo circular determinar el modelo al que se ajusta la desnaturalización térmica de la caricaína, siguiendo las cinéticas de desnaturalización a diversas temperaturas y valores de pH.
- Por técnicas de dicroísmo circular obtener información sobre la pérdida de estructura secundaria y terciaria de la caricaína.
- Analizar la posible variación de la entropía y entalpía de activación a distintos valores de pH.

# **Capítulo 2**

## **Análisis de Datos**

## 2. ANÁLISIS DE DATOS

### 2.1 CURVAS DE DESNATURALIZACIÓN

Si se estudia el desdoblamiento de una proteína por determinado método espectroscópico, como fluorescencia o dicroísmo circular, las fracciones  $f_N$  de moléculas nativas y  $f_D$  de moléculas desnaturalizadas como función del parámetro de desplegamiento estarán descritas por

$$f_N = \frac{(\theta - \theta_D)}{(\theta_N - \theta_D)} \quad \text{y} \quad f_D = \frac{(\theta - \theta_N)}{(\theta_D - \theta_N)} \quad (1)$$

donde  $\theta$  es cualquier propiedad física que cambie durante la transición;  $\theta_N$  y  $\theta_D$  son, respectivamente, los valores de dicha propiedad en los estados nativo y desnaturalizado [15, 41].

### 2.2 DICROÍSMO CIRCULAR

Los espectros de dicroísmo circular son reportados como elipticidad por residuo medio  $[\theta]_{\text{mrw}}$ , la cual se calcula utilizando una masa molecular por residuo medio, determinada por la secuencia de aminoácidos de acuerdo a la relación:

$$[\theta]_{\text{mrw}} = \frac{100 \cdot \theta}{c \cdot l} \quad (\text{grados cm}^2 \text{ decimol}^{-1}) \quad (2)$$

donde

$[\theta]_{mrw}$  = elipticidad molar por residuo.

$\theta$  = elipticidad en grados.

$c$  = concentración molar por residuo.

$l$  = longitud de recorrido óptico en cm.

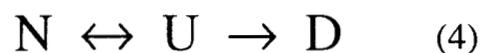
### 2.3 MODELOS DE DOS ESTADOS

El desplegamiento de ciertas proteínas no existe en estado de equilibrio, por lo que es necesario la aplicación de modelos irreversibles. La desnaturalización irreversible de una proteína puede ajustarse a dos modelos de primer orden. El primero de ellos es el modelo de dos estados



en este modelo no hay formación de intermediarios estables.

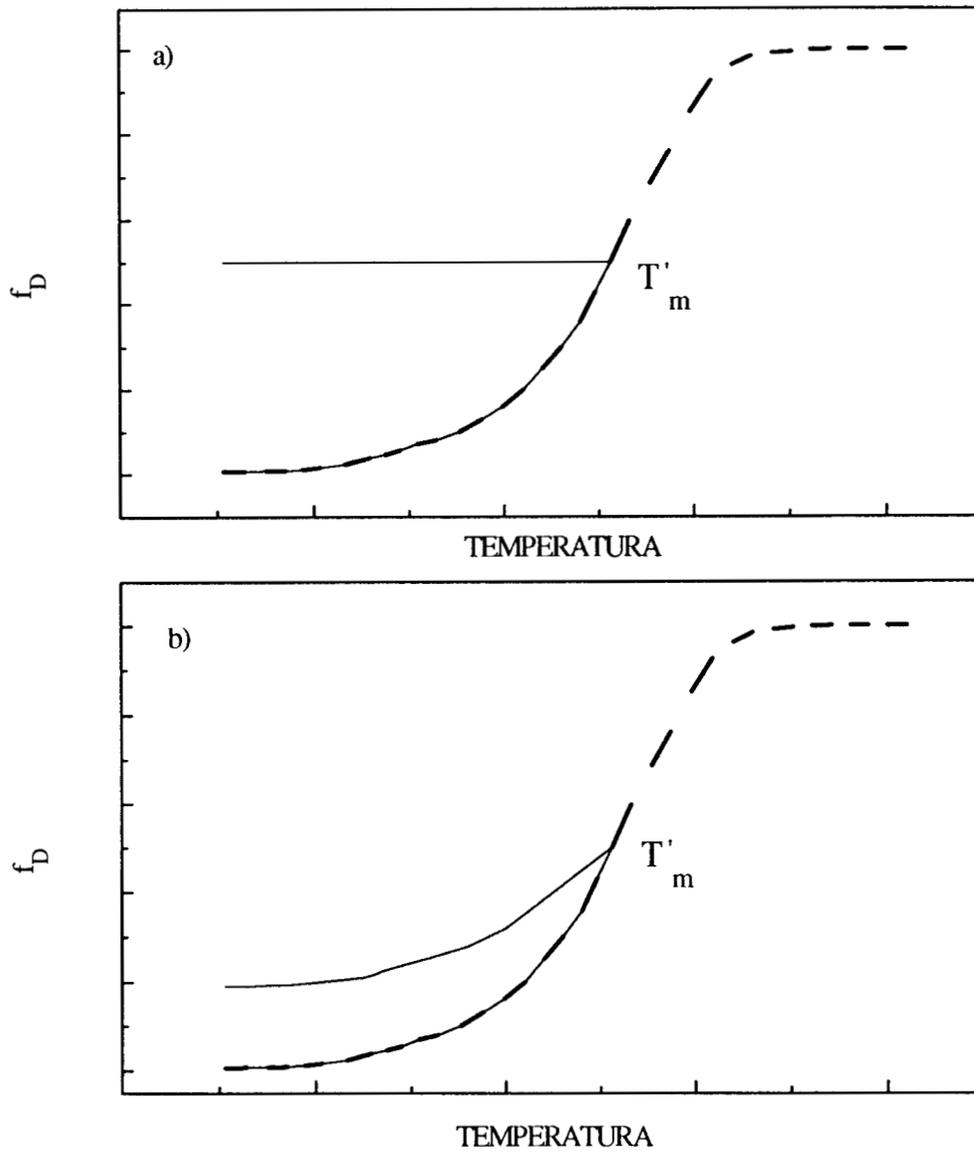
El segundo modelo es el de Lumry-Eyring [42]



Donde N es el estado nativo de la proteína, U la conformación desplegada y D el estado irreversiblemente desnaturalizado. En este modelo, el desplegamiento de las proteínas involucra por lo menos dos etapas, la

primera es un desplegamiento reversible de la proteína nativa N, y la segunda una alteración irreversible de la proteína desplegada U, que produce un estado final D incapaz de volver al estado nativo [43, 44].

En el modelo de Lumry-Eyring, en consecuencia, para determinadas condiciones, el desplegamiento será parcialmente reversible [45], en particular un calentamiento a velocidad de barrido constante, seguido de un rápido enfriamiento en las cercanías de la temperatura de transición ( $T'_m$ ), antes de que concluya la transición, y regresando a la temperatura inicial, indicará que modelo describe mejor el proceso. Si este se ajusta a un modelo de dos estados, la señal permanecerá inalterable (figura 2a) [44]; por el contrario, si se ajusta al modelo de Lumry-Eyring, la señal tenderá a regresar, al menos parcialmente, a su valor inicial (figura 2b) [46].

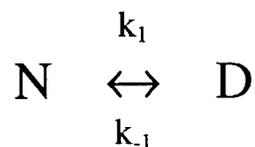


**Figura 2.** Calentamiento de una proteína a velocidad de barrido constante hasta una temperatura inferior a la  $T'_m$ , y enfriamiento subsecuente. a) Modelo de dos estados. b) Modelo de Lumry-Eyring. En ambas figuras la línea punteada representa la transición completa cuando no se aplica un enfriamiento.

## 2.4 CINÉTICAS DEL MODELO DE DOS ESTADOS

Considerable información puede ser obtenida de estudios cinéticos, donde el proceso de desplegamiento depende del tiempo.

El plegamiento y desplegamiento de las proteínas son procesos intramoleculares. Por tanto, las cinéticas de esas reacciones pueden ser descritas en términos de ecuaciones de primer orden. Esto significa que la concentración de una especie dada es descrita por una suma de uno o más términos exponenciales. Si se considera que se trata de un modelo simple de dos estados, se asume que inicialmente sólo proteína nativa o sólo proteína desnaturizada ésta presente, para la reacción



la ecuación de velocidad es

$$\frac{-d(N)}{dt} = k_1(N) - k_{-1}(D) \quad (5)$$

o

$$\frac{-df_N}{dt} = k_1 f_N - k_{-1} f_D$$

donde  $k_1$  y  $k_{-1}$  son las constantes de velocidad de desplegamiento y plegamiento, respectivamente. Definiendo  $f_N = f_N^{eq} + \Delta f_N$  y  $f_D = f_D^{eq} + \Delta f_D$ , siendo  $\Delta f$  las desviaciones del equilibrio [41], se obtiene

$$\frac{-df_N}{dt} = (k_1 + k_{-1}) f_N$$

con  $\Delta f_N = -\Delta f_D$ , y cumpliéndose la condición de equilibrio  $k_1 f_N^{eq} = k_{-1} f_D^{eq}$ . La solución a la ecuación es

$$\Delta f_N = \Delta f_N^0 e^{-\lambda t}$$

donde  $\lambda = k_1 + k_{-1}$ , y  $\Delta f_N^0$  es el valor de  $\Delta f_N$  a  $t = 0$

En general si se mide una propiedad física ( $y$ ), donde

$$y = f_N y_N + f_D y_D$$

es conveniente trabajar con los valores de  $\Delta y$ , donde

$$\Delta y = y - y^{eq} = y_N \Delta f_N + y_D \Delta f_D = \Delta y_0 e^{-\lambda t}$$

obteniéndose

$$\frac{\Delta y}{\Delta y_0} = e^{-\lambda t}$$

$$\Delta y = \Delta y_0 e^{-\lambda t} \quad (6)$$

$$\ln \Delta y = \ln \Delta y_0 - \lambda t \quad (7)$$

Esta ecuación indica que la gráfica de  $\ln \Delta y$  contra  $t$  debe ser lineal, y la inclinación de la recta debe ser independiente de las condiciones iniciales, si se cumple esto se trata de un modelo de dos estados [41].

Cuando la gráfica de  $\ln \Delta y$  contra  $t$  es bifásica, no se puede aplicar el modelo simple de dos estados ya que, ésto sugiere que la reacción de desdoblamiento ocurre probablemente en dos etapas [41].

Cuando no es posible detectar la señal de elipticidad en el dicroísmo circular en el tiempo cero, es decir cuando la proteína se encuentra nativa, se puede realizar una extrapolación de  $(y)$  a  $t = 0$ . Utilizando la ecuación (6)

$$\Delta y = \Delta y_0 e^{-\lambda t}$$

o

$$y' - y^{\text{eq}} = \Delta y_0 e^{-\lambda t}$$

donde  $y'$  es la señal de elipticidad a  $t = 0$

$$y' = \Delta y_0 e^{-\lambda t} + y^{\text{eq}}$$

pero a  $t = 0$

$$y' = \Delta y_0 + y^{eq} \quad (8)$$

Con la ecuación (8) podemos comprobar si existe una fase rápida en los primeros minutos de mezclado, ya que el punto obtenido con esta ecuación a  $t = 0$  debe coincidir con el valor que se obtenga de la curva de transición al intersectar la señal de elipticidad en el estado nativo ( $\theta_N$ ) con la temperatura a la cual se realizó la cinética.

