



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

C. B. I.

DEPARTAMENTO DE QUIMICA

“EFECTO DE LA FOTOOXIDACION EN LA
DESNATURALIZACION TERMICA DE LA PROTEINA
BROMELAINA DE TALLO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JOSE EZEQUIEL GUTIERREZ GOMEZ

MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE 1999



**Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa**

**Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Departamento de Química**

**“EFECTO DE LA FOTOOXIDACIÓN EN LA
DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA DE LA
PROTEÍNA BROMELAÍNA DE TALLO”**

Tesis que presenta

José Ezequiel Gutiérrez Gómez

Para la obtención del grado de
Maestro en Ciencias

México Noviembre de 1999

Esta tesis se realizó en el área de Biofísicoquímica del Departamento de Química de la División de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. José Alfonso Arroyo Reyna.

Recordando soy quien soy y quien no
puedo ser y contengo dentro de mí el poder
de las palabras que me llegan de otro tiempo,
de otros espacios

• • •

¿Era uno o muchos, que unían
Entre sí sus nombres y fama
Como un río en el que convergen
Numerosos afluentes?

¿Quién se atreverá a llamar falsos a sus sueños?
¿Quién ha buscado o escudriñado
Todo el vasto e inexplorado
Universo del pensamiento?

¿Quién, confiando en su propia habilidad,
Marcará de manera estricta
La línea divisoria que separa
Lo divino de lo humano?

L.O. H.T.

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo suministrado por CONACYT, México (convenio no. 473100-5-3771N). Así como por la beca otorgada (no. de expediente 95330) para la realización del mismo.

ÍNDICE

Capítulo 1 Generalidades	1
1.1 Introducción	2
1.2 Dicroísmo circular (DC)	8
1.3 Fluorescencia	9
1.4 Estabilidad de proteínas	10
1.5 Bromelaína de tallo de la piña	14
1.6 Objetivos	15
Capítulo 2 Método experimental	16
2.1 Materiales	17
2.2 Purificación de la bromelaína de tallo	17
2.3 Inhibición de la actividad enzimática	18
2.4 Dicroísmo Circular (DC)	19
2.5 Emisión de fluorescencia	20
Capítulo 3 Análisis de datos	21
3.1 Dicroísmo circular	22
3.2 Fluorescencia	28

Capítulo 4 Resultados y discusión	37
4.1 Constantes de velocidad	38
4.2 Fotooxidación	50
Capítulo 5 Conclusiones y perspectivas	54
5.1 Conclusiones	55
5.2 Desnaturalización de la bromelaína de tallo	58
5.3 Perspectivas	59
Bibliografía	60

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES

1.1 Introducción

Las proteínas forman parte del grupo de biomoléculas, que junto con los carbohidratos, los lípidos y los ácidos nucleicos son los principales compuestos orgánicos de todos los tipos de células, ya sean animales o vegetales. Los carbohidratos y los lípidos son las principales fuentes de energía para la mayoría de las formas de vida, los ácidos nucleicos son importantes para el almacenamiento y transferencia de información genética usada en la síntesis de proteínas y de otras moléculas. En cuanto a las proteínas, estas se encuentran entre las macromoléculas biológicas más abundantes en la naturaleza, son muy versátiles en cuanto a sus funciones; así vemos que son elementos de estructura, tienen importancia como catalizadores de reacciones químicas, como reguladores de procesos metabólicos celulares, presentan funciones mecánicas, de almacenamiento, de transporte, de defensa y nutrición, de ahí que prácticamente todas las propiedades que caracterizan a los organismos vivos, estén afectadas por las proteínas [1]. ¿Pero que es lo que hace que un hombre y una bacteria sean tan diferentes? ¿Por qué son así, si comparten las mismas unidades fundamentales? en este caso los α -aminoácidos (Fig. 1.1).

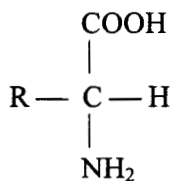


Fig. 1.1 Fórmula general para un α -aminoácido

Las proteínas de absolutamente todos los seres vivos contienen los mismos veinte aminoácidos, que pueden agruparse en cualquier orden y así cada secuencia produce una proteína diferente, con propiedades distintas de las otras.

Cada aminoácido que es parte de una proteína puede ser cualquiera de los veinte sin impedimento alguno, así entonces una cadena que tan solo se componga por cinco aminoácidos, podría tener cualquiera de ellos en primer lugar, cualquiera en segundo y así sucesivamente, resultando una combinación de tres millones doscientas mil posibilidades de estructurar tal número de cadenas distintas, con diferentes propiedades, y solamente con cinco aminoácidos.

Las proteínas son moléculas de carácter polimérico, formadas por aminoácidos, y unidos entre ellos mediante enlaces peptídicos (Fig. 1.2), formando así, a las cadenas polipeptídicas.

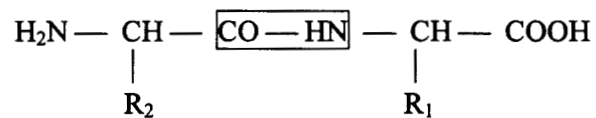


Fig. 1.2 En el recuadro, se representa un enlace peptídico entre dos residuos de aminoácido.

Las proteínas difieren particularmente por la secuencia lineal en la cual los aminoácidos están ensamblados en la cadena polipeptídica, de manera que la diversidad funcional depende de esta secuencia, así como de las propiedades químicas de las cadenas polipeptídicas y del tipo de estructuras que estas forman. En consecuencia cada proteína tiene una función biológica específica que se relaciona directamente con una estructura tridimensional plegada única, y depende, en gran medida de la secuencia de los aminoácidos [1].

Estas estructuras, se encuentran organizadas en cuatro niveles, bien definidos entre sí. Los cuales están clasificados de la forma siguiente:

Estructura primaria: es el orden secuencial de los residuos de aminoácidos, los cuales se encuentran unidos por enlaces peptídicos que son de carácter covalente.

Estructura secundaria: es el plegamiento de las cadenas polipeptídicas en estructuras enrolladas, conocidas como hélices α y hojas plegadas llamadas conformaciones β , estas estructuras se mantienen unidas mediante enlaces débiles.

Estructura terciaria: es la estructura completa tridimensional de una unidad efectiva indivisible e incluye una descripción de la localización espacial de todos los residuos de aminoácidos.

Estructura cuaternaria: es un arreglo espacial organizado de subunidades, y que esta formado por una asociación no covalente de unidades independientes de estructuras terciarias [2].

La estructura tridimensional más estable, es la conformación termodinámica que posee la menor energía libre de Gibbs y obviamente esta es la que predomina, cualquier cambio requiere de un incremento significativo en la energía libre. Las proteínas que se encuentran en su conformación funcional se denominan proteínas nativas. Desde un punto de vista cinético, se dice que la forma más estable es la conformación cinética más accesible.

Las conformaciones, son arreglos tridimensionales de átomos, que no se superponen entre sí, pero son interconvertibles sin romperse los enlaces covalentes [3].

Para dilucidar y entender mejor la importancia que tiene la funcionalidad de las proteínas de acuerdo a su estructura, es necesario conocer el mecanismo mediante el cual las proteínas se pliegan para adquirir su forma nativa, la cual de entre muchas posibilidades es la más estable y funcional. Para conocer el mecanismo y las condiciones que hacen que una proteína permanezca estable *in vivo*, hay dos maneras de conocerlo: (a) estudiándola como una función de variables ambientales como son; la temperatura, presión y agentes químicos; (b) estudiando sistemas modelo [4].

Los cambios en dichas variables inducen un desplegamiento, siendo este un proceso de desdoblamiento (conocido con el término de desnaturalización), de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria, con la consecuente pérdida de la estructura nativa y de la actividad biológica sin que ocurran cambios en la estructura primaria de los aminoácidos [5].

Además de lo anterior, el desplegamiento puede seguir varios mecanismos cinéticos de desdoblamiento, dependiendo de la aparición de intermediarios (con una estabilidad y conformación estructural propia) o no. Sánchez-Ruiz [6] consideró varios mecanismos, que se enumeran a continuación:

1. - $N \rightarrow D$
2. - $N \leftrightarrow D$
3. - $N \leftrightarrow I \rightarrow D$
4. - $N \rightarrow I \rightarrow D$

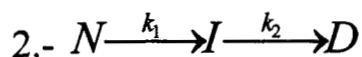
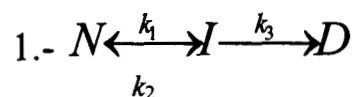
Donde **N**, representa el estado nativo de una determinada proteína, **I** representa a un intermediario y **D** es finalmente el estado desnaturalizado. Al mecanismo número tres se le conoce como modelo Lumry-Eyring [6].

En los mecanismos donde ocurre una desnaturalización irreversible, se incluye al menos uno de los siguientes pasos: (1) desplegamiento reversible del intermediario **I**; (2) alteración irreversible de la proteína desplegada **I** para dar un estado final **D**, que es incapaz de regresar al estado nativo.

Hay situaciones que dependen del modo en que el mecanismo irreversible sucede, si este paso es suficientemente rápido, la transición puede estar dominada completamente por la cinética de formación del estado final. Es muy importante hacer notar que el paso irreversible $I \rightarrow D$ se asume que es de primer orden y la constante de velocidad cambia, con la temperatura de acuerdo a la ecuación de Arrhenius [6]:

$$k = A e^{-E/RT}$$

Según los valores de las constantes, será la estabilidad de los diferentes estados, así vemos entonces que si por ejemplo:



Tomando el modelo de Lumry-Eyring, y si $k_1 \ll k_2 \gg k_3$, las moléculas de I tienden a la forma nativa. Si $k_1 \ll k_2$ la concentración de I es muy pequeña. Y si $k_3 \gg k_2$ la mayoría de las moléculas de I se convierten en D, en lugar de volver al estado nativo [6].

