



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTABILIDAD TÉRMICA DE LA LISOZIMA  
EN PRESENCIA DE ALFA-CICLODEXTRINA  
A DISTINTOS pH.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Q U Í M I C O

P R E S E N T A:

OSCAR ARROYOS ROSALES



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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:**

**PRESIDENTA:** Profesora Lilia María Ernestina Vierna García.

**VOCAL:** Profesor Miguel Antonio Costas Basin.

**SECRETARIO:** Profesor Ernesto Carrillo Nava.

**1er. SUPLENTE:** Profesor Gerardo Omar Hernández Segura.

**2do. SUPLENTE:** Profesor Luis Fernando Olguín Contreras.

El Presente Trabajo se Desarrolló en el Laboratorio 102 de Biofísicoquímica de la  
Facultad de Química, UNAM.

**ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Miguel Antonio Costas Basin.

**SUSTENTANTE:**

Oscar Arroyos Rosales.

# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. <b>Proteína Lisozima.</b> . . . . .	1
1.1.1. Cálculo del grado de exposición de amino ácidos. . . . .	2
1.1.2. pKa de grupos funcionales de amino ácidos. . . . .	4
1.2. <b>Alfa Ciclodextrina.</b> . . . . .	6
1.3. <b>Calorimetría de Barrido Diferencial</b> . . . . .	10
1.3.1. Estabilidad de Proteínas. . . . .	13
<b>2. Objetivos</b>	<b>17</b>
<b>3. Metodología Experimental</b>	<b>18</b>
3.1. <b>Materiales</b> . . . . .	18
3.1.1. Instrumentos y Aparatos. . . . .	19
3.2. Preparación de las muestras. . . . .	19
3.2.1. Procesamiento de los datos. . . . .	21
<b>4. Resultados y Discusión</b>	<b>24</b>
4.1. Experimentos DSC con Lisozima. . . . .	24
4.2. Análisis de $\Delta T_m$ (Modelo de Cooper). . . . .	30
4.3. Grado de exposición al solvente y $\Phi_{pH}$ . . . . .	33
4.4. Interpretación cualitativa de los resultados. . . . .	42
<b>5. Conclusiones</b>	<b>43</b>
<b>6. Perspectivas de Trabajo Futuro.</b>	<b>44</b>

**Bibliografía**

**44**

# Índice de figuras

1.1. Modelo de hélices $\alpha$ y láminas $\beta$ de Lisozima . . . . .	1
1.2. Diagrama que muestra el principio físico de cálculo de ASA. . . . .	3
1.3. Modelo de una $\alpha$ CD y sus 6 subunidades de piranosa. . . . .	6
1.4. Modelo cristalográfico del complejo $\alpha$ CD y beta amilasa de soya . . . . .	6
1.5. Diagrama de un Calorímetro Capilar VP-DSC. . . . .	11
1.6. Termograma de DSC en el que se muestran los parámetros más relevantes de un proceso de desplegamiento de dos estados reversible. . . . .	13
1.7. Ejemplo del efecto de un agente químico en el abatimiento de la $T_m$ de una proteína. . . . .	14
1.8. Gráfico que muestra el cambio en $T_m$ contra el aumento en concentración de un agente desnaturalizante (Datos correspondientes a la Figura 1.7). . . . .	15
1.9. Ejemplo de un termograma donde se recupera alrededor del 90% del área original en un recalentamiento. . . . .	16
3.1. Diagrama que muestra una bandeja de 96 pozos con capacidades máximas de 1000 $\mu$ L. . . . .	20
3.2. Metodología del Tratamiento de los experimentos en DSC. . . . .	22
4.1. Gráfico de $\Delta T_m$ contra concentración de $\alpha$ CD, donde se muestran los resultados para los valores de pH: 2, 3 y 5. . . . .	28
4.2. Gráfico de barras que muestra los porcentajes de reversibilidad para los valores de pH: 2, 3, 5 y 6. . . . .	28
4.3. Gráfico que muestra la variación de la $T_m$ con el pH. . . . .	29
4.4. Ajuste lineal de los datos a pH 2. . . . .	30
4.5. Ajuste lineal de los datos a pH 3. . . . .	31
4.6. Ajuste lineal de los datos a pH 5. . . . .	31

4.7. Lisozima. Resaltados en amarillo los residuos de amino ácidos TRP mencionados en el cuadro 4.8. . . . .	34
4.8. Lisozima. Resaltados en amarillo los residuos de amino ácidos TYR mencionados en el cuadro 4.9. . . . .	35
4.9. Lisozima. Resaltados en amarillo los residuos de amino ácidos PHE mencionados en el cuadro 4.10. . . . .	36
4.10. Lisozima. Resaltados en amarillo los residuos de amino ácidos ARG mencionados en el cuadro 4.11. . . . .	37
4.11. Lisozima. Resaltados en amarillo los residuos de amino ácidos ASP mencionados en el cuadro 4.12. . . . .	38
4.12. Lisozima. Resaltados en verde el residuos del amino ácido $GLU^7$ , azul los residuos de amino ácidos $LYS^{97}$ $LYS^{116}$ mencionados en el cuadro 4.13. . . . .	39
4.13. Gráficos de fracción disociada de los amino ácidos participantes de equilibrios ácido base. .	40

# Índice de cuadros

1.1. Propiedades fisicoquímicas de las tres ciclodextrinas más representativas . . . . .	7
1.2. Constantes de formación entre algunos amino ácidos y $\alpha CD$ . . . . .	9
3.1. Programa ejemplo del llenado de los pozos de una bandeja para DSC. . . . .	21
4.1. Primer programa de concentraciones a pH 2. . . . .	25
4.2. Segundo programa de concentraciones a pH 2. . . . .	25
4.3. Primer programa de concentraciones a pH 3. . . . .	26
4.4. Segundo programa de concentraciones a pH 3. . . . .	26
4.5. Primer programa de concentraciones a pH 5. . . . .	27
4.6. Segundo programa de concentraciones a pH 5. . . . .	27
4.7. Resumen de los datos para $nK_b$ obtenidos mediante los datos de ajuste. . . . .	32
4.8. Resultados del grado de exposición de amino ácidos TRP. . . . .	34
4.9. Resultados del grado de exposición de amino ácidos TYR. . . . .	35
4.10. Resultados del grado de exposición de amino ácidos PHE. . . . .	36
4.11. Resultados del grado de exposición y pKa de amino ácidos ARG. . . . .	37
4.12. Resultados del grado de exposición y pKa de amino ácidos ASP. . . . .	38
4.13. Resultados del grado de exposición y pKa de amino ácidos GLU y LYS. . . . .	39
4.14. Amino ácidos objetivo de complejación con $\alpha CD$ debido a su grado de exposición. . . . .	41

## Resumen

En este trabajo se presentan los resultados de experimentos de Calorimetría de barrido diferencial (DSC) realizados en Lisozima a distintos valores de pH así como también en presencia de alfa Ciclodextrina ( $\alpha CD$ ).

Los experimentos de DSC permiten obtener gráficos de  $C_p$  contra temperatura y a partir de estos se pueden medir propiedades de transición entre fases o estados de una proteína; como por ejemplo la temperatura media de desnaturalización ( $T_m$ ), el cual es un valor de temperatura que caracteriza a cada proteína en su ambiente (condiciones amortiguamiento pH, FI, etc.) químico. Con fundamento en los hechos anteriores se obtuvieron en este trabajo los siguientes resultados:

- 1) Comportamiento del valor de  $T_{m_0}$  (Valor de  $T_m$  para la Lisozima en ausencia de  $\alpha CD$ ) ante cambios en el pH del medio amortiguado. Se observó que los valores de  $T_{m_0}$  para pH entre 3 y 5 oscilan entre 76 y 77 °C, mientras que para pH 2 oscilan alrededor de 62 °C y a pH 6 alrededor de 72 °C. La estabilidad térmica de la proteína es proporcional al valor de  $T_{m_0}$  por lo que la máxima estabilidad de la Lisozima está entre los pH 3 a 5, mientras que para pH 2 y 6 la estabilidad decrece.
- 2) Variación del porcentaje de reversibilidad del proceso de desplegamiento debido a cambios en el pH del medio. La máxima reversibilidad en términos de área recobrada durante un recalentamiento de la muestra en ausencia de  $\alpha CD$  se observa a pH ácidos mientras que se pierde esta capacidad conforme se incrementa el pH.
- 3) Abatimiento de la  $T_m$  debido a la presencia de alfa Ciclodextrina [1] ( $T_{m_{\alpha CD}}$ ). El mayor abatimiento (valor más negativo del  $\Delta T_m = T_{m_{\alpha CD}} - T_{m_0}$ ) en la  $T_m$  se observa a una concentración de 90 mM  $\alpha CD$  y varía según el pH del medio de este modo; a pH 2 se observa el valor más negativo de  $\Delta T_m$  alrededor de -3.7 °C, para pH 3 el  $\Delta T_m$  es alrededor de -2.5°C y a pH 5 alrededor de -2.7°C.

A valores ácidos de pH la Lisozima tiene su mayor estabilidad en el rango de 3 a 5 y la reversibilidad del proceso de desplegamiento es de alrededor del 85%. Es también a pH ácidos que se observa una mayor interacción con  $\alpha CD$  en términos de  $\Delta T_m$ . A pH básicos, es probable que la proteína sea incapaz de plegarse debido a un proceso de agregación como sugieren los datos de reversibilidad a pH 6.

# Capítulo 1

## Introducción

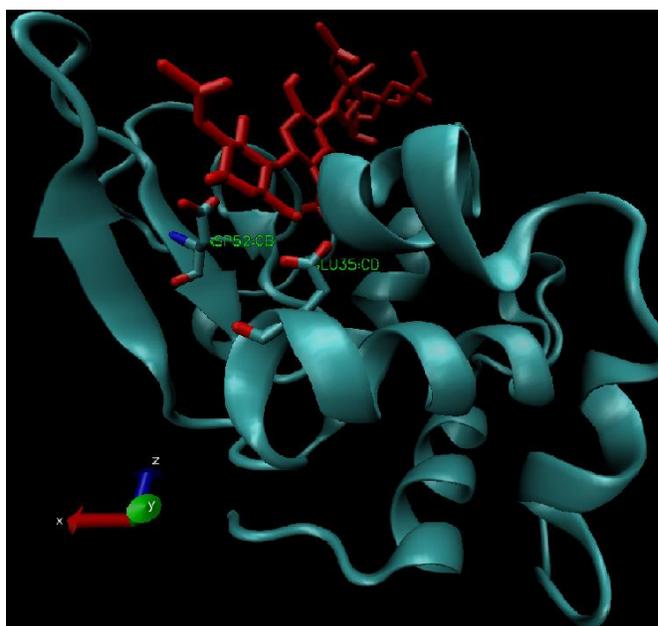
### 1.1. Proteína Lisozima.

La proteína Lisozima (*N-acetil muramidasa*, *N-acetilmuramil hidrolasa*) es una proteína globular que actúa como agente bactericida al degradar la pared celular de cierto tipo de bacterias. Se puede encontrar en fluidos como la saliva, el moco y como subproducto metabólico de algunas bacterias así como también en la clara de huevo.

La Lisozima de la clara de huevo de gallina es un monómero de 129 amino ácidos con una masa molecular de alrededor de 14300 Daltons. En su estructura existen cuatro enlaces disulfuro [2] entre las cisteínas 6 y 127, 30 y 115, 64 y 80, 76 y 94 y una hendidura que contiene el sitio activo ver figura 1.1. El sustrato natural de la Lisozima es la molécula de peptidoglucano (polisacárido) que se

encuentra en paredes bacterianas. La Lisozima rompe el enlace glucosídico

C-O ( $\beta$  1  $\rightarrow$  4) entre dos azúcares que constituyen la molécula de peptidoglucano: el ácido N-acetilmurámico (Mur2Ac) y la N-acetil-glucosamina (GlcNAc). Los amino ácidos catalíticos clave son GLU<sup>35</sup> y ASP<sup>52</sup>. El sitio activo de Lisozima está localizado en una hendidura, que divide la proteína en dos dominios unidos por una hélice alfa. Uno de los dominios (residuos 40 a 85) consiste casi enteramente de láminas beta,



**Figura 1.1** – Modelo de hélice  $\alpha$  y láminas  $\beta$  de Lisozima (verde) unida a su sustrato natural (rojo).

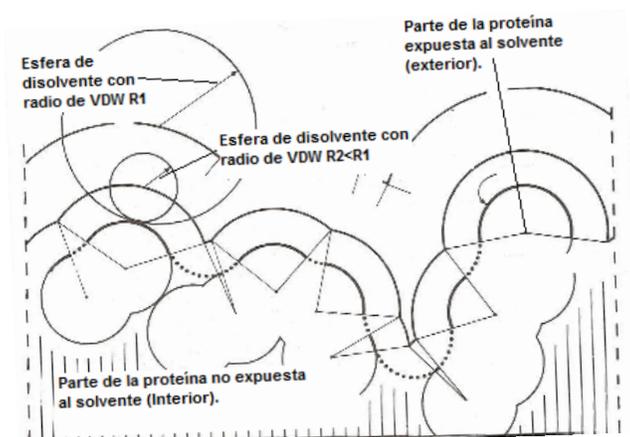
mientras que el segundo dominio (residuos 89 a 129) son mayoritariamente hélices alfa. La reacción de la Lizosima sobre glicanos es una sustitución nucleofílica en la que un grupo -OH del agua reemplaza a GlcNAc en la posición C-1 de Mur2Ac.

Para la realización de este trabajo se empleó el liofilizado de Lizosima extraída de la clara de huevo de gallina de Sigma-Aldrich para Biología Molecular. La descripción del polipéptido se da como una sola cadena de 129 amino ácidos entrecruzados conteniendo puentes de disulfuro, la pureza de la proteína es de menos del 98 %, con una masa molecular de 14.3 kDa y un punto isoeléctrico correspondiente a un pH de 11.4. Se asegura que la enzima es activa [3] en el intervalo de pH de 6 a 9 y que la máxima actividad de ésta se observa a un pH de 6 y un intervalo de fuerza iónica de 0.02 a 0.1 M. Los inhibidores de la Lizosima son derivados de indoles que se unen y distorsionan el sitio activo, también se menciona que se ve inhibida por la presencia de tensoactivos como el dodecil sulfato de sodio, dodecanato y su alcohol. Su máxima solubilidad en agua es 10 mg/mL.