La constante de velocidad ( $k$ ) del desplegamiento se expresa como

$$k = \frac{k_B T K^*}{h} \quad (9)$$

pero  $\Delta G^* = -RT \ln K^*$ , donde  $K^*$  es la constante de pseudoequilibrio para el estado activado

$$k = \left( \frac{k_B T}{h} \right) e^{-\Delta G^* / RT} \quad (10)$$

donde  $k_B$ ,  $h$  y  $R$  son las constantes de Boltzmann, Planck y de los gases, respectivamente, considerando  $\Delta G_U^* = \Delta H_U^* - T\Delta S_U^*$ , se llega a la ecuación (11)

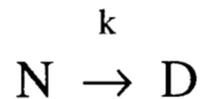
$$\ln \frac{k}{T} = \ln \left( \frac{k_B}{h} \right) - \frac{\Delta G^*}{RT}$$

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \left( \frac{k_B}{h} \right) - \frac{\Delta H_U^*}{RT} + \frac{\Delta S_U^*}{R} \quad (11)$$

La entalpía de activación,  $\Delta H_U^*$ , y la entropía de activación,  $\Delta S_U^*$ , se calculan de los datos experimentales que resultan de graficar  $\ln(k/T)$  contra  $1/T$  (gráfica de Eyring) para la cinética de desnaturalización [18, 44, 47].  $\Delta H_U^*$  será constante en todo el intervalo del gráfico, si la pendiente del mismo es constante y por lo tanto se obtiene una línea recta, indicando que  $\Delta H_U^*$  es independiente de la temperatura.

## 2.5 MODELOS PARA PROCESOS IRREVERSIBLES.

La desnaturalización térmica de muchas proteínas es irreversible. Para explicar los cambios ocurridos en dicho proceso se ha utilizado el modelo de dos estados:



siendo  $k$  la constante de velocidad de primer orden, que cambia con la temperatura según la ecuación de Arrhenius:

$$k = A \exp\left(\frac{-E}{RT}\right) \quad (12)$$

o en su forma logarítmica

$$\ln k = \ln A - \left(\frac{E}{RT}\right) \quad (13)$$

La ecuación (13) representa la forma de una línea recta, donde  $A$  es el factor pre-exponencial y  $E$  la energía de activación.

De ésta forma, de la pendiente y la ordenada al origen se pueden obtener, respectivamente, los valores de la energía de activación,  $E$ , y el factor pre-exponencial,  $A$ .

Sánchez-Ruiz et al. [48] derivaron varios métodos para calcular la energía de activación del proceso a partir del análisis de curvas calorimétricas. Dos de estos métodos pueden ser adaptados para utilizar la información de los estudios por difracción circular [49].

El primer caso involucra la fracción de proteína en el estado nativo ( $f_N$ ). Para cada curva de transición  $f_N$  puede ser expresada como una función de la temperatura,  $T$ , de acuerdo a

$$\ln \left[ \ln \left( \frac{1}{f_N} \right) \right] = \left( \frac{E}{R} \right) \left( \frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \quad (14)$$

o

$$\ln \left[ \ln \left( \frac{1}{f_N} \right) \right] = \left( \frac{E}{RT_m} \right) - \left( \frac{E}{RT} \right) \quad (15)$$

La ecuación (15) representa una línea recta, donde del valor de la pendiente se obtiene  $E$  y del valor de la ordenada al origen obtenemos la temperatura media,  $T_m$ , para el proceso.

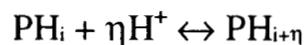
El segundo método relaciona la temperatura media,  $T_m$ , de la curva de transición del estado nativo al estado desnaturizado, con la velocidad de calentamiento,  $v$ , ecuación (16):

$$\ln \left( \frac{v}{T_m^2} \right) = \left[ \ln \frac{AR}{E} - \frac{E}{RT_m} \right] \quad (16)$$

donde A es el factor pre-exponencial de la ecuación de Arrhenius. Por lo que, a partir de un gráfico del  $\ln (v/T_m^2)$  en función de  $1/T_m$ , se obtendrá una línea recta con pendiente igual a  $(-E/R)$ .

## 2.6 TITULACIÓN POTENCIOMÉTRICA.

Una curva de titulación, estrictamente hablando de una curva de titulación de iones hidrógeno, representa la relación entre pH y el número de moles de protones enlazados por 1 mol de proteína en la reacción.



Donde  $PH_i$  representa una especie de proteína en el comienzo de la titulación y  $\eta H^+$  es el número de iones de hidrógeno enlazados por la proteína [50]. Los valores experimentales de  $\eta$  son obtenidos como la diferencia entre el número de moles de ácido adicionados a una solución que contiene un mol de proteína, llevando su pH de un valor inicial a uno final y el número de moles de ácido adicionados al disolvente sin proteína [50].

El número de grupos protonados ( $\eta H^+$ ) en la caricaína durante la titulación se calculó con la siguiente fórmula:

$$\eta H^+ = \frac{n_p}{n_{\text{prot}}} \quad (17)$$

Donde  $\eta H^+$  = número de grupos protonados en la proteína.

$n_p$  = número de moles de protones enlazados por la proteína.

$n_{\text{prot}}$  = número de moles de proteína.

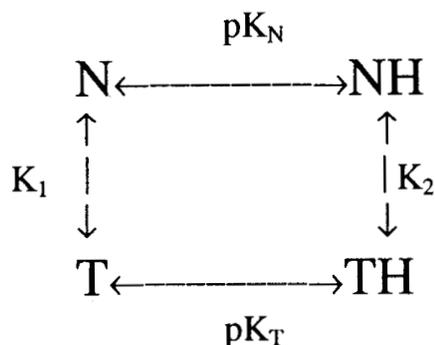
Pero

$$n_p = n_a - (n_f - n_i)$$

Donde  $n_a$  representa el número de moles de protones agregados a la solución de referencia (solución sin proteína),  $n_i$  es el número de moles de protones presentes en la solución de proteína al inicio de la titulación y  $n_f$  es el número de moles de protones en la solución de proteína en cada punto de la titulación. Tanto  $n_a$  como  $n_f$  cambian durante la titulación, dependiendo de la cantidad de ácido agregado.

Podemos apreciar cualitativamente la variación de la estabilidad de proteínas con el pH, analizando la figura 3, en la que se considera la diferencia entre dos estados, el nativo, N, y el nativo protonado, NH, es decir, a un valor de pH más bajo. Se supone, que la proteína contiene un solo tipo de residuo protonable, por ejemplo un Asp. Cada uno de los estados mencionados

alcanzará, en el proceso de desplegamiento, un estado de transición T y TH, respectivamente [44].



**Figura 3.** Transición de dos estados de una proteína hipotética.

$K_1$  es una constante de pseudoequilibrio entre el estado nativo N y el de transición T.  $pK_N$  y  $pK_T$  son el logaritmo negativo de las constantes de disociación del residuo protonable, definidas para el estado nativo y el de transición respectivamente. Estas últimas constantes tendrán, en general, valores distintos, pues en el estado de transición se modificará parcialmente la estructura terciaria y, por tanto, las distancias entre los distintos residuos [44].

En el estado desplegado donde la cadena polipeptídica se encuentra completamente expuesta al disolvente, la separación espacial de los residuos es máxima, de modo que el agua del medio bloquea las interacciones residuo-residuo. Por lo tanto, el valor del pKa del Asp en el estado desplegado es probablemente similar al del aminoácido aislado en agua. En el estado nativo de la proteína, por el contrario, donde el Asp ocupa un lugar específico e interactúa con otros residuos, el valor de ( $pK_N$ ) puede diferir del valor de pKa del Asp aislado en agua.

Para el ciclo termodinámico descrito anteriormente se puede calcular una constante de equilibrio aparente  $K^*_{app}$ , que depende de las concentraciones de los estados de transición (T y TH) y de los estados nativos (N y NH), y que se puede expresar como

$$K^*_{app} = \frac{[T] + [TH]}{[N] + [NH]}$$

La correspondiente dependencia del sistema de la figura 3 con el pH cae en tres regiones y su conducta se puede estudiar separadamente:

A valores de pH más altos que el  $pK_T$  el residuo se encuentra ionizado tanto en el estado nativo como en el de transición, por lo que el equilibrio es determinado por  $K_1$ .

$$K^*_{app} = \frac{[T]}{[N]} = K_1$$

A valores de pH más bajos que el  $pK_T$  pero más altos que el  $pK_N$  el aspártico se encuentra protonado (neutro) en el estado de transición pero permanece ionizado en la proteína nativa.

$$K^*_{app} = \frac{[T] + [TH]}{[N]}$$

Por lo que la  $K^*_{app}$  aumentará, provocando que la velocidad de desnaturalización aumente.

Finalmente a valores de pH abajo de  $pK_N$  ambos estados son neutros, el equilibrio es determinado por  $K_2$ .

$$K^*_{app} = \frac{[TH]}{[NH]} = K_2$$

Los factores que contribuyen a los cambios de pKa en los diferentes estados de la proteína son de origen electrostático [6, 51], y entre otros esta la interacción del Asp con otros residuos ionizados de la proteína. Lo que provocará que las cargas positivas cercanas tiendan a disminuir su pKa, mientras que las negativas lo harán aumentar.

# **Capítulo 3**

## **Desarrollo Experimental**

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 3.1 MATERIALES

Para estos experimentos se utilizó quimopapaína parcialmente purificada (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A). Se aisló la caricaína por cromatografía líquida de intercambio catiónico de alta resolución (HPLC) [52]. Antes de purificarla se inhibió irreversiblemente el sitio activo con iodoacetamida, con el objeto de evitar la autólisis. Después de la purificación se liofilizó la caricaína.

#### 3.2 DICROÍSMO CIRCULAR

Se utilizó un espectropolarímetro JASCO J- 500A con celda de 1 mm y 1 cm de trayectoria óptica, para la región del UV lejano y del UV cercano, respectivamente, con chaqueta de circulación de agua conectada a un baño térmico HAAKE NK-22. Para registrar la temperatura en la celda óptica se utilizó un termómetro digital COLE-PARMER 8402-20.

Para estudiar el efecto de la temperatura en la cinética de desnaturalización de la caricaína a diferentes valores de pH y diferentes temperaturas, se colocaron en la celda óptica 2.0 mL de regulador de glicina 0.05 M con valores de pH en el intervalo de 2.0 a 3.9, y se permitió que se estabilizara la temperatura. Posteriormente, se inyectaron 0.2 mL de una solución concentrada de caricaína para obtener una concentración final de entre 0.13 y 0.15 mg/mL y se observó la variación de la señal de elipticidad a

220 nm. La concentración de caricaína se calculó espectrofotométricamente, utilizando como coeficiente de extinción  $A_{280\text{ nm}} = 1.83\text{ mL mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  [26, 36].

