

# **ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS EN EL CUERPO HUMANO**

**BIOQUIMICA I**  
ING. BEATRIZ LOPEZ LOPEZ



**PRESENTA EL ALUMNO:**

**Erwin Avelino Bastard Alvarado**

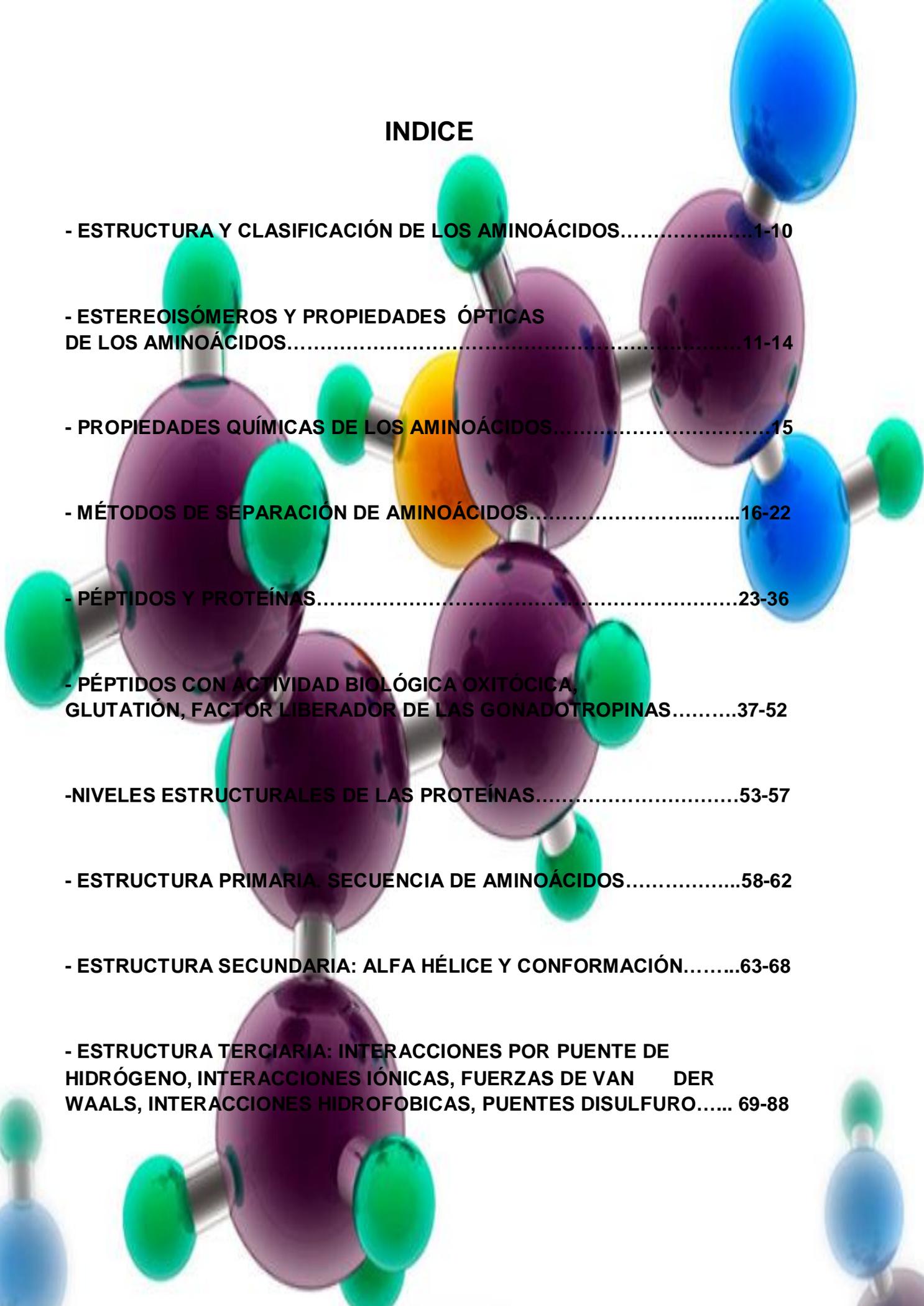
**GRUPO, SEMESTRE y MODALIDAD:**

**Ier. Semestre "A" Licenciatura en Enfermería  
Escolarizado**

**Pichucalco, Chiapas**

**17 de octubre del 2020.**

# INDICE



- ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS.....	1-10
- ESTEREOISÓMEROS Y PROPIEDADES ÓPTICAS DE LOS AMINOÁCIDOS.....	11-14
- PROPIEDADES QUÍMICAS DE LOS AMINOÁCIDOS.....	15
- MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE AMINOÁCIDOS.....	16-22
- PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS.....	23-36
- PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA OXITÓCICA, GLUTATIÓN, FACTOR LIBERADOR DE LAS GONADOTROPINAS.....	37-52
-NIVELES ESTRUCTURALES DE LAS PROTEÍNAS.....	53-57
- ESTRUCTURA PRIMARIA. SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS.....	58-62
- ESTRUCTURA SECUNDARIA: ALFA HÉLICE Y CONFORMACIÓN.....	63-68
- ESTRUCTURA TERCIARIA: INTERACCIONES POR PUENTE DE HIDRÓGENO, INTERACCIONES IÓNICAS, FUERZAS DE VAN DER WAALS, INTERACCIONES HIDROFOBICAS, PUENTES DISULFURO.....	69-88

- ESTRUCTURA CUATERNARIA: PROTEÍNAS OLIGOMÉRICAS).....89-90

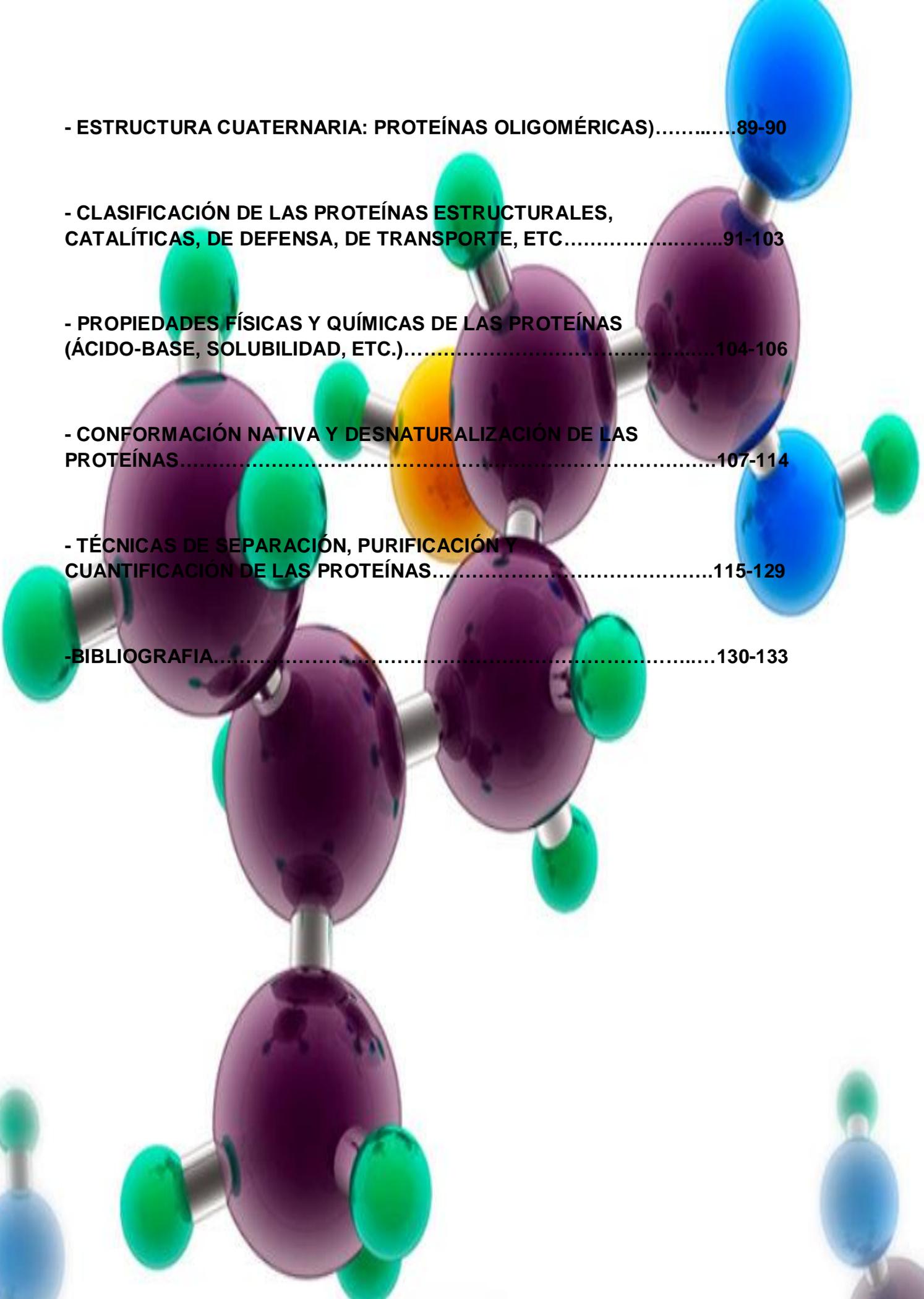
- CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ESTRUCTURALES,  
CATALÍTICAS, DE DEFENSA, DE TRANSPORTE, ETC.....91-103

- PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LAS PROTEÍNAS  
(ÁCIDO-BASE, SOLUBILIDAD, ETC.).....104-106

- CONFORMACIÓN NATIVA Y DESNATURALIZACIÓN DE LAS  
PROTEÍNAS.....107-114

- TÉCNICAS DE SEPARACIÓN, PURIFICACIÓN Y  
CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.....115-129

-BIBLIOGRAFIA.....130-133



# AMINOÁCIDOS

Un aminoácido (a veces abreviado como AA), es una molécula orgánica con un grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) en uno de los extremos de la molécula y un grupo carboxilo ( $-\text{COOH}$ ) en el otro extremo. Son la base de las proteínas, sin embargo tanto estos como sus derivados participan en funciones celulares tan diversas como la transmisión nerviosa y la biosíntesis de porfirinas, purinas, pirimidinas y urea. Los aminoácidos juegan un papel clave en casi todos los procesos biológicos.

Dos aminoácidos se combinan en una reacción de condensación entre el grupo amino de uno y el carboxilo del otro, liberándose una molécula de agua (deshidratación) y formando un enlace amida que se denomina enlace peptídico; estos dos "residuos" de aminoácido forman un dipéptido, si se une un tercer aminoácido se forma un tripéptido y así, sucesivamente, hasta formar un polipéptido. Esta reacción tiene lugar de manera natural dentro de las células, en los ribosomas. En el código genético están codificados los veinte distintos aminoácidos, también llamados residuos, que constituyen los eslabones que conforman péptidos, que cuando forman cadenas polipeptídicas y alcanzan pesos moleculares se denominan proteínas.

La unión de varios aminoácidos da lugar a cadenas llamadas péptidos o polipéptidos, que se denominan proteínas cuando la cadena polipeptídica supera una cierta longitud (entre 50 y 100 residuos aminoácidos, dependiendo de los autores) o la masa molecular total supera las 5000 UMA y, especialmente, cuando tienen una estructura tridimensional estable definida.

## ESTRUCTURA

**-Proteicos:**  $\alpha$  y L-aminoácidos Forman parte de las proteínas, son una fuente de carbono, nitrógeno y energía. Son precursores de neurotransmisores y hormonas.

**-Aminoácidos comunes (20):** al menos cada uno tiene un triplete de bases codificador definido por el código genético.

**-No comunes:** vienen de modificaciones postraduccionales.

**-No proteicos:** a, b, L-, D-. Poseen estructuras y funciones muy distintas. Se pueden encontrar en las paredes bacterianas, componentes de antibióticos, intermediarios en las rutas metabólicas, etc. Y por sus características, tienen funciones muy heterogéneas.

Como bioquímico, no sólo es conveniente, sino una necesidad saber las propiedades de cada aminoácido y sus códigos de tres y una letra.

AMINOÁCIDO	CÓDIGO DE TRES LETRAS	CÓDIGO DE UNA LETRA
-Alanina	-Ala	-A
-Cisteína	-Cys	-C
-Ácido aspártico	-Asp	-D
-Ácido glutámico	-Glu	-E
-Fenilalanina	-Phe	-F
-Glicocola o glicina	-Gly	-G
-Histidina	-His	-H
-Isoleucina	-Ile	-I
-Lisina	-Lys	-K
-Leucina	-Leu	-L
-Metionina	-Met	-M
-Asparagina	-Asn	-N
-Prolina	-Pro	-P
-Glutamina	-Gln	-Q
-Arginina	-Arg	-R
-Serina	-Ser	-S
-Treonina	-Thr	-T
-Valina	-Val	-V
-Triptófano	-Trp	-W
-Tirosina	-Tyr	-Y

## **ESTUDIO DE LA CADENA LATERAL R DE LOS AMINOÁCIDOS:**

Los aminoácidos pueden clasificarse en función de las propiedades de sus cadenas laterales.

### **No polares**

**-Alifáticos:** Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina.

**-Aromáticos:** Fenilalanina, Triptófano.

**-Cíclico:** Prolina, (también erróneamente conocida como iminoácido). Los carbonos se unen al nitrógeno del N terminal.

**-Azufre:** Metionina.

### **Polares sin carga**

**-Grupos –OH:** Serina, Treonina

**-Grupo fenol:** Tirosina

**-Tiol –SH:** Cisteína

**-Grupo amida:** Asparagina, Glutamina

### **Polares con carga**

**-Ácidos:** Ácido aspártico, Ácido glutámico

**-Básicos:** Lisina, Arginina, Histidina

## **HISTIDINA**

Es fundamental para el mantenimiento de la vida celular. El pKa de su grupo imidazol está próximo al pH fisiológico y su mejor capacidad tamponadora ronda ese pH, es por ello que abunda en la hemoglobina.

## INTERACCIONES R-R (ENTRE LAS CADENAS LATERALES)

### No covalentes

**-Van der Waals:** por los aminoácidos apolares

**-Puentes de hidrógeno:** carbonilos del Asp, Glu, grupo OH, fenol y amida, incluso también Lys, Arg e His.

**-Interacciones iónicas:** un aminoácido con carga neta positiva establece la interacción con uno de carga neta negativa. Interacciones entre aminoácidos ácidos y básicos (Lys + Asp).

### Covalentes

**Cadenas laterales de Cys:** enlaces disulfuro o S-S.

**Propiedades estereoquímicas:** Todos los proteicos son de configuración L, pero pueden ser dextro o levo debido a que todos, por lo menos tienen un átomo de carbono asimétrico (excepto la Gly).

**Propiedades espectroscópicas:** Los tres aminoácidos aromáticos Phe, Tyr y Trp absorben a una longitud de onda  $\lambda$  de 280nm. En un péptido con 10 aminoácidos es posible que no se encuentren residuos aromáticos y la determinación de la concentración en disolución por espectroscopia UV sea más complicada, pero en las proteínas se podría aventurar a decir que todas pueden llegar a tener residuos aromáticos. Para determinar la concentración de la proteína o péptido en disolución, hay que medir la absorbancia a 280nm, esto nos da unos valores densidad óptica en función con la cantidad de aminoácidos aromáticos presentes.

A partir de la ecuación de Lambert-Beer, se obtiene la siguiente razón:  $A = \epsilon \cdot C \cdot l$  donde A es la absorbancia,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción (característico y definido para cada proteína), C es la concentración y l es el paso óptico en cm de la cubeta empleada para hacer la medición.

**Reacción con la ninhidrina:** La ninhidrina es un reactivo que da color al interaccionar con los aminoácidos. Para que la reacción se lleve a cabo, hacen falta los grupos amino y carboxilo libres. Esta sustancia que se disuelve en etanol o metanol y cuando reacciona con un aminoácido a 100°C, el aminoácido se descarboxila (se libera un  $\text{CO}_2$ ), el C- $\alpha$  se oxida; de esta forma se crea una molécula con dobles enlaces conjugados de color violeta.

La intensidad del color nos puede dar una idea sobre la concentración de aminoácidos presentes durante la prueba. Hay que recordar que la Prolina es un aminoácido cíclico (el grupo amino no es terminal) y es por ello que no reacciona con la ninhidrina.

## **AMINOÁCIDOS PROTEICOS MODIFICADOS**

Durante el proceso de maduración o modificación de las proteínas, algunos residuos sufren modificación. Es lo que se llama modificación postraduccionales. Algunos ejemplos de ellos son la fosfoserina, donde el grupo -OH de la Ser se ha reemplazado por un fosfato.

