



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO PRELIMINAR DE PROTEINAS DEL GUAYULE



**DEPTO. DE PASANTES Y
EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

TESIS PROFESIONAL

MANUEL OCHOA OCHOA

QUIMICO

1981



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

	Pag.
Introducción	2
Material y Metodos	11
Parte Experimental y Resultados	23
Conclusiones	65
Bibliografía	68
APENDICES	
A) Ultracentrifugación	71
B) Liofilización	78
C) Cromatografía de Permeación	87
D) Técnicas Electroforéticas	
1) Electroforesis y Electroforesis-SDS	98
2) Electroenfoque	115
E) Técnicas Radioactivas	121
Bibliografía	129

INTRODUCCION

HISTORIA

Los aztecas, mixtecas, olmecas y mayas empleaban para el juego de pelota, bolas de hule natural, obtenido muy probablemente de plantas tropicales nativas de México.

Bigelow en 1852 colecta guayule en Zacatecas y es clasificado por Asa Gray (Parthenium argentatum). La sociedad Mexicana de Historia Natural lo estudia en 1876.

En 1902 se establece la primera de varias -- plantas (La Flor) procesadoras de hule de guayule iniciándose así su explotación (1). Esta se abandona alrededor de 1914. Durante la segunda guerra mundial se renueva el interés en el guayule al empezar, en 1942, en los Estados Unidos el Proyecto de Emergencia del Hule, reiniciándose la explotación del guayule mexicano en forma intensiva y extensiva, estableciéndose en Salinas, California (E. U.) plantaciones de guayule (aprox. 13,000 ha) con la idea de suplir -- parcialmente el hule de hevea que antes de la conflagración suministraba el Sureste Asiático.

En los años setentas México inicia proyectos de investigación y desarrollo del guayule como fuente alterna de hule natural que culmina con los logros del mejoramiento del hule mediante la eliminación de resinas, obteniéndose del guayule un hule de calidad

comparable al de hevea y claramente se establece en Saltillo la factibilidad de este recurso para convertirse en un candidato primordial - que llegue a ser una fuente renovable de hule natural.

LA INDUSTRIA DEL HULE.

La industria del acero y textil caracterizan la Revolución Industrial del Siglo XVIII, surgiendo a fines del Siglo XIX otras industrias como la química, eléctrica y la de automóviles, que antes de 1914 tenía poca importancia. Dentro de este contexto se desarrolla la producción y consumo del hule, (2), cuya demanda continuará de aquí en adelante íntimamente ligada al desarrollo de la industria automotriz.

El hule, durante este período, provenía fundamentalmente de la explotación de hevea con una participación temporal y pequeña de guayule y quizá Castilloa elastica. Se desarrollan por esta época las grandes plantaciones hulfíferas de hevea en el Sureste de Asia; y paralelamente continúa la búsqueda de un sustituto principalmente en los E.U. y Alemania.

El 85 % del hule natural del mundo es producido en el sureste Asiático, y son Malasia e Indonesia los países que encabezan la producción de esta zona con 50 y 20 % respectivamente.

EL GUAYULE

Existen cerca de 2 000 especies de plantas que contienen hule siendo muy pocas las que lo producen en cantidades significativas que ameriten su explotación. Dos de ellas, el arbol de hule (Hevea brasiliensis Mull) cultivada principalmente en el suroeste de Asia y el arbusto de guayule (Parthenium argentatum Gray), el cual crece en forma silvestre en algunas regiones semiáridas al norte de México, desde el siglo pasado han sido las fuentes de obtención de hule natural.

En contraste con el majestuoso arbol de hevea, el guayule es un arbusto no mayor de un metro de alto, las dos plantas contrastan tambien en sus requerimientos climatológicos, el hevea es nativo de las regiones lluviosas del Ecuador en la zona del Amazonas, el guayule en -- cambio , proviene de tierras más altas y en climas de temperatura subtropical, en las que la lluvia es escasa y errática.

Es sabido desde hace tiempo, que las dos plantas a -- pesar de sus diferencias producen hule natural , de hecho el guayule proveyó el 10% del hule comercial en 1910, quedando relegado como recurso menor -- durante 40 años. Sin embargo durante la II Guerra Mundial, Estados Unidos llevo a cabo un intenso plan de emergencia para el cultivo del guayule el cual fué abandonado después. Para 1946 existió una buena provisión de hule de -- hevea que eliminaba la necesidad de otra fuente de obtención, más aún, existía la idea que los elastómeros sintéticos convertirían al hule natural en obsoleto.

Desde entonces el panorama ha cambiado y las siguientes condiciones son evidentes:

- El hule no muestra huellas de obsolescencia. Ha-
biendo retenido su posición como uno de los productos mundiales más --
importantes teniendo para 1982 una producción mayor a 5 millones de
toneladas, una tercera parte de las necesidades mundiales. Existe la cer-
teza de que la demanda de hule natural excederá a la producción espera--
da en las plantaciones de hevea en los años próximos, significando esto una
gran escasez a nivel mundial.

- El petróleo, nuestra mayor fuente de hidrocar--
buros disminuirá gradualmente prediciéndose en unas décadas más su --
agotamiento.

El incremento en el precio del petróleo ha disminu-
ido la competitividad de los elastómeros sintéticos, de los cuales el petró-
leo es la materia prima.

- Con el elevado ritmo de crecimiento de población
existe la necesidad universal de utilizar la productividad de tierras margina-
les, especialmente en las zonas áridas, de encontrarse productos agrícolas
adaptados a los difíciles ambientes del desierto que provean de trabajo y re-
cursos económicos a sus habitantes que viven donde el cultivo de productos
comerciales es arriesgado ó imposible.

Actualmente en México hay 4 millones de hectáreas

accesibles y densos parajes de guayule salvaje convenientes para su recolección y explotación comercial con un promedio superior al 10% de hule por arbusto en base seca. Se estima que estas regiones contienen un almacenamiento de 300 000 toneladas de hule.

Los subproductos del guayule aún no han sido explotados comercialmente, su composición y cualidades son poco conocidas pero muy prometedoras. La cera de las hojas es producida en grandes cantidades (2.5% en base seca), tiene una notable dureza y su punto de fusión es más alto que el de la cera de Carnauba, además es fácilmente extraída con un color claro que la de Carnauba no logra igualar. Igualmente, el bagazo y el corcho pueden tener valor comercial. Contiene algunos terpenos semejantes a los producidos por los pinos: alfa-pinenos, beta-pinenos, cadinenos, dipentenos, partenoles, etc., los ácidos diterpénicos se emplean en la industria papclera y los terpenos volátiles son solventes ampliamente usados en la industria de la pintura.

El arbusto del guayule se encuentra al pie de las colinas y sobre terrenos de roca calcárea. Estos suelos presentan una profundidad variable y un lecho de "caliche" (grava sobre roca de nitrato de sodio) de pH básico. En estos terrenos y bajo clima desértico, el guayule vive en vecindad con agaves, espinosas y mimosas. El guayule es la única especie de su género que contiene la suficiente cantidad de hule para presentar importancia económica. Las otras tienen

un desarrollo vegetativo más importante, pero no contienen hule.

El guayule *Parthenium argentatum* Gray es una planta que pertenece a la familia Compositac. Se encuentra en el norte de México en los estados de Coahuila, Durango, Zacatecas, San Luis

Potosí, Nuevo León, Chihuahua y en los E. U., en el sur de Texas, fig. 1. En su estado salvaje su crecimiento es lento debido a las condiciones climáticas dentro de las cuales se encuentra localizado, que son altitud de 600 a 2000 m, precipitaciones anuales de 200 a 400 mm, temperatura elevada durante el día y baja durante la noche. Crece de 50 a 60 cm en un año y el desarrollo de sus raíces se considera bastante importante, de 6 m de profundidad y 3 m de ancho, ya que de estas depende su captación de agua y almacenamiento durante la época de sequía.

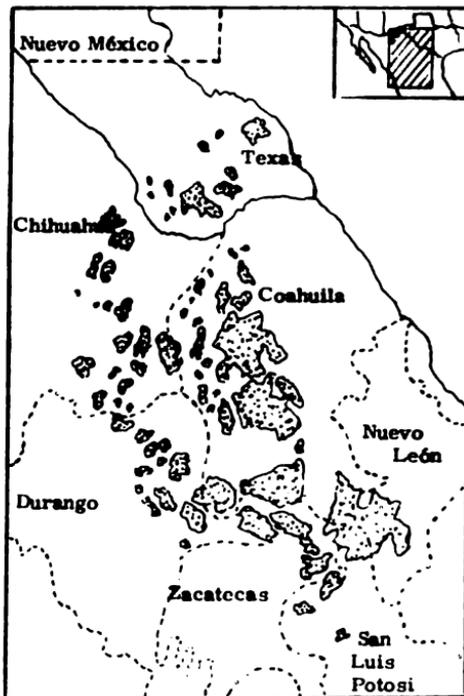


Figura No. 1 Zonas de guayule silvestre en México y Texas.

El hule se encuentra contenido en forma líquida en células aisladas principalmente en el parénquima cortical y en las raíces medulares. Las 2/3 partes del hule se encuentran dentro de la parte aérea y la parte restante dentro de las raíces. No existe hule dentro de las hojas. En el guayule silvestre, la cantidad de hule alcanza un promedio del 10% sobre el peso seco, pero hay una considerable variabilidad. El rendimiento depende de las capacidades genéticas de la planta, pero también de las condiciones del medio. Dentro del ciclo anual de crecimiento el guayule produce poco hule, pero cuando el crecimiento disminuye, los productos de la fotosíntesis son transformados en hule. El hule fabricado por las plantas se acumula y permanece estático, esto es, se ha demostrado experimentalmente que, privando de fuentes de carbono al guayule, este no utiliza el hule como fuente de energía.

En la actualidad el guayule es el primer candidato para obtener una fuente adicional renovable de hule. Desde su conocimiento (hace más de 100 años) ha sido desplazado de su posición de fuente de obtención, primeramente por hevea y posteriormente por los elastómeros sintéticos. Ahora sabemos que las plantaciones de Hevea brasiliensis son limitadas debido a sus grandes requerimientos de agua por lo cual no podrán aumentarse en forma indefinida.

Considerando que el 30% de la superficie --

actual de la tierra esta cubierta de zonas áridas, la vegetación desértica tiene gran importancia debido a su actividad fotosintética. Desde 1977 la investigación sobre zonas áridas en México ha sido desarrollada y enfocada hacia la conservación y desarrollo del guayule como una fuente económica de hule.

No es posible hablar del guayule sin destacar las condiciones económicas, políticas, sociales y científicas, que han provocado y renovado el interés sobre él:

-El incremento de los precios del petróleo, de los cuales dependen los cauchos sintéticos, lleva implícito el encarecimiento de estos materiales y un aumento en la competitividad del hule de guayule.

- La inseguridad política de las regiones del sureste asiático fuentes de aprovisionamiento de hule natural.

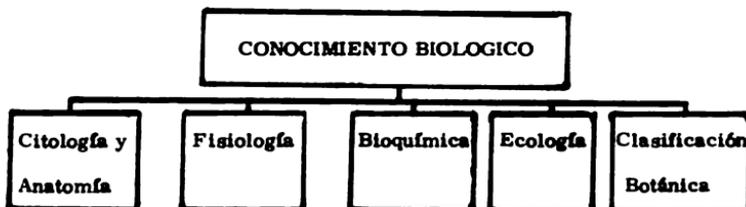
- La voluntad de favorecer a las poblaciones de las regiones semi-desérticas de México, procurándoles una actividad remunerativa.

- La posibilidad de mecanizar las plantaciones, lo que permitirá una producción por unidad de mano de obra muy superior a la de hevea.

- La escasez de hule natural prevista para 1985 a escala mundial a pesar de las plantaciones y replantaciones de hevea actualmente en auge en Extremo Oriente, Africa, y América del sur.

-El deseo de desarrollar en cuanto sea posible un recurso nacional que disminuya ó elimine las importaciones.

Habiendo hecho las consideraciones anteriores que revelan la gran importancia que reviste el desarrollo del guayule, es necesario situarnos dentro del conocimiento biológico actual:



Es dentro del área de la Bioquímica en donde enfocamos el presente estudio. La bioquímica dentro del estudio del guayule adquiere una gran importancia, ya que ésta, trata de esclarecer las rutas metabólicas seguidas en la biosíntesis de metabolitos así como la acción y función de cofactores, proteínas y enzimas involucradas; por lo cual y ya que es la producción de un metabolito secundario (el hule) lo que nos ocupa y debido a que este, adquiere gran importancia en la actualidad, el presente estudio es de gran relevancia debido al poco conocimiento bioquímico que se tiene de esta planta, enfocado a esclarecer el mecanismo y las vías metabólicas que entrañan la biosíntesis del hule, la manera en que se puede estimular un incremento en la biosíntesis de hule y a que nivel de macromoléculas se induce este aumento.

MATERIAL Y METODOS

I. - Material biológico.

Las plantas. - Las plantas se recolectaron de las cercanías del CIQA de Saltillo, Coah.

II. - Métodos.

IIa. - Liofilización. - Se coloca el material a secar o concentrar en un matraz bola de vidrio ocupando el 10% de la capacidad de la bola y se congela en una mezcla de acetona - hielo seco distribuyendolo por rotación en la mayor superficie posible de la bola, procurando que la capa congelada sea delgada y homogénea, una vez congelado el material se coloca en el aparato liofilizador, se conecta la bomba de vacío y se mantiene la temperatura a - 55°C, hasta que el material este completamente seco.

Aparato liofilizador: EF4 Modulo Freeze Dryer, Edwards.

IIb. - Homogenización. - El tejido se desintegró de dos maneras, a) suspendido en solución empleando el Ultra-Turrax, Janke & Kunkel, y b) en seco utilizando el molinillo IKA -WERK, Janke & Kunkel.

IIc. - Ultracentrifugación. - Se centrifugó en tubos de acetato de celulosa en la ultracentrifuga Beckman L.-2 H.V.

IId. -Purificación por precipitación con sulfato de amonio. - Esta purificación se efectúa a baja temperatura de dos formas, a) empleando una solución saturada y fría de sulfato de amonio al 100 % y adicionándola a la muestra hasta alcanzar el grado de saturación requerido y b) calculando la cantidad de sulfato de amonio sólido necesaria y añadiéndola lentamente y con agitación constante para lograr su disolución, obteniendo así la concentración deseada.

Ile. Diálisis. - La muestra a dializar se coloca en una bolsa de celofán disuelta en la solución amortiguadora adecuada se introduce una canica de vidrio dentro de la bolsa de diálisis y se coloca en el aparato de diálisis continuo (7) procediéndose a su operación.

Aparato de diálisis continuo. El aparato es de vidrio y consiste en un tubo de diálisis A rodeado por otro tubo de refrigeración B y sujetado por un soporte con ejes C (fig. 2). Los sacos de diálisis (D) conteniendo las canicas de vidrio y la muestra se introducen en el tubo A. El agua destilada o la solución amortiguadora empleada para provocar el fenómeno de difusión, entra a través del tapon de hule horadado (a_1) y sale por el tubo (a_2), que pasa a través del tubo de refrigeración B. Este tubo (B) tiene una entrada b_1 y una salida de sifon de mayor diámetro b_2 y un tubo de respiración b_3 . Se conecta a un enfriador de agua.

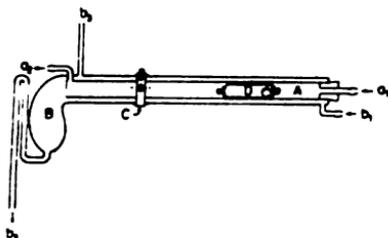


Figura 2. Aparato de diálisis continua.

Funcionamiento. - El aparato cargado con los sacos de diálisis y la solución pesa más del lado derecho, por lo que se inclina hacia ese lado hasta llegar a un tope sujeto al soporte, donde se detiene. Al entrar el agua de enfriamiento, se empieza a llenar el recipiente del lado izquierdo, hasta que, al pesar más, hace que el aparato se balancee hacia la izquierda. Al llenarse el sifón, rápidamente se desalojó el agua y el aparato se balancea nuevamente hacia el lado derecho.

Este movimiento hace que la canica se desplace dentro del saco de dialisis, provocando su agitación. El enfriamiento se hace con un refrigerador de agua (Sargent 84890) colocado de manera que el sifón se descargue en el mismo refrigerador.

IIf. - Determinación de proteínas. - Se siguió el método descrito por Lowry (8) empleando el reactivo de Folin - Ciocalteau. Este método se basa en la ocurrencia de dos reacciones: a) la formación de un complejo colorido entre los enlaces peptídicos y el ion cuprico en solución alcalina, y b) la reducción del reactivo fosfomolibdico fosfotungstíco por el complejo cobre-proteína.

Iig. - Filtración en gel. - Para este proceso de purificación se utilizaron los siguientes geles: Sephadex G-25, Sephadex G-100 y Ultogel. Estos fueron empacados en columnas cromatográficas de LKB-Produkter, en diferentes tamaños según los requerimientos.

Ultogel. - El Ultogel es un medio para filtración (9) constituido por un gel de acrilamida y agarosa, esta mezcla le confiere características especiales. El Ultogel es estable en intervalos de pH de 3-10 y temperaturas de 2° - 36°C. Existen comercialmente diversas concentraciones de poliacrilamida y agarosa lo cual permite seleccionar el gel con el intervalo de fraccionamiento adecuado.

Preparación del gel. - El Ultogel es suspendido en agua destilada y sometido a vacío, agitando esporádicamente, durante 30 min, para eliminar el aire atrapado en los poros del gel, se lava varias veces con el eluyente que se va a utilizar y se empaqueta en la columna.

Dextrana azul 2000. La dextrana azul es un polímero de D-glucopiranososa

sintetizado a partir de sacarosa por un gran número de bacterias pertenecientes a la familia Lactobacilae, al cual se le ha introducido un grupo cromóforo policíclico (10). La dextrana azul 2000 tiene un peso molecular promedio de 2 000 000 daltons, por lo cual es utilizada en la determinación del volumen de exclusión de la mayoría de los geles en la filtración con este tipo de soportes; gracias a que es un compuesto colorido permite observar directamente su desarrollo a través de la columna y juzgar la calidad del empacamiento y homogenización del gel, por lo cual se aplica antes de "inyectar" la muestra a la columna.

Sephadex. - El Sephadex consiste de pequeños granulos de una sustancia hidrofílica insoluble, hecha por el entrecruzamiento de polisacáridos (dextrinas) que forman una malla tridimensional, de carácter no iónico y en la cual sus propiedades polares se deben casi por completo a su alto contenido de grupos hidroxílicos (11). El Sephadex esta hecho con diferentes grados de entrecruzamientos los cuales determinan la porosidad de la malla. Un alto grado de entrecruzamiento resulta en una estructura compacta con baja porosidad y un bajo entrecruzamiento da una estructura altamente porosa. Debido a su carácter hidrofílico, el Sephadex tiene una gran afinidad por el agua. De los diferentes tipos de Sephadex existentes en el mercado es posible escoger aquel que mejor satisfaga los requerimientos de resolución.

Preparación del gel. - Se coloca el Sephadex en un baño maría a ebullición durante 5 horas para imbibir las partículas, después para eliminar el aire atrapado en los poros del gel se somete a vacío por 30 minutos, agitando periódicamente a intervalos cortos de tiempo, se procede después a empa - car la columna con presión hidrostática.

III. - Métodos Electroforéticos:

IIIa. - Electroenfoque. - Para los distintos experimentos se emplearon pla - cas de poliacrilamida (LKB Ampholine PAG plates) para electroenfoque analítico, de diferentes intervalos de pH (12). Se procedió como se in - dica en la nota de instrucciones No. 1804 de LKB. Las condiciones en que se electroenfocaron las distintas muestras se enuncian en cada uno de los experimentos (ver Cuadro 1), estos se efectuaron varias veces tratando de encontrar las condiciones óptimas y la concentración adecuada de las mues - tras que se resolvieran en el mayor número de bandas. El equipo utilizado fué el de LKB-Bromma Produkter.

IIIb. - Electroforesis - SDS. - Esta técnica se emplea en la separación de proteínas y en la determinación de sus pesos moleculares (13). Para este experimento se utilizó el equipo especializado LKB.

Se preparó un gel de poliacrilamida -SDS al 10 %, mez - clando los siguientes reactivos en las cantidades anotadas:

CUADRO No. 1

ELECTROENFOQUE

Condiciones	E x p e r i m e n t o				
	1	2	3	4	5
Intervalo de pH	5,5 - 8,5	3,5 - 9,5	4,0 - 6,5	4,0-5,0	4,0-5,0
Solución del electrodo:					
- anódico	Hepes 0,4 M	H ₃ PO ₄ 1,0M	ac. glutami- mico 0,1 M en H ₃ PO ₄ 0,5 M.	H ₃ PO ₄ 1,0M	H ₃ PO ₄ 1,0 M
-catódico	NaOH 0,1M	NaOH 1M	- alanina	glicina 1,0M	glicina 1,0M
Potencia (watts)	25	30	25	30	30
Voltaje (volts)	1 600	1 500	2 000	1 400	1 400
Corriente (mA)	50	50	25	50	50
Temperatura (°C)	10	10	10	10	10
Tiempo del Experimento (horas)	1,3	1,5	2,5	3,0	3,0

- 1) Solución amortiguadora patrón = 33,0 ml
- 2) Solución de acrilamida = 29,7 ml
- 3) Persulfato de amonio = 3,2 ml
- 4) TEMED = 0,1 ml

66,0 ml volúmen final

- 1) Solución amortiguadora patrón.- Amortiguador de fosfatos 0,2 M pH=7,1
- 2) Solución de acrilamida. - 22,2 g de acrilamida especial para electroforesis + 0,6 g de bis-acrilamida, se lleva a 100 ml con agua destilada, guardar en frasco ambar a 4 ° C . ; Toxico;
- 3) Solución de persulfato de amonio. - 100 mg de persulfato de amonio se afora a 10 ml con agua destilada. Preparase el mismo día.
- 4) TEMED. - Solución de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina al 97 % mín. Preparación de la placa de poliacrilamida. - El gel se preparó en la forma descrita en la nota de aplicaciones No. 306 de LKB, (14).

