

183
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

ESTUDIO VOLUMETRICO DE LA DESNATURALIZACION DE LISOZIMA CON UREA E HIDROCLORURO DE GUANIDINA

T E S I S

Que para obtener el título de
INGENIERO QUIMICO

p r e s e n t a

BERNARDO YAÑEZ SOTO



México, D. F.

1998

263748

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Biblioteca Central

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

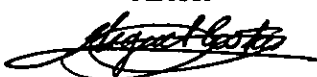
Jurado asignado:

Presidente:	Prof. Costas Basín Miguel Antonio
Vocal:	Prof. Vázquez Ramos Jorge Manuel
Secretario	Prof. Muñoz Clares Rosario Adelaida
1er. Suplente	Prof. Gavilanes Ruiz Marina
2o. Suplente	Prof. Trejo Candelas Luis Miguel

Lugar en donde se desarrolló el tema:

**Laboratorio de Termofísica
Departamento de Física y Química Teórica
División de estudios de posgrado
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México**

Asesor



Miguel Antonio Costas Basín

Supervisor Técnico



Daniel Alejandro Fernández Velasco

Sustentante



Bernardo Yañez Soto

A aquellos que cultivan la razón.

¡Imagina un mundo de gases ideales,
de cuerdas sin peso, de C_p constantes!
¡Evaluar las fases sin usar viriales,
sin diferenciales, factor integrante,
cálculo numérico o reacciones reales!

¡Un mundo perfecto, sin iteraciones!
¡Un mundo resuelto con dos ecuaciones!
¡Imagina un mundo sin complicaciones,
en que Bird y Prautznitz toman vacaciones
y dejan volar todas sus pasiones!

¡Un mundo en que no haya nunca un Runge-Kutta,
y nunca ningún anfolito dismuta!
¡Un mundo en que Procter a todos recluta,
y en que nos enseñan a seguir la ruta
pa' ching%\$ a todos los hijos de pu*# !

¡Ese mundo es falso:...el mundo es cule@\$!
¡Ese mundo falso que yo siempre espero
puedes tu metértic#% por el agujer%& !
Sin él te aseguro que yo no me muero:
No lo necesito... ¡Pues soy INGENIERO!

B. Y. S.

AGRADECIMIENTOS:

Al programa DGAPA IN103596 por la beca disfrutada.

A Miguel y Alejandro, por su apoyo, su paciencia y sus recomendaciones. Al Dr. Bazúa por sus consejos y por esas veces en que salimos de su oficina a medianoche.

A TEMOLA, y todos los que forman parte de ella, por permitirme terminar mi tesis mientras trabajaba.

A Fabrizio, porque si no fuera por él, yo no sabría tantas cosas sobre las mujeres (aunque sea pura teoría). A Augusto, al Negro, al Biro, al Mier, al Chema, y a todos los cuates de la facultad que no haya mencionado (hasta el Niñodonte, que todos sabemos qué es...), por hacer que las clases fueran bastante más escandalosas de lo normal. A Charlie, Susana, Maru, Silvia, por la compañía que me hacían cuando tenía que medir densidades. A Edurne y Sheila, por haber sido tan buenas amigas conmigo. A Wawis y a Elisa por haberme acompañado al gimnasio (aunque hayan sido sólo 2 veces). A Laura Verduzco por aquellas idas al cine.

A toda mi familia por haberse aguantado las ganas de verme recibido. Espero que haya valido la pena. A los Meli, por adoptarme como un miembro más de su familia.

Especialmente a Fofi, por las alegrías, los apapachos, y por haberme ayudado con los experimentos, aunque la hayan regañado en su casa por llegar tarde (regañó que, dicho sea de paso, también me tocó a mí).

Finalmente, a todos los que no haya mencionado, pero que sientan que algo tengo que agradecerles.....

!!!GRACIAS!!!

INDICE

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

- a) Objetivos..... 5
- b) Estructura de este trabajo..... 6

II. FUNDAMENTOS DE LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS Y DEL PROCESO DE DESNATURALIZACIÓN

- a) Aminoácidos y proteínas..... 8
- b) Conformación de las proteínas..... 16
- c) Desnaturalización..... 20
- d) Lisozima de clara de huevo..... 22

III. CAMBIOS EN EL VOLUMEN ESPECÍFICO DE LAS PROTEÍNAS DURANTE LA DESNATURALIZACIÓN

- a) Volumen aparente..... 25
- b) Resumen de resultados en la literatura..... 29

IV. METODOS EXPERIMENTALES

- a) Preparación de las soluciones..... 33
- b) Mediciones densimétricas..... 36

V. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

a)	Cálculo de volúmenes aparentes.....	39
b)	Comparación con resultados en la literatura.....	42
c)	Modelo de la esfera porosa.....	45
d)	Análisis para la mezcla de urea e hidrocloreuro de guanidina.....	60

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFÍA

APÉNDICES

I.- INTRODUCCIÓN GENERAL.

La estructura tridimensional de las proteínas puede ser estudiada a través de la desnaturalización de éstas. La desnaturalización es el proceso mediante el cual la proteína pierde su estructura funcional ó nativa y puede producirse por cambios de temperatura, pH, presión o con la adición de sustancias conocidas como desnaturalizantes, entre los que se encuentran la urea, el hidrocloreuro de guanidina y el tiocianato de guanidina. El estudio de la desnaturalización por medio de la medición de los volúmenes específicos de la forma nativa y desnaturalizada de las proteínas no es muy usado ya que algunos autores sugieren que los cambios de volumen causados por la desnaturalización son muy pequeños para poder obtener de ellos datos termodinámicos²⁰.

a) Objetivos

El objetivo del presente trabajo es el estudio de la desnaturalización de la lisozima obtenida de la clara de huevo, a través de la medición del cambio de volumen específico de la proteína en solución cuando se le añaden urea ó hidrocloreuro de guanidina ó una mezcla de ellos. Para ello, se midieron las densidades de soluciones de lisozima con varias concentraciones de los desnaturalizantes mencionados. En este contexto se han planteado las siguientes preguntas:

1. ¿Cómo varía el volumen específico de la lisozima con la concentración de desnaturalizante? ¿es esta variación lineal o no?

2. ¿Es posible desarrollar un modelo simple que explique y prediga el comportamiento del volumen específico durante la desnaturalización?
3. A través de los cambios de volumen durante la desnaturalización, ¿qué se puede establecer acerca de la afinidad ó interacción entre cada uno de los desnaturalizantes y la proteína?
4. ¿Son las mezclas de urea e hidrocloreuro de guanidina aditivas para la desnaturalización?

b) Estructura de este trabajo.

Este trabajo está dividido en 6 capítulos. En el capítulo II se describen las características generales de las proteínas, tales como sus bloques estructurales, su arreglo tridimensional y su desnaturalización, así como algunas de las funciones específicas de la proteína estudiada, la lisozima. En el capítulo III se explica el significado del volumen aparente y su relación con el volumen específico, así como sus usos en el estudio de proteínas. Además, se hace un resumen de las investigaciones de la desnaturalización por medio de volúmenes aparentes. En el capítulo IV se explica la metodología experimental y el tratamiento que se le dio a los datos experimentales obtenidos. En el capítulo V se propone un modelo para explicar el comportamiento de los volúmenes específicos de las proteínas durante su desnaturalización y se analizan los resultados obtenidos. Finalmente, en

el capítulo VI se reportan las conclusiones del presente trabajo y se dan algunas sugerencias para trabajo futuro.

II.- FUNDAMENTOS DE LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS Y DEL PROCESO DE DESNATURALIZACIÓN.

a) Aminoácidos y proteínas

En las células, las moléculas orgánicas más abundantes son las proteínas, ya que constituyen el 50% de su peso seco¹⁹. Su importancia estriba en ser los instrumentos moleculares con los que la información genética es expresada. Las proteínas son polímeros no ramificados de α -aminoácidos (Fig. 1), que se unen por medio de enlaces sustituidos llamados *enlaces peptídicos* (Fig. 2). A dichos polímeros se les conoce como *cadena polipeptídica*.

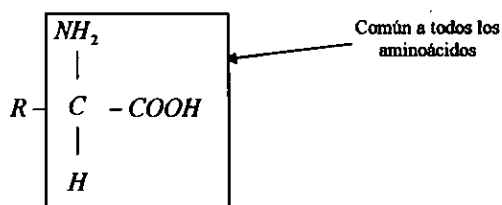


Fig. 1. Estructura de un α -aminoácido, en donde R son los residuos que forman las cadenas laterales de los péptidos.

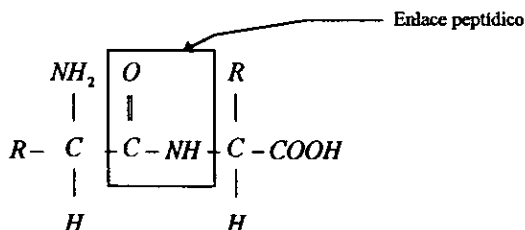
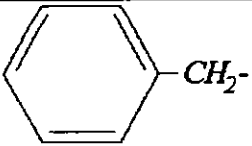
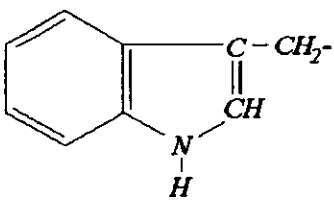


Fig. 2. Estructura de un enlace peptídico.

Existen 20 α -aminoácidos que son los encontrados con mayor frecuencia en las proteínas, y son indispensables para formar parte de la estructura de éstas. Normalmente se subdividen en los que tienen grupos R no-polares, los que tienen grupos R polares sin carga a pH neutro, y los que tienen grupos R polares, los cuales pueden ser cargados positivamente o negativamente a pH neutro. Los 20 aminoácidos más comunes son:

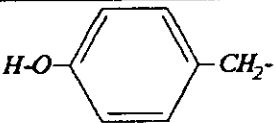
1.- Aminoácidos no polares.

NOMBRE DEL AMINOÁCIDO	RESIDUO (R)
Alanina	$\text{CH}_3 -$
Valina	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \backslash \\ \text{CH}_3 - \\ / \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Leucina	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \backslash \\ \text{CH} - \text{CH}_3 - \\ / \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Isoleucina	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $

Prolina	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{C} \\ \\ \text{H}_2\text{C} \\ \backslash \quad / \\ \text{NH} \end{array} $
Fenilalanina	
Triptofano	
Metionina	$\text{CH}_3 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 -$

2.- Aminoácidos polares sin carga a pH neutro.

NOMBRE DEL AMINOÁCIDO	RESIDUO
Glicina	$\text{H} -$
Serina	$\text{HO} - \text{CH}_2 -$
Treonina	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \\ \\ \text{OH} \end{array} $
Cisteína	$\text{HS} - \text{CH}_2 -$

Tirosina	
Asparagina	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \diagdown \\ \text{C} - \text{CH}_2 - \\ \\ \text{O} \end{array}$
Glutamina	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \diagdown \\ \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \\ \\ \text{O} \end{array}$

3.- Aminoácidos polares con carga negativa a pH neutro.

NOMBRE DEL AMINOÁCIDO	RESIDUO
Ácido aspártico	$\begin{array}{c} ^-\text{O} \\ \diagdown \\ \text{C} - \text{CH}_2 - \\ \\ \text{O} \end{array}$
Ácido glutámico	$\begin{array}{c} ^-\text{O} \\ \diagdown \\ \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \\ \\ \text{O} \end{array}$

4.- Aminoácidos polares con carga positiva a pH neutro.

NOMBRE DEL AMINOÁCIDO	RESIDUO
Lisina	$H_3N^+ - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -$
Arginina	$ \begin{array}{c} H_2N - C - NH - CH_2 - CH_2 - CH_2 - \\ \\ ^+NH_2 \end{array} $
Histidina (a pH 6.0)	$ \begin{array}{c} H-C \equiv C-CH_2- \\ \quad \quad \\ H-N \quad N-H \\ \quad \quad \quad \backslash \quad / \\ \quad \quad \quad C \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad H \end{array} $

Existen una gran cantidad de aminoácidos que son diferentes a los 20 anteriormente presentados, como la 4-hidroxiprolina, la hidroxilisina o la desmosina; pero todos son derivados de los 20 aminoácidos más frecuentes. Inclusive hay alrededor de 150 aminoácidos que se pueden encontrar en las células y los tejidos, pero no se encuentran en proteínas. Algunos ejemplos son la β -alanina, el ácido γ -aminobutírico o la β -cianoalanina. La forma cristalizada de los aminoácidos tiene un punto de fusión arriba de 200° C, y normalmente son mucho más solubles en agua que en solventes menos polares. Esto es debido a que la estructura molecular de los aminoácidos se estabiliza por fuerzas de atracción electrostáticas producidas por grupos de carga opuesta. Esto significa que en solución, los aminoácidos se comportan como iones dipolares, llamados *zwitteriones*, lo cual se confirma por las altas constantes dielécticas y sus momentos dipolares (Figuras 3 y 4):

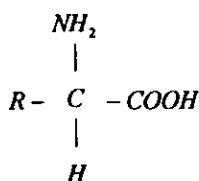


Fig. 3.- Aminoácido sin disociar

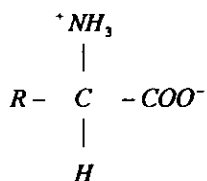


Fig 4.- Forma dipolar o zwitterión

El comportamiento ácido-base de los aminoácidos puede ser descrito en términos de la ecuación de Brønsted-Lowry, es decir, el comportamiento de un aminoácido completamente protonado es similar a un ácido dibásico, que puede donar dos protones cuando se titula completamente con una base (Figura 5), de acuerdo con las reacciones:

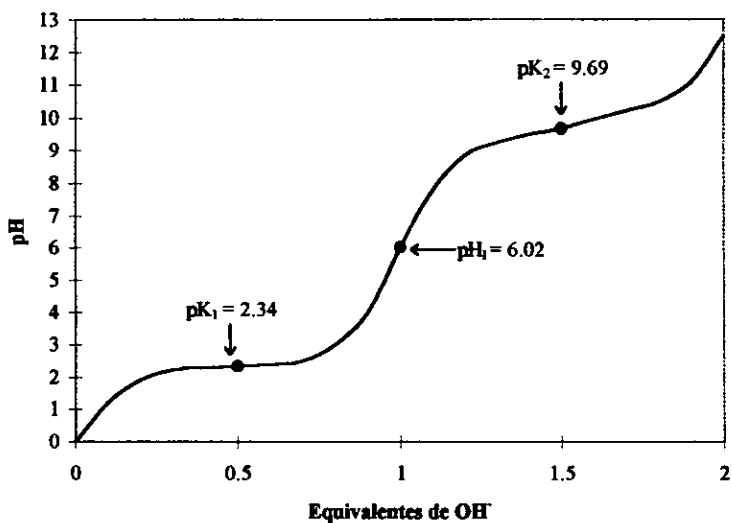
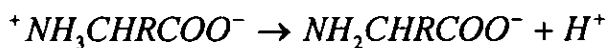
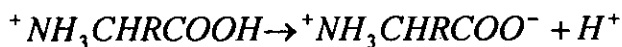


Fig. 5.- Curva de titulación de la alanina

El punto de inflexión de la curva de titulación de los aminoácidos (Figura 5) se conoce como *punto isoeléctrico* y es el punto en el que los aminoácidos se encuentran en forma de zwitteriones. A pH más bajos, la forma que predomina es la de $^+\text{NH}_3\text{CHRCOOH}$ y a pH más altos, la forma que predomina es la de $\text{NH}_2\text{CHRCOO}^-$. Cada proteína tiene un punto isoeléctrico diferente, dependiendo de su secuencia particular de aminoácidos⁴.