Ahora bien, dependiendo del mecanismo seguido, podemos analizar datos experimentales para obtener información concerniente a parámetros cinéticos (las aproximaciones cinéticas son necesarias para determinar la existencia y número de posibles estados intermediarios) y termodinámicos, monitoreando una determinada propiedad física medible [2].

1.2 Dicroísmo circular (DC)

El dicroísmo circular (DC), es un método espectroscópico que mide la actividad óptica de moléculas asimétricas en solución (las proteínas son estructuras asimétricas). Las proteínas en DC presentan señales en dos regiones espectrales: el UV-lejano (170-250 nm) donde podemos encontrar predominantemente la contribución de los enlaces peptídicos; y el UV-cercano (250-300 nm) donde se muestran bandas ocasionadas principalmente por la presencia de aminoácidos aromáticos.

En esta técnica, es generalmente aceptado que los espectros de DC de una proteína son un reflejo directo de su estructura secundaria [7], por lo que se utiliza ampliamente para monitorear la transición cinética desde un estado nativo a un estado desnaturalizado, ya que las diferencias estructurales en DC entre ambos estados son muy notables [8].

Esta técnica se utilizó en un trabajo de Arroyo R. y colaboradores [9], en donde encontraron evidencias experimentales suficientes, que determinaron que la desnaturalización térmica de la bromelaína de tallo a pH de 3.4 implica un proceso irreversible y que además sigue un mecanismo de dos estados $N \rightarrow D$. Este paso se lleva a cabo bajo una cinética de primer orden, donde la rapidez de la reacción –en este caso la desnaturalización de la proteína– es directamente proporcional a una sola concentración ($v=kc$).

1.3 Fluorescencia

Es conveniente probar otra técnica alternativa, aparte del dicroísmo circular que nos permita verificar el mecanismo de desnaturalización térmica de la bromelaína de tallo.

La fluorescencia es una técnica muy sensible a los cambios que suceden en la conformación estructural de las proteínas, teniendo como ventaja que permite trabajar con concentraciones de muestra muy bajas. De esta técnica, se obtiene información acerca de parámetros termodinámicos y cinéticos relacionados con el proceso del plegamiento y desplegamiento de las proteínas y está directamente relacionada con la población de macroestados en una transición de desplegamiento [10].

Las señales de fluorescencia de las proteínas están determinadas principalmente por la presencia de los aminoácidos aromáticos, como son: el triptófano, la tirosina y la fenilalanina, por lo que las transiciones de desplegamiento/plegamiento que son inducidas por agentes químicos, por temperatura y pH, se ven reflejadas en el tipo de señales que dichos aminoácidos muestran. Por otro lado es importante tener muy en cuenta que la señal de fluorescencia es dominada predominantemente por la presencia del triptófano [8].

Las propiedades de fluorescencia de los residuos de triptófano son particularmente sensibles a las perturbaciones estructurales de las proteínas, lo que además resulta ventajoso, ya que a menudo hay pocos residuos de este aminoácido en las proteínas.

Dependiendo de la longitud de onda de la excitación, podemos evaluar solo a uno de los tres aminoácidos, por ejemplo para observar solo fluorescencia del triptófano, la excitación debe ser a 295 nm [8].

1.4 Estabilidad de proteínas y la radiación UV

La exposición de las proteínas a la radiación ionizante y no ionizante (como la radiación UV) causa efectos directos en la inactivación de las proteínas [4]. De acuerdo con varios trabajos experimentales, se observó que el triptófano tiene un importante papel en la inactivación de las enzimas por radiación UV, lo que ha llevado a generalizar que los aminoácidos aromáticos son sensibles a la fotólisis en la mayoría de las proteínas [11].

La fotosensibilidad del triptófano, es determinada más por la naturaleza del aminoácido adyacente, por su entorno local, así como si esta expuesto o no a un medio acuoso.

Sellers y colaboradores [11], mencionan que a 295 nm aproximadamente el 97 % de la luz absorbida por la β -tripsina (la proteína con la cual ellos trabajaron), realmente es absorbida por los residuos de triptófano; y que generalmente hay una pérdida de la actividad así como un aumento en la fotodegradación de los triptófanos presentes en la enzima.

Se ve entonces que una buena parte de los cambios observados en absorción y en el espectro de fluorescencia de emisión deben ser atribuidos a la fotólisis del triptófano, es decir, a la degradación del mismo y/o a la formación de fotoproductos del triptófano [12], como la N-formilquinurenina (NFK), el principal fotoproducto en disoluciones acuosas y en condiciones aeróbicas [13]. En condiciones de anaerobiosis el grado de aparición de fotoproductos disminuye.

En revisiones posteriores, se ha comprobado que el indol presente en la estructura del triptófano, es un fluoróforo cuya fluorescencia, es altamente sensible al ambiente, haciendo

de esto una excelente elección para reportar los cambios conformacionales en proteínas e interacciones con otras moléculas [14].

Por otro lado Creed [15] reporta que en presencia de oxígeno, la irradiación del dipeptido Gly-Trp y Trp-Gly produce N-formilquinurenina y quinurenina, mientras que con Trp-Gly y con el triptófano en N-terminal hay mas resistencia a la oxidación.

Esto implica la conveniencia de revisar la secuencia de aminoácidos en la estructura de la bromelaína de tallo, con la finalidad de conocer la posición de los triptófanos y de los aminoácidos adyacentes para saber cómo estos pueden modificar los patrones esperados de desplegamiento. La bromelaína de tallo es una proteína que fue secuenciada y caracterizada en un trabajo de Ritonja y colaboradores [16] como una glicoproteína que puede tener dos secuencias; una menor que comienza con alanina y otra mayor que empieza con valina, por lo que esta proteína puede existir como una cadena polipeptídica con 211 o 212 residuos de aminoácidos con una M_r de 22828 para la versión más larga [16] (Figura 1.3).

1 10 20 30 40 50 60 70
 AVPQSIDWRDYGAVTSVKNQNPCGACWAFAAIATVESIYKIKKGILEPLSEQQLDCAKGYGCKGGWEFR

 80 90 100 110 * 120 130 140
 AFEFIISNKGVASGAIYPYKAAKGTCKTDGVPNSAYITGYARVPRNNESSMMYA VSKQPITVAVDANANF

 150 160 170 180 190 200 210
 QYYKSGVFNPGCGTSLNHAVTAIGYGQDSIYPKKWGAKWGEAGYIRMARDVSSSSGICGIAIDPLYPTLEE

Ala	A	25	Gln	Q	7	Leu	L	6	Ser	S	17
Arg	R	6	Glu	E	9	Lys	K	15	Thr	T	9
Asn	N	10	Gly	G	22	Met	M	3	Trp	W	5
Asp	D	8	His	H	1	Phe	F	6	Tyr	Y	14
Cys	C	7	Ile	I	17	Pro	P	11	Val	V	14

Asn-117 es el aminoácido de unión con el carbohidrato (indicado por un *).

Fig. 1.3. Secuencia de aminoácidos y composición de la bromelaína de tallo

De la observación de la secuencia de aminoácidos, podemos ver que hay 5 triptófanos (W). Sus respectivos aminoácidos adyacentes se encuentran ubicados de la siguiente manera (figura 1.4):

.aminoácidos	.posición
DWR	7-9
CWA	26-28
GWE	66-68
KWG	175-177
KWG	179-181

Fig. 1.4 Posición de los triptófanos en la secuencia de aminoácidos

Y de acuerdo con el trabajo de Tassin y Borkman [13], para una glicina adyacente antes de un triptófano, no se observará fluorescencia significativa debido a la degradación del triptófano.

Resultado, distinto en el modelo Trp-Gly, en donde se observó, un incremento en la intensidad de la fluorescencia después de una irradiación, concretamente se manifiesta una banda para a aproximadamente 440 nm cuando había una excitación a 360 nm, lo cual además se debe a la aparición de fotoproductos como consecuencia de la oxidación del triptófano. Según Tassin y Borkman [13], los fotoproductos no se forman sin la presencia del oxígeno.

1.5 Bromelaína de tallo de la piña

Dentro de la amplia clasificación de las proteínas, encontramos a las proteasas o enzimas proteolíticas. Las proteasas cisteínicas son una familia ampliamente distribuida en la naturaleza, tal y como lo mencionan Arroyo R. y colaboradores [17], dentro de estas ubicamos a la bromelaína, aislada de la planta de la piña (*Ananas comosus*) perteneciente a la familia *Bromeliaceae*. De esta planta podemos aislar por lo menos a cuatro proteasas; del jugo de la fruta obtenemos a la llamada bromelaína de la fruta, del tallo a la bromelaína de tallo y en cantidades menores a otras dos proteasas: comosaína y ananaína [18].

Ritonja y colaboradores [16] demostraron a través de la secuencia de la bromelaína de tallo, que esta es un miembro de la superfamilia de la papaína, ya que las cadenas polipeptídicas de estas proteínas comparten un patrón común de plegamiento.

En el tallo de la planta de la piña hay seis formas moleculares de bromelaína, que pueden ser separadas por medio de cromatografía de intercambio iónico de alta resolución, estas formas difieren en su acción sobre diferentes sustratos, su susceptibilidad a agentes reductores y oxidantes, pero especialmente el pH al cual hidrolizan más rápidamente [19].

1.6 Objetivos

De acuerdo con los elementos introducidos anteriormente, el objetivo de este trabajo consiste en analizar los efectos de la fotooxidación a diferentes temperaturas en la desnaturalización térmica de la bromelaína de tallo y su influencia en la estabilidad termodinámica y en los mecanismos de la cinética de dicha transformación.

CAPÍTULO 2

MÉTODO EXPERIMENTAL

2.1 Materiales

Bromelaína de tallo . Fue extraída y purificada parcialmente por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, U.S.A.)

Cloruro de mercurio II. Suministrado en grado analítico por Merck (Darmstadt, R.F.A.)

2-Mercaptoetanol. Suministrado en grado analítico por Merck (Schuchardt, R.F.A.)

Iodoacetamida. Suministrada por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, U.S.A.)