El experimento se efectuó bajo las siguientes condiciones: Corriente= 20 mA durante los primeros 10 min., inmediatamente después de aplicar las muestras y ajustando posteriormente a 190 mA. Fuerza de campo = 6 volts/cm. Velocidad de migración del bromofenol azul = 1,2 cm/h. Temperatura = 5 °C Tiempo total del experimento = 5,0 horas.

Terminado el experimento se procede tal como lo sugiere n Fehrstrom y Moberg (14) para la conservación de la placa y

la determinación de los pesos moleculares.

IV. - Métodos para la determinación de Actividades Enzimáticas Espectrofotométricamente. - Las actividades enzimáticas fueron medidas en el espectrofotómetro automático de doble haz Perkin-Elmer modelo 450, estas determinaciones están basadas en la propiedad que tienen los piridinucleotidos reducidos de absorber la luz a una longitud de onda de 340 nm.

a) Incubación para determinar la acción de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

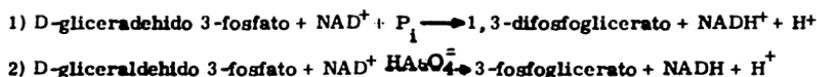


Se emplean los siguientes reactivos en solución acuosa:

	Volumenes Empleados	
	Problema	Testigo
1) Solución amortiguadora glicil-glicina 0.2 M pH = 7.2	2 ml	2 ml
2) MgCl ₂ 0.03 M	0.2 ml	0.2 ml
3) NADP ⁺ (2 mg/ml)	0.4 ml	-
4) glucosa 6-fosfato (sal de sodio) 5 mg/ml	0.4 ml	0.4 ml
5) Solución enzimática comercial (glucosa- 6-fosfato deshidrogenasa)	20 ul	20 ul
6) suero de guayule (G ₈₀) dializado y li - filizado (4 mg/ml)		
7) agua destilada	-	0.4 ml

Se coloca la solución testigo en un celda (de 1 cm de espesor) para ajustar el aparato a cero de absorbancia, se añaden a otra celda de iguales dimensiones la solución problema conteniendo todos los reactivos excepto el NADP^+ . Al añadir este se toma como tiempo cero, se mezcla y se mide la absorbancia cada 30 segundos a una longitud de onda constante (340 nm).

b) Incubación para determinar la acción de la gliceraldehido 3-fosfato-deshidrogenasa. La determinación de esta actividad se realizó según el método descrito por Remi E. Ameluxen (15).



Reactivos (en solución acuosa)	Problema	Testigo
1) Solución amortiguadora glicina- NaOH 0.10 M pH= 10 (con unos cristales de cistefna)	2.7 ml	2.7 ml
2) NAD^+ 7.6 mM	0.1 ml	0.1 ml
3) Gliceraldehido 3-fosfato (como dietilacetal)	0.1 ml	-
4) Arseniato de sodio 0. 17 M	0.1 ml	-
5) Solución enzimática comercial (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa)	1 ul	1 ul
6) suero de guayule (G) dializado y liofilizado (4 ,mg/ ml) 80	10 ul	10 ul
7) agua destilada	-	0.2 ml

La actividad se sigue espectrofotométricamente tal como la describió Krebs (15). La mezcla de reacción conteniendo la solución amortiguadora , NAD^+ y la solución enzimática se incuba 10 minutos a 30°C para la completa activación de la enzima por la cisteína , y el aparato empleado es el mismo que se empleó en la incubación anterior y su ajuste se hace en igual forma. Una vez ajustado el aparato empleado, en una celda se colocan los reactivos de la mezcla problema a excepción del arseniato de sodio y el gliceraldehído 3-fosfato los cuales se mezclan aparte en una proporción 1: 1 , de esta mezcla se toman 0.2 ml y se añaden a la celda, este momento se toma como tiempo cero , se agita y se mide la absorbancia a 340 nm en intervalos de 30 segundos.

V. - Métodos para la Determinación de Actividad Enzimática por Centelleo. -

a) Incubación con mevalonato 2- ^{14}C

Reactivos	Volúmen (ul)
1) MgCl_2 0.10 M	80
2) Solución amortiguadora tris-maleico 0.10 pH= 6.55	1 000
3) EDTA 0.10 M	80
4) ATP 5 mg	-
5) suero de guayule (G) 2 00 mg	-
6) Mevalolactona 2- ^{14}C (mevalonato en benceno con actividad de 50 $\mu\text{C}/\text{ml}$ de Amersham --- 20 μl = 1 μCi 1 μCi = 22.2×10^5 desintegraciones/min)	20

Se disuelve el suero en la solución amortiguadora se añaden los demás reactivos e inmediatamente se coloca la mezcla de incubación en un baño a 28°C durante un periodo determinado. Terminado el tiempo de incubación se calienta en un baño de vapor por 30 min.

Se añade metanol destilado caliente y se refluja por 3 horas. El precipitado se seca a baja presión en un desecador durante 2 horas. Se extrae con benceno destilado 24 horas. El extracto bencénico se transfiere a un frasco vial y se coloca en un baño de vapor y pasándole una corriente de N₂ se evapora a sequedad. Una vez seco se añaden al frasco vial 10 ml de líquido de centelleo tolueno conteniendo 5 % de PPO (2,5-difeniloxazol) analizaren el contador de centelleo. El aparato utilizado fué el analizador de centelleo líquido Philips PW 4540.

b) Incubación con isopentilpirofosfato (1-¹⁴C)

Reactivos	Volúmen (ul)
1) MgCl ₂ 0.10 M	100
2) sol. amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH=6.77 conteniendo 2 gotas por cada 15 ml de 2-mercaptoetanol	1 000
3) muestra de guayule	-
4) Isopentilpirofosfato (1- ¹⁴ C), sal de amonio en sol. acuosa, con actividad de 50 uCi/ml de Amersham 10 ul = 0,5 uCi=1.11 x 10 ⁵ dpm ó cpm	10

Se sigue el mismo procedimiento que para la incubación con mevalonato.

PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

Las plantas de guayule fueron traídas de zonas cercanas al Centro de Investigación de Química Aplicada, (CIQA) Saltillo, Coah. La edad de las plantas oscilaba entre 2 y 4 años , y fueron transplantadas a macetas en este Instituto.

Obtención de Proteínas:

Para la obtención de proteínas se usó tejido fresco, así que a plantas de guayule se le cortaron segmentos de tallo, los cuales se defoliaron y se les eliminó la humedad por liofilización obteniéndose - 20- 25 % de agua, esta variación dependía de la edad del tejido y fluctuaba de planta a planta.

Se tomaron 6 g de tejido seco liofilizado, se colocaron en un mortero de porcelana, donde fueron macerados en frío en presencia de hielo seco, enseguida se homogenizó con agua destilada durante -- 10 minutos en Ultraturrax a 5°C., luego se centrifugó a 75 000 x g durante 90 minutos a 2° C. El sobrenadante se decantó, se congeló y liofilizó. Un diagrama de flujo que ilustra las operaciones anteriores se muestra - en el diagrama No. 1.

Obtención de las muestras por Filtración en Ultrogel:

A 0,16 g del sobrenadante liofilizado se le reconstituyó con 4 ml del tampón glicil glicina 0,01 M, pH 7,1, se filtró por

PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

Las plantas de guayule fueron traídas de zonas cercanas al Centro de Investigación de Química Aplicada, (CIQA) Saltillo, Coah. La edad de las plantas oscilaba entre 2 y 4 años , y fueron transplantadas a macetas en este Instituto.

Obtención de Proteínas:

Para la obtención de proteínas se usó tejido fresco, así que a plantas de guayule se le cortaron segmentos de tallo, los cuales se defoliaron y se les eliminó la humedad por liofilización obteniéndose 20- 25 % de agua, esta variación dependía de la edad del tejido y fluctuaba de planta a planta.

Se tomaron 6 g de tejido seco liofilizado, se colocaron en un mortero de porcelana, donde fueron macerados en frío en presencia de hielo seco, enseguida se homogenizó con agua destilada durante 10 minutos en Ultraturrax a 5°C., luego se centrifugó a 75 000 x g durante 90 minutos a 2° C. El sobrenadante se decantó, se congeló y liofilizó. Un diagrama de flujo que ilustra las operaciones anteriores se muestra en el diagrama No. 1.

Obtención de las muestras por Filtración en Ultrogel:

A 0.16 g del sobrenadante liofilizado se le reconstituyó con 4 ml del tampón glicil glicina 0.01 M, pH 7.1, se filtró por

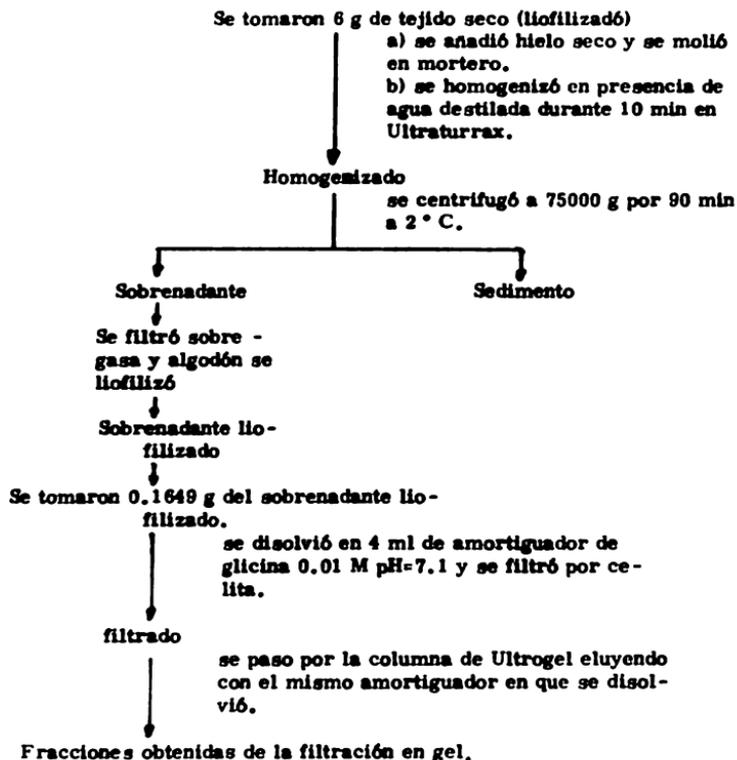
celita para eliminar el material insoluble, y el filtrado se sometió a una cromatografía de permeación en Ultrogel AcA 44 (poliacrilamida 4 % - agarosa 4 %), que tiene una amplitud de fraccionamiento (para proteínas globulares) de 10, 000 - 130, 000 daltons. La columna se - equilibró con el amortiguador glicil glicina 0.01 M, pH 7.1. Las condiciones fueron: Columna (cama), 68 cm de altura, 1,6 cm de diámetro, volumen total 136,7 ml. La velocidad de flujo fue de 0,525 ml/min (un poco mayor que la óptima, sacrificando un poco la eficiencia en favor de la rapidez). El volumen de cada fracción fué de 65 gotas (4,3 ml) y la temperatura se mantuvo a 5 °C durante esta operación.

La absorbancia del eluyente de la columna de Ultrogel se leyó a 254 y 276 nm, mediante un Uvicord(espectrofotómetro) acoplado a un registrador. Los resultados de la filtración en gel se muestran en la figura 2 presentando varias bandas. Las fracciones que constituyen cada una de ellas se reunieron numerándose por el orden de elución. Tabla I nos muestra un resumen de cuales fracciones corresponden a cada banda.

Esta primera resolución del extracto de tallo de guayule nos sirvió para identificar componentes que absorben a 254 y 276 nm , y fueron base para subsecuentes experimentos.

Proceso seguido para la obtención de muestras por Filtración en Ultrogel

DIAGRAMA 1



Se separaron y distribuyeron de acuerdo al cromatograma al graficar las absorbancias de las fracciones a longitudes de onda de 276 y 254 nm.



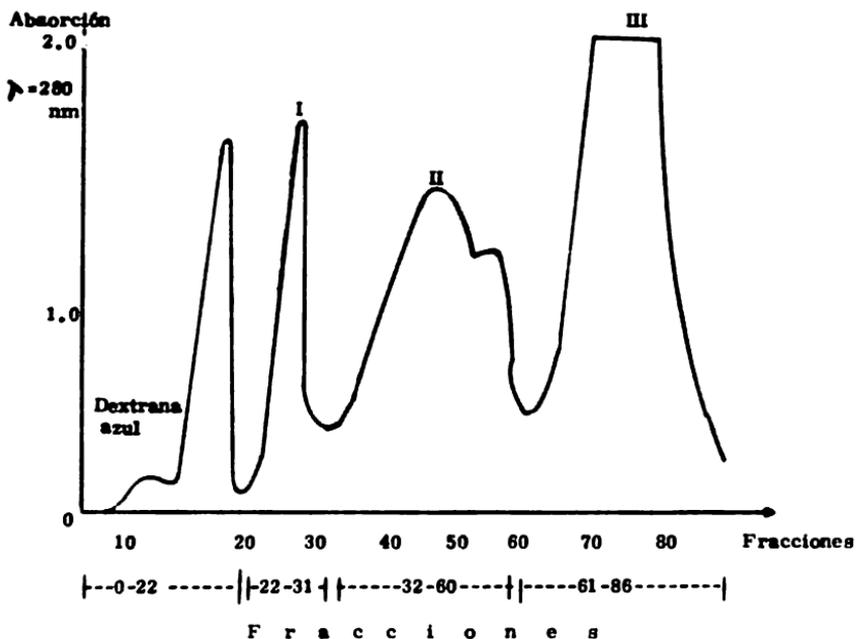


Figura No. 2 . Muestra sometida a Filtración en Gel (Ultogel).

Obtención de Muestras por Filtración en Sephadex:

Se maceraron 18 g de tallo fresco de guayule en un mortero con hielo seco, el tejido macerado se suspendió en 100 ml de agua destilada enfriada y se desintegró completamente en Ultraturrax por 5 min., durante la homogenización la muestra se colocó en un baño de hielo para evitar hasta donde fuera posible la elevación de la temperatura, lo cual pudiera afectar a las muestras proteínicas en general; el homogenizado se centrifugó a baja velocidad (3 000 r.p.m.) durante 10 minutos se decantó el sobrenadante y se procedió a su liofilización.

Del guayule liofilizado se tomaron 200 mg. se rehidrataron y se dializaron contra agua destilada manteniendo la temperatura a 4°C durante todo el proceso.

La muestra dializada se volvió a liofilizar para -- concentrarla y una alícuota se aplicó sobre una placa de poliácridamida (PAG) con un gradiente de anfólitos y por electroenfoque se determinaron los pI ' s de las proteínas presentes en el suero obtenido por la metodología descrita (Experimento No. 1).

El resto del suero de guayule liofilizado sin dializar se disolvió en agua destilada y se centrifugó de nuevo a 75 000 g (rotor 30, Ultracentrifuga Beckman Modelo L.-2) durante 60 minutos a 4°C, el sobrenadante obtenido se liofilizó inmediatamente obteniéndose 0.65 g de suero de guayule seco. A este suero se le determinó proteínas según el método

de Lowry (7) (Folin - Ciocalteu) obteniéndose 28,86 % de proteínas en base seca del suero.

El suero liofilizado se reconstituyó y dializó contra agua destilada durante 18 horas, a 4 °C y un flujo constante de intercambio de agua de diálisis y con agitación para facilitar de esta manera la salida de iones y moléculas pequeñas a través de la membrana de celofán (7). Después se sometió a una filtración en gel con Sephadex, G-25 mediano (50-15 u) con las siguientes características: Límite de fraccionamiento para péptidos y proteínas globulares de 1 000 - 5 000 daltons.

El Sephadex G-25 se vertió en una columna con las siguientes dimensiones: diámetro, 1,6 cm, altura de cama 25 cm, volumen de cama 50,24 ml.

El flujo empleado fué de 0,35 ml/min y el volumen de cada fracción colectada fué de 4,5 ml.

Para obtener el volumen de exclusión se calibró la columna con Dextrana Azul a una concentración de 2 mg/ml. La columna fué equilibrada con agua destilada. A cada fracción colectada se le midió su absorción en un espectrofotómetro (Pye Unicam) a una longitud de onda de 280 nm. Observándose dos bandas separadas, la primera de ellas quedaba dentro del volumen de exclusión (32,5 ml) y la segunda correspondió a las moléculas que fueron capaces de penetrar la matriz del gel.

Se reunieron todas las fracciones pertenecientes a la primera banda conformando una sola fracción, esta fué sometida a una pre-

cipitación con solución de sulfato de amonio hasta una concentración final de 80% (P/V); el precipitado obtenido (GI) se centrifugó a 3 000 r. p. m. durante 10 min. el sobrenadante obtenido se dializó , liofilizó; debemos - hacer notar que durante todas las manipulaciones la temperatura se mantuvo abajo de 10° C , para tratar de evitar cualquier acción enzimática.

El suero precipitado con sulfato de amonio al 80 % (GI) se rehidrató para someterlo a una purificación en filtración en gel con Sephadex G-100, con un rango de fraccionamiento para proteínas globulares de 40 000-150 000 daltons.

A continuación se describen las características de la filtración y las dimensiones de la columna; diámetro de la columna, 2,5 cm, altura de cama 69,7 cm con flujo 0,4 ml / min y un volúmen de fracción colectada de 4,3 ml.

La columna se calibro pasando por ella 3 veces el volúmen de cama de gel de solución tampon glicil-glicina 0,01 M pH=7,1.

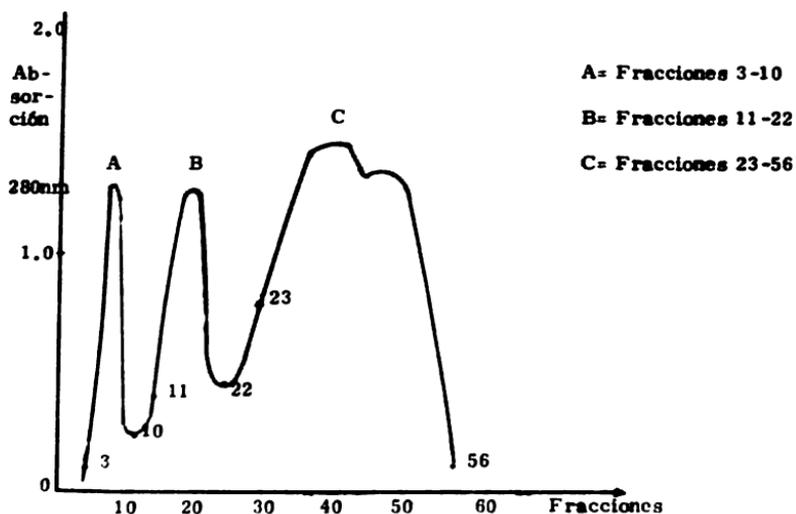
La columna se calibró con Dextrana Azul , y se -- determinó su volúmen de exclusión resultando de 43 ml.

Se tomaron 35 mg de suero de guayule precipitado (GI) con sulfato de amonio al 80% y se disolvieron en 2 ml de amortiguador glicil-glicina 0,01 M, pH= 7,1. Se aplicó la muestra en la columna y se eluyó con el mismo amortiguador en que se disolvió.

A las fracciones colectadas en la filtración con Se-

phadex G-100 se les leyó su absorbancia a 280 nm en el espectrofotómetro (UNICAM - SP600 UV) resultando las bandas mostradas en el cromatograma, (fig. No. 3).

FIGURA No. 3



Se mezclaron las fracciones correspondientes a cada una de las bandas denominadas A, B y C, se dializaron durante 16 horas a baja temperatura (5° C) y se liofilizaron. Se obtuvieron 6.1 mg de la fracción A, 8.0 mg de la fracción B, y una cantidad no determinada de la fracción C a causa de su higroscopicidad y dificultad de recuperación del recipiente de liofilización. Estas fracciones se sometieron a electroenfoque en placa delgada de poliacrilamida en un gradiente de anfolitos de pH entre 5.5- 8.5.

Electroenfoque.