Para caracterizar las proteínas se puede usar su composición química, su peso molecular y su secuencia de aminoácidos¹⁹. Químicamente, las proteínas se dividen en :

- I. *Simples*. - En su hidrólisis producen únicamente aminoácidos.
- II. *Conjugadas*. - También producen otros componentes orgánicos e inorgánicos. Todos esos componentes se conocen como *grupos prostéticos*. Por sus grupos prostéticos, las proteínas conjugadas se pueden subdividir en :
 - a) Lipoproteínas (Lípidos).
 - b) Glucoproteínas (Azúcares).
 - c) Fosfoproteínas (Fosfatos).
 - d) Hemoproteínas (Hierro).
 - e) Flavoproteínas (Flavina).
 - f) Metaloproteínas (Otros metales).

Funcionalmente, se dividen en:

- **Enzimas:** Son el grupo más numeroso de proteínas. Su función es ser catalizadores de reacciones. Algunos ejemplos son la ribonucleasa, que hidroliza el RNA; la tripsina, que hidroliza algunos péptidos, y el citocromo C, que transfiere electrones.
- **Proteínas estructurales:** Son el siguiente grupo en número. Su función es ser elementos estructurales de los tejidos, tales como la α -queratina del pelo, uñas y garras; la elastina de los ligamentos y el colágeno de la piel, tendones y huesos.
- **Proteínas contráctiles:** Son elementos esenciales de los sistemas contráctiles y móviles; como la actina y la miosina de los músculos.
- **Proteínas de transporte:** Estas proteínas son capaces de unirse a moléculas específicas y transportarlas por la sangre. Algunos ejemplos son la hemoglobina, que transporta O_2 a través de la sangre de los vertebrados ó la albúmina, que transporta ácidos grasos del tejido adiposo a otros órganos.
- **Hormonas:** Son proteínas que tienen una gran actividad biológica. Entre ellas están la somatotropina, la hormona de crecimiento de la glándula pituitaria; o la insulina secretada por el páncreas, que regula el metabolismo de la glucosa.
- **Proteínas protectoras:** Son moléculas que se producen en la sangre de los vertebrados cuando se exponen a un antígeno, que es una proteína u otra macromolécula ajena a la especie. Estas proteínas, conocidas como anticuerpos son específicas al antígeno al que el individuo se expuso, y normalmente se adhieren a él, formando una estructura insoluble llamada estructura antígeno-anticuerpo.

- **Proteínas de almacenaje:** Son proteínas cuya función es ser fuente de aminoácidos. Algunos ejemplos son la ovalbúmina de la clara de huevo, o la caseína, una proteína de la leche.
- **Toxinas:** Son moléculas fabricadas por los individuos para protegerse a sí mismos, o para matar otras especies. Generalmente son péptidos. Algunos ejemplos son los venenos de serpientes, o el aceite de ricino.

b) Conformación de las proteínas

Los enlaces simples de las moléculas orgánicas tienen una libertad de rotación, lo cual hace que puedan existir un número sumamente grande de configuraciones. A pesar de esto, sólo una configuración es la más estable y una es la más inestable⁵. Un ejemplo muy claro es el caso de la molécula de etano ($\text{CH}_3\text{-CH}_3$), cuyo enlace simple gira libremente. En esta molécula, la configuración más estable es la alternada y la más inestable es la eclipsada (Fig. 6).

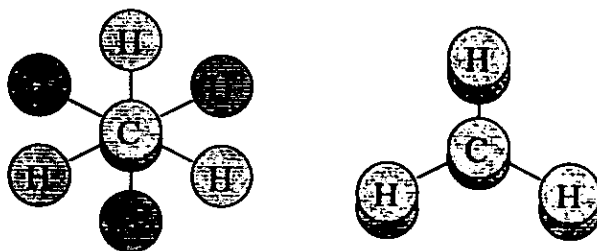


Fig 6.- Configuraciones alternada y eclipsada de la molécula de etano ($\text{CH}_3\text{-CH}_3$)

En el caso de las proteínas, las cadenas polipeptídicas teóricamente se unen por medio de enlaces simples. Sin embargo, en 1939 Linus Pauling y R. B. Corey llegaron a la conclusión de que los enlaces N-C de las cadenas polipeptídicas tienen un carácter de doble enlace parcial, puesto que son más cortos que los enlaces N-C normales, por lo que no giran libremente. Esto restringe la libertad de conformación de las proteínas; pero aún así puede haber un número enorme, prácticamente infinito de configuraciones. No obstante, se ha demostrado que la cadena polipeptídica de una proteína tiene únicamente una conformación bajo condiciones normales de temperatura, pH y presión y ésta es llamada *conformación nativa*. Esta configuración es más estable que otras formas posibles. De hecho, las proteínas son moléculas muy especiales por las siguientes propiedades que las definen:

1. Como es un polímero largo, consistente en varios cientos ó miles de átomos, es un sistema macroscópico desde el punto de vista físico⁴.
2. Aunque en solución existen fluctuaciones; en su estado nativo cada átomo de las proteínas ocupa una posición definida, como en un cristal, con la diferencia de que la posición de cada uno de los átomos es única relacionada con los átomos vecinos, lo cual hace que sea una nueva clase de sistema macroscópico con un orden aperiódico⁴.
3. Una proteína se sintetiza como un polímero heterogéneo lineal de diferentes aminoácidos, unidos por enlaces peptídicos en un orden genéticamente determinado. Esta cadena se acomoda en una posición única, determinada por la secuencia de aminoácidos. Su acomodo en tercera dimensión es un proceso reversible dependiente de las condiciones ambientales⁴.

Para facilitar el estudio de la estructura de las proteínas ésta se ha dividido en cuatro niveles:

- *Estructura primaria* : Es la secuencia de aminoácidos en una proteína.
- *Estructura secundaria* : Son las α -hélices y hojas- β contenidas en una proteína
- *Estructura terciaria* : Es el arreglo tridimensional completo de la proteína.
- *Estructura cuaternaria* : Es el arreglo espacial de las proteínas oligoméricas.

Estructura secundaria:

Una de las estructuras más comúnmente encontradas en las proteínas son las α -hélice. Éstas son las estructuras tridimensionales más simples en las proteínas, y constan de vueltas repetitivas con una periodicidad de aproximadamente 5.0 a 5.5 Å, formando hélices compactas. Los grupos residuales R de los aminoácidos se extienden hacia afuera de la hélice compacta. Esta estructura es muy estable gracias a los puentes de hidrógeno formados entre los átomos de hidrógeno unidos al átomo de nitrógeno del enlace peptídico del primer aminoácido de la secuencia (el cual es muy electronegativo) y los átomos de oxígeno del grupo carbonilo del cuarto aminoácido de la secuencia. De esta manera se forman hélices como la que se muestra en la Fig. 7

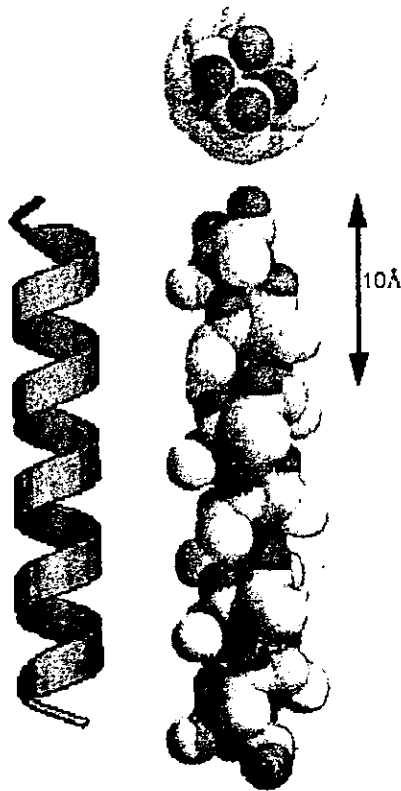


Fig. 7.- α -hélice.

Estructura terciaria:

Algunas de las fuerzas que estabilizan la estructura terciaria de las proteínas son⁴:

- Puentes de hidrógeno formados entre los O y los H de los grupos peptídicos, no de los residuos. Estos enlaces pueden ser intracadena (α -hélices), o intercadena (hojas- β).
- Puentes de disulfuro intracadena, formados con los residuos de cisteína.

- Protección de los grupos hidrofóbicos contra el disolvente.
- Inestabilidad de las α -hélices que poseen aminoácidos que inducen puntos de inestabilidad en donde las cadenas tienden a doblarse (prolina).
- Interacciones electrostáticas

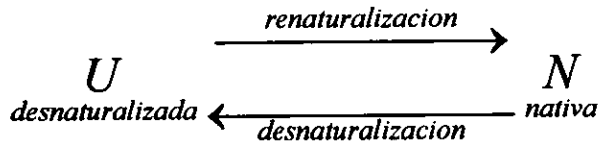
Estructura cuaternaria:

Algunas proteínas tienen más de una cadena. A éstas se les llama proteínas *oligoméricas*, y cada una de las cadenas se denominan *protómeros*. Normalmente son números pares entre 2 y 20, pero hay algunas proteínas que poseen más de 2000 (como el virus del mosaico del tabaco).

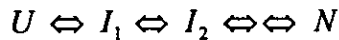
c) Desnaturalización.

La desnaturalización es el proceso mediante el cual la proteína en estado nativo pierde su estructura cuaternaria (en su caso), terciaria y secundaria. Durante la desnaturalización se pueden distinguir 2 estados: estados totalmente abiertos, expuestos al solvente, obtenidos bajo condiciones severas de desnaturalización y estados desnaturalizados compactos, obtenidos bajo condiciones leves de desnaturalización.

La desnaturalización puede ser un proceso reversible, es decir, mediante el cambio de las condiciones ambientales que provocaron la desnaturalización, la proteína regresa a su estado nativo. Esto se representa como⁴:



El proceso de desnaturalización también puede producir estados intermedios, que pueden tener cierta actividad, o no, por lo que algunos autores prefieren la representación de la desnaturalización como se muestra a continuación⁴:



Una proteína puede ser desnaturalizada cambiando varios parámetros externos:

- Aumentando o disminuyendo la temperatura
- Aumentando la presión
- Aumentando la concentración de desnaturalizante
- Aumentando o disminuyendo el pH

Normalmente las propiedades ópticas e hidrodinámicas de las proteínas a lo largo del proceso de desnaturalización son diferentes para cada tipo de desnaturalización. Eso quiere decir que la secuencia de estados (conformaciones) y el estado desnaturalizado de una proteína producido por causas térmicas no es el mismo que el producido por pH, o por desnaturalizantes. De hecho, se habla de que la desnaturalización por medio de urea o hidrocloreuro de guanidina produce estados en donde todos los grupos hidrofóbicos están expuestos, mientras que en la desnaturalización térmica, por presión o por cambios de pH quedan grupos hidrofóbicos protegidos.

d) Lisozima de clara de huevo.

La *Lisozima*, *Muramidasa* ó *Peptidoglicol-N-acetilmuramilhidrolasa* obtenida de la clara de huevo es una enzima monomérica con un número de residuos de 129 y un peso molecular de 14,307 g/mol (peso molecular según la secuencia de aminoácidos). Posee 4 puentes disulfuro intracadena establecidos por los enlaces cruzados de cisteína. El 25% de sus residuos adoptan una conformación de α -hélice. La estructura es muy compacta. Casi todos sus residuos polares están en la superficie de la molécula y en general los no-polares están dentro de la misma. El punto isoelectrico de la lisozima es de 11.35. El rango de pH en que es activa es de 6.0 - 9.0 y su actividad máxima se obtiene en un pH de 6.2. Su función es la degradación de la pared celular de las bacterias Gram-positivo, a través del rompimiento de los enlaces β -glucosídicos de sus polisacáridos¹³.

La lisozima se encuentra en abundancia en la clara de huevo de aves, aunque su función en ésta no es obvia. También se encuentra en algunas secreciones de los vertebrados, como las lágrimas, en donde sirve probablemente como un agente antibacterial debilitando y digiriendo la pared bacteriana, dejando a la bacteria muy susceptible a la lisis osmótica. La lisozima posee un sitio activo para un segmento hexosacárido de los peptidoglicoles. Dicho sitio catalítico es una hendidura localizada entre las dos mitades de la molécula¹⁴ (Fig. 8).