### 1.1.1. Cálculo del grado de exposición de amino ácidos.

El Área superficial accesible al disolvente (*Accessible Surface Area* ASA) de una molécula es la componente de su superficie molecular que se encuentra expuesta al solvente y por tanto estará en contacto íntimo con él. Un método desarrollado por Shrake y Rupley [4] para calcular el ASA de un amino ácido en una estructura proteica consiste en aproximar cada átomo como una esfera rígida mediante una representación de malla de puntos para la superficie de ésta esfera de *van der Waals* (VDW). Para generar la malla de un átomo en la molécula típicamente se comienza con puntos radialmente equidistantes en una esfera unitaria centrada en el origen y una vez que se cuenta con la distribución de estos puntos se multiplica el radio de cada punto de la esfera de VDW por el radio atómico y se reemplaza la posición (0,0,0) por las coordenadas (x,y,z) del átomo en la estructura cristalina de la proteína, los datos se obtienen del Banco de Datos Cristalográficos para Proteínas (*Protein Data Bank* PDB).

Después se elige un radio que caracterice una esfera la cual representará a la molécula de solvente con la que se pretende calcular el ASA. Esta esfera de disolvente se desplaza sobre las esferas de VDW de los átomos constitutivos de la proteína y el recorrido de la esfera de disolvente se emplea para calcular por geometría el ASA. La precisión del método varía principalmente dependiendo del radio de la esfera de disolvente y del número de puntos empleados para construir la malla de la esfera de VDW. Para tener una referencia contra la cual contrastar el valor del ASA para un amino ácido dentro de la estructura de la proteína, se realiza simultáneamente el cálculo del ASA para este amino ácido en la secuencia de un



**Figura 1.2** – Diagrama que muestra el principio físico de cálculo de ASA.

tripéptido del tipo:



Donde XXX representa el código de 3 letras para el amino ácido de interés. Este cálculo de ASA en el tripéptido sirve para tener una idea del máximo valor de exposición posible al disolvente del amino ácido XXX en una estructura polipeptídica. Empleando éste método numérico se puede usar el valor de ASA de un amino ácido para estimar su grado de exposición al disolvente comparado contra una referencia de exposición máxima (ASA tripéptido) y de éste modo tener una idea del grado de exposición al disolvente de un determinado aminoácido en una proteína. En general éste cálculo involucra los siguientes pasos:

- a) Cálculo del ASA de todos los átomos de la secuencia polipeptídica.
- b) Cálculo del ASA de cada amino ácido de la secuencia polipeptídica a partir del ASA atómico.
- c) Realizar una comparación de la exposición de cada amino ácido en la secuencia polipeptídica (ASA de cada amino ácido en la estructura tridimensional de la proteína obtenida a partir de datos cristalográficos como por ejemplo PDB) contra un valor de referencia que considere el ASA total de un amino ácido (ASA en tripéptido por ejemplo).

En éste trabajo se ocuparon dos programas de cómputo que sirvieron para calcular los valores de ASA y visualizar los amino ácidos con mayor exposición al agua. El programa de visualización empleado fue *Visual Molecular Dynamics 1.9* [5] y el programa para calcular el ASA fue: ASA-ENG<sup>1</sup> usando un radio de la esfera de disolvente de 1.4 Å (radio covalente aproximado para una molécula de agua aproximándola como

<sup>1</sup>Programa desarrollado en el grupo de investigación de J.M. Sánchez-Ruiz, Universidad de Granada.

una esfera) y 2000 puntos para la malla de VDW. En ambos programas se introducen datos cristalográficos para las coordenadas cartesianas (x,y,z) de los átomos de la proteína Lisozima (PDB 193L).

### 1.1.2. **pKa de grupos funcionales de amino ácidos.**

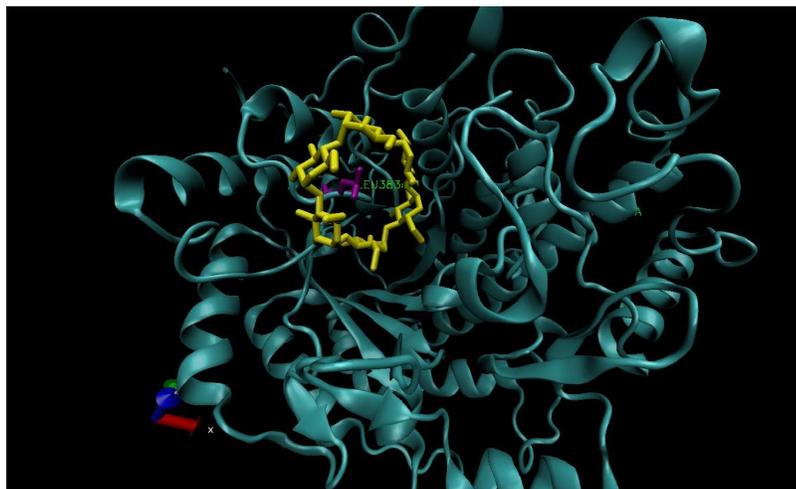
Las cadenas laterales de amino ácidos establecen interacciones con otros amino ácidos y con agua. Estas interacciones determinan la estabilidad y funcionamiento de la proteína. Los amino ácidos hidrofóbicos (aquellos con cadena lateral de carácter hidrofóbica) solamente se involucran en interacciones de tipo van der Waals. Su tendencia para evitar el contacto con el agua y agruparse con residuos similares es el fundamento del denominado efecto hidrofóbico durante el plegamiento. Los amino ácidos Alanina y Leucina son residuos que favorecen la formación de hélices  $\alpha$ , mientras que Prolina raramente se encuentra en este tipo de estructuras debido principalmente a que el nitrógeno de la cadena principal no se encuentra disponible para formar puente de hidrógeno con los amino ácidos adyacentes. Los residuos hidrofílicos son capaces de establecer puentes de hidrógeno con sus congéneres, moléculas polares orgánicas y con agua. Además de esto algunos pueden cambiar su carga neta dependiendo del pH o del medio. Los ácidos Aspártico y Glutámico tienen valores de  $pK_a$  alrededor de 5 en solución acuosa, de modo que a pH 7 usualmente se encuentran con carga negativa, pero en un microambiente hidrofóbico como es por ejemplo el interior (núcleo) de la proteína el  $pK_a$  puede desplazarse hasta un valor de 7 o inclusive mayor. Éste hecho les permite participar dentro del núcleo de la proteína en la formación de puentes de hidrógeno a un pH fisiológico. Las mismas consideraciones anteriores se aplican a Lisina, que tiene un  $pK_a$  mayor a 10 en agua y comúnmente se esquematiza con carga positiva, pero en un ambiente no polar o en presencia de cargas positivas, su  $pK_a$  se puede desplazar hasta 6, y la especie neutral de Lisina puede fungir como un aceptor de protón en un enlace de tipo puente de hidrógeno. Histidina es tal vez el más versátil de los amino ácidos, tiene dos grupos NH básicos, cada uno con valores de  $pK_a$  alrededor de 6. Cuando uno de estos grupos NH pierde un protón, el  $pK_a$  del otro grupo se desplaza hasta más de 10 [6]. Cuando ambos están protonados, el residuo tiene una carga neta positiva. Cuando sólo un NH está protonado, la cadena lateral estará neutra y tendrá la habilidad tanto de donar como aceptar un enlace de hidrógeno. La forma completamente desprotonada tendrá una carga neta negativa y es poco frecuente. Arginina casi siempre se encuentra totalmente protonada a pH neutro y su carga positiva se localiza principalmente en el átomo de carbono del grupo guanidinio. Serina, Treonina, Glutamina y Asparagina no se ionizan pero tienen la capacidad de donar o aceptar un enlace de puente de hidrógeno simultáneamente. Cisteína al igual que Histidina es comúnmente encontrada en los sitios activos de proteínas, ya que el anión tiolato es el nucleófilo más poderoso entre los amino ácidos. Cuando una proteína se pliega, sus amino ácidos

susceptibles de protonación cambian su ambiente de estar en un medio de tipo libre a un medio determinado por la estructura tridimensional de la proteína. Puede suceder por ejemplo que un amino ácido se encuentre expuesto al solvente (y por lo tanto a los iones  $H^+$  y  $OH^-$ ) cuando la proteína está desplegada, y que cuando la proteína se pliegue éste mismo amino ácido no este expuesto y además mantenga interacciones de tipo débil con amino ácidos vecinos. De éste modo estos factores alteran el valor normal del  $pK_a$  que tendría determinado amino ácido libre. Los métodos de cálculo del  $pK_a$  para un amino ácido en una proteína plegada generalmente consideran el efecto del ambiente proteico para ese amino ácido. Los efectos del medio en los valores modelo del  $pK_a$  para un amino ácido se dividen en:

- Aquellos que no dependen del pH; los efectos de desolvatación, interacción con cargas permanentes y dipolos, son adicionados al valor del  $pK_a$  modelo, para originar un valor de  $pK_a$  corregido.
- Aquellos que dependen del pH; para este caso los efectos no pueden ser añadidos del mismo modo sino que deben ser sumados usando funciones de distribución (peso estadístico).

## 1.2. Alfa Ciclodextrina.

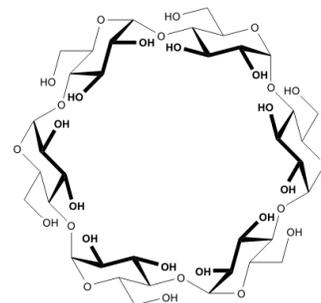
La Química Supramolecular es una disciplina de la química que se ocupa del estudio de estructuras formadas por interacciones intermoleculares de tipo no covalente, por ejemplo entre moléculas neutras, iones o radicales. La mayoría de este tipo de interacciones se observan entre una molécula huésped y una hospedera. De entre una vasta mayoría de moléculas hospederas se destacan las ciclodextrinas debido a que son productos seminaturales producidos a partir de materiales naturales renovables como almidón, mediante una simple conversión enzimática. Son producidas en cantidades de toneladas anualmente mediante tecnologías no dañinas al ambiente, además son relativamente económicas comparadas con otros tipos de moléculas huésped. Las ciclodextrinas forman complejos de inclusión estables con moléculas huéspedes. Por lo tanto son buenos candidatos como acarreadores de fármacos y pueden, en principio ser empleados en las industrias alimentarias y cosméticas.



**Figura 1.4** – Modelo cristalográfico (PDB 1BTC) que muestra la  $\alpha$ CD (amarillo) unida al amino ácido LEU<sup>383</sup> (púrpura) de la beta amilasa de soya (verde).

Para 1980 ya se había demostrado que la aparente toxicidad de las ciclodextrinas provenía de un inadecuado método de cristalización el cual dejaba solventes de los procesos extractivos incluidos en las moléculas de  $\alpha$ CD. También se había podido llegar a un costo de producción viable para su uso comercial e industrial.

Desde un punto de vista químico las ciclodextrinas son heteromacrociclos formados de subunidades de glu-



**Figura 1.3** – Modelo de una  $\alpha$ CD y sus 6 subunidades de piranosa.

Los primeros estudios sistemáticos sobre las ciclodextrinas se realizaron en los periodos de 1930 a 1970 en los cuales se logró determinar que las ciclodextrinas se componían de subunidades de maltosa que se unían a través de enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos. Estos resultados fueron obtenidos mediante ensayos de hidrólisis enzimática y acetólisis, logrando al final elucidar su estructura cíclica. En la época de los 50 el grupo de investigación de F. Cramer comenzó a trabajar intensivamente acerca de la formación de comple-

copiranosas que presentan una forma de tipo cono truncado y hueco cuyas dos superficies mayores tienen polaridad inversa. La superficie interior del cono es de carácter apolar mientras que la superficie exterior es de carácter polar. En particular la  $\alpha$ CD también llamada  $\alpha$ -dextrina de Schardinger, ciclomaltohexosa, ciclohexaglucano, ciclohexaamilosa o ACD C6A, tiene seis unidades glucopiranosas como puede observarse en la figura 1.3 y además se han informado en la literatura [7] la formación de complejos de inclusión entre las cadenas laterales de proteínas y este heteromacrociclo (figura 1.4).

**Propiedades fisicoquímicas de distintas ciclodextrinas**

Tipo de ciclodextrina	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD.
Número de unidades de Glucopiranosas	6	7	8
Fórmula empírica anhidra	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Apariencia	polvo blanco cristalino	polvo blanco cristalino	polvo blanco cristalino
Masa molecular(g/mol) (Anhídrido)	972.85	1134.99	1297.14
Solubilidad máxima en agua [mol/dm <sup>3</sup> ] (25°C)	0.1211	0.0163	0.168
Rotación óptica [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> (25°C)	+150.5	+162.0	+177.4
Altura de la cavidad (Å)	7.8	7.8	7.8
Diámetro interno (Å)	de 4.7 a 5.3	de 6.0 a 6.5	de 7.5 a 8.3
Diámetro externo (Å)	14.6 ± 0.4	15.4 ± 0.4	17.5 ± 0.4
Volumen aproximado de la cavidad [Å <sup>3</sup> ]	174	262	427
Agua de cristalización [% Peso Molecular]	10.2	de 13.2 a 14.5	de 8.13 a 17.7
$pK_a$ Potenciométrico (25°C)	12.332	12.202	12.081

**Cuadro 1.1** – Propiedades fisicoquímicas de las tres ciclodextrinas más representativas (referencia [8])

### Producción de Ciclodextrinas

La enzima que produce directamente la ciclodextrina a partir de almidón es la Ciclodextrin Glucosil Transferasa (CGT-asa) producida por los microorganismos *Bacillus macerans*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus circulans* y *Alkalophylic bacillus*. Microorganismos modificados genéticamente han proveído enzimas de mayor actividad capaces de producir ciclodextrinas a nivel industrial y de muy bajo costo. El primer paso en la producción de ciclodextrinas es la licuefacción del almidón a elevada temperatura, después se hidroliza el caldo sin llegar a azúcares de bajo peso molecular de lo contrario el rendimiento de ciclodextrinas será bajo. Después del enfriamiento se adiciona la enzima al caldo de almidón, para separar la fase condensada de ciclodextrina se adiciona al caldo 1-decanol lo cual formará un complejo de inclusión entre la ciclodextrina y el alcohol, éste complejo insoluble es removido de la mezcla de reacción mediante filtrado, la remoción de solventes a partir del filtrado es generalmente realizado después de suspender el sólido en agua por destilación o extracción.

La solución acuosa obtenida después de la remoción del solvente complejante es tratada con carbón activado y filtrada. Las ciclodextrinas son entonces separadas de esta solución mediante cristalización y filtrado. La pureza de las ciclodextrinas producidas industrialmente es en general mayor al 99 %.