2.2 Purificación de la bromelaína de tallo

Una muestra de 0.5 g de extracto crudo de bromelaína de tallo, fue disuelta en 11 ml de una disolución reguladora de fosfatos 0.05M pH 6 que contenía cloruro de mercurio II, en una concentración de 3×10^{-6} M, la cual es suficiente para inhibir la actividad de la bromelaína de tallo [20].

Después el material insoluble fue removido por centrifugación a 6000 r.p.m. durante veinte minutos a 4°C. La solución sobrenadante fue filtrada con una membrana Millipore de porosidad $0.45 \mu\text{m}$ y posteriormente pasada a través de una columna de fractogel TSK HW-40 (F) eluída con la misma disolución reguladora y de la observación del cromatograma resultante, se colectaron las fracciones con mayor actividad proteolítica comprobada, esto se hizo por Arroyo usando una solución de caseína al 1 % como sustrato y a pH 6.0 [17].

2.3 Inhibición de la actividad enzimática

La fracción recolectada, se inactivó irreversiblemente por medio de una reducción con 2-mercaptoetanol (4.55 $\mu\text{l}/\text{mg}$ de proteína) en frío y bajo agitación durante veinte minutos, seguida de una carboximetilación con iodoacetamida (14.3 mg/mg de proteína), nuevamente bajo agitación durante dos horas y a temperatura ambiente. La disolución resultante fue puesta a dializar contra agua desionizada durante un periodo de 15 días.

Después del periodo de la diálisis, se continuo con la purificación de la muestra, para separar los dos principales componentes de la bromelaína de tallo [18, 21]. La muestra se inyectó en una columna de cromatografía de intercambio catiónico TSK-SP5PW instalada en un cromatógrafo VARIAN 9050/9012, se usó un regulador de fosfatos 0.05 M a un pH de 6.0 con un flujo de 0.75 ml/min , y una disolución de cloruro de sodio 1.0 M preparada en la misma disolución reguladora para establecer el gradiente de elución.

Se colectaron 2 fracciones, las cuales fueron nombradas SB1 y SB2. La determinación de la concentración de la muestra se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 280 nm ($\epsilon = 2.01 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Posteriormente la muestra fue desalada en columnas PD-10 empacadas con Sephadex G-25M, seguido de esto las muestras fueron liofilizadas para asegurar su conservación en refrigeración.

2.4 Dicroísmo circular (DC)

Las determinaciones de dicroísmo circular fueron hechas en un espectropolarímetro JASCO J715; con una lámpara de Xe con 150 W de potencia, usando una celda con una trayectoria óptica de 1 cm y una abertura de 2 nm. En la celda se colocaron previamente 2321 μl de una disolución reguladora de glicina-HCl 0.02 M, a un pH 3.4 para que alcanzara el equilibrio térmico a la temperatura seleccionada, para posteriormente añadir 179 μl de la muestra con una concentración de 420 $\mu\text{g/ml}$, y lograr así una concentración final en la celda de 30 $\mu\text{g/ml}$. Se observó un tiempo muerto de 12 segundos.

El procedimiento para lograr el equilibrio térmico, fue del tipo efecto Peltier, el cual permite un control de temperatura programable.

La desnaturalización térmica de la proteína, fue llevada a cabo por monitoreo de la elipticidad, primero en la región de absorción de enlaces peptídicos, a una longitud de onda de 220 nm y a varias temperaturas [22].

Para la región de absorción de aminoácidos aromáticos, se trabajó a 280 nm. Colocándose en la celda 1042 μl de la disolución reguladora, después de que se alcanzó el equilibrio térmico se añadieron 958 μl de la muestra de una concentración de 969 $\mu\text{g/ml}$ para obtener una concentración final en la celda de 464 $\mu\text{g/ml}$.

2.5 Emisión de fluorescencia

Las determinaciones cinéticas de fluorescencia fueron hechas en un espectrofluorómetro de conteo de fotones PC1 ISS con una lámpara de Xe, con 300 W de potencia. Las muestras liofilizadas fueron disueltas en una disolución reguladora de glicina-HCl 0.02M a un pH de 3.4 y se les determinó nuevamente su concentración espectrofotométricamente. Antes de trabajar se puso en una celda de trayectoria óptica de un 1 cm, 2368 μl de la misma disolución reguladora con la finalidad de que se alcanzara el equilibrio térmico a la temperatura elegida, para luego añadir 132 μl de una disolución de bromelaína nativa con una concentración de 303 $\mu\text{g/ml}$ y así obtener una concentración final en la celda de 16 $\mu\text{g/ml}$.

La temperatura fue controlada con un baño de agua Fisher Scientific modelo 90, desde donde circulaba el agua por un sistema de enchaquetado hacia la celda, obteniéndose una desviación de las lecturas de la temperatura de $\pm 0.65^\circ\text{C}$.

Se observó en esta técnica, un tiempo muerto de mezclado de 25 segundos, teniendo una anchura de banda de 16 nm en la excitación y de 4 nm para la emisión.

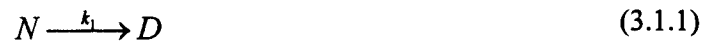
Las cinéticas de la desnaturalización térmica de la proteína, se realizaron a una longitud de onda de emisión de 340 nm y 280 nm para la excitación (la λ_{max} de la proteína nativa es de 340 nm). En todos los casos se obtuvieron curvas de intensidad relativa contra tiempo. Después de que las cinéticas concluyeron se obtuvo el espectro de la muestra desnaturalizada para luego ser enfriada hasta temperatura ambiente y sacar nuevamente espectros a una λ_{exc} de 325 nm haciendo un barrido de 340 a 500 nm.

CAPÍTULO 3

ANÁLISIS DE DATOS

3.1 Dicroísmo circular

Para trabajar con los datos obtenidos del método de dicroísmo circular (DC), suponemos que el mecanismo que sigue el desplegamiento de la bromelaína de tallo es el siguiente:



De donde se parte para poder encontrar una expresión que permita calcular a la constante de velocidad k_1 mediante alguna propiedad física que se determine experimentalmente y que varíe en función del tiempo; así tenemos ahora a la siguiente expresión:

$$-\frac{d[N]}{dt} = k_1[N] \quad (3.1.2)$$

La expresión (3.1.2) corresponde también a la forma:

$$-\frac{dfn}{dt} = k_1 fn \quad (3.1.3)$$

Donde fn corresponde a la fracción de proteína nativa

Separando las variables e integrando, se obtienen las siguientes expresiones:

$$-\frac{df_n}{f_n} = k_1 dt \quad (3.1.4)$$

$$\int_{fn^0}^{fn} \frac{df_n}{f_n} = -k \int_0^t dt \quad (3.1.5)$$

$$\ln \frac{fn}{fn^0} = -k_1 t \quad (3.1.6)$$

Si $fn^0 = 1$

$$fn = e^{-k_1 t} \quad (3.1.7)$$

Una gran parte del desarrollo de la cinética química es descrita en términos de la ecuación de Arrhenius.

$$k = Ae^{-E/RT} \quad (3.1.8)$$

La ecuación de Arrhenius relaciona a la constante de velocidad de reacción k con la temperatura absoluta, lo cual se ha comprobado experimentalmente, es decir la velocidad de reacción es función de la temperatura [23].

Para fines experimentales la ecuación de Arrhenius se puede escribir en su forma lineal:

$$\ln k = \ln A - E / RT \quad (3.1.9)$$

Donde E es la energía de activación
 A es el factor preexponencial
 R es la constante de los gases ideales

Un análisis de regresión lineal, fue aplicado a los datos de una gráfica de $\ln k$ contra $1/T$ de donde se obtiene que la pendiente es igual a la energía de activación entre la constante de los gases ideales (R).

Para poder obtener ahora el valor de la constante de velocidad k , es necesario conocer una propiedad física que pueda ser determinada experimentalmente, para este caso se trata de la elipticidad θ . Este termino es una medida de la actividad óptica y se refiere a la desviación en grados de la luz polarizada en un plano.

Los datos pueden ser interpretados como la elipticidad por residuo medio $[\theta]_{MRW}$, que es la rotación en grados $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ [8].

Conociendo la elipticidad y usando la siguiente relación:

$$kt = \ln \frac{y_{\infty} - y_0}{y_{\infty} - y} \quad (3.1.10)$$

Donde $y_0 =$ a una propiedad física a tiempo cero

$y_{\infty} - y_0 =$ Es proporcional a la concentración inicial del reactivo

$y_{\infty} - y =$ Es el cambio de concentración en función del tiempo.

La expresión (3.1.10), se usa de la siguiente manera para construir una gráfica con datos experimentales:

$$\ln(y_{\infty} - y) = \ln(y_{\infty} - y_0) - kt \quad (3.1.11)$$

De una gráfica de $\ln(y_{\infty} - y)$ versus t se obtiene que la pendiente es igual al valor negativo de la constante de velocidad k .

Conociendo ahora el valor de la constante a diferentes temperaturas, podemos utilizar la expresión (3.1.9), para calcular el valor de la energía de activación.

Para poder conocer la entalpía y entropía estándar de activación, se utiliza la ecuación de Eyring, la cual se fundamenta en la teoría del complejo activado (TCA).

La expresión que proporciona la TCA para la constante de velocidad de una reacción de primer orden es [24]:

$$k = \frac{k_B T}{h} K^{\ddagger} \quad (3.1.12)$$

Donde k_B es la constante de Boltzman
 h es la constante de Planck
 K^{\ddagger} es la constante de equilibrio para el proceso

Si se toma la siguiente igualdad:

$$\Delta^{\ddagger} G^0 = -RT \ln K^{\ddagger} \quad (3.1.13)$$

$\Delta^{\ddagger} G^0$ es la energía de Gibbs estándar de activación

Por lo que:

$$e^{-\Delta^\ddagger G^0/RT} = K^\ddagger \quad (3.1.14)$$

Si esta ultima expresión, la sustituimos en la (3.1.12), se obtiene:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta^\ddagger G^0/RT} \quad (3.1.15)$$

Tomando en cuenta que:

$$\Delta^\ddagger G^0 = \Delta^\ddagger H^0 - T\Delta^\ddagger S^0 \quad (3.1.16)$$

Y sustituyéndola en la (3.1.15) se llega a:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{\Delta^\ddagger S^0/R} e^{-\Delta^\ddagger H^0/RT} \quad (3.1.17)$$

Esta última expresión se le conoce comúnmente como la ecuación de Eyring, con la cual se realizaron ajustes lineales a los datos experimentales obtenidos.