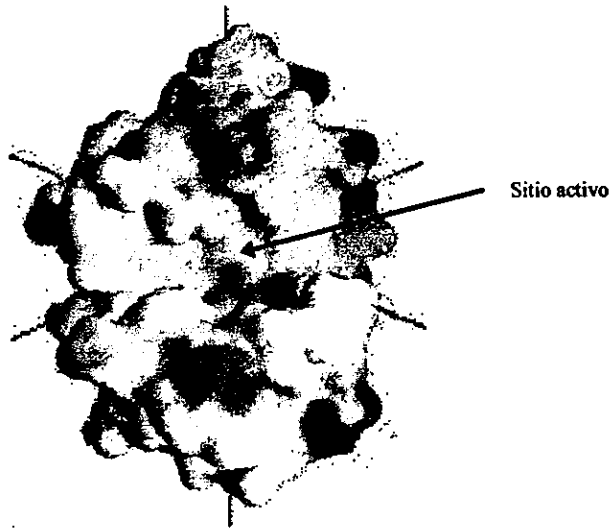
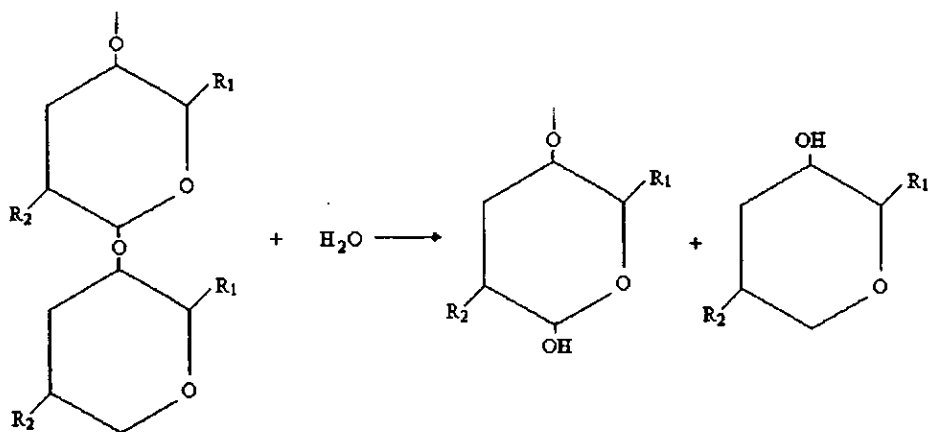


Fig. 8.- Estructura tridimensional y sitio activo de la lisozima

La lisozima cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos $1 \rightarrow 4$ del esqueleto polisacárido de las mureínas, produciendo disacáridos de N-acetil-D-glucosamina y ácido N-acetilmurámico al que están adheridos las cadenas laterales de péptidos (ej, muropéptidos), según la siguiente reacción¹⁹:



Cuando las bacterias Gram-positivas son tratadas con lisozima en presencia de un soluto como la sacarosa, la pared celular es deshecha, produciendo un protoplasto (célula bacteriana Gram-positiva, rodeada únicamente por su membrana). Los protoplastos pueden mantenerse estables mientras el medio sea hipertónico, para prevenir el hinchamiento y la ruptura de la membrana. Las bacterias Gram-negativas son menos susceptibles a la degradación por lisozima, debido a la menor proporción de peptidoglicanos, además de que tienen una envoltura. Sin embargo, al adicionar EDTA, los iones metálicos de la membrana exterior quelan, lo cual optimiza su degradación con lisozima¹⁹.

III.- CAMBIOS EN EL VOLUMEN ESPECÍFICO DE LAS PROTEINAS DURANTE LA DESNATURALIZACIÓN

a) Volumen aparente.

El volumen parcial molar del componente i-ésimo ($\bar{V}_i$) de una mezcla se define como el cambio en el volumen total de la mezcla por número de moles (n), si se le añade una cantidad infinitesimal del componente i a T y P constantes¹²:

$$\bar{V}_i = \left(\frac{\partial V}{\partial n_i} \right)_{T, P, n_{j \neq i}} \quad (1)$$

El volumen parcial específico del componente i-ésimo ($\bar{v}_i$) se define de la misma manera, sustituyendo el número de moles (n) por el de gramos (g)¹²:

$$\bar{v}_i = \left(\frac{\partial V}{\partial g_i} \right)_{T, P, g_{j \neq i}} \quad (2)$$

Por lo tanto:

$$\bar{v}_i = \frac{\bar{V}_i}{M_i} \quad (3)$$

Donde M_i es el peso molecular del componente i-ésimo. La representación gráfica del volumen parcial específico se muestra en la figura 9 para una mezcla binaria 1 (agua) + 2

(proteína); es decir, representa la derivada de cada punto de la curva que representa la variación del volumen total con los gramos agregados del componente 2:

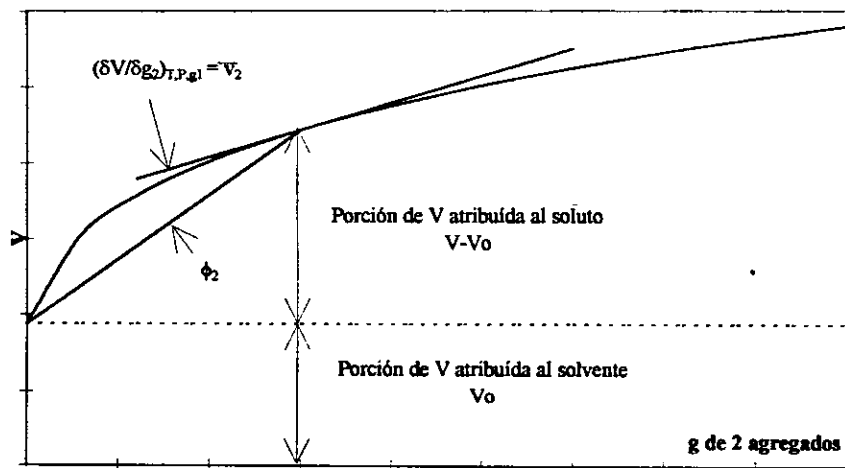


Fig. 9.- Volumen parcial específico y volumen aparente específico

Como se puede apreciar en la figura 9, el volumen de la solución ejemplo aumenta con la adición de solvente. Arbitrariamente se puede dividir el volumen total en dos porciones: la primera porción, atribuible al solvente, es el volumen del solvente puro (V_0); la segunda porción, que es la que se atribuye al soluto, es la diferencia entre el volumen total y el volumen del solvente puro ($V - V_0$). Esta porción, que aparentemente es la contribución del soluto, se divide entre la masa del mismo, para convertirlo en un valor específico. Tenemos entonces la definición del volumen aparente específico del componente 2¹⁵:

$$\phi_2 = \frac{V - V_0}{g_2} \quad (4)$$

Vo puede calcularse como el volumen específico del solvente puro (v^o), multiplicado por la cantidad de solvente puro, en gramos (g_1):

$$\phi_2 = \frac{V - g_1 v^o}{g_2} \quad (5)$$

Dividiendo todos los términos entre el peso total de la solución ($g_1 + g_2$):

$$\phi_2 = \frac{\frac{V}{g_1 + g_2} - \frac{g_1}{g_1 + g_2} v^o}{\frac{g_2}{g_1 + g_2}} \quad (6)$$

$V/(g_1 + g_2)$ es el volumen específico de la solución, que denotaremos como v ; podemos sustituir además las fracciones peso de los componentes de la solución (w_i), ya que:

$$w_i = \frac{g_i}{g_1 + g_2} \quad (\text{Solución binaria}) \quad (7)$$

Por lo tanto:

$$\phi_2 = \frac{v - w_1 v^o}{w_2} \quad (8)$$

Como $w_1 + w_2 = 1$, podemos expresar la ecuación:

$$\phi_2 = \frac{v + w_2 v^o - v^o}{w_2} = v^o - \frac{v^o - v}{w_2} \quad (9)$$

La densidad de una solución se define exactamente como el inverso del volumen específico; por lo que la ecuación (8) se puede expresar sustituyendo los valores de v y v^o por los de

$1/\rho$ y $1/\rho_s$ respectivamente, siendo ρ la densidad de la solución y ρ_s la densidad del solvente puro. La ecuación queda como sigue:

$$\phi_2 = \frac{1}{\rho_s} - \frac{\frac{1}{\rho_s} - \frac{1}{\rho}}{w_2} = \frac{1}{\rho_s} \left[1 - \left(\frac{\rho - \rho_s}{w_2 \rho} \right) \right] \quad (10)$$

La fracción masa multiplicada por la densidad es igual a la concentración de la solución (C_2), por lo que la ecuación final queda:

$$\phi_2 = \frac{1}{\rho_s} \left[1 - \left(\frac{\rho - \rho_s}{C_2} \right) \right] \quad (11)$$

Como podemos ver en la figura 9, si $(\partial V / \partial g_2)$ es constante, entonces ϕ_2 es igual a $\bar{v}_2$ a cualquier C_2 ó g_2 . Si no es constante, ϕ_2 sólo se aproxima a $\bar{v}_2$ a concentraciones C_2 infinitesimales. En el caso de las proteínas la concentración utilizada es muy pequeña, por lo que podemos decir que las dos cantidades, ϕ_2 y $\bar{v}_2$, son la misma. Entonces, para calcular ϕ_2 únicamente se tiene que medir la densidad del solvente (ρ_s), y la densidad de la solución (ρ) a diferentes concentraciones de proteína (C_2). Normalmente los resultados de ϕ_2 para varias concentraciones se grafican y se obtiene una relación lineal, cuya ordenada al origen es ϕ_2 a dilución infinita. Se puede hacer el mismo procedimiento para soluciones no-binarias, si consideramos ρ_s como la densidad de la solución sin el componente 2 (ejemplo: agua + amortiguador + sales + urea +).

El volumen parcial específico ($\bar{v}_2$) es una propiedad de las macromoléculas con una especial importancia en las áreas de la fisicoquímica y la bioquímica. Un ejemplo muy claro es la determinación de los pesos moleculares de las macromoléculas en soluciones de dos componentes, a partir de datos de ultracentrifugación. En este caso, el llamado término de flotación, es decir $(1 - \bar{v}_2 \rho_1)$, involucra al volumen específico parcial¹². En la literatura es común encontrar el uso del volumen aparente específico (ϕ_2) en lugar de $\bar{v}_2$, por las razones discutidas con anterioridad. El volumen parcial específico (o en su caso, el volumen aparente específico) es una propiedad que se usa para la caracterización de las proteínas, y existen listados muy completos de esta propiedad medida en función de diferentes variables, tales como temperatura, pH y concentración de sales¹².

b) Resumen de resultados en la literatura.

Se han hecho estudios detallados sobre la variación del volumen específico de las proteínas en solución¹². Los resultados quedan ilustrados con las investigaciones hechas con albúmina de suero bovino (BSA)⁷. Se ha encontrado que los efectos de las distintas variables son los siguientes:

- **Concentración de proteína:** Se ha detectado un ligero aumento de ϕ_2 si C_2 aumenta, y normalmente este aumento es lineal (Fig. 10A).
- **Temperatura:** En el rango de temperaturas de 4°-45° C se ha visto una tendencia lineal en el volumen específico. Este efecto de la temperatura es más pronunciado para proteínas grandes que para pequeñas. (Fig. 10B).

- **Envejecimiento o desnaturalización térmica:** El envejecimiento producido por largos periodos de almacenaje de las proteínas en solución a temperatura ambiente, o la desnaturalización a temperaturas elevadas producen una disminución en el volumen específico. Estos efectos son más pronunciados en agua que en soluciones amortiguadoras (Fig 10C).
- **Desnaturalización ácida y alcalina:** La desnaturalización a pH extremos, que produce un desdoblamiento parcial, está acompañada de disminuciones no lineales del volumen específico (Fig 10D).
- **Amortiguadores:** Los amortiguadores generalmente causan incrementos lineales de ϕ_2 , dependiendo el efecto de los componentes del amortiguador. Los amortiguadores de fosfato producen un incremento grande de ϕ_2 (Fig. 11A). A partir de este caso, la concentración de la proteína (C_2) es constante, y lo que varía es la concentración de otros componentes (C_3).
- **Adición de sales:** Como en el caso de los amortiguadores, las soluciones acuosas de sales inducen incrementos lineales de ϕ_2 , en algunos casos estos incrementos son grandes (Fig 11B).
- **Adición de azúcares o polioles:** Se reportan efectos similares a los de las sales, pero no tan grandes (Fig 11C).
- **Adición de desnaturalizantes:** Se ha hecho una gran variedad de estudios que emplean únicamente una concentración de desnaturalizante, como urea 8 M ó hidrocloreto de guanidina 6 M, para asegurar que la proteína estuviera desnaturalizada. Esos experimentos demostraron un aumento muy pequeño del volumen específico con respecto al volumen de la proteína nativa^{26, 18, 17}. En la literatura se encontró un sólo

estudio más detallado a concentraciones menores de desnaturalizante⁷, que mostró que la variación del volumen específico no es lineal; y que después de una zona en que ϕ_2 no varía mucho, se aprecia una fuerte disminución hasta llegar a un mínimo, lo que se relaciona con la desnaturalización de la proteína. A concentraciones altas de GuHCl se observa un aumento muy grande de ϕ_2 , atribuido al efecto salino de este desnaturalizante (Fig 11D).

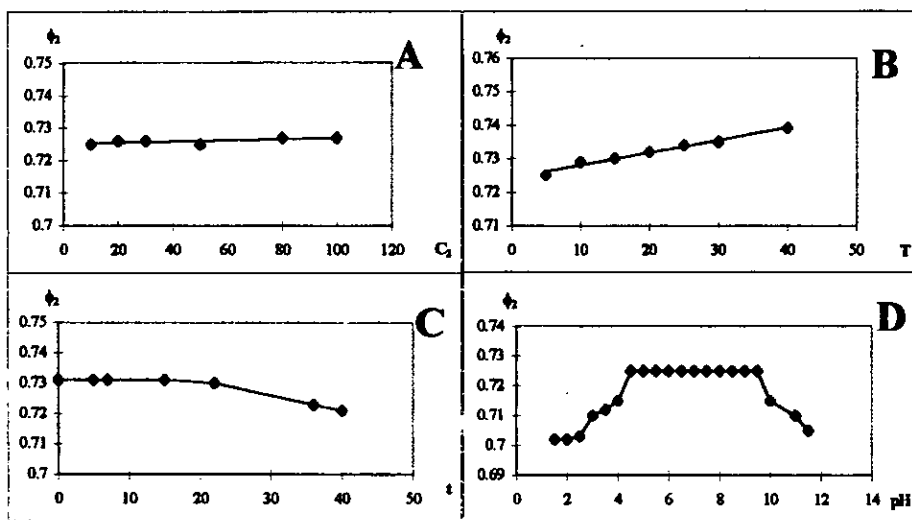


Fig. 10.- Volúmenes aparentes específicos ϕ_2 (mL/g) de albúmina de suero bovino (BSA)⁷ en agua o soluciones amortiguadoras como función de A concentración de proteína C_2 (mg/mL), B temperatura T (°C), C tiempo t (h) de envejecimiento a temperatura ambiente, D pH.

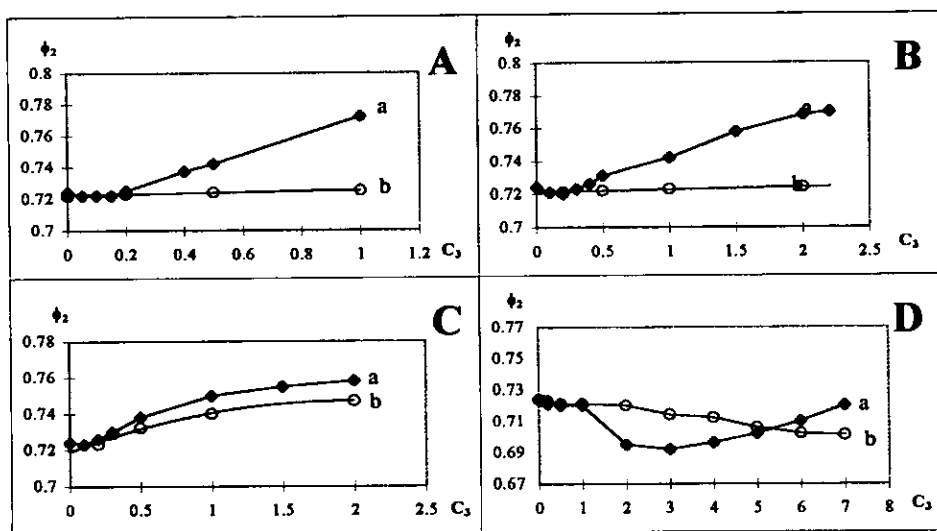


Fig. 11.- Volúmenes aparentes específicos ϕ_2 (mL/g) de albúmina de suero bovino (BSA)⁷ en agua o soluciones amortiguadoras en presencia de los siguientes componentes C_3 : A amortiguador a pH 7.0 a) K_2HPO_4/KH_2PO_4 , b) Tris/HCl; B sal a) $(NH_4)_2SO_4$, b) NH_4Cl ; C azúcar a) sacarosa, b) glucosa; D desnaturizante a) GuHCl, b) urea.