### Complejos de inclusión.

En solución acuosa, la cavidad de carácter apolar de las ciclodextrinas estará parcialmente ocupada por moléculas de agua que se encontraran energéticamente desfavorecidas debido al tipo de interacciones (polar-apolar) a las cuales están sometidas y por lo tanto serán propensas de ser sustituidas por moléculas hospederas menos polares que el agua.

De éste modo la ciclodextrina disuelta en agua es la molécula hospedera y la fuerza motriz de la formación de complejo es la substitución de las moléculas de agua por moléculas que estabilicen la energética del complejo de inclusión debido a su polaridad. La esencia del poder encapsulante de las ciclodextrinas radica en su capacidad de formar complejos (cuadro 1.2) que, para muchos huéspedes, son de estequiometría 1:1, sin embargo; complejos de estequiometrías 2:1, 1:2, 2:2 e incluso de mayor complejidad pueden ser encontradas en la literatura.

**Unión de Amino Ácidos a Ciclodextrinas.**

En el cuadro 1.2 se presentan las constantes de formación de diversos complejos de inclusión entre las ciclodextrinas y algunos amino ácidos. Los datos fueron obtenidos empleando distintas técnicas como microcalorimetría, espectroscopías UV-VIS, de fluorescencia, y Resonancia Nuclear Magnética (NMR). Los solventes empleados fueron agua o D<sub>2</sub>O a distintos valores de pH y con distintos medios amortiguadores. Las constantes de unión en el cuadro 1.2 son pequeñas, indicando que los complejos de inclusión entre ciclodextrina y amino ácidos son débiles.

Constantes de unión a 25 °C entre algunos amino ácidos y $\alpha CD$ [ $\frac{dm^3}{mol}$ ]	
Tipo de amino ácido	$\alpha$ -CD
L-ALA	1122
GLY	562
L-HIS	12
L-LEU	6
L-PHE	257
L-TRP	62
L-TYR	794
L-ASP	4467
L-LYS	167

**Cuadro 1.2** – Constantes de formación entre algunos amino ácidos y  $\alpha CD$  (referencias [8, 9])

### 1.3. Calorimetría de Barrido Diferencial

El acrónimo en idioma inglés de la técnica termoanalítica Calorimetría de Barrido Diferencial, es DSC (*Differential Scanning Calorimetry*). Esta técnica permite medir transiciones térmicas inducidas en un sistema, así como también ciertas propiedades termodinámicas y cinéticas del proceso. De este modo se puede decir que la técnica de DSC permite estudiar propiedades termotrópicas (y su variación con la temperatura) de distintas macromoléculas biológicas o macropolímeros, como por ejemplo las transiciones de fase o cambios conformacionales. Mejoras en aspectos técnicos de diseño y materiales a lo largo de 5 décadas han permitido construir instrumentos cuyos límites de detección sean cada vez menores, permitiendo con esto el estudio detallado de biopolímeros de interés o de interacciones de unión entre ligantes y biomoléculas. Un avance importante en este campo surge con el advenimiento de los calorímetros que emplean celdas adiabáticas microlítricas, las cuales impiden la transferencia de energía (calor) entre el sistema y su entorno, permitiendo medir directamente la diferencia en temperatura entre las celdas de referencia y de muestra. Estas celdas miniaturizadas mejoran la sensibilidad de respuesta a la compensación térmica al reducir drásticamente los gradientes de temperatura que pudieran presentarse en una celda debido a la transferencia de calor a lo largo del solvente y la eliminación de los sistemas de agitación al ser innecesarios en sistemas capilares. Estos capilares son celdas cilíndricas con diámetros del orden de micrómetros que tienen un cociente de superficie por unidad de volumen más alto que los diseños predecesores, logrando que los efectos de viscosidad y gradientes de calor sean minimizados. Además, los sistemas capilares pueden resistir grandes presiones internas en comparación con otros diseños, lo que repercute en la capacidad de acoplamiento de sistemas presurizados capaces de alcanzar temperaturas por encima de los puntos de ebullición de determinados disolventes inorgánicos y orgánicos.

En la figura 1.5 se muestra el diagrama de un Calorímetro Capilar VP-DSC cuya descripción corresponde a:

(1,2) celdas de muestra y referencia con tubos capilares de entrada para el llenado y limpieza; (3,4) calentadores principales situados sobre las celdas, controlados por un Voltaje  $V_{II}$  de la fuente de alimentación (5). La fuente de alimentación se conecta a una computadora (6) mediante una tarjeta convertora analógica digital de señales (7). Durante una calibración y en el modo de retroalimentación; dispositivo de medida del efecto térmico (8) y sensor de cristal (9) para medir la diferencia de temperatura  $\Delta T_1$  entre las dos celdas. Cubriendo a las dos celdas se encuentra la coraza (10) con dispositivos de calentamiento y enfriamiento (11) dirigidos por un controlador (12), que responde a una señal entrante en una terminal (13) procedente

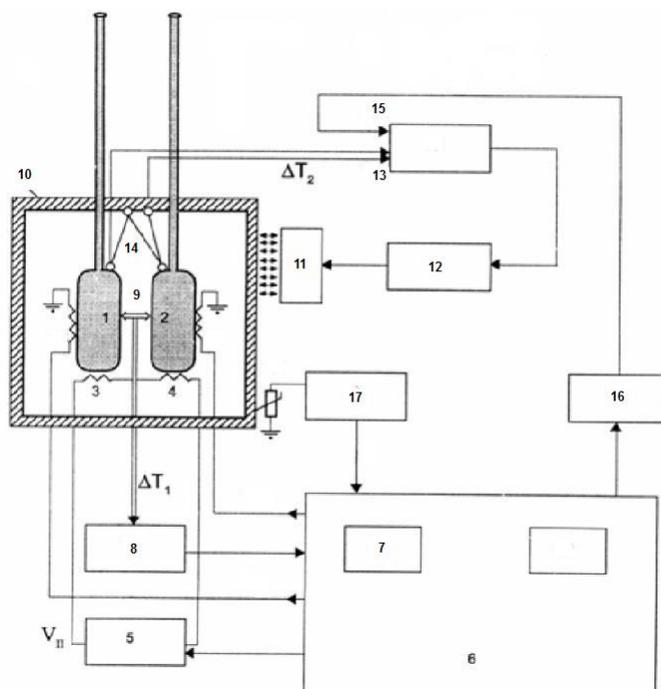


Figura 1.5 – Diagrama de un Calorímetro Capilar VP-DSC.

del sensor (14) que mide la diferencia de temperatura  $\Delta T_2$  entre las celdas y la coraza. La otra terminal (15) recibe un voltaje de la fuente de alimentación (16), controlada por la computadora a través de la tarjeta analógica (7). La coraza tiene además un dispositivo (17) para la medida de temperaturas activado mediante un sensor (18) dispuesto en la coraza térmica. La señal que sale de él pasa por la computadora a través de la tarjeta analógica (7). Las señales calibradas de entrada a la computadora ( $\Delta T_1$ ) y ( $\Delta T_2$ ) así como la temperatura registrada por (17) son monitoreadas durante todo el experimento y almacenadas en la computadora a intervalos señalados por el usuario (Plotnikov *et al.*,1997).

Dos sistemas principales son empleados para controlar las temperaturas de las celdas. La primera es una unidad de compensación de potencia eléctrica, la cual controla y realiza un monitoreo de modo independiente de la temperatura de cada una de las celdas. De este modo, una cantidad constante de energía se provee a las celdas y la temperatura se incrementa a una velocidad controlada e igual para ambas de modo que se encuentran en equilibrio térmico. Sin embargo, una transición que sea inducida térmicamente y que por tanto requiera un flujo de calor, dará como resultado una variación en la temperatura de la celda donde se encuentra la muestra, en comparación con la temperatura mantenida en la celda de referencia y el calor extra requerido (potencia eléctrica) para mantener la temperatura de la celda de la muestra igual

a la temperatura de la celda de referencia se usa para calcular la capacidad calorífica de exceso.

Controles independientes utilizan dos unidades de calentamiento y enfriamiento (una por cada celda) para mantener la temperatura. El segundo sistema usa el principio de flujo de calor, donde ambas celdas se encuentran conectadas a través de un dispositivo de resistencia al flujo (usualmente un disco metálico). La diferencia en potencia eléctrica requerida y colectada por la unidad medidora de la temperatura es proporcional a la diferencia de temperatura que se usa en el cálculo de la capacidad calorífica ( $\frac{dQ}{dT} = C_p$ ). Existen diversos diseños de calorímetros de barrido, pero todos tienen en común las siguientes características principales:

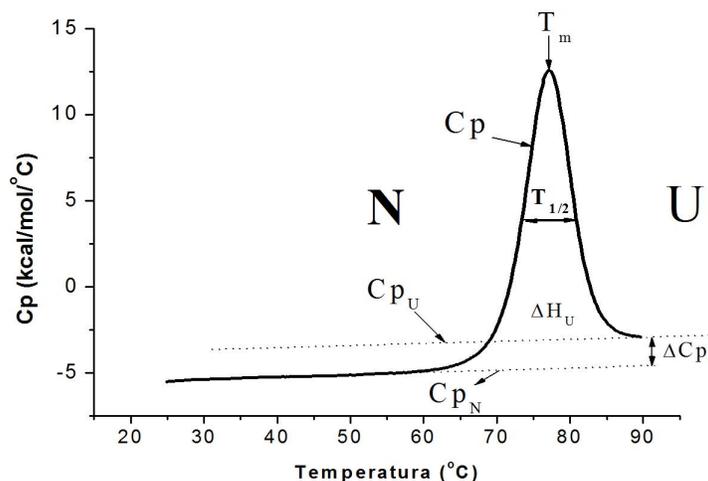
Primera deben ser capaces de medir cambios de temperatura de un modo muy preciso y convertir la señal térmica en eléctrica y viceversa, manteniendo velocidades de calentamiento o enfriamiento constantes.

Segunda deben medir con precisión el flujo de calor "diferencial" entre las celdas de muestra y referencia, lo cual repercute en una mejor estabilidad de las líneas base (el desplazamiento entre ellas es cercano a cero) y una reducción en el ruido instrumental (la variabilidad entre puntos consecutivos captados en tiempo real del experimento es baja).

Durante un experimento de DSC la solución de muestra (típicamente una solución de proteína en concentraciones que van desde los 0.2 mg/mL hasta 2 mg/mL) es calentada a una velocidad constante en la celda calorimétrica. Simultáneamente en la celda de referencia se incrementa la temperatura como una réplica conteniendo una solución con la misma composición que la celda de muestra excepto por la muestra de proteína. Ambas soluciones están sometidas a una presión constante positiva que inhibirá la formación de burbujas durante el calentamiento debida a la transición a vapor del solvente o a los gases disueltos en las soluciones. Las diferencias de temperatura entre las celdas de muestra y referencia y la chaqueta o coraza son medidas por termopares sensibles que convierten la señal térmica en una diferencia de potencial eléctrico. Al principio del calentamiento no habrá diferencia significativa de temperatura entre ambas celdas, pero al llegar a un valor de temperatura las moléculas de proteína en la celda S comenzarán a desplegarse (desnaturalización térmica), por lo que cierta cantidad de energía calorífica proveniente de los calentadores principales será empleada para compensar esta transición endotérmica ocurrida en la celda S y así poder mantener igual y constante la temperatura entre las celdas. A partir del gráfico obtenido durante éste proceso (Figura 1.4) se puede calcular de manera directa las entalpías de procesos termoquímicos reversibles. Si el proceso es irreversible, la cantidad de información termodinámica que puede obtenerse es más limitada.

## 1.3.1. Estabilidad de Proteínas.

El uso de la calorimetría DSC permite la obtención de parámetros termoquímicos de las proteínas como son por ejemplo: a) La temperatura media de transición  $T_m$ . b) El  $\Delta H_u$  y  $\Delta C_p$  asociado con el proceso de desdoblamiento reversible. c) La estabilidad térmica de la proteína en presencia de agentes químicos.



**Figura 1.6** – Termograma de DSC en el que se muestran los parámetros más relevantes de un proceso de desplegamiento de dos estados reversible.

La Figura 1.6 muestra un termograma con los parámetros termodinámicos característicos de un proceso de desplegamiento de dos estados. Las letras N y U corresponden a los estados nativo y desnaturalizado en los cuales se distribuye la cantidad total de proteína durante la desnaturalización (la fragmentación de una población o cantidad de proteína proviene de un fenómeno estadístico debido a las moléculas de proteína componentes de la muestra). En la misma figura se observan la función  $C_p$  para el proceso de desplegamiento, la temperatura media de transición  $T_m$ , el cambio de capacidad calorífica entre los estados N y U de la proteína  $\Delta C_p$ , el ancho del pico de desnaturalización a la mitad de la altura  $T_{1/2}$ , la entalpía de desnaturalización  $\Delta H_u$  (correspondiente al área bajo el pico o curva de transición después de la sustracción de la línea base instrumental efecto  $\Delta C_p$ ), extrapolados se observan las funciones de  $C_p$  para los estados U ( $C_{pU}$ ) y N ( $C_{pN}$ ).

El equilibrio químico y su constante para el proceso reversible de dos estados es:

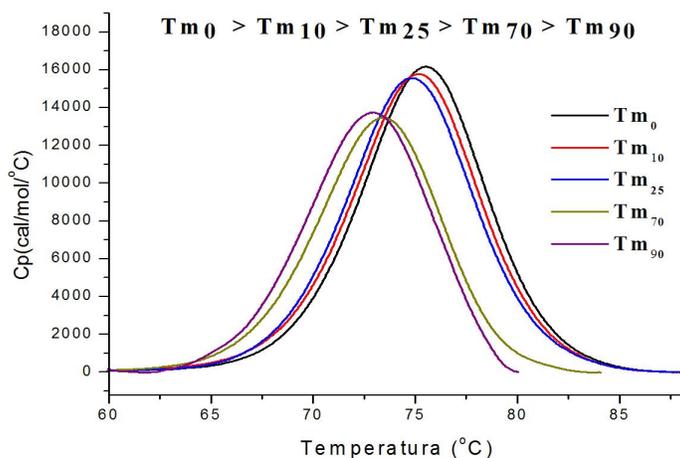
$$N \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} U \quad (1.1)$$

$$K_U = \frac{[U]}{[N]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (1.2)$$

Los valores de  $\Delta H_u$  del proceso de desplegamiento (calor de desnaturalización) se obtienen al integrar el área bajo la curva del termograma (para el caso de desnaturalizaciones reversibles). Cuando el proceso de desnaturalización térmica de una proteína involucra sólo 2 estados se puede localizar un valor de máximo  $C_p$  a una temperatura llamada  $T_m$ . El área normalizada debajo de la curva de un termograma es por extensión proporcional a la distribución de la cantidad total de proteína [10] entre los estados involucrados en el proceso, de modo que a la temperatura  $T_m$  el 50 % de la cantidad total de proteína se encuentra en su configuración nativa y el resto como desnaturalizada, razón por la cual a ésta temperatura se le llama temperatura del punto medio de transición o desnaturalización. El valor del  $\Delta C_p$  proviene de substraer la capacidad calorífica del estado nativo al valor de  $C_p$  correspondiente al estado U.