Se comprobó la irreversibilidad del proceso de desnaturalización de la caricaína, realizando transiciones de desplegamiento: una muestra de proteína a una concentración final de 0.15 mg/mL, en regulador de glicina 0.05 M y a pH 2.5, se calentó con una velocidad de barrido de 1 °C/min hasta una temperatura  $T'_m$  de 52.0 °C, en la cual se había completado aproximadamente la mitad de la transición. Luego se enfrió rápidamente la muestra hasta su temperatura inicial (20.0 °C). El cambio de la señal de dicroísmo circular se siguió a 220 nm.

Se realizaron estudios sobre la pérdida de estructura secundaria y terciaria de la proteína utilizando un espectropolarímetro JASCO modelo J-715 con celda de 1 cm de trayectoria óptica y un sistema de control de temperatura tipo PELTIER, modelo PTC-348WI.

Para estudiar el proceso de desplegamiento de las estructuras secundaria y terciaria se realizaron cinéticas de desnaturalización en regiones espectrales distintas. Las condiciones a las cuales se trabajó fueron: regulador de glicina 0.05 M, pH 2.5 y temperatura de 51.3 °C. Para ambas regiones se utilizó una celda de 1 cm de recorrido óptico. El proceso de desplegamiento de la estructura secundaria se siguió a una longitud de onda de 220 nm y una concentración final de la proteína de 0.028 mg/mL. En la región de los residuos de tipo aromáticos (UV cercano) se empleó una longitud de onda de 278 nm y una concentración final de la proteína de 0.50 mg/mL.

### 3.3 TITULACIÓN POTENCIOMÉTRICA

Para la titulación de caricaína se utilizó un potenciómetro CORNING, pH/ion analyzer 350 y la temperatura se controló con un sistema tipo PELTIER, modelo PTC-348WI.

Se preparó una muestra de caricaína a una concentración de 4.0 mg/mL, la cual se dializó contra una solución de NaCl 0.1 M. Posteriormente, 2.0 mL de la enzima a pH 4.75 se titularon adicionando alícuotas de 5.0  $\mu$ L de HCl 0.1 M, con agitación constante y manteniendo la temperatura a 25.0 °C. Se registraron los cambios en el pH, hasta un valor de 2.0.

# **Capítulo 4**

## **Resultados y discusión**

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

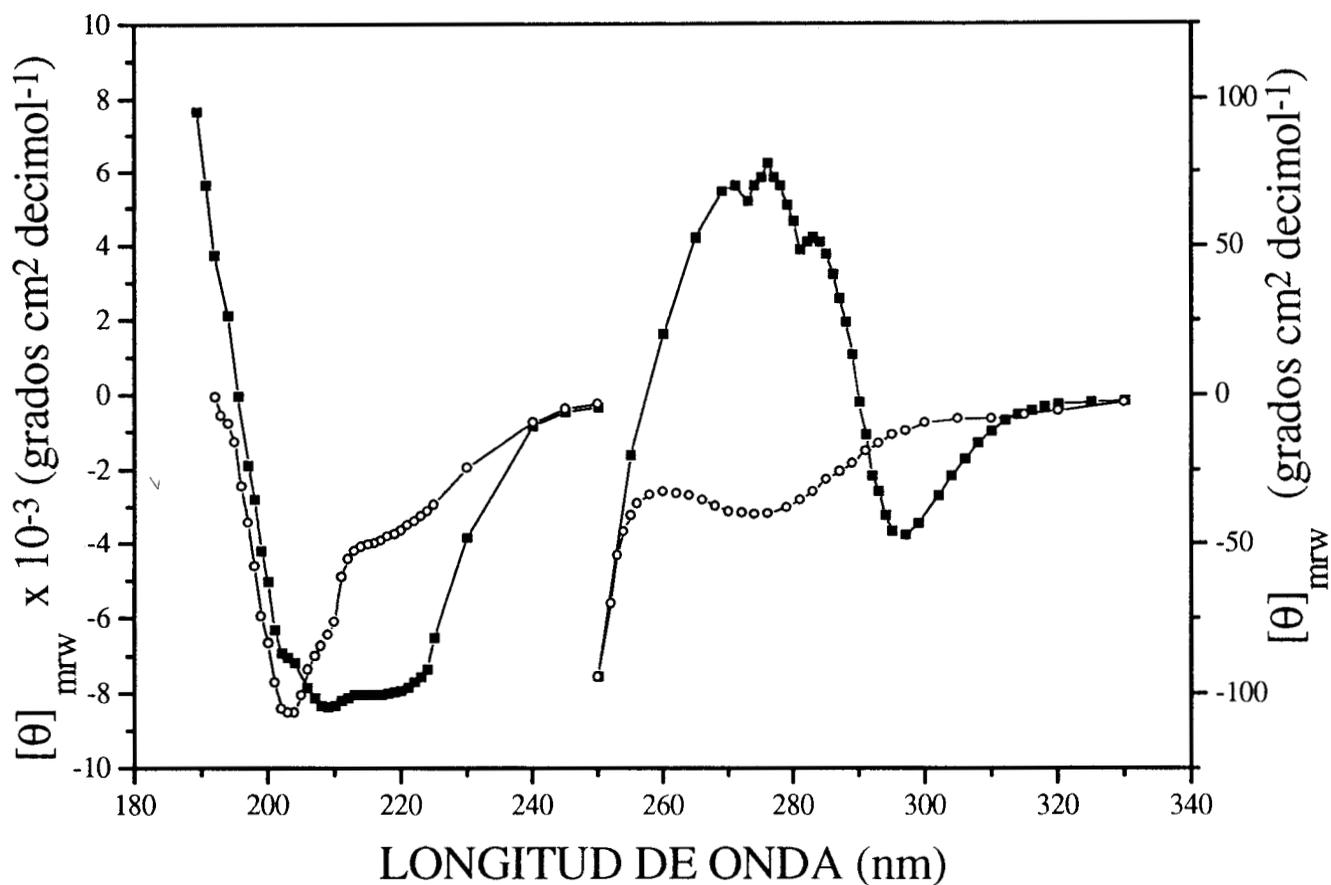
### 4.1 ESPECTROS NATIVO Y DESNATURALIZADO

En la figura 4 se muestran los espectros de DC en las regiones del UV lejano y el UV cercano.

El espectro de dicroísmo circular de la caricaína en la región del UV lejano (190-260 nm) tiene las siguientes características [34]:

1. Una banda positiva centrada en 185-186 nm.
2. Una señal negativa alrededor de 200 nm la muestran como un hombro o como un pico pequeño.
3. El extremo negativo a 208 nm es mayor en magnitud que la banda a 220-222 nm.

Considerando las características espectrales, la caricaína pertenece a la clase de proteínas  $\alpha+\beta$ , cuyos miembros presentan regiones separadas ricas en hélice  $\alpha$  y hojas  $\beta$  [34, 53].



**Figura 4.** Espectros de dicroísmo circular de curcumina nativa y desnaturada en regulador de glicina 0.05 M, pH 2.5, en la región del UV lejano (200-250 nm) a 19.6 (■) y 82.6 °C (o) y en la región del UV cercano (250-320 nm), a 20.0 (■) y 82.5 °C (o).

Los espectros de la estructura nativa concuerdan con la forma de los espectros reportados para esta enzima [34]. Para la región del UV lejano, (200 - 250 nm) a temperatura alta se observa un mínimo alrededor de 200 nm y la señal a 220 nm casi se pierde, lo que indica la aparición de estructuras desordenadas en la cadena polipeptídica.

Para la región del UV cercano, (250 – 320 nm) a 20.0 °C se observa la presencia de una banda negativa ancha centrada de 297 a 298 nm, se tiene referencia de que esta banda es una característica común en las proteinasas del látex de papaya [34]. Ya que en esta longitud de onda los residuos de tirosina y fenilalanina no contribuyen a los espectros de DC en las proteínas [54, 55], esta banda negativa probablemente se origina de residuos de triptofano localizados en ambientes asimétricos que son similares en cada una de las proteinasas [34]. También se observa un máximo alrededor de 280 nm, esto se debe a que los residuos aromáticos (triptofano, tirosina y fenilalanina) absorben luz significativamente a esta longitud de onda. Al aumentar la temperatura, la señal de elipticidad alrededor de 280 nm disminuye, lo que indica que hay pérdida de estructura terciaria.

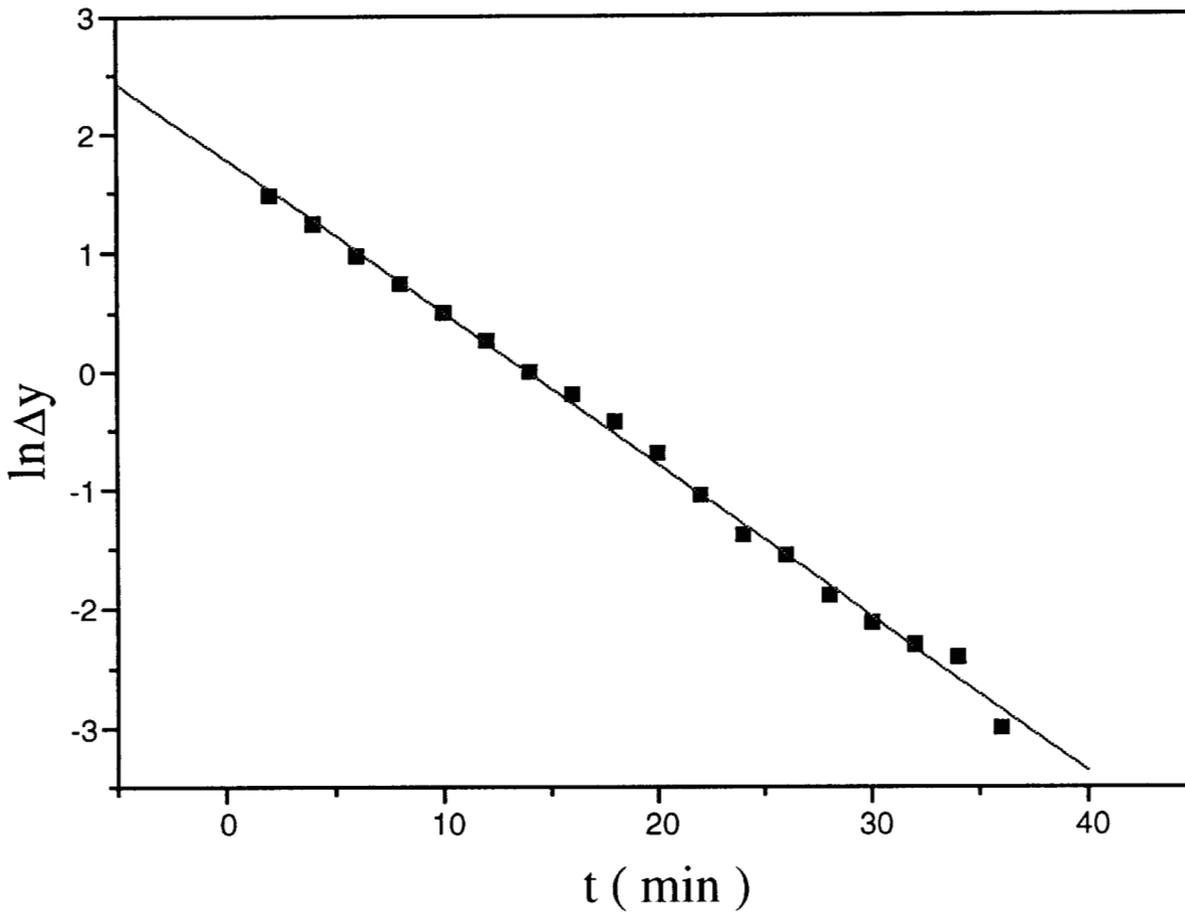
#### 4.2. DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA DE LA CARICAÍNA POR DICROISMO CIRCULAR

Para comprobar el modelo al que se ajusta el proceso de desnaturalización de la caricaína se analizaron las cinéticas de desnaturalización a valores de pH entre 2.0 y 3.9 a diferentes temperaturas, como se observa en la tabla IV. Se realizaron gráficas de  $\ln \Delta y$  contra  $t$ , la

gráfica obtenida para un pH de 2.5 y una temperatura de 51.8 °C se representa en la figura 5.