IV.- METODOS EXPERIMENTALES

a) Preparación de las Soluciones.

Las sustancias utilizadas para este trabajo fueron las siguientes:

- **HIDROCLORURO DE GUANIDINA:** Boehringer Mannheim
- **UREA:** Aldrich al 99%
- **ÁCIDO ACÉTICO:** J. T. Baker al 99.8%
- **LISOZIMA DE CLARA DE HUEVO:** Sigma N° de catálogo: 12650-88-3
- **CLORURO DE SODIO:** Mallinckrodt al 99.5%
- **ÁCIDO CLORHÍDRICO:** J. T. Baker al 35%
- **TRIS Tris (hidroximetil) aminometano :** Sigma
- **AGUA BIDESTILADA**

Se prepararon dos soluciones amortiguadoras concentradas, una de Tris-HCl 0.47 M, con un pH de 7.00 y otra de acetato de sodio 1.13 M, con un pH de 5.19. La elección de los pH con los que se trabajó fue hecha para poder comparar con los resultados de la desnaturalización seguida por absorción de UV obtenidos por Ahmad y Bigelow¹, quienes trabajaron en estas condiciones. Para cada experimento, se prepararon soluciones concentradas de desnaturalizante, aproximadamente 10 M para el caso de la urea, y 6 M para el caso del hidrocloreuro de guanidina. Para los experimentos con soluciones conteniendo lisozima, se preparó una solución concentrada de lisozima con una concentración de aproximadamente de 0.05 g/mL. Las soluciones de proteína +

desnaturalizante fueron preparadas 24 horas antes de su utilización, para asegurar condiciones de equilibrio.

Las soluciones se prepararon de la siguiente manera :

I. Soluciones de urea

- a) En matraces aforados de 10 mL se agregó 1 mL de solución amortiguadora de acetato de sodio concentrada, asegurando una concentración final de amortiguador 0.113 M
- b) Posteriormente se añadieron cantidades variables de solución concentrada de urea
- c) Se aforó a 10 mL

II. Soluciones de urea con lisozima :

- a) En matraces aforados de 10 mL se agregó 1 mL de solución amortiguadora de acetato de sodio concentrada, asegurando una concentración final de amortiguador 0.113 M
- b) En seguida se agregó 1 mL de solución concentrada de lisozima.
- c) Posteriormente se añadieron cantidades variables de solución concentrada de urea
- d) Se aforó a 10 mL, asegurando de esta manera una concentración final de lisozima de 5 mg/mL.

III. Soluciones de hidrocloreuro de guanidina

- a) En matraces aforados de 10 mL se agregaron 3 mL de solución amortiguadora de Tris-HCl concentrada, asegurando una concentración final de amortiguador 0.141 M
- b) Posteriormente se añadieron cantidades variables de solución concentrada de hidrocloreuro de guanidina
- c) Se aforó a 10 mL

IV. Soluciones de hidrocloreuro de guanidina con lisozima :

- a) En matraces aforados de 10 mL se agregaron 3 mL de solución amortiguadora de Tris-HCl concentrada, asegurando una concentración final de amortiguador 0.141 M.
- b) En seguida se agregó 1 mL de solución concentrada de lisozima.
- c) Posteriormente se añadieron cantidades variables de solución concentrada de hidrocloreuro de guanidina.
- d) Se aforó a 10 mL, asegurando de esta manera una concentración final de lisozima de 5 mg/mL.

V. Soluciones de urea con hidrocloreuro de guanidina.

- a) En matraces aforados de 10 mL se agregaron 3 mL de solución amortiguadora de Tris-HCl concentrada, asegurando una concentración final de amortiguador 0.141 M
- b) A continuación se agregaron 2 mL de solución concentrada de urea
- c) Posteriormente se añadieron cantidades variables de solución concentrada de hidrocloreuro de guanidina

- d) Se aforó a 10 mL.

VI. Soluciones de urea + GuHCl con lisozima :

- a) En matraces aforados de 10 mL se agregaron 3 mL de solución amortiguadora de Tris-HCl concentrada, asegurando una concentración final de amortiguador 0.141 M.
- b) En seguida se agregó 1 mL de solución concentrada de lisozima.
- c) A continuación se agregaron 2 mL de solución concentrada de urea.
- d) Posteriormente se añadieron cantidades variables de solución concentrada de hidrocloreuro de guanidina.
- e) Se aforó a 10 mL, asegurando de esta manera una concentración final de lisozima de 5 mg/mL.

b) Mediciones densimétricas

El aparato utilizado es un densímetro de celda vibratoria modelo 03D SODEV (Sherbrooke, P. Q., Canadá) (Fig. 11). Este densímetro de flujo de alta precisión se basa en el principio de un tubo vibratorio, cuya frecuencia de resonancia es mantenida y detectada por aparatos electrónicos apropiados. En el aparato, el líquido a estudiar circula a un flujo constante por el tubo vibratorio y se determina la frecuencia de resonancia²⁵. Asegurándose que no haya efectos secundarios debido a la condición de flujo, el periodo de vibración del tubo puede ser relacionado con la densidad del líquido ρ según la siguiente ecuación:

$$\rho = A + B\tau^2 \quad (12)$$

Donde A y B son constantes del instrumento que se calculan calibrando, es decir, midiendo el periodo de resonancia τ de dos fluidos cuyas densidades sean conocidas. En este trabajo los líquidos de referencia para calcular estas constantes fueron el agua destilada, con un valor teórico de densidad de 0.997045 g/mL a 25 ° C²⁴, y soluciones de Cloruro de Sodio (NaCl) en agua. Los valores teóricos de las densidades de las soluciones de Cloruro de Sodio en agua fueron calculados de acuerdo con la siguiente ecuación, válida para soluciones salinas de 1 a 2% en peso y una temperatura de 25 °C²⁴:

$$\rho_{sal} = 0.00703(\%_{SAL}) + 0.99706 \quad (13)$$

En este trabajo se hicieron todas las mediciones a 25° C. Para alcanzar la precisión necesaria en las densidades se requiere que las fluctuaciones de temperatura sean menores a ± 0.001 °C. Esto se consiguió por medio de un controlador de temperatura modelo CT-L de la marca SODEV (Sherbrooke, P. Q., Canadá)²⁵.

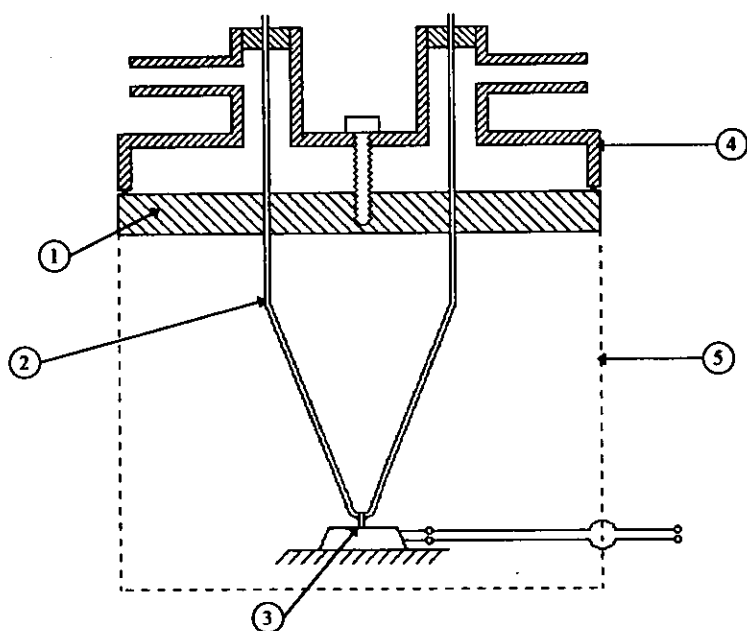


Fig. 11. Diseño mecánico del densímetro de flujo. 1, Placa de cobre para sujetar; 2, tubo vibratorio de acero inoxidable; 3, receptor magnético; 4, enchaquetado de regulación térmica para la placa de cobre y la toma del líquido; 5, Recipiente regulado térmicamente.

V.- RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

a) Cálculo de volúmenes aparentes

De las tres series experimentales que se hicieron (urea, hidrocloreto de guanidina y una mezcla de ambas), se obtuvieron los siguientes datos experimentales (las densidades de las soluciones se presentan en el Apéndice I):

- 10 soluciones de hidrocloreto de guanidina a pH 7.0, que van de 0.00 a 5.25 M de GuHCl
- 16 soluciones de lisozima con una concentración promedio de 5.1945 mg/mL con GuHCl a pH 7.0, que van de 0.00 a 5.42 M de GuHCl
- 10 soluciones de urea a pH 4.0, que van de 0.00 a 8.35 M de urea
- 16 soluciones de lisozima con una concentración promedio de 5.0420 mg/mL con urea a pH 4.0, que van desde 0.00 a 9.38 M de urea
- 8 soluciones de urea 2.03 M con GuHCl a pH 7.0, que van de 0.00 a 5.88 M de GuHCl
- 8 soluciones de lisozima con una concentración promedio de 4.7692 mg/mL, con urea 2.03 M y con GuHCl a pH 7.0, que van de 0.00 a 5.22 M de GuHCl

Para cada uno de los experimentos, tanto para aquellos con soluciones de urea o de hidrocloreto de guanidina, como para el caso de las soluciones con proteína se ajustaron los resultados de la densidad en función de la concentración de los desnaturalizantes a una ecuación cúbica, que nos genera una correlación R^2 mayor a 0.9999. Las figuras 13 y 14

muestran un ejemplo. Fueron descartados los puntos experimentales que, usando el criterio de Chauvenet²⁷ (Apéndice II), son estadísticamente inaceptables.

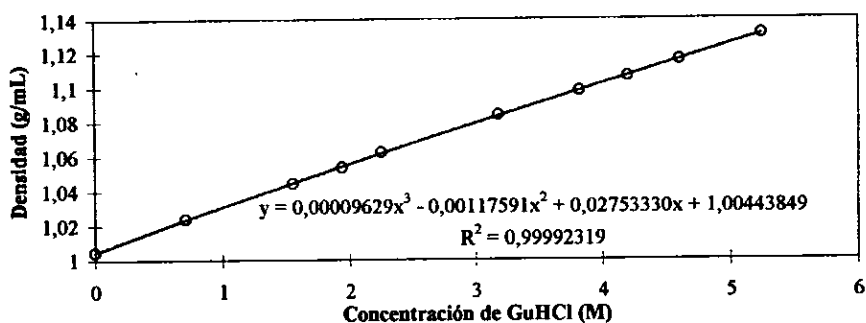


Figura 13.- Comportamiento de la densidad de una solución de GuHCl en agua en función de su concentración de hidrocloreuro de Guanidina a pH = 7.0.

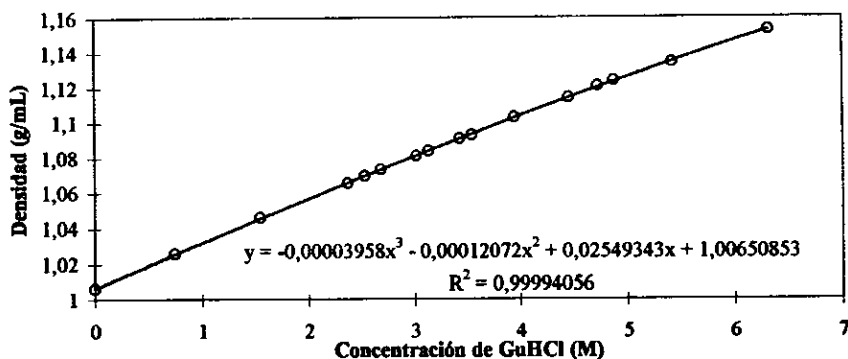


Figura 14.- Comportamiento de la densidad de una solución con lisozima (5 mg/mL) en función de la concentración de hidrocloreuro de Guanidina a pH = 7.0.

El polinomio (los coeficientes se muestran en el apéndice I), tanto para el comportamiento de la densidad del solvente como para el comportamiento de la densidad de las soluciones de lisozima, fue después introducido a la ecuación del volumen aparente (ecuación 11), obteniendo los resultados mostrados en la figura 15. El comportamiento

cualitativo del volumen específico de la lisozima es semejante al observado para la albúmina de suero bovino (BSA)⁷ (fig. 11D).