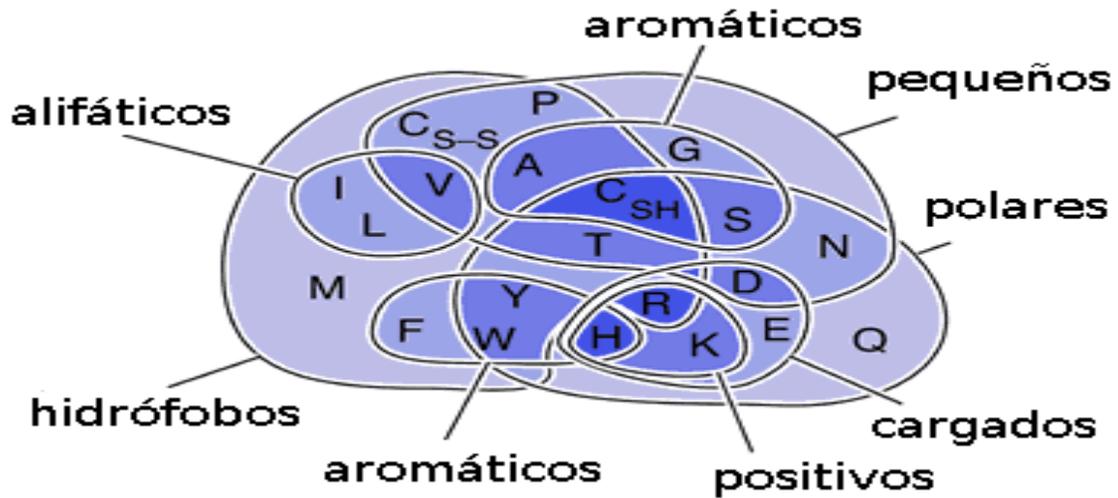
**Hidroxilisina:** un grupo -OH se incorpora en el carbono 3.

**Hidroxirolina:** en el carbono cíclico, se une un OH.

## **CLASIFICACIÓN**

Existen muchas formas de clasificar los aminoácidos; las dos que se presentan a continuación son las más comunes.

Según las propiedades de su cadena



Otra forma de clasificar los aminoácidos de acuerdo a su cadena lateral.

Los aminoácidos se clasifican habitualmente según las propiedades de su cadena lateral:

**-Neutros polares, polareso hidrófilos:** Serina (Ser, S), Treonina (Thr, T), cisteína (Cys, C), glutamina (Gln, Q), Asparagina (Asn, N), tirosina (Tyr, Y).

**-Neutros no polares, apolares o hidrófobos:** Alanina (Ala, A), Valina (Val, V), leucina (Leu, L), isoleucina (Ile, I), metionina (Met, M), Prolina (Pro, P), fenilalanina (Phe, F), triptófano (Trp, W) y glicina (Gly, G).

**-Con carga negativa o ácidos:** ácido aspártico (Asp, D) y ácido glutámico (Glu, E).

**-Con carga positiva o básicos:** lisina (Lys, K), arginina (Arg, R) e histidina (His, H). Fenilalanina (Phe, F), tirosina (Tyr, Y) y triptófano (Trp, W) (ya incluidos en los grupos neutros polares y neutros no polares).

## SEGÚN SU OBTENCIÓN

A los aminoácidos que deben ser captados como parte de los alimentos se los llama esenciales; la carencia de estos aminoácidos en la dieta limita el desarrollo del organismo, ya que no es posible reponer las células de los tejidos que mueren o crear tejidos nuevos, en el caso del crecimiento. Para el ser humano, los aminoácidos esenciales son:

- Valina (Val, V)
- Leucina (Leu, L)
- Treonina (Thr, T)
- Lisina (Lys, K)
- Triptófano (Trp, W)
- Histidina (His, H) \*
- Fenilalanina (Phe, F)
- Isoleucina (Ile, I)
- Arginina (Arg, R) \*
- Metionina (Met, M)

A los aminoácidos que pueden sintetizarse en el propio organismo se los conoce como no esenciales y son:

- Alanina (Ala, A)
- Prolina (Pro, P)
- Glicina (Gly, G)
- Serina (Ser, S)
- Cisteína (Cys, C) \*\*
- Asparagina (Asn, N)
- Glutamina (Gln, Q)
- Tirosina (Tyr, Y) \*\*
- Ácido aspártico (Asp, D)

- Ácido glutámico (Glu, E)

Estas clasificaciones varían según la especie e incluso, para algunos aminoácidos, según los autores. Se han aislado cepas de bacterias con requerimientos diferenciales de cada tipo de aminoácido.

### **SEGÚN LA UBICACIÓN DEL GRUPO AMINO**

- **Alfa-aminoácidos:** El grupo amino está ubicado en el carbono n.º 2 de la cadena, es decir el primer carbono a continuación del grupo carboxilo (históricamente este carbono se denomina carbono alfa). La mayoría de las proteínas están compuestas por residuos de alfa-aminoácidos enlazados mediante enlaces amida (enlaces peptídicos).

- **Beta-aminoácidos:** El grupo amino está ubicado en el carbono n.º 3 de la cadena, es decir en el segundo carbono a continuación del grupo carboxilo.

- **Gamma-aminoácidos:** El grupo amino está ubicado en el carbono n.º 4 de la cadena, es decir en el tercer carbono a continuación del grupo carboxilo.

### **AMINOÁCIDOS CODIFICADOS EN EL GENOMA**

Los aminoácidos proteicos, canónicos o naturales son aquellos que están codificados en el genoma; para la mayoría de los seres vivos son 20: alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, fenilalanina, glicina, glutamato, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptófano y valina.

## AMINOÁCIDOS MODIFICADOS

Las modificaciones postraduccionales de los 20 aminoácidos codificados genéticamente conducen a la formación de 100 o más derivados de los aminoácidos. Las modificaciones de los aminoácidos juegan con frecuencia un papel de gran importancia en la correcta funcionalidad de una proteína.

Existen muchos aminoácidos no proteicos que juegan papeles distintos en la naturaleza y pueden o no provenir de aminoácidos. Ejemplos de estos aminoácidos no proteínicos son:

- Sarcosina
- Etilglicina o ácido  $\alpha$ -aminobutírico (AABA)
- Ácido de jencólico
- Hipoglicinas A y B
- Mimosina
- Aliina
- Canalina
- Canavanina
- Ornitina
- Homometionina
- Homoserina
- Homoarginina
- Homofenilalanina
- Homocisteína
- Homoleucina
- Cistationina
- Norvalina
- Norleucina
- Ciclopentenilglicina

- B-Alanina
- Ácido gamma-aminobutírico
- Ácido iboténico
- Ácido pipecólico
- Ácido guanidinacético
- Taurina
- Ácido trans-2-amino-5-cloro-4-hexenoico
- Ácido trans-2-amino-5-cloro-6-hidroxi-4-hexenoico
- Ácido 2-amino-4-cloro-4-pentenoico
- Ácido diaminopimélico
- Semialdehído aspártico
- Semialdehído glutámico
- Citrulina
- DOPA
- Quinurenina
- Nicotianina
- Ácido 2-azetidincarboxílico
- B-(4-hidroxibenzotiazol-6-il) alanina
- B-(2-metil-4-hidroxibenzotiazol-6-il)-alanina
- Indospicina
- Nε-(indol-3-acetil) lisina
- (p-hidroximetil) fenilalanina
- 0-etil-L-homoserina, aislada de *Corynebacterium ethanolaminophilum*
- 5-Hidroxitriptófano
- Ácido licopérido, aislado de *Lycoperdon perlatum*
- Ácido lentínico
- Ácido estizolobínico
- Ácido estizolóbico
- Tiroxina
- Azoxibacilina

## ESTEREOISOMERÍA

Un estereoisómero es un isómero que tiene la misma fórmula molecular y cuadrícula, también la misma secuencia de átomos enlazados, con los mismos enlaces entre sus átomos, pero difieren en la orientación tridimensional de sus átomos en el espacio. Se diferencian, por tanto, de los isómeros estructurales, en los cuales los átomos están enlazados en un orden diferente dentro de la molécula.

### CLASIFICACIÓN

- Isómeros conformacionales, conformeros o rotámeros, fácilmente interconvertibles entre sí por la rotación en torno a enlaces.
- Se puede presentar en compuestos con cadenas abiertas, y en anillos.
- Isómeros configuracionales, solo interconvertibles entre sí mediante ruptura de enlaces.

### ESTOS, A SU VEZ, SE PUEDEN CLASIFICAR EN:

- **Estereoisómeros quirales:** No son superponibles con su imagen en el espejo. Pueden ser enantiómeros y diastereoisómeros.

\*Enantiómeros, que son imágenes especulares no superponibles entre sí. Si una molécula tiene un isómero especular no superponible se dice que es una molécula quiral, que posee quiralidad o que es ópticamente activa.

\*Diastereoisómeros o disterómeros, que son los demás estereoisómeros, los que no son enantiómeros, o sea, no son imágenes especulares entre sí.

Un compuesto puede tener como máximo un enantiómeros pero puede tener varios diastereoisómeros.

- Estereoisómeros no quirales: Son superponibles con su imagen en el espejo. Difieren en su mayor parte en la ordenación de los átomos en el plano. Pueden ser formas meso, isómeros cis-trans, isómeros sin-anti, isómeros E-Z, isómeros en do-exo, e isómeros in-out.

Los isómeros configuracionales son aislables, ya que es necesaria una gran cantidad de energía para interconvertibles (energía necesaria para la ruptura de enlaces), mientras que los isómeros conformacionales generalmente no son aislables, debido a la facilidad de interconversión a una temperaturas relativamente bajas. La rama de la stereoquímica que estudia los isómeros conformacionales que son aislables (la mayoría derivados del bifenilo) se llama atropoisomería.

## **PROPIEDADES OPTICAS DE LOS AMINOÁCIDOS**

Los aminoácidos son compuestos sólidos, cristalinos, incoloros, algunos con sabor dulce, de elevado punto de fusión, solubles en agua (por el grupo amino y el grupo carboxilo), y otras propiedades importantes.

### **ESTEREOISOMERÍA O ISOMERÍA ESPACIAL**

Todos los aminoácidos, excepto la glicina, tienen un carbono asimétrico, el carbono  $\alpha$ , enlazado a cuatro radicales diferentes: un grupo amino, un grupo carboxilo, un radical R y un hidrógeno. Como consecuencia, los aminoácidos presentan isomería.

### **Cada aminoácido puede tener dos estereoisómeros:**

- Con configuración D si al disponerlo en el espacio, de forma que el grupo carboxilo quede arriba, el grupo  $\text{-NH}_2$  queda situado a la derecha.
- Con configuración L, si el grupo  $\text{-NH}_2$  se encuentra a la izquierda.

Ambos estereoisómeros son imágenes especulares y no superponibles entre sí, por lo que son enantiómeros.

Todos los aminoácidos proteicos tienen configuración L.

### **ISOMERÍA ÓPTICA**

Los aminoácidos presentan actividad óptica por la existencia del carbono asimétrico, siendo capaces de desviar el plano de luz polarizada que atraviesa una disolución de aminoácidos.

Según hacia dónde desvía el plano de luz polarizada pueden ser:

- Dextrógiro o (+), si el aminoácido desvía el plano de luz polarizada hacia la derecha.
- Levógiro o (-), si lo desvía hacia la izquierda.

La configuración L o D es independiente de la actividad óptica, por lo que un L-aminoácido puede ser levógiro o dextrógiro, igual que otro con configuración D.

### **COMPORTAMIENTO ANFÓTERO**

Los aminoácidos disueltos en agua presentan un comportamiento anfótero, es decir, pueden ionizarse, comportándose como ácido o como base, dependiendo del pH. Esta característica se debe a la existencia del grupo carboxilo y del grupo amino:

- **Se comporta como ácido:** Los grupos  $\text{-COOH}$  liberan protones, quedando como  $\text{-COO}^-$ .

- **Se comporta como base:** Los grupos  $\text{-NH}_2$  captan protones, quedando como  $\text{-NH}_3^+$ .

Debido a su comportamiento anfótero, los aminoácidos tienden a neutralizar las variaciones de pH del medio, ya que pueden comportarse como un ácido o una base, liberando o retirando protones del medio.

Si el medio es ácido, el aminoácido se comporta como una base. El grupo  $\text{-COO}^-$  capta un protón y pierde su carga negativa.

Si el medio es básico, el aminoácido se comporta como un ácido. El grupo como  $\text{-NH}_3^+$  libera un protón y pierde su carga positiva.

Cada aminoácido tiene un pH en el que tiende a adoptar una forma dipolar neutra (o zwitterión), con tantas cargas positivas como negativas, que se denomina punto isoeléctrico.

## **PROPIEDADES QUÍMICAS DE LOS AMINOÁCIDOS**

### **PROPIEDADES DE LOS AMINOÁCIDOS**

- Sus pesos moleculares están entre los 57 y los 186 (un peso molecular promedio es 110 daltones).
- los aminoácidos como cristales tienen puntos de fusión ( $= 250^{\circ}\text{C}$ ).
- bastante solubles en agua.
- insolubles e solventes no polares.
- pueden tener carga eléctrica (dependiendo del PH) algunos (triptófano, fenilalanina y tirosina) pueden absorber fuertemente la luz ultra violeta (280 nm).

Pueden protonarse o desprotonarse, por lo que pueden actuar como donadores o aceptores de  $\text{H}^+$ , o sea pueden actuar como ácido o como bases y se comportan como iones dipolares o zwitteriones en solución acuosa.

### **PROPIEDADES ACIDO-BÁSICAS DE LOS AMINOÁCIDOS**

Las propiedades ácido-básicas de los aminoácidos son importantes, porque:

- Determinan muchas propiedades de las proteínas.
- ayudan a separarlos, identificarlos y cuantificar.

# MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE AMINOÁCIDOS

## SEPARACIÓN DE MOLÉCULAS POR CROMATOGRAFÍA

El estudio y caracterización de las distintas biomoléculas (azúcares, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) requiere en numerosos casos su aislamiento y purificación a partir de mezclas complejas como son los preparados de cualquier material biológico. Una de las técnicas bioquímicas más clásicas y utilizadas para dicho fin es la cromatografía. La cromatografía incluye una amplia gama de técnicas, que se pueden clasificar atendiendo al fundamento físico-químico en el que se basa la separación (cromatografía de adsorción, de reparto, de cambio iónico, de filtración molecular, hidrofóbica y de afinidad), o al material sobre el que se lleva a cabo (cromatografía en papel, capa fina, en columna y de gases).

Todas las técnicas intentan explotar las diferencias físicas, químicas y biológicas de las distintas biomoléculas para llevar a cabo su separación y aislamiento. Entre dichas propiedades podríamos citar:

- Diferencias en solubilidad en diferentes solventes, tanto orgánicos como acuosos.
- Diferencias en tamaño y forma.
- Diferencias en carga.
- Diferencias en afinidad por otras biomoléculas.

Todas estas propiedades y, por tanto, la separación de diferentes compuestos están influenciadas por las condiciones del medio de separación, pH, temperatura, fuerza iónica e hidrofobicidad.

De forma general, en las técnicas cromatografías existe una distribución de las moléculas entre dos fases, la fase estacionaria o parte del sistema separador que permanece fija en el espacio, y la fase móvil que circula sobre la fase estacionaria en íntimo contacto con ésta.

## **CROMATOGRAFÍA DE REPARTO**

En la presente práctica llevaremos a cabo una cromatografía de reparto, en capa fina, para la separación de aminoácidos. En la cromatografía de reparto los componentes de una mezcla se separan en base a una distribución diferente entre la fase móvil y la fase estacionaria.

El movimiento relativo de las moléculas a lo largo del sistema cromatográfico es el resultado de un equilibrio entre las fuerzas de transmisión o arrastre ejercido por la fase móvil en su desplazamiento sobre la fase estacionaria y las fuerzas que tienden a frenar dicho desplazamiento. Las fuerzas de frenado pueden ser tanto de reparto (basado en criterios de solubilidad) como de adsorción.

La teoría de la cromatografía de reparto se basa en que, en general, si dos fases inmiscibles se encuentran en contacto una con otra y si una de las dos fases contiene un soluto, éste se distribuirá entre ambas de acuerdo con sus solubilidades relativas. Dicho fenómeno se denomina reparto y viene determinado por el coeficiente de reparto, que es la relación entre las concentraciones del soluto, en el equilibrio, en las dos fases. En la cromatografía de reparto tenemos un soporte inerte al que está unida la fase estacionaria líquida. La mezcla a separar junto con la fase móvil se hace avanzar a lo largo de la fase estacionaria por capilaridad.

## **CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA**

En la cromatografía en capa fina, CCF o TLC ("thin-layer chromatography, en la terminología inglesa) se puede utilizar como soporte cualquier sustancia que pueda dividirse en partículas finas y distribuirse uniformemente en forma de láminas. Esto incluye sustancias inorgánicas (gel de sílice, óxido de aluminio, tierra de diatomeas, silicato de magnesio, etc) y orgánicas (celulosa, poliamida, polietileno, etc).

La CCF presenta una serie de ventajas respecto a cromatografías alternativas, como es la de papel, tales como las siguientes:

- Una mayor resolución, obteniéndose por lo general manchas más pequeñas.
- Una mayor velocidad de separación.
- Pueden utilizarse un gran número de materiales como soportes y disolventes.
- Los compuestos pueden ser detectados con facilidad y su recuperación es muy simple.

La mayor resolución obtenida por CCF se debe a que pueden formarse partículas muy finas del soporte, por lo que la relación superficie/volumen es muy elevada, proporcionando una gran área superficial por unidad de longitud. Esto se traduce en que la cantidad de muestra que se puede aplicar es mayor y la difusión es mucho menor.

La ventaja respecto a la cromatografía en papel es que éste tiene una estructura fibrosa y la capilaridad asociada a las fibras tiende a aumentar la difusión de las moléculas.