Experimentos de DSC en presencia de agentes químicos muestran un desplazamiento de las trazas térmicas de las proteínas.

Este desplazamiento se observa con respecto a la  $T_m$  en ausencia del agente desnaturalizante ( $T_{m_0}$ ) y puede ser: (i)  $T_{m_D}$  (agente químico) >  $T_{m_0}$  (estabilización de la proteína) y (ii)  $T_{m_D}$  (agente químico) <  $T_{m_0}$  (desestabilización de la proteína) Como ejemplo del desplazamiento de un termograma se muestra la



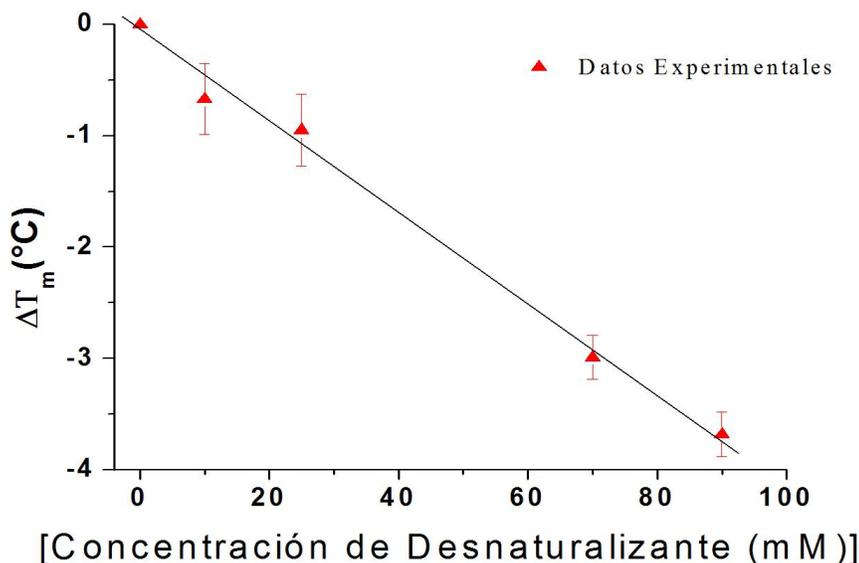
**Figura 1.7** – Ejemplo del efecto de un agente químico en el abatimiento de la  $T_m$  de una proteína.

Figura 1.7, en la cual  $T_{m_0}$  corresponde a un valor de  $T_m$  sin agente químico,  $T_{m_{10}}$  cuando la proteína

está en presencia de 10 mM de un desnaturalizante,  $T_{m_{25}}$  25 mM,  $T_{m_{70}}$  70 mM y  $T_{m_{90}}$  90 mM. Para analizar el efecto que tiene el aumento de concentración del agente químico sobre la temperatura media de desnaturalización se realizan gráficos de  $\Delta T_m$  (figura 1.8) como función de la concentración del agente químico de prueba, donde:

$$\Delta T_m = T_m(\text{en presencia del agente químico}) - T_{m_0} \quad (1.3)$$

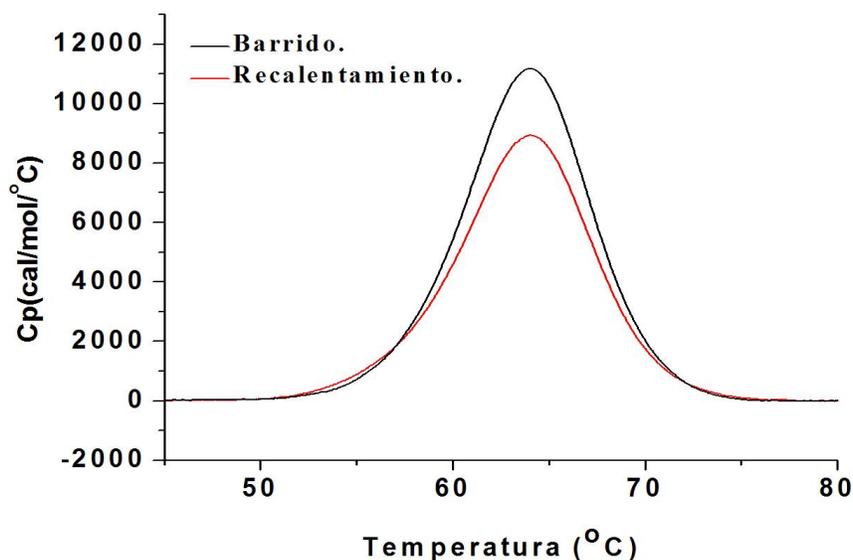
Otro hecho importante que nos habla de la integridad de la proteína (así como de un equilibrio verdadero



**Figura 1.8** – Gráfico que muestra el cambio en  $T_m$  contra el aumento en concentración de un agente desnaturalizante (Datos correspondientes a la Figura 1.7).

en el proceso de desplegamiento) es la capacidad de recobrar su estructura nativa a partir del estado desplegado. Para que el equilibrio químico realmente exista en una desnaturalización la velocidad de formación de U debe igualar a la velocidad de formación de N (ecuación 1.1). Experimentalmente una aproximación para cuantificar la reversibilidad del desplegamiento es realizar un recalentamiento a la muestra; es decir, se obtiene la traza térmica, después se enfría el sistema permitiendo que se repliegue la proteína y se realiza de nuevo el calentamiento para verificar que se reproduce el termograma anteriormente obtenido en términos del área recobrada. Como ejemplo se muestra la figura 1.9.

El grupo de investigación de Cooper [1] realizó en 1992, experimentos de DSC para analizar el efecto que podría tener en la estabilidad térmica de distintas proteínas globulares la variación de la concentración de  $\alpha CD$ . Mediante análisis del  $\Delta T_m$  como función lineal de la concentración de  $\alpha CD$  para Lisozima (condi-



**Figura 1.9** – Ejemplo de un termograma donde se recobra alrededor del 90 % del área original en un recalentamiento.

ciones de pH 3.3, amortiguador clorhidrato de glicina), halló que los amino ácidos aromáticos (6 TRP, 3 PHE, 3 TYR) de Lisozima muy probablemente son los que interactúan con la ciclodextrina. Al considerar los tipos de amino ácidos que menciona Cooper, se puede predecir que un cambio en el pH del medio no debería modificar los resultados en el  $\Delta T_m$  medido de Lisozima, ya que estos amino ácidos en principio, no toman parte en equilibrios ácido base en solución acuosa. Teniendo en mente las conclusiones del trabajo de Cooper se propuso realizar mediciones de  $\Delta T_m$  a distintos valores de pH y verificar que se reproducían los resultados que el obtuvo.

## Capítulo 2

# Objetivos

1. Estudiar el efecto de la presencia de  $\alpha CD$  en la estructura de Lisozima.
2. Realizar Mediciones de  $\Delta T_m = T_m(\text{en presencia de } \alpha CD) - T_m(\text{en ausencia de } \alpha CD) = T_{m_{\alpha CD}} - T_{m_0}$  a distintos valores de pH.
3. Realizar un análisis acerca del número, tipo y grado de exposición de amino ácidos que pueden formar complejos con  $\alpha CD$  y son susceptibles de protonación en la proteína Lisozima, empleando para ello datos estructurales provenientes del Banco de Datos de Proteínas (PDB 193L).
4. Correlacionar los resultados obtenidos de  $\Delta T_m$  para los distintos valores de pH con los resultados del análisis de exposición de las cadenas laterales de la Lisozima.

## Capítulo 3

# Metodología Experimental

### 3.1. Materiales

#### Lisozima.

La Lisozima empleada es un liofilizado comprado a Sigma-Aldrich, producto proveniente de Canada. Pureza: no menos del 98%. Grado Biología Molecular, Masa Molecular 14.3kDa.

#### Sales de Fosfatos.

Se emplearon:  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  marca J. T. Baker. El peso fórmula es de  $137.99 \frac{g}{mol}$  y una pureza del 99.6%  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  marca J. T. Baker. El peso fórmula es de  $268.07 \frac{g}{mol}$  y una pureza del 99.9%

#### Agua Desionizada.

El agua destilada y desionizada se obtuvo de un desionizador Simplicity Millipore RiOS-D1 UV-3 con una resistividad de  $18.2 M\Omega \cdot cm$  a  $25^\circ C$ , con un contenido de carbono orgánico menor a  $5 \frac{\mu g}{L}$  (ppb) usando la lámpara UV, y de menos de  $15 \frac{\mu g}{L}$  (ppb) sin lámpara UV. Para el caso de micro organismos presentes se asegura un contenido menor a 1 Unidad Formadora de Colonia por mL reemplazando oportunamente el filtro final.

#### $\alpha$ Ciclodextrina.

Alfa ciclohexa amilosa Sigma-Aldrich 98% pureza HPLC, 12.3%  $H_2O$ , peso fórmula  $972.86 \frac{g}{mol}$  proveniente de EUA.

#### Ácido Fosfórico.

Ácido Orto Fosfórico marca J. T. Baker Analyzed ACS Reagent. Pureza 85-87%

#### Estándares de pH 4, 7 y 10.

Solución Buffer Ftalato pH  $4.01 \pm 0.01$  a  $25^\circ C$ . Solución Buffer Fosfatos pH  $7.00 \pm 0.01$  a  $25^\circ C$ . Solución Buffer Boratos pH  $10.00 \pm 0.01$  a  $25^\circ C$ .

### 3.1.1. Instrumentos y Aparatos.

#### **Balanza Analítica.**

Balanza Analítica Mettler AT250 precisión 0.1 mg para el rango de 1 a 50 mg y 0.01 mg para el rango de 0.1 a 1 mg

#### **Potenciómetro .**

Potenciómetro Orion ajuste de la pendiente a 2 o 3 puntos según se requiera con los amortiguadores de pH 4, 7, 10.

#### **Pipetas Microlítricas.**

Pipeta marca Ependorff de 20 a 200  $\mu\text{L}$  Incertidumbre:  $\pm 3\%$ .

#### **Pipetas Microlítricas.**

Pipeta marca Gilson de 200 a 1000  $\mu\text{L}$  Incertidumbre:  $\pm 3\%$ .

#### **Microcalorímetro Capilar Marca VP-DSC de Microcal.**

Microcalorímetro con automuestreador VP-DSC Microcal (G& E).

## 3.2. Preparación de las muestras.

#### **Soluciones amortiguadoras.**

Se pesó la cantidad de la sal apropiada de Fosfato en la balanza analítica. Para pH 5, 3 y 2 se empleó  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y para pH 6  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Se disolvió la sal en agua destilada desionizada para lograr una concentración de 10 mM en 100 mL de agua y se midió el pH (previo ajuste del potenciómetro con los estándares de pH). Se ajustó el valor de pH con ácido ortofosfórico. Una vez que se tiene la solución amortiguadora se degasifica en un sonicador durante 30 minutos para evitar la formación de burbujas durante el experimento de DSC.

#### **Lisozima.**

Se pesaron alrededor de 0.040 g del liofilizado en la balanza analítica y se disolvieron en 10 mL de amortiguador (Solución amortiguadora de Fosfatos 10 mM).

#### **$\alpha\text{CD}$ .**

Se pesó la alfa ciclodextrina (cantidad correspondiente para realizar una disolución de concentración 100 mM en el amortiguador) en la balanza analítica considerando su pureza y la cantidad de agua presente en la muestra (11 % en peso).

#### **Preparación de soluciones madre.**

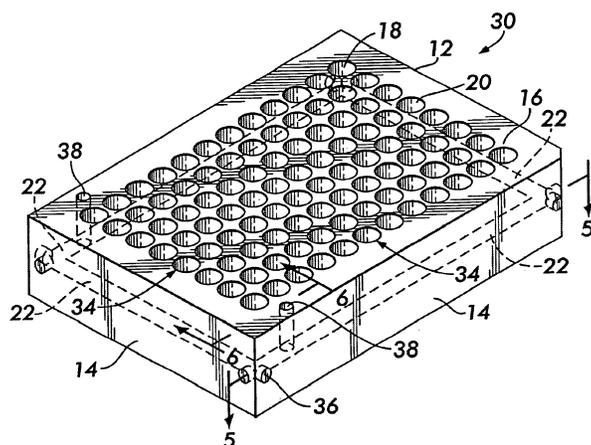
Se realizaron soluciones madre de proteína a una concentración de 4 mg/mL (Graviméricamente) para cada uno de los pH medidos.

Se realizaron soluciones madre de  $\alpha CD$  a una concentración de 100 mM (Graviméricamente) para cada uno de los pH medidos.

Las soluciones madre de  $\alpha CD$  y proteína para los distintos pH se realizaron disolviendo el sólido mediante agitación con un aparato Vortex hasta que se observó una disolución monofásica.

Teniendo las soluciones madre de amortiguador,  $\alpha CD$  y proteína se procedió a mezclar (empleando pipetas microlítricas) las cantidades requeridas de estas para tener las concentraciones de  $\alpha CD$  (5, 10, 15, 25, 37.5, 50, 60, 70, 80 y 90 mM) a partir de una solución madre 100 mM y obtener una concentración final de proteína de 0.4 mg/mL a partir de una solución madre 4 mg/mL en un volumen total de 400  $\mu L$ .

Empleando las pipetas microlítricas se llenaron los pozos de 400 $\mu L$  que forman parte de una bandeja donde caben 48 muestras (ver figura 3.1).



**Figura 3.1** – Diagrama que muestra una bandeja de 96 pozos con capacidades máximas de 1000  $\mu L$ .

Debido al diseño del calorímetro (ver figura 1.5) por cada barrido se deben llenar dos pozos uno cuyo contenido será introducido en la celda de referencia y otro en la celda de la muestra. De este modo los primeros cuatro pozos (dos barridos) corresponden a líneas base (amortiguador con o sin  $\alpha CD$ ), el quinto pozo tendrá el mismo contenido que los pozos de líneas base mientras que el sexto pozo tendrá además la proteína (tercer barrido pozos 5° y 6°). Como ejemplo de un protocolo de llenado para un experimento de DSC se muestra el cuadro 3.1.