En el experimento No. 1 de electroenfoque efectuado bajo las condiciones descritas en la nota de aplicación No. 1804 de LKB, se aplicaron las siguientes muestras (ver la tabla II) se variaron las --- concentraciones iniciales con el objeto de observar el mayor número de --- bandas posibles para evitar que estas concentraciones llegasen a ser un factor limitante para su resolución. La muestra G1 es la misma que se aplicó a la filtración en Sephadex G-100 y que se separó en tres fracciones (A, B y C). La muestra G* se obtuvo de macerar 35 g de tallo fresco con hielo seco en un mortero, homogenizar el tejido macerado 5 min en una solución de sulfato de amonio a 60 % de saturación y se volvió a centrifugar a 75 000 g durante 3 horas a 4° C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se redisolvió en la solución de mecaptopetanol y se dializó durante 14 horas contra la solución de 2-mercaptoetanol, se liofilizó denominándose

como muestra G² como se dijo anteriormente.

Precipitación directa de proteína de guayule al 80% (G₈₀)

Se maceraron 55 g de tallo de guayule fresco con hielo seco, luego se pasó al tejido macerado a un molino con hielo seco y se molió durante 60 segundos, el tejido molido se suspendió en solución de mercaptoetanol 1.5×10^{-6} M fría (5°C), se centrifugó 120 min a 38 000 g a 5°C. El sobrenadante se filtró a través de gasa doble y se liofilizó.

El sobrenadante liofilizado se disolvió en 40 ml de una solución fría de mercaptoetanol 6×10^{-6} M, en seguida y con agitación constante se le añadieron lentamente 160 ml de una solución de sulfato de amonio saturada al 100% (P/V), precipitando así las proteínas solubles que no soportan una concentración final del 80% de sulfato de amonio, el precipitado obtenido se centrifugó de nuevo a 38 000 g durante 40 min a una temperatura de 5°C.

Al sobrenadante se le sometió a un barrido completo en el espectrofotometro UV-Visible observandose una pequeña lectura de absorbancia en la región de 280 nm., lo cual nos indicaba existía un pequeño remanente de proteínas en el sobrenadante (ó sea que estas no estaban completamente precipitadas a esa concentración de sal). El precipitado se redisolvió en la solución de mercaptoetanol 3×10^{-6} M y se dializó contra esta misma solución durante 20 horas, manteniéndose un --

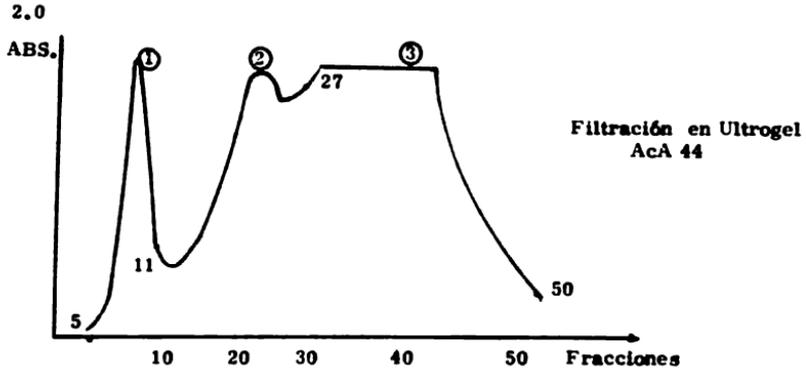
un flujo continuo de la solución de diálisis para evitar la saturación por la sal de amonio y extraer esta completamente de la solución proteica inmediatamente después se liofilizó (G_{80}).

A G_{80} se le determinó proteína por el método de Lowry utilizando el reactivo de Folin Ciocalteu resultando 75.88 % de proteína, una porción de la muestra anterior se sometió a filtración en gel.

Del precipitado liofilizado se tomaron 72.5 mg y se redisolvió en 5 ml de solución amortiguadora Tris-clorhídrico 0.02 M pH=7.8. Se filtró por celita y el filtrado se aplicó a una columna cromatográfica de Ultrogel AcA 44 de las siguientes dimensiones: una altura del gel de 42 cm, un volumen de cama de gel de 84 cm, altura de la columna 80 cm, diámetro 1.6 cm, una velocidad de flujo lineal de 3.0 cm/h y una velocidad de flujo de 6.0 cm³/h, volumen de fracción de 3.0 ml, tiempo requerido por fracción 33 min. El volumen de exclusión determinado con dextrana azul fué de 38 ml, durante la filtración la temperatura se mantuvo a 4 °C, la muestra fué eluida del gel con el mismo amortiguador en el que se disolvió.

A las fracciones obtenidas de la filtración en Ultrogel se les determinó su absorbancia a 280 nm obteniéndose el cromatograma de la Figura No. 4.

FIGURA No. 4



Las fracciones se separaron en tres partes, la primera abarcaba de las fracciones 5-11, la segunda de 12-27 y la tercera de 28-48, se dializaron contra una solución de mercaptoetanol 1.5×10^{-6} durante 20 hrs. a 4°C con flujo de intercambio de la solución de dialisis constante y agitación.

Una vez dializadas las tres partes se liofilizaron. De las partes 1 y 2 se obtuvo tan poco material liofilizado que no fué posible - determinar la cantidad y fueron redisueltas en 1 ml de agua destilada.

Electroenfoque Experimento No. 2.

Las tres partes obtenidas fueron aplicadas a una placa de poliacrilamida (PAG) con un gradiente de pH de 3.5-9.5 junto con una muestra de proteína de guayule (G_{80}) que corresponde a la misma que

se aplicó a la columna cromatográfica, se electroenfocaron bajo las condiciones ya descritas y los resultados obtenidos se resumen en la Tabla III.

En esta placa se observa una gran concentración de las bandas enfocadas en la región más ácida de la placa correspondiente a un pH de 5.5-3.5, lo cual nos indica que las proteínas enfocadas tienen carga negativa ya que emigran hacia el ánodo, de aquí se desprende la necesidad de ampliar la capacidad de resolución de la placa estrechando el gradiente de pH dentro de la zona ácida (6.5-4), esto se describe en el experimento No. 3 de electroenfoco en placa delgada de poliacrilamida. Dado que las muestras 1 y 2 no se obtuvieron en cantidades suficientes para aplicarlos en este intervalo de pH solamente se trabajó con las muestras 3 y G₈₀ tratando de esta manera de establecer alguna diferencia entre ellas, los resultados están expresados en la tabla IV y las condiciones en que se efectuó el experimento están descritas en la parte No. IIIa. de métodos.

En la Tabla IV se puede notar que aún hay un gran número de bandas concentradas en la zona de menor pH (Más bajo) por lo cual se creyó conveniente reducir el intervalo de pH y así aumentar el grado de resolución al aumentar el número de anfolitos dentro de una zona más estrecha, utilizando las mismas muestras (3 y G₈₀) se realizó el experimento No. 4 de electroenfoco con un gradiente de pH de 5-4 bajo las condiciones enunciadas en la sección de métodos y obteniéndose los resultados presentados en la Tabla V.

En este experimento se observó más claramente la distribución de las bandas cuyos puntos isoeléctricos se encontraban en la parte ácida, particularmente en la región de pH 5 a 4.

Dentro de las diferentes gradientes de pH es posible observar algunas pequeñas diferencias entre las distintas muestras aplicadas, sin embargo estas no son tan grandes como para poder decir que hubo ó no una buena separación y purificación de ellas a través de los procesos a que fueron sometidas, que sirva de parámetro, si bien aunque podemos observar que existen proteínas con el mismo punto isoeléctrico, eso no asegura el que estas sean iguales por lo cual se trató de establecer alguna diferencia en las distintas muestras por medio de determinaciones de actividad enzimática.

Detección de Actividad Enzimática Espectrofotométricamente.

En las proteínas del guayule se trató de establecer su actividad enzimática dentro de una de las vías metabólicas primarias como es la glucólisis. La primera de las actividades buscada fué la de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa; en dos celdas de 4 ml y 1 cm de espesor, se colocaron 2 ml de amortiguador de glicil-glicina, 0.4 ml de la solución de NADP^+ , 2 ml de MgCl_2 y 0.4 ml de la sal sódica de glucosa-6-fosfato en cada una, una vez que la mezcla de reacción se equilibró a temperatura ambiente (20 min) se colocaron las celdas en el espectrofotómetro, una celda de referencia que contenía todos los reactivos a exce-

cción de la solución enzimática y otra celda para la muestra problema una vez que se ajustó el aparato a cero de absorbancia con la celda de referencia a 340 nm (zona de absorbancia del nucleótido reducido) se - añadió , a la celda de muestra 20 ul de solución enzimática se agitó rápidamente para homogenizar la mezcla de reacción y se tomaron lecturas de absorbancia cada 30 segundos.

En la segunda incubación se buscó actividad de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (según el método de Remi E. Ameluxen), la actividad enzimática se siguió también espectrofotométricamente esencialmente como la describe Krebs . (15). La reacción es irreversible usando arseniato. La mezcla de reacción conteniendo 2.7 ml de amortiguador glicina-NaOH (conteniendo unos cristales de cistefina) - 0.1 ml de NAD^+ y 1 l de solución de enzima (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) se colocó en una celda de 4 ml y 1 cm de espesor y se incubó 10 minutos a 30°C para completar la activación de la enzima por la cistefina en otra celda que sirvió de referencia se añadió también la mezcla de reacción y se ajustó el aparato a cero de absorbancia a 340 nm . A la celda de muestra se le añadió 0.2 ml de una mezcla (1:1) de arseniato de sodio y gliceraldehido - 3 - fosfato, se agitó rápidamente para homogenizar y se tomaron lecturas de absorbancia cada 30 segundos.

Los sistemas de las incubaciones fueron probados con enzimas purificadas adquiridas de casas comerciales habiendo funcionado correctamente.

Sin embargo cuando se colocaron las muestras de guayule para determinarles las mismas actividades enzimáticas, la coloración presente en ellas enmascaró cualquier actividad enzimática detectable espectrofotométricamente, este hecho llamó poderosamente nuestra atención, nos preguntamos que clase de compuesto sería que no hubiera sido posible eliminarlo ni por ultracentrifugación, dialisis, filtración en gel ó purificación por medio de la precipitación por sales. Sabiendo que hay una gran cantidad de compuestos presentes en pequeñas cantidades en el citoplasma que realizan al romper la estructura celular un efecto de teriorante sobre las protefnas nos encaminamos a la identificación de algunos de estos compuestos reportados en la literatura para tratar de evitar su acción.

Se ha reportado que muchos frutos presentan altos niveles de fenoles y fenoloxidasas que al interaccionar durante el proceso de extracción del tejido para su analisis, presentan un avanzado grado de oscurecimiento concomitante con un deterioro proteico. El oscurecimiento es producido por una oxidación fenólica y una eventual polimerización no enzimática de las quinonas a taninos o melaninas. Los taninos son un serio impedimento para la extracción de otras enzimas activas solubles precipitandolas ó uniendose a la superficie de las protefnas provocando la inactivación de la enzima. Las fenoloxidasas son protefnas que contienen cobre y se emplean en sustratos específicos para dividirlos en

dos grupos: Un grupo (tirosinasa) cataliza la oxidación de mono y difenoles mientras que el otro (polifenoloxidasas) es ampliamente específico en la catálisis de oxidación de o-dehidrofenoles como el catecol y el ácido clorogénico. Recientemente se desarrolló un método con el que se podían obtener patrones proteínicos con un mayor grado de conservación de actividades enzimáticas.

Este método fue el que se utilizó (ver arriba), y esta basado en la " Homogenización de tejidos a bajas temperaturas " (aproximadamente a -70°C) en acetona, seguida de una equilibración a -25°C . El agua y , los solutos solubles de bajo peso molecular pasan a la fase líquida en la cual son extraídas y el polvo resultante, polvo acetónico conteniendo las proteínas es secado bajo vacío. Presumiblemente bajo estas condiciones los fenoles , ácidos, azúcares y otros componentes solubles son extraídos en un medio que minimiza las interacciones con las proteínas , sin embargo en el caso de guayule no funcionó.

Obtención de muestras por el método de "polvo acetónico".

Bajo los antecedentes de Clements (16), se adaptó la metodología empleada en frutas al guayule. Se colocaron 85 g de tallo fresco en un mortero con hielo seco y se maceraron, el tejido macerado se molió con hielo seco usando intervalos de 30 seg, para evitar calentamiento del tejido hasta obtener un polvo fino. Inmediatamente este se pasó

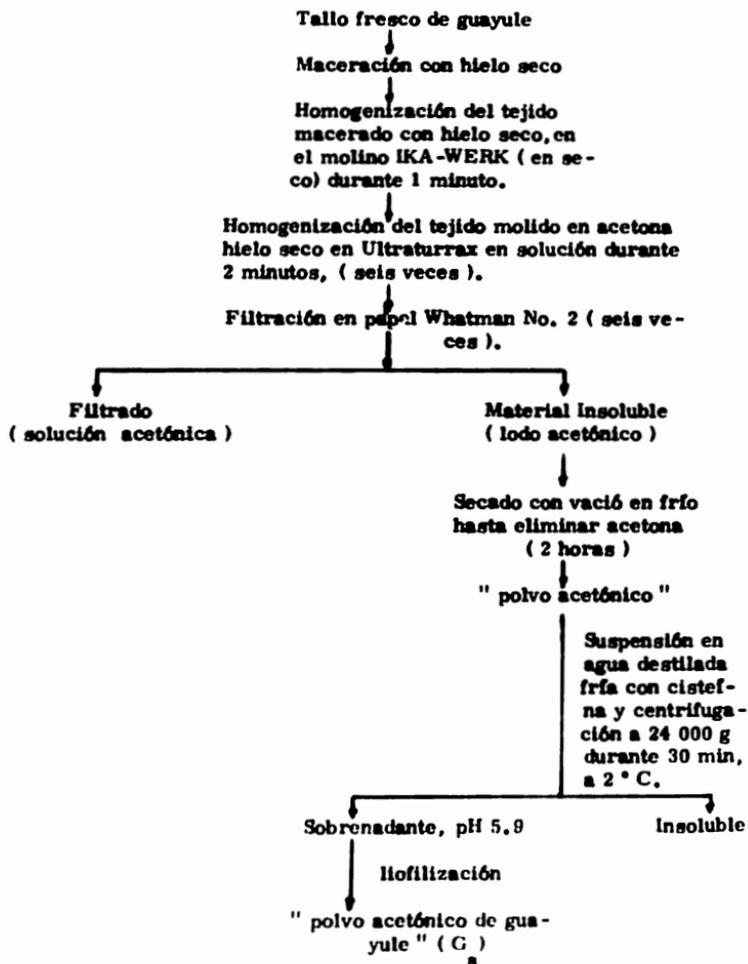
a un vaso de precipitados conteniendo 300 ml de acetona-hielo seco (-60 °C) en seguida se homogenizó en el Ultraturrax durante 2 min., se dejó reposar por 5 min, se filtró en papel Whatman No. 2 con vacío, el precipitado se volvió a extraer con acetona y hielo seco, homogenizando, dejando reposar y filtrando por seis ocasiones más hasta que se obtuvo un filtrado amarillo pálido. el " lodo acetónico " resultante se equilibró a aproximadamente -25°C y se colocó en la bola del rotavapor sumergida en un baño de hielo, después de 2 horas la acetona había sido eliminada, quedando el " polvo acetónico de guayule " seco, este se suspendió en 400 ml de agua destilada fría conteniendo 7 mg de cisteína y se centrifugó 30 min a 24 000 x g a una temperatura de 2 °C. El sobrenadante se liofilizó y denominó G₈ (polvo acetónico de guayule), el método descrito se ilustra en el diagrama No. 2.

Purificación por precipitación con sulfato de amonio.

Se realizó una purificación del " polvo acetónico de guayule " por medio de la precipitación con sulfato de amonio; un gramo aproximadamente de G₈ se disolvió en 20 ml de agua fría, manteniéndose la solución en un baño de hielo y con agitación constante se añadieron lentamente cristales de sulfato de amonio para lograr su disolución y hasta alcanzar una saturación final de la solución de 90 % (13.24 g), se centrifugó a 10 000 x g durante 30 minutos a 5 °C. El sobrenadante se desechó y el precipitado de proteínas se volvió a disolver en

Proceso seguido para la obtención de muestras proteicas por el Método "acetónico"

DIAGRAMA No. 2



agua destilada fría y se dializó durante 20 horas contra agua destilada manteniendo la temperatura a 4°C y se liofilizó. A esta muestra se le llamó "proteína de extracto acetónico" (G_{a-90}) .

Comparación de los métodos de obtención de muestras en electroenfoque.

Con el objeto de comparar los patrones proteínicos obtenidos por los distintos métodos y purificados por precipitación con sulfato de amonio, a las muestras G₈₀ y G_{a-90} se les sometió al experimento No. 5 de electroenfoque en un gradiente de pH de 4.0-5.0 bajo las condiciones descritas en la parte No. IIIa de métodos. En la tabla VI se anotaron los resultados obtenidos en este experimento.

En la placa del gel de poliacrilamida del experimento No. 5 y como se puede apreciar en la fotografía correspondiente no se detecta diferencia alguna entre los patrones proteínicos obtenidos de las distintas metodologías, lo cual nos hace suponer que los métodos empleados pueden ser considerarse satisfactorios y utilizarse indistintamente con el objeto de obtener patrones de proteínas.

Electroforesis-SDS.

Habiendo determinado la naturaleza ácida, si nó de todas, por lo menos de la mayoría de las proteínas obtenidas y encontrados sus puntos isoelectricos en distintos gradientes de pH, se creyó necesario (siendo este trabajo un estudio preliminar que marcará la

pauta para posteriores experimentos) conocer el rango de pesos moleculares en el cual se encuentra concentrado el grueso de las proteínas del guayule. Para tal efecto se preparó un gel de poliacrilamida-SDS de acuerdo a la técnica descrita en la nota de aplicación No. 306 de LKB.

La placa con el gel se colocó sobre la placa de enfriamiento la cual estaba conectada a un baño refrigerante para mantener la temperatura a 5°C durante el experimento.

Las muestras aplicadas fueron las obtenidas por los distintos metodos y de los cuales se creyó conveniente hacer una comparación para conocer sus diferencias, previamente las muestras habian sido disueltas en la solución amortiguadora de muestra (conteniendo SDS y 2-mercaptoetanol) en las concentraciones anotadas en la tabla VIII y estas fueron "activadas" durante 2 min a ebullición, una vez a temperatura ambiente, se les añadió a 250 ul de las muestras 10 ul de la solución de bromofenol azul y 10 ul de 2-mercaptoetanol, se agitarón bien y se aplicaron 10 ul de cada una de las muestras en los pozos de aplicación del gel de poliacrilamida-SDS, esta operación se realizó lo más rápido posible para evitar la difusión, sobretodo del bromofenol que fué el indicador frontal en la electroforesis; inmediatamente despues de aplicar las muestras se encendió la fuente poder y se ajustó la corriente a 20 mA durante los primeros 10 minutos con el objeto de concentrar las muestras.

Despues de concentrar se ajustó la corriente a

190 mA, manteniendo este flujo de corriente constante durante 5 horas, que es el tiempo que duró la electroforesis, bajo estas condiciones la velocidad de migración del bromofenol fué de 1.2 cm/h y la fuerza del campo de 6 volts/cm.

Despues de la electroforesis se midió la distancia de emigración del colorante en el punto medio de las bandas. Para evitar la pérdida de proteínas pequeñas solubles y minimizar la difusión prontamente se colocó el gel en la solución fijadora (tricloroacético-sulfosalicilico-metanol-agua) por una hora, luego se pasó a la solución teñidora donde permaneció 2 horas, enseguida se eliminó el exceso de colorante del gel cambiando varias veces la solución desteñidora (etanol-acético-agua) hasta que el último cambio de la solución desteñidora se mantuvo claro, luego se colocó en la solución preservadora (solución desteñidora + glicerol) durante una hora y se envolvió el gel en una hoja de papel celofán mojada con la misma solución y se dejó secar la placa a temperatura ambiente.

La determinación de los pesos moléculares se efectuó calculando la movilidad relativa.

$$\text{Movilidad Relativa} = \frac{\text{distancia de emigración prot. long. gel antes fijar}}{\text{dist. de emigración bromofenol long. gel despues de secar}} \times \frac{\text{long. gel despues de secar}}{\text{long. gel antes fijar}}$$

O sea que la movilidad relativa se calcula con res-

pecto al azul de bromofenol. La longitud del gel se mide en la dirección de los electrodos.

Movilidad relativa = R_f x factor de cambio de la placa del gel

Todas las distancias se tomaron en la mitad de las bandas. El factor de cambio del gel se debe al hinchamiento ó encogimiento de este durante el proceso de fijado y secado. Con estandares de proteínas y sus diferentes movilidades relativas se hizo el trazó del logaritmo en base 10 del peso molecular contra la movilidad relativa, obteniéndose una línea recta (se aplicó regresión lineal) de pendiente negativa, Fig. 5 , en la cual se aproximaron los pesos moleculares (no conocidos) de las muestras.