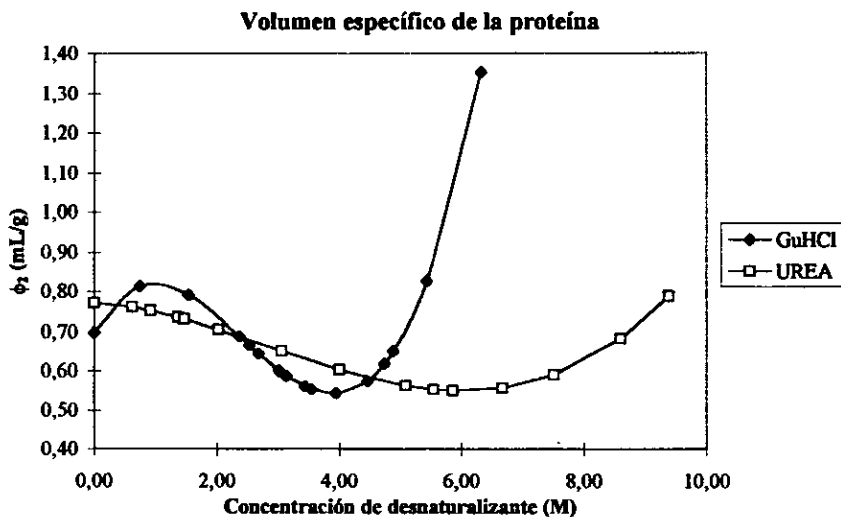


Figura 15.- Volúmenes específicos aparentes obtenidos para la desnaturalización de lisozima con urea (pH = 4.0) e hidrócloruro de guanidina (pH = 7.0)

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede observar lo siguiente:

- A concentraciones bajas de desnaturalizante se aprecia un aumento en el volumen específico de la proteína (en GuHCl), o bien una disminución (en urea).
- Después de cierta concentración, hay una caída brusca en el volumen hasta llegar a un valor mínimo.
- A partir de este punto nuevamente se observa un aumento en el volumen.

b) Comparación con resultados de la literatura

Los resultados obtenidos para la desnaturalización de la lisozima pueden compararse con algunos resultados reportados en la literatura. Únicamente se encontraron resultados de volumen aparente a dilución infinita y a una concentración de desnaturalizante (6 M para el caso del GuHCl y 8 M para la urea)^{26, 20, 17, 18}, es decir, los trabajos que se han hecho al respecto únicamente miden el volumen específico en ausencia de desnaturalizante y lo comparan con el volumen específico con la proteína totalmente desnaturalizada, que es generalmente mayor de 5 M de GuHCl ó mayor de una concentración 7 M de urea. Los resultados se presentan en la tabla 1 y la figura 16:

CONDICIONES EXPERIMENTALES	VALOR DEL VOLUMEN APARENTE (Φ) REPORTADO EN LA LITERATURA	VALOR DEL VOLUMEN APARENTE (Φ) OBTENIDO EN ESTE TRABAJO
Solución a 25° C (dilución infinita, calculados como función de la concentración de proteína)	0.714 ³ , 0.723 ³ , 0.710-720 ^{3, 6, 8, 16, 22, 28, 29} , 0.702 ^{18, 26}	0.702 a pH 7.00 0.770 a pH 5.19
6 M GuHCl, 20° C	0.694 ¹⁷ , 0.704 ¹⁸	1.130
8 M urea, 20° C, pH 4.0	0.700 ²⁶ , 0.707 ²⁶	0.620

Tabla 1.- Valores de volumen aparente reportados en la literatura

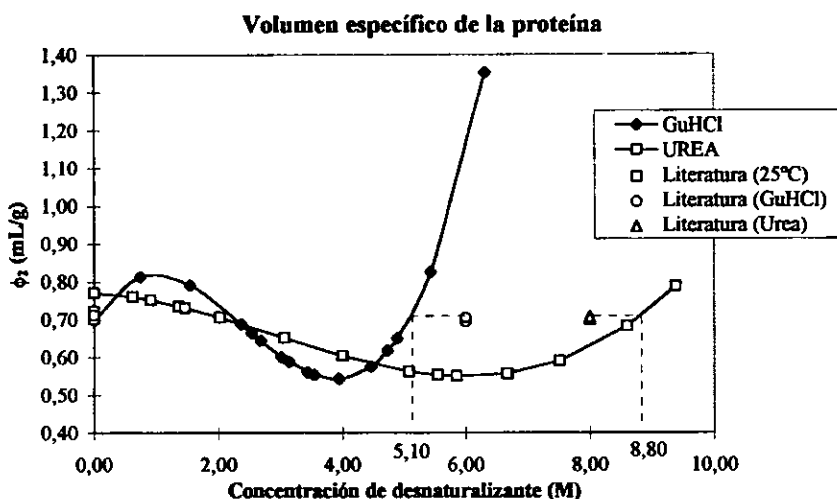


Figura 16.- Comparación de los resultados experimentales con los reportados en la literatura.

Los resultados de volúmenes específicos aparentes de la lisozima obtenidos en el presente trabajo en ausencia de desnaturalizante son similares a los reportados en la literatura. Los resultados reportados en la literatura para la proteína desnaturalizada con 6 M de GuHCl y 8 M de urea son casi iguales a los obtenidos en ausencia de desnaturalizante ; por lo que en la literatura se menciona con frecuencia que el cambio de volumen causado por la desnaturalización es muy pequeño. En los resultados obtenidos en este trabajo, las concentraciones en las que encontramos estos puntos de volumen específico igual al volumen de la proteína nativa son 5.1 M para el caso de la GuHCl, y 8.8 M para el caso de la urea (ver fig. 16). Las posibles fuentes de discrepancia son las concentraciones amortiguadores y el pH.

La figura 17 muestra la desnaturalización de la lisozima con urea y GuHCl seguidas por la técnica de absorción de UV¹, a los mismos pH de este trabajo. Podemos apreciar que la concentración de desnaturalizante a la cual la mitad de la lisozima está desnaturalizada (punto de inflexión) coinciden con los valores mínimos obtenidos por el cálculo de volúmenes. De esta manera, la concentración en la cual aparece el valor mínimo en el volumen específico aparente (fig. 15 ó 16) para GuHCl (4 M) coincide con el obtenido por absorción de UV, que es 4.2 M, así como el valor obtenido para urea (6 M), que por absorción de UV es 6.8 M. Esta coincidencia de resultados por distintas técnicas da confianza en los resultados obtenidos en este trabajo.

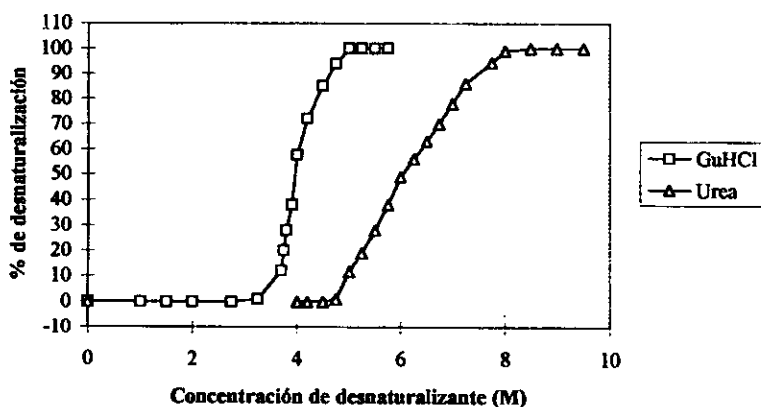


Fig. 17.- Desnaturalización de la lisozima seguida por Absorción de UV¹.

La aparición de un mínimo en los resultados obtenidos por densidades puede explicarse a través de la definición de volumen aparente específico de la ec. (4). Según esta definición, el volumen aparente específico de un soluto está referido al solvente, es decir, se calcula como la diferencia entre el volumen de la solución y el volumen ocupado por el

solvente ($V-V_0$). Si el soluto tiene espacios vacíos que no son ocupados por el solvente, el volumen aparente es más grande que si no existieran esos espacios vacíos. Una disminución del volumen aparente puede relacionarse con la penetración de solvente a los espacios vacíos de la molécula de soluto, lo que en el caso de las proteínas se puede comparar con la aparición de estados desnaturalizados compactos, en los que los aminoácidos hidrofóbicos, anteriormente protegidos en el interior de la molécula, se encuentran totalmente expuestos al solvente (por lo tanto los espacios vacíos entre ellos fueron llenados por solvente).

c) Modelo de la esfera porosa

Para analizar con detalle el comportamiento observado en la figura 14 se propone aquí un modelo que llamaremos “modelo de la esfera porosa”, y que se basa en las siguientes consideraciones:

- La molécula de proteína es una esfera porosa, en cuyo interior semi-hueco se agrupan los grupos hidrofóbicos.
- Al añadir desnaturalizante, la proteína se expande por las interacciones con las moléculas de desnaturalizante añadido y los efectos salinos, lo cual provoca un aumento en el tamaño de los poros.
- Los poros, al alcanzar un tamaño adecuado, permiten la penetración de la molécula de desnaturalizante al interior de la proteína. (Fig. 18)

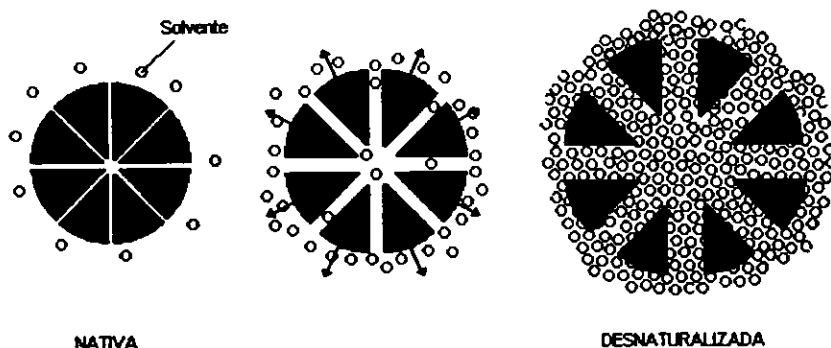


Fig. 18.- Modelo de la esfera porosa

El modelo se desarrolla de la siguiente manera:

1. Se propone que el volumen específico medido de la proteína ($V_{\text{proteína}}$) es el volumen de la esfera (V_{esfera}), menos el volumen de solvente y de desnaturizante que han penetrado en el interior a través de los poros de la molécula (V_{penet}). De esta manera:

$$V_{\text{medido}} = V_{\text{esp proteína}} = V_{\text{esfera}} - V_{\text{penet}} \quad (14)$$

2. Para calcular el primer término de la resta (V_{esfera}), se utiliza la ecuación de volumen de una esfera:

$$V_{\text{esfera}} = \frac{4}{3} \pi r_{\text{esfera}}^3 \quad (15)$$

Donde r_{esfera} es el radio de la esfera. Dicho radio puede ser calculado como la suma del radio inicial de la esfera ($r_{inicial}$) y el cambio en el radio de la misma, que es la cantidad que aumenta el radio durante el proceso (Δr_{esfera}):

$$r_{esfera} = r_{inicial} + \Delta r_{esfera} \quad (16)$$

Se propone que el cambio en el radio de la esfera constituida por la proteína es directamente proporcional a la concentración de desnaturalizante (C_D), de la siguiente manera:

$$\Delta r_{esfera} \propto C_D \quad (17)$$

Para romper la proporcionalidad se asigna una constante de proporcionalidad que llamaremos D_D , que significa la cantidad que aumenta el radio de la proteína en Angstroms, por cada unidad de molaridad de la solución de desnaturalizante. De ese modo, la ecuación (16) queda de la siguiente manera:

$$r_{esfera} = r_{inicial} + D_D C_D \quad (18)$$

Si sustituimos el radio de la esfera definido en la ecuación (18) en la ecuación (15), obtendremos el volumen de la esfera:

$$V_{esfera} = \frac{4}{3} \pi (r_{inicial} + D_D C_D)^3 \quad (19)$$

3. Para calcular el segundo término de la ecuación (14), (V_{penet}), se harán las siguientes consideraciones:

Consideramos que la penetración de las moléculas de solvente al interior de la molécula es dependiente del radio promedio del poro sobre la superficie de la molécula:

$$V_{penet} = f(r_{poro}) \quad (20)$$

Esto quiere decir que si los poros son muy pequeños, las moléculas de desnaturalizante no podrán penetrar por impedimento estérico. Para ello es necesario considerar que deben cumplirse los siguientes requisitos: a) Que a radios pequeños de poro la penetración de solvente sea cero; b) Que a partir de un radio de poro similar al radio de la molécula de desnaturalizante, éste comience a penetrar; y c) Que en determinado momento, el interior de la molécula se encuentre saturado, y ya no pueda penetrar más desnaturalizante. Estos requisitos o restricciones sobre la función $f(r_{poro})$ en la ec (20), quedan satisfechos si empleamos para $f(r_{poro})$ una ecuación del tipo de la de Boltzmann, que presenta gráficas del estilo de la que se muestra en la figura 19:

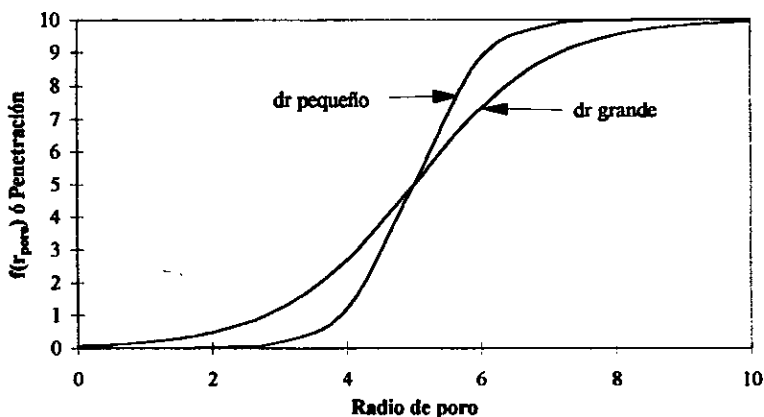


Figura 19.- Variación de la penetración de desnaturalizante como función del radio del poro. Ecuación de Boltzmann

Este tipo de ecuación tiene la siguiente expresión:

$$V_{penet} = \frac{V_{penet}^{inic} - V_{penet}^{max}}{1 + e^{(r_{poro} - r_{poro}^0)/dr_{poro}}} + V_{penet}^{max} \quad (21)$$

En donde V_{penet} es el volumen de solvente (agua + desnaturalizante + buffer) que penetró al interior de la molécula de proteína; V_{penet}^{inic} es el volumen inicial de solvente (agua + buffer) que está en el interior de la proteína antes de agregar desnaturalizante (el límite inferior); V_{penet}^{max} es el volumen de solvente máximo que penetra (límite superior); r_{poro}^0 es el radio de poro en el momento en que ha penetrado la mitad de la cantidad máxima de solvente, y dr_{poro} se relaciona con la facilidad de penetración conforme el radio del poro aumenta.