La (3.1.17) se puede escribir también como:

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta^\ddagger S^0}{R} - \left(\frac{\Delta^\ddagger H^0}{R}\right)\left(\frac{1}{T}\right) \quad (3.1.18)$$

Observando esta expresión, se puede ver que si se hace un gráfico en función de $1/T$, se puede calcular la entalpía estándar de activación a partir de la pendiente y la entropía estándar de activación, a partir de la ordenada al origen. La ecuación (3.1.18) se le conoce también como la ecuación de Eyring.

3.2 Fluorescencia

Los datos obtenidos de las cinéticas a diferentes temperaturas se presentan como una relación de fluorescencia relativa a diferentes tiempos que se ajustan a una expresión doble exponencial, esto quiere decir que por este método podemos calcular dos constantes de velocidad, que están de acuerdo con un mecanismo simple de tres estados:



Donde como ya se menciono anteriormente **N** se refiere a un estado nativo, **D** a un estado desplegado, y para este caso **X** se refiere a un estado indeterminado, que no corresponde necesariamente a una forma intermedia estable.

Debemos entonces encontrar una expresión que sea doblemente exponencial y que se adapte al cálculo de nuestros resultados.

La velocidad de desaparición de **N** está dada por [23]:

$$-\frac{d[N]}{dt} = k_1[N] \quad (3.2.2)$$

La velocidad de aparición de **X**, es:

$$\frac{d[X]}{dt} = k_1[N] - k_2[X] \quad (3.2.3)$$

La velocidad para la aparición de la especie D:

$$\frac{d[D]}{dt} = k_2[X] \quad (3.2.4)$$

Cabe recordar que:

$$\frac{d[N]}{dt} + \frac{d[X]}{dt} + \frac{d[D]}{dt} = 0 \quad (3.2.5)$$

Integrando la ecuación (3.2.2); obtenemos la siguiente expresión:

$$[N] = [N]_0 e^{-k_1 t} \quad (3.2.6)$$

Lo que nos indica que la concentración de la especie [N], disminuye exponencialmente con respecto al tiempo, desde un valor inicial $[N]_0$ hasta un valor final que puede ser cero.

Sustituyendo la ecuación (3.2.6) en la ecuación (3.2.3), se llega a la siguiente expresión:

$$\frac{d[X]}{dt} = k_1 [N]_0 e^{-k_1 t} - k_2 [X] \quad (3.2.7)$$

Reagrupando y multiplicando ambos lados por un factor de integración:

$$\left(\frac{d[X]}{dt} + k_2[X]\right)e^{k_2t} = k_1[N]_0 e^{-k_1t} e^{k_2t} \quad (3.2.8)$$

Tomando en cuenta la ecuación (3.2.6), la anterior se convierte en:

$$\left(\frac{d[X]}{dt} + k_2[X]\right)e^{k_2t} = k_1[N]e^{k_2t} \quad (3.2.9)$$

El término de la izquierda se puede igualar al valor de la derivada de $\frac{d[X]}{dt}e^{k_2t}$ por lo

que entonces la ecuación (3.2.9) queda como:

$$\left(\frac{d[X]}{dt} + k_2[X]\right)e^{k_2t} = \frac{d[X]e^{k_2t}}{dt} \quad (3.2.10)$$

Igualando la expresión (3.2.10) con la (3.2.8) e integrando:

$$[X]e^{k_2 t} = \frac{k_1 [N]_0}{k_2 - k_1} e^{(k_2 - k_1)t} + I \quad (3.2.11)$$

Para saber el valor real de la constante de integración, suponemos que a $t = 0$ el valor de $[X]$ es igual a cero, por lo tanto:

$$I = -\frac{k_1 [N]_0}{k_2 - k_1} \quad (3.2.12)$$

Sustituyendo la expresión (3.2.12) en la (3.2.11):

$$[X]e^{k_2 t} = \frac{k_1 [N]_0}{k_2 - k_1} e^{(k_2 - k_1)t} - \frac{k_1 [N]_0}{k_2 - k_1} \quad (3.2.13)$$

Factorizando y despejando $[X]$, llegamos a:

$$[X] = [N]_0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} [e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}] \quad (3.2.14)$$

Recordando las condiciones iniciales, de que $[X]_0 = 0$, $[D]_0 = 0$ y donde el balance de masa es

$$[N]_0 = [N] + [X] + [D] \quad (3.2.15)$$

Y si ahora sustituimos la ecuación (3.2.6) y la ecuación (3.2.14) en la ecuación (3.2.15)

tenemos:

$$[N]_0 = [N]_0 e^{-k_1 t} + [N]_0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} [e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}] + [D] \quad (3.2.16)$$

Despejando [D] se obtiene la siguiente ecuación:

$$[D] = [N]_0 \left\{ 1 + \frac{1}{k_2 - k_1} [k_1 e^{-k_2 t} - k_2 e^{-k_1 t}] \right\} \quad (3.2.17)$$

La señal de fluorescencia a un determinado tiempo se puede expresar de la siguiente manera:

$$F_{(t)} = \sum_{i=1}^n F_{i(t)} \quad (3.2.18)$$

$F_{(t)}$ es la fluorescencia total al tiempo t

$F_{i(t)}$ es la fluorescencia total de la especie i al tiempo t

Para nuestro caso concreto, la podemos escribir de la siguiente forma:

$$F_{(t)} = F_{N(t)} + F_{X(t)} + F_{D(t)} \quad (3.2.19)$$

Donde $F_{N(t)}$ es la señal de fluorescencia del estado nativo N al tiempo t

$F_{X(t)}$ es la señal de fluorescencia de la especie X al tiempo t

$F_{D(t)}$ es la señal de fluorescencia de la especie D al tiempo t

Para señales de fluorescencia relativa, hay que tomar en cuenta que:

$$F_{rel(t)} \equiv \frac{F_{(t)}}{F_{N(0)}} \quad (3.2.20)$$

Con esta última consideración, la ecuación (3.2.19) se escribe como:

$$F_{rel(t)} \equiv \frac{F_{N(t)}}{F_{N(0)}} + \frac{F_{X(t)}}{F_{N(0)}} + \frac{F_{D(t)}}{F_{N(0)}} \quad (3.2.21)$$

Aplicando la ley de Lambert-Beer al concepto de la Fluorescencia:

$$F = z\varepsilon\varphi c \quad (3.2.22)$$

Donde z es una constante que incluye a la intensidad del haz incidente, al espesor de la muestra y a factores instrumentales. ε es el coeficiente de extinción molar, c es la concentración molar y φ es el rendimiento cuántico, que se refiere a la fracción de moléculas que son desexcitadas por la fluorescencia [25].

Así entonces:

$$\frac{F_{N(t)}}{F_{N(0)}} \equiv \frac{z\varepsilon_N\varphi_N c_{N(t)}}{z\varepsilon_N\varphi_N c_{N(0)}} \quad (3.2.23)$$

Y si además: $c_N + c_X + c_D = c_0$, para también considerar la siguiente igualdad:

$$\frac{c_N}{c_0} + \frac{c_X}{c_0} + \frac{c_D}{c_0} = 1 = f_N + f_X + f_D \quad (3.2.24)$$

f_N es la fracción de la especie nativa **N**

f_X es la fracción de la especie **X**

f_D es la fracción de la especie **D**

La expresión (3.2.23) se transforma ahora en:

$$\frac{F_{N(t)}}{F_{N(0)}} = \frac{f_{N(t)}}{f_{N(0)}} = f_{N(t)} \quad (3.2.25)$$

Y para el siguiente término:

$$\frac{F_{X(t)}}{F_{N(0)}} = \frac{z\varepsilon_X \varphi_X c_{X(t)}}{z\varepsilon_N \varphi_N c_{N(0)}} \cong \frac{\varphi_X}{\varphi_N} f_{X(t)} \quad (3.2.26)$$

Similarmente:

$$\frac{F_{D(t)}}{F_{N(0)}} \cong \frac{\varphi_D}{\varphi_N} f_{D(t)} \quad (3.2.27)$$

Sustituyendo la ecuación (3.2.25), la ecuación (3.2.26) y la ecuación (3.2.27) en la ecuación (3.2.21) se llega a:

$$F_{rel(t)} = f_{N(t)} + \frac{\varphi_X}{\varphi_N} f_{X(t)} + \frac{\varphi_D}{\varphi_N} f_{D(t)} \quad (3.2.28)$$

La anterior expresión se puede escribir como:

$$F_{rel(t)} = f_{N(t)} + b f_{X(t)} + c f_{D(t)} \quad (3.2.29)$$

Donde b y c , son constantes que dependen del rendimiento cuántico.

La ecuación (3.2.29) se puede escribir de otra manera, si tomamos en cuenta las ecuaciones (3.2.6), la (3.2.14) y la (3.2.17).

$$F_{rel(t)} = [N]_0 e^{-k_1 t} + b \left\{ [N]_0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} [e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}] \right\} + c \left\{ [N]_0 + \frac{[N]_0 [k_1 e^{-k_2 t} - k_2 e^{-k_1 t}]}{k_2 - k_1} \right\} \quad (3.2.30)$$

Reordenando la expresión (3.2.30) se obtiene:

$$F_{rel(t)} = c + \left[\frac{(k_1 - k_2) - b k_1 + c k_2}{k_1 - k_2} \right] e^{-k_1 t} + \left[\frac{b k_1 - c k_1}{k_1 - k_2} \right] e^{-k_2 t} \quad (3.2.31)$$

Como se puede observar, esta última expresión describe la cinética del desplegamiento por medio de dos términos exponenciales de decaimiento.