## **REACCIONES COLOREADAS DE AMINOÁCIDOS**

Los métodos colorimétricos de determinación de aminoácidos se basan en la reacción específica de éstos con determinados compuestos, dando derivados coloreados. La formación de color se toma como resultado positivo e indica su presencia, mientras que el no desarrollo de color es indicativo de que no está presente. Para cada prueba se utilizará un control negativo, también denominado blanco de la reacción, en el que el reactivo se añadirá a agua destilada (o solvente adecuado).

Hay métodos de determinación de aminoácidos con el grupo amino libre (método de la ninhidrina), de aminoácidos con núcleos aromáticos (reacción xantoproteica), de los que poseen un grupo indólico (triptófano; reacción con el ácido glioxílico), un anillo fenólico (tirosina; reacción de Millón), de aminoácidos azufrados (cisteína; reacción con nitroprusiato sódico). En todos los métodos, el aminoácido reacciona con otro compuesto formando derivados coloreados que se pueden determinar cuantitativamente por espectroscopia visible.

La técnica es muy sensible, por lo que es ideal para detectar concentraciones bajas de aminoácidos, utilizándose para revelar su presencia en cromatogramas y fracciones procedentes de otras técnicas de separación. La presencia de aldehídos resultantes de la degradación de la ninhidrina por reacción con los aminoácidos modifica, bajo ciertas condiciones, el color formado, lo que sirve para identificar el tipo de aminoácido.

### **OBJETIVOS**

- Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina sobre gel de sílice.
- Revelado de los aminoácidos mediante la reacción coloreada con la ninhidrina.
- Cálculo del valor de  $R_f$  para cada uno de los aminoácidos. Justificación de las diferencias en  $R_f$  de los distintos aminoácidos.

- Identificación de la naturaleza de aminoácidos desconocidos.

### **LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO**

- Equipamiento
- Secador de pelo.
- Placa de silicagel para cromatografía en capa fina.
- Agitador de tubos.
- Tanque cromatográfico.
- Material
- Gradillas con tubos de ensayo.
- Juego de pipetas (0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 y 25,0 ml).
- Propipetas. Probetas (100 y 250 ml).
- Vasos de precipitado (100 y 500 ml).
- Frasco lavador con agua destilada.
- Recipientes de muestras biológicas de 50 ml.
- Papel de filtro.
- Capilares para aplicar muestras.
- Papel de parafilm.
- Rotulador de vidrio.
- Pipetas Pasteur de plástico.
- Guantes de látex.
- Frascos pulverizadores. Tijeras.
- Reactivos
- Glutamato.
- Glicina. Lisina.

- Prolina.
- Leucina.
- Solución problema de aminoácidos.
- Etanol.
- Hidróxido amónico.
- Ninhidrina.

## **PROTOCOLO A REALIZAR**

### **Paso primero**

Sobre una placa de silicagel de 20 x 20 cm se traza con un lápiz una recta paralela a uno de los bordes y a una distancia de éste de 2 cm. Sobre esta línea se pone 6 puntos equidistantes entre si y sobre los bordes.

**Advertencias:** No hay que tocar la parte del silica gel de la placa con las manos, ya que la contaminaríamos con aminoácidos procedentes de nuestras manos. No utilizar nunca bolígrafo ni rotulador. No horadar la placa cuando la marquéis.

### **Paso segundo**

En cada punto (identificados con el nombre de cada uno de los aminoácidos) se aplicarán tres gotas de la solución de aminoácidos y solución problema (un aminoácido en cada punto y en el último la solución problema). Se utiliza un capilar para aplicar la muestra gota a gota (hacerlo con mucho cuidado). Se seca con un secador de pelo después de haber aplicado cada gota. Se marca con lápiz, y en el extremo opuesto de la placa, algún indicativo del grupo que realiza la cromatografía.

### **Paso tercero**

Se añade al tanque cromatográfico eluyente hasta una altura aproximada de 1 cm y sin que éste alcance la zona de aplicación de las muestras. Se mete la placa en el tanque, se tapa y se deja desarrollar la cromatografía hasta que el eluyente alcance el borde superior, sin llegar a sobrepasarlo (2-3 h aproximadamente).

**Advertencia:** Se opera en la campana extractora de gases, ya que el eluyente es tóxico.

### **Paso cuarto**

Terminada la cromatografía se saca la placa, se marca la distancia recorrida por el eluyente, se seca dentro de la campana de gases con la ayuda de un secador de aire y se rocía con un pulverizador que contiene la solución reveladora (en la campana de gases). La placa se secará haciéndole llegar aire caliente con el secador.

**Advertencia:** Esta operación debe de hacerse en la campana extractora de gases.

## **PÉPTIDOS**

Los péptidos son moléculas compuestas a partir de los vínculos que entablan ciertos aminoácidos (que, a su vez, son ciertas clases de moléculas de carácter orgánico). La relación entre los aminoácidos quedaba establecida a través de lo que se conoce como un enlace peptídico.

Es importante destacar que las proteínas también se forman mediante las uniones de los aminoácidos. Por lo general, cuando se involucran más de un centenar de aminoácidos, se habla de proteínas, mientras que las moléculas que presenta una cantidad inferior ingresan en el grupo de los péptidos. Los péptidos, por lo tanto, tienen menor masa.

### **FUNCIONES**

En los animales superiores llama la atención el hecho de como unos pocos aminoácidos que no presentan actividad algunas en forma aislada son capaces de desencadenar respuestas biológicas tan intensas. Los péptidos se producen generalmente mediante la hidrolisis de proteínas precursoras, aunque en hongos y bacterias existen sistemas de síntesis peptídicas no ribosómica. En los cuales los aminoácidos son activados a través de una vida diferente.

Entre las funciones biológicas más importantes que utilizan los péptidos podemos destacar las siguientes:

#### **Agentes vasoactivos**

El agente hipertenso más potente que se conoce es la angiotensina II, un octapeptido que se origina mediante la hidrolisis de una proteína precursora que se llama angiotensinogeno, y que no tiene actividades vasopresora.

Otros péptidos son agentes hipotensores (tienen actividad vasodilatadora). Uno de los mejores conocidos es la bradiquinina, un nonapeptido que se origina mediante la hidrolisis de una proteína precursora que se llama quinogeno.

## Hormonas

Son señales químicas que ejercen su acción sobre órganos y tejidos situados lejos del hogar donde se ha sintetizado. Muchas hormonas tienen estructura peptídica, como por ejemplo:

- **oxitócica:** nonapeptido (CYIQNCPLG) segregado por I hipófisis. Provoca la contracción uterina y la secreción de la leche por las glándulas mamarias. Facilitando el parto y la alimentación del recién nacido.
- **vasopresina:** nonapeptido (CYFQNCPRG) que induce la reabsorción de agua en el riñón (también se llama hormonas antidiuréticas).
- **somatostatina:** tetradecapéptido que inhibe la liberación de las hormonas del crecimiento.
- **insulina:** hormona compuesta por 51 aminoácidos sintetizada en el páncreas. Estimula la absorción de glucosa por parte de las células. Su ausencia es causa de diabetes, fue el primer péptido que se secuenció por métodos químicos. Está formada por 2 cadenas polipeptídicas unidas entre sí mediante 3 puentes disulfuro.
- **glucagón:** hormonas compuestas por 29 aminoácidos liberadas por el páncreas cuando los niveles de azúcar en sangre son altos. Hace que en hígado, el glucógeno se hidrolice para generar glucosa. Sus efectos son los contrarios a los de la insulina.

## Neurotransmisiones

Son señales químicas producidas en un terminal nervioso presináptico, y que a través de un receptor específico ejercen su acción sobre la neurona post-sináptica. Son neurotransmisores peptídicos las encefalinas (pentapéptidos), la B-endorfina (de 31 aminoácidos) y la sustancia P (undecapéptido).

## **Antibióticos**

La valinomicina y la gramicidina S son 2 péptidos cíclicos con acciones antibióticas. Los 2 contienen aminoácidos de la serie D, además de otros aminoácidos no proteicos.

La valinomicina es un ionoforo es capaz de transportar iones potasio a través de las membranas biológicas.

## **Antioxidantes**

El glutatión (H-y-Cys-Cly-OH) es un tripéptido que actúa como antioxidante celular. Reduce las especies reactivas del oxígeno (como el peróxido de H) gracias a la enzima glutatión peroxidasa, la cual cataliza la siguiente reacción  $H_2O_2 + 2GSH > GSSG + 2H_2O$ .

## **REACCIONES**

### **Reacciones químicas de los péptidos**

Son las mismas que las de los aminoácidos, es decir, las que den respectivamente sus grupos amino, carboxilo y R. Estas reacciones (sobre todo las de los grupos amino y carboxilo) se han empleado para secuenciar péptidos.

### **Reacciones del grupo amino**

En cuanto a las reacciones del grupo amino, es muy interesante la reacción con el reactivo de Sanger para secuenciar, ya que si tenemos el 2,4-dinitrofenil-péptido y lo hidrolizamos por hidrólisis ácida, se hidrolizarán todos los enlaces peptídicos y obtendremos el dinitrofenil del primer aminoácido de la secuencia, el  $-NH_2$  terminal, más el resto de los aminoácidos disgregados en el medio.

En esta reacción, el núcleo coloreado de dinitrobenceno se une al átomo de nitrógeno del aminoácido para producir un derivado amarillo, el derivado 2,4-dinitrofenil o DNP-aminoácido.

El compuesto DNFB reaccionara con el grupo amino libre del extremo amino de un polipéptido, así como también con los grupos amino de los aminoácidos libres. El enlace C–N que se forma es por lo general mucho más estable que un enlace peptídico. De esta forma, haciendo reaccionar una proteína nativa o un polipéptido intacto con el DNFB, hidrolizando la proteína en ácido y aislando los DNP-aminoácidos coloreados, puede identificarse el grupo amino terminal del aminoácido en una cadena polipeptídica. El grupo amino terminal de la lisina y algunos otros grupos funcionales de las cadenas laterales también reaccionarán con el DNFB.

Se separan ambos compuestos y por cromatografía se detecta. Con el resto del péptido se sigue con el mismo procedimiento hasta tener la secuencia completa.

Este método se conoce como degradación de Edman, y es la reacción que usan los secuenciadores automáticos de proteínas. Pero estos secuenciadores solo pueden secuenciar los 20 o 30 primeros aminoácidos, por lo que tendremos que hidrolizar y seguir después. Esto es porque el rendimiento no es del 100% y perdemos péptido poco a poco, y al final no nos queda. Solo las enzimas consiguen un rendimiento al 100%.

### **Reacciones del grupo carboxilo**

También podemos secuenciar empezando por el extremo carboxilo-terminal, para lo que se usan enzimas como la carboxipeptidasa. Es una proteasa que hidroliza los enlaces peptídicos. Ésta en concreto es una exoproteasa (ataca a la proteína por un extremo) que ataca al extremo carboxilo terminal.

Se emplean 2 tipos, la carboxipeptidasa A y B. Catalizan la misma reacción, pero tienen especificidad distinta. La A solo rompe el enlace peptídico si el aminoácido carboxilo-terminal es hidrofóbico. La B lo rompe si es básico.

Hay que controlar muy bien el tiempo de reacción, ya que cuando se libera un carboxilo terminal el siguiente aminoácido se convierte en el carboxilo terminal.

## Reacciones de los grupos R

Respecto a las reacciones de los grupos R, existen muchos reactivos que reaccionan de forma específica con determinados grupos R (OH de la serina, tiol de la cisteína...). Esto se usa para ver qué aminoácido es esencial para el funcionamiento de la proteína.

Dentro de las reacciones de los grupos R, una interesante desde el punto de vista de aislamiento y purificación de proteínas es la del grupo tiólico (-SH) de la cisteína, que es fuertemente reductor. En presencia de O<sub>2</sub> tiene mucha tendencia a oxidarse. Si hay dos moléculas de cisteína, en presencia de oxígeno, se oxidan para originar una molécula de cistina.

Cuando aislamos una proteína de su entorno natural, ponemos a la proteína en presencia de oxígeno, con lo que esos grupos tiólicos se pueden oxidar, y la proteína perder su funcionalidad.

Para evitar esto, en los medios de aislamiento y purificación de proteínas añadimos β-mercapto-etanol, cuyo grupo tiólico es más reductor que el de la propia cisteína; tiene más tendencia a oxidarse.

Cuando queremos estudiar la composición de aminoácidos de una proteína tenemos que hidrolizarla completamente, con lo que tenemos una mezcla de todo el conjunto de aminoácidos libres que constituyen dicha proteína.

## PROTEÍNAS

Las proteínas son moléculas formadas por aminoácidos que están unidos por un tipo de enlaces conocidos como enlaces peptídicos. El orden y la disposición de los aminoácidos dependen del código genético de cada persona. Todas las proteínas están compuestas por:

- Carbono
- Hidrógeno

- Oxígeno
- Nitrógeno

Y la mayoría contiene además azufre y fósforo.

Las proteínas suponen aproximadamente la mitad del peso de los tejidos del organismo, y están presentes en todas las células del cuerpo, además de participar en prácticamente todos los procesos biológicos que se producen.

## TIPOS

### Según su origen

Según su origen pueden ser proteínas animales y proteínas vegetales:

- **Proteínas animales:** Son aquellas que proceden de los animales (carnes, pescados, huevos, lácteos, etc).
- **Proteínas vegetales:** Son aquellas que proceden de los vegetales como las legumbres, las semillas, los frutos secos, etc.

### Según su función

Según su función las proteínas pueden clasificarse en:

- **Hormonales:** Estas proteínas son transportadas a través de la sangre y emiten información de una célula a otra.
- **Enzimáticas:** son aquellas que aceleran los procesos metabólicos en las células (la digestión, funciones del hígado, etc).
- **Estructurales:** son necesarias para nuestro cuerpo como el colágeno, la queratina y la elastina.

- **Defensivas:** Estas proteínas tienen una función inmunitaria para protegernos de las bacterias.
- **De almacenamiento:** Son aquellas que guardan minerales como el potasio o el hierro.
- **Transportadoras:** las proteínas transportan minerales a las células, como es el caso de la hemoglobina.
- **Receptores:** son usadas en la comunicación entre las células.
- **Motoras:** son las que regulan la fuerza, la velocidad del corazón y las contracciones musculares.

### **Según su composición**

Los tipos de proteínas pueden ser:

- **Simples:** aminoácidos.
- **Conjugadas:** contienen un componente no aminoácido (dentro de las cuales están las glucoproteínas, lipoproteínas, nucleoproteínas, metaloproteína, hemoproteína).

### **FUNCIONES**

Las proteínas desempeñan un papel importante en muchos procesos biológicos y funciones cruciales. Son muy versátiles y tienen muchas diversas funciones en la carrocería, según lo enlistado abajo:

- Actúe como catalizadores.

- Transporte otras moléculas.
- Salve otras moléculas.
- Proporcione el apoyo mecánico.
- Ofrezca la protección inmune.
- Genere el movimiento.
- Transmita los impulsos de nervio.
- Controle el incremento y la diferenciación de la célula.

El fragmento al cual la estructura de proteínas tiene un impacto en su función es mostrado por el efecto de cambios en la estructura de una proteína. Cualquier cambio a una proteína en cualquier nivel estructural, incluyendo cambios ligeros en el plegamiento y la forma de la proteína, puede hacerla no funcional.

## **PROPIEDADES**

### **Solubilidad**

Las proteínas son solubles en agua cuando adoptan una conformación globular. La solubilidad es debida a los radicales (-R) libres de los aminoácidos que, al ionizarse, establecen enlaces débiles (puentes de hidrógeno) con las moléculas de agua. Así, cuando una proteína se solubiliza queda recubierta de una capa de moléculas de agua (capa de solvatación) que impide que se pueda unir a otras proteínas lo cual provocaría su precipitación (insolubilización). Esta propiedad es la que hace posible la hidratación de los tejidos de los seres vivos.

### **Capacidad amortiguadora**

Las proteínas tienen un comportamiento anfótero y esto las hace capaces de neutralizar las variaciones de pH del medio, ya que pueden comportarse como un ácido o una base y por tanto liberar o retirar protones ( $H^+$ ) del medio donde se encuentran.

## **Desnaturalización y renaturalización**

La desnaturalización de una proteína se refiere a la ruptura de los enlaces que mantenían sus estructuras cuaternaria, terciaria y secundaria, conservándose solamente la primaria. En estos casos las proteínas se transforman en filamentos lineales y delgados que se entrelazan hasta formar compuestos fibrosos e insolubles en agua.

Los agentes que pueden desnaturalizar a una proteína pueden ser: calor excesivo; sustancias que modifican el pH; alteraciones en la concentración; alta salinidad; agitación molecular; etc... El efecto más visible de éste fenómeno es que las proteínas se hacen menos solubles o insolubles y que pierden su actividad biológica.

La mayor parte de las proteínas experimentan desnaturalizaciones cuando se calientan entre 50 y 60 °C; otras se desnaturalizan también cuando se enfrían por debajo de los 10 a 15 °C.

Algunas veces, se produce la renaturalización, cuando al volver a las condiciones normales, la proteína recupera la conformación primitiva.

### **La desnaturalización puede ser:**

- **Irreversible.** Si la proteína desnaturalizada no puede recuperar su conformación nativa ni su funcionalidad. Renaturalización
- **Reversible.** Se produce renaturalización, recuperando la proteína su conformación nativa y funcionalidad.

## **Especificidad**

Es una de las propiedades más características y se refiere a que cada una de las especies de seres vivos es capaz de fabricar sus propias proteínas (diferentes de las de otras especies) y, aún, dentro de una misma especie hay diferencias proteicas entre los distintos individuos. Esto no ocurre con los glúcidos y lípidos, que son comunes a todos los seres vivos.