El radio del poro se calcula a partir del área transversal del poro (A_{poro}), (Figura 20) de la siguiente manera:

$$r_{poro} = \sqrt{\frac{A_{poro}}{\pi}} \quad (22)$$

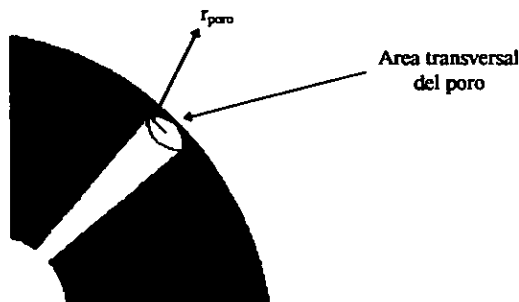


Figura 20.- Área transversal del poro en la molécula de proteína

El área transversal promedio del poro se calcula como el área total de los poros ($A_{tot\ pores}$) dividido entre el número de poros (N_{poros}), es decir:

$$A_{poro} = \frac{A_{tot\ pores}}{N_{poros}} \quad (23)$$

El área total de los poros sobre la molécula es dependiente del área exterior total de la esfera ($A_{ext\ total}$), de la siguiente manera:

$$A_{tot\ poro} = A_{ext\ total} - A_{molec} \quad (24)$$

Siendo A_{molec} el área en que contribuye la molécula de proteína, es decir, el área que ocupan los aminoácidos exteriores de la proteína. El área exterior total de la superficie de una esfera se calcula con la siguiente ecuación:

$$A_{ext\ total} = 4\pi r_{esfera}^2 \quad (25)$$

Si sustituimos la ecuación (18) en la ecuación (25) obtendremos:

$$A_{ext\ total} = 4\pi (r_{inicial} + D_D C_D)^2 \quad (26)$$

Por lo tanto, si sustituimos (26) en (24) obtenemos:

$$A_{tot\ poro} = 4\pi (r_{inicial} + D_D C_D)^2 - A_{molec} \quad (27)$$

Y si sustituimos (27) en (23), obtendremos el área transversal promedio de cada poro:

$$A_{poro} = \frac{4\pi(r_{inicial} + D_D C_D)^2 - A_{molec}}{N_{poros}} \quad (28)$$

La ecuación (28) puede finalmente ser usada para calcular el radio promedio de los poros sobre la proteína, sustituyéndola en (22), obteniendo de ese modo:

$$r_{poro} = \sqrt{\frac{4\pi(r_{inicial} + D_D C_D)^2 - A_{molec}}{N_{poros}\pi}} \quad (29)$$

La ecuación final del modelo de la esfera porosa, obtenida por la sustitución de las ecuaciones (19) y (21) en la ecuación (14) queda como sigue:

$$V_{prot} = \frac{4}{3}\pi(r_{inicial} + D_D C_D)^3 - \frac{V_{penet}^{inic} - V_{penet}^{max}}{1 + e^{(r_{poro} - r_{poro}^0)/dr_{poro}}} - V_{penet}^{max} \quad (30)$$

donde r_{poro} está dado por (29).

Analizando los límites de la ecuación, tenemos que a $C_D = 0$ el término de penetración tiende a V_{penet}^{inic} , que se asignó como cero, por lo que a $C_D = 0$ el volumen de la proteína tiende al volumen calculado con $r_{inicial}$, que es exactamente el volumen inicial de la misma.

Para la asignación de parámetros se siguió el procedimiento descrito a continuación:

1. Se calculó el radio inicial de proteína (r_{inicial}) con el volumen específico calculado para ausencia de desnaturizante, con la ecuación (15). Este radio fue de 15.82 Å para el caso de la desnaturalización con GuHCl, y de 16.35 Å para la desnaturalización con urea; lo cual se acerca a los resultados obtenidos con dispersión de luz, que son del orden de los 15 Å³⁰, y los resultados de cristalografía, que indican que la molécula tiene dimensiones de 45X30X30 Å⁵.
2. El área exterior de la esfera por la contribución misma de la molécula (A_{molec}), es decir, el área exterior total de la esfera menos el área transversal de los poros se calculó como el área exterior total de una esfera con el volumen específico mínimo obtenido de los experimentos (0.54 mL/g). Esta área resultó de 2650 Å².
3. Al volumen inicial de penetración de desnaturizante a la molécula de proteína ($V_{\text{penet}}^{\text{inic}}$) se le asignó el valor de cero.
4. El número de poros (N_{poros}) se ajustó de acuerdo con el radio de los poros y el radio de la molécula de desnaturizante de tal manera que la penetración evidente comenzara cuando el tamaño de los poros fuera el mismo que el de las moléculas de desnaturizante. Para ello se usó un radio de desnaturizante calculado a partir del volumen aparente del mismo a dilución infinita, que para el caso del GuHCl es de 3.00 Å y para el caso de la urea es de 2.86 Å. El número de poros fue de 30.

Los demás parámetros (D_D , $V_{\text{penet}}^{\text{max}}$, r_{poro}^0 y dr_{poro}), se ajustaron usando un método de mínimos cuadrados. Los resultados se desglosan en la tabla 2:

Parámetros	GuHCl	Urea
D_D	1.56 A/M	0.38 A/M
$V_{\text{max penet}}^{\text{max}}$	42800 A ³	16400 A ³
r_{poro}^0	5.26 A	3.68 A
dr_{poro}	0.71	0.320

Tabla 2.- Parámetros ajustados para el modelo de la esfera porosa

La bondad de los resultados se puede apreciar en las siguientes gráficas (fig. 21 y fig 22):

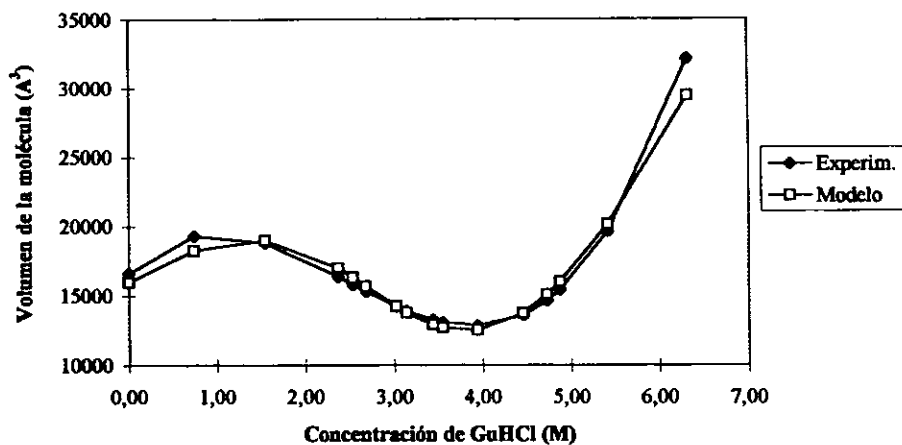


Fig 21.- Bondad del ajuste del modelo de la esfera porosa para la desnaturalización de Lisozima con hidrocloreuro de guanidina.

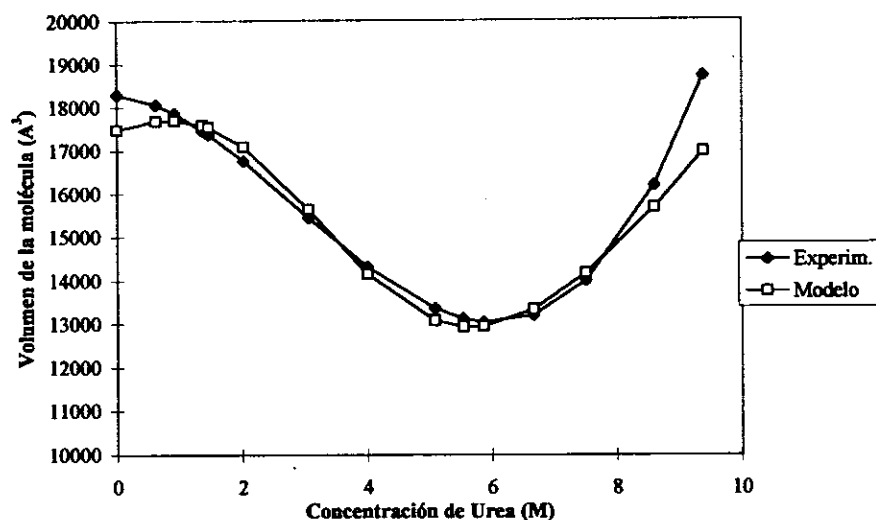


Fig 22.- Bondad del ajuste del modelo de la esfera porosa para la desnaturalización de lisozima con urea

Se puede apreciar que estos resultados coinciden casi completamente con los experimentales. A continuación se presentan los componentes del modelo desglosados. La figura 23 corresponde a los componentes para el caso de la desnaturalización con GuHCl y la figura 24 al caso de la desnaturalización con urea:

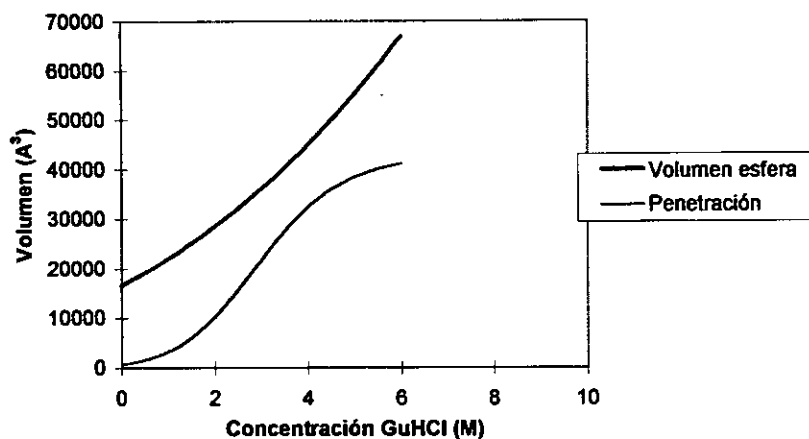


Fig. 23.- Componentes del modelo de la esfera porosa para la desnaturalización con GuHCl

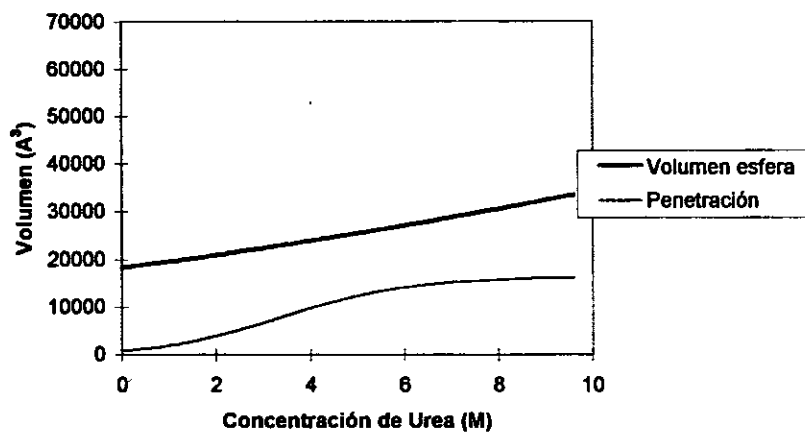


Fig. 24.- Componentes del modelo de la esfera porosa para la desnaturalización con urea

En las gráficas mostradas con anterioridad podemos apreciar que la desnaturalización de la lisozima con GuHCl es más fácil que con urea, principalmente porque el crecimiento de la esfera es mayor en GuHCl.

El modelo de la esfera porosa puede analizarse con más detalle variando alguno de los parámetros y manteniendo constantes los demás. Ese comportamiento se muestra en las figuras 25, 26, 27 y 28:

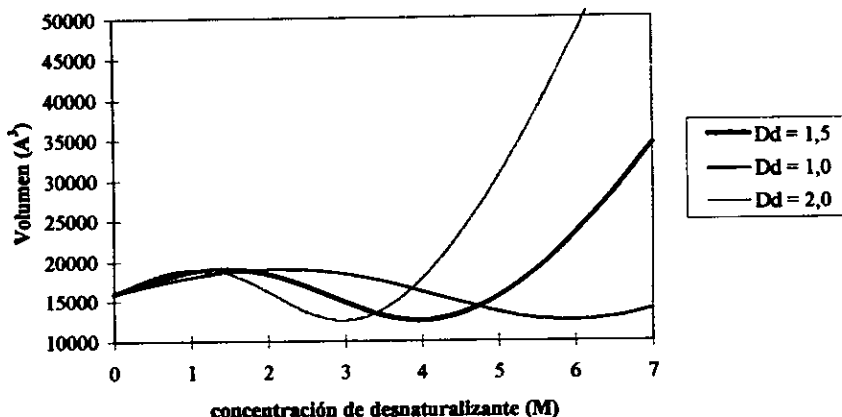


Fig 25.- Comportamiento del modelo variando D_D , donde $r^0 = 5.26$; $dr = 0.71$, y $V_{\text{permet}}^{\text{max}} = 42800$

D_D es el cambio de radio de la proteína por unidad molar de desnaturalizante, y sus unidades son $\text{\AA} / (\text{mol/l})$. De la figura 25 se puede decir que mientras mayor sea D_D , el mínimo se encuentra antes, es decir, la desnaturalización ocurre a menores concentraciones de desnaturalizante además que el incremento de volumen específico después de la desnaturalización es mayor a D_D grandes.

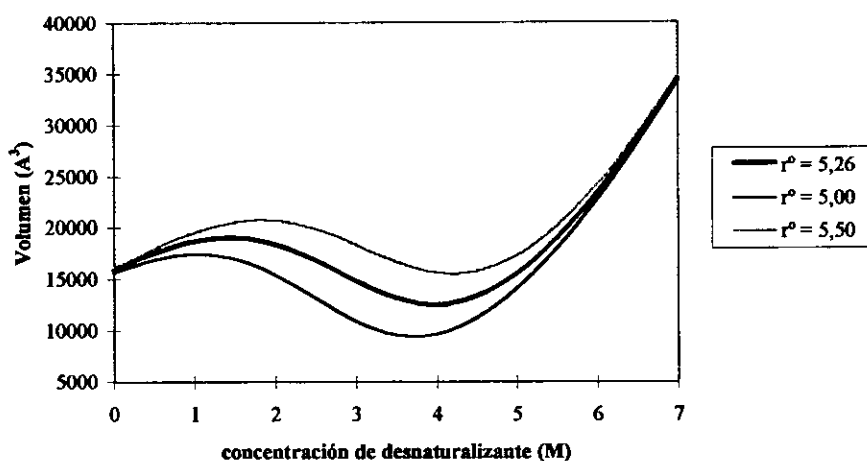


Fig 26.- Comportamiento del modelo variando r° , donde $D_D = 1.5$; $dr = 0.71$, y $V_{penet}^{max} = 42800$

r° es el radio de poro en el momento en que ha penetrado la mitad de la cantidad máxima de solvente, y sus unidades son (Å). En este gráfico se puede ver que los valores de volumen específico para la desnaturalización no cambian a concentraciones pequeñas ni a concentraciones grandes cuando varía r° , aunque los valores de volumen a concentraciones medias son mayores para r° grandes. Para r° grandes encontramos el mínimo (indicativo de desnaturalización) a concentraciones un poco menores que el mínimo para r° pequeños, aunque el efecto no es tan apreciable como en el caso de D_D .