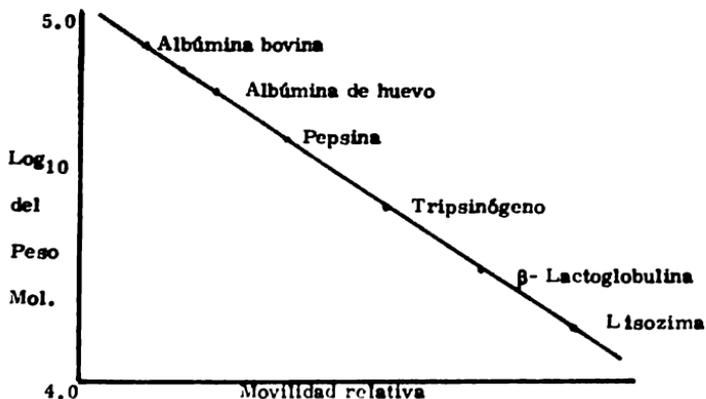


Fig. 5. Muestras de proteínas conocidas sometidas a electroforesis-SDS. Trazo usado en el cálculo de pesos moleculares.

Proteínas Usadas en Electroforesis en Gel de Poliacrilamida - SDS.

TABLA VII

Proteína	Peso Molecular	Log ₁₀ PM	Movilidad Relativa
Albumina bovina	66 000	4.8195	0.1879
Albumina de huevo	45 000	4.6532	0.3481
Pepsina	84 700	4.5403	0.4592
Tripsinógeno	24 000	4.3802	0.5671
β - Lactoglobulina	18 000	4.2648	0.7777
Lisozima	14 300	4.1515	0.8592

La movilidad relativa experimental determinada se lleva a la recta y se determina la otra coordenada (log. PM), en esta forma se calcularon los pesos moleculares. Los resultados de las muestras obtenidas de la electroforesis en gel de poliacrilamida -SDS al 10 % se encuentran tabulados en la Tabla VII.

Considerando la imposibilidad de determinar actividades enzimáticas por técnicas espectrofotométricas debido a la coloración café parda presente en las muestras obtenidas con absorbancia grande a 340-nm color que no fué posible eliminar por las diferentes técnicas

TABLA VI.

Muestra	Conc. (mg/ml)	Bandas	Movilidad relativa	Log ₁₀ PM	P.M.
G _{a-90}	44 mg/ml	1	0.9160	4.0936	12 404
		1 { ancha	0.8701	4.1383	13 750
			0.7928	4.2137	16 356
		1	0.7812	4.2250	16 788
		1	0.3787	4.6174	40 870
		1	0.2554	4.7368	54 315
		1	0.0821	4.0966	80 645
G ₈₀	47 mg/ml	1	0.8991	4.11	12 883
		1 { ancha	0.8743	4.8743	13 622
			0.7465	4.2588	18 148
		1	0.7005	4.3037	20 122
		1	0.3773	4.6188	41 675
		1	0.2556	4.7376	54 870
Parte ③	15 mg/ml	1	0.0813	4.9074	80 793
		1	0.9091	4.1003	12 598
		1 { ancha	0.7981	4.2085	16 164
			0.5962	4.4054	25 434
		1	0.3777	4.6184	41 538
		1	0.2550	4.7372	54 607
1	0.0880	4.9054	80 490		

Continuación TABLA VII

Muestra	Conc.	Bandas	Mobilidad	Log ₁₀ PM	P M
Parte ③	37 mg/ml	1	0.4091	4.1003	12 598
		1 { ancha	0.8654	4.1429	13 896
			0.7700	4.2359	17 214
		1	0.3777	4.6184	41 538
		1	0.2559	4.7372	54 697
		1	0.0830	4.9054	80 490

de purificación, ni con modificaciones en los métodos, se intentó demostrar la acción enzimática involucrada en la biosíntesis de hule empleando sustratos marcados con ^{14}C y se analizaron los productos de incubación por el método de centelleo líquido.

Se buscó la incorporación de mevalonato $2\text{-}^{14}\text{C}$, a hule. En un matraz Erlenmeyer de 15 ml se colocó la mezcla de reacción conteniendo MgCl_2 , ATP y EDTA, tal como se indicó en la parte IIa de métodos se añadió el suero de guayule (polvo acetónico = G_8) disuelto en la solución amortiguadora glicil-glicina, enseguida se agregó el mevalonato marcado y se incubó en un baño a 28°C durante 18 horas, después se añadieron 2 ml de hule en benceno (30.3 mg de hule de guayule) se calentó en baño de vapor durante 30 minutos, para detener cualquier actividad enzimática, se precipitó con metanol destilado caliente y el precipitado se lavó varias veces con metanol frío, se transfirió la mezcla cuantitativamente a un (Soxhlet) dedal de celulosa para extracción y se extrajo refluendo con metanol por tres horas se separó el dedal del aparato guardando la solución metanólica para analizarla por centelleo (ver diagrama No. 3); el dedal conteniendo el residuo insoluble se colocó en desecador y se seco a baja presión empleando una bomba para vació durante dos horas. Una vez seco el dedal se volvió a colocar en Soxhlet, se extrajo con benceno destilado a reflujo por ocho horas. El extracto bencénico se transfirió cuantitativamente a un frasco vial para centelleo se colocó en baño de vapor y pasando una corriente de N_2 se evaporó a sequedad, se añadieron 10 ml de líqui-

do de centelleo tolueno (conteniendo 5% de P.P.O.) y se analizó . Para comprobar que las cuentas obtenidas estaban incorporadas al hule, se volvió a precipitar con metanol, se filtró por celita y se disolvió de nuevo con benceno , se evaporó de la misma manera descrita anteriormente, se añadió el líquido de centelleo y se analizó en el contador. Los resultados se muestran en el diagrama No. 3 para una mejor ilustración.

Para conocer la cantidad de cuentas o desintegraciones recuperadas a lo largo del proceso se calculó a partir de la alícuota inicial tomada, el número de cuentas que había en el volúmen total de la incubación y tomando en cuenta la pérdida de 20 ul correspondientes al benceno (solvente del mevalonato) que se evaporó durante la incubación, resultando un volúmen total de 1160 ul al cual le corresponden 1 230 780 cpm.

Se hizo el balance de cuentas de los extractos obtenidos:

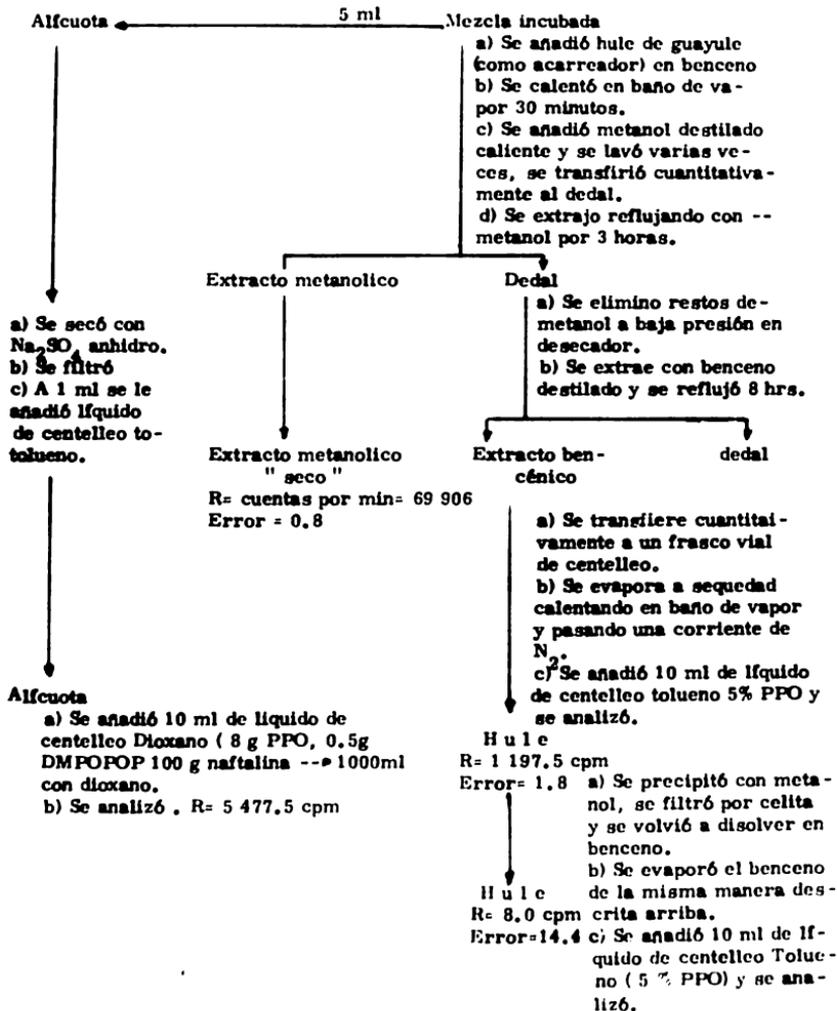
En 1 ml del extracto metanólico hubo 69 906,0 cpm de donde al volúmen total del extracto metanólico (50 ml) le corresponden ... 1 209 373,8 cpm
y en el extracto bencénico evaporado hubo 1 197,5 cpm

Total de cuentas recuperadas 1 210 571,3 cpm

Recuperándose un 98,40 % de las cuentas con las que se había iniciado la incubación. De los resultados de la incubación con polvo acetónico de guayule se observó que no hubo incorporación del precursor marcado a hule, se pensó que quizá hubiera algo en la muestra completa que

Extracción de hule de la muestra G_a incubada con 2-¹⁴C mevalonato

DIAGRAMA No. 3



podiera estar afectando a alguna de las enzimas involucradas en la biosíntesis del hule, por lo cual se repitió la incubación empleando muestras un poco más purificadas, como la G₈₀ y la G_{a-90} y haciendo algunas modificaciones en el proceso de extracción (ver diagrama No. 4).

Se pensó que tal vez sería necesario añadir mevalonato frío (no marcado) para que estuviera mejor distribuido el sustrato en la solución y fuese mayor la biosíntesis de polímero y que ayudaría, aquél, al mevalonato marcado a entrar en contacto con la enzima.

Se efectuaron dos incubaciones simultaneas con las muestras G₈₀ y G_{a-90} sometidas a las mismas condiciones, las mezclas de incubación contenían los siguientes reactivos, todos en soluciones acuosas:

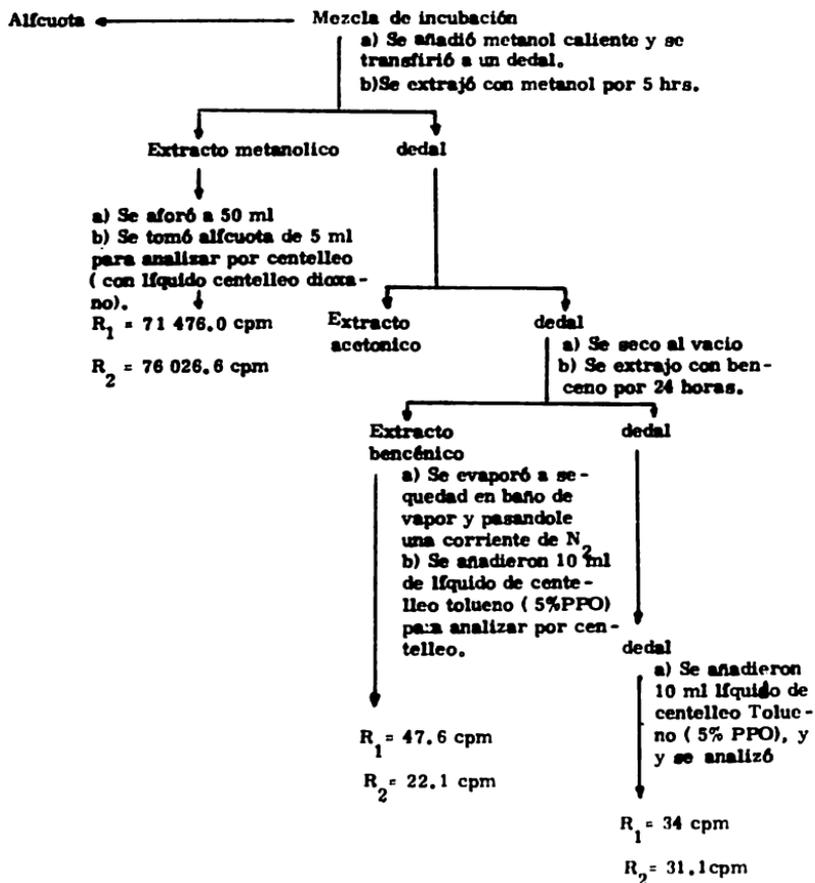
Reactivos.	Incubación.	
	1	2
mevalolactona (fría)	39.1 mg	22.3 mg
ATP	5.0 mg	5.0 mg
muestra G ₈₀	41.0 mg	-
muestra G _{a-90}	-	30.0 mg
EDTA 0.10 M	80 ul	80 ul
MgCl ₂ 0.10 M	80 ul	80 ul
solución amortiguadora Tris - maleico 0.10 M , pH= 6.5	1 000 ul	1 000 ul
mevalolactona 2- ¹⁴ C conteniendo 0.25uCi/ 5 ul	5 ul	5 ul
Volúmen Total	1 165 ul	1 165 ul

En un matraz Erlenmeyer de 5 ml se colocaron los reactivos en el orden en que aparecen anteriormente, una vez disuelta la muestra de guayule en la solución amortiguadora se añadió la mevalolactona marcada y se mezcló bien y se tomó una alícuota de 5 ul para conocer el número de cuentas con que se inició el experimento, en seguida se colocó la mezcla de incubación en un baño a 28 °C con agitación constante suave durante 18 horas.

Terminada la incubación se añadió metanol caliente, se transfirió cuantitativamente con metanol a un dedal de celulosa (Soxhlet) colocado en un aparato para reflujo y se extrajo con metanol (ver el diagrama No. 4) por 5 horas, el dedal se extrajo con benceno 24 horas. El extracto bencénico se transfirió a un vial de centelleo y se colocó en un baño de vapor, pasándole una corriente de nitrógeno se evaporó a sequedad, se añadieron 10 ml de líquido de centelleo tolueno (5 % PPO) y se analizó.

No se obtuvo incorporación del sustrato marcado pues el número tan bajo de cuentas en el extracto bencénico se debe al " conteo base " del sistema y del analizador de centelleo líquido. Se pensó que tal vez se hubiera perdido la actividad enzimática a través de los pasos de purificación ó por el efecto acausado por las fenoloxidasas por lo cual se creyó conveniente realizar la incubación directamente con tejido fresco y en ausencia de oxígeno para evitar cualquier oxidación. Ya que la conversión enzimática de monofenol a difenol requiere de oxígeno.

DIAGRAMA No. 4



A 10 g de tallo recién cortado de guayule se les sumergió en aire líquido por 30 minutos se maceraron en un mortero con hielo seco en seguida se pasó el tejido macerado al molino con hielo seco y se molió durante 5 minutos añadiendo hielo seco cada 30 segundos. Se tomaron 2 g de tejido de guayule y se colocaron en un tubo de Thunberg.

En el tubo vertical se añadieron los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidades
D.L. Mevalolactona (fría)	35 mg
ATP	10 mg
MgCl ₂ 0.1 M	100 ul
EDTA 0.1 M	100 ul
Solución amortiguadora tris-maléico 0.1 M pH=6.5	3 000 ul
Mevalolactona 2- ¹⁴ C en benceno conteniendo 1 uCi/20ml	20 ul

El tejido de guayule se sometió a vacío inmediatamente después de su obtención, se añadió la mezcla de incubación y se puso en contacto con el tejido iniciando la incubación, se colocó en un baño a 28°C por 20 horas, durante este periodo la mezcla de incubación se mantuvo a baja presión (vacío) eliminando el aire. Después de la incubación se procedió a la extracción y análisis de la misma forma que en la anterior incubación - obteniéndose los siguientes resultados.

En 5 ml de extracto metanolico	131 683,2 cpm
En el volúmen total del extracto metanolico	1 316 832 cpm
En el extracto acetónico (25 ml)	288,5 cpm
En el extracto bencénico (evaporado a sequedad)	68,8 cpm
Total de cuentas / minuto recuperadas	1 317 189,3 cpm

Tomando en cuenta que se añadieron 20 ul de mevalolactona 2-¹⁴C conteniendo 1 uCi en ese volúmen y ya que:

$$1 \text{ uCi} = 22,2 \times 10^5 \text{ cpm}$$

Se dividió el número de cpm recuperadas entre el número de cpm añadidas a la mezcla de incubación para obtener la eficiencia del aparato:

$$\frac{1 \ 317 \ 189,3 \text{ cpm}}{2 \ 220 \ 000,0 \text{ cpm}} = 0,5 \text{ ó sea un } 50\% \text{ de eficiencia}$$

Como se desprende de los resultados obtenidos del extracto bencénico (68,8 cpm) no hubo incorporación a hule del sustrato marcado, lo cual sugiere que alguna ó algunas de las enzimas involucradas en la biosíntesis de hule a partir de mevalonato se encuentran dañadas ó les hace falta algun cofactor para realizar su acción. Como se observa en la fig. 5 en el mecanismo de biosíntesis de hule existen todavía varias reacciones por efectuarse de mevalonato a hule, se penso que si se redujeran las posibilidades de fallas por deterioró en las enzimas ó por la falta de cofactores al mínimo usando un precursor más cercano al producto final (hule), tal vez sería posible la incorporación de este sustrato a hule, ya que el último intermedio en la biosíntesis del hule es el isopentenilpírofosfato, se en-

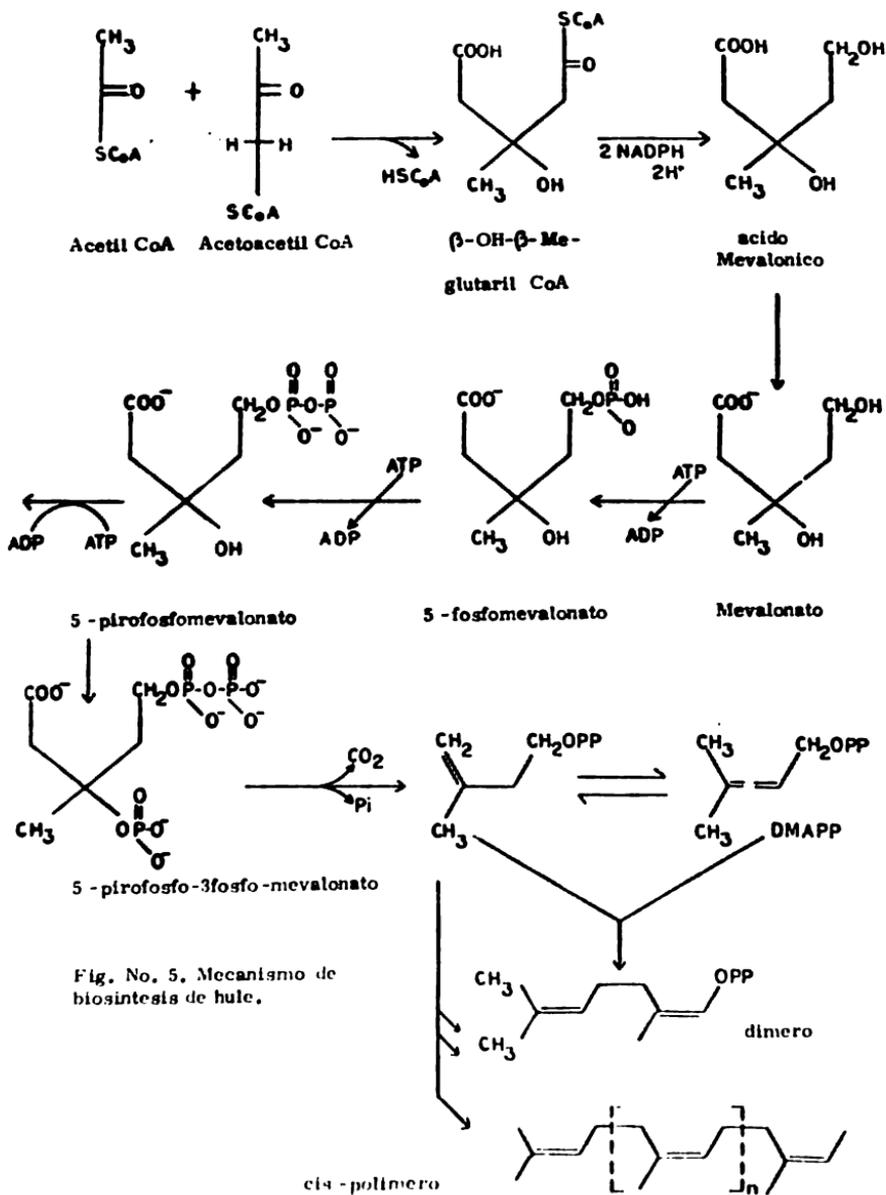


Fig. No. 5. Mecanismo de biosintesis de hule.

pleó este marcado con ^{14}C para poder comprobar su incorporación.

Se trabajo con dos muestras obtenidas por diferentes métodos, la primera llamada "polvo total de guayule" se obtuvo de la manera siguiente, a 10 g de tallo de guayule recién cortado se le sumergió en aire líquido, se maceraron en mortero de porcelana con aire líquido y el tejido macerado se molió con hielo seco durante 2 minutos se transfirió de nuevo al mortero y se pulverizo en aire líquido. Del polvo así obtenido se tomó 1 g para la incubación, la segunda muestra "polvo acetónico de guayule" se obtuvo por el método descrito anteriormente (ver diagrama No. 2).