### **Se distinguen dos tipos de especificidad:**

- **Especificidad de función:** Cada proteína está especializada en una determinada función. La secuencia de aminoácidos condiciona la estructura cuaternaria de la proteína, que es la responsable, en última instancia, de su función característica. Una pequeña variación en la secuencia de aminoácidos puede provocar la pérdida de funcionalidad de la proteína.

- **Especificidad de especie:** Cada especie tiene proteínas exclusivas, pero las proteínas que desempeñan la misma función en diferentes especies suelen tener una composición y estructura similares. A estas proteínas se les llama proteínas homólogas, como la insulina, exclusiva de vertebrados, pero cuya cadena A es idéntica en la especie humana, el cerdo, el perro, el conejo y el cachalote.

La enorme diversidad proteica interespecífica e intraespecífica es la consecuencia de las múltiples combinaciones entre los aminoácidos, lo cual está determinado por el ADN de cada individuo.

La especificidad de las proteínas explica algunos fenómenos biológicos como: la compatibilidad o no de trasplantes de órganos; injertos biológicos; sueros sanguíneos; etc... O los procesos alérgicos e incluso algunas infecciones.

### **CLASIFICACIÓN**

#### **Su Clasificación se detiene según el tipo de estructura terciaria:**

-**Proteínas globulares:** adquieren formas más o menos esféricas o redondeadas; generalmente son solubles en agua o en disoluciones diluidas.

- **Proteínas fibrilares:** adquieren formas alargadas; generalmente son insolubles en agua y las responsables de la mayor parte de las estructuras fijas de los organismos.

## **Clasificación según las funciones que desempeñan en los organismos**

**-Proteínas estructurales:** contribuyen a fijar la forma o dar rigidez o flexibilidad a las diversas partes de los organismos, desde los orgánulos celulares a los miembros de los pluricelulares. Pertenecen a este grupo la mayor parte de las proteínas fibrilares, como el colágeno de los tendones, la queratina de pelos y uñas, la fibroína de la seda.

**-Proteínas de reserva:** constituyen un almacén de aminoácidos que el organismo utilizará en el crecimiento o reparación de sus estructuras y en su desarrollo. Ejemplos son la albumina de las semillas, leche y huevos.

**-Proteínas activas:** que desempeñan múltiples funciones activas en el funcionamiento del organismo; todas tienen en común que para desempeñar su función han de interactuar específicamente con otra sustancia llamada ligando. A su vez podemos subdividir esta clase de proteínas en las siguientes:

**Enzimas:** se unen a un ligando que se denomina sustrato y catalizan su transformación química en otra sustancia diferente.

**Proteínas transportadoras:** se unen reversiblemente a un ligando y lo transportan de un lugar a otro del organismo. Actúan así la hemoglobina y la mioglobina, citadas como proteínas conjugadas transportadoras de oxígeno, la primera en la sangre y la segunda en el interior de la célula. Existen proteínas con forma de canal que sirven para la entrada y salida de otras moléculas a través de la membrana celular, como los canales de potasio.

**Proteínas reguladoras:** interactúan con el ligando y ponen en marcha determinados procesos celulares. Por ejemplo, los receptores hormonales, al unirse a una hormona, el ligando, desencadenan un proceso o conjunto de reacciones en la célula.

## ALIMENTOS RICOS EN PROTEÍNAS

Los alimentos más ricos en proteínas son los de origen animal como la carne, el pescado, huevo, leche, queso y yogur. Además de estar presentes en grandes cantidades, las proteínas de estos alimentos son de alto valor biológico, es decir, también son de mejor calidad siendo utilizadas por el organismo más fácilmente.

Sin embargo, legumbres como los guisantes, los granos y la soya también poseen buenas cantidades de proteína y pueden ser utilizados en una dieta equilibrada para mantener un buen funcionamiento del organismo, formando parte de los alimentos incluidos en las dietas vegetarianas.

Las proteínas son esenciales para el funcionamiento del organismo, debido a que están relacionadas con el proceso de crecimiento, reparación y mantenimiento de los músculos, tejidos y órganos, además de la producción de hormonas. Vea con más detalles las funciones de las proteínas.

### Alimentos ricos en proteína animal

En la tabla a continuación se indica la cantidad de proteínas por cada 100 gramos de alimento:

ALIMENTOS	PROTEINA ANIMAL POR 100 GRAMOS	ENERGIA POR 100 GRAMOS
Carne de pollo	32,8 gramos	148 kcals
Carne de vaca	26,4 gramos	163 kcals
Carne de puerco (lomo)	22,2 gramos	131 kcals
Carne de pato	19,3 gramos	133 kcals
Carne de codorniz	22,1 gramos	119 kcals
Carne de conejo	20,3 gramos	117 kcals
Quesos en general	26 gramos	316 kcals
Salmon sin piel, fresco y crudo	19,3 gramos	170 kcals
Atún fresco y crudo	25,7 gramos	118 kcals
Bacalao salado crudo	29 gramos	136 kcals
Pescados en general	19,2 gramos	109 kcals
Huevo	13 gramos	149 kcals
Yogur	4,1 gramos	54 kcals
Leche	3,3 gramos	47 calorías

Kéfir	5,5 gramos	44 calorías
Camarones	17,6 gramos	77 kcals
Cangrejo cocido	18,5 gramos	83 kcals
Mejillones	24 gramos	172 kcals
Jamón	25 gramos	215 kcals

### Alimentos ricos en proteína vegetal

Los alimentos ricos en proteína vegetal son importantes principalmente en las dietas vegetarianas, proporcionando las cantidades adecuadas de aminoácidos para mantener la formación de músculos, células y hormonas en el organismo.

En la tabla a continuación se muestra los principales alimentos de origen vegetal que son ricos en proteínas:

ALIMENTOS	PROTEINA VEGETAL POR 100 GRAMOS	ENERGIA POR 100 GRAMOS
Soya	12,5 gramos	140 kcals
Quínoa	12,0 gramos	335 kcals
Trigo sarraceno	11,0 gramos	366 kcals
Semilla de mijo	11,8 gramos	360 kcals
Lentejas	9,1 gramos	108 kcals
Tofu	8,5 gramos	76 kcals
Frijoles	6,6 gramos	91 kcals
Guisantes	6,2 gramos	63 kcals
Arroz cocido	2,5 gramos	127 kcals
Semilla de linaza	14,1 gramos	495 kcals
Semilla de ajonjolí	21,2 gramos	584 kcals
Garbanzo	21,2 gramos	355 kcals
Cacahuete omaní	25,4 gramos	589 kcals
Nueces	16,7 gramos	699 kcals
Avellanas	14 gramos	689 kcals
Almendras	21,6 gramos	643 kcals
Nueces de Brasil	14,5 gramos	643 kcals

## **Cómo combinar las proteínas vegetales para aumentar su calidad**

En el caso de las personas vegetarianas y veganas, lo ideal para proporcionarle al organismo proteínas de alta calidad es combinar algunos alimentos que se complementan entre sí, algunos ejemplos son:

- Arroz y frijoles de cualquier tipo.
- Guisantes y semillas de mijo.
- Lentejas y trigo sarraceno.
- Quínoa y maíz.
- Arroz integral y frijoles rojos.

La combinación de estos alimentos y la variedad en la dieta son importantes para mantener el crecimiento y el buen funcionamiento del organismo en personas que no ingieren proteínas animales. En el caso de individuos ovolactovegetarianos, también pueden incluir en la dieta proteínas provenientes del huevo, de la leche y de sus derivados.

## PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Los péptidos bioactivos o péptidos con actividad biológica son los fragmentos cortos de la proteína (aminoácidos 2–20 de largo) que pueden influenciar una multitud de funciones corporales.

Los péptidos bioactivos difieren de las proteínas cuando se trata de largo (mientras que las proteínas consisten en generalmente series más largas de más de 200 aminoácidos). También contienen residuos más hidrofóbicos que la proteína media y se han mostrado para ser resistentes a las peptidasas de la digestión.

### FUENTES DE BIOPEPTIDES

**Fuentes de la instalación:** Los granos de cereal tales como trigo, cebada, arroz, centeno, avena, mijo, zahína, y maíz, son una fuente rica de péptidos bioactivos. El trigo y la avena tienen los péptidos de ACE, el inhibidor de la peptidasa del dipeptidyl, y péptidos inhibitorios con actividades antitrombóticas, antioxidantes, hipotensas, y del opiáceo.

El trigo y el arroz tienen series del péptido que muestren actividad anticáncer. Entre los cereales, el trigo y la cebada mostraron la abundancia más alta de péptidos con actividad biológica potencial.

**Fuentes animales:** La leche bovina, el queso, y los productos lácteos tienen altas cantidades de proteínas y de péptidos bioactivos. Esto podría ofrecer una razón posible por la que la leche es esencial para la nutrición en niños durante los meses tempranos después del nacimiento. La leche es una fuente rica de los péptidos biológicamente activos que se liberan durante la digestión.

El consumo de leche fermentada que contenga los péptidos bioactivos puede tensión arterial baja en pacientes hipertensos. Los huevos son otra fuente rica de péptidos biológicamente activos.

Los estudios muestran que la yema de huevo fresca tiene actividad antioxidante más alta que la clara de huevo fresca y los huevos enteros. El hidrolizado hervido de la clara de huevo mostró que la actividad bioactivos más alta del péptido y un total de 63 determinaron los péptidos. La carne y los pescados derivaron los péptidos también muestran los péptidos con las actividades del antihypertensive, del antioxidante, antimicrobianas y antiproliferativas in vitro.

## **PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

Para que un péptido sea considerado bioactivos, debe tener un efecto fisiológico de una manera positiva. Esta actividad de un péptido depende de su composición de aminoácido, aminoácido de N y de la C-terminal, largo de la cadena del péptido, carga de los aminoácidos, y la naturaleza hidrofílica hidrofóbica del aminoácido. Algunas de las propiedades farmacológicas de péptidos bioactivos se discuten abajo.

**Propiedades antioxidantes de péptidos biactive:** La oxidación es uno de los factores enfermedad-que causan del comandante en seres humanos. Los péptidos derivados de las proteínas de leche muestran propiedades antioxidantes y previenen la peroxidación de ácidos grasos esenciales. La digestión de la caseína también produce los péptidos phosphorylated con actividad antioxidante hidrofílica y lipofílica. Los péptidos de la soja muestran diversos grados de hidrólisis y de actividades antioxidantes.

**Propiedades antimicrobianas:** Los péptidos antimicrobianos (amperios) inhiben incremento de la célula y están implicados en microorganismos de la matanza, tales como bacterias y hongos. Los amperios se dividen a tres familias basadas en sus características estructurales: péptidos lineales espirales del  $\alpha$ -; péptidos cíclicos e indefinido disulfuro-puenteados; y péptidos con un alto contenido de los residuos específicos del aminoácido (ricos ego de la prolina, de la glicocola o de la histidina).

La mayoría de los amperios tienen propiedades catiónicas e hidrofóbica que lleven a la acción recíproca fácil con la pared celular o la membrana bacteriana aniónica. Los amperios derivados de la caseína muestran efecto inhibitorio contra los gingivalis de Streptococcus Mutans, del estreptococo sanguis, de Porphyromonas, el estreptococo sobrinus, Sthaphylococcus aurífero, Escherichia Coli, y las salmonelas typhimurium.

**Propiedades inmunomoduladores:** Las proteínas y los péptidos de fuentes tales como huevo, leche, soja, y fuentes de la instalación muestran propiedades antiinflamatorias. La ovotransferrina, una proteína de la clara de huevo, inhibe la proliferación de los linfocitos del bazo del ratón. Los péptidos de los hidrolizados de las proteínas del arroz y de la soja pueden estimular el ROS y accionar sistemas de defensa inmunes no específicos.

**Propiedades de Cytomodulatory:** Los estudios muestran que las composiciones citotóxicas qué específicamente célula mala del objetivo puede tener efectos anticáncer. Se ha propuesto que los péptidos bioactivos pueden poseer tales efectos protectores del cáncer.

**Efectos metabólicos:** Los cambios en metabolismo pueden llevar a varias condiciones, tales como diabetes, obesidad centrípeta, hipertensión, y dyslipidemia (triglicéridos elevados, lipoproteínas de baja densidad densas, y lipoproteínas de alta densidad inferiores). Varios péptidos bioactivos están implicados en su regla.

La Alfa-glucosidasa y la peptidasa IV (DPP-IV) del dipeptidyl están implicadas íntimo en el revelado del tipo - diabetes 2 (T2D). Uno de los péptidos extraídos de la demostración de la clara de huevo antidiabéticos y de propiedades inhibitorias de la  $\alpha$ -glucosidasa.

## **USOS DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

Nutraceuticals es sustancias del natural-origen extraídas de las frutas, de las plantas, de biomasa lignocelulósica, y de las algas que tienen subsidios por enfermedad importantes cuando están incorporadas en la comida o las formulaciones farmacéuticas.

Nutraceuticals está recibiendo la gran atención debido a su efecto sobre salud humana y enfermedades. Por ejemplo, los péptidos bioactivos se han agregado a las fórmulas suaves infantiles, al queso, y al yogur. Las plantas medicinales se están utilizando cada vez más en la fabricación de la comida debido a la presencia de antioxidantes naturales que ofrece propiedades alimenticias y terapéuticas.

## OXITÓCINA

La oxitócica (del griego ὄξύς oxys "rápido" y τόκος tokos "nacimiento") es una hormona producida por los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo que es liberada a la circulación a través de la neurohipófisis. Ejerce funciones como neuromodulador en el sistema nervioso central modulando comportamientos sociales, sentimentales, patrones sexuales y la conducta parental.

En las mujeres, la oxitocina es igualmente liberada en grandes cantidades tras la distensión del cérvix uterino y la vagina durante el parto, así como en la eyección de la leche materna en respuesta a la estimulación del pezón por la succión del bebé, facilitando por tanto el parto y la lactancia y luego del orgasmo por lo que se asocia con el placer sexual y la formación de vínculos emocionales.

En el cerebro parece estar involucrada en el reconocimiento y establecimiento de relaciones sociales y podría estar involucrada en la formación de relaciones de confianza y generosidad entre personas. Ejemplo de ello es que investigaciones han descubierto que la ausencia de la hormona oxitocina podría desempeñar un papel relevante en la aparición del autismo. También se piensa que su función está asociada con el contacto y el orgasmo.

### **FUNCIONES**

#### **Vinculada al amor**

Se dice frecuentemente que la oxitocina es la sustancia responsable de que exista el amor. Esto no deja de ser una conclusión reduccionista y algo aventurado, teniendo en cuenta que no existe una sola concepción sobre lo que es el amor y, en todo caso, en la experiencia subjetiva relacionada con el afecto y el enamoramiento intervienen muchas otras sustancias.

La oxitocina, como pasa con todos los neurotransmisores, nunca trabaja sola: siempre está encajada en un puzzle bioquímico que da forma a nuestra mente y nuestros actos.

Sin embargo, es verdad que hay algunos patrones en los que puede verse la relación que hay entre la oxitocina y todo ese conjunto de experiencias y procesos que tienen que ver con el amor y el afecto.

Por ejemplo, los niveles de oxitocina aumentan cuando hay que reconocer caras familiares. También aumentan al mirarse a los ojos con seres queridos, tiene un papel a la hora de recordar a miembros del propio grupo y, en general, es segregado en cantidades relativamente grandes en situaciones relacionadas con el amor y el apego. Cuando experimentamos la sensación de compartir una relación íntima con otra persona y cuando sentimos que estamos en un ambiente de confianza, se segrega más oxitocina, tal y como se explica en el artículo sobre la química del amor.

De hecho, se ha visto que en las personas con depresión crónica a las que se les da una dosis extra de oxitocina, estas tienden a prestar mayor atención a las caras felices que a las tristes.

### **Reguladora de los partos y la maternidad**

La oxitocina interviene en otros procesos más variados. Etimológicamente, la palabra “oxitocina” significa “nacimiento rápido” en griego. Esto es así porque, como hormona, la oxitocina tiene un papel muy importante en los partos y, por extensión, en la lactancia, dos procesos fundamentales en la maternidad, tal y como comprobó el fisiólogo Henry Dale, quien le puso nombre a esta sustancia.

En concreto, la oxitocina hace que ciertas fibras musculares del útero se mantengan contraídas durante el parto, y además es la responsable de que se den las contracciones antes del nacimiento. Además, la oxitocina tiene ciertos efectos mecánicos sobre las mamas, haciendo que estas eyecten leche materna.

### **El papel de esta hormona en la sexualidad**

Durante el acto sexual, los niveles de oxitocina en sangre acostumbran a ser significativamente más altos de lo normal. Esto refuerza la hipótesis de que esta hormona tiene un importante papel en los procesos químicos y mecánicos que intervienen en la sexualidad.

Se ha comprobado, por ejemplo, que la oxitocina interviene en la aparición de contracciones vaginales que hacen más fácil que el espermatozoides llegue al óvulo. En el caso de los hombres, produce contracciones en la próstata y las vesículas seminales. Además, tanto en hombres como en mujeres los niveles de oxitocina en sangre alcanzan su máximo durante el orgasmo.

### **Creando vínculos sociales**

Como hemos visto, la oxitocina está fuertemente asociada con la generación de lazos afectivos, y no solo los relativos a la maternidad.