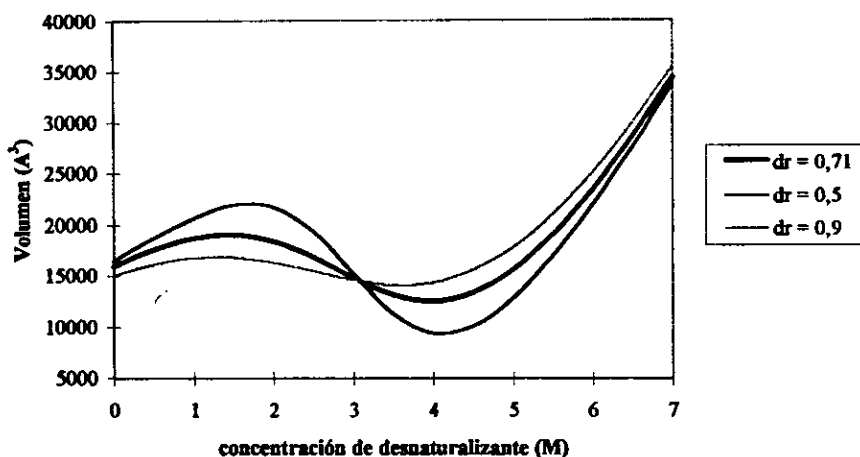


Fig 27.- Comportamiento del modelo variando dr , donde $D_D = 1.5$; $r^o = 5.26$, y $V_{penet}^{max} = 42800$

dr es la facilidad de penetración conforme el radio del poro aumenta. Aquí se aprecia que el punto de inflexión de la curva se encuentra en la misma concentración, y a dr grandes, la curva tiene un comportamiento más suave, mientras que para dr pequeños, el comportamiento es más brusco. El mínimo se encuentra a concentraciones un poco mayores para dr pequeños. Este comportamiento también se puede apreciar en la fig. 19, donde el cambio es brusco si dr es pequeño, y suave si dr es grande.

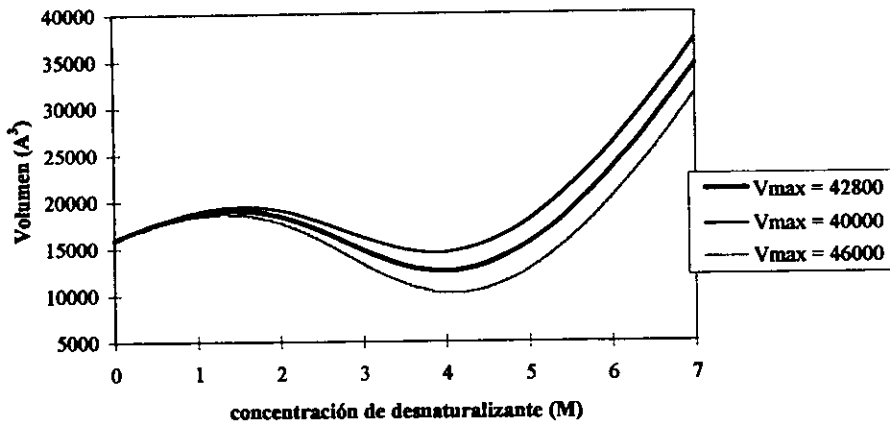


Fig 29.- Comportamiento del modelo variando V_{penet}^{max} , donde $D_D = 1.5$; $r^0 = 5.26$, y $dr = 0.71$

V_{penet}^{max} es el volumen de solvente máximo que penetra a la proteína y sus unidades son $\text{\AA}^3$. Cuando varía V_{penet}^{max} a grandes concentraciones la curva se desplaza hacia arriba para valores pequeños y hacia abajo para valores grandes, estando el mínimo prácticamente en la misma concentración.

Haciendo un análisis más profundo de los resultados, podemos decir lo siguiente:

1. D_D para GuHCl es 4.1 veces mayor que D_D para urea. El crecimiento del radio de la proteína es mucho mayor para la desnaturalización con GuHCl que para la desnaturalización con urea, lo que hace que la desnaturalización ocurra a concentraciones sensiblemente menores de desnaturalizante para GuHCl. (fig 25). En otras palabras, se confirma el hecho ya conocido de que GuHCl es un desnaturalizante más eficaz que la urea.

2. dr es 2 veces mayor en GuHCl que en urea. Esto nos indica que la penetración de desnaturizante a la proteína es mejor para la urea que para GuHCl, pero la desnaturalización es más lenta porque el crecimiento de la molécula es menor.
3. El volumen máximo de solvente que penetra a la molécula es mayor para el caso de GuHCl ($42800 \text{ \AA}^3$ contra $16400 \text{ \AA}^3$ en el caso de la urea). Ello implica que el estado desnaturalizado es diferente en cada desnaturizante.

De este análisis se concluye que el parámetro más importante del modelo de la esfera porosa para caracterizar la desnaturalización es D_D , ya que es el que nos relaciona la afinidad de la proteína con el desnaturizante en mayor grado.

d) Análisis para la mezcla de urea e hidrocloreuro de guanidina

Para probar el modelo, se realizó un tercer experimento, desnaturizando la proteína con una mezcla de urea y de GuHCl. Para ello, se hicieron soluciones con una concentración constante de urea de 2 M, y los resultados se obtuvieron de la misma manera que los anteriores. Los resultados se muestran a continuación en dos gráficas : La figura 29 muestra el volumen específico en función de la concentración total de desnaturizante y la figura 30 el volumen específico en función de la concentración de hidrocloreuro de guanidina únicamente.

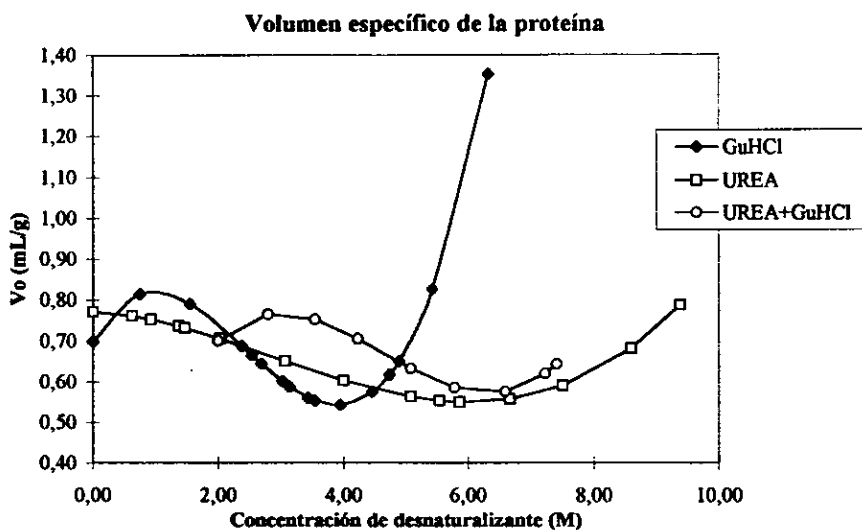


Fig. 29.- Volúmenes específicos aparentes obtenidos para la desnaturalización de lisozima con una mezcla de urea 2 M e hidrocloreuro de guanidina, en función de la concentración total de desnaturalizante, comparada con los resultados obtenidos para urea y GuHCl únicamente.

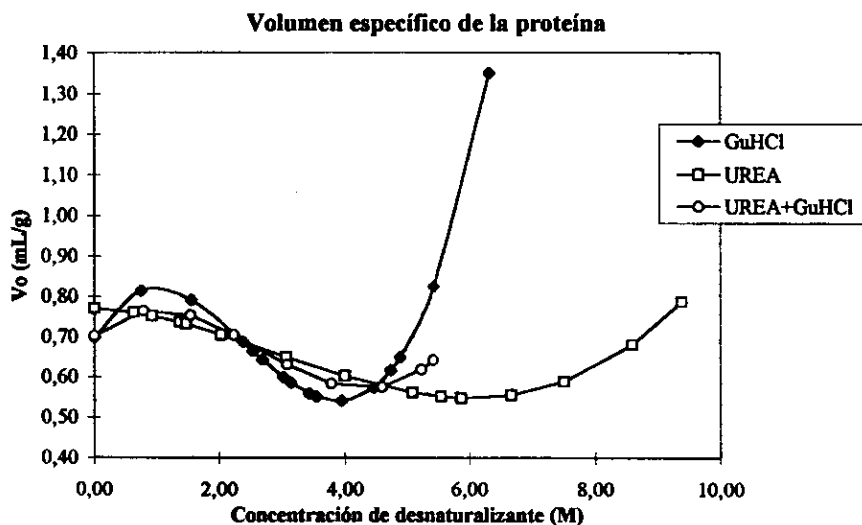


Fig. 30.- Volúmenes específicos aparentes obtenidos para la desnaturalización de lisozima con una mezcla de urea 2 M e hidrocloreuro de guanidina, en función de la concentración de GuHCl, comparada con los resultados obtenidos para urea y GuHCl únicamente.

La no-aditividad en la desnaturalización de la guanidina con una mezcla de urea y GuHCl se puede apreciar en la figura 30, en donde vemos que tenemos que agregar la misma cantidad de GuHCl cuando hay 2 M de urea que cuando no hay otro desnaturalizante (aprox. 4 M).

Para el uso del modelo de la esfera porosa se hicieron las siguientes consideraciones:

- Como a las soluciones ya se les había agregado un desnaturalizante con anterioridad (urea 2 M), la esfera constituida por la molécula de proteína ya había sido modificada; por lo que se tomaron las cantidades obtenidas con el modelo para el caso de desnaturalización con urea. Esto quiere decir que el volumen inicial de penetración de solvente a la proteína (V_{penet}^{inic}) no es igual a cero, sino igual al V_{penet}^{inic} obtenido para una concentración de urea 2 M. Ese valor es de $3932 \text{ \AA}^3$. En ese punto, además, el radio de la esfera es igual a $17.11 \text{ \AA}$, por lo que se tomó ese valor como $r_{inicial}$.
- Como primer cálculo, se usaron los valores de parámetros obtenidos para GuHCl, ya que un buen ajuste indicaría un comportamiento aditivo entre la urea y el GuHCl en la desnaturalización. Los resultados de este primer cálculo se muestran en la fig. 31:

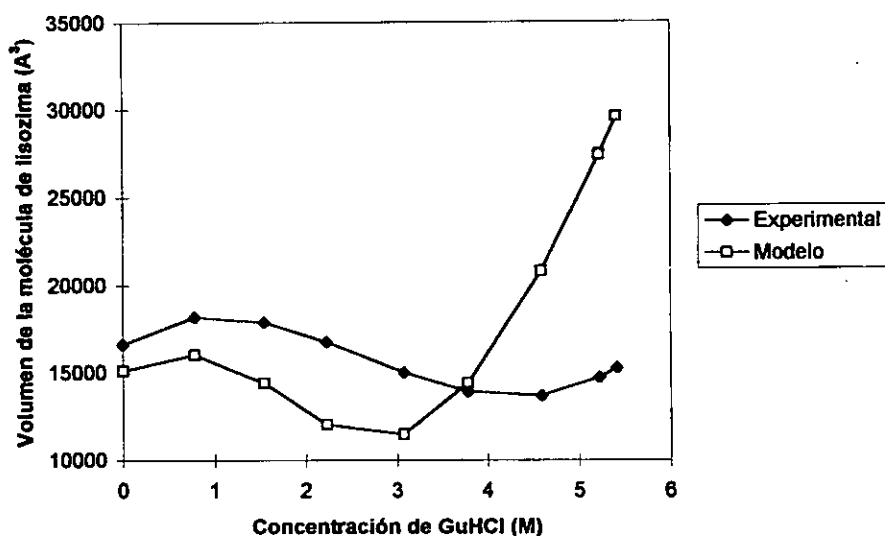


Fig 31.- Modelo de la esfera porosa para la mezcla de urea (2 M) y GuHCl usando los parámetros obtenidos para GuHCl.

- Posteriormente se calcularon nuevos parámetros de ajuste para este caso en particular con un método de mínimos cuadrados, y se obtuvieron los resultados mostrados en el tabla 3:

Parámetros	Urea+GuHCl
D_D	1.15 A/M
V_{penet}^{max}	42750 A ³
r_{poro}^0	5.47 A
dr_{poro}	0.640

Tabla 3.- Parámetros ajustados para la mezcla de urea 2 M e hidrocloreuro de guanidina

La bondad del ajuste se muestra en la figura 32:

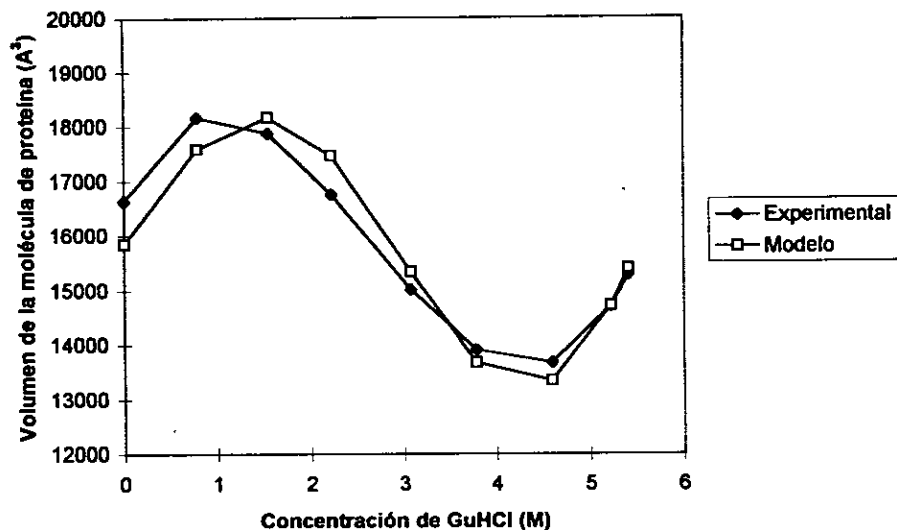


Fig 32.- Bondad del ajuste del modelo de la esfera porosa para la mezcla de urea 2 M y GuHCl.

Los componentes del modelo de esfera porosa se desglosan en la figura 33:

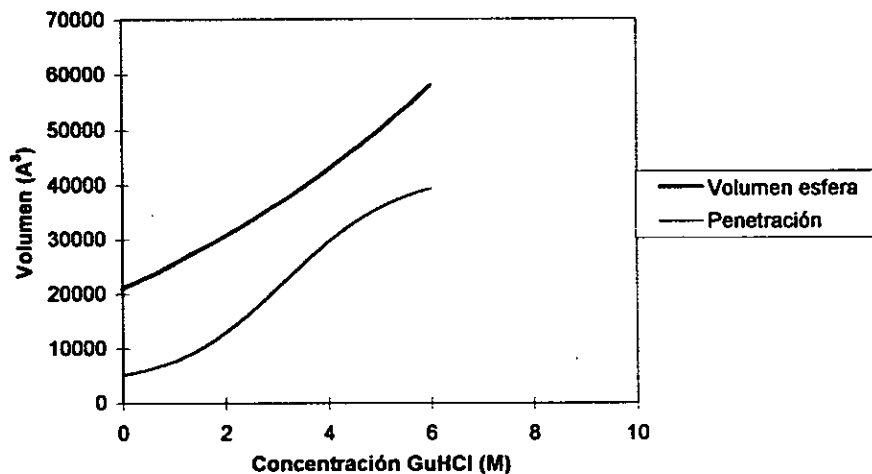


Fig. 33.- Componentes del modelo de la esfera porosa para la desnaturalización con una mezcla de urea 2 M y GuHCl

A partir de estos resultados, se puede afirmar, como se argumentó cualitativamente más arriba que las mezclas de urea e Hidroclouro de Guanidina no se comportan aditivamente durante la desnaturalización, ya que el ajuste del modelo muestra algunas diferencias. Sin embargo, de éste se puede decir lo siguiente:

1. La mayor diferencia encontrada fue la del rango de aumento del radio de la esfera (D_D), ya que D_D para GuHCl es 1.36 veces el D_D para la mezcla urea-GuHCl.
2. Sin embargo, la penetración de solvente al interior de la esfera (dr) es prácticamente el mismo, ya que dr para GuHCl es únicamente 1.11 veces mayor que dr para la mezcla.