**TABLA IV.** Intervalo de pH y temperatura para las cinéticas de desnaturalización de caricaína.

<b>pH</b>	<b>INTERVALO DE TEMPERATURA (°C)</b>
2.0	32.1 a 42.0
2.2	40.1 a 53.0
2.5	35.2 a 56.2
2.9	60.1 a 68.9
3.2	66.3 a 74.0
3.5	72.3 a 79.9
3.9	74.8 a 81.5



**Figura 5.** Gráfica de  $\ln \Delta y$  contra el tiempo para la desnaturalización de caricaína en regulador de glicina 0.05 M, pH 2.5 y temperatura de 51.8 °C

Con los valores de las pendientes que resultan de este tipo de gráficas se obtuvieron las constantes de velocidad de desnaturalización, ecuación (7), para el intervalo de temperatura en los pH mencionados anteriormente. Los

valores de las constantes de velocidad de desnaturalización para un pH de 2.5 se dan en la tabla V.

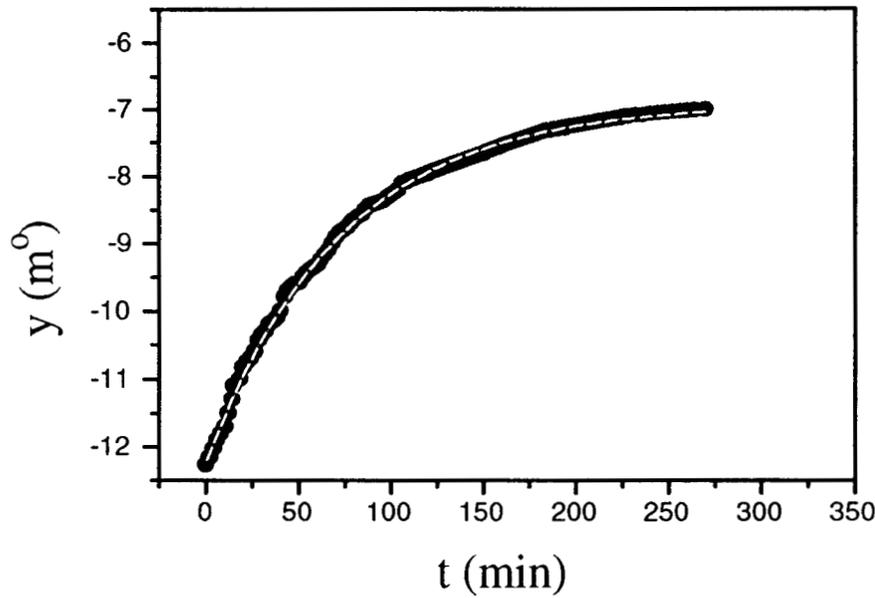
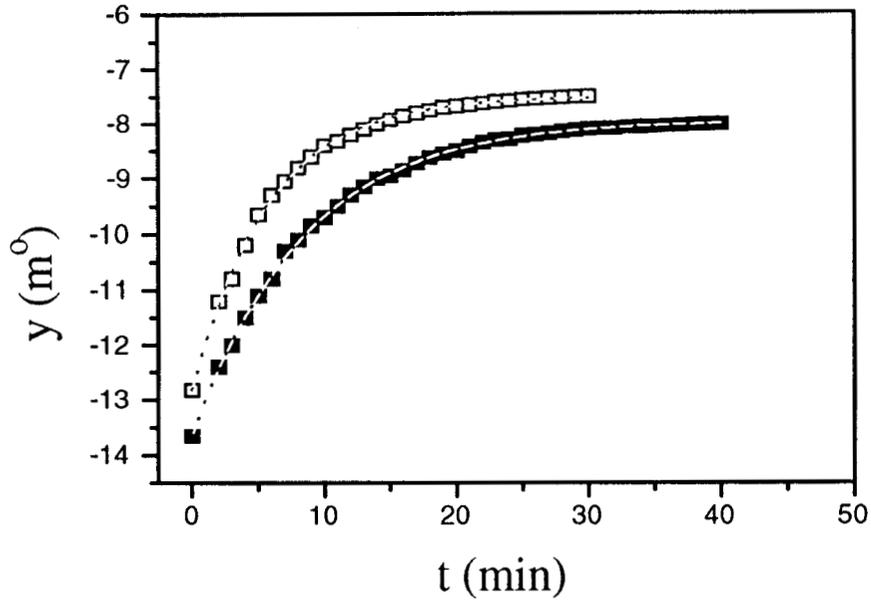
**TABLA V.** Constantes de velocidad de desnaturalización para la caricaína a un pH de 2.5.

pH 2.5		
TEMPERATURA (°C)	k (min <sup>-1</sup> )	σ
56.2	0.18286	0.00676
51.8	0.07307	0.00181
50.2	0.03990	0.00134
47.2	0.01586	0.0004107
44.1	0.00543	0.0001223
40.0	0.0008029	8.178X10 <sup>-5</sup>
35.2	0.0001341	1.889X10 <sup>-6</sup>

Donde  $\sigma$  representa la desviación estándar de la constante de velocidad k en minutos.

Las gráficas de  $\ln \Delta y$  contra  $t$  son lineales, como lo muestra la figura 5, lo que significa que el proceso de desnaturalización se ajusta a un modelo de dos estados.

Sin embargo, durante el mezclado de la proteína, existe un tiempo muerto de dos minutos, tiempo en el cual podría existir una fase rápida, por lo que se realizó la extrapolación de la gráfica de  $(y)$  contra el tiempo a  $t = 0$ , ecuación (8). Los valores de la elipticidad que se obtuvieron de la extrapolación para pH 2.5 y temperaturas de 56.2, 51.8 y 47.2 °C fueron -12.82, -13.66 y -12.27 m°, respectivamente, lo que indica que no existe una etapa rápida que involucre un cambio estructural considerable en los primeros minutos de mezclado (figura 6). Por tanto, podemos decir que la desnaturalización de la caricína se ajusta a un modelo de dos estados  $N \rightarrow D$ , y que es un proceso monofásico.



**Figura 6.** Cinéticas de desnaturalización térmica de caricaína a pH 2.5 y diferentes temperaturas: 56.2 °C ( $\square$ ), 51.8 °C ( $\blacksquare$ ) y 47.2 °C ( $\bullet$ ). La línea punteada (-----) representa el ajuste y extrapolación de los datos de la gráfica de  $y$  contra  $t$  con una función exponencial sencilla, ecuación (8).

### 4.3 DESNATURALIZACIÓN IRREVERSIBLE

Se ha demostrado mediante estudios cinéticos en un intervalo de pH de 2.0 a 3.9, y diferentes temperaturas, que la desnaturalización de la caricaína se ajusta a un modelo de dos estados. En la figura 7 se muestra la curva de la transición que resulta del calentamiento de la proteína a una velocidad de calentamiento constante de 1 °C/min, hasta una temperatura de 80.8 °C, también se muestra la curva del calentamiento de la proteína hasta una temperatura máxima de 52.0 °C, seguida de un rápido enfriamiento, hasta una temperatura de 20.0 °C.

La forma que presenta la curva de la transición completa que se muestra en la figura 7, sugiere que no hay formación de intermediarios estables durante la desnaturalización de la caricaína. En la misma figura también observamos que la señal de DC a 220 nm provocada por el calentamiento y seguida de un rápido enfriamiento de la proteína, no regresa a su valor original, indicando que la desnaturalización térmica de la caricaína es irreversible. En la sección 4.2 se comprobó que la desnaturalización de la caricaína se ajusta a un modelo de dos estados, por lo que podemos decir que durante el proceso de desnaturalización no existe un estado intermediario U desplegado reversiblemente en equilibrio con la proteína nativa.