Kiefhaber T. [4] hace un análisis de los experimentos cinéticos; donde el número de fases cinéticas observadas, la constante aparente de velocidad, y sus respectivas amplitudes (A_i) pueden ser evaluadas. Para el caso donde se estudian reacciones unimoleculares el cambio observado en la señal con respecto al tiempo, se representa como la suma de n exponenciales:

$$B_{(t)} - B_{(\infty)} = \sum_{i=1}^n A_i e^{-\lambda_i t} \quad (3.2.32)$$

$B_{(t)}$ es la señal observada al tiempo t

$B_{(\infty)}$ es la señal después que la reacción se ha completado

De acuerdo con lo anterior, podemos escribir la ecuación (3.2.31) de la siguiente forma:

$$F_{rel(t)} - F_{rel(\infty)} = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} \quad (3.2.33)$$

A_1 y A_2 son las amplitudes para las fases 1 y 2 respectivamente.

k_1 y k_2 son las constantes de velocidad para cada una de las fases

De la ecuación (3.2.33), se obtiene de una manera simple, las constantes que corresponden a las dos fases que se revelan de las cinéticas monitoreadas por el método de fluorescencia.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Constantes de velocidad

Las curvas de las cinéticas observadas por monitoreo de la elipticidad a 220 nm, siguieron un patrón monoexponencial para todas las temperaturas experimentales, lo cual confirma que por este método, se detecta un modelo de desdoblamiento de dos estados: $N \xrightarrow{k} D$, el cual fue analizado con la ecuación (3.1.9) para calcular mediante una propiedad física que varía con la temperatura a cierto tiempo, las constantes de velocidad.

La tabla I nos muestra las constantes de velocidad para el desdoblamiento de la bromelaína de tallo en una fase a diferentes temperaturas, monitoreadas por DC:

A la longitud de onda de 280 nm, las constantes de velocidad son esencialmente idénticas, estos resultados sugieren que no hay intermediarios presentes en la desnaturalización térmica seguida por DC, además el valor de estas constantes determinadas experimentalmente, representan una medida de un desplegamiento global [26].

Tabla I

Valores de las constantes de velocidad para el desplegamiento de bromelaína de tallo por monitoreo de la elipticidad a 220 nm.

$k \times 10^5 (s^{-1})$	TEMPERATURA (°C)
6.7639	35.3
7.5754	40.4
22.197	46.0
38.899	50.0
165.14	53.0
231.82	55.0
581.24	60.0

Usando el valor de las constantes de velocidad calculadas a partir de los estudios de dicroísmo circular, hacemos ajustes lineales utilizando la ecuación de Eyring (3.1.18) para conocer el ΔH de activación a partir de la pendiente y el ΔS de activación mediante la ordenada al origen. La ecuación de Arrhenius (3.1.7) para calcular la energía de activación (Figuras 4.1 y 4.2 respectivamente). Resultando de esto excelentes ajustes para todas las temperaturas. Los ajustes y las gráficas fueron hechas con el programa Origin 4.1.

Sin embargo, en las cinéticas del desplegamiento para la bromelaína de tallo monitoreadas por fluorescencia, estas siguen un patrón biexponencial (Fig. 4.3), del cual se deduce claramente que hay un mecanismo de tres estados; $N \xrightarrow{k_1} X \xrightarrow{k_2} D$. Se comprobó la irreversibilidad del proceso de desnaturalización de la siguiente manera: (a) los experimentos cinéticos se interrumpieron a tiempos en los que empezaba a aparecer X; (b) la disolución se enfriaba rápidamente a temperatura ambiente; (c) se obtenía el espectro de fluorescencia, observando que la intensidad del máximo a 340 nm no regresaba al valor correspondiente al estado nativo.

Se obtienen dos constantes de velocidad, las cuales fueron calculadas de las curvas de fluorescencia y utilizando la ecuación (3.2.33), dichos resultados se muestran en la tabla II:

Tabla II

Valores de las constantes de velocidad para el desplegamiento de bromelaína de tallo monitoreado por fluorescencia

Temperatura (°C)	$k_1 \times 10^4 (\text{s}^{-1})$	$k_2 \times 10^5 (\text{s}^{-1})$
36.5	3.434	4.929
40.5	4.257	7.142
45.0	6.625	9.851
50.2	29.20	9.723
52.9	28.20	11.37
55.6	88.60	14.76
59.5	170.4	20.07

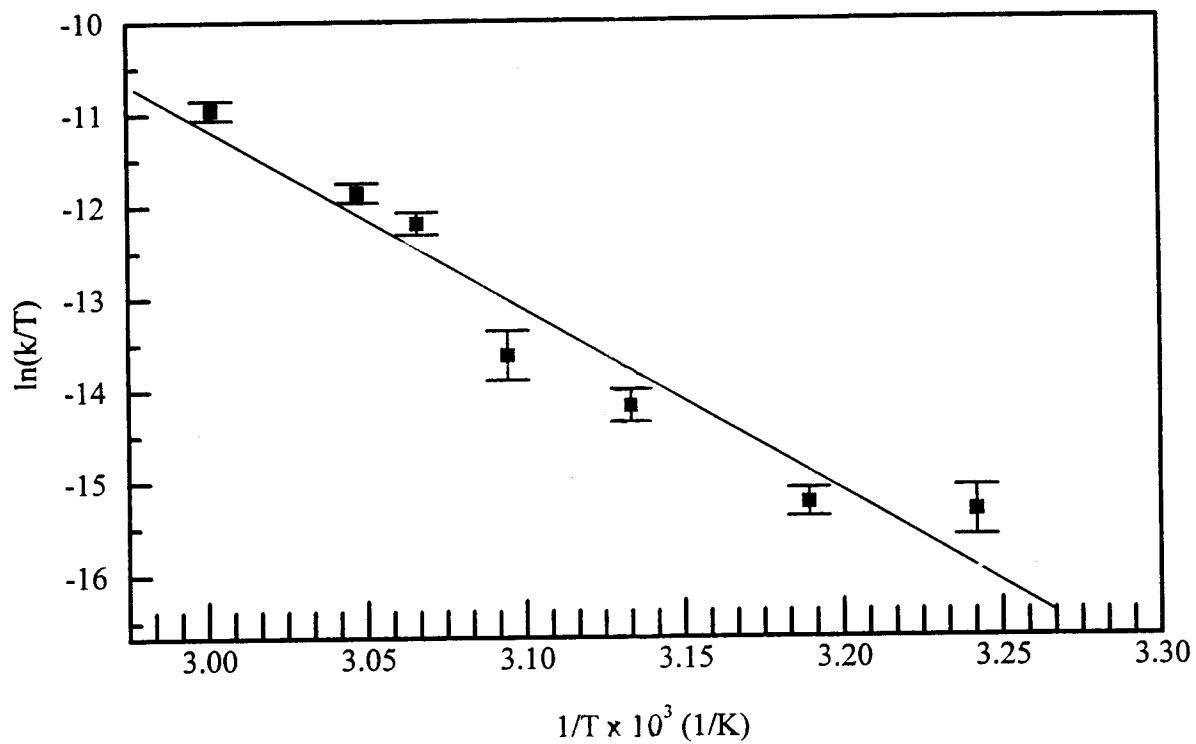


Fig. 4.1. Gráfica de Eyring para la cinética de desnaturalización térmica, seguida por el monitoreo de la elipticidad a 220 nm

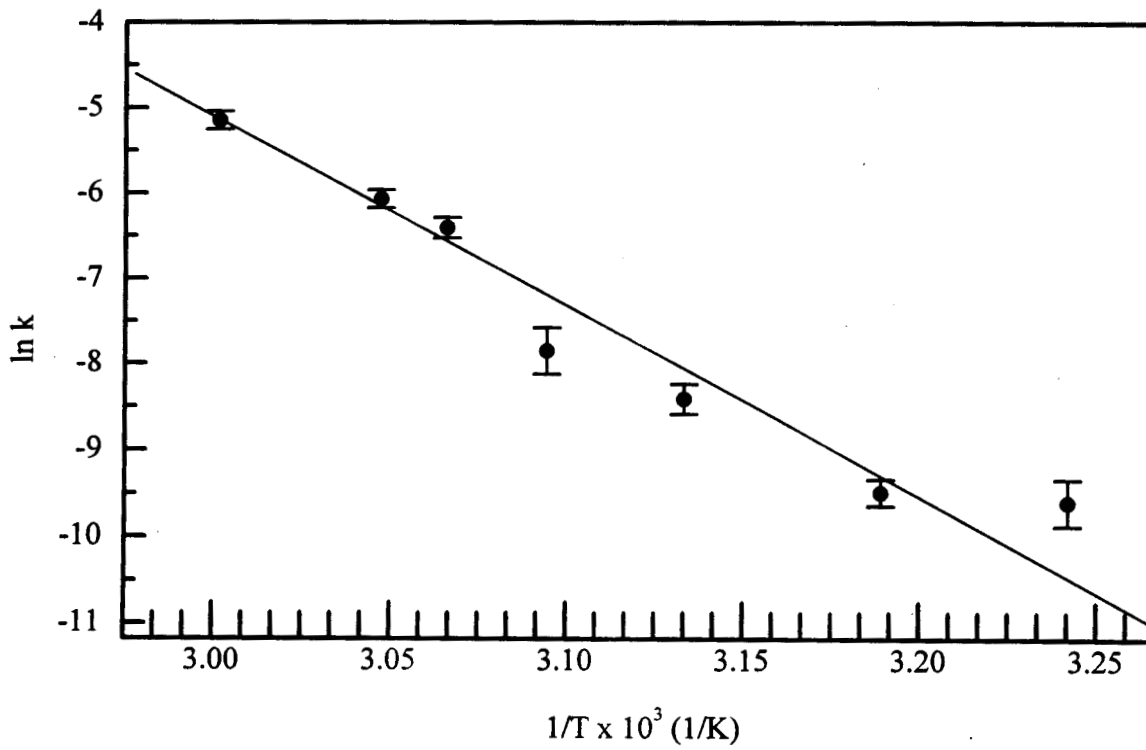


Fig. 4.2. Gráfica de Arrhenius para la cinética de la desnaturalización térmica de bromelaina de tallo, seguida por el monitoreo de la elipticidad a 220 nm