Debido a estos resultados, se decidió hacer un nuevo ajuste, manteniendo los valores de dr y de volumen máximo de penetración de solvente (V_{penet}^{max}) iguales a los presentados para GuHCl, y únicamente ajustando los valores de D_D y el radio de poro en el que ha penetrado la mitad del volumen máximo máxima (r_{poro}^0). Los valores obtenidos de este segundo ajuste se muestran en la tabla 4. La bondad de este segundo ajuste se presenta en la figura 34:

Parámetros	urea+GuHCl
D_D	1.11 A/M
V_{penet}^{max}	42800 A ³
r_{poro}^0	5.47 A
dr_{poro}	0.71

Tabla 4.- Parámetros del segundo ajuste para la mezcla de urea 2 M e hidrocloreuro de guanidina

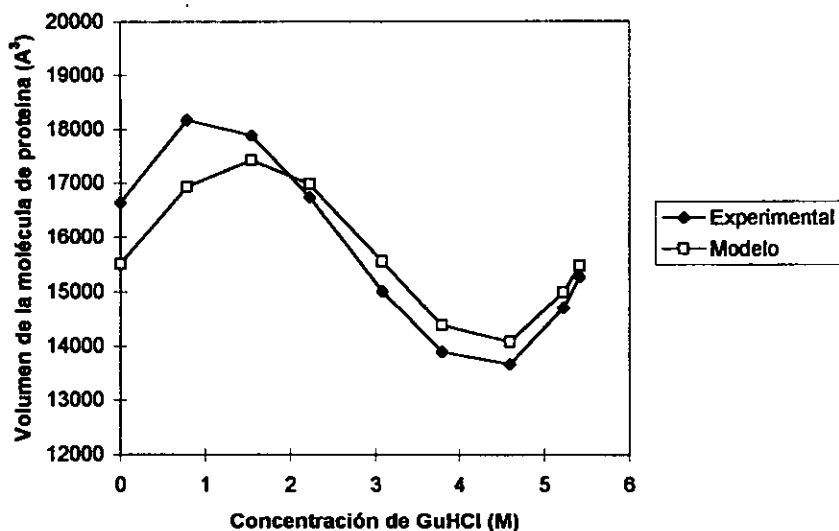


Fig 34.- Bondad del ajuste del modelo de la esfera porosa para la mezcla de urea 2 M y GuHCl, manteniendo igual al caso de GuHCl la rapidez de penetración de solvente y el volumen máximo de solvente que penetra.

De estos resultados se concluye que para el caso de la mezcla de urea con GuHCl el crecimiento de la esfera es 1.40 veces menor que durante la desnaturalización con GuHCl únicamente; aunque la penetración de GuHCl es igual para ambos casos. Estos resultados nos sugieren que el modelo es suficientemente bueno, tanto para los desnaturalizantes solos, como para la mezcla y que la desnaturalización con la mezcla urea-GuHCl ocurre a concentraciones un poco mayores que la desnaturalización con GuHCl..

VI.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Como se muestra en los resultados presentados en la figura 15, el volumen específico de la lisozima no se comporta como una función lineal de la concentración de desnaturalizante. De hecho, los resultados planteados en la literatura que se muestran en la tabla 1 nos dan idea de que el volumen de la proteína no cambia mucho con la desnaturalización; en cambio, los resultados presentados en este trabajo nos indican lo contrario.
2. Fue posible explicar de una manera muy simple el comportamiento del volumen de las proteínas durante la desnaturalización, a través del “modelo de esfera porosa”.
3. La desnaturalización puede ser relacionada con el aumento de radio de la molécula de proteína, por lo que la afinidad de un desnaturalizante por una proteína puede describirse en términos de D_D : a mayores valores de D_D , esta afinidad aumenta.
4. Se comprobó que las mezclas de urea e Hidrocloruro de Guanidina no son aditivas para la desnaturalización, al ver los resultados obtenidos para la mezcla, y el análisis de los parámetros del modelo propuesto.
5. El estado desnaturalizado de la lisozima es diferente para cada uno de los desnaturalizantes utilizados.

Con el objeto de seguir explorando la utilidad del tipo de medidas experimentales realizadas aquí y la validez del modelo propuesto se proponen a futuro:

- Medir el volumen específico y aplicar el modelo para la desnaturalización de lisozima con mezclas de urea y GuHCl, a concentración constante de urea; para varias concentraciones de urea.
- Medir el volumen específico y aplicar el modelo para la desnaturalización de lisozima con mezclas de urea y GuHCl, a concentración constante de GuHCl; para varias concentraciones de GuHCl.
- Medir el volumen específico y aplicar el modelo para la desnaturalización de lisozima con urea ó con GuHCl, a diferentes concentraciones de lisozima.
- Finalmente, también se sugiere realizar estudios semejantes con otras proteínas con el objeto de averiguar si existe o no alguna variación sistemática de los parámetros del modelo con algunas características estructurales de las proteínas. Esto, desde luego, estaría limitado por las cantidades de proteína necesaria para las determinaciones experimentales y por ello se sugiere realizar este estudio con proteínas cuyo costo no sea muy elevado.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Ahmad F., Bigelow, C. C. (1982), Estimation of the Free Energy of Stabilization of Ribonuclease A, Lysozyme, α -Lactalbumin, and Myoglobin, *J. Biol. Chem.* **257**, 12935-12938.
- 2.- Barrow, G. M., (1976), *Química Física para las Ciencias de la Vida*, pp. Reverté, Barcelona.
- 3.- Charlwood P. A. (1957), *J Am Chem Soc*, **79**, 776-781
- 4.- Creighton, T. E. (1992), *Protein Folding*, Freeman, U. S. A.
- 5.- Creighton, T. E. (1993), *Proteins. Structure and Molecular Properties*, Freeman, U.S.A.
- 6.- Deonier, R. C., Williams, J. W. (1970), *Biochemistry*, **9**, 4260-4267
- 7.- Durchschlag, H., Jaenicke, R. (1982), Partial Specific Volume Changes of Protein Densimetric Studies, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 1074-1079.
- 8.- Floßdorf, J., Süßenbach, U. (1978), *Makromol Chem.*, **179**, 1061-1068
- 9.- Frigolet, C. (1995), Estudio Calorimétrico de la Formación de los Complejos Dimetilformamida - Benceno y N-Metilacetamida - Benceno en Ciclohexano y Tetracloruro de Carbono, Tesis de Licenciatura. Facultad de Química.
- 10.- Greene, R. F.; Pace, C. N. (1974), Urea and Guanidine Hydrochloride Denaturation of Ribonuclease, Lysozyme, α -Chymotrypsin, and β -Lactoglobulin, *J. Biol. Chem.* **249**, 5388-5393

- 11.- Harpaz Y., Gerstein, M., Chothia, C. (1994), Volume Changes on Protein Folding, *Structure* **2**, 641-649.
- 12.- Hinz, H. J., (1986), *Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology*, Springer-Verlag, Germany.
- 13.- <http://www.sial.com/sigma/proddata/17651.htm>
- 14.- <http://www.tasc.com/ENTERTAINMENT/molec.html>
- 15.- Klotz, I. M., Rosenberg, R. M., (1994), *Chemical Thermodynamics*, Wiley Interscience, U. S. A.
- 16.- Krigbaum W. R., Kügler, F. R. (1970), *Biochemistry* **9**, 1216,1223
- 17.- Lee J. C., Timasheff, S. N. (1979), The Calculation of Partial Specific Volumes of Proteins in 6 M Guanidine Hydrochloride, *Methods. Enzymol.* **61**, 49-57.
- 18.- Lee, J. C., Timasheff, S. N. (1974), Partial Specific Volumes and Interactions with Solvent Components of Proteins in Guanidine Hydrochloride, *Biochemistry* **13**, 257-265.
- 19.- Lehninger, A. I., (1970), *Biochemistry*, Worth Publishers, U. S. A.
- 20.- Makhatadze, G. I., Privalov, P. L. (1992), Protein Interactions with Urea and Guanidinium Chloride, *J. Mol. Biol.* **226**, 491-505.
- 21.- Makhatadze, G. I., Privalov, P. L. (1993), Contribution of Hydration to Protein Folding Thermodynamics, *J. Mol. Biol.* **232**, 639-659.
- 22.- McMeekin, T. L. Marshall, K.(1952), *Science* **116**, 142-143
- 23.- Myers, J. K., et. al. (1995), Denaturant m Values and Heat Capacity Changes: Relation to Changes in Accesible Surface Areas of Protein Unfolding, *Protein Science.* **4**, 2138-2148

- 24.- Perry, R. H.; Chilton, C. H. (1989) *Chemical Engineers' Handbook*, McGraw-Hill, U.S.A.
- 25.- Picker, P., Tremblay, E., Jolicoeur, C. (1974), A High-Precision Digital Readout Flow Densimeter for Liquids, *Journal of Solution Chemistry* **3**, 377-384.
- 26.- Prakash, V., et. al. (1981), Interactions of Proteins with Solvent Components in 8 M Urea, *Arch. Biochem. Biophys.* **210**, 455-464.
- 27.- Taylor, J. R. (1982), *An Introduction to Error Analysis*, University Science Books, U. S. A
- 28.- Ullman, A. et. al. (1968), *Biochemistry* **7**, 261-265
- 29.- Zamyatnin A. A. (1972), *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **24**, 107-123
- 30.- Feng H. P., Widom J. (1994), Kinetics of Compaction During Lysozyme Refolding Studied by Continous-Flow Quasielectric Light Scattering. *Biochemistry* **33**, 13382-13390

CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE PROTEÍNA: 5.1945×10^{-3} g/mL	
CONCENTRACIÓN DE GuHCl	DENSIDAD DE LA SOLUCIÓN
0.00	1.006387
0.00	1.006376
0.74	1.025643
1.55	1.045920
2.37	1.065491
2.53	1.069630
2.69	1.073457
3.02	1.081050
3.14	1.084107
3.44	1.090951
3.55	1.093072
3.94	1.102892
4.46	1.114164
4.73	1.120777
4.88	1.124069
5.42	1.134464

Coefficientes:

$$\begin{aligned}
 P &= 1.006508 & R &= -1.207250 \times 10^{-4} \\
 Q &= 2.549343 \times 10^{-2} & S &= -3.958110 \times 10^{-5}
 \end{aligned}$$

EXPERIMENTO 2.- Desnaturalización de Lisozima con urea a 25° C.

CONCENTRACIÓN DE UREA	DENSIDAD DE LA SOLUCIÓN
0.00	1.003546
0.97	1.019365
2.13	1.037998
3.06	1.053146
4.09	1.070122
4.84	1.082459
5.92	1.101431
6.71	1.115533
7.60	1.131513
8.35	1.144929

Coefficientes:

$$\begin{array}{ll}
 P = & 1.003702 \\
 Q = & 1.593742 \times 10^{-2} \\
 R = & 3.626730 \times 10^{-5} \\
 S = & 1.002660 \times 10^{-5}
 \end{array}$$

CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE PROTEÍNA: 5.0420×10^{-3} g/mL	
CONCENTRACIÓN DE UREA	DENSIDAD DE LA SOLUCIÓN
0.00	1.005082
0.00	1.004737
0.62	1.014653
0.92	1.019615
1.37	1.026183
1.47	1.027836
2.03	1.037916
3.06	1.054843
4.00	1.070536
5.08	1.089624
5.54	1.096596
5.86	1.102184
6.66	1.115915
7.51	1.131403
8.60	1.150158
9.38	1.165627

Coefficientes:

$$\begin{array}{ll}
 P = & 1.004699 \\
 Q = & 1.600307 \times 10^{-2}
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{ll}
 R = & 1.0127546 \times 10^{-4} \\
 S = & 1.657630 \times 10^{-6}
 \end{array}$$

EXPERIMENTO 3.- Desnaturalización de lisozima con mezcla de urea y GuHCl a 25° C.

CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE UREA: 2.03 M	
CONCENTRACIÓN DE GuHCl	DENSIDAD DE LA SOLUCIÓN
0.00	1.035803
1.44	1.067961
2.28	1.087503
3.05	1.105637
3.84	1.123379
4.09	1.129232
5.15	1.152770
5.88	1.168387

Coefficientes:

$$\begin{array}{ll}
 P = 1.035769 & R = 5.256076 \times 10^{-4} \\
 Q = 2.184676 \times 10^{-2} & S = -6.869450 \times 10^{-5}
 \end{array}$$

CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE PROTEÍNA: 4.7692×10^{-3} g/mL	
CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE UREA: 2.03 M	
CONCENTRACIÓN DE GuHCl	DENSIDAD DE LA SOLUCIÓN
0.00	1.037645
0.79	1.053148
1.54	1.071450
2.23	1.087845
3.08	1.108503
3.78	1.123257
4.59	1.141348
5.22	1.156427

Coefficientes:

$$\begin{array}{ll}
 P = 1.037124 & R = 9.716719 \times 10^{-4} \\
 Q = 2.104140 \times 10^{-2} & S = -1.242055 \times 10^{-4}
 \end{array}$$

APENDICE II

CRITERIO DE CHAUVENET PARA EL RECHAZO DE DATOS

En un grupo determinado de datos experimentales puede haber alguno sospechoso de no pertenecer a dicho grupo debido a errores que generalmente son de carácter aleatorio. Esos datos pueden ser descartados siguiendo el criterio de Chauvenet, que consiste en los siguientes pasos :

1. Para el grupo completo de datos se calcula la media $\bar{x}$ y la desviación estándar σ_x .
2. Se obtiene la diferencia entre la media y el dato sospechoso, y se divide entre la desviación estándar, para calcular la desviación normalizada Z :

$$Z = \frac{|\bar{x} - x_s|}{\sigma_x}$$

3. Se calcula el porcentaje de mediciones fuera de esta desviación normalizada considerando un comportamiento de distribución normal (Puede ser hecho con tablas).
4. El porcentaje se multiplica por el número de mediciones, para obtener el número de posibilidades de encontrar esa medición en la muestra.
5. Si el número es menor a 0.5 (Criterio de Chauvenet), el dato sospechoso debe ser descartado.