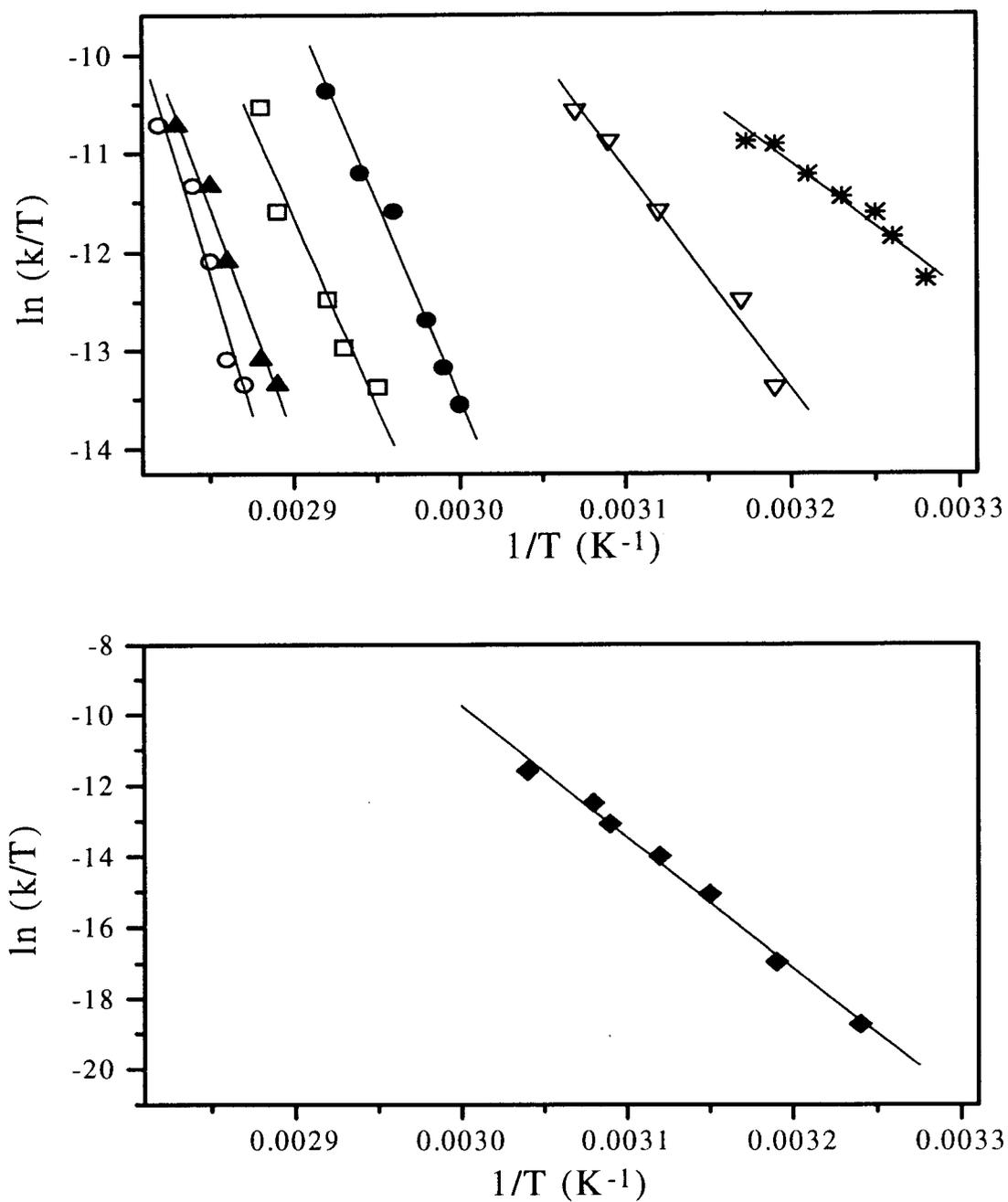


#### 4.4 PARÁMETROS DE ACTIVACIÓN

A partir de los valores de las constantes de velocidad de desnaturalización para cada valor de pH se construyeron gráficas de  $\ln(k/T)$  contra  $1/T$  (gráficas de Eyring), en la figura 8 se muestran las gráficas de Eyring para varios valores de pH. La gráfica de Eyring para el valor de pH 2.5, se graficó por separado, ya que el intervalo de temperatura que se trabajó fue muy amplio, pero a pesar de eso se sigue observando una línea recta, es decir, la pendiente del gráfico es constante, indicando que  $\Delta H^*$  no depende de la temperatura en el intervalo del gráfico.

Con los valores de la pendiente y la ordenada al origen obtenidos de las gráficas de Eyring, se calcularon  $\Delta H^*$  y  $\Delta S^*$  para cada valor de pH, ecuación (11), los valores obtenidos se dan en la tabla VI.

Se observó que existe una gran dependencia de estos parámetros con el pH, ya que  $\Delta H^*$  y  $\Delta S^*$  aumentan conforme aumenta el pH. Debido a que a pH's más altos hay menos cargas positivas en el medio que provoquen el desplegamiento de la proteína, es necesario aplicar mayor calor para activar sus moléculas, por lo tanto el desorden de las estructuras de la cadena polipeptídica aumenta.



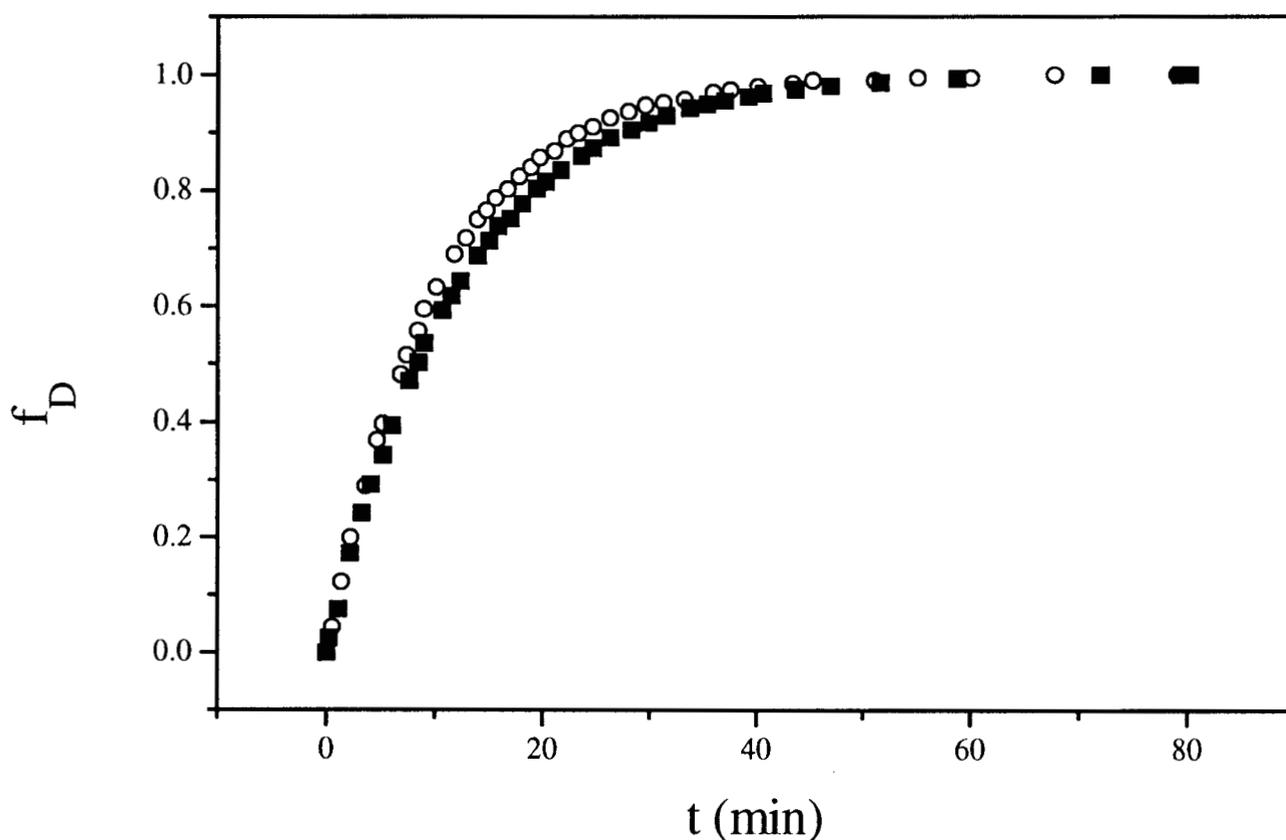
**Figura 8.** Gráficas de Eyring para la desnaturalización de caricaína en regulador de glicina 0.05 M, a varios valores de pH: (o) 3.9, (▲) 3.5, (□) 3.2, (●) 2.9, (◆) 2.5, (▽) 2.2 y (\*) 2.0.

**TABLA VI.** Entalpía y entropía de activación de caricaína a diferentes valores de pH.

pH	ENTALPÍA DE ACTIVACIÓN	ENTROPÍA DE ACTIVACIÓN
	$\Delta H^*$ (kJ/mol)	$\Delta S^*$ (J/Kmol)
2.0	108.90	58.57
2.2	186.19	286.66
2.5	301.58	625.52
2.9	331.92	686.19
3.2	354.39	732.21
3.5	388.70	811.71
3.9	400.83	836.82

#### 4.5 ESTRUCTURAS SECUNDARIA Y TERCIARIA.

En la figura 9 se muestran las cinéticas de desnaturalización de la caricaína, siguiendo los cambios de la elipticidad a 220 nm y 278 nm, a la misma temperatura y valor de pH. Con esas cinéticas fue posible calcular las constantes de velocidad para los dos procesos. Los resultados se muestran en la tabla VII.



**Figura 9.** Cinéticas de desnaturalización térmica de caricaína en regulador de glicina 0.05 M a 51.0 °C y pH 2.5. La desnaturalización se siguió en la región del UV lejano a 220 nm (o) y en la región del UV cercano a 278 nm (■).

**TABLA VII.** Comparación de las constantes de velocidad de la caricaína en la región del UV cercano (278 nm) y UV lejano (220 nm) a 51.0 °C y pH 2.5.

pH 2.5	
$k_{\text{aro}} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{pep}} \text{ (min}^{-1}\text{)}$
0.083	0.098

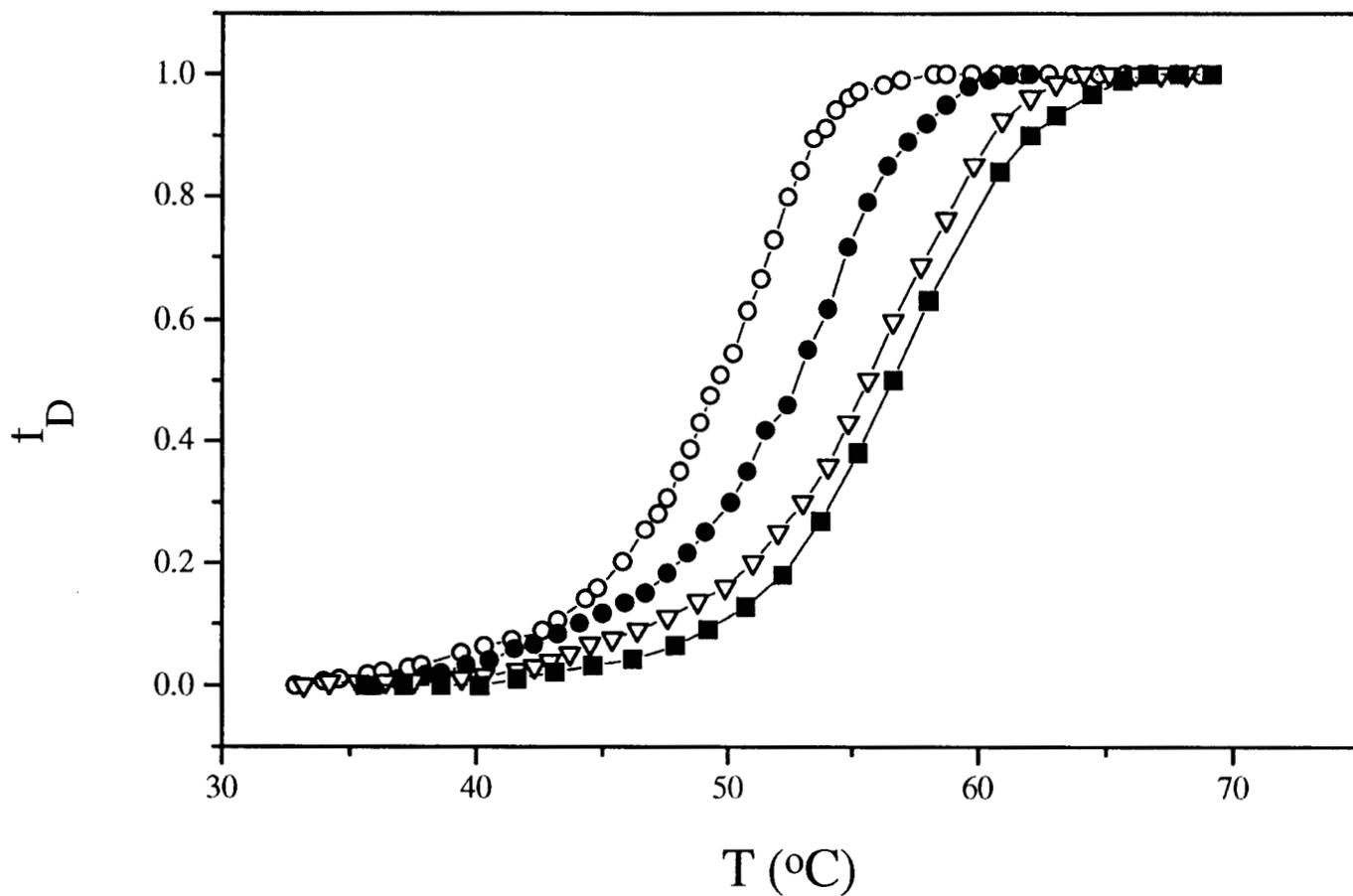
Ya que los valores de las constantes de velocidad que aparecen en la tabla VII son muy parecidos, podemos decir que no hay más de una etapa en el proceso de desnaturalización y que la pérdida de estructura secundaria y terciaria durante este proceso se presenta casi al mismo tiempo, es decir, que los enlaces se modifican simultáneamente de manera cooperativa, lo que favorece el paso de la configuración nativa a la desplegada.