Esto no es casual. El hecho de poder contar con la ayuda y el apoyo de otras personas es una de las grandes ventajas evolutivas que ha tenido nuestra especie, y es por eso que se puede decir que la oxitocina forma parte de ese pegamento social que tanto nos ha beneficiado. Si el hecho de entrar en contacto con una persona nos hace segregar más oxitocina, a la larga se entra en una dinámica química y relacional en la que los lazos personales son muy fuertes. De este modo, el vínculo se hace muy resistente y permanece a lo largo del tiempo.

### **ESTADOS DE RESPUESTA DEL CUERPO**

El cuerpo humano tiene dos patrones esenciales de respuesta y cada uno de ellos está regido por hormonas y transmisores bioquímicos que los define y los distinguen. Ambos mecanismos de respuesta son importantes para la supervivencia y la vida, y lo que los diferencia es el tiempo que nos ocupan.

**Listo para la acción:** Uno de ellos se produce cuando el cerebro percibe un peligro o amenaza y pone en marcha lo que se denomina la reacción de “lucha o huida” (atacar o escapar).

Eso desencadena una función de alarma que produce distintas reacciones corporales, como el aumento de la tensión arterial, la intensificación del metabolismo celular o un flujo mayor de sangre hacia los músculos de las extremidades que capacitan para la acción.

Esta reacción en cadena está mediada por el sistema nervioso vegetativo simpático y las hormonas de la corteza suprarrenal: adrenalina, noradrenalina, cortisol. Se trata de un estado de contracción. La energía se focaliza en el ataque o la huida, con lo que el organismo permanece en alerta máxima. Es una reacción circunstancial ante un estímulo real acotado en el tiempo.

**Estado de placidez:** El otro mecanismo de respuesta es el de la calma, la relajación y los estados de placidez. En este caso está mediada por diferentes hormonas (oxitocina, endorfinas, dopamina, serotonina) y se modula a través del sistema nervioso vegetativo parasimpático. Debería constituir la base, la forma de estar y sentir en la vida cotidiana.

Este estado, que se podría llamar de respuesta biológica positiva, se puede inducir y potenciar mediante la respiración consciente, mensajes desde la corteza cerebral, etc.

Estas respuestas se pueden identificar observando el estado de la saliva.

- El estado de alarma, se acompaña de boca seca y saliva espesa y amarga.
- El estado de placidez, por la boca húmeda y una saliva transparente.

No es casual, por tanto, que el estrés extremo se asocie a sequedad de garganta, mientras que la expresión “caerse la baba” se asocie a estados de gran admiración y relajación.

**Empatía y emociones:** Una parte importante en este tipo de reacciones es la función que desempeñan la relación y los afectos. La oxitocina tiene la capacidad de producir empatía, nos da la oportunidad de reconocer las emociones de los otros y responder afectivamente.

Se segrega simplemente por el contacto ocular entre dos personas. Es de vital importancia en el momento del parto, pues además de producir las contracciones que dilatan el cuello del útero y hacen progresar al bebé para su nacimiento, pone en marcha la creación del vínculo o impronta entre la madre y el bebé.

La oxitocina es el mediador químico que produce y sostiene el comportamiento maternal en la mujer y paternal en el hombre.

**Liberación espontánea:** Hay tres circunstancias de la vida sexual de la mujer que cursan con una liberación de oxitocina de niveles similares: el orgasmo, el parto y la lactancia.

Esta hormona es segregada por el cuerpo de cada mujer a su medida, por eso la oxitocina sintética con sus dosis mayores produce en algunos casos contracciones violentas del útero (espasmos) e intenso dolor.

Es importante saber que la oxitocina se segrega también por la estimulación del pezón, estrategia que se puede usar cuando el parto se ralentiza o bloquea.

En mi experiencia asistiendo partos en casa durante años he tenido la oportunidad de contemplar como una dilatación bloqueada se reanudaba al ponerse la hermanita a mamar.

**La oxitocina en la lactancia:** La oxitocina es imprescindible para la lactancia. Se libera tanto en la madre como en el bebé cuando se da de mamar.

En este acto se produce un "cuelgue de amor" mediado por la oxitocina y las endorfinas, que pasan desde el torrente circulatorio de la madre a la leche materna, y desde esta al bebé. Todo ello provoca en el bebé la liberación de estas mismas hormonas.

El médico sudafricano Nills Bergman, entusiasta de la investigación sobre el nacimiento, recalcó en Madrid el papel de la oxitocina en la producción y mantenimiento del vínculo materno-infantil. Tiene que ver, pues, con el aprendizaje de la capacidad de amar. Aprendemos a amar a través del modelo del amor materno.

## GLUTATIÓN

El glutatión (también glutatióna) (GSH)<sup>2</sup> es un tripéptido no proteínico constituido por tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina. Contiene un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato. Se trata del principal antioxidante de las células, es ubicuo y ayuda a protegerlas de las especies reactivas del oxígeno, como los radicales libres y los peróxidos.

Es nucleofílico en azufre y ataca los aceptores conjugados electrofílicos venenosos. Los grupos tiol se mantienen en un estado reducido a una concentración de aproximadamente ~ 5 mM en células animales. En efecto, el glutatión reduce cualquier enlace disulfuro formado dentro de proteínas citoplasmáticas de cisteínas, al actuar como un donante de electrones. En el proceso, el glutatión se convierte en su forma oxidada, llamada disulfuro de glutatión (GSSG). En las células, el glutatión se encuentra principalmente en su estado reducido (GSH) y, en mucha menor proporción, en su estado oxidado (GSSG).

Ello es así ya que la enzima que "reduce" el tripéptido a partir de su forma oxidada, la glutatión reductasa, es constitutivamente activa e inducible en situaciones de estrés oxidativo. De hecho, la proporción GSH/GSSG dentro de las células se utiliza a menudo como "indicador" del estado oxidativo de la célula y de la toxicidad celular.

### **FUNCIONES**

- Es el mayor antioxidante endógeno producido por las células, participando directamente en la neutralización de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS), así como el mantenimiento de los antioxidantes exógenos, como las vitaminas C y E en sus formas reducidas (activas).

- A través de la conjugación directa, participa en la desintoxicación compuestos extraños (xenobióticos) y agentes carcinógenos.
- En las plantas es esencial en la regulación del desarrollo y en las respuestas al medio ambiente (defensa frente a estreses bióticos y abióticos). En animales es esencial para el correcto funcionamiento del sistema inmunológico, participando por ejemplo, en la modulación de la presentación de antígenos a los linfocitos, en la proliferación de los linfocitos, y en la regulación de los procesos de apoptosis o muerte celular programada.
- Desempeña un papel fundamental en numerosas reacciones metabólicas y bioquímicas como: síntesis y reparación del ADN, síntesis de proteínas, transporte de aminoácidos, reacciones enzimáticas, metabolismo del azufre, etc.

## **PROBLEMAS DE LA SUPLEMENTACIÓN**

Si bien los especialistas vienen empleando el glutatión bajo forma inyectable, es frecuente ver en el mercado complementos nutricionales de glutatión en cápsulas. Por su composición el glutatión es muy sensible a la degradación en el estómago y su eficacia por vía oral es muy baja. Muy poco de este llega al hígado, su principal órgano diana. Los estudios clínicos han demostrado claramente este problema, hasta el punto de que científicos cubanos desarrollaron un método basado en la inhalación y el empleo en la interfaz pulmonar.

Para aumentar la tasa de glutatión reducido, se pueden emplear complementos a base de los aminoácidos precursores como la cisteína, la n-acetil cisteína, glicina o el ácido glutámico aunque este último no suele encontrarse en el mercado europeo. No se recomienda un exceso de ingesta de l- cisteína.

Otros productos que favorecen la tasa de glutatión, o su acción hepática, son el ácido lipoico, el cardo mariano (silimarina), la melatonina, la vitamina D, la SAME (s-adenosil metionina) o la cúrcuma.

## **GLUTATIÓN ORAL LIPOSOMAL**

El glutatión liposomal se prepara en el laboratorio, recubriendo la molécula con lecitinas naturales de soja o girasol, ricas en fosfolípidos. Las moléculas de glutatión quedan así protegidas de la degradación y pueden disponer de una biodisponibilidad superior. El precio del producto es superior pero puede evitar los inconvenientes de las formas inyectables. El producto disponible de glutatión liposomal es de la marca Curessuport. Se presenta en cajas de 30 sobres.

## **FACTOR LIBERADOR DE LAS GONADOTROPINAS**

La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), también conocida como hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), es una hormona peptídica responsable de la liberación de hormona estimulante del folículo (FSH) y de hormona luteinizante (LH) de la pituitaria anterior. La GnRH es sintetizada y liberada en las neuronas del hipotálamo. Se considera una neurohormona, es decir, una hormona producida en una célula neuronal y liberada en sus terminales neuronales.

Un área clave para la producción de GnRH es la zona preóptica del hipotálamo, que contiene la mayoría de las neuronas secretoras de GnRH. La GnRH es secretada en el torrente sanguíneo portal hipofisario, en la eminencia media. La sangre portal lleva la GnRH a la glándula pituitaria, que contiene células gonadotropas donde la GnRH activa su propio receptor.

El receptor de la GnRH (GNRHR) es un receptor con siete dominios transmembrana acoplados a proteína-G, que estimula la isoforma beta de la fosfolipasa C fosfoinositida (la cual moviliza el calcio y la proteína quinasa C). Esto resulta en la activación de proteínas implicadas en la síntesis y secreción de las gonadotropinas LH y FSH. La GnRH es degradada por proteólisis en pocos minutos.

La GnRH se encuentra también en órganos fuera del hipotálamo y la hipófisis, y su papel en otros procesos vitales es difícil de entender.

### **ESTRUCTURA Y GENÉTICA**

El gen GNRH1, precursor de la GnRH, se encuentra en el cromosoma 8. En los mamíferos, el decapeptido lineal que es producto final se sintetiza a partir de una prehormona de 92 aminoácidos en el hipotálamo anterior preóptica.

La identidad de la GnRH fue descubierta por los Premios Nobel de 1977 Roger Guillemin y Andrew V. Schally:

### **FUNCIONES**

En la hipófisis, la GnRH estimula la síntesis y secreción de las gonadotropinas:

- hormona folículo-estimulante (FSH).

- hormona luteinizante (LH).

Estos procesos son controlados por el tamaño y frecuencia de los pulsos de GnRH, así como por la retroalimentación de andrógenos y estrógenos. La baja frecuencia de pulsos de GnRH conduce a la liberación de FSH, mientras que la alta frecuencia de pulsos de GnRH estimula la liberación de LH.

Existen diferencias en la secreción de GnRH entre mujeres y hombres. En los hombres, la GnRH se secreta en pulsos a una frecuencia constante, mientras que en las mujeres la frecuencia de los pulsos varía durante el ciclo menstrual y hay una gran oleada de GnRH antes de la ovulación.

La secreción de GnRH es pulsátil en todos los vertebrados, y es necesaria para una correcta función reproductora. Por lo tanto, una sola hormona, GnRH1, controla un proceso complejo de crecimiento folicular, la ovulación y el mantenimiento del cuerpo lúteo en la hembra, así como la espermatogénesis en el varón.

## **ACTIVIDAD**

- La actividad de la GnRH es muy baja durante la infancia, y se activa en la pubertad.

Durante los años reproductivos, el pulso de actividad es fundamental para el éxito de la función reproductora en el control de los bucles de retroalimentación. Sin embargo, una vez que el embarazo está establecido, la actividad de la GnRH no es necesaria.

- La actividad pulsátil puede ser alterada por la enfermedad hipotalámica-pituitaria, ya sea por disfunción (es decir, supresión hipotalámica) o por lesiones orgánicas (traumatismos, tumores). Los niveles de prolactina elevados disminuyen la actividad de la GnRH. En cambio, la hiperinsulinemia aumenta el pulso de actividad que conduce a una actividad desordenada de la LH y la FSH, como sucede en el síndrome de ovario poliquístico. La formación de GnRH está ausente de forma congénita en el síndrome de Kallmann.

- Las neuronas de GnRH están reguladas por muchas neuronas aferentes distintas, utilizando varios transmisores (incluyendo norepinefrina, GABA, glutamato).

La dopamina puede inhibir la liberación de LH en mujeres ovariectomizadas. La kisspeptina parece ser un importante regulador de la liberación de GnRH. La liberación de GnRH también puede ser regulada por los estrógenos. Se ha informado de que hay neuronas productoras de kisspeptina que también expresan receptor de estrógeno alfa.

### **USOS MÉDICOS**

La GnRH está disponible como clorhidrato de gonadorelina (Factrel) para uso inyectable. Se utiliza a través de un sistema de bomba de perfusión para inducir la ovulación en pacientes con hipogonadismo hipotalámico.

Un análogo de la GnRH, la leuprolida, se utiliza por infusión continua para tratar el carcinoma de mama, la endometriosis, el carcinoma de próstata y la pubertad precoz.

## NIVELES ESTRUCTURALES DE LAS PROTEÍNAS

La rigidez del enlace peptídico posibilita que las proteínas adopten formas tridimensionales bien definidas. La libertad de rotación de los dos lados de la unidad peptídica es igualmente importante porque permite a las proteínas doblarse de formas muy diferentes. Las proteínas se disponen en el espacio formando una estructura tridimensional definida, que puede tener hasta cuatro niveles de organización: estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

**Estructura primaria:** Es la secuencia lineal de aminoácidos que integran una proteína, es decir, indica la cantidad y el tipo de los aminoácidos que la forman y el orden en que se encuentran unidos.

La estructura primaria de las proteínas está determinada en la información genética y los enlaces que mantienen su estabilidad son enlaces peptídicos. La comparación de secuencias de distintas proteínas permite establecer relaciones evolutivas entre especies.

La estructura primaria de las proteínas es lineal, y se convierte en tridimensional al plegarse.

**Estructura secundaria:** Es la organización regular y periódica en el espacio de las cadenas polipeptídicas en una dirección.

El plegamiento característico de este tipo de organización está determinado por la secuencia de aminoácidos y la rigidez del enlace peptídico, que sólo posibilita giros en torno a los enlaces sencillos. La estabilidad de esta estructura es posible gracias a los puentes de hidrógeno que se establecen entre los grupos amino y carboxilo.

**Estructura helicoidal o hélice  $\alpha$ :** Es la estructura secundaria más corriente. En ella, la cadena polipeptídica se va enrollando en espiral sobre sí misma debido a los giros que se producen en torno al carbono  $\alpha$  de cada aminoácido.

**Características:**

- Se establecen puentes de hidrógeno intracatenarios, entre el grupo  $-\text{CO}$  de un aminoácido y el grupo  $-\text{NH}$  del aminoácido situado cuatro residuos después.
- Hay 3'6 aminoácidos por vuelta de hélice, cada aminoácido gira  $100^\circ$  respecto al anterior.
- Se produce un avance por residuo de  $1'5 \text{ \AA}$ , por lo que el paso de rosca de  $5'4 \text{ \AA}$ .
- El giro en las hélices  $\alpha$  que se encuentran en las proteínas es dextrógiro (sentido de las agujas del reloj).
- Todos los grupos carboxilo quedan orientados en la misma dirección, mientras que los amino se orientan en la dirección contraria. Los radicales de los aminoácidos quedan dirigidos hacia el exterior de la  $\alpha$ -hélice.
- Los residuos de prolina e hidroxiprolina desestabilizan la  $\alpha$ -hélice, ya que estos aminoácidos impiden la formación de enlaces de hidrógeno.

**Estructura de hoja plegada o B-laminar:** En este tipo de estructura secundaria la cadena polipeptídica se pliega de manera que los planos de los enlaces peptídicos se disponen en forma de zig-zag. La interacción con otros fragmentos de la cadena conduce a la formación de láminas u hojas, en vez de estar estrechamente enrollada como en el caso de la hélice  $\alpha$ . En ella:

- Se establecen puentes de hidrógeno intercatenarios, entre grupos –NH y –CO de filamentos polipeptídicos diferentes.

- Las cadenas laterales se sitúan alternativamente por encima y por debajo del plano de la lámina.

- Cada resto de aminoácido ocupa 3'5 Å.

- Las cadenas adyacentes en una hoja plegada B pueden orientarse en la misma dirección (hojas B paralelas) o en direcciones opuestas (hojas B antiparalelas). En ambos casos, los radicales de los aminoácidos se orientan hacia ambos lados de la hoja, de forma alterna. La disposición antiparalela es un poco más compacta que la paralela, y aparece con mayor frecuencia en las proteínas.

Como se puede observar es necesario introducir giros o codos en las cadenas polipeptídicas que también se estabilizan por puentes de hidrógeno. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos se favorecerá una u otra estructura, y pueden aparecer combinadas en una misma proteína.

**Estructura terciaria:** La estructura terciaria define la forma tridimensional que adquiere una cadena polipeptídica, es decir, al modo en que una proteína se encuentra plegada en el espacio.

La estructura tridimensional condiciona la función de la proteína. En ella se pueden identificar agrupaciones de menor tamaño que denominamos dominios. El concepto de dominio es muy útil al explicar la relación entre estructura y función en las proteínas pues dominios particulares tienen funciones propias en más de una proteína.

En la conformación espacial de una proteína influye la tendencia de las cadenas laterales hidrófobas de los aminoácidos a mantenerse en el interior de la proteína; adoptando la forma termodinámicamente más estable en ese medio. La proteína puede sufrir cambios conformacionales en el desempeño de su función y en la regulación de su actividad.