En un matraz Erlenmeyer de 5 ml se colocó la mezcla de incubación conteniendo los siguientes reactivos:

Reactivo	Incubación	
	1	2
" polvo total de guayule"	-	1 000 mg
" polvo acetónico de guayule"	200 mg	-
solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH: 6.77	1 000 ul	3 000 ul
MgCl_2 0.10 M	100 ul	100 ul
isopentilpírofosfato 1- ^{14}C conteniendo 0.5 uCi/10 ul (sal de amonio en solución acuosa).	10 ul	10 ul

La mezcla de incubación se colocó en un baño a 28°C con agitación durante 22 horas. Después se añadió metanol caliente y se transfirió cuantitativamente a un dedal de celulosa y se extrajo refluendo con metanol por 5 horas, las siguientes extracciones se hicieron de la misma manera que en las incubaciones anteriores obteniéndose los siguientes resultados de los extractos bencénicos evaporados a sequedad y analizados en 10 ml de líquido de centelleo tolueno (5% PPO);

Incubación

1

Con polvo acetónico de guayule

$R_1 = 31.4$ cpm

2

Con polvo total de guayule

$R_2 = 43.8$ cpm

De estos resultados se comprueba que no hay incorporación de isopentilpirofosfato 1- ^{14}C a hule en las plantas de guayule que fueron traídas de las cercanías del CIQA de Saltillo, Coah.

TABLA I

Bandas	Consiste de las fracciones	Peso después de liofilizar (mg)	Proteínas determinadas por el método de Lowry.(7) (%)
I	23 - 30	24.5	1
II	31 - 60	77.5	3.1
*III	61 - 86	10.0	-

* Esta fracción es muy higroscópica, lo que dificultó su recuperación de la bola de liofilización.

TABLA II
Experimento No. 1
Electroenfoque intervalo de pH = 8.5 - 5.5

Muestra	Conc. (mg/ml)	Vol. de aplicación (ul)	Bandas electroenfocadas intervalos de pH				Total
			8,5-6,6	6,5-6,2	6,1-5,9	5,8-5,5	
Fracción A	5,65	45	-	4	4	6	14
Fracción B	4,78	45	-	-	4	4	8
Fracción C	15,87	15	-	-	4	3	7
Fracción G1	4,35	30	-	4	5	4	15
Fracción G	5,22	15	-	-	5	2	7

TABLA III
Experimento No 2
Electroenfoque intervalo de pH- 9,5-3,5

Muestra	Conc. (mg/ml)	Vol de aplicación (ul)	Bandas electroenfocadas intervalos de pH						Total	
			9,5-8,5	8,4-7,0	6,9-5,4	5,3-4,8	4,7-4,3	4,2-3,8		3,7-3,5
Parte ① disuelta en 10 ml	30	-	-	-	no detectadas	-	-	-	0	
Parte ② "	30	-	-	-	no detectadas	-	-	-	0	
Parte ③	7	30	-	-	-	-	5	3	8	
G ₈₀	15	30	-	-	1	6	3	7	5	20

TABLA IV
Experimento No. 3
Electroenfoque intervalo de pH = 6,5 - 4,0

Muestra	Conc. (mg/ml)	Vol. de aplicación (ul)	Proteínas. (%)	Bandas electroenfocadas intervalos de pH						Total
				6,5-5,6	5,5-5,2	5,1-4,9	4,8-4,6	4,5-4,3	4,2-4,0	
G ₈₀	17	30	4,11	-	2	3	7	6	5	23
Parte ③	16	30	4,38	-	2	2	7	6	5	22

TABLA V
Experimento No. 4
Electroenfoque intervalo de pH: 5.0-4.0

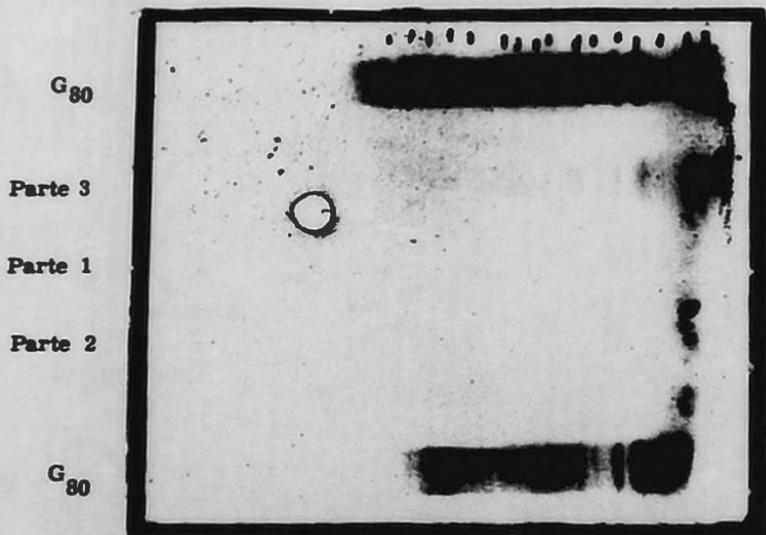
Muestra	Conc. (mg/ml)	Vol de apli- cación (ul)	Prote- inas. (%)	Bandas electroenfocadas intervalos de pH									Total
				5.0	4.9	4.8	4.7	4.5	4.4	4.25	4.1	4.0	
G ₈₀	17.8	45	4.11	2	-	3	1	4	4	5	4	2	25
Parte ③	16.0	45	4.38	2	-	3	1	4	4	5	3	1	23

TABLA VI
Experimento No. 5
Electroenfoque intervalo de pH = 5.0-4.0

Muestra	Conc. (mg/ml)	Vol. de aplica- ción(ul)	Prote- inas. (%)	Bandas el electroenfocadas intervalos de pH									Total
				5.0	4.9	4.8	4.7	4.55	4.4	4.25	4.1	4.0	
G ₈₀	18	45	4.11	1	2	1	4	4	4	2	3	2	23
G ₈₋₉₀	16	45	3.68	1	2	1	4	4	4	2	3	2	23

- Cátodo
pH= 9.5

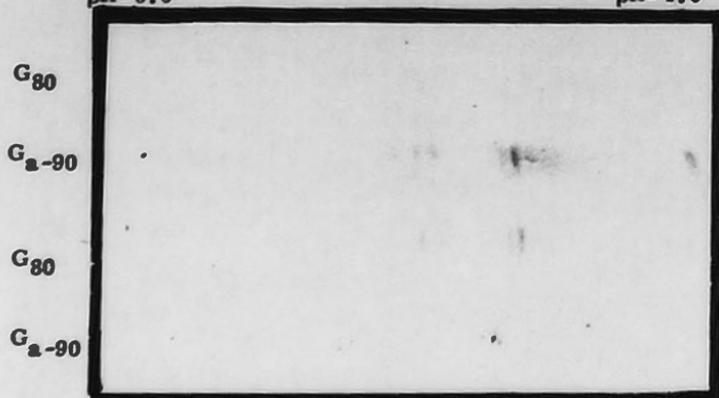
+ Anodo
pH= 3.5



Fotografía del experimento No. 2 de electroenfoque en un intervalo de pH de 9.5 - 3.5 .

- Cátodo
pH= 5.0

+ Anodo
pH= 4.0



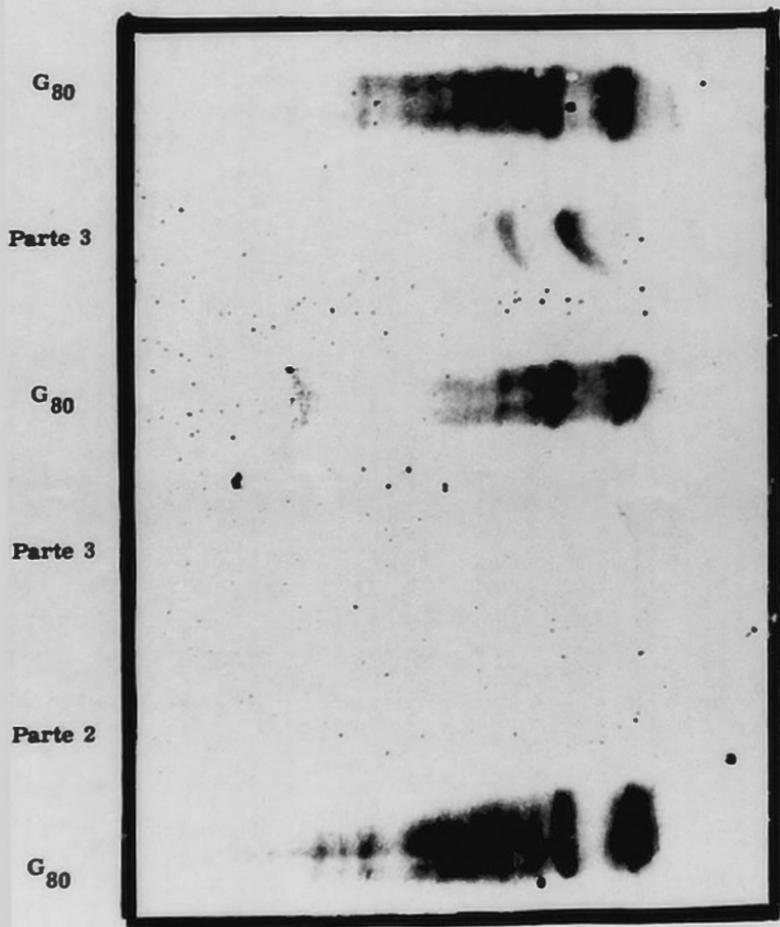
Fotografía del experimento No. 5 de electroenfoque en un intervalo de pH de 5.0 - 4.0 .

- Cátodo

+ Anodo

pH= 6.5

pH= 4.0



Fotografía del experimento No. 3 de electro-
énfoque en un intervalo de pH de 6.5 - 4.0.

CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos en los experimentos de electroenfoque se desprende la naturaleza acida de las protefmas solubles obtenidas por los diferentes métodos. Aún cuando los "sueros" ó extractos protefnicos fueron obtenidos por diferentes procedimientos y se efectuaron algunas variantes en ellos con el fin de preservar la actividad enzimática esta no pudo ser determinada, por lo tanto, difícilmente se podría definir cual de los métodos empleados de extracción fué el más conveniente.

Ya que no se observa gran diferencia en el número de bandas electroenfocadas de muestras similares y fracciones obtenidas de los diversos procesos de purificación seguidos, se puede decir que los métodos empleados en general, son buenos procedimientos para la obtención de patrones de protefmas solubles.

Es posible que las protefmas y con ello las enzimas, hayan sido dañadas por la acción de las fenolasas y oxidaciones provocadas inmediatamente despues de la desintegración celular, con el concomitante oscurecimiento de las fracciones protefmas, lo cual impide la determinación de la acción enzimática que involucra la reducción de piridin-nucleótidos que pueden ser determinadas espectrofotométricamente pero que enmascara la coloración presente en las fracciones protefmas.

Es necesario seguir trabajando con este complejo proteico colorido para poder determinar si el oscurecimiento se debe efectivamente a la acción de tirosinasas (fenolasas) y polifenoloxidasas.

Al tratar de determinar actividad enzimática por el método de análisis nuclear empleado, utilizando sustratos marcados, se tuvieron problemas, esto se puede deber a varios factores que hayan afectado ya sea individualmente ó en conjunto a las plantas a saber;

- Las plantas podrían ser de edad avanzada (ésta no está definida, por tratarse de plantas silvestres), por lo cual la actividad enzimática involucrada en la biosíntesis del hule puede ser mínima ó nula.

- Tal vez las plantas hayan sufrido algún trastorno por haberlas sacado de su hábitat y hayan sido afectadas por el exceso de humedad y gran precipitación pluvial de la Ciudad de México a la cual estuvieron sometidas ya que se encontraban a la intemperie, por la falta de un invernadero adecuado a las condiciones climáticas requeridas.

- Posiblemente la actividad enzimática se haya visto disminuida ó perdida debido a los métodos de extracción utilizados.

Queda bien claro la necesidad que existe de continuar con estos estudios que nos ayuden a resolver los problemas que se presentan

en el aislamiento y purificación de proteínas del guayule, que nos permitan conocer más acerca de esta planta para poder aprovechar al máximo su potencialidad biosintética.

BIBLIOGRAFIA:

- 1) Mc Ginnies, W.G., Guayule. Reencuentro en el Desierto; CONACYT, p. 15 (1978).
- 2) Velázquez, M.A., Martínez, O. y Aguirre, J., *ibid*, p. 27.
- 3) Academia Nacional de Ciencias. Guayule: Una fuente alternativa de hule natural. Washington , D.C. (1977).
- 4) Serier, J.B., Le Guayule. Institut de Recherches sur le Cautchouc. *mal # 27* (1979).
- 5) Campos-López, E., The rubber shrub. *Chemtech*. jan , 50-57 (1979).
- 6) Interest in guayule rubber intensifies; *C & EN*, may 23:22 (1977).
- 7) Arreguín, B. y Taboada, J., *Bol. Inst. Quím. UNAM*; 20 : 95-97(1968).
- 8) Lowry, O.H., et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent, *J. Biol. Chem.* , 193 : 256 (1951).
- 9) LKB-Produkter. *Instruction Manual*. LKB Ultragel., dec.(1976).

- 10) Pharmacia Fine Chemicals. Blue Dextran 2 000., jan . (1972)
- 11) Pharmacia Fine Chemicals. Sephadex. Gel Filtration in theory and practice. jan. (1977).
- 12) LKB-Produktør. Instruction LKB Ampholine PAGplates for analytical electrofocusing on polyacrylamide gels. No. 1804.
- 13) Webber, K Pringle, J. and Osborn, M., Methods in Enzymology; Academic Press. N.Y. -London, 26 : 3-27 (1972).
- 14) Fehrstrom, H. and Moberg, U.: SDS and Conventional Polyacrylamide Gel Electrophoresis with LKB 2117 Multiphor. LKB Application Note 306. april (1977).
- 15) Ameluxen , R.E., Methods in Enzymology; Vol. XLI, p. 268.
- 16) Clements, R.L., Fruit Proteins: Extraction and Electrophoresis Analytical Biochemistry; 13; 390 - 401 (1965).
- 17) Arreguín, B., Contribution of other metabolic routes in rubber biosynthesis (en revisión) Trabajo presentado en el simposio internacional: Hule natural hacia el año 2 000, Saltillo, Coah. julio (1980).

APENDICES

A) ULTRACENTRIFUGACION .

B) LIOFILIZACION.

C) CROMATOGRAFIA DE PERMEACION .

D) TECNICAS ELECTROFORETICAS.

1) Electroforesis y Electroforesis - SDS.

2) Electroenfoque.

E) TECNICAS RADIOACTIVAS.

A) ULTRACENTRIFUGACION

Si se agita una mezcla de arena y agua hasta formar una suspensión uniforme y luego se coloca sobre una mesa, la arena comenzará a sedimentarse. Esta es una sedimentación bajo una aceleración de $1 \times g$.

En forma idéntica, moléculas de proteínas en solución experimentaran la misma aceleración en condiciones similares. Sin embargo no se observará una sedimentación apreciable, hay dos razones para esto.

La primera es que el peso efectivo (peso de la partícula menos el peso del líquido desplazado) de las moléculas de proteína es mucho menor que el de los granos de arena, consecuentemente su velocidad de sedimentación es mucho menor.

La segunda razón puede ser encontrada en el fenómeno del movimiento Browniano (de partículas visibles). Este movimiento fortuito es de origen térmico y puede resultar de colisiones de moléculas de solvente térmicamente activadas con las partículas mayores de soluto. Debido a que el movimiento impartido a las partículas de soluto es al azar, se produce una suspensión uniforme de estas partículas, aún cuando el peso molecular de ellas sea del orden de varios millones. Este movimiento térmico es, por supuesto, la base del fenómeno de difusión. Para moléculas proteicas, que tengan un peso molecular entre $10^4 - 10^6$. El movimiento térmico adquirido a temperaturas cercanas a $300^\circ K$ es del todo suficiente para mantener una suspensión

uniforme a $1 \times g$. Con el fin de producir una sedimentación apreciable de proteínas , se necesitan fuerzas gravitacionales más grandes para vencer el movimiento térmico , δ , en otras palabras , para incrementar la velocidad de sedimentación arriba de la velocidad de difusión .

Para partículas del tamaño de las proteínas , se necesitan aceleraciones del orden de $10^5 - 10^6 \times g$ y el instrumento que es capaz de lograrla es la **ULTRACENTRIFUGA** .

Teoría

Las técnicas de separación por centrifugación están basadas en el comportamiento de partículas cuando se les aplica un campo - centrífugo . El rotor es un aditamento generalmente separable de la ultra - centrífuga dentro del cual se coloca la solución a centrifugar ya sea en tubos ó directamente .

Las partículas (soluto) están normalmente suspendidas en un medio líquido contenido en un tubo que va colocado en un rotor . El rotor se acopla al eje central de la centrífuga .

Partículas que difieren en densidad , tamaño ó forma sedimentan a diferentes velocidades por acción de la fuerza centrífuga , siendo dirigidas radialmente hacia afuera . Este movimiento es determinado por la velocidad angular del rotor (w , en radianes por segundo) y la distancia radial (r , en cm) de la partícula al eje de rotación , de acuerdo a la ecuación;

$$G = w^2 \cdot r$$

Ya que una revolución del rotor es igual a $2\pi r$ adianes, la velocidad angular w del rotor, en revoluciones por minuto (rev / min) puede expresarse así :

$$w = \frac{2 \pi \text{ rev. min}^{-1}}{60}$$

y el campo centrífugo como:

$$G = \frac{4 \pi^2 (\text{rev/min})^2 r}{3600}$$

El campo centrífugo generalmente se expresa como el Campo Centrífugo Relativo (RCF), en múltiplos de g , la constante gravitacional (980 cm/seg) de donde:

$$\text{RFC} = \frac{4\pi^2 (\text{rev/min})^2 r}{3600 \times 980}$$

La cual se puede simplificar para dar:

$$\text{RFC} = 1.11 \times 10^{-5} (\text{rev/min})^2 r$$

La velocidad de sedimentación de una partícula esférica depende no sólo del campo centrífugo aplicado, sino también del radio de la partícula y de la viscosidad del medio en el cual se encuentra suspendida. El tiempo que tarda es inversamente proporcional a la velocidad de sedimentación y esta dado por:

$$t = \frac{q}{z} \frac{\eta}{w^2 r_p^2 (\rho_p - \rho)} \frac{\ln \frac{r_b}{r_c}}{\gamma_c}$$

t = tiempo de sedimentación en segundos

η = viscosidad del medio soporte o suspendiente

r_p = radio de la partícula

ρ_p = densidad de la partícula

r_c = distancia radial del centro de rotación al menisco del líquido

r_b = distancia radial del centro de rotación al fondo del tubo

ρ = densidad del medio

De la ecuación anterior se puede ver que a una velocidad dada del rotor, el tiempo requerido para sedimentar una población homogénea de partículas esféricas es inversamente proporcional al cuadrado de su radio y a la diferencia entre su densidad y la del medio que lo suspende y directamente proporcional a la viscosidad del medio.

Esta claro pues, que una mezcla heterogénea, de partículas aproximadamente esféricas, puede ser separada por centrifugación en base a sus densidades y/o a su tamaño, dejándolas el tiempo requerido para su completa sedimentación en un campo centrífugo fijado o midiendo su grado de sedimentación después de cierto tiempo. Es evidente la importancia que tienen la densidad y viscosidad del medio; para lograr la separación. Esta ha sido la base para la separación de organelos celulares de homogenados de tejido.

Preparación de Gradientes

El medio preferido para la preparación de gradientes de densidad es una solución de sacarosa, la cual puede estar amortiguada o no. Las proporciones de algunas soluciones de sacarosa más comúnmente empleadas están dadas en la Tabla I.

Tabla I

PROPIEDADES DE SOLUCIONES DE SACAROSA

CONC.		DENSIDAD		VISCOSIDAD (CPS)	
p/p	p/v	0°C	20°C	0°C	20°C
2.49	2.5	1.010	1.008	1.90	1.06
4.92	5.0	1.020	1.017	2.04	1.13
12.01	12.6	1.050	1.047	2.64	1.43
23.15	25.4	1.100	1.095	4.45	2.24
43.11	51.5	1.200	1.193	19.80	7.94
60.74	78.6	1.300	1.291	275.00	66.1
68.68	92.5	1.350	1.340	2440.00	357.0

Los gradientes, por lo tanto pueden ser escogidos de acuerdo a las necesidades del proceso de aislamiento.

El Ficoll por ejemplo (un copolímero de sacarosa y epíclorhidrina, de peso molecular 400,000 daltons, Pharmacia Fine Chemicals), puede substituir a la sacarosa cuando se requieran gradientes de alta densidad y baja presión osmótica, Ficoll tiene la ventaja de que no penetra las membra-

nas celulares. Se utilizan sales de metales pesados como cesio y rubidio para formar gradientes de alta densidad.

Las técnicas más comunmente usadas para la formación de gradientes son dos:

a) Gradiente de Densidad Discontinua. - Soluciones de densidad decreciente se estratifican cuidadosamente por medio de una pipeta en capas superpuestas en tubos de centrifuga. El tubo se centrifuga bajo las condiciones experimentales apropiadas. Si la serie de gradientes discontinua se deja reposar, lentamente se va formando un gradiente linear continuo.

b) Técnica de Gradiente de Densidad Continua. - El método más común para producir un gradiente de densidad continuo es utilizando el aparato especial conocido como formador de gradiente.