#### 4.6 EFECTO DE LA VELOCIDAD DE CALENTAMIENTO EN LA DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA

En la figura 10 se muestran las curvas de transición térmica seguidas a diferentes velocidades de calentamiento, por monitoreo de la señal de elipticidad a 220 nm.

Las curvas de la figura 10 nos confirman que el proceso de desnaturalización de la caricaína es irreversible, pues las rutas de desplegamiento a diferentes velocidades de calentamiento no son las mismas; es decir, la transición de la desnaturalización depende de la velocidad de calentamiento, y esto es característico de los procesos de desplegamiento que se encuentran bajo control cinético, debido a la presencia de una reacción irreversible [45, 56, 57]. Por lo tanto la proteína no puede regresar a su estructura original.

En la tabla VIII se muestran los valores para la velocidad de calentamiento y la temperatura media de cada transición de la figura 10, (sección 2.5).



**Figura 10.** Curvas de transición térmica de la caricaína en regulador de glicina 0.05 M a pH 2.5. Las curvas de transición se obtuvieron a diferentes velocidades de calentamiento: 0.1(o), 0.3 (●), 1.0 (▽) y 1.5 (■) °C/min.

**TABLA VIII.** Velocidad de calentamiento y temperatura media de cada una de las curvas de transición de la figura 10.

<b>pH 2.5</b>	
<b>VELOCIDAD DE CALENTAMIENTO</b>	<b>TEMPERATURA MEDIA</b>
<b>v (°C /min)</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>
0.1	50.91
0.3	54.18
1.0	57.06
1.5	57.96

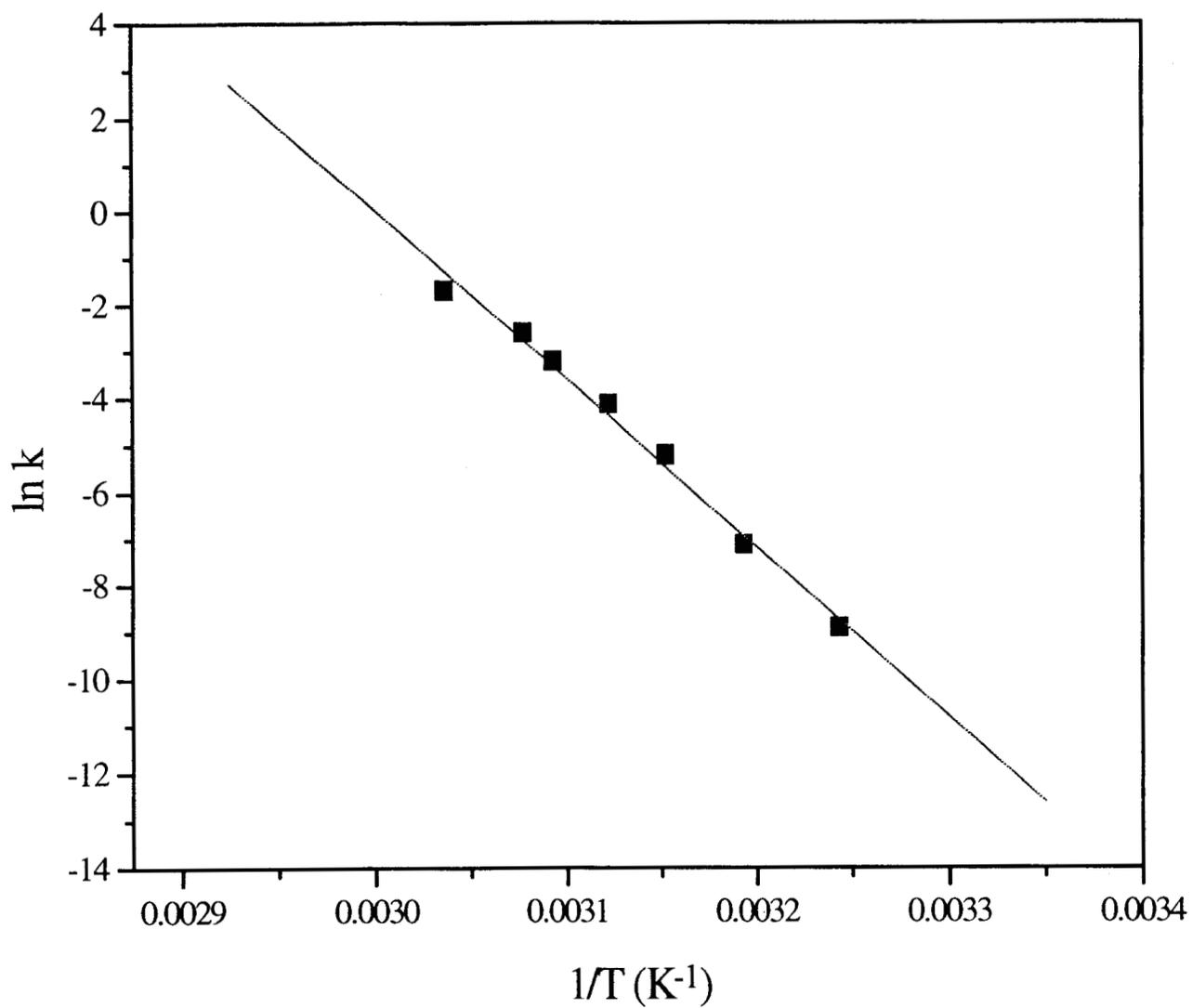
## 4.7 ENERGÍA DE ACTIVACIÓN

Como la desnaturalización térmica de la proteína es de carácter irreversible, se calculó la energía de activación con los métodos mencionados en la sección 2.5, los cuales consideran un modelo simple de dos estados ( $N \rightarrow D$ ).

Utilizando la ecuación de Arrhenius, ecuación (13) y los valores de la tabla IX, (los cuales fueron calculados de las cinéticas de desnaturalización a diferentes temperaturas), se graficó el  $\ln k$  en función de  $1/T$ , este gráfico se muestra en la figura 11. Con el valor de la pendiente obtuvimos la energía de activación para el proceso, el cual se reporta en la tabla XI.

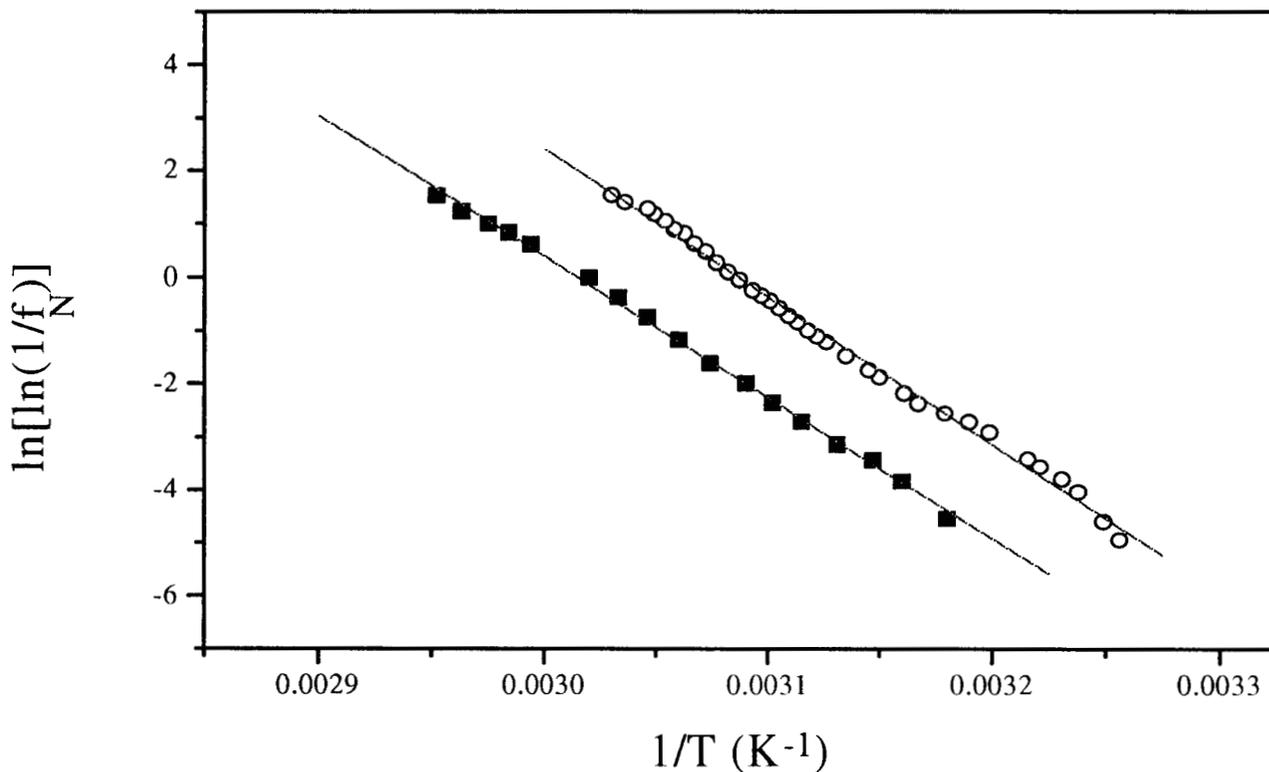
**TABLA IX.** Valores empleados en la ecuación de Arrhenius para calcular la energía de activación del proceso de desnaturalización de la proteína.

<b>pH 2.5</b>			
<b>T (°C)</b>	<b>k (min<sup>-1</sup>)</b>	<b>1/T X10<sup>-3</sup> (K<sup>-1</sup>)</b>	<b>ln k</b>
56.2	0.18286	3.036	-1.6990
51.8	0.07307	3.077	-2.6163
50.2	0.03990	3.093	-3.2214
47.2	0.01586	3.122	-4.1440
44.1	0.00543	3.152	-5.2158
40.0	0.0008029	3.193	-7.1273
35.2	0.0001341	3.243	-8.9169



**Figura 11.** Gráfica de Arrhenius para el modelo irreversible de dos estados.

Otra forma de calcular la energía de activación fue utilizar la ecuación (15). Para cada velocidad de calentamiento de la figura 10 se graficó el  $\ln[\ln(1/f_N)]$  en función de  $1/T$ ; en la figura 12 se muestra la gráfica para la velocidad de calentamiento de 0.1 y 1.5 °C/min. En la tabla X se dan los valores de  $T_m$  y  $E$  de este proceso, obtenidos para cada velocidad de calentamiento. En la tabla XI se muestra el valor promedio de estas energías de activación.