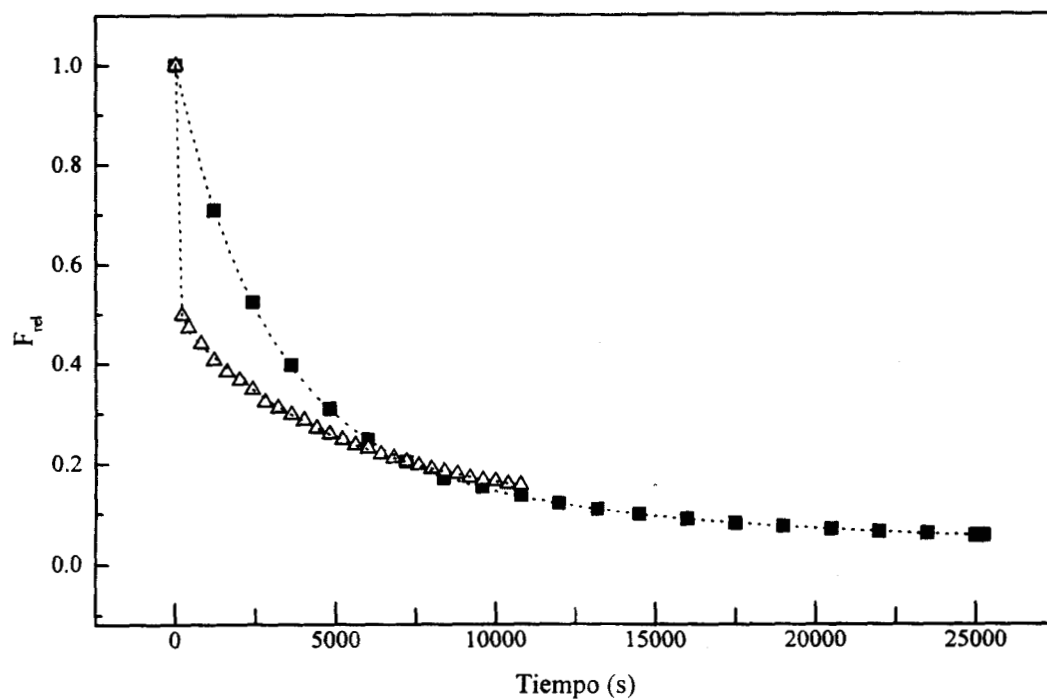


Fig. 4.3 Gráfica representativa de los datos obtenidos de la cinética seguida por fluorescencia: Δ , temperatura de 36.5°C; \blacksquare , temperatura de 59.5°C. Las líneas punteadas representan el ajuste por medio de una ecuación doble exponencial (3.2.33). ($\lambda_{\text{exc.}}$ 280 nm, $\lambda_{\text{emis.}}$ 340 nm).

De acuerdo con los resultados que se observan, la primera constante (k_1) corresponde a una fase cinética rápida, que debe aplicarse a la aparición de un estado desnaturalizado completo, sobre todo si se compara con la energía de activación reportada por Arroyo y Hernández en su trabajo [9] en donde comprueban el modelo irreversible de dos estados para la desnaturalización de la bromelaína de tallo. La segunda constante (k_2) se refiere a una fase lenta.

La tabla III muestra una compilación de los parámetros de activación, de acuerdo a las teorías de Eyring y Arrhenius. Con excepción de la segunda fase cinética en fluorescencia, todos los demás valores son similares entre sí.

En cuanto a la magnitud de los valores de la segunda fase cinética, observamos que estos no corresponden a una transición de desplegamiento, estos valores pudieran deberse a un simple cambio conformacional, a una reacción de la especie desnaturalizada o a una ligera variación cinética en el mecanismo de desplegamiento.

En la tabla II se puede observar, que las constantes de velocidad para esta fase varían muy poco, conforme aumenta la temperatura.

Tabla III

Parámetros termodinámicos del desplegamiento de bromelaína de tallo obtenidos por dicroísmo circular y fluorescencia.

Técnica	E_a (kJ mol ⁻¹)	$\Delta^\ddagger H$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta^\ddagger S$ (J K ⁻¹ mol ⁻¹)
DC	184.42±17.34	182.02±17.33	313.32±53.34
Flr. (1° fase cinética)	164.47±10.27	161.88±10.27	262.51±32.01
Flr. (2° fase cinética)	46.43±2.81	43.76±2.82	-129.64±8.55

La figura 4.4 nos ilustra una gráfica de Eyring para la primera y segunda fases cinéticas en fluorescencia, para el desplegamiento de la bromelaína de tallo. El ajuste para la primera fase (k_1) es bueno, obteniéndose un factor de correlación de 0.97. Mientras que en el ajuste para la segunda fase (k_2) hay un ligero desplazamiento, con 0.96 de factor de correlación.

Una gráfica comparativa de Arrhenius para el desplegamiento de la bromelaína de tallo, monitoreada por DC y fluorescencia, se muestra en la figura 4.5, donde se puede apreciar que los datos de DC, tienen una tendencia muy parecida a la de los datos de la primera fase cinética detectada en fluorescencia.

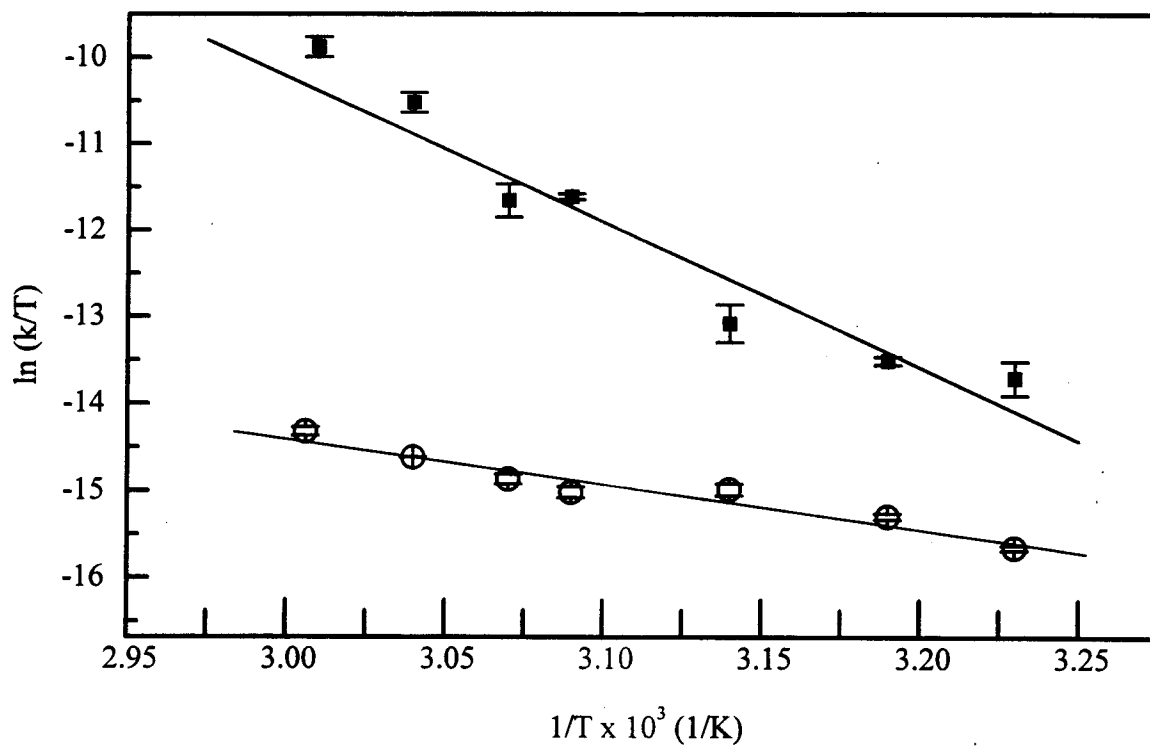


Fig. 4.4. Gráfica de Eyring para las dos fases cinéticas de desplegamiento detectadas por fluorescencia: k_1 (■), k_2 (○). (λ_{exc} . 280 nm, λ_{emis} . 340 nm).