Idealmente para cada medición del  $C_p$  de la proteína se realizan un total de 3 barridos (1 muestra y 2 líneas

base), sin embargo realmente sucede que algunos barridos pueden perderse debido a un mal llenado de los pozos o impurezas en estos mismos que arruinen uno o más barridos. De este modo un programa como el mostrado en el cuadro 3.1 tuvo cuando menos 21 barridos (en ocasiones se tuvieron que realizar repeticiones de los barridos arruinados) para asegurar un adecuado procesamiento de las trazas calorimétricas.

**Programa de llenado de los pozos vol. de la muestra 400  $\mu\text{L}$ , concentración de proteína 0.4  $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ .**

$[\alpha\text{CD}]$ (mM)	vol. $\mu\text{L}$ de solución madre de $\alpha\text{CD}$	vol. $\mu\text{L}$ de solución madre de proteína	vol. $\mu\text{L}$ de amortiguador barrido de proteína	vol. $\mu\text{L}$ de amortiguador barrido de líneas base
0	0	40	360	400
90	360	40	0	40
80	320	40	40	80
60	240	40	120	160
37.5	150	40	210	250
15	60	40	300	340
5	20	40	340	380

**Cuadro 3.1** – Programa ejemplo del llenado de los pozos de una bandeja para DSC.

### 3.2.1. Procesamiento de los datos.

Para cada programa de concentraciones de  $\alpha\text{CD}$  se debieron fijar los siguientes parámetros experimentales:

- Intervalo de temperatura para la medición (20 a 90°C).
- Velocidad del incremento de temperatura (90°C/hr).
- Número de mediciones del  $C_p$  (1 cada 2 segundos).
- El tiempo que las celdas permanecerán a la temperatura inicial antes de empezar un barrido (20 minutos a 25 °C)

Una vez que se ha corrido un programa de concentraciones (Cuadro 3.1) se procesan los datos restando al barrido de proteína el inmediato anterior de línea base (ver figura 3.2a), lo cual arroja como resultado un

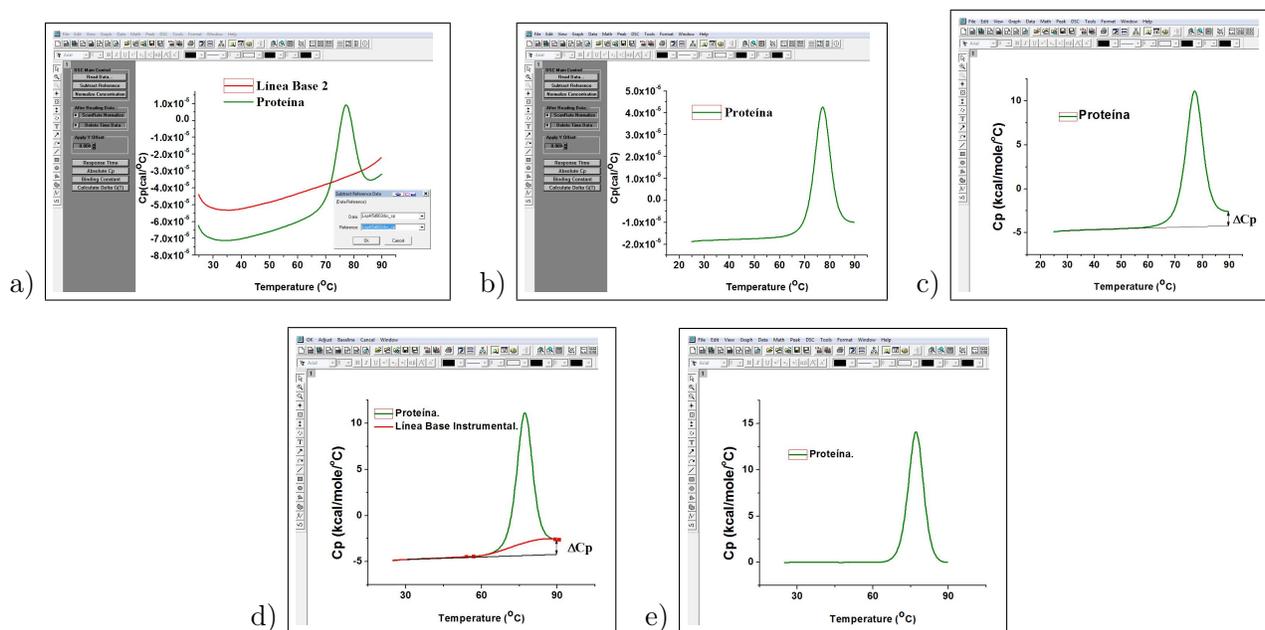


Figura 3.2 – Metodología del Tratamiento de los experimentos en DSC.

termograma con un  $C_p$  dependiente de la temperatura corregido por los efectos del amortiguador (figura 3.2b). Después, la traza es normalizada usando la concentración (figura 3.2c) de proteína en la celda ( $\frac{mmol}{dm^3}$ ), y por último se resta (figura 3.2d) una línea base instrumental que considera el efecto del  $\Delta C_p$ , de éste modo se desplaza la base del termograma a cero. El procedimiento anterior se aplicó para muestras de proteína en amortiguador, en amortiguador más  $\alpha CD$  y recalentamientos. A partir de termogramas como los mostrados en las figuras 3.2 (a, b, c, d y e) se obtuvieron, empleando la macroinstrucción para DSC del programa Origin 7, los siguientes valores:

I)  $T_m$ .

II) Área del pico de la transición.

III) Ancho a la mitad del área.

Con los Datos I), II) y III) obtenidos para los programas de concentraciones de  $\alpha CD$  (90, 80, 70, 60, 50, 37.5, 25, 15, 10, 5 y 0 mM) a los valores de pH 2, 3, 5, se calcularon:

- Abatimiento del  $T_m$  debido al efecto de  $\alpha CD$

$$\Delta T_m = T_m(\text{en presencia de } \alpha CD) - T_m(\text{en ausencia de } \alpha CD) = T_{m_{\alpha CD}} - T_{m_0}$$

- Se ensayó también la reversibilidad del proceso de desplegamiento para los distintos pH en ausencia

de  $\alpha CD$  y en presencia de 90 mM de  $\alpha CD$ .

**Evaluación de las incertidumbres.**

Las incertidumbres asociadas a los cálculos del  $\Delta T_m$  fueron realizadas del siguiente modo: usando la velocidad de barrido igual a  $90^\circ C/hr$  ( $1.5^\circ C/min$ ), la frecuencia de captura cada 2 segundos ( $0.03333$  min) y empleando la ecuación:

$$U_{T_m} = \frac{1}{(\text{Frecuencia de captura})} * (\text{velocidad de barrido})$$

Se calcula una incertidumbre de  $0.05^\circ C$  en cada medición de  $T_m$  ( $U_{T_m} = 0.05^\circ C$ ). Se empleó la fórmula para la propagación de la incertidumbre en una función cuyas variables están sujetas a incertidumbres experimentales:

$$\begin{aligned} Y_i &= f(X_i) \\ U_{Y_i}^2 &= \sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial f(x)}{\partial x_i} \right)_{j \neq i}^2 \cdot U_{x_i}^2 \\ \Delta T_m &= T_{m_{\alpha CD}} - T_{m_0} \\ U_{\Delta T_m}^2 &= \left( \frac{\partial \Delta T_m}{\partial T_{m_0}} \right)^2 \cdot U_{T_{m_0}}^2 + \left( \frac{\partial \Delta T_m}{\partial T_{m_{\alpha CD}}} \right)^2 \cdot U_{T_{m_{\alpha CD}}}^2 \\ U_{\Delta T_m}^2 &= (1)^2 \cdot (0.05^\circ C)^2 + (-1)^2 \cdot (0.05^\circ C)^2 \\ U_{\Delta T_m} &= 0.07^\circ C \end{aligned} \tag{3.1}$$

Para el resultado anterior se expandió la cobertura para un 90 % ( $k = 2$ ), de modo que la incertidumbre experimental en  $\Delta T_m$  es:

$$k \cdot U_{\Delta T_m} = 0.14^\circ C \tag{3.2}$$

Las incertidumbres asociadas a los cálculos de reversibilidad provienen de las desviaciones estándar de cuando menos 2 repeticiones de cada recalentamiento.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} \tag{3.3}$$

$$S = \sqrt{\left( \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1} \right)} \tag{3.4}$$

## Capítulo 4

# Resultados y Discusión

### 4.1. Experimentos DSC con Lisozima.

A continuación se enlistan los resultados de los experimentos de DSC realizados para distintos pH (2, 3 y 5) y variación de la concentración de  $\alpha CD$  (valores entre 0 y 90 mM). Con el propósito de verificar el comportamiento de la reversibilidad de la desnaturalización ante el aumento de pH, se realizaron recalentamientos a 0 mM de  $\alpha CD$  para los valores de pH 2, 3, 5 y 6. Se incluyó pH 6 para corroborar resultados experimentales [11] acerca de la probable caída de porcentaje de reversibilidad debido al pH. Para verificar la posible participación de  $\alpha CD$  como coadyuvante del replegamiento, también se verificó la reversibilidad en presencia de 90 mM de  $\alpha CD$  para los 4 valores de pH mencionados.

---

$T_m$  medido para los valores de pH, a 0 y 90 mM de  $\alpha CD$ .

---

pH	$[\alpha CD]$ ( mM)	$T_m$ (°C)	$S_{T_m}$ (°C)	pH	$[\alpha CD]$ ( mM)	$T_m$ (°C)	$S_{T_m}$ (°C)
2	0	61.70	0.93	5	0	77.09	0.07
	90	59.89	0.77		90	74.11	0.02
3	0	76.03	0.49	6	0	71.62	0.51
	90	73.35	0.56		90	71.05	0.55

---

Porcentajes de Reversibilidad para los valores de pH, a 0 y 90 mM de  $\alpha CD$ .

pH	$[\alpha CD]$ ( mM)	Área recobrada (%)	$S_{Rev}$ (%)	pH	$[\alpha CD]$ ( mM)	Área recobrada (%)	$S_{Rev}$ (%)
2	0	88	6	5	0	89	4
	90	87	6		90	92	4
3	0	86	5	6	0	19	4
	90	87	5		90	15	4

**Programa a pH2.**

$[\alpha CD]$ (mM)	$T_m$ (°C)	Área (kcal/mol)	$T_{\frac{1}{2}}$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)
0	64.02	94060	7.5	0
10	63.34	95388	7.7	-0.67
25	63.07	102001	7.9	-0.95
50	61.75	88644	8.0	-2.26
70	61.02	89685	8.2	-2.99
90	60.34	86233	8.4	-3.68

**Cuadro 4.1** – Primer programa de concentraciones a pH 2.

**Programa a pH 2.**

$[\alpha CD]$ (mM)	$T_m$ (°C)	Área (kcal/mol)	$T_{\frac{1}{2}}$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)
0	61.15	99569	7.9	0
5	60.83	120490	8.5	-0.32
15	60.31	97118	7.9	-0.84
37.5	59.19	95642	8.2	-1.96
60	58.28	92531	8.4	-2.88
80	57.41	90620	8.5	-3.74
90	57.11	76481	8.3	-4.04

**Cuadro 4.2** – Segundo programa de concentraciones a pH 2.

**Programa a pH 3.**

$[\alpha CD]$ (mM)	$T_m$ (°C)	Área (kcal/mol)	$T_{\frac{1}{2}}$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)
0	75.49	127322	7.1	0
10	75.14	126621	7.1	-0.35
25	74.82	124843	7.2	-0.67
70	73.43	103985	7.1	-2.06
90	72.95	104009	7.2	-2.54

**Cuadro 4.3** – Primer programa de concentraciones a pH 3.**Programa a pH 3.**

$[\alpha CD]$ (mM)	$T_m$ (°C)	Área (kcal/mol)	$T_{\frac{1}{2}}$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)
0	76.43	103836	6.6	0
5	76.12	127837	7.1	-0.32
15	75.78	126010	7.1	-0.66
37.5	75.04	129342	7.2	-1.40
50	74.92	115458	7.2	-1.51
60	74.63	124387	7.4	-1.80
80	74.14	120016	7.3	-2.30
90	73.74	80522	6.5	-2.69

**Cuadro 4.4** – Segundo programa de concentraciones a pH 3.

**Programa a pH 5.**

$[\alpha CD]$ (mM)	$T_m$ (°C)	Área (kcal/mol)	$T_{\frac{1}{2}}$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)
0	77.13	104061	6.8	0
5	77.08	131663	7.0	-0.06
25	76.32	125959	7.2	-0.81
50	75.50	121878	7.4	-1.63
70	74.94	128269	7.6	-2.19
90	74.09	119062	7.4	-2.95

**Cuadro 4.5** – Primer programa de concentraciones a pH 5.**Programa a pH 5.**

$[\alpha CD]$ (mM)	$T_m$ (°C)	Área (kcal/mol)	$T_{\frac{1}{2}}$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)
0	77.04	124857	7.0	0
10	76.79	125628	7.2	-0.24
15	76.71	121079	7.0	-0.33
37.5	75.87	113785	7.2	-1.16
60	75.23	122609	7.4	-1.81
80	74.57	118584	7.4	-2.46
90	74.12	104607	7.0	-2.91

**Cuadro 4.6** – Segundo programa de concentraciones a pH 5.

Empleando los resultados mostrados en las tablas anteriores se construyeron los siguientes gráficos:

- Gráfico de  $\Delta T_m$  contra incremento de la concentración de  $\alpha CD$  (Figura 4.1).
- Gráfico de barras representando el porcentaje de reversibilidad para los distintos valores de pH (2, 3, 5 y 6), en ausencia de  $\alpha CD$  y en presencia de  $\alpha CD$  (90 mM) (Figura 4.2).