La estructura terciaria se estabiliza mediante enlaces que se establecen entre determinados grupos de las cadenas laterales:

- Enlaces o puentes de hidrógeno: entre las cadenas laterales de aminoácidos polares sin carga. Son de vital importancia debido a su abundancia.
- Atracciones electrostáticas o interacciones iónicas, entre grupos carboxilo y amino de aminoácidos ácidos y básicos.
- Atracciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals entre radicales alifáticos y aromáticos de las cadenas laterales de los aminoácidos apolares.
- Puentes disulfuro: enlaces covalentes  $-S-S-$ , más fuertes que los anteriores, entre dos grupos  $-SH$  de dos cisteínas (o derivados).
- Enlaces coordinados: entre cationes de metales de transición y la proteína.

**Estructura cuaternaria:** Aparece en las proteínas constituidas por más de una subunidad o protómero. La estructura cuaternaria hace referencia a esta asociación de protómeros para formar la proteína biológicamente activa.

Los protómeros pueden unirse débilmente entre sí a través de enlaces de hidrógeno o fuerzas de van der Waals, y en algunos casos, aunque no es habitual, esta unión puede establecerse mediante puentes disulfuro.

Esta estructura sólo la presentan las proteínas oligoméricas, que tienen dos o más cadenas polipeptídicas, iguales o no, cada una de las cuales posee su propia estructura secundaria y terciaria.

Así, en la queratina del pelo se forman tres hebras y cada una de las hebras está constituida por un arrollamiento  $\alpha$ -hélice. Por su parte, las cuatro cadenas polipeptídicas globulares de la hemoglobina se encajan y adoptan una disposición aproximadamente tetraédrica, que constituye la estructura cuaternaria de la hemoglobina.

En un nivel aún superior encontraríamos la asociación entre proteínas y moléculas no proteínicas como glúcidos, lípidos y ácidos nucleicos.

**Desnaturalización:** La pérdida de la estructura nativa de una proteína se denomina desnaturalización y se debe a la rotura de los enlaces que mantienen las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias lo que conduce a la pérdida de su actividad biológica (los enlaces covalentes se mantienen, por lo que la estructura primaria se mantiene).

La desnaturalización puede ser provocada por cambios en el pH o en la temperatura, por radiación ultravioleta o por determinados agentes químicos desnaturalizantes (como la urea) y en ciertas condiciones puede ser reversible (renaturalización).

## ESTRUCTURA PRIMARIA DE LAS PROTEÍNAS

La estructura primaria es la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica. Esta secuencia se escribe desde el grupo amino-terminal hasta el carboxi-terminal, de acuerdo con el orden en que se sintetizan las proteínas por el ribosoma. Los aminoácidos están unidos de manera covalente por medio de enlaces peptídicos. Debido a que la formación del enlace peptídico ocurre por una reacción de condensación, se desprende una molécula de agua, producto de el -OH del carboxilo y de un -H del grupo amino, y se habla propiamente de la secuencia de residuos de aminoácidos (o simplemente residuos). La cadena principal está formada por la sucesión de enlaces peptídicos que forma una columna vertebral de la cadena polipeptídica. El primer residuo tiene su grupo  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> libre y el último residuo tiene su grupo  $\alpha$ -COOH libre. Así se establecen el extremo N-terminal y C-terminal, con el que inicia y termina la secuencia de residuos.

### EFFECTO DE LAS MUTACIONES GENÉTICAS SOBRE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LAS PROTEÍNAS

Las mutaciones genéticas de tipo puntual pueden alterar la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica.

#### **Estas modificaciones pueden producir:**

- **cambios conservadores:** en los cuales la naturaleza de la cadena lateral es mantenida (Ejemplo si es reemplazado un residuo de Asparagina por uno de Glutamina); en este caso, los cambios en la estructura y función proteica no son tan significativos.

- **cambios no conservadores:** donde la mutación reemplaza el aminoácido por otro de propiedades diferentes (Ejemplo se reemplaza un residuo de Arginina por otro de Prolina).

Este último tipo de cambios en la cadena peptídica puede llegar a alterar la función de la proteína y si ocurren en células sexuales pueden llegar a perpetuarse en futuras generaciones, siendo un factor muy importante en los procesos evolutivos.

- **no hay cambio:** las mutaciones silenciosas o sinónimas en el gen producen la misma secuencia de aminoácidos. Esto se debe a que el código genético es degenerado, es decir, contiene codones que son redundantes. Por ejemplo, el aminoácido glicina, tiene cuatro codones: GGA, GGU, GGG y GGC, lo que significa que si ocurre una mutación que altere el nucleótido de la tercera posición, el aminoácido que se incorpore en la proteína siempre va a ser glicina.

Otro tipo de mutaciones, como la delección, inserción, duplicación, e inversión producen generalmente proteínas alteradas en el tamaño (más grande o menor, dependiendo la región del gen donde ocurrió la mutación) o la estructura tridimensional o ambos. En casi todos estos casos, las proteínas aberrantes conducen a problemas fisiológicos severos.

## **MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES**

Algunos residuos laterales de aminoácidos en ciertas proteínas son modificados luego de la traducción por acetilación, metilación, carboxilación, Hidroxilación, Glucosilación y Fosforilación, entre otros, cambiándose las propiedades electrónicas de los mismos.

### **Algunos ejemplos son:**

- Fosfoserina
- 4-hidroxiprolina
- $\gamma$ -hidroxilisina
- Ácido  $\gamma$ -caboxiglutámico

- Acetil lisina

- 3-metilhistidina

## **RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA PRIMARIA Y LA FORMA TRIDIMENSIONAL DE LAS PROTEÍNAS**

La secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica determina el tipo de interacciones no covalentes que se producirán (tanto entre la misma proteína como con su entorno) y el grado de libertad de adoptar diferentes conformaciones estables a una temperatura fisiológica. Algunos efectos de determinados aminoácidos sobre la estructura de la cadena son:

**Aminoácidos hidrófobos alifáticos (Alanina (Ala), Valina (Val), Isoleucina (Ile), Leucina (Leu)):** Se encuentran en la región interna de las proteínas o, en el caso de las proteínas de membrana, interaccionando con las colas hidrofóbicas de los ácidos grasos. También pueden mantener unidas a proteínas en forma reversible y permitir la unión con sustratos hidrófobos en enzimas (Ejemplo: la unión de fosfolipasas (PL) con su sustrato, los fosfolípidos de las membranas, es estabilizada mediante la interacción de aminoácidos hidrófobos con las colas hidrofóbicas de los ácidos grasos.). Algunas estructuras proteicas formadas por aminoácidos hidrófobos son las cremalleras de leucina, bolsillos hidrófobos, alfa hélices hidrófobas.

**Aminoácidos hidrófobos aromáticos (Fenilalanina (Phe), Tirosina (Tyr), Triptófano (Trp)):** Al igual que los aminoácidos hidrófobos alifáticos suelen encontrarse en la proteína en regiones donde no se encuentran en contacto con el agua.

En el caso de la tirosina y el triptófano, como tienen un grupo polar en su cadena lateral, podrían presentar cierta interacción con sustancias polares.

**aminoácidos polares sin carga neta** (Treonina (Thr), Serina (Ser), Asparagina (Asn), Glutamina (Gln)), **ácidos** (Aspartato (Asp), Glutamato (Glu)) **y básicos** (Histidina (His), Lisina (Lys), Arginina (Arg)): Están ubicados en la superficie proteica en contacto con el agua, iones y otras moléculas polares. Se encuentran en la superficie de los orificios en las proteínas de membrana formando canales iónicos y de otras moléculas polares. Posibilitan la solubilidad de la proteína en el medio acuoso.

**Cisteína (Cys):** Es un aminoácido azufrado que puede oxidarse para formar puentes disulfuro (-S-S-) con una segunda cisteína ubicada en la misma cadena polipeptídica o en una cadena diferente. Esto le da a la estructura de la proteína una mayor estabilidad limitando su deformación.

**Glicina (Gly):** Por el pequeño tamaño de su residuo lateral puede ubicarse en lugares muy estrechos dentro de la proteína, permitiéndole una forma más compacta. En ciertas estructuras como las hélices puede ser un factor desestabilizante debido a que permite una mayor libertad de movimiento.

**Prolina (Pro):** Por su estructura cíclica, permite cambios bruscos en la dirección de la cadena polipeptídica y limita la posibilidad de movimiento aleatorio de la cadena. Se encuentra en estructuras como los giros beta y giros gamma.

## SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

Se denomina secuencia de aminoácidos o secuencia peptídica o secuencia aminoacídica al orden en que los aminoácidos se encadenan dentro de los péptidos y las proteínas.

## **DESCRIPCIÓN**

Las proteínas pertenecen al tipo de moléculas denominadas polímeros, es decir, están compuestas de una sucesión de fragmentos menores. Más específicamente, son polímeros lineales, compuestos de una secuencia no ramificada de fragmentos que son, en el caso de las proteínas, los aminoácidos. Pese a ser cadenas lineales, se pliegan sobre sí mismas para adquirir una estructura tridimensional que condiciona su estructura y función (estructura secundaria y terciaria). También depende de la secuencia aminoacídica que tenga, llamándose a esta secuencia estructura primaria de la proteína. Aunque hasta ahora no se ha logrado, debería ser posible predecir la estructura tridimensional de una proteína conociendo su estructura primaria, salvo en algunos casos especiales. La secuencia de aminoácidos de una proteína viene determinada por la secuencia de nucleótidos del ADN del gen que la codifica.

## ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LAS PROTEÍNAS

Una representación 3D de la estructura de la proteína de la mioglobina: las hélices alfa se muestran en color y la bobina aleatoria en blanco; no se muestran hojas plegada betas. Esta proteína fue la primera que tuvo su estructura resuelta mediante cristalografía de rayos X, gracias a Max Perutz y Sir John Cowdery Kendrew en 1958, lo que les supuso recibir el Premio Nobel de Química en 1962.

La estructura secundaria de las proteínas es el plegamiento regular local entre residuos aminoacídicos cercanos de la cadena polipeptídica. Este tipo de estructura de las proteínas se adopta gracias a la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos carbonilo (-CO-) y amino (-NH-) de los carbonos involucrados en los enlaces peptídicos de aminoácidos cercanos en la cadena. Estos también se los encuentra en forma de espiral aplanada. Existen diferentes modelos de estructuras secundarias (motivos), los más frecuentes son la hélice alfa y la conformación o beta o lámina plegada.

### CLASIFICACIÓN

#### **Características físicas de las tres mayores hélices proteicas:**

Las formas secundarias más comunes son las hélices alfa y las sábanas beta. Otras hélices, como la  $3_{10}$  y la hélice  $\pi$ , se ha postulado que poseen patrones de unión de hidrógeno energéticamente favorables, pero rara vez vistas naturalmente, a excepción de su presencia en los extremos de las hélices alfa. Otras estructuras extendidas como la hélice de poliprolina y la sábana alfa son raras en la forma natural proteica pero se cree que son intermediarios importantes en el doblamiento de las proteínas.

- **Hélice alfa:** En esta estructura la cadena polipeptídica se desarrolla en espiral sobre sí misma debido a los giros producidos en torno al carbono alfa de cada aminoácido. Esta estructura se mantiene gracias a los enlaces de hidrógeno intracatenarios formados entre el grupo  $-C=O$  del aminoácido "n" y el  $-NH$  del "n+4" (cuatro aminoácidos más adelante en la cadena).
- **Hoja plegada beta:** Cuando la cadena principal se estira al máximo que permiten sus enlaces covalentes se adopta una configuración espacial denominada cadena beta. Algunas regiones de proteínas adoptan una estructura en zigzag y se asocian entre sí estableciendo uniones mediante enlaces de hidrógeno intercatenarios. Todos los enlaces peptídicos participan en estos enlaces cruzados, confiriendo así gran estabilidad a la estructura. La forma en beta es una conformación simple formada por dos o más cadenas polipeptídicas paralelas (que corren en el mismo sentido) o antiparalelas (que corren en direcciones opuestas) y se adosan estrechamente por medio de puentes de hidrógeno y diversos arreglos entre los radicales libres de los aminoácidos. Esta conformación tiene una estructura laminar y plegada, a la manera de un acordeón.
- **Hélice de colágeno:** una variedad particular de la estructura secundaria, característica del colágeno, proteína presente en tendones y tejido conectivo.
- **Existen otros tipos de hélices:** Hélice  $3_{10}$  (puentes de hidrógeno entre los aminoácidos "n" y "n+3") y hélice  $\Pi$  (puentes de hidrógeno entre los aminoácidos "n" y "n+5"), pero son mucho menos usuales.

## ALGORITMO DSSP

Existen varios métodos para definir la estructura secundaria de una proteína (por ejemplo STRIDE, DEFINE), pero el método del diccionario de estructura de proteínas (DSSP) es el más utilizado para describir estas estructuras, que utiliza códigos de una letra.

### **Existen ocho tipos de estructuras que el DSSP define:**

**G** = hélice de 3 vueltas ( $3_{10}$ ). Longitud mínima de 3 residuos.

**H** = hélice de 4 (hélice alfa). Long. Mínima de 4 residuos.

**I** = hélice de 5 vueltas (hélice  $\pi$ ). Long. Mínima de 5 residuos.

**T** = giro de unión de hidrógeno (3-4-5)

**E** = hebra extendida en conformación sábana beta paralela y/o anti-paralela. Long. Mínima de 2 residuos.

**B** = residuo en punto beta aislado.

**S** = doblado (no posee uniones de hidrógeno).

**C** = rollo (residuos que no forman parte de aquello mencionados anteriormente).

## **HÉLICE ALFA**

La hélice alfa es la estructura secundaria más sencilla que una proteína puede adoptar en el espacio de acuerdo con la rigidez y libertad de rotación de los enlaces entre sus residuos aminoacídicos.

Se caracteriza por la forma espiralada en la que se encuentran dispuestos los aminoácidos, que parecen ordenarse alrededor de un eje longitudinal imaginario con los grupos R hacia el exterior de este.

Las hélices alfa fueron descritas por primera vez en el año 1951 por Pauling y colaboradores, quienes emplearon los datos disponibles sobre las distancias interatómicas, los ángulos de enlace y otros parámetros estructurales de péptidos y aminoácidos para predecir las configuraciones más probables que podrían asumir las cadenas polipeptídicas.

La descripción de la hélice alfa surgió de la búsqueda de todas las estructuras posibles en una cadena peptídica que fuesen estabilizadas por puentes de hidrógeno, donde los residuos fueran estequiométricamente equivalentes y la configuración de cada uno fuese planar, tal y como lo indicaban los datos de resonancia de los enlaces peptídicos que estaban disponibles para la fecha.

## **ESTRUCTURA**

En general, cada giro de una hélice alfa tiene en promedio 3.6 residuos aminoácidos, lo que equivale más o menos a 5.4 Å de longitud. Sin embargo, los ángulos y las longitudes de giro varían de una proteína a otra con estricta dependencia de la secuencia de aminoácidos de la estructura primaria.

No todos los péptidos pueden formar hélices alfa estables. Ello está dado por la capacidad intrínseca de cada aminoácido de la cadena para formar hélices, que se relaciona directamente con la naturaleza química y física de sus grupos R sustituyentes.

Por ejemplo, a determinado pH muchos residuos polares pueden adquirir la misma carga, por lo que no pueden ubicarse consecutivamente en una hélice ya que la repulsión entre ellos implicaría una gran distorsión en la misma.

En proteínas integrales de membrana abundan hélices alfa con residuos de fuerte carácter hidrofóbico, estrictamente necesarios para la inserción y configuración de los segmentos entre las colas apolares de los fosfolípidos constituyentes.

Las proteínas solubles, por el contrario, poseen hélices alfa ricas en residuos polares, que hacen posible una mejor interacción con el medio acuoso presente en el citoplasma o en los espacios intersticiales.

## **IMPORTANCIA**

Los motivos hélice alfa tienen un amplio rango de funciones biológicas. Patrones de interacción específicos entre las hélices juegan un papel crítico en la función, el ensamblaje y la oligomerización tanto de proteínas de membrana como de proteínas solubles.

Estos dominios están presentes en muchos factores de transcripción, importantes desde el punto de vista de la regulación de la expresión genética. También están presentes en proteínas con relevancia estructural y en proteínas membranales que tienen funciones de transporte y/o transmisión de señales de diversa índole.

### **A continuación, algunos ejemplos clásicos de proteínas con hélices alfa:**

- **Miosina:** La miosina es una ATPasa activada por actina que se encarga de la contracción muscular y de gran variedad de formas de movilidad celular. Tanto las miosinas musculares como las no musculares consisten en dos regiones o “cabezas” globulares unidas entre sí por una larga “cola” alfa helicoidal.
- **Colágeno:** Un tercio del contenido proteico total del cuerpo humano está representado por el colágeno. Es la proteína más abundante del espacio extracelular y tiene como característica distintiva un motivo estructural compuesto por tres hebras paralelas con una configuración helicoidal levógira, que se juntan para formar una hélice triple de sentido dextrógiro.
- **Queratina:** Las queratinas son un grupo de proteínas formadoras de filamentos que son producidas por algunas células epiteliales en los vertebrados. Son el principal componente de las uñas, el cabello, las garras, el caparazón de las tortugas, los cuernos y las plumas. Parte de su estructura fibrilar está formada por segmentos de hélice alfa.