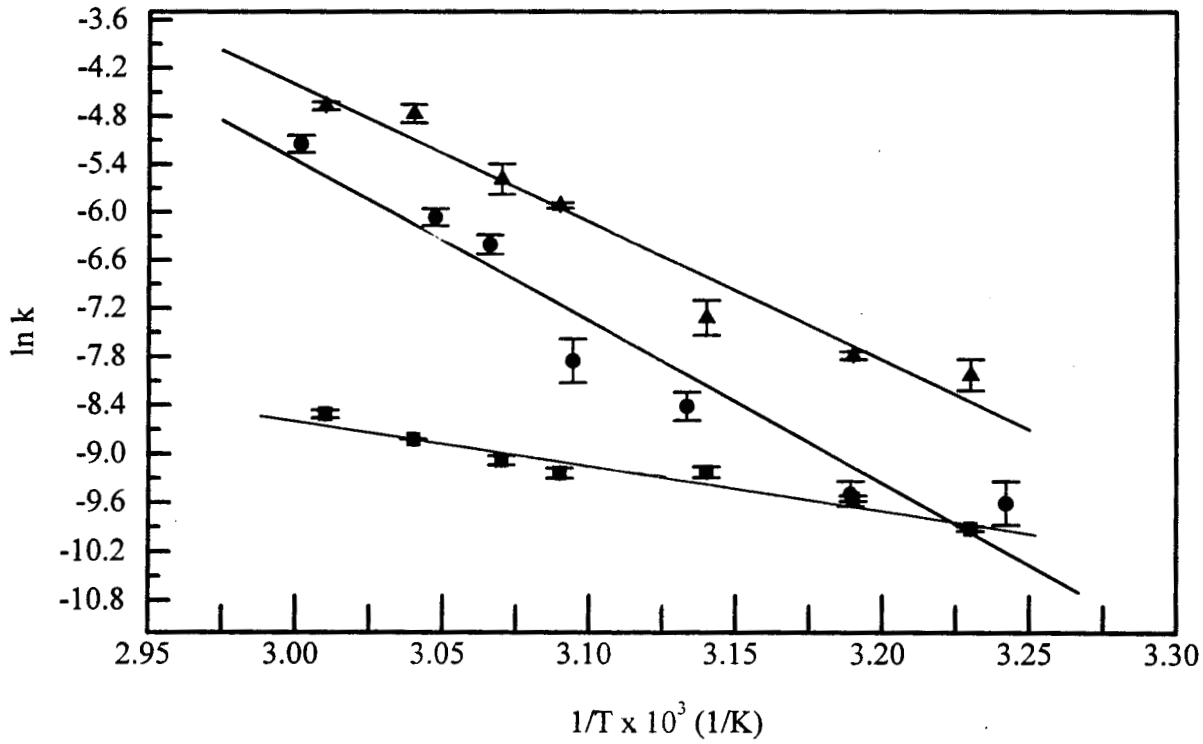


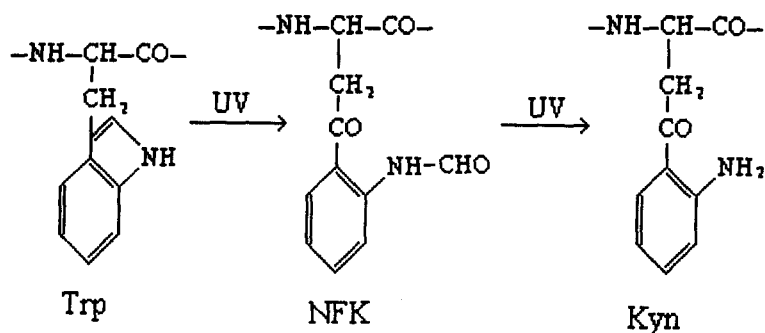
Fig. 4.5. Gráficas comparativas de Arrhenius para la desnaturalización térmica de la bromelaina de tallo a pH de 3.4, monitoreadas por: ●, datos de dicroísmo circular (DC); ▲, datos de fluorescencia, primera fase (k_1); ■, datos de fluorescencia, segunda fase (k_2).

4.2 Fotooxidación

Espectros de Fluorescencia

Los espectros de emisión de fluorescencia de bromelaína nativa y de bromelaína irradiada desnaturalizada, se efectuaron a una longitud de onda de excitación de 325 nm. Tal como se ilustra en la figura 4.6, los espectros de bromelaína desnaturalizada (a 60 y 37.7°C) revelan la producción de nuevos productos fluorescentes, ya que la bromelaína nativa no emite en el intervalo de 360-500 nm. Espectros similares son descritos por Pigault y Gerard [12].

La N-formilquinurenina (NFK) y la quinurenina (Kyn) son fotoproductos que pueden aparecer (entre otros) como consecuencia de la fotólisis de los triptófanos presentes en bromelaína de tallo, debido a la exposición de los rayos UV; tal y como se muestra en la siguiente reacción:



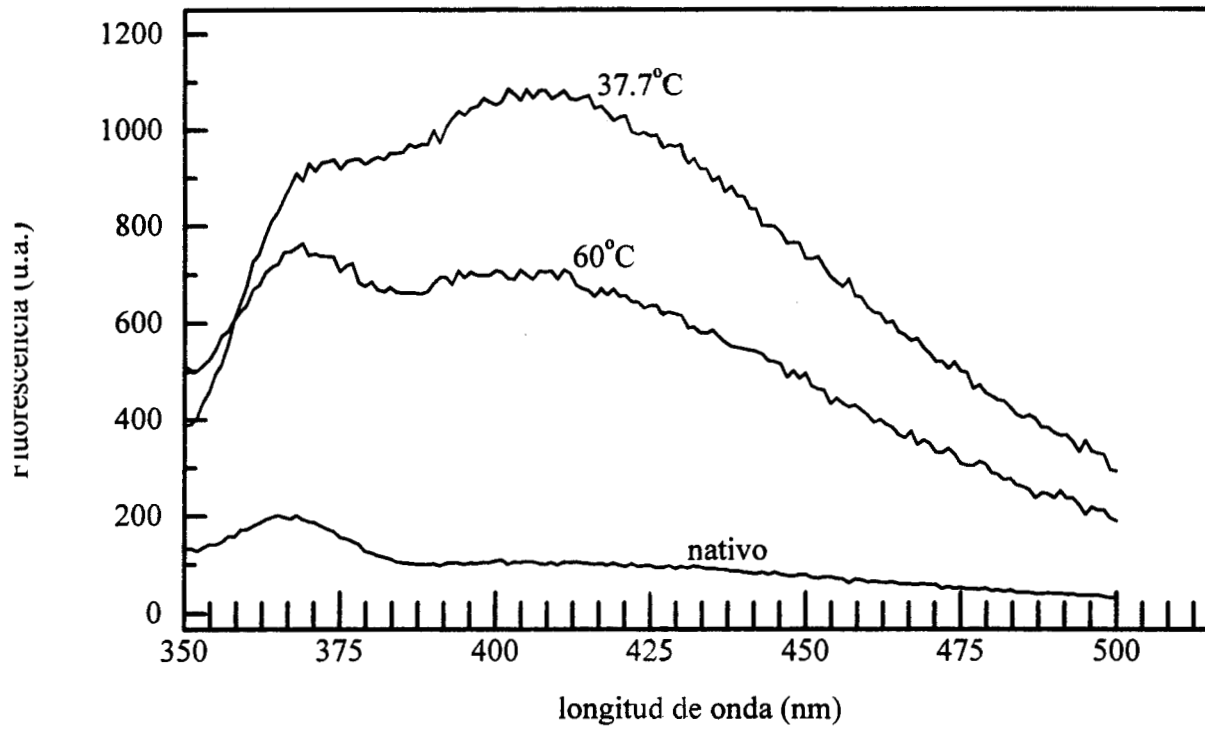


Fig. 4.6. Espectro comparativo de fotoproductos, con la muestra nativa a dos diferentes temperaturas (λ_{exc} 325 nm).

Espectros de Absorción

Los espectros UV de bromelaína antes y después de los experimentos cinéticos de fluorescencia se ilustran en la figura 4.7. Se observan incrementos de absorbencia para la proteína desnaturalizada en todo el intervalo espectral estudiado. Se ha reportado que los cambios observados en los espectros de absorción de algunas proteínas después de la irradiación se deben a la destrucción del triptófano, fotooxidación del trp y dispersión de luz [12].

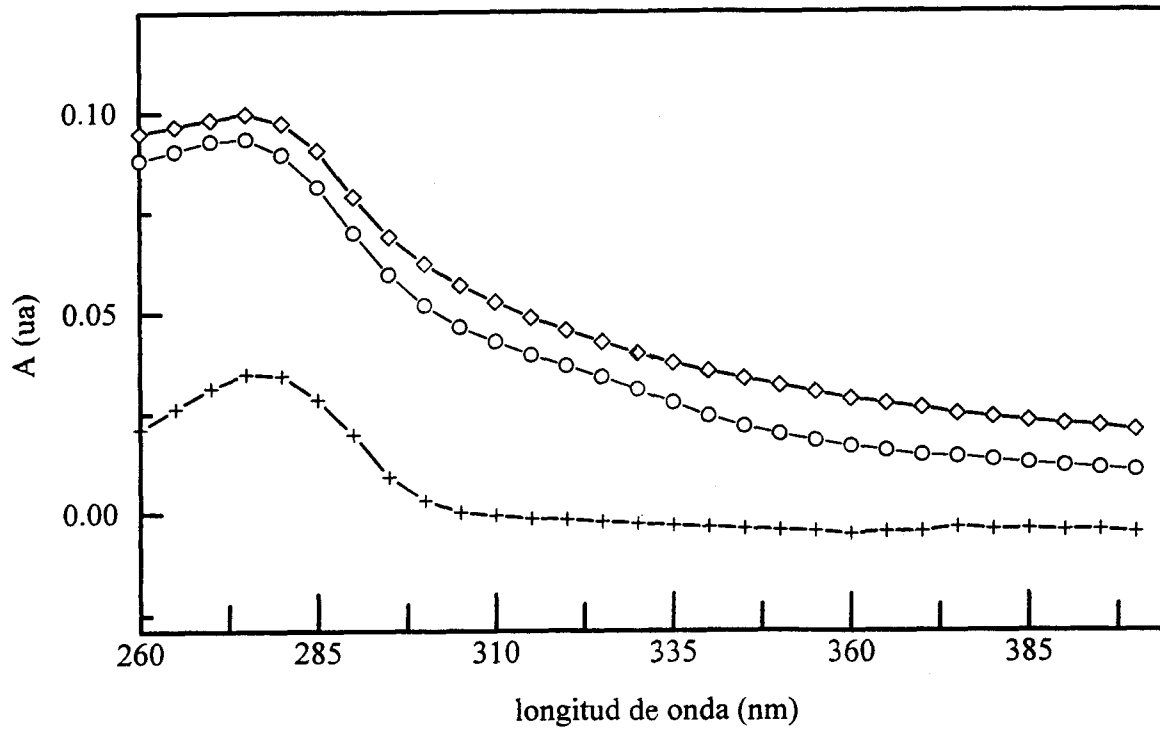


Fig. 4.7. Espectro UV comparativo del grado de absorbencia de la muestra fotooxidada a dos diferentes temperaturas con la muestra nativa: O, fotooxidación a 50°C; ◇, fotooxidación a 37°C; +, muestra nativa. En las dos primeras temperaturas, los espectros fueron obtenidos después de haber enfriado la muestra a temperatura ambiente.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en DC, se puede confirmar que el modelo de desplegamiento para la bromelaína de tallo a pH 3.4, sigue un mecanismo cinético de dos estados, y que este es irreversible.