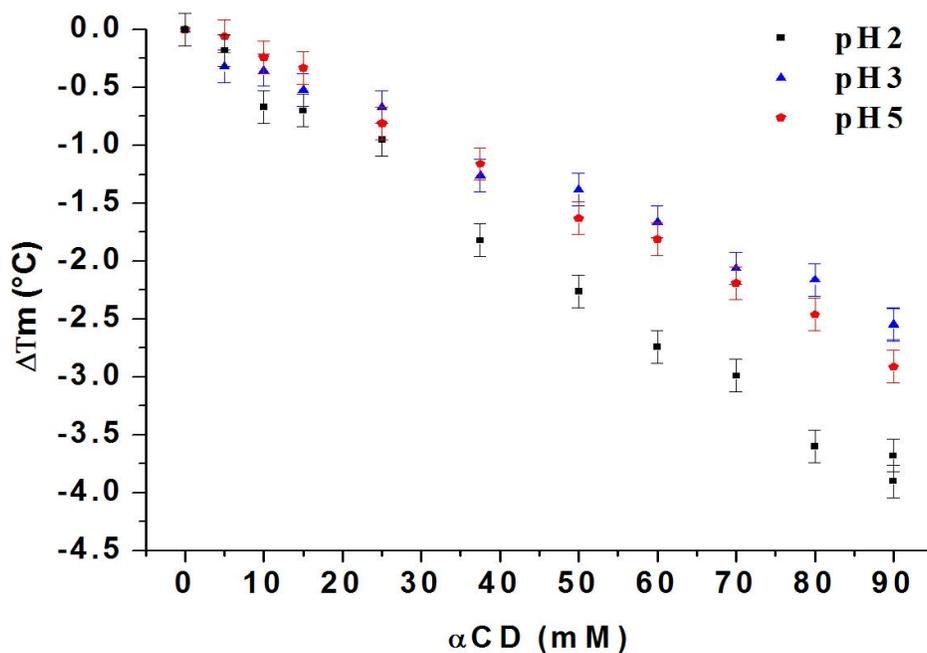


Figura 4.1 – Gráfico de  $\Delta T_m$  contra concentración de  $\alpha$ CD, donde se muestran los resultados para los valores de pH: 2, 3 y 5. Las barras corresponden a la incertidumbre instrumental.

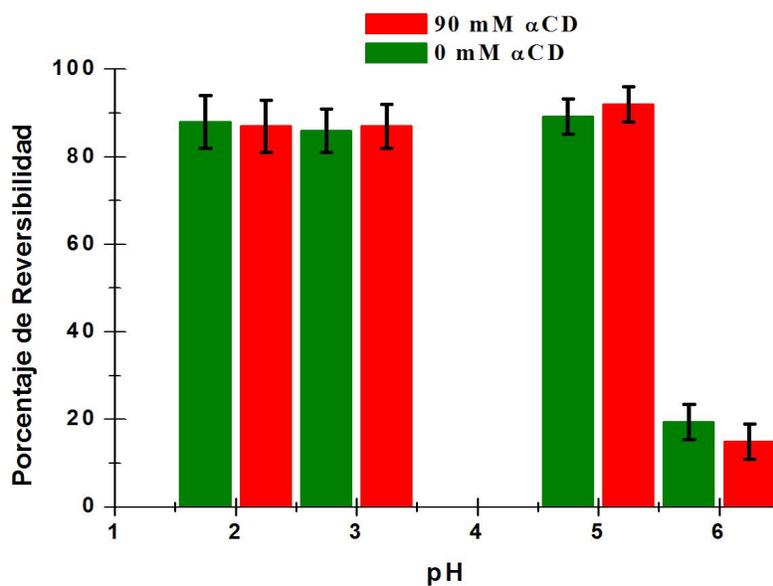
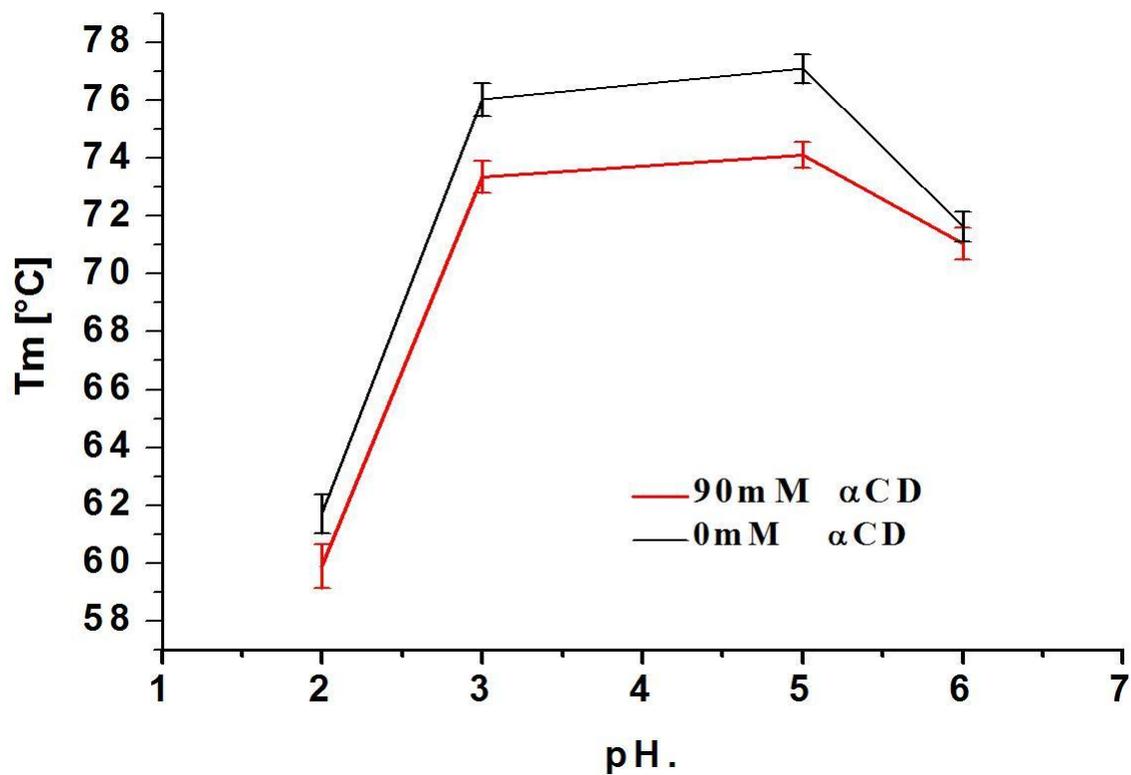


Figura 4.2 – Gráfico de barras que muestra los porcentajes de reversibilidad para los valores de pH: 2, 3, 5 y 6. Las barras corresponden a las desviación estándar del porcentaje.



**Figura 4.3** – Gráfico que muestra la variación de la  $T_m$  con el pH. Las barras corresponden a las desviación estándar de la  $T_m$ .

## 4.2. Análisis de $\Delta T_m$ (Modelo de Cooper).

El análisis de A. Cooper para la desnaturalización de una proteína en presencia de un agente químico como la  $\alpha CD$  asume que la  $\alpha CD$  se une a los amino ácidos (formando complejos de inclusión) de la proteína cuando esta está en el estado desnaturalizado. En este modelo  $\Delta T_m$  está dada por:

$$\Delta T_m = \frac{-nRT_m T_{\alpha CD} \ln(1 + K_b[\alpha CD])}{\Delta H_u} \quad (4.1)$$

Suponiendo que la unión es débil ( $K_b$  pequeño) y que la concentración de  $\alpha CD$  es baja la ecuación puede simplificarse a:

$$\Delta T_m \simeq \frac{-nK_b RT_m^2 [\alpha CD]}{\Delta H_u} \quad (4.2)$$

Se observa que  $\Delta T_m$  varía linealmente con  $[\alpha CD]$ , es decir  $\Delta T_m = A + B[\alpha CD]$ .

Donde  $A \simeq 0$  El ajuste de los datos experimentales de  $\Delta T_m$  a una recta proporciona la pendiente  $B$  a partir de la cual puede estimarse el producto  $nK_b$  como:

$$nK_b = \frac{-B \cdot \Delta H_u}{RT_m^2} \quad (4.3)$$

Los resultados de los ajustes lineales y valores de  $nK_b$  se presentan a continuación:

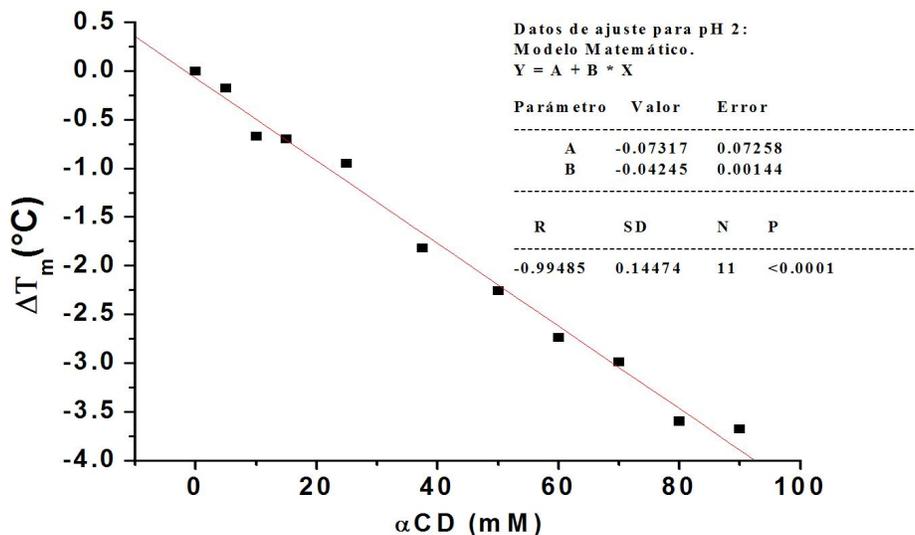


Figura 4.4 – Ajuste lineal de los datos a pH 2.

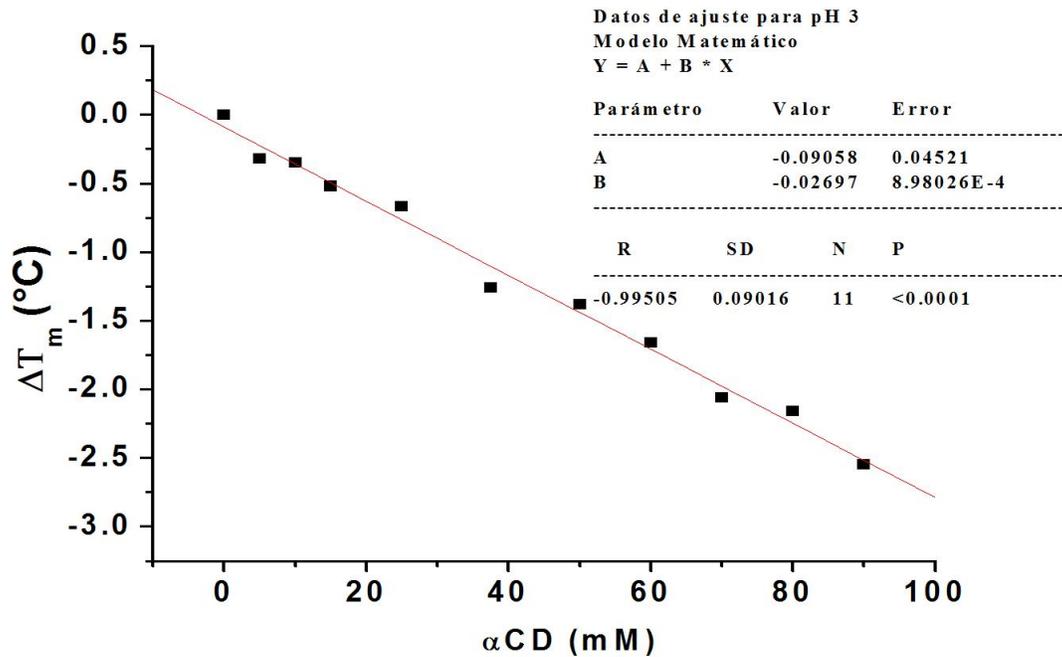


Figura 4.5 – Ajuste lineal de los datos a pH 3.

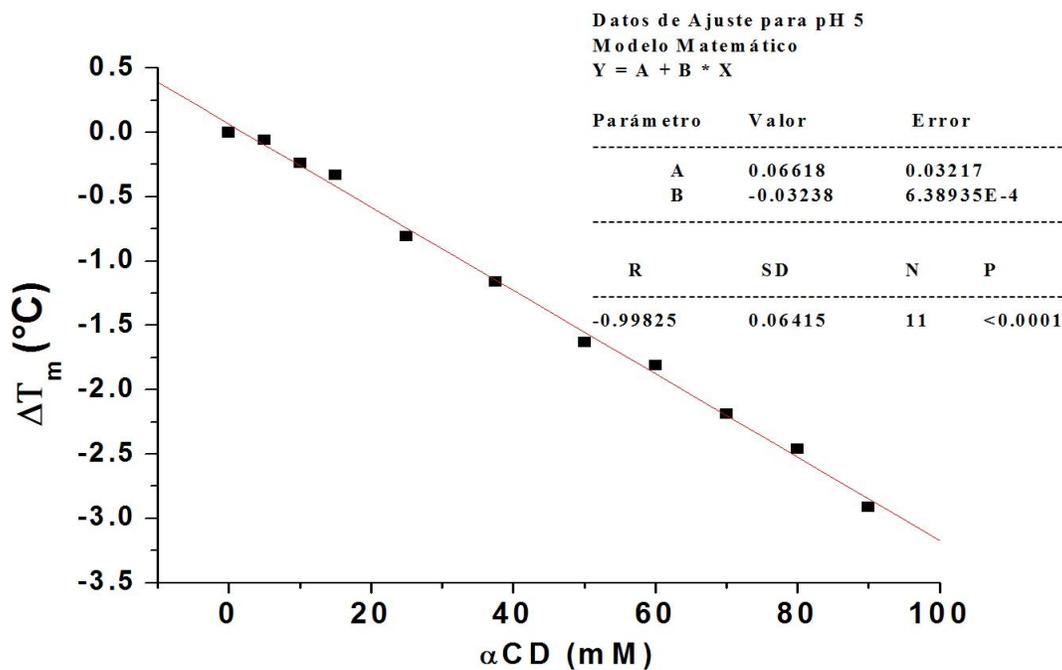


Figura 4.6 – Ajuste lineal de los datos a pH 5.

Resultados para $nK_b$ .			
pH	2	3	5
$B$ (K/(mol/dm <sup>3</sup> ))	-42.45	-26.97	-32.38
$T_m$ (K)	334.15	349.15	350.15
$\Delta H_u$ (cal/mol)	96815	115579	114459
$nK_b$ (dm <sup>3</sup> /mol)	18.5	12.9	15.2

**Cuadro 4.7** – Resumen de los datos para  $nK_b$  obtenidos mediante los datos de ajuste.

En la interpretación de datos de  $\Delta T_m$ , Cooper consideró que los amino ácidos que deben formar complejos de inclusión con la  $\alpha CD$  son los aromáticos. Si estos amino ácidos fuesen los únicos involucrados, el producto  $nK_b$  debería ser el mismo a todo pH. El cuadro (4.7) indica que este no es el caso y por lo tanto deben considerarse otros amino ácidos con grupos ácidos o básicos que, a diferentes valores de pH, puedan o no formar complejos de inclusión con la  $\alpha CD$ . A continuación se explora esta consideración que se combina con el grado de exposición al disolvente de los amino ácidos. Al hacerlo se estará considerando (cualitativamente) que la  $\alpha CD$  también puede unirse a algunos amino ácidos en el estado nativo.