- **Hemoglobina:** El oxígeno en la sangre es transportado por la hemoglobina. La porción globina de esta proteína tetramérica consiste en dos hélices alfa idénticas de 141 residuos cada una, y de dos cadenas beta de 146 residuos cada una.

- **Proteínas tipo “dedos de zinc”:** Los organismos eucariotas poseen una gran riqueza de proteínas tipo dedos de zinc, que funcionan para diferentes propósitos: reconocimiento de ADN, empaquetado de ARN, activación transcripcional, regulación de la apoptosis, plegamiento de proteínas, etc. Muchas proteínas dedos de zinc poseen hélices alfa como componente principal de su estructura y que son esenciales para su función.

## **ESTRUCTURA TERCIARIA DE LAS PROTEÍNAS**

La estructura terciaria de las proteínas se forma sobre la disposición de la estructura secundaria de un polipéptido al plegarse sobre sí misma originando una conformación globular. La cual se mantiene estable debido a la existencia de enlaces entre los radicales R de los aminoácidos, aparecen los puentes disulfuro entre los radicales de aminoácidos que tienen azufre (cisteína); también las fuerzas hidrófobas son fundamentales en esta estructura.

Las dos posibles estructuras terciarias son la estructura globular y la estructura fibrilar:

- La estructura globular tiene forma de "ovillo", es soluble, y es típica de las hormonas o los enzimas.
- La estructura fibrosa se caracteriza por dar a la proteína forma de filamento y ser insoluble; ejemplos de proteínas con esta estructura son la alfa o la beta-queratina y el colágeno.

### **FUERZAS QUE ESTABILIZADAS**

La estructura terciaria de las proteínas está afianzada por cuatro clases de interacciones: enlaces puentes disulfuro entre Cys, puentes de hidrógeno entre cadenas laterales, interacciones iónicas, interacciones de van der Waals, y el efecto hidrófobo (exclusión de las moléculas de agua evitando su contacto con los residuos hidrófobos, que quedan empaquetados en el interior de la estructura)y, recientemente se ha descubierto, como consecuencia de las investigaciones en materia de anatomía molecular, una estrecha relación entre las interacciones entre las regiones hidrofóbicas de las cadenas alifáticas radicales de las proteínas. Las interacciones entre las cadenas laterales de los residuos de la proteína dirigen al polipéptido para constituir una estructura compacta.

## INTERACCIONES POR PUENTE DE HIDROGENO

La fuerza por puente de hidrógeno o enlace de hidrógeno es la fuerza eminentemente electrostática atractiva entre un átomo electronegativo y un átomo de hidrógeno unido covalentemente a otro átomo electronegativo. Resulta de la formación de una fuerza carga-dipolo con un átomo de hidrógeno unido a un átomo de nitrógeno, oxígeno o flúor (de ahí el nombre de "enlace de hidrógeno"), que no debe confundirse con un enlace covalente a átomos de hidrógeno. La energía de un enlace de hidrógeno (típicamente de 5 a 30 kJ/mol) es significativamente menor a la de los enlaces covalentes débiles (155 kJ/mol), y un enlace covalente típico es solo 20 veces más fuerte que un enlace de hidrógeno intermolecular. Estos enlaces pueden ocurrir entre moléculas (intermolecularidad), o entre diferentes partes de una misma molécula (intramolecularidad).

El enlace de hidrógeno es una fuerza electrostática dipolo-dipolo fija muy fuerte cuando están muchas moléculas unidas, ya que da gran estabilidad, pero más débil que el enlace covalente o el enlace iónico. La fuerza del enlace de hidrógeno se ubica en algún lugar intermedio entre un enlace covalente y una fuerza de Van der Waals (fuerza de dispersión). Este tipo de enlace ocurre tanto en moléculas inorgánicas tales como el agua, y en moléculas orgánicas como el ADN.

El enlace de hidrógeno intermolecular es responsable del punto de ebullición alto del agua (100°C). Esto es debido al fuerte enlace de hidrógeno, en contraste a los otros hidruros de calcógenos. El enlace de hidrógeno intramolecular es responsable parcialmente de la estructura secundaria estructura terciaria y estructura cuaternaria de las proteínas y ácidos nucleicos.

En un enlace de hidrógeno tenemos que distinguir entre el átomo DADOR del hidrógeno (aquel al que está unido covalentemente el hidrógeno) y el ACEPTOR, que es al átomo de O N al cual se va a enlazar el hidrógeno.

## **DADOR**

Un enlace O-H está muy polarizado por la elevada electronegatividad del oxígeno y por el hecho de que el único protón del núcleo del hidrógeno atrae débilmente a los electrones del enlace. Así, se estima que la carga positiva sobre el hidrógeno es de 0,4 unidades. En el caso de que el átomo electronegativo sea nitrógeno la situación es similar, aunque dada la menor electronegatividad del nitrógeno la polarización del enlace va a ser algo menor. Los grupos O-H y el N-H van a actuar como donadores de hidrógeno en el enlace de hidrógeno. A pesar de la similitud química el grupo S-H es un mal donador, debido a la baja electronegatividad del azufre.

## **ACEPTOR**

El aceptor del hidrógeno va a ser un átomo electronegativo (otra vez oxígeno o nitrógeno) pero con una peculiaridad: el hidrógeno se va a unir a un orbital ocupado por dos electrones solitarios. Estos orbitales tienen una densidad de carga negativa alta, y por consiguiente se pueden unir a la carga positiva del hidrógeno.

En el caso del oxígeno, con un total de 8 electrones, se presentan DOS pares de electrones solitarios, tanto en el caso de la hibridación  $sp^3$  como de la  $sp^2$ :

Además de todo lo expuesto, merece la pena conocer a fondo otra serie de datos importantes acerca de los llamados puentes de hidrógeno:

-En la sustancia en la que resultan más efectivos es en el agua.

-Diversos son los trabajos e investigaciones que, a lo largo de los años, se han realizado sobre los puentes de ese tipo.

No obstante, una de las más significativas es la que establece que la distancia entre los átomos de oxígeno que toman parte en aquellos es de 0,28 nm, es decir, 0,28 nanómetros.

-Se puede decir que vienen a ser un caso singular en cuanto a la interacción de clase dipolo – dipolo.

-De entre todo el conjunto de fuerzas intermoleculares que existen, se considera que los puentes que estamos abordando son, sin lugar a dudas, los que tienen mayor entidad. Y es que su fuerza puede alcanzar hasta los 155 KJ por mol.

-Los átomos que, por regla general, son los que participan en el desarrollo y creación de puentes de hidrógeno son el flúor, el nitrógeno o el cloro.

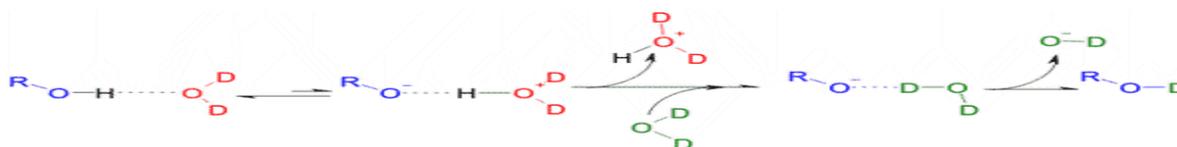
-Es importante conocer que cualquier puente de hidrógeno se puede subdividir en lo que se ha dado en llamar puente de hidrógeno simétrico. Este es un término con el que se hace referencia a un enlace que es mucho más fuerte, que se puede dar en el hielo que está sometido a altas presiones y que se caracteriza porque el átomo de hidrógeno está a una distancia equidistante del átomo al que se encuentra unido de manera covalente.

## PROPIEDADES

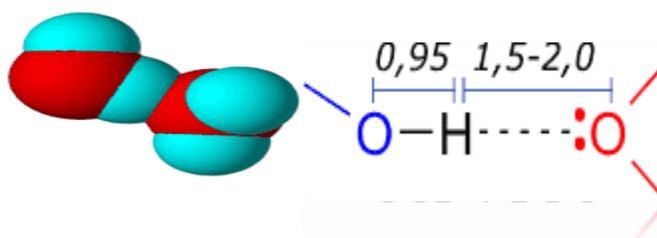
El enlace de hidrógeno presenta un cierto carácter covalente. O, lo que es lo mismo, podemos considerar que el enlace resuena entre estas dos posibles estructuras:



En condiciones óptimas esto supone un 10% de carácter covalente. Una consecuencia importante de esta resonancia es que se pueden intercambiar los hidrógenos de una molécula con los hidrógenos del agua disolvente. Este fenómeno se aprecia fácilmente si la molécula se disuelve en agua pesada  $D_2O$ ; si los hidrógenos son accesibles al disolvente, se intercambian por deuterio:



La distancia interatómica entre el hidrógeno y el aceptor es menor que la suma de sus radios de Van der Waals, (0,27 nm, aprox. para un par Oxígeno-Hidrógeno), aunque están más separados que si estuvieran unidos por un enlace covalente puro:

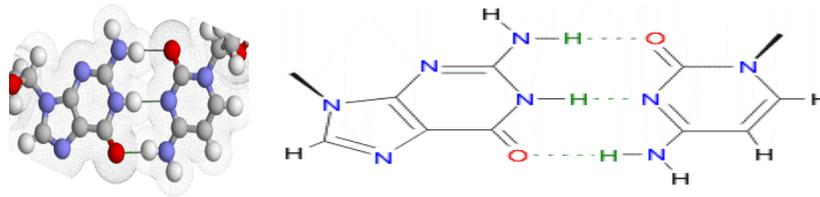


La energía del enlace de hidrógeno depende del ángulo de enlace; es máxima cuando los tres átomos (dador-hidrógeno-aceptor) están alineados y disminuye cuando se disponen en ángulo. Es un enlace muy direccional aunque pequeñas variaciones de hasta  $20^\circ$  no tienen demasiada importancia. Por último, la energía de un enlace de hidrógeno depende de los aceptores y dadores. De mayor a menor energía de enlace tenemos las siguientes posibilidades:



En condiciones óptimas la energía de un enlace de hidrógeno puede alcanzar unos 23 kJ/mol (unas 15 veces más que la energía de las fuerzas de dispersión de London).

La fuerza relativamente alta de estos enlaces y su direccionalidad hacen que sean muy importantes en la estructura de las macromoléculas. Un ejemplo bien conocido es el emparejamiento de bases en el ADN. Por ejemplo, en este par GC perteneciente a un dodecámero cuya estructura en disolución ha sido determinada por RMN, lo que permite visualizar los átomos de hidrógeno:



## INTERACCIONES IÓNICAS

Se llevan a cabo entre iones, por consiguiente con carga eléctrica neta. Pueden participar tanto grupos funcionales cargados (carboxilo, amino) como iones inorgánicos, y pueden ser tanto de atracción, si los iones tienen cargas opuestas como de repulsión, si presentan igual carga. Ambos tipos de interacción son importantes en las biomoléculas, y por ello se tratan aquí como interacciones iónicas, y no como enlaces iónicos exclusivamente. Los enlaces iónicos se denominan a veces "puentes salinos", aunque esta es una denominación anticuada y poco precisa.

La constante dieléctrica  $\epsilon$  depende del medio, y es un parámetro que indica el grado de apantallamiento que sufre el campo eléctrico en el medio en el cual se encuentran las cargas.

En el vacío vale 1, en hidrocarburos aproximadamente 2, mientras que en el agua, y debido a su elevado momento dipolar, la carga se apantalla rápidamente; la constante dieléctrica tiene en este caso un valor de 78,5: por consiguiente las interacciones electrostáticas son mucho menos intensas en medio acuoso que en un medio apolar. Por otra parte, la presencia de iones en disolución, lo que es lo habitual en el medio celular, contribuye a que el apantallamiento del campo eléctrico sea muy eficiente.

De hecho, se puede asumir que, en sistemas biológicos acuosos, las interacciones iónicas dejan de tener importancia a distancias superiores a 1 nm, más o menos. Distinta puede ser la situación en medios hidrofóbicos libres de cargas, como el interior hidrofóbico de las membranas o el interior de las proteínas, en las que el efecto de las cargas eléctricas puede alcanzar distancias superiores resultando en interacciones electrostáticas significativas entre cargas alejadas del orden de varios nm.

Por otro lado, el efecto de apantallamiento debido al agua depende del número de moléculas de agua que se interpongan entre las cargas a considerar, por lo que dos grupos cargados situados muy próximos en la superficie de una proteína podrían interactuar fuertemente a pesar de encontrarse teóricamente en medio líquido si entre ellos no se encuentran moléculas del disolvente.

## **CARACTERÍSTICAS**

- **No direccionalidad:** Los grupos cargados van a interactuar con la misma fuerza, independientemente de su orientación relativa.
- **Dependencia de la distancia:** La energía de la interacción disminuye linealmente al separar las cargas, haya o no apantallamiento.

- **Dependencia del pH (no siempre):** Los grupos iónicos de las biomoléculas son generalmente ácidos o bases débiles, cuyo grado de ionización depende del pH.

## FUERZAS DE VAN DER WAALS

En fisicoquímica, las fuerzas de Van der Waals o interacciones de Van der Waals son las fuerzas atractivas o repulsivas entre moléculas distintas a aquellas debidas a un enlace intermolecular (enlace iónico, enlace metálico y enlace covalente de tipo reticular) o a la interacción electrostática de iones con moléculas neutras.

### TIPOS

- **Dipolo - Dipolo:** enlace formado por dos moléculas polares cercanas entre las que se produce una atracción entre sus dipolos positivos ( $\delta^+$ ) y negativos ( $\delta^-$ ). Ejemplos: enlaces dipolo-dipolo de las moléculas del agua.

- **Dipolo - Dipolo Inducido:** enlace formado por una molécula polar y otra no polar sobre la que se induce un dipolo transitorio. Ejemplo: enlace dipolo-dipolo inducido de las moléculas del agua con las de oxígeno ( $O_2$ ).

- **Dipolos Transitorios o Fuerzas de London:** enlace formado entre dos moléculas no polares en las que se producen dipolos transitorios. Son fuerzas muy débiles. Se producen en todas las moléculas, con más intensidad cuanto mayor sea el número de electrones.

- **Ión - Dipolo:** se producen entre iones y moléculas polares. Explica la disolución de las sales en el agua.

## INTRODUCCIÓN

Las fuerzas de Van der Waals son relativamente débiles comparadas con los enlaces químicos normales, pero desempeñan un papel fundamental en campos tan diversos como química supramolecular, biología estructural, ciencia de polímeros, nanotecnología, ciencia de superficies y física de la materia condensada. Las fuerzas de Van der Waals definen el carácter químico de muchos compuestos orgánicos. También definen la solubilidad de los alcoholes inferiores. Las propiedades del grupo polar hidroxilo dominan a las débiles fuerzas intermoleculares de Van der Waals. En los alcoholes superiores, las propiedades del radical alquílico apolar (R) dominan y definen la solubilidad. Las fuerzas de Van der Waals crecen con la longitud de la parte no polar de la sustancia.

Las fuerzas de Van der Waals incluyen atracciones entre átomos, moléculas y superficies. Difieren del enlace covalente y del enlace iónico en que están causados por correlaciones en las polarizaciones fluctuantes de partículas cercanas (una consecuencia de la dinámica cuántica). Las fuerzas intermoleculares tienen cuatro contribuciones importantes. En general, un potencial intermolecular tiene un componente repulsivo que evita el colapso de las moléculas, debido a que al acercarse las entidades unas a otras las repulsiones dominan.

También tiene un componente atractivo que, a su vez, consta de tres contribuciones distintas:

- La primera fuente de atracción es la interacción electrostática, también denominada interacción de Keesom o fuerza de Keesom en honor a Willem Hendrik Keesom.
- La segunda fuente de atracción es la inducción (también denominada polarización electroquímica), que es la interacción entre un multipolo permanente en una molécula, con un multipolo inducido en otra.

Esta interacción se mide algunas veces en debyes, en honor a Peter Debye.

- La tercera atracción suele ser denominada en honor a Fritz London que la llamaba dispersión. Es la única atracción experimentada por moléculas no polares, pero opera entre cualquier par de moléculas, sin importar su simetría.

### **CLASES DE ENLACE DE VAN DER WAALS**

- **Orientación:** interacción dipolo permanente-dipolo permanente.
- **Inducción:** interacción dipolo permanente-dipolo inducido.
- **Dispersión (Fuerzas de London):** dipolo instantáneo-dipolo instantáneo.

### **CARACTERÍSTICAS**

Este tipo de fuerzas resultan por lo general débiles en comparación con los enlaces químicos ordinarios, lo cual no les impide resultar fundamentales para diversos campos de la física, la biología y la ingeniería. Gracias a ellas muchos compuestos químicos pueden ser definidos, como la solubilidad de los alcoholes inferiores, por ejemplo.

Las fuerzas de Van der Waals crecen con la longitud del extremo no polar de una sustancia, puesto que están causadas por correlaciones entre las polarizaciones fluctuantes entre átomos, moléculas o superficies cercanas, consecuencia de la dinámica cuántica.

Presentan anisotropía, es decir, sus propiedades varían dependiendo de la orientación de las moléculas: de ello a menudo depende que sean de atracción o de repulsión.

Estas fuerzas son las más débiles que se dan entre moléculas en la naturaleza, requiriendo así apenas 0,1 a 35 kJ/mol de energía para vencerlas.

Sin embargo, son cruciales para la formación de proteínas, ya que es una forma de enlace molecular económica y sencilla.