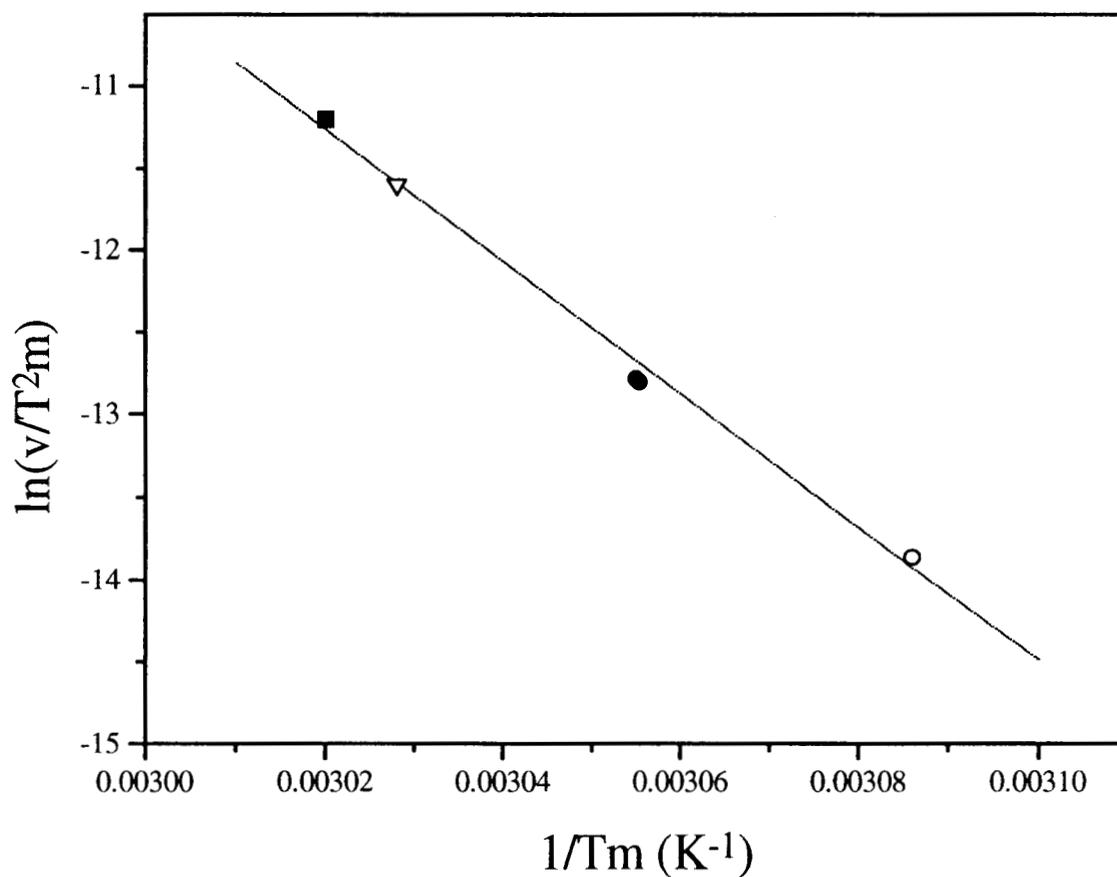


**Figura 12.** Gráfica de  $\ln[\ln(1/f_N)]$  en función de  $1/T$ , para una velocidad de calentamiento de 0.1 (o) y 1.5 (■) °C/min.

**TABLA X.** Energía de activación del proceso de desnaturalización de la caricaína a diferentes velocidades de calentamiento aplicando la ecuación (15).

<b>pH 2.5</b>			
<b>VELOCIDAD DE CALENTAMIENTO</b>	<b>TEMPERATURA MEDIA</b>		<b>ENERGÍA DE ACTIVACIÓN</b>
<b>v (°C /min)</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>m</sub> (K)</b>	<b>E (kJ/mol)</b>
0.1	50.85	323.80	231.05±0.012
0.3	53.93	327.08	211.11±0.009
1.0	57.07	330.22	208.07±0.010
1.5	58.58	331.73	220.73±0.029

Por último, con la ecuación (16) y los valores de la tabla VIII, se graficó el  $\ln(v/T_m^2)$  en función de  $1/T_m$ , figura 13, y con el valor de la pendiente se calculó la energía de activación para estas curvas de transición. El valor se da en la tabla XI.



**Figura 13.** Diagrama del  $\ln (v/T_m^2)$  en función de  $1/T_m$ . Cada punto corresponde a cada una de las cuatro curvas de transición de la figura 10: 0.1 (o), 0.3 (●), 1.0(▽), 1.5 (■) °C/min.

**TABLA XI.** Energía de activación de la desnaturalización térmica de caricaína por diferentes métodos.

pH 2.5		
MÉTODO	E (kJ/mol)	ln (A/min <sup>-1</sup> )
ln k vs. 1/T	299.82±0.035	108.19
[ln (1/f <sub>N</sub> )] vs. 1/T	217.74±0.015	-
ln (v/T <sup>2</sup> <sub>m</sub> ) vs. 1/T <sub>m</sub>	335.29±0.159	121.12

El factor pre-exponencial, A, se obtuvo de la ordenada al origen, ecuaciones (13) y (16), y representa la constante de velocidad de desnaturalización de la proteína a la temperatura a la cual se produce la intersección entre la línea obtenida y el eje Y.

En cada uno de los métodos empleados para el cálculo de la energía de activación del proceso de desnaturalización de la proteína, se observó linealidad en los diagramas, indicando que la desnaturalización térmica de la caricaína cumple con un modelo irreversible de dos estados, esto sugiere que k es una constante de velocidad de una reacción elemental.

A pesar de obtener gráficas lineales por los tres métodos, observamos en la tabla XI que los valores de la energía de activación varían, sin embargo

podemos decir que el valor que probablemente se acerca más al real es el calculado con la ecuación de Arrhenius, debido a que para emplear este método fue necesario realizar varias cinéticas de desnaturalización a diferentes condiciones experimentales, los cuales se controlaron adecuadamente; en cambio en los otros dos métodos, debido al equipo empleado, no fue factible controlar con mucha exactitud la velocidad de calentamiento.

#### 4.8 TITULACIÓN POTENCIOMÉTRICA.

La variación de los parámetros de activación con el pH puede atribuirse a diferencias en la conducta de ionización del estado nativo con respecto al estado de transición. Se estudió la titulación de grupos carboxílicos en la caricaína nativa en un intervalo de pH de 4.75 a 2.0 a una temperatura de 25.0 °C. En la tabla XII se da la composición de aminoácidos polares cargados negativamente de la caricaína. También se dan los pKa para estos aminoácidos aislados en agua [58], los cuales son parecidos a los pKa de los residuos de la proteína desplegada [6].

**TABLA XII.** Composición de aminoácidos polares cargados negativamente de la caricaína. Se indica el valor de pKa para los residuos aislados en agua [58].

AMINOÁCIDOS	CARICAÍNA	pKa
Acido Aspártico	3	3.86 (carboxilo β)
Acido Glutámico	11	4.25 (carboxilo γ)
Alanina: C-terminal	1	2.35
Total	15	

En la secuencia de aminoácidos de la caricaína aparecen 15 grupos carboxílicos, tres aspartatos, once glutamatos y la alanina del grupo C-terminal (que se indican con negritas en la tabla II), de estos grupos no todos son protonados en el intervalo de pH estudiado [50], según lo obtenido al aplicar la ecuación (17). La figura 14 muestra que a 25.0 °C alrededor de 9 protones son enlazados por la proteína en un intervalo de pH 4.75 a 2.0.

Algunos resultados experimentales han indicado que las interacciones entre grupos con carga opuesta (pares iónicos) pueden tener un efecto estabilizante en la estructura nativa [59, 60], y que la variación de la estabilidad con el pH es un reflejo de la diferencia en el pKa de grupos ionizables entre el estado nativo y el desplegado [59, 60-62]. Un carboxilato involucrado en un par iónico en el estado nativo verá su pKa desplazado hacia un valor menor que el típico en la cadena polipeptídica desplegada. Esto, a su vez, indica que el estado nativo se protonará menos que el estado desplegado cuando el pH disminuye.

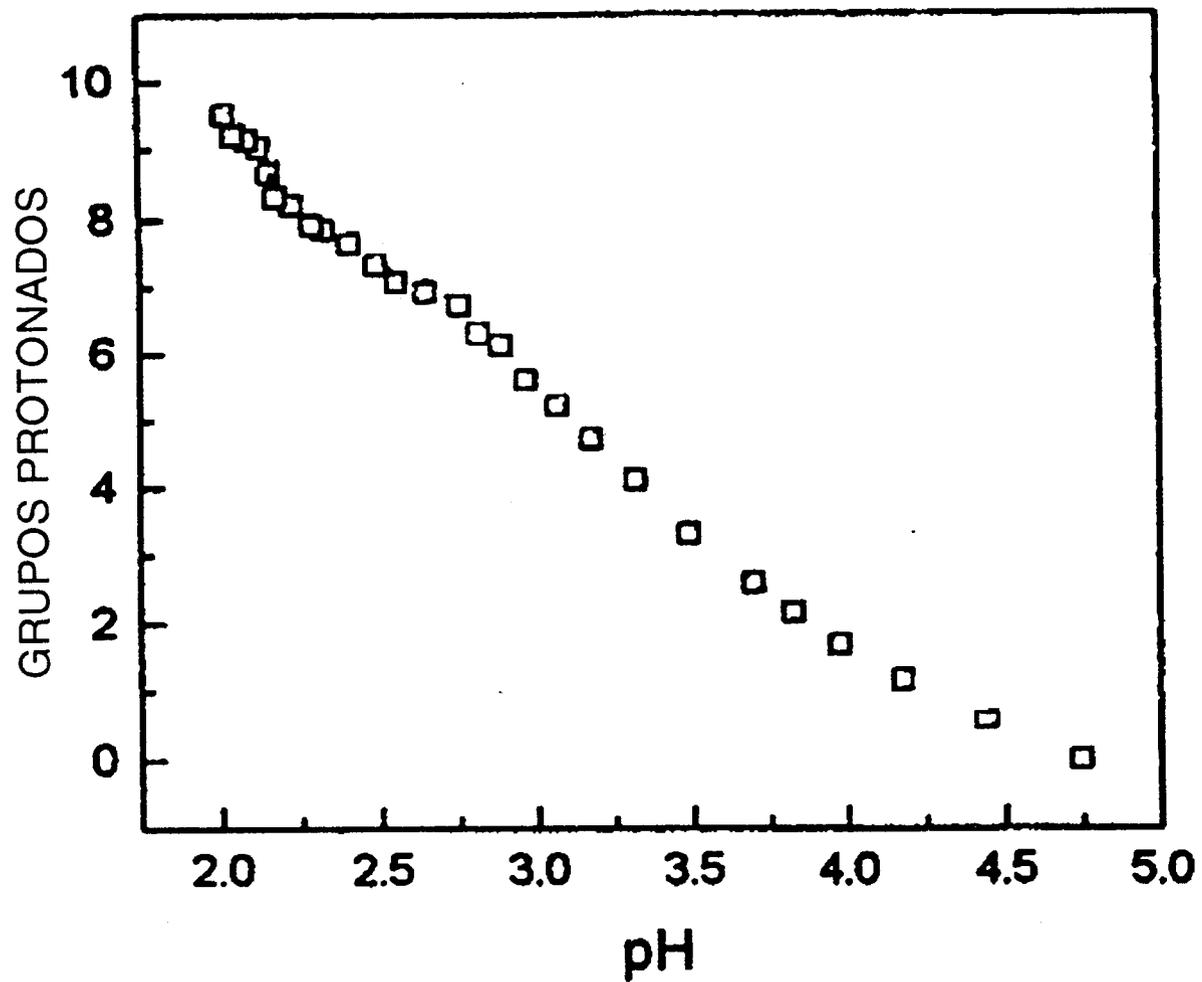
La estructura tridimensional de la caricaína revela que todas sus cadenas laterales ácidas participan en múltiples interacciones con grupos cargados positivamente. Esto hace suponer que los valores de pKa de los sitios titulables (carboxilatos) son principalmente influidos por interacciones de este tipo.