Este aparato consiste de dos cámaras cilíndricas horadadas con precisión de idéntico diámetro. Las cámaras están interconectadas en su base por un tubo conteniendo una válvula de control que permite que se regule el mezclado del contenido de las dos cámaras. Se llena una cámara (la cámara mezcladora) con la solución más densa, provista de un agitador y una salida hacia los tubos de centrifuga. La segunda cámara contiene la solución menos densa, se ajustan las alturas de las soluciones de las dos cámaras inicialmente por lo cual sus presiones hidrostáticas son iguales. Se pone a funcionar el agitador y al abrir la válvula el líquido denso corre hacia el tubo

de centrífuga y se reemplaza inmediatamente en la cámara mezcladora por una cantidad equivalente de la solución menos densa vía la válvula de control. La solución en la cámara mezcladora se mantiene homogénea -- por medio de una agitación constante. Cuando se han llenado los tubos de centrífuga, la densidad de la solución en los tubos decrece linealmente. Pueden producirse gradientes no lineales haciendo las dos cámaras de diferente diámetro.

Transferencia de los Gradientes. - Después de centrifugar y ya que la separación de partículas se ha efectuado, es necesario transferir la solución de los tubos cuidadosamente a fin de separar las bandas del material centrifugado. La transferencia de los gradientes de los tubos de centrífuga se puede hacer de muchas maneras.

Un método común es el de desplazamiento. Se pasa una solución más densa(perforando la base del tubo) y esto va empujando hacia arriba las bandas formadas en la centrifugación las cuales se colectan -- por medio de una pipeta.

Otro es colectando fracciones. El tubo de centrífuga es perforado en la base si los tubos están hechos de celuloide o nitrato de -- celulosa , colocando un tubo fino a través del cual las gotas de la solución -- gradiente pasaran y podran ser colectadas y después analizadas usando un colector de fracciones.

B) LIOFILIZACION

Es el proceso de "secado" por medio del cual es posible preparar materiales originalmente húmedos o soluciones acuosas (generalmente de origen biológico) este proceso de secado consiste en el precongelamiento del material o solución; una vez solidificado el material ocurre la sublimación (2), que es el cambio del estado sólido al gaseoso sin pasar por el estado líquido.

La principal diferencia entre el secado de materiales congelados y el de materiales "húmedos" o en solución , es la ausencia (o presencia) de una fase móvil líquida durante el proceso.

En el secado en fase sólida o liofilización, el transporte líquido no tiene lugar y el resultado es normalmente un producto poroso y homogéneo.

Al congelar una solución acuosa , la mayor parte del agua cristaliza obteniéndose cristales de hielo de agua pura, dejando un líquido concentrado entre los cristales, posteriormente la solución concentrada congelara como una matriz en forma de cristales de hielo interespaciados. De hecho, una muy fina separación de moléculas de agua y de soluto tiene lugar durante la operación de congelación . Posteriormente en el proceso de sublimación, el agua cristalizada se evapora (2) ya que esto no sucede simultáneamente en todas las partes del material , ésta escapa como vapor directamente

a los alrededores dejando una malla de poros dentro del producto, así la fracción más pequeña de agua contenida en la matriz del producto, entre los poros, se difundirá hacia el poro más cercano para escapar en forma de vapor. Lo sobresaliente del proceso de liofilización es la asombrosa -- cualidad de retención de aromas; sin embargo hay cierta pérdida de aroma en el período inicial; pero al final del proceso los componentes del aroma parecen quedar resguardados en la matriz del material; el agua "pura" de los cristales de hielo puede escapar sin arrastrar los componentes volátiles. La fracción de agua y los componentes volátiles en la matriz pueden escapar por difusión a través de la matriz del material, al sistema poroso, y es -- aquí donde los componentes aromáticos son retenidos. En la práctica el -- proceso de liofilización está definido normalmente a través de tres pará-
② metros: velocidad de congelamiento (congelación), vacío de liofilización y temperatura de desorción (disipación).

La velocidad de congelamiento puede variar dentro de un rango amplio de acuerdo a las dimensiones del material en cuestión, la -- influencia de este parámetro puede ser muy importante en la forma de la configuración de los cristales de hielo así como en la estructura final del producto ó material liofilizado.

La rapidez de congelamiento ha sido sinónimo de gran calidad, obteniéndose mejores resultados empleando altas velocidades de congelamiento.

Sin embargo, el congelamiento lento puede dar una es-

estructura más abierta al producto terminado, que puede ser más favorable para su reconstitución. Altas velocidades de congelamiento pueden producir una disminución de color en el producto liofilizado. El vacío de la cámara liofilizadora es el principal factor de control para la temperatura de secado en el proceso de liofilización. El vacío debe permanecer tan alto como sea posible durante el proceso para evitar que se alcance la temperatura de fusión del producto.

El aparato liofilizador consiste esencialmente de una cámara de vacío, una trampa de agua y una bomba mecánica de vacío. El vapor de agua desprendido durante el proceso es atrapado antes de llegar a la bomba de vacío, por agentes desecantes (agentes secadores) o condensadores refrigerados.

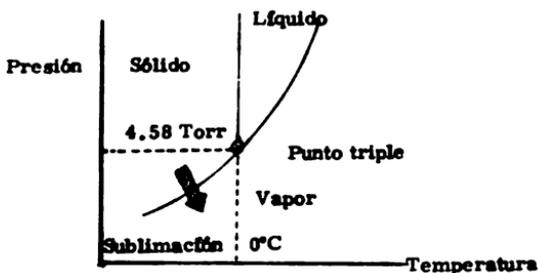
El vacío crea las condiciones necesarias (favorables) para que se efectúe la sublimación, y ésta sólo se lleva a cabo si se le suministra calor al material congelado. La temperatura ambiente es usualmente suficiente para lograr la liofilización. La generación de vapor de agua del producto congelado provoca el descenso de la temperatura hasta el punto donde el calor perdido (o disipado), debido a la sublimación, se equilibra con el calor ganado de los alrededores o con el calor aplicado.

Para un secado más eficiente es esencial que la temperatura del producto permanezca tan alta como sea posible pero sin fundir. La reconstitución del producto puede lograrse añadiendo la cantidad de agua que se estime necesaria y de acuerdo a los propósitos deseados.

Teoría

La liofilización es una operación en la cual el agua es transferida del estado sólido (hielo) al estado gaseoso (vapor de agua):

Fig. 1



En el diagrama anterior observamos que esta separación (sublimación) puede efectuarse cuando la presión de vapor y la temperatura de la superficie de hielo al que tiene lugar la sublimación están por abajo del punto triple (4.5 torr. y una temperatura cercana a 0°C. En la fig. 2 se observa la relación entre el vapor de agua del hielo y su temperatura debajo del punto triple.

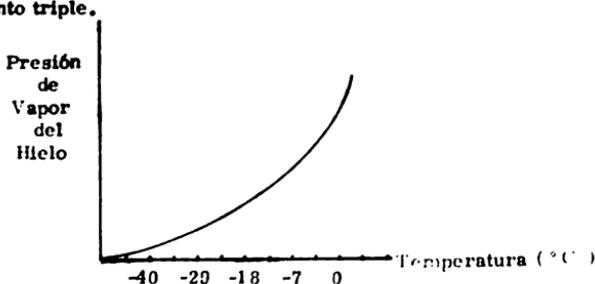


Fig. 2 Presión de vapor del hielo debajo del punto triple.

Teóricamente en la figura se representa la presión de vapor de los alimentos o material a liofilizar en función de la temperatura, si existe una fase de hielo.

La liofilización (sublimación) difiere de otros métodos de deshidratación en que está ausente una fase líquida.

Consideraciones Básicas sobre la Transferencia de calor y masa.

Un bloque de hielo puede sublimarse transfiriendo calor por conducción a través del hielo, o por radiación:

Durante la sublimación, el contenido de H_2O de un material se reduce de un valor inicial m_0 (en la capa congelada) a un valor final m_f (capa seca) la cual es determinada por el equilibrio con la presión parcial del agua (p_g) en el espacio que rodea a la capa seca. Es posible que exista una región de transición (o gradientes) en donde no haya hielo visible pero con más humedad que la porción ya seca (m_f). Esta capa de transición parece ser muy delgada.

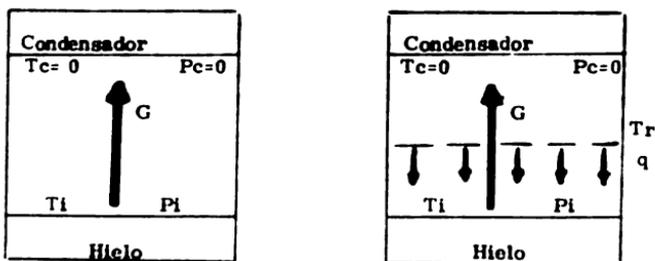


Fig. 3 . Representación esquemática del proceso de sublimación de un trozo de hielo. a) Se desprecia la transferencia de calor b) Transferencia de calor por radiación a la superficie.

Un trozo de hielo mantenido a temperatura constante T_i con una presión de vapor correspondiente p_i conectado a una trampa y un condensador, con una temperatura T_c tan baja que la presión de vapor correspondiente es despreciable (p_c). Si suponemos que el espacio entre el hielo y el condensador no ofrece resistencia. Bajo estas condiciones ideales y un tanto irreales, la sublimación alcanza su rapidez (tasa) máxima G_{max} . Y sigue la ecuación 1 :

$$G_{max} = \frac{K_1 A p_i}{\sqrt{T_i}}$$

G_{max} = tasa máxima de evaporación (lb h⁻¹)

A = área de sublimación (ft²)

T_i = temperatura absoluta del hielo (°R)

p_i = presión de vapor del hielo (Torr)

K_1 = constante que depende de PM de la sustancia bajo sublimación.

Para el caso del hielo G_{max} queda dada por la ecuación (2).

$$G_{max} = \frac{2\ 447\ A\ p_i}{\sqrt{T_i}}$$

En el caso ideal de arriba no hemos tomado en cuenta el calor latente de sublimación.

Ejemplo numérico. Si consideramos un bloque de hielo a 15°F y un p_i de 2 Torr y un área 1 ft² entonces

$$G_{\max} = \frac{(2.447)(1)(2)}{\sqrt{470}} = 222 \text{ lb h}^{-1}$$

Esta tasa de sublimación requiere un suministro de calor latente igual a

$$(222 \text{ lb h}^{-1}) \times (1200 \text{ BTU lb}^{-1}) = 266, 000 \text{ BTU h}^{-1}$$

En realidad la liofilización es un proceso de transferencias y resistencias de calor y masa y ambas tienen que considerarse en un análisis de esta operación. Fig. 4.

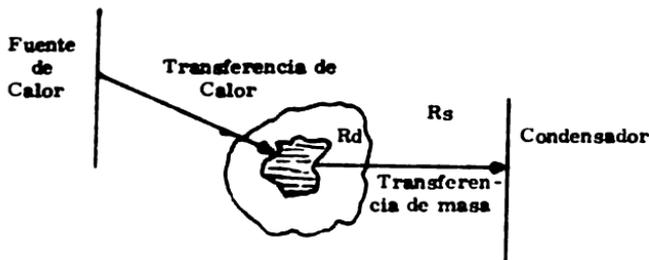


Fig. 4. Representación esquemática de la transferencia de calor y masa en liofilización.

y la tasa de sublimación es

$$G = \frac{A (p_i - p_c)}{R_d + R_s + K_i^{-1}} \dots\dots\dots (3)$$

G = tasa de sublimación

R_d = resistencia de la capa seca (alimentos etc.)

R_s = resistencia del espacio entre el alimento y el condensador

K_1 = constante definida en la ecuación 1

Al mismo tiempo hay que suministrar el calor de sublimación H_s , y

$$G = \frac{q}{\Delta H_s} \dots\dots\dots (4)$$

en donde q es el flujo de calor en (BTU h⁻¹).

Si el calor de sublimación es suministrado por radiación, todavía la demanda de calor es grande (no obstante la buena conductividad térmica del hielo), ya que el gradiente de temperatura disponible es bajo ($T_w - T_i$) y por lo tanto sólo una capa delgada de hielo puede ser liofilizada con eficiencia.

En el proceso de liofilización hay que efectuar las tres operaciones siguientes:

a) congelar el material disuelto por medio de bajas -- temperaturas,

b) Secar por sublimación directa del disolvente congelado (H_2O) generalmente bajo presión reducida.

c) Almacenar en el estado seco bajo condiciones controladas (ausencia de O_2 y de presión de vapor), en contenedores

opacos herméticos, a veces llenos con un gas inerte.

La mayoría de los productos pueden conservarse en esta forma por tiempo ilimitado y pueden reconstituirse a su estado original.

C) CROMATOGRAFIA DE PERMEACION

Es la separación de moléculas en base a su tamaño y forma molecular utiliza las propiedades de "tamizar" que presenta una gran variedad de materiales porosos. Probablemente los más comúnmente usados de tales materiales son los del grupo Compuestos Orgánicos Poliméricos, los cuales poseen una matriz tridimensional de poros que les confieren propiedades de gel. Un gran número de materiales se encuentran disponibles para este propósito y su composición y porosidad son cuidadosamente controlados, por lo cual moléculas de un rango limitado de tamaño pueden ser resueltas seleccionando el gel apropiado. El término -filtración en gel es utilizado para describir la separación de moléculas de diferente tamaño molecular utilizando estos materiales. Recientemente se han empleado esferitas de vidrio poroso como tamices o cribas moleculares y se ha introducido el término de cromatografía controlada sobre vidrio poroso para describir esta técnica de separación.

El término cromatografía de permeación describe todos los procesos de separación de moléculas usando tamices moleculares.

El principio general de la Cromatografía de Permeación es bastante simple, una columna de partículas de gel o gránulos de vidrio poroso están en equilibrio con un solvente conveniente para las moléculas que van a ser separadas. Las moléculas grandes a separar son total-

mente excluidas de los poros, pasaran sólo a través de los espacios intersticiales, otras más pequeñas serán distribuidas entre el solvente del interior y del exterior del tamiz molecular y pasarán a través de la columna a baja velocidad. Los pasos seguidos en este proceso están representados en la fotografía que ilustra este principio.

Teoría

El solvente absorbido por un gel hinchado está disponible para el soluto en un grado tal que depende de la porosidad de las partículas del gel y del tamaño de las moléculas de soluto. Así, la distribución de un soluto en una columna de gel dilatado está determinada exclusivamente por el volumen total del disolvente, es decir el que se encuentra dentro y fuera de las partículas del gel.

Para un tipo de gel dado, la distribución de un soluto particular entre el solvente interior y el exterior es definido como K_d (coeficiente de distribución) que está en función del tamaño molecular del soluto.

Si el soluto es grande y es completamente excluido del solvente interior del gel, $K_d=0$, mientras que si el soluto es lo suficientemente pequeño para ganar una completa accesibilidad del solvente interno, $K_d = 1$.

Debido a la variación en el tamaño de los poros de un gel dado, hay cierto solvente interno que será aprovechado y algo que no es disponible para solutos de tamaño intermedio, entonces el K_d

varia entre 0 y 1. Es esta completa variación del K_d entre estos dos límites lo que hace posible la separación de solutos con rangos de tamaño molecular pequeño al pasar por un gel dado.

El volumen de elución V_e , de un soluto depende del volumen externo de las partículas del gel V_o (también llamado volumen muerto), de su coeficiente de distribución, y del volumen interno de la matriz del gel mismo V_i :

$$V_e = V_o + K_d \cdot V_i \quad \dots\dots\dots(1)$$

El volumen interior V_i , puede ser calculado, conociendo el peso seco del gel "a", y la cantidad de agua absorbida W_r , de donde :

$$V_i = a \cdot W_r \quad \dots\dots\dots(2)$$

El valor numérico de V_e para un soluto dado varía con el tamaño de la columna, mientras que K_d es un valor característico para el soluto y es independiente de la geometría de la cama del gel.

Para dos sustancias de diferente peso molecular y de valores K_d' y K_d'' la diferencia en sus volúmenes de elución V_s , está dado por :

$$V_s = V_e' - V_e'' = (V_o + K_d' V_i) - (V_o + K_d'' V_i)$$

$$V_s = (K_d' - K_d'') V_i$$

De esta manera, para lograr una completa separación de dos sustancias, el volumen en que se aplique la muestra no debe ser mayor a V_s . En la práctica, se observan desviaciones del com-

portamiento ideal debido a un empaquetamiento defectuoso de la columna, por lo que resulta aconsejable reducir el volumen de aplicación de muestra abajo del valor de V_s , dado que la razón del volumen de muestra y del volumen interior del gel afecta tanto a la buena separación y al grado de dilución de la muestra. Las ecuaciones (1) y (2) pueden ser utilizadas para calcular el volumen óptimo de cama para una purificación dada.

El método de cromatografía de permeación ó filtración en gel, recibe algunas veces el nombre de "tamiz molecular", pero esto puede dar una impresión errática, ya que cuando partículas de diferente tamaño se tamizan a través de un cedazo o malla, las moléculas pequeñas emergen o pasan el tamiz primero, mientras que las grandes son retenidas, opuestamente a lo encontrado en la filtración en gel.

La fase estacionaria (empacada en una columna) consiste de camas de partículas generalmente esféricas que contienen numerosos poros que se llenan de la fase móvil. Cuando la muestra problema que se desea separar, es aplicada a la parte superior de la columna, las moléculas grandes, incapaces de penetrar en los poros de las partículas que forman la cama, son eluidas primero por la fase móvil. Las moléculas pequeñas que tienen acceso a los poros son eluidas después de las moléculas más grandes y en orden decreciente de tamaño. Para proteínas globulares el volumen de elución depende directamente del peso molecular.



Como se observa en la fig. 5 (cromatograma) las moléculas grandes son eluidas en el volumen intersticial V_z (comunemente llamado volumen V_o), las pequeñas que penetran completamente la cama, eluyen en un volumen correspondiente al volumen intersticial más el volumen interno de las partículas porosas; $V_o + V_p$, en donde V_p es el volumen contenido en los poros. Si el volumen del esqueleto ó matriz es designado V_m , el volumen total de la columna será:

$$V_t = V_o + V_p + V_m$$

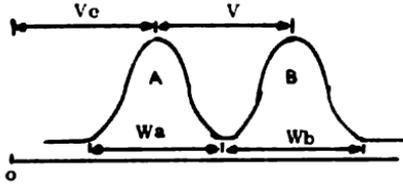
Las moléculas de tamaño intermedio eluyen entre el volumen intersticial V_o y el volumen $V_o + V_p$, este valor recibe el nombre de volumen de elución V_e . Se puede expresar un factor de distribución K_d para la porción de volumen de poro disponible para una molécula como sigue:

$$K_d = (V_e - V_o) / V_p$$

Cuando se grafican los K_d contra los logaritmos de los pesos moleculares, se obtiene una curva de calibración, que nos muestra el rango de fraccionamiento para compuestos homólogos, tales como proteínas globulares.

Eficiencia de la separación. - La separación ó resolución (R) de un sistema de dos componentes depende de a) la selectividad y b) del efecto de ensanchamiento de la banda :

$$R = \frac{\Delta V}{(W_A + W_B) / 2}$$



a) La selectividad. - En una verdadera filtración en gel depende enteramente del carácter de la fase estacionaria, como tamaño de poro, su distribución y el volumen total de los poros.

b) El efecto de ensanchamiento de la banda. - Este es causado por la fase estacionaria, por la forma en que ha sido empacada la columna, así como por las condiciones escogidas para la separación. Estos efectos se expresan en términos del número teórico de platos (N) ó de la altura equivalente para un plato teórico (H ó HETP) :

$$N \sim 16 \left[\frac{V_c}{W} \right]^2$$

$$H = \frac{\text{longitud de la columna}}{N}$$

De donde para obtener :

- Buena selectividad -----► ΔV
- Menor ensanchamiento de bandas -----► valores pequeños de W ---
- alta resolución para valores grandes de N (ó valores pequeños de H).

Influencia de la porosidad de la columna. - En la filtración en gel, la separación esta basada en la exclusión completa ó parcial de ciertos componentes de una muestra en su tránsito hacia el líquido atrapado en los po-

res de la fase estacionaria. Para llevar a cabo la separación, el tamaño del poro debe corresponder al tamaño físico de las moléculas de la muestra. Además, el tamaño del poro determina la medida de las moléculas más grandes que pueden ser separadas por un gel (límite de exclusión).

Como se mencionó anteriormente, la selectividad de una verdadera filtración en gel esta restringida sólo por las propiedades de la fase estacionaria. El tamaño del poro determina el rango de fraccionamiento, mientras que el volumen del poro (V_p) define la distancia entre el primer componente (excluido) y el último (totalmente incluido).

A fin de reforzar la estructura del gel, muchos fabricantes incrementan el volumen de la fase estacionaria, esto causa una inevitable pérdida de eficiencia en la separación creando un medio con menos poros.

Influencia de la velocidad de flujo. - En principio, el efecto de ensanchamiento puede ser atribuido a tres factores :

- A la difusión regresiva (contraria al flujo), debido a la dispersión de los espacios entre las partículas.
- A la difusión axial en la fase móvil.
- A la dispersión debido a una incompleta transferencia de masa.