## **IMPORTANCIA**

Las Fuerzas de Van der Waals son responsables de fenómenos muy importantes:

- Aumento de los puntos de fusión y ebullición de un compuesto.
- Viscosidad.
- Tensión superficial.
- Difusión.
- Adhesión.

## **INTERACCIONES HIDROFÓBICAS**

Las interacciones hidrofóbicas (HI) son las fuerzas que mantengan la cohesión entre compuestos apolares inmersos en una solución o solvente polar. A diferencia de otras interacciones de carácter no-covalente, como los puentes de hidrógeno, las interacciones iónicas o las fuerzas de van der Waals, las interacciones hidrofóbicas no dependen de las propiedades intrínsecas de los solutos, sino más bien de los solventes.

## **EJEMPLOS**

### **Membranas**

Un excelente ejemplo de HI es la formación de membranas celulares. Tales estructuras están compuestas por una bicapa de fosfolípidos. Su organización se da gracias a las HI que ocurren entre las colas apolares en “repulsión” al medio acuoso circundante.

## **Proteínas**

Las HI tienen una gran influencia sobre el plegamiento de las proteínas globulares, cuya forma biológicamente activa se obtiene tras el establecimiento de una configuración espacial particular, gobernada por la presencia de determinados residuos aminoacídicos en la estructura.

- **El caso de la apomioglobina:** La apomioglobina (mioglobina carente del grupo hemo) es una pequeña proteína alfa-helicoidal que ha servido como modelo para estudiar el proceso de plegamiento y la importancia de las HI entre los residuos apolares en la cadena polipeptídica de la misma.

En un estudio realizado por Dyson y colaboradores en 2006 donde se emplearon secuencias mutadas de la apomioglobina, se demostró que la iniciación de los eventos de plegamiento de esta depende primordialmente de las HI entre los aminoácidos con grupos apolares de las alfa-hélices.

Así, pequeños cambios introducidos en la secuencia aminoacídica significan importantes modificaciones en la estructura terciaria, lo que da lugar a proteínas mal formadas e inactivas.

## **Detergentes**

Otro ejemplo claro de las HI es el modo de acción de los detergentes comerciales que empleamos con fines domésticos cada día.

Los detergentes son moléculas anfipáticas (con una región polar y otra apolar).

Pueden “emulsificar” grasas puesto que tienen la capacidad de formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua y tener interacciones hidrofóbicas con los lípidos presentes en las grasas.

Al entrar en contacto con grasas en una solución acuosa, las moléculas de detergente se asocian entre sí de tal manera que las colas apolares se enfrentan, encerrando las moléculas lipídicas, y se exponen hacia la superficie de la micela las regiones polares, que entran en contacto con el agua.

## **PUENTES DISULFURO**

En química y biología un disulfuro o se refiere al grupo funcional con la estructura general R-S-S-R'. El enlace también es llamado enlace SS o puente disulfuro y generalmente se deriva del enlazamiento de dos grupos tiol. En términos formales, el enlace es un persulfuro, en analogía a su similar, peróxido (R-O-O-R'), pero esta terminología es raramente utilizada, a excepción cuando se hace referencia a hidrosulfuros (compuestos R-S-S-H o H-S-S-H).

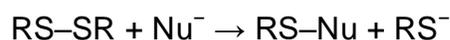
En química inorgánica, disulfuro generalmente se refiere al anión correspondiente  $S_2^{2-}$  ( $^-\text{S}-\text{S}^-$ ), por ejemplo en el dicloruro de disulfuro.<sup>3</sup> En las proteínas, la formación de puentes disulfuros entre cisteínas es muy importante para el plegamiento e integridad de la estructura terciaria y para la regulación de diversos procesos metabólicos.

### **DISULFURO ORGÁNICO**

#### **Propiedades**

Los enlaces disulfuro son fuertes, con una energía de disociación de enlace típica de 60 kcal/mol (251 kJ mol<sup>-1</sup>).

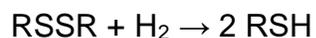
Sin embargo, siendo cerca del 40% más débil que C-C y C-H, el enlace disulfuro es frecuentemente el "enlace débil" en muchas moléculas. Además, se refleja su polarizabilidad del azufre divalente, el enlace S-S es susceptible a la escisión por reactivos polares, ya sean electrófilos o nucleófilos.



El enlace disulfuro es alrededor de 2.05 Å de longitud. Alrededor de 0.5 Å más largo que el enlace C-C. Los disulfuros muestran una preferencia de ángulos diedros que se aproximan a 90°. Cuando el ángulo se aproxima a 0° o 180°, entonces el disulfuro es significativamente un mejor oxidante.

Los disulfuros que tienen dos grupos R iguales son llamados simétricos, algunos ejemplos son el difenil disulfuro y el dimetil disulfuro. Cuando los dos grupos R no son idénticos, el compuesto es clasificado como asimétrico o disulfuro mixto.

Aunque la hidrogenación de disulfuros usualmente no es práctica, la constante de equilibrio para la reacción indica una medida de la potencial oxidación-reducción estándar para los disulfuros:



Este valor es alrededor de -250 mv NHE (pH = 7). En comparación, el potencial oxidación-reducción estándar para las ferroxidinas es de alrededor -430 mv.

## SÍNTESIS

Los enlaces disulfuro son formados generalmente por la oxidación de grupos sulfidrilo (-SH), especialmente en contextos biológicos. La transformación es la siguiente:



Una variedad de oxidantes promueven esta reacción, incluyendo el aire y el peróxido de hidrógeno. Se piensa que tales reacciones proceden por intermediarios de ácido sulfónico.

El yodo en presencia de una base, es comúnmente utilizado para oxidar tioles a disulfuros dentro de un laboratorio. Varios metales, como complejos de cobre (II) y hierro (III) intervienen esta reacción. Alternativamente, enlaces disulfuro en proteínas se forman por el intercambio de tiol-disulfuro:



Tales reacciones con mediadas por enzimas en algunos casos y en otros casos bajo condiciones de control de equilibrio, especialmente en la presencia de alguna concentración catalítica de alguna base.

La alquilación de metales alcalinos y polisulfuros dan como resultado disulfuros. Los polímeros "Thiokol" se dan cuando el polisulfuro de sodio es tratado con dihalogenuros de alquilo. En otra reacción similar, reactivos carboniónicos reaccionan con azufre elemental para resultar en mezclas de tioéter, disulfuros y polisulfuros. Estas reacciones son generalmente inselectivas, pero pueden ser optimizadas para aplicaciones específicas.

Muchos métodos especializados han sido desarrollados para formar disulfuros, usualmente para aplicaciones en síntesis orgánicas. Reactivos que otorgan el equivalente de "RS<sup>+</sup>" reaccionan con tioles que dan disulfuros asimétricos.



## REACCIONES

El aspecto más importante de los enlaces disulfuro es su escisión, la cual ocurre por la vía de reducción. Una variedad de reductores pueden ser utilizados. En bioquímica, tioles como el mercaptoetanol (b-ME) o el ditioneitol (DTT) funcionan como agentes reductores; los reactivos tiol son utilizados en exceso para llevar el equilibrio a la derecha:

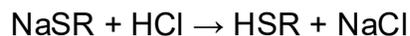


El reductor Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) es útil, además de por ser inodoro comparado con b-ME y DTT, porque es selectivo en condiciones alcalinas y ácidas (contrario al DTT), es más hidrofílica y más resistente a la oxidación mediada por el aire. Además, generalmente no es necesario inactivar TCEP antes de la modificación de tioles de proteína.

En síntesis orgánica, compuestos hidruro son empleados típicamente para la escisión de disulfuros, tales como borohidruro de sodio. Metales alcalinos más agresivos tendrán efecto en esta reacción:



Estas reacciones son frecuentemente seguidas por una protonación del tiolato.



El intercambio tiol-disulfuro es una reacción química en que el grupo tiolato  $\text{S}^-$  ataca el átomo de azufre de un enlace disulfuro  $\text{-S-S-}$ . El enlace disulfuro original se rompe, y el otro átomo de azufre (átomo verde en la Figura 1) es liberado como un nuevo tiolato que se lleva la carga negativa. Mientras tanto, el nuevo enlace disulfuro se forma entre el tiolato atacante (átomo rojo en la Figura 1) y el átomo de azufre original (átomo azul en la figura 1).

## **OCURRENCIA EN PROTEÍNAS**

Los enlaces disulfuro tienen un rol importante en el plegamiento y estabilidad de algunas proteínas, usualmente proteínas secretadas al medio extracelular. Ya que la mayoría de los comportamientos celulares son ambientes reductores, en general, los enlaces disulfuro son inestables en el citosol, con algunas excepciones como se denota más abajo, a no ser que haya sulfidril oxidasa presente.

El enlace disulfuro estabiliza la forma plegada de una proteína de varias maneras:

- Mantiene dos porciones de la proteína juntas, que le da a la proteína su topología plegada. Lo que conlleva a que el enlace disulfuro desestabiliza la forma desplegada de la proteína al bajar su nivel de entropía.

- En enlace disulfuro puede formar un núcleo hidrofóbico en una proteína plegada, por ejemplo, residuos hidrofóbicos locales se pueden condensar alrededor de un enlace disulfuro y también uno sobre otro en consecuencia de las interacciones hidrofóbicas.

- En relación con 1 y 2, el enlace disulfuro une dos segmentos de la cadena proteica; el enlace aumenta la concentración local de residuos proteicos y disminuye la concentración local de moléculas de agua. Ya que las moléculas de agua atacan los enlaces de hidrógeno amida-amida y rompen la estructura secundaria, un enlace disulfuro estabiliza la estructura secundaria en su vecindad. Por ejemplo, investigadores han identificado varios pares de péptidos que están inestructurados cuando se encuentran aislados, pero adoptan una estructura secundaria o terciaria cuando se forma un enlace disulfuro entre ellos.

### **EN BACTERIAS Y ARCHEA**

Los enlaces disulfuro tienen un rol importante en la protección de bacterias, ya que actúan como un interruptor de encendido y apagado para las proteínas cuando las células están expuestas a reacciones de oxidación. El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) puede dañar severamente en ADN y matarla a bajas concentraciones de no ser por la actividad protectora de los enlaces SS. Las Archeas típicamente tienen menos enlaces disulfuro que los organismos superiores.

### **EN EUCARIOTAS**

En células eucariotas, en general, enlaces disulfuro estables se forman en el lumen del retículo endoplásmico rugoso y en el espacio intermembranal de la mitocondria, pero no en el citosol.

Esto se debe a que en los organelos antes mencionados se tiene un ambiente que favorece la oxidación y al ambiente reductor con el que cuenta el citosol (ver glutatión). Por lo tanto, los enlaces disulfuro son mayormente encontrados en proteínas secretadas, proteínas lisosomales, y en los dominós exoplásmicos de proteínas de membrana.

Existen notables excepciones a esta regla. Por ejemplo, muchas proteínas nucleares y citosólicas pueden ser reticuladas por medio de disulfuros durante la muerte celular necrótica. Similarmente, un número de proteínas citosólicas puede contener residuos de cisteína en proximidad de una a otra que fungen como sensores de oxidación o catalizadores de óxido-reducción; cuando el potencial reductor de las células falla, se oxidan y desencadenan mecanismos celulares de respuesta. Los virus Vaccinia también producen proteínas citosólicas y péptidos que tienen muchos enlaces disulfuros; aunque se desconoce por qué, se presume que tienen efectos protectores contra la maquinaria intracelular de proteólisis.

Los enlaces disulfuro también se forman entre portaminas en la cromatina del esperma de muchas especies mamíferas.

## **DISULFUROS EN PROTEÍNAS REGULADORAS**

Como los enlaces disulfuro pueden ser reversiblemente reducidos o reoxidados, el estado redox de estos enlaces ha evolucionado como un elemento de señalización. En cloroplastos, por ejemplo, la reducción enzimática de enlaces disulfuro se ha asociado al control de numerosas rutas metabólicas y de expresión de genes. La actividad de señalización ha sido demostrada, hasta ahora, que se lleva a cabo por el sistema ferredoxina-tiorredoxina, que canaliza electrones de las reacciones de luz del fotosistema I para, catalíticamente, reducir disulfuros en las proteínas reguladas de manera dependiente de la luz.

De esta manera, los cloroplastos ajustan la actividad de procesos clave como el ciclo de Calvin-Benson, degradación de almidón, producción de ATP y expresión génica de acuerdo a la intensidad de la luz.

## **EN PELO Y PLUMAS**

Más del 90% del peso seco del pelo se compone de proteínas llamadas queratinas que tienen un alto contenido de disulfuros provenientes de la cisteína. La durabilidad que se da en parte por los enlaces disulfuro, es ilustrada por la recuperación de cabello virtualmente intacto en tumbas egipcias. Las plumas tienen queratinas similares y son extremadamente resistentes a enzimas digestivas. Diferentes partes del pelo y de las plumas tienen diferentes concentraciones de cisteína, que tiene en consecuencia su suavidad o dureza. La manipulación de enlaces disulfuro en el cabello es la base para los enchinados permanentes en la industria cosmética. Reactivos que afectan la creación o rompimiento de enlaces S–S son necesarios, por ejemplo, tioglicolato de amonio. El alto contenido de disulfuro en las plumas determina que exista una alta concentración de azufre en huevos provenientes de aves. El alto contenido de azufre en el pelo y las plumas contribuye al olor desagradable que resulta de su combustión.

## **DISULFUROS INORGÁNICOS**

El anión disulfuro es  $S_2^{2-}$ , o  $^-S-S^-$ . Usualmente se le asigna el número de oxidación  $-2$  al azufre, descrito como  $S^{2-}$  y llamado sulfuro. Tiene la configuración electrónica del gas noble (argón). En disulfuros, el azufre es solamente reducido a un estado con número de oxidación  $-1$ . Entonces su configuración se asemeja a aquella de un átomo de cloro. Entonces tiene a formar enlaces covalentes con otro centro  $S^-$  para formar grupos  $S_2^{2-}$ . El oxígeno se comporta de manera similar, por ejemplo en peróxidos como  $H_2O_2$ .

### **Ejemplos:**

- Disulfuro de hierro ( $\text{FeS}_2$ )
- Dicloruro de disulfuro ( $\text{S}_2\text{Cl}_2$ )

### **AMBIGÜEDADES**

El término disulfuro también hace referencia a compuestos que contienen dos átomos de azufre en su fórmula molecular. Esto sucede debido a que se hace uso de la nomenclatura sistemática.

Por ejemplo, el disulfuro de carbono ( $\text{CS}_2$ ), es una molécula con un centro de carbono y dos átomos de azufre ligados al átomo central por enlace doble:  $\text{S}=\text{C}=\text{S}$ . Por lo tanto, esta molécula no tiene la misma estructura química que la de los compuestos mencionados anteriormente ya que no es una unión de dos átomos de azufre adyacentes. Otro ejemplo es el disulfuro de molibdeno ( $\text{MoS}_2$ ) el cual; como se puede observar en la figura, es un compuesto cristalino.

## **ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LAS PROTEÍNAS**

La estructura cuaternaria de las proteínas se forma mediante la unión de enlaces débiles de varias cadenas polipeptídicas con estructura terciaria para formar un complejo proteico. Cada una de estas cadenas polipeptídicas recibe el nombre de protómero.

En cuanto a los niveles de la estructura de las proteínas, puede tener de forma más amplia que lo normal. Comprende la gama de proteínas oligoméricas, es decir aquellas proteínas que constan con más de una cadena polipeptídica, en la cual además puede existir un comportamiento de alosterismo según el método concertado de Jacques Monod.

El alosterismo trata de regulación enzimática de las propiedades de una proteína multimérica. En cuanto a la estructura cuaternaria, el alosterismo puede ser captado como consecuencia del movimiento relativo de un monómero en las propiedades multiméricas. La Hemoglobina proporciona un ejemplo bien estudiado, pero no es el único.

Cuando una proteína consta de más de una cadena polipeptídica, es decir, cuando se trata de una proteína oligoméricas, decimos que tiene estructura cuaternaria.

### **La estructura cuaternaria debe considerar:**

- El número y la naturaleza de las distintas subunidades o monómeros que integran el oligómero.
- la forma en que se asocian en el espacio para dar lugar al oligómero. La figura de la derecha corresponde a la hemoglobina.

En proteínas con estructura terciaria de tipo fibroso, la estructura cuaternaria resulta de la asociación de varias hebras para formar una fibra o soga. La miosina o la tropomiosina constan de dos hebras con estructura de hélice a enrolladas en una fibra levógira. La  $\alpha$ -queratina del cabello y el fibrinógeno de la sangre presentan tres hebras en cada fibra levógira. El colágeno consta de tres hebras helicoidales levógiras que forman una fibra dextrógira. La fibroína de la seda presenta varias hebras con estructura de hoja b orientadas de forma antiparalela.

### **Cuando varias proteínas con estructura terciaria de tipo globular se asocian para formar una estructura de tipo cuaternario, los monómeros pueden ser:**

- Exactamente iguales, como en el caso de la fosfoglucoisomerasa o de la hexoquinasa.

- Muy parecidos, como en el caso de la lactato deshidrogenasa.
- Con estructura distinta pero con una misma función, como en el caso de la hemoglobina.
- Estructural y funcionalmente distintos, que una vez asociados forman una unidad funcional, como en el caso de la aspartato transcarbamilasa, un enzima alostérico con seis subunidades con actividad catalítica y seis