### 4.3. Grado de exposición al solvente y $\Phi_{pH}$ .

Se realizaron cálculos del grado de exposición al solvente de los amino ácidos en Lisozima (PDB 193L) empleando para ello el programa ASA-ENG. También se realizaron cálculos de la fracción disociada de los residuos capaces de participar en equilibrios ácido base para lo cual se usaron valores de  $pK_a$  para dichos amino ácidos en la estructura nativa (programa PropKa 3.5 [12]) así como también valores de  $pK_a$  para los amino ácidos en forma libre.

Se define un criterio de exposición  $R$  el cual es igual al cociente de la superficie accesible al disolvente calculado para dicho amino ácido en Lisozima, entre el valor de la superficie accesible al disolvente calculado para dicho amino ácido como tripéptido con Glicina, es decir:

$$R = \frac{ASA_{Liso}}{ASA_{Tripep}}$$

Para el caso de los equilibrios ácido base se considera:

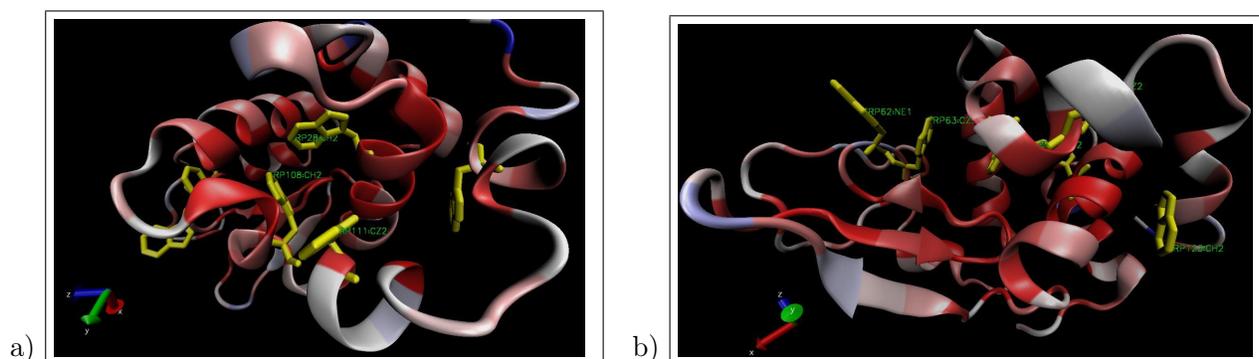
$$K_a = \frac{[H^+][B^n]}{[HB^{1-n}]} \quad (4.4)$$

Donde  $B$  representa a la forma básica del amino ácido y  $n$  determina la carga de la forma básica del amino ácido. Se presentan los resultados para los amino ácidos que se consideran susceptibles de formar complejos con  $\alpha CD$ . Amino ácidos aromáticos: triptofano, tirosina y fenilalanina. Amino ácidos que intervienen en equilibrios ácido base: arginina, aspartato, glutamato y lisina. Para todos los diagramas de hélices  $\alpha$  y hojas  $\beta$  donde se representa a Lisozima, el código de colores es: color rojo amino ácidos con baja o nula exposición al solvente, valor de  $R$  entre 0 y 0.3. En color blanco mediana exposición, valor de  $R$  entre 0.31 y 0.48. En color azul amino ácidos con el mayor grado de exposición, valor de  $R$  entre 0.49 y 1.

En el cuadro 4.8 se presentan los resultados del grado de exposición para los 6 amino ácidos Triptofano en la estructura nativa, en las figuras 4.7a y 4.7b se muestran dos perspectivas de la imagen de la proteína con las representaciones de dichos residuos usando el programa *Visual Molecular Dynamics*:

Triptofano (TRP).		
Número de residuo	ASA como tripéptido [ $\text{\AA}^2$ ]	R
62	256.3	0.52
123	262.2	0.23
63	257.5	0.11
111	247.9	0.05
108	247	0.04
28	253.6	0.00

**Cuadro 4.8** – Resultados del grado de exposición de amino ácidos TRP.

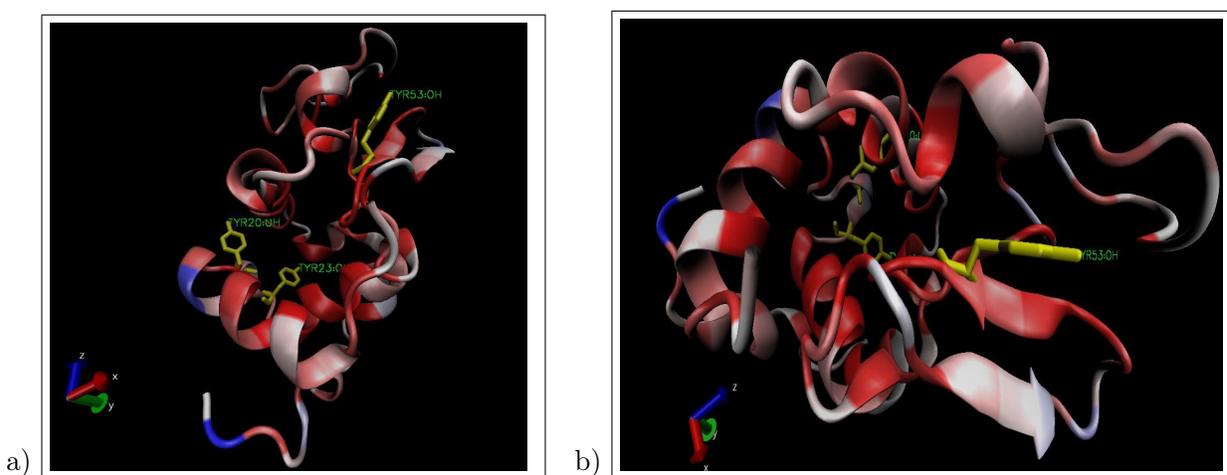


**Figura 4.7** – Lisozima. Resaltados en amarillo los residuos de amino ácidos TRP mencionados en el cuadro 4.8.

En el cuadro 4.9 se presentan los resultados del grado de exposición para los 3 amino ácidos Tirosina en la estructura nativa, en las figuras 4.8a y 4.8b se muestran dos perspectivas de la imagen de la proteína con las representaciones de dichos residuos usando el programa *Visual Molecular Dynamics*:

Tirosina (TYR).		
Número de residuo	ASA como tripéptido [ $\text{\AA}^2$ ]	R
20	231.2	0.24
23	221.2	0.18
53	217.7	0.10

**Cuadro 4.9** – Resultados del grado de exposición de amino ácidos TYR.

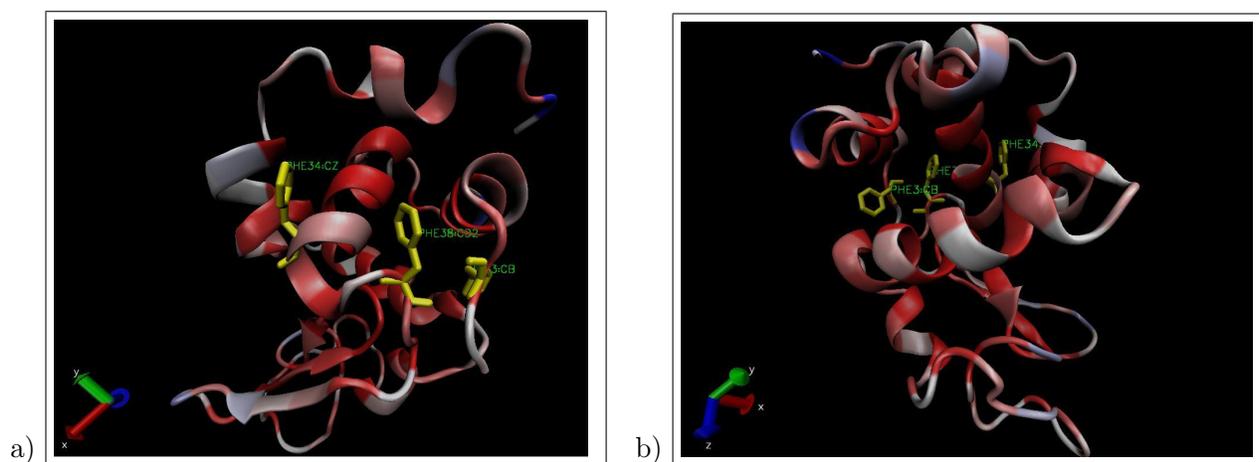


**Figura 4.8** – Lisozima. Resaltados en amarillo los residuos de amino ácidos TYR mencionados en el cuadro 4.9.

En el cuadro 4.10 se presentan los resultados del grado de exposición para los 3 amino ácidos Fenilalanina en la estructura nativa, en las figuras 4.9a y 4.9b se muestran dos perspectivas de la imagen de la proteína con las representaciones de dichos residuos usando el programa *Visual Molecular Dynamics*:

Fenil Alanina (PHE).		
Número de residuo	ASA como tripéptido [ $\text{\AA}^2$ ]	R
34	222.6	0.27
38	219.8	0.08
3	211.3	0.06

**Cuadro 4.10** – Resultados del grado de exposición de amino ácidos PHE.

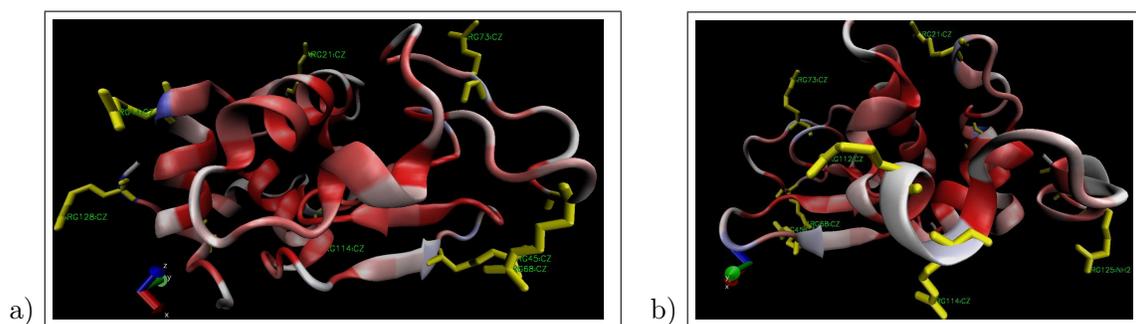


**Figura 4.9** – Lisozima. Resaltados en amarillo los residuos de amino ácidos PHE mencionados en el cuadro 4.10.

En el cuadro 4.11 se presentan los resultados del grado de exposición para los amino ácidos Arginina en la estructura nativa, en las figuras 4.10a y 4.10b se muestran dos perspectivas de la imagen de la proteína con las representaciones de dichos residuos usando el programa *Visual Molecular Dynamics*:

Arginina (ARG).			
Número de amino ácido (PDB 193L)	ASA como tripéptido [Å <sup>2</sup> ]	R	$pK_a$
5	250.6	0.25	11.65
14	251.6	0.76	12.41
21	254.8	0.56	13.02
45	241	0.57	11.95
61	249.7	0.20	12.8
68	241.4	0.49	12.61
73	252.7	0.57	12.31
112	244.7	0.41	12.19
114	243.1	0.56	12.14
125	228.2	0.59	12.28
128	245.1	0.94	12.48

**Cuadro 4.11** – Resultados del grado de exposición y pKa de amino ácidos ARG.

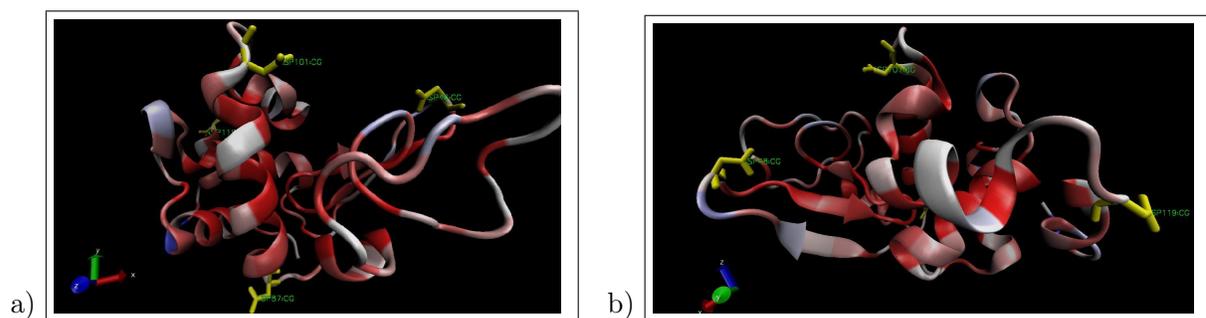


**Figura 4.10** – Lisozima. Resaltados en amarillo los residuos de amino ácidos ARG mencionados en el cuadro 4.11.

En el cuadro 4.12 se presentan los resultados del grado de exposición para los amino ácidos Aspartato en la estructura nativa, en las figuras 4.11a y 4.11b se muestran dos perspectivas de la imagen de la proteína con las representaciones de dichos residuos usando el programa *Visual Molecular Dynamics*:

Aspartato (ASP).			
Número de residuo	ASA como tripéptido [ $\text{\AA}^2$ ]	R	$pK_a$
18	157.1	0.31	3.71
48	150.1	0.52	1.81
52	158.6	0.15	5.35
66	152.5	0.25	1.6
87	145.7	0.59	2.18
101	158.8	0.55	4.13
119	155.8	0.65	4.06