Al analizar los resultados de emisión de fluorescencia se observó un mecanismo cinético de desplegamiento de tres estados, con una constante de velocidad para cada transición. Si observamos los parámetros de activación, se nota claramente que los valores de la segunda fase cinética no corresponden a una transición de desplegamiento. Además experimentalmente, el método ha hecho notar que hay una reacción de fotólisis donde aparecen fotoproductos (probablemente NFK y otros productos de fotodegradación), que obviamente reflejan su existencia por medio de absorción de luz a una longitud de onda donde las proteínas normalmente ya no absorben y además a través de una transición, la cual seguramente corresponde a la segunda fase cinética que se observa en la fluorescencia, por lo que el modelo (3.2.1) muy bien pudiera escribirse ahora como:



Donde D' corresponde a un estado fotooxidado de la especie desnaturalizada.

La figura 5.1, nos da una mejor visualización de lo que esta ocurriendo mientras va pasando el tiempo del desplegamiento de la proteína nativa:

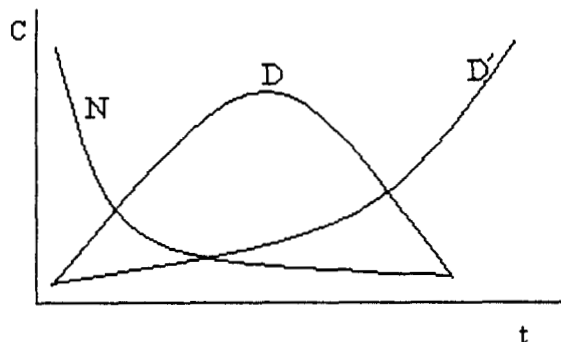


Fig. 5.1. Esquema de la aparición de un estado fotooxidado de la especie desnaturalizada **D'**.

En la figura 5.1, se observa que conforme transcurre el tiempo, la especie nativa va desapareciendo, para dar lugar a un estado desnaturalizado y que al mismo tiempo, este va siendo fotooxidado. Es importante hacer notar que cuando **D** esta a un tiempo máximo, la concentración de **D'** es pequeña, lo cual pudiera deberse a una ausencia de estructura secundaria y terciaria en **D'**.

Queda bastante claro, que la única fase cinética detectada por DC, corresponde a la primera fase observada por fluorescencia (ver fig. 4.5), es decir que **D** y **D'**, -dadas las concentraciones utilizadas (16 μ g/ml), son indistinguibles una de otra por dicroísmo circular [27].

En investigaciones experimentales previas, donde trabajaron con el método de DC, utilizando a la quimopapaína [26] la cual pertenece a la misma familia de la bromelaína de tallo, se encontró que la cinética de desnaturalización se ajustaba muy bien a una reacción irreversible de primer orden y de dos estados, así como que no ocurría una fase rápida durante el tiempo muerto de mezclado.

5.2 Desnaturalización de la bromelaína de tallo

Evidentemente la desnaturalización térmica de la bromelaína de tallo se ve afectada por la exposición de la misma a los rayos UV. Así entonces la contribución de la fotooxidación de la proteína a la desnaturalización de la misma, es digna de tomarse en cuenta, ya que como se ha visto dependiendo de la cantidad de los triptófanos y de la posición de estos, será el grado de fotooxidación de la proteína, lo cual se verá reflejado en la posible aparición de fotoproductos. Estos a su vez provocarán la aparición de bandas en los espectros de la proteína ya desnaturalizada y enfriada a la temperatura ambiente.

Al revisar los parámetros de activación vemos que el efecto de la fotooxidación se refleja directamente en la segunda fase cinética detectada en fluorescencia, cuyos valores como ya se dijo antes no son propios de una transición efectiva de desplegamiento [28].

Por otro lado, el efecto global que tiene el incremento de la temperatura sobre la proteína es mucho mayor que la fotólisis provocada por la irradiación UV, por lo que el gasto energético del proceso de desnaturalización resulta mayor que el generado por la fotooxidación, aún así los parámetros de activación de este último proceso, pudieran provocar una disminución general de los valores considerados únicamente para la desnaturalización, sobre todo si se tiene en cuenta que la fotooxidación ocurre desde el principio.

Por lo que aún dentro de la misma familia a la cual pertenece la bromelaína de tallo, es importante considerar el grado de fotooxidación que pudiera ocurrir, como consecuencia de la presencia de triptófanos.

5.3 Perspectivas

Para este trabajo sería deseable, haber conocido la estructura tridimensional de la bromelaina de tallo para saber con exactitud la posición de los cinco triptófanos, e ir visualizando como es que estos quedan expuestos conforme se va perdiendo la estructura secundaria al avanzar el desplegamiento, como consecuencia de un incremento en la temperatura; ya que no se sabe cuantos y sobre todo cuales de los triptófanos son los fotooxidados. Así los cambios en la fluorescencia del triptófano pudieran ser interpretados en términos estructurales.

Es importante aclarar que dependiendo del tiempo de exposición a los rayos UV y a la estabilidad de la N-formilquinurenina (NFK) formada, pudiera aparecer otro fotoproducto secundario, la quinurenina (Kyn), tal y como se muestra en la reacción de la pagina 49.

Como perspectiva a futuro para complementar este trabajo, queda el de dilucidar el mecanismo de transición de la segunda fase cinética revelada en el método de fluorescencia, así como el cuantificar e identificar plenamente a los fotoproductos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. y Cox, M. M. (1993) *Principios de Bioquímica*, 2ª edición, Ed. Omega, Barcelona, España. pp. 160-161
 - 2.- Cantor, C. R. and Schimmel, P. R., (1980) *Biophysical Chemistry Part I: The conformation of biological macromolecules*, 1ª ed., W. H. New York, Freeman. Cap. 2
 - 3.- Creighton T. E. (1993) *Proteins, Structures and Molecular Properties*. Ed. N. H. Freeman and Co. USA. pp. 171
 - 4.- *Methods in Molecular Biology*, (1995) vol. 40: *Protein Stability and Folding: theory and practice*. Edited by B. A. Shirley. Humana Press Inc., Totowa, NJ. pp. 5-6, 52-55, 317-318
 - 5.- Creighton, T. E., (1994) The Protein Folding Problem. En *Mechanisms of Protein Folding*. Pain, R.H., Ed. Oxford University Press. USA. pp. 1-25
 - 6.- Sanchez-Ruiz, J. M. (1992) *Biophys. J.* **61**: 921-935
 - 7.- Hennessey, J. P. y Johnson, W. C. (1981) *Biochemistry*. **20**: 1085-1093
-

- 8.- Protein structure a practical approach (1989) 1^a ed., Edited by T. E. Creighton. 264-285
 - 9.- Arroyo-Reyna, A. y Hernández-Arana, A. (1995) *Biochim. Biophys. Acta.* **1248**: 123-128
 - 10.- Eftink, M. R. (1994). *Biophys. J.*, **66**: 482-501
 - 11.- Sellers, R. y Ghiron, C. A. (1973) *Photochem. and Photobiol.* **18**: 393-401
 - 12.- Pigault, C. y Gerard, D. (1984) *Photochem. and Photobiol.* **40**: 291-296
 - 13.- Tassin, J. D. y Borkman, R. F. (1980) *Photochem. and Photobiol.* **32**: 577-585
 - 14.- Chen, Y. y Barkley, M. D. (1998) *Biochemistry.* **37**: 9976-9982.
 - 15.- Creed, D. (1984) *Photochem. and Photobiol.* **39**: 537-562
-

- 16.- Ritonja, A., Rowan, A. D., Buttle, D. J., Rawlings, N. D., Turk, V. y Barrett, A. J. (1989) *FEBS Letters*. **247**: 419-424
 - 17.- Arroyo-Reyna, A., Hernandez-Arana, A. y Arreguin-Espinosa, R. (1994) *Biochem. J.* **300**: 107-110
 - 18.- Rowan, A. D., Buttle, D. J. y Barrett, A. J. (1990) *Biochem. J.* **266**: 869-875
 - 19.- Heinicke, R. M. y Gortner, W. A, (1957) *Econ. Botany*, **11**: 225-234.
 - 20.- Murachi, T. y Neurath, H. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**: 99-107
 - 21.- Ota, S., Muta, E., Katahira, V. y Okamoto, V. (1985) *J. Biochem. Tokio*. **98**: 219-228
 - 22.- Creighton, T. E. (1979) *J. Mol. Biol.* **129**: 235
 - 23.- Connors, K. A. (1990) *CHEMICAL KINETICS: The study of reactions rates in solution*. 1^a ed. VCH Publishers, Inc. USA, pp. 66-67, 187-188
-

- 24.- Levine, I. N. (1996) Fisicoquímica vol. 2. Ed. McGraw-Hill, 4^a ed. España, pp. 921-922.
- 25.- Campbell, I. D. y Dwek, R. A. (1984) BIOLOGICAL SPECTROSCOPY. The Benjamin/Cummings Publishing, Co., Inc., Menlo Park, USA, CA. pp. 96-98
- 26.- Solís-Mendiola, S., Gutiérrez-Gonzalez, L. H., Arroyo-Reyna, A., Padilla-Zuñiga, J., Rojo-Domínguez, A. y Hernandez-Arana A. (1998) *Biochim.Biophys. Acta.* **1338**: 363-372
- 27.- Okajima, T., Kawata, Y. y Hamaguchi, K. (1990) *Biochemistry.* **29**: 9168-9175
- 28.- Cavagnero, S., Zhou, Z. H., Adams, M. W. W. y Chan, S. I. (1998) *Biochemistry.* **37**: 3377-3385
-