Experimentalmente se observó que al trabajar a pH's ácidos era necesario mantener la solución de proteína a temperatura baja, para evitar la desnaturalización antes de realizar las cinéticas. Esto puede deberse a que a pH's bajos (menores de 2.5) existe una mayor cantidad de protones presentes

en la proteína los cuales aumentan la velocidad de desplegamiento debido a las repulsiones electrostáticas entre cargas positivas. Así como también puede reducirse el grado de expansión necesario para alcanzar el estado de transición. Por lo que en parte, esto explica la disminución de la entalpía de activación cuando el valor del pH es más bajo.

En el estado de transición los cambios de pKa hacia valores más altos son consistentes con un debilitamiento de las interacciones iónicas debido a la expansión molecular que acompaña la formación del estado de transición [47]. Por lo que la protonación de los residuos en el estado de transición es más favorecida que en el estado nativo.

Un residuo ionizable contribuirá a la diferencia en el número de protones ligados a la proteína nativa y al estado de transición sólo en el caso de que su ionización en la proteína nativa sea diferente de su ionización en el estado de transición. Esto indica que al disminuir el pH, podrían surgir diferencias en los estados de ionización de los residuos ionizables en ambos estados, lo que contribuirá a la desestabilización de la proteína.



**Figura 14.** Curva de protonación de caricaína nativa en agua, manteniendo la fuerza iónica constante con NaCl 0.1 M.

# **Capítulo 5**

## **Conclusiones y Perspectivas**

## 5.1 CONCLUSIONES

- El modelo que se ajusta a la desnaturalización de caricaína es el de dos estados irreversible.
- La pérdida de estructura secundaria y terciaria ocurre simultáneamente.
- La considerable variación de  $\Delta H^*$  y  $\Delta S^*$  con el pH puede deberse a la existencia de un gran número de grupos protonables en la caricaína.

## 5.2 PERSPECTIVAS

- Realizar estudios más detallados de la protonación de residuos, para confirmar los resultados obtenidos en este trabajo:

Aplicar modelos teóricos que reproduzcan las curvas de titulación de la caricaína nativa, para poder determinar teóricamente el cambio de los pKa de los grupos ionizables cuando el estado nativo alcanza el estado de transición.

# REFERENCIAS

## 8. REFERENCIAS

1. Lehninger, A. L. (1989) "Bioquímica", Omega, Barcelona, España.
2. Bohinski, R. C. (1978) Bioquímica, Fondo Educativo Interamericano, Nueva York, pp.111-152.
3. Química Fundamental, Eric E. Conn y P.K. Stumpf, tercera edición, editorial limusa, 1978.
4. Tanford, C. (1968a) Adv. Protein Chem. 23, 121-217.
5. Tanford, C. (1968b) Adv. Protein Chem. 23, 218-182.
6. Oliveberg, M., Vuilleumier, S. y Fersht, A. (1994) Biochemistry 33, 8826-8832.
7. Schmid, F. X. (1992) en Protein Folding (Creighton, T. E., ed.), pp. 197-241, Freeman, Nueva York.
8. Ransberger, K. y Solorzano, H (1991) Enzimoterapia, Asociación Médica Int. de Inv. enzimática.
9. Badui, S. (1984) Química de los alimentos, Ed.Alhambra, S. A., España.
10. Jerne NK. (1967) Antibodies and learning: selection versus instruction. en the neurosciences: A study program. (Quarton GC. et al., eds.) Rockefeller University Press:
11. Anfinsen CB. (1973) Principles that govern the foldin of protein chains. Science 181: 223-230.
12. Rojo-Domínguez, A. (1992) Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Depto. de Química.
13. Javid, M. J., Nordby, E. J., Ford, L. T., Hejna, W. J., Whisler, W. W., Burton, C., Millet, D. K., Wiltse, L. L., Widell, E. H., Boyds, R. J., Newton, St. E. y Thirted, R. (1983) Am. Med. Assoc. 249, 2489.
14. Van Holde, K. E. (1979) Bioquímica Física, Alhambra, Madrid.

15. Privalov, P. L. (1979) *Adv. Protein Chem.* 33, 167-241.
16. Ptitsyn, O. B. (1994) *Protein Eng.* 7, 593-596.
17. Schirley, B. A. (1995) *Methods in Molecular Biology*, 40., Totowa, New Jersey.
18. F. X. Schmid, Kinetics of unfolding and refolding of single domain proteins, in: T. E. Creighton (Ed.), *Protein Folding*, Freeman, New York, 1992, pp. 197-241.
19. S. E. Jackson, A. R. Fersht, Folding of chymotrypsin inhibitor 2. Influence of proline isomerisation on the folding kinetics and thermodynamics characterization of the transition state of folding, *Biochemistry* 30 (1991) 10436-10443.
20. S. I. Segawa, M. Sugihara, Characterization of the transition state of lysozyme unfolding. I. Effect of protein-solvent interactions on the transition state, *Biopolymers* 23 (1984) 2473-2488.
21. Goldenberg, D. P. y Creighton, T. E. (1985) *Biopolymers* 24, 167-182.
22. Creighton, T. E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5082-5086.
23. Fersht, A. R., Kellis, J. T., Matouschek, A. T. E. L. y Serrano, L. (1990) *Nature* 334, 602.
24. Summer, I. G., Harris, G. H., G. W., Taylor, M. A. J., Pickersgill, R. W., Owen, A. J. y Goodenough (1993), *Eur. J. Biochem.* 214, 129-134.
25. Schack, P. (1967) *C. R. Trav. Lab. Carlsberg* 36, 67-83.
26. Robinson, G. W. (1975) *Biochemistry.* 14, 3695-3700.
27. Brocklehurst, K. y Salih, E. (1983) *Biochem. J.* 213, 559-560.
28. Polgár, L. (1984) *Biochem. J.* 221, 555-556.
29. Buttle, D. J. y Barrett, A. J. (1984) *Biochem. J.* 223, 81-88.

30. Brocklehurst, K., Salih, E., Mckee, R. y Smith, H. (1958) *Biochem. J.* 228, 525-527.
31. Maes, D., Bouckaert, J., Poortmans, F., Wyns, L. y Looze, Y. (1996) 35, 16292-16298.
32. Kamphuis, I. G., Drenth, J. y Baker, E. N. (1985a ) *J. Mol. Biol.* 182, 317-329.
33. More, S. (1969) *En Structure and Function Relationships of Proteolytic Enzymes*, (Desnuelle, P., Neurath, H. y Ottesen, M., eds.), Academic Press, Nueva York, pp. 289-297.
34. Solís-Mendiola, S. (1994) Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Depto. de Química.
35. Dubois, T., Kleinschmidt, T., Schnek, A. G., Looze, Y. y Braunitzer, G. (1988) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 741-754.
36. Dubois, T., Jacquet, A., Schnek, A. G. y Looze, Y. (1988) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 733-740.
37. Baines, B. S. y Brocklehurst, K. (1982) *Biochem. J.* 205, 205-211.
38. Padilla-Zúñiga, A. J. (1993) Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, México.
39. Baker E. N. Y Drenth, J. (1987) in *Biological Macromolecules and Assemblies* (Jurnak, F. A. y MacPherson, A., eds.), vol. 3, pp. 313-368, John Wiley and Sons, N. Y.
40. Kamphuis, I. G., Kalk, K. H., Swarte, M. B. A. y Drenth, J. (1984) *J. Mol. Biol.* 179, 233-257.
41. Cantor, C. R. y Schimmel, P. R. (1980) *Biophysical Chemistry, Part III*, W. H. Freeman, Nueva York, pp. 1075-1107.
42. Lumry, R. y Eyring, H. (1954) *J. Phys. Chem.* 58, 110-120.
43. Sánchez-Ruíz, J. M. (1992) *Biophys. J.* 61, 921-935.

44. Gutiérrez-González, L. H. (1996) Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Depto. de Química.
45. Lepock, J. R., Ritchie, K. P., Kolios, M. C., Rodahl, A. M., Heinz, K. A. y Kruuv, J. (1992) *Biochemistry* 31, 12706-12712.
46. Tello-Solís, S. R. y Hernández-Arana, A. (1995) *Biochem. J.* 311, 969-974.
47. Solís-Mendiola, S., Gutiérrez-González, L. H., Arroyo-Reyna, A, Padilla-Zúñiga, J., Rojo-Domínguez, A. y Hernández-Arana, A. (1998) *Biochimica et Biophysica Acta* 35765, 1-10.
48. Sánchez-Ruiz, J. M., López-Lacomba, J. L., Cortijo, M. Y Mateo, P. L. (1988) *Biochemistry* 27, 1648-1652.
49. Arroyo-Reyna, A. y Hernández-Arana, A *Biochimica et Biophysica Acta* 1248 (1995) 123-128.
50. Nazoki, Y., and Tanford, C, (1967) *Methods Enzymol.* 11, 715-734.
51. Bashford, D., and Karplus, M. (1990) *Biochemistry* 29, 10219-10225.
52. Solís-Mendiola, S. (1989) Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Depto. de Química.
53. Manavalan, P. y Johnson, W. C. (1983) *Nature* 305, 831-832.
54. Strickland, E. H. (1974) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 2, 113-175.
55. Strickland, E. H., Horwitz, J. y Billups, C. (1969) *Biochemistry* 8, 3205-3213.
56. Guzmán-Casado, M., Parody-Morreale, A., Mateo, L. P. Y Sánchez-Ruiz, J. M. (1990) *Eur. J. Biochem.* 188, 181-185.
57. Freire, E., Van Osdol, W. W., Mayorga, O. L. y Sánchez-Ruiz, J. M., (1990) *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 19, 159-188.
58. Jean-Claude, Cheftel, (1989) *Proteínas Alimentarias*. Editorial ACRIBIA, S. A. ZARAGOZA (España).

59. Anderson, D. E. Becketl, W. J., and Dahlquist, F. W. (1990) *Biochemistry* 29, 2403-2408.
60. Oliveberg, M., Arcus, V. L., Avron, B., Bycroft, M., and Fersht, A. R. (1990) *Biochemistry* 34, 9424-9433
61. Pfeil, W., and Privalov, P. L. (1976) *Biophys. Chem.* 4, 23-32.
62. Tanford, C (1970) *Adv. Protein Chem.* 24, 1-95.