**Cuadro 4.12** – Resultados del grado de exposición y  $pK_a$  de amino ácidos ASP.

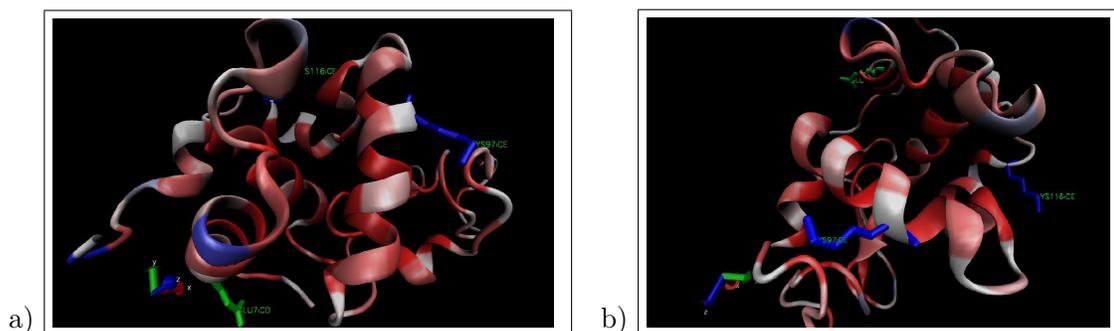


**Figura 4.11** – Lisozima. Resaltados en amarillo los residuos de amino ácidos ASP mencionados en el cuadro 4.12.

En el cuadro 4.13 se presentan los resultados del grado de exposición para los amino ácidos Glutamato y Lisina en la estructura nativa, en las figuras 4.12a y 4.12b se muestran dos perspectivas de la imagen de la proteína con las representaciones de dichos residuos usando el programa *Visual Molecular Dynamics*:

Glutamato (GLU) y Lisina (LYS).			
Número de residuo	ASA como tripéptido [ $\text{\AA}^2$ ]	R	$pK_a$
LYS <sup>97</sup>	214.9	0.48	10.19
LYS <sup>116</sup>	217.8	0.48	10.11
GLU <sup>7</sup>	182.8	0.41	2.97

**Cuadro 4.13** – Resultados del grado de exposición y pKa de amino ácidos GLU y LYS.

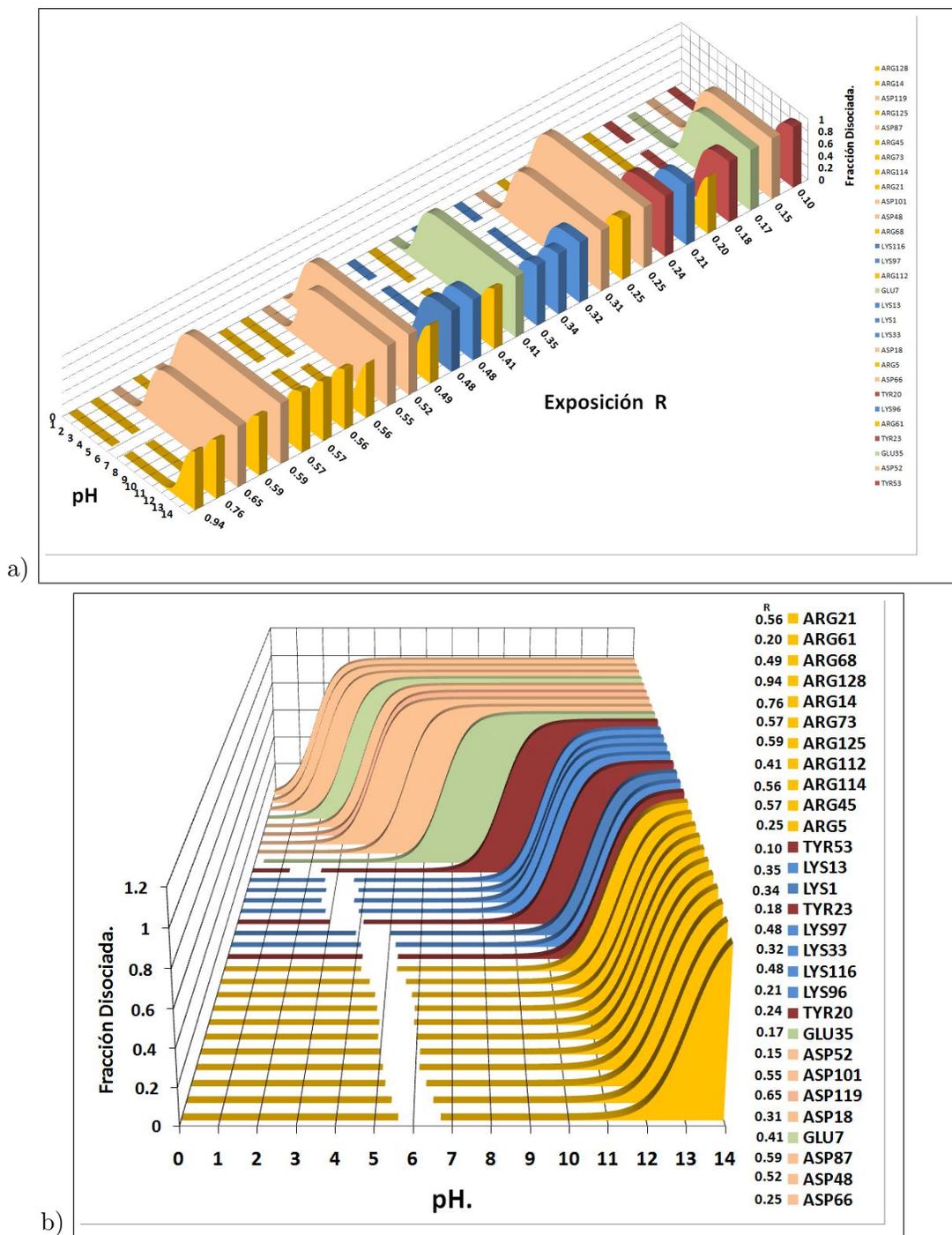


**Figura 4.12** – Lisozima. Resaltados en verde el residuos del amino ácido GLU<sup>7</sup>, azul los residuos de amino ácidos LYS<sup>97</sup> LYS<sup>116</sup> mencionados en el cuadro 4.13.

Se calculó la fracción disociada para todos estos amino ácidos empleando el pKa dentro de la estructura nativa como función del pH usando la ecuación:

$$\Phi_{pH} = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_a}}$$

A continuación se muestra su variación con el grado de exposición R a diferentes valores de pH (figuras 4.13a y 4.13b).



**Figura 4.13** – Gráficos de Fracción disociada de los amino ácidos participantes de equilibrios ácido base. 4.13a Ordenados según decrece R, 4.13b Ordenados según crece pKa.

Finalmente, en el siguiente cuadro se muestra para cada amino ácido analizado la carga probable que tiene en el intervalo de pH de 2 a 5.

**Variación de la carga en el intervalo de pH 2 a 5 de los amino ácidos objetivo.**

Tipo de amino ácido	Exposición	Carga probable	Tipo de amino ácido	Exposición	Carga probable
Hidrofóbicos	R	(+,n,-)	Ácido	R	(+,n,-)
TRP <sup>62</sup>	0.52	n	GLU <sup>7</sup>	0.41	n → -
TRP <sup>123</sup>	0.23	n	Ácido	R	(+,n,-)
TYR <sup>20</sup>	0.24	n	ASP <sup>119</sup>	0.65	n
PHE <sup>34</sup>	0.27	n	ASP <sup>87</sup>	0.59	n → -
Básico	R	(+,n,-)	ASP <sup>101</sup>	0.55	n
ARG <sup>128</sup>	0.94	+	ASP <sup>48</sup>	0.52	-
ARG <sup>14</sup>	0.76	+	Básico	R	(+,n,-)
ARG <sup>125</sup>	0.59	+	LYS <sup>97</sup>	0.48	+
ARG <sup>73</sup>	0.57	+	LYS <sup>116</sup>	0.48	+
ARG <sup>45</sup>	0.57	+			
ARG <sup>114</sup>	0.56	+			
ARG <sup>21</sup>	0.56	+			
ARG <sup>68</sup>	0.49	+			

**Cuadro 4.14** – Amino ácidos objetivo de complejación con  $\alpha CD$  debido a su grado de exposición.

#### 4.4. Interpretación cualitativa de los resultados.

Se ha informado en la literatura que las constantes de formación de complejos [9] entre  $\alpha CD$  y amino ácidos varía dependiendo de la carga formal del amino ácido. En particular, las constantes de afinidad entre  $\alpha CD$  y amino ácidos siguen la secuencia:  $K_b > K_b^- > K_b^+$ , donde los superíndices en las constantes de formación de complejo indican la carga que tiene el amino ácido huésped de  $\alpha CD$ . Como se discutió en la sección 4.2 la variación de  $\Delta T_m$  con pH no puede ser explicada considerando sólo a los amino ácidos hidrofóbicos. En este contexto se destacan los datos presentados en la tabla 4.14, donde se puede observar que los amino ácidos ASP (101, 119, 87 y 48) son relevantes debido a que son los que cambian de signo de un estado neutral a uno con carga negativa y poseen una constante de unión a ciclodextrina significativamente mayor que otros amino ácidos cuadro 1.2, y tienen un grado de exposición alto.

Considerando los valores de  $nK_b$  del cuadro 4.7, puede suponerse que el número de sitios de unión de  $\alpha CD$  ( $n$ ), varía como función del pH. A pH2 la fracción disociada de los amino ácidos ASP<sup>101</sup>, ASP<sup>119</sup>, ASP<sup>87</sup> y ASP<sup>48</sup>, es baja lo cual hace pensar que probablemente se encuentren en su forma protonada neutral en solución, lo cual favorecería su interacción con  $\alpha CD$ . Estos mismos amino ácidos a pH 3 y 5 cambian su fracción disociada, de tal modo que es probable que todos ellos a pH 5 tengan carga formal negativa, lo cual hace pensar que la constante de unión entre  $\alpha CD$  y estos amino ácidos con carga sea menor que a pH2. Este resultado podría explicar por que se observa una marcada diferencia entre el  $\Delta T_m$  a pH2 y el  $\Delta T_m$  a pH5 y pH3. Es importante mencionar que si bien las constantes de unión para los amino ácidos aromáticos (cuadro 1.2), también son significativas y muy probablemente relevantes, su grado de exposición al disolvente no es tan alto como para el caso de los amino ácidos ASP. En resumen, es probable que los valores de  $\Delta T_m$  para la Lisozima se deban a la complejación de la  $\alpha CD$  con los ASP (carga formal negativa). Este efecto es más marcado a pH2, donde la desestabilización térmica de la proteína es mayor.

## Capítulo 5

### Conclusiones

Se puede concluir que la estabilidad de Lisozima en términos de su  $T_m$  varía con el pH (ver figura 4.3) debido a las desprotonaciones de sus residuos ácidos, y que éste papel de los residuos también influye en su capacidad para ser complejados por  $\alpha CD$ . Comparada con otros agentes químicos muy utilizados (como la urea y clorhidrato de guanidina [13]), con los que se requiere de una concentración mucho mayor (2 a 4 M) para obtener  $\Delta T_m$  de las magnitudes como los resultados aquí mostrados, la  $\alpha CD$  es un agente desestabilizante "sitio específico". Considerando los resultados obtenidos por Cooper y los presentados en éste trabajo puede decirse que si bien Cooper analizó un modelo que primordialmente se enfocaba en la unión de  $\alpha CD$  a los amino ácidos aromáticos en el estado desplegado, los valores de  $\Delta T_m$  a distintos valores de pH sugieren que este fenómeno puede no solamente deberse a la participación de amino ácidos aromáticos sino que también deben considerarse los amino ácidos con grupos funcionales ácidos o básicos para ambos estados de la proteína (nativo y desplegado).

## Capítulo 6

# Perspectivas de Trabajo Futuro.

Con el propósito de mejorar nuestra descripción de los  $\Delta T_m$  obtenidos para Lisozima y  $\alpha CD$  se requiere modelar la unión de  $\alpha CD$  al estado nativo y no sólo pensar en la unión al estado desplegado. De éste modo podrían introducirse en el modelo variables de interés como el pKa de los amino ácidos, el grado de exposición a los amino ácidos y la variación de los sitios de unión. Se propone también realizar mediciones de DSC usando los programas de concentración de  $\alpha CD$  para valores de pH superiores a 5 e inclusive encima del punto isoelectrico (pH 11) de la Lisozima.

# Bibliografía

- [1] Cooper Alan, *Effect of Cyclodextrins on the Thermal Stability of Globular Proteins* , Journal of the American Chemical Society, 1992, Vol.114, pp. 9208-9209.
- [2] Nelson D. L., Cox M. M., 2006, *Lehninger Principios de Bioquímica* , Barcelona: Omega, pp.78-79, 222-224, 9208-9209.
- [3] Davies, R.C., et al., *The dependence of lysozyme activity on pH and ionic strength.* , Biochim. Biophys. Acta, 178, 1969, pp. 294-305.
- [4] Shrake A., Rupley J.A., *Environment and Exposure to Solvent of Protein Atoms. Lysozyme and Insulin* , Journal of Molecular Biology, 1973, Vol. 79, 351-371.
- [5] Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., *VMD - Visual Molecular Dynamics* , J. Molec. Graphics, 1996, vol. 14, pp. 33-38.
- [6] Petsko G. A., Ringe D., *Protein Structure and Function*, New Science Press, Ltd., Sunderland, MA., 2004, pp. 4,5.
- [7] Bunzo M., Edward J. H., Mamoru S., Yukiteru K., Masaaki H., Yuhei M., James C. S., *The 2.0 Å Resolution Structure of Soybean  $\beta$  amylase Complexed with  $\alpha$ -cyclodextrin* , Biochemistry, 1993, Vol. 32, 6836-6845.
- [8] Fitzpatrick D., Ulrich H. J., *Macrocyclic Chemistry: New Research and Developments* , Nova Science Publishers, Inc., New York, 2010, pp. 233-259.
- [9] Hans-Jorg Schneider, Hacket F., Rudiger V., *NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes* , Chem. Rev., 1998, Vol. 98, No. 5, 1898,1899.
- [10] Sanchez-Ruiz Jose Manuel, *Theoretical Analysis of Lumry-Eyring Models in Differential Scanning Calorimetry* , Biophysical Journal, 1992, Vol. 61, 921-935.

- 
- [11] Desai A., Lee C., Sharma L., Sharma A., *Lysozyme Refolding with Cyclodextrins: Structure-Activity Relationship* , Biochimie, 2006, Vol. 88, 1435-1445.
- [12] Hui Li, Andrew D. Robertson, and Jan H. Jensen *Very Fast Empirical Prediction and Interpretation of Protein pKa Values* , Proteins, 2005, Vol. 61, 704-721.
- [13] Costas M., Rodríguez-Larrea D., De Maria L., Bouchert Torvben V., Gomez-Puyou A., Sánchez-Ruiz J.M., *Between-Species Variation in the Kinetic Stability of TIM Proteins Linked to Solvation-Barrier Free Energies* , Journal of Molecular Biology, 2009, Vol. 385, 924-937.