Estas tres determinantes de la amplitud de banda se relacionan en forma diferente con la velocidad de flujo.

El efecto de la difusión contraria se reduce mejorando la calidad del empaquetamiento de la columna. La difusión axial es inversamente proporcional a la velocidad de flujo. La dispersión debido a la transferencia de masa se incrementa al aumentar el flujo.

Influencia del tamaño de partículas del gel. - Se ha mostrado por mediciones empíricas que el tamaño de partículas del gel (d_p) influye en la amplitud de banda de la siguiente manera:

- La difusión regresiva, aumenta linealmente con el tamaño de partícula.
- La difusión axial no es afectada por el tamaño de las partículas.
- La dispersión debido a una incompleta transferencia de masa se incrementa linealmente con d_p^2 .

La validez de los enunciados anteriores están restringidos a partículas de cierto rango de tamaño. Sin embargo en términos generales, un gran tamaño de partícula significa:

- Un rápido descenso en la eficiencia de la separación cuando se cambia de una velocidad de flujo óptima a otra más alta.
- Una velocidad de flujo óptima baja.

De esta manera fases estacionarias de pequeñas partículas son usadas para lograr una alta resolución a velocidades razonables.

La desventaja de las partículas pequeñas es que provocan una gran resistencia al flujo (con una concomitante necesidad de usar relativamente altas presiones) así como dificultades en su em-

paquetamiento dentro de la columna.

Influencia del peso molecular. - La influencia del peso molecular de los componentes de la muestra, sobre la amplitud de la banda se desatiende en cromatografía líquida. La baja velocidad de difusión de las biomoléculas grandes, requiere un tiempo mayor para el equilibrio.

El peso molecular de la muestra influye en el ancho de la banda de la siguiente manera :

- La difusión regresiva permanece inalterada.
- La difusión axial decrece al incrementar el peso molecular.
- La difusión debido a la incompleta transferencia de masa aumenta considerablemente al incrementar el peso molecular.

Así, la máxima resolución de muestras de alto peso molecular, tales como proteínas, se consigue con velocidades de flujo reducidas, es decir, a bajas presiones de trabajo.

A la luz de los tópicos discutidos en las secciones precedentes, se concluye que un buen desempeño de la filtración en gel demanda, para el caso de proteínas, un medio que contenga :

- Pequeñas partículas para una mejor separación.
- Poros grandes para un rango de fraccionamiento conveniente.
- Un volumen total de poro (porosidad) grande para una buena separación.

Además, la composición físico-química del gel debe reunir ciertos requisitos básicos :

- Rigidez para un mejor empacamiento.
- Ser inerte para compuestos biológicos lábiles.
- Nula adsorptividad para una alta recuperación y para un verdadero mecanismo de filtración en gel.
- Estabilidad, para un tiempo de vida larga.

Finalmente el medio de separación debe ser corrido bajo condiciones apropiadas :

- A bajas velocidades de flujo para lograr del sistema la inherente eficiencia de separación.

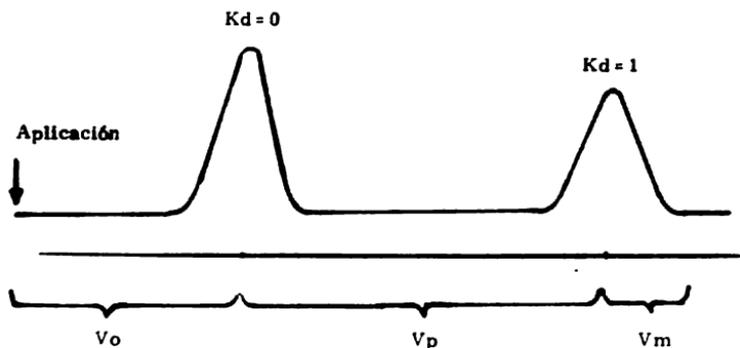


Fig. 5. Cromatograma de la elución de una muestra de dos componentes; uno de ellos es completamente excluido del solvente interior del gel ($K_d=0$), el otro es lo suficientemente pequeño para tener accesibilidad al solvente interior del gel ($K_d=1$).

D) TECNICAS ELECTROFORETICAS

1) ELECTROFORESIS

Electroforesis significa migración de partículas cargadas en un campo eléctrico. La primera publicación sobre la aplicación de esta técnica, que atrajo mucho interés fué la de Tiselius quien separó y caracterizó macromoléculas electroforeticamente. (12).

Teoría

Una partícula cargada en un medio aislado experimentará una fuerza si se le aplica un campo eléctrico. La partícula se moverá a una velocidad v ; determinada por su carga q , por el campo eléctrico E , y por el coeficiente de fricción f producido al pasar a través del medio. Así tenemos :

$$Eq = f v \quad (1)$$

El coeficiente de fricción f de la partícula es una medida de su tamaño hidrodinámico. La movilidad de la partícula es la velocidad impartida por un campo eléctrico externo dado.

$$\text{Movilidad} = \mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{f}$$

Esta es generalmente una constante característica de la especie iónica en particular.

Aunque la relación indicada arriba puede verificarse experimentalmente, existen otros factores que afectan las movilidades de

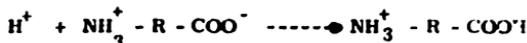
partículas con carga, así que las *movilidades* observadas no pueden ser usadas para determinar cargas netas reales, o coeficientes de fricción. De aquí que la electroforesis sea usada como criterio de pureza de sustancias, y en menor grado como un método de preparación.

Muchas moléculas, biológicas importantes (aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) poseen especies cargadas eléctricamente, cationes (+) y aniones (-), que se moverán en una celda de -- electrólisis hacia el cátodo (polo negativo) o hacia el ánodo (polo positivo), de donde reciben su nombre.

Aún moléculas con cargas similares tendrán diferentes relaciones de carga/masa debido a las diferencias inherentes a su peso molecular. En consecuencia estas diferencias forman la base para una migración diferencial al someterlas a la acción de un campo eléctrico. Esto es el principio de la electroforesis.

Las proteínas son mezclas complejas de aminoácidos y tienen carácter anfotérico ó lo que quiere decir que pueden existir con cargas positivas, negativas o sin carga, dependiendo del pH del medio que las rodea. Las cargas dependen de los grupos amino o carboxilo de la proteína: En el grupo $\text{NH}_3^+ - \text{R} - \text{COO}^-$ la carga positiva (NH_3^+) cancela a la -- negativa (COO^-) dejando una carga neta de cero, cuando esto ocurre se dice que está en su punto isoelectrónico (pI), es decir no emigrará en un campo eléctrico.

Si una proteína se coloca en un medio ácido, con exceso de iones H^+ estos se combinan con la proteína como sigue:



confiriéndole una carga positiva, porque los grupos carboxilos quedan protonados y no tienen carga eléctrica. Algo parecido ocurre si la proteína es colocada en un medio alcalino, adquirirá una carga negativa.



Así las proteínas tomarán las características de las soluciones amortiguadoras.

En la electrolisis, si colocamos dos electrodos en agua observamos que el paso de corriente es restringido, por la ausencia de iones que actúan como transportadores de corriente. Durante la electrolisis de una solución salina diluida se producen iones OH^- e H^+ en el cátodo y el ánodo respectivamente: El generador ó batería fuerza los electrones al cátodo y los saca del ánodo cerrando el circuito.

Cátodo



Ánodo



Dos electrones del cátodo reaccionan con 2 moléculas de agua, formándose H_2 , después de saturar escapa como gas, permaneciendo los iones OH^- en solución.

cciondo los OH^- en la solución; los iones se mueven en el líquido (conductividad iónica) siendo atraídos por los electrodos.

El agua pura tiene muy baja conductividad eléctrica, pero muchas sustancias la conducen bien, debido a que el soluto disuelto se ha disociado en iones que transportan la corriente.

En la electroforesis además de las proteínas que se van a separar y que deben de estar fuera de su pI se necesitan otros iones, para que la corriente pueda transportarse en forma homogénea (9 , 11).

En la electroforesis un ión o grupos con carga, migrará hacia uno de los electrodos cuando es colocado en un campo eléctrico. La mezcla a separar se aplica como una estrecha zona a una distancia conveniente de cada electrodo; al ocurrir la migración dos diferentes componentes se mueven a diferentes velocidades y lentamente se irán separando -- unos de otros en dirección de la migración es decir hacia el electrodo de carga opuesta al ión.

Hay dos tipos de electroforesis : Electroforesis libre, donde las proteínas se separan en un medio líquido y Electroforesis de zona, donde la muestra es aplicada sobre un soporte(papel, acetato de celulosa, agua, almidón, poliacrilamida). Aquí las proteínas van formando zonas. Este tipo de electroforesis(13, 14) se utiliza cuando se desea fijar las proteínas ó moléculas separadas por electroforesis, donde puedan desnaturalizarse, teñirse y conservarse.

En la actualidad la electroforesis casi no se efectúa en solución libre, sino que la solución de electroforesis es mantenida en un medio estable, tal como tiras de papel, o en geles diversos. En el primer caso el papel es rápidamente secado en un horno; en el segundo caso el gel es colocado en un fijador, el cual precipita las sustancias examinadas permaneciendo así en su correcta posición de migración, o con algún colorante con el cual se produce una precipitación al formarse un producto de reacción insoluble.

Se necesita además de las proteínas a separar (con carga para que emigren) otros iones, ya que la corriente entre los electrodos debe ser la misma, para que donde las proteínas no la transportan los iones pequeños deben hacerlo, requiriéndose una solución eléctricamente homogénea. De donde se desprende que es conveniente contar con un dispositivo que mantenga constante la corriente a través del soporte y medio líquido. Al principio se observa una variación del potencial, alcanzándose casi inmediatamente un valor constante.

Goay-Chapman y Debye-Huckel, al analizar la distribución de iones pequeños alrededor de una partícula o macromolécula cargada eléctricamente y presente en una solución salina (15) encuentran iones de carga opuesta en alta concentración y próximos a la de la superficie de la partícula. Esto forma discontinuidades de concentración. La unión de iones a la proteína afecta directamente su carga y por lo

tanto su movilidad. Además los contraiones forman una nube de carga opuesta alrededor de la proteína. Estos contraiones (iones pequeños de carga opuesta) pueden estar hidratados y se produce una repulsión electrostática a corta distancia, la nube de iones se separa de la proteína. Así que durante la electroforesis la proteína se mueve en forma irregular hacia el electrodo apropiado, cada vez que la proteína se des-
plaza la nube de contraiones se rezaga momentáneamente, formándose un campo electrostático que se opone al campo aplicado, así que la proteína experimenta un campo eléctrico neto disminuido, esto se traduce en movilidades menores. Además los iones que se están moviendo en dirección opuesta llevan una considerable cantidad de disolvente (hidratación) y la proteína por decirlo así se está moviendo contra un flujo de disolvente (efecto electroforético) reduciendo su movilidad.

Algunos parámetros que afectan la movilidad electroforética.

La separación depende también de la fuerza del campo eléctrico en el sistema, así como de la fuerza iónica de los tan-pones.

La fuerza de campo significa número de volts por cm. Por ejemplo, si los electrodos se encuentran separados 20 cm y el voltaje aplicado es de 400 volts, tendremos una fuerza de campo de 20 volts/cm. Mientras más próximos están entre sí el anodo y el cátodo mayor es la fuerza y más rápida la migración. La velocidad de migración (M) de una partícula con carga es indirectamente proporcio-

nal al espacio (e) entre los electrodos y directamente proporcional al voltaje.

Si se aumenta el tiempo se aumenta la distancia (d) que emigra. Así tenemos :

$$M = \frac{V t \mu}{e}$$

d = distancia

μ = movilidad

v = voltaje

e = distancia entre electrodos (cm)

t = tiempo en segundos

la ecuación anterior nos da:

$$d e = v t \mu$$

$$y \quad \mu = \frac{d e}{V t} ; \text{ en unidades : } \frac{\text{cm cm}}{\text{volts seg.}} = \frac{\text{cm}^2}{\text{volts seg.}}$$

así la movilidad queda expresada en $\text{cm}^2 / \text{volt seg.}$

Al disminuir la conductancia del sistema, lo que se logra disminuyendo la fuerza iónica de los tampones, el resultado es que los componentes de la muestra a separar se moverán más rápidamente, ya que la electricidad es transportada por los iones, al haber menos iones de tampón con relación a los de la muestra, mayor será la electricidad que estos últimos llevarán.

Otro efecto es que el movimiento de iones rodeados por iones de carga opuesta es retardado por la atracción de estos últimos, así que el aumentar la concentración del tampón tiene un efecto doble reduciendo la velocidad de migración (la cual no sufre a aceleración como podría

esperarse sino que su velocidad es aproximadamente constante).

$$f = Q \times E$$

f= fuerza ejercida sobre la partícula

Q= carga de la misma

E = fuerza del campo

Esto se debe a que la partícula se mueve a través del medio tampon, y encuentra una fuerza retardante causada por la viscosidad del medio. Esta fuerza ha sido expresada por Stokes (17).

La fuerza iónica de $f = \frac{1}{2} \sum m c^2$ donde m es la molaridad (molalidad) y c es la carga del ion.

Electroforesis en geles

Aunque existen diversos soportes (papel, almidón agarosa), sólo me referiré al de poliacrilamida. Estos están excentos de cargas y el tamaño de los poros depende de la concentración total de acrilamida y del grado de enlaces cruzados (el paso es menor al aumentar la proporción de bis acrilamida).

El paso de líquidos efectuado a través de los - poros de un gel se puede deber a la presión hidrostática o a la electroosmosis o a ambas; este flujo puede arrastrar moléculas no cargadas. Existe además de la movilidad por carga otro efecto de tamizado, impartido por el gel a moléculas de diferente tamaño . Las proteínas a separar

deben caber por los poros para que puedan emigrar de acuerdo a sus cargas.

Las separaciones electroforéticas zonales se producen en base a la magnitud de la carga.

Electroforesis en geles con SDS:

La poliacrilamida en presencia de un detergente como el sulfato de dodecil sódico (SDS) es una de las técnicas más ampliamente usadas para la separación efectiva de proteínas, en particular para determinar su peso molecular (9). En esta técnica las proteínas son desnaturalizadas por el detergente SDS y colocadas sobre un gel de poliacrilamida-SDS equilibrado con una solución amortiguadora que contiene el detergente y sometidas a un campo eléctrico, los polipéptidos-SDS cargados negativamente (debido al SDS) se moverán hacia el ánodo a una velocidad dependiente del peso molecular (10).

Si graficamos la movilidad electroforética relativa de una serie de proteínas bien caracterizadas contra el logaritmo de sus pesos moleculares obtendremos una línea recta, en ésta podemos determinar el peso molecular de una proteína no caracterizada, conociendo su movilidad electroforética.

En su estado nativo, las cadenas polipeptídicas de una proteína globular están estrechamente plegadas formando una estructura tridimensional .

Al ser tratadas con SDS en presencia de un agente --

reductor se provoca el desdoblamiento de las cadenas peptídicas asumiendo una estructura recta rígida como varillas en la cual el núcleo polipeptídico está cubierto por moléculas de SDS.

Proteínas de alto peso molecular ligan más SDS que aquellas de bajo peso molecular. Dado que la molécula SDS tiene una carga neta negativa a pH neutro los polipeptidos-SDS más grandes están cargados más negativamente que los polipeptidos-SDS más pequeños.

De hecho, la molécula de SDS se une al polipeptido con una relación de peso constante, correspondiendo más o menos una molécula ligada por tres enlaces peptídicos. En otras palabras en los polipeptidos-SDS, la carga por unidad de peso es constante. Dado que la fuerza eléctrica que está actuando sobre una partícula es directamente proporcional a su carga neta. La relación anterior quiere decir que la fuerza eléctrica por unidad de peso es también constante.

El tamaño de poro promedio del gel depende de la concentración de los monómeros de acrilamida y bis-acrilamida usados durante la polimerización. Al iniciar la corrida electrofóretica todos los polipeptidos-SDS entran en la misma posición y empiezan a moverse bajo la misma aceleración cuando se aplica el campo eléctrico.

Las moléculas pequeñas pueden viajar a través de los poros de poli(acrilamida) más fácilmente que las moléculas grandes.

Esta situación permite la separación de polipeptidos de diferente peso molecular bajo la premisa que estas moléculas tuvieran formas similares, de esta manera las diferencias en peso molecular estarán reflejadas en diferencias de tamaño. Todos los polipeptidos-SDS tienen una forma rígida similar (Como varillas), las cuales tienen un eje menor (18°) constante y un eje mayor dependiente del peso molecular.

En electroforesis de poliacrilamida-SDS, el gel es una malla continua de poros y no contiene un espacio equivalente accesible al solvente externo. De este modo a diferencia de la filtración en gel, todas las moléculas en electroforesis en gel no tienen otra opción que viajar a través de los poros. La separación puede realizarse también en otros medios o soportes tales como almidón o agarosa, si la concentración de materia prima de estos geles fuera lo bastante alta para producir poros de tamaño pequeño, dentro del rango de tamaño de las moléculas proteicas que van a ser separadas.

La determinación del peso molecular es una información básica importante en la caracterización de una proteína.

Los bioquímicos dedican buena parte de su tiempo al aislamiento, identificación y caracterización de las proteínas y la electroforesis es otra herramienta que ha permitido un avance notable en este campo.

Factores que afectan la velocidad de migración. -

Dada la relevancia que tienen y aún que algunos de ellos ya han sido mencionadas anteriormente los agrupamos de la siguiente manera:

La muestra, La naturaleza de compuestos cargados afectan sus velocidades de migración de diferentes maneras.

i) Carga. La velocidad de migración aumenta con un incremento en la carga neta, la magnitud de la carga es generalmente dependiente del pH.

ii) Tamaño. La velocidad de migración disminuye para las moléculas más grandes, debido al aumento de las fuerzas electrostáticas y de fricción ejercidas por el medio.

iii) Forma. Moléculas con tamaños similares pero diferentes formas por ejemplo proteínas fibrosas y globulares exhiben diferentes características de migración causada por el efecto diferencial de las fuerzas electrostáticas y de fricción.

El campo eléctrico, La ley de Ohm establece la relación entre la corriente A (en ampers), el voltaje V (en volts) y la resistencia (en Ohms): $A = V/R$. La separación de iones en un campo eléctrico está influenciada por los siguientes tres factores:

i) Corriente. Como la corriente en la solución entre los electrodos es conducida completamente por el buffer y los iones de la muestra, la velocidad de migración es directamente proporcional a la corriente . La distancia recorrida por los iones será proporcional al tiempo durante el cual la corriente es

aplicada, por lo tanto para una máxima reproducibilidad, la corriente debe ser mantenida constante durante la electroforesis. Por supuesto que debe usarse siempre corriente directa.

ii) Voltaje. Este rige la corriente y por consiguiente la velocidad de migración es proporcional a la diferencia de potencial a través del medio de soporte, este es el gradiente de voltaje expresado generalmente en Volts/cm (el voltaje aplicado dividido entre la longitud del medio soporte).

iii) Resistencia. La velocidad de migración es inversamente proporcional a la resistencia la cual depende del tipo y tamaño del medio soporte y de la fuerza iónica del amortiguador. La resistencia aumentará con la longitud del medio soporte y ambos decrecerán al aumentar el ancho del medio y la concentración de iones del amortiguador. El calor es producido durante la electroforesis a una velocidad igual a $A^2 R$ watts y la resistencia decrece al aumentar la temperatura.

Consecuentemente si el voltaje permanece constante el calentamiento producirá un incremento en la corriente y en la -- evaporación del solvente del medio.

El amortiguador. Este determina y estabiliza el pH del medio soporte y afecta también la velocidad de migración de los compuestos de diferentes formas:

i) Composición. Puesto que el buffer actúa como disolvente de la muestra, cierta difusión de la muestra es inevitable. Esto es particularmente notable para moléculas pequeñas tales como aminoácidos y azúcares.

La difusión puede ser minimizada corriendo las muestras en bandas mas estrechas empleando alto voltaje para periodos tan cortos como sea posible y removiendo y secando rápidamente después de que la separación se ha efectuado.

ii) Concentración. Si se incrementa la fuerza iónica del amortiguador la proporción de la corriente transportada por el amortiguador aumentará y la parte de la corriente transportada por la muestra disminuirá y así lentamente su velocidad de migración. Una alta fuerza iónica del amortiguador incrementará sobre todo la corriente y por ende la producción de calor.

A baja fuerza iónica la proporción de la corriente transportada por el amortiguador decrecerá y la parte de la corriente transportada por la muestra aumentará, incrementando así su velocidad de migración, pero la difusión y la resultante pérdida de la resolución serán mayores.

De esta manera la fuerza iónica debe ser escogida y seleccionada generalmente dentro de un rango entre 0.05 - 0.10 mol/ml

Fuerza iónica = $\frac{1}{2} \sum C Z^2$ en donde C es la concentración molar de un ión y Z es su número de carga.

iii) pH. Este tiene un efecto pequeño en compuestos completamente ionizados tales como sales inorgánicas, pero para compuestos orgánicos el pH determina el grado de ionización, por lo cual su velocidad de migración dependerá del pH.

El medio soporte. Aunque se emplean materiales relativamente inertes como medio de soporte, la composición precisa del medio tiene varios efectos sobre la velocidad de migración de un compuesto, el medio escogido dependerá del tipo de muestra.

i) Adsorción. Es la retención de las moléculas de la muestra por el medio soporte causando una disminución de la resolución de separación, la adsorción puede disminuir también la velocidad de migración.

ii) Electro-osmosis (Electro-endoosmosis). Este fenómeno es provocado por la carga relativa producida entre las moléculas de agua del amortiguador y la superficie del medio soporte. La ionización de grupos en el medio soporte y la superficie de adsorción de los iones del amortiguador provocan generalmente iones oxonium (H_3O^+) producidos de las moléculas de agua, ya que están cargados positivamente migrarán hacia el cátodo acarreando sustancias neutras disueltas, acelerando el progreso de los cationes y retardando a los aniones. Este efecto puede ser ignorado, pero si se trata de determinar los puntos isoelectrónicos de determinados compuestos, entonces se debe tener en cuenta, normalmente se calcula corriendo moléculas neutras tales como urea o glucosa y midiendo la distancia de su migración. Este efecto es de menor proporción en geles de acetato de celulosa o poliacrilamida que en papel o gel de almidón.

iii) Tamiz molecular. Esto es lo preponderante de la electroforesis en gel en donde las propiedades de criba molecular de un medio soporte se-

mi-rígido (el gel) ayuda a separar compuestos iónicos grandes, como proteínas, las cuales no difieren solamente en su movilidad electroforética sino también en su forma y tamaño.

El tamaño de poro de los geles puede ser variado de acuerdo al análisis en particular deseado. El principio de tamiz molecular de geles de agar, almidón y poliacrilamida es que el movimiento de las moléculas grandes es obstruido en mayor forma al disminuir el tamaño de poro como resultado del incremento en el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas del gel.

Así pues, es necesario tener en cuenta estos factores para un correcto desarrollo de las técnicas electroforéticas.



2) ELECTROENFOQUE

El electroenfoque difiere de la electroforesis convencional, en que el pH no se mantiene constante a través de todo el sistema. En aquel cada componente de una mezcla emigra electroforéticamente en un gradiente estacionario de pH, hasta alcanzar un estado (invariante) constante, enfocándose o concentrándose cada uno como una banda en su punto isoeléctrico (pI) respectivo y quedándose allí. (9, 11).

La técnica requiere pues un gradiente de pH estable entre el ánodo y el cátodo. Esto se logra por la electrólisis en agua de una mezcla de anfolitos de peso molecular bajo que se llaman anfolitos acarreadores.

No es necesario aplicar la muestra como una banda angosta en electroenfoque, porque las bandas de cada componente se concentran solas pudiendo separarse proteínas que difieran en centésimas de unidad de pH. Cada componente emigrará (se enfocará) a su punto isoeléctrico.

En todas las electroforesis se hace uso del hecho de que cada proteína tiene carga neta que varía con el pH de su ambiente.

Cuando pasan de un pH bajo a un pH muy alto la carga neta cambia en forma continua de + a - . A un pH definido la carga neta es igual a cero; este es el pI .

Así, una proteína introducida a este gradiente a un pH por debajo de su pI , contendrá una carga positiva neta y bajo la influen-

pl la carga neta decrecerá gradualmente alcanzando finalmente la posición de su pI, donde la carga neta será cero y la migración cesará.

Si por el contrario se colocase una proteína a un pH más alto que su pI, su carga neta será negativa y la proteína migrará hacia el ánodo, y en forma similar será fijada a su pI. Por lo tanto cada proteína terminará su migración como una zona muy angosta y en la posición (de las anfolinas) correspondiente a su pI.

El punto isoeléctrico de una molécula está determinado por el número, tipo de grupos proteolíticos y sus constantes de disociación. Las proteínas muestran una considerable variación en su punto isoiónico, están generalmente en un rango de pH de 3-11. Es también aceptado que en una celda de electrólisis el ánodo cargado positivamente atrae iones negativos y repele iones positivos; opuestamente a lo que ocurre en el cátodo

En la electroforesis convencional hay un pH constante entre el ánodo y el cátodo, por lo cual, los iones cargados positivamente, por ejemplo proteínas, emigrarán hacia el cátodo mientras los iones con carga negativa migrarán al ánodo. En el electroenfoque se establece un gradiente de pH que permanece invariable, el pH aumenta sucesivamente del ánodo al cátodo.

Si una proteína se coloca en el sistema a un pH más bajo que su punto isoiónico, la carga neta de la molécula será positiva y

se moverá en dirección del cátodo. Debido a la presencia del gradiente de pH, la proteína migrará a un medio de valores sucesivamente más altos, de pH, los cuales influirán en la ionización y carga neta de la molécula. La proteína buscará eventualmente un pH donde su carga neta sea cero y parará de migrar, este es el pI de la proteína.

El pH aquí es igual al punto isoelectrico, el cual es muy cercano o igual al punto isoelectrico. La consecuencia de esto es que cada proteína se moverá "enfocándose" a su respectivo pI en un gradiente de pH estable. Independientemente de su origen, del aparato y tiempo de la corriente aplicada. Una vez alcanzado el "enfoco" es decir, cuando las proteínas han llegado a su pI, la resolución se mantendrá aún cuando el experimento continúe durante más tiempo, ya que el efecto de "enfoco" trabaja contra el fenómeno de difusión. Esto es contrario a lo que sucede en electroforesis convencional, donde la difusión de la muestra es un obstáculo.

Se debe recordar, sin embargo, que los valores de pI son dependientes de la temperatura y estos decrecen al aumentar ella. Además el pH debe ser medido a una temperatura constante, usualmente a la temperatura de "enfocamiento".

En cuanto a los anfolitos acarreadores (abreviados C A), éstos deben reunir ciertos requisitos :

- Es necesaria cierta capacidad amortiguadora del anfolito a valores de pH cercanos al pI debido a que el CA debe dictar el trayecto del pH.

se moverá en dirección del cátodo. Debido a la presencia del gradiente de pH, la proteína migrará a un medio de valores sucesivamente más altos, de pH, los cuales influirán en la ionización y carga neta de la molécula. La proteína buscará eventualmente un pH donde su carga neta sea cero y parará de migrar, este es el pI de la proteína.

El pH aquí es igual al punto isoelectrico, el cual es muy cercano o igual al punto isométrico. La consecuencia de esto es que cada proteína se moverá "enfocándose" a su respectivo pI en un gradiente de pH estable. Independientemente de su origen, del aparato y tiempo de la corriente aplicada. Una vez alcanzado el "enfoco" es decir, cuando las proteínas han llegado a su pI, la resolución se mantendrá aún cuando el experimento continúe durante más tiempo, ya que el efecto de "enfoco" trabaja contra el fenómeno de difusión. Esto es contrario a lo que sucede en electroforesis convencional, donde la difusión de la muestra es un obstáculo.

Se debe recordar, sin embargo, que los valores de pI son dependientes de la temperatura y estos decrecen al aumentar ella. Además el pH debe ser medido a una temperatura constante, usualmente a la temperatura de "enfocamiento".

En cuanto a los anfolitos acarreadores (abreviados C A), éstos deben reunir ciertos requisitos :

- Es necesaria cierta capacidad amortiguadora del anfolito a valores de pH cercanos al pI debido a que el CA debe dictar el trayecto del pH.

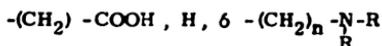
- Debe de tener una cierta conductancia en su pl , esta propiedad esta relacionada con una buena capacidad amortiguadora.
- Los CA deben ser de peso molecular más bien bajo para facilitar la separación de las protefnas después del electroenfoque por procedimientos sencillos como filtración en gel o diálisis.

Para uso general se emplean anfolitos acarreadores con valores de pl que abarcan intervalos de pH de 3 a 11; rango de pH en el cual la mayoría de las protefnas son isoelectricas. El número exacto de C A necesario por unidad de pH depende de varios factores, incluyendo su capacidad amortiguadora en el valor deseado del gradiente de pH que permita una mejor resolución. Además los CA deben tener buena solubilidad en agua para evitar su adsorción a sitios hidrofóbicos de las protefnas. La absorción de luz de los CA arriba de 280 nm debe ser baja, de manera que permita la detección sin interferencia de protefnas después de "enfocadas", las cuales deben de leerse a 280 nm.

La estructura general de los CA es :



donde R puede ser :



y $n < 5$.

Tales CA se encuentran disponibles comercialmente.

El electroenfoque ofrece las siguientes ventajas:

1) La separación de proteínas en un alto grado de resolución tanto para propósitos analíticos como preparativos. Pueden ser separadas proteínas que difieran en su pI en 0,01 unidad de pH . El poder de resolución es del mismo orden o mejor, que el obtenido de una cuidadosa electroforesis en gel de poliacrilamida.

2) La caracterización de cada proteína por su pI . Los valores de pI son obtenidos siempre después de "enfocarse" y separarse midiendo simplemente el pH en el punto de máxima concentración de proteína. Estos valores de pI pueden ser determinados con un alto grado de reproducibilidad y son muy usados en estudios comparativos de proteínas. La cantidad mínima de proteína necesaria está limitada solamente por la sensibilidad del método de detección de la proteína.

En el caso particular del electroenfoque en placa delgada de poliacrilamida, por su fácil acceso al gel durante todo el experimento, permite además :

- Fácil aplicación de la muestra, lo cual puede hacerse en cualquier parte de la superficie del gel.
- Múltiples muestras pueden aplicarse en el mismo gel, bajo condiciones idénticas .
- Pueden aplicarse proteínas lábiles después de que se ha formado el gradiente de pH .
- El pH puede medirse directamente sobre la superficie del gel.
- El fijado y tizado se hace en forma directa.

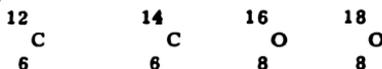
Electroforesis en capa delgada



E) TECNICAS RADIOACTIVAS

Existen átomos de un mismo elemento que difieren en sus números de masa (diferente número de neutrones) llamados isótopos (4,5,).

Simbólicamente especies nucleares específicas se representan por un número subscripto para número atómico y un número superescrito para el número de masa, seguido del símbolo del elemento, por ejemplo:



El número de isótopos de un elemento dado varía.

Así hay tres isótopos para el átomo de hidrógeno ^1H , ^2H , ^3H y siete para el de carbono de ^{10}C a ^{16}C inclusive y 20, ó más para algunos elementos de alto número atómico.

Estabilidad atómica y radiación. - En la práctica sólo unos cuantos isótopos de un elemento dado son suficientemente estables para existir en forma natural. Estos son conocidos como isótopos estables.

Algunos otros isótopos son inestables y se desintegran a una velocidad característica para dar un isótopo estable. Los radioisótopos inestables son producidos principalmente en forma artificial, los menos inestables, se encuentran en la naturaleza.

Los radioisótopos emiten partículas y/o radiaciones electromagnéticas durante el proceso de desintegración. Las partículas β ,

son electrones que se presentan en dos formas ($\beta +$) positrones y negatrones ($\beta -$).

Tipos de desintegración radiactiva. -

Existen varios tipos de desintegración radiactiva, las siguientes pueden considerarse como las más importantes:

a) Desintegración por emisión de negatrones. En este caso un neutrón es convertido en un protón por la expulsión de una partícula beta cargada negativamente llamada " negatron " ($\beta - ev$).

Neutrón ----- protón + negatrón

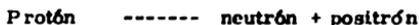
Un negatrón es un electrón pero se utiliza este termino para enfatizar el origen nuclear de la partícula. Como resultado de la emisión del negatrón, el núcleo pierde un neutrón pero gana un protón. La relación: número de neutrones/número atómico, disminuye ya que el número atómico (Z) aumenta en uno y la masa atómica (A) permanece constante, puesto que la masa atómica (A) es igual a la suma del número atómico (Z) y el número de neutrones (N), o sea:

$$A = Z + N$$

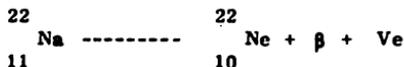
Un isótopo usado frecuentemente en trabajos biológicos que se desintegra por emisiones de negatrones es el ^{14}C .



b) Desintegración por emisión de positrones. Algunos isótopos se desintegran emitiendo partículas cargadas positivamente llamadas positrones (β^+ + e^-). Esto ocurre cuando un protón es convertido en un neutrón.



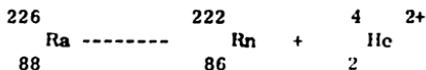
Los positrones son extremadamente inestables y tienen solamente una existencia transitoria. Como resultado de la emisión del positrón el núcleo pierde un protón y gana un neutrón, la relación N/Z se incrementa, el número atómico disminuye en uno y el número de masa permanece constante. Ejem.



c) Desintegración por emisiones (α) alfa. Isótopos de elementos de alto número atómico se desintegran frecuentemente emitiendo partículas alfa (α).

Una partícula alfa es un núcleo de helio, es decir consiste de dos protones y dos neutrones (${}^4_2\text{He}^{2+}$). Por lo tanto la emisión de partículas alfa provoca un considerable aligeramiento del núcleo, una disminución del número atómico en dos

y un crecimiento del número de masa de cuatro, Isótopos con este tipo de desintegración no son usados generalmente en trabajos biológicos. Ejem.



d) Desintegración por emisión de rayos gamma. En contraste con las mismas de partículas α y β , las emisiones gamma involucran radiaciones electromagnéticas similar a γ , pero con una longitud de onda más corta que los rayos X. Estos rayos son el resultado de una transformación en el núcleo del átomo (en contraste con los rayos X que son emitidos como una consecuencia de la excitación involucrando los orbitales del átomo) y frecuentemente acompañado de emisiones de partículas α y β . Emisiones de radiaciones gamma por si mismas no provocan cambios en el número atómico o de masa.

Decaimiento de la energía radiactiva. - La unidad usual para expresar los niveles de energía asociados con la desintegración radiactiva es el electrón-volt (eV). Un electrón-volt es la energía adquirida por un electrón en aceleración a través de una diferencia de potencial de 1 volt y es equivalente a 1.6×10^{-19} .

Los isótopos que emiten partículas α , son normalmente los más energéticos encontrándose del orden de 4.0 - 8.0 MeV (Mega electrón volts) mientras que las que emiten β y γ generalmente tienen energías de decaimiento menores que 3.0 MeV.

Unidades de radiactividad. - El curie (Ci) está definido como la cantidad de material radiactivo cuyo número de desintegración es nucleares por segundo es el mismo que el de 1 g de radio, es decir 3.7×10^{10} , (3.7×10^{10} / seg).

Para usos biológicos esta unidad es demasiado grande por lo cual se utiliza el microcurie (μCi).

Existen varios métodos para detectar y medir la radiactividad, nosotros nos ocuparemos solamente de los métodos basados en la excitación de compuestos.

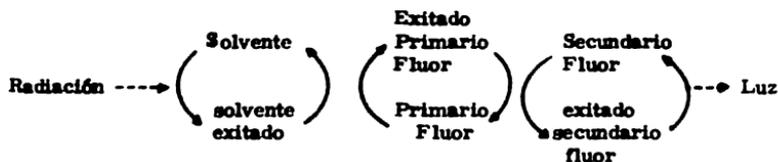
La radiactividad causa la excitación de ciertos compuestos fluorescentes, los cuales producen fluorescencia (centelleo). La luz emitida por centelleo puede ser detectada por un fotomultiplicador que convierte los fotones en pulsos eléctricos cuya magnitud es proporcional a la energía del evento radioactivo original.

Existen básicamente dos tipos de contadores de centelleo

1) Contador de centelleo sólido o externo (5). Este utiliza como detector un cristal de yoduro de sodio sensibilizado usualmente con yoduro de talio. El cristal está algunas veces perforado con el fin de colocar el tubo de la muestra en la perforación . Esta geometría permite una eficiencia . Esto es un valor principalmente de emisiones gamma, ya que las partículas α y β no atraviesan el recipiente para alcanzar el cristal. El cristal está colocado cerca de un fotomultiplicador el cual se encuentra conectado a una fuente de alto voltaje y a una escala indicadora.

2) Contador de centelleo líquido o interno. La muestra es mezclada con un solvente que contiene en solución un centelleador apropiado. El contador de centelleo líquido es particularmente usado en la cuantificación de β -emisores tales como ^3H , ^{14}D , ^{35}S , los cuales

son comúnmente empleados en trabajos biológicos. Pocos solventes orgánicos fluorescen cuando son bombardeados con radiactividad. La luz emitida por la mayoría de los fototubos disponibles. Sin embargo, si un compuesto es disuelto en el solvente, este puede aceptar la energía del solvente y emitir su misma fluorescencia a una longitud de onda mayor y entonces la luz puede ser detectada más eficientemente. Tales compuestos son conocidos como fluorescentes primarios, el más frecuentemente utilizado es el 2,5-difeniloxazol (PFO). Desafortunadamente la luz emitida por el PFO no es detectada con una alta eficiencia, por lo cual se puede adicionar otro fluorescente (secundario) tal como el 1,4-di-2-(5-feniloxazolil) - benceno (POPOP), que es el centelleo secundario más usado. Así la transferencia de energía del proceso queda como:



Se utiliza un fluorescente secundario, que emite la luz a una mejor longitud de onda de detección ya que el solvente no puede emitir la energía directamente al fluorescente secundario (16). Existen -- además del PFO varios compuestos orgánicos que actúan como centelleadores cuando son disueltos en el solvente adecuado, entre éstos se encuentra

el antraceno, el p-terpenil, α -naftilfeniloxazol (NPO), el fenilbifeniloxadizol (PBD).

Los disolventes para centelleo juegan un papel importante en la eficiencia de conteo (15). Un buen disolvente debe poseer propiedades moleculares que faciliten tanto la conversión de energía como la transmisión. Resultados experimentales muestran que los mejores disolventes para centelleo son aromáticos, como benceno < tolueno < p-xileno < mesitaleno. La eficiencia se atribuye a los electrones π aromáticos, capaces de moverse dentro de la molécula. La eficiencia de centelleo de un sistema se refiere al poder de convertir la energía de radiación incidente a fotones de luz.

A cualquier factor que reduce la producción de fotones en un sistema se le denomina quenching y esto puede ocurrir de varias formas:

a) La muestra misma puede absorber la luz producida por el centellador, o su propia radiación.

b) El disolvente no transfiere la energía de la partícula al centellador.

c) El centellador absorbe parte de su propia fluorescencia.

d) La interacción química de algunos componentes contenidos en la solución a contar, pueden originar una reducción de fotones.

Así que la determinación de quenching es sinónimo con determinación de eficiencia de conteo en el área de conteo por centelleo líquido. Esto puede hacerse por el método de empleo de un estándar interno , con la relación de canales del aparato o bien utilizando un estándar externo, al cual se le conoce con certidumbre el número de cuentas.

BIBLIOGRAFIA:

- 1) Lorentzen, J., Chem. and Ind., July 21, 465-468 (1979).
- 2) Karel, M., Freeze drying and advanced food technology. Goldblith, S.A., Rey, L. and Rothmayr, W.W., Academic Press, p 177, London (1975).
- 3) Edwards Instructions, (Catalogo) LF4 Modulyo Freeze Dryer. feb. (1979).
- 4) Williams, B.L. and Wilson, K., Principles and Techniques of practical Biochemistry. Arnold, London (1975).
- 5) Brewer, J.M., Pesce, A.J. and Ashworth, R.B., Experimental Techniques in Biochemistry. 2nd. ed. Prentice-Hall Inc., New Jersey (1974).
- 6) Nieto, D., Metodologia para el aislamiento, purificacion y caracterizacion de las enzimas GSSG-reductasa y CoASSG-reductasa. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias, UNAM (1971).
- 7) LKB-Produkter, (Catalogo) Seminar Notes. Protein Separation by Liquid Chromatography. Part 1: Gel Filtration. Sweden (1980).
- 8) Plummer, D.T., An introduction to practical biochemistry. 2nd. ed. Mc Graw Hill, London (1978).
- 9) Smith, I., Chromatographic and Electrophoretic Techniques. Vol. 2 4th ed., William Heinemann Medical Books LTD. London (1976).
- 10) Svasti, J. and Panijpan, B., SDS- Polyacrylamide Gel Electrophoresis. J. of Chem. Education. 54 #9, p 560 (1977).
- 11) Jakoby, W.B., Enzyme Purification and Related Techniques. Methods in Enzymology. Vol. XXII, 389 (1971).
- 12) Tiselius, A., Trans. Faraday Soc. 33 524 (1937).
- 13) Kloboasitzky, D.V. and Konig, P., Arch. expt. Path. Pharmak. 192 , 271 (1939).
- 14) Consden, R., Gordon, A.A. and Martin, A., Biochem. J., 38 224 (1944).
- 15) Sanders, L., Físicoquímica para estudiantes de biología, farmacia y medicina. Manual Moderno (1978).

- 16) Ewing, G.W., **Instrumental Methods of Chemical Analysis**, 3th ed. Mc Graw Hill Book Co. Tokyo (1969).
- 17) Mcloan, C.E. & Kiser, R.W., **Problems and Experiments in Instrumental Analysis**.; Charles E. Merrill Publishing Co.; Columbus, Ohio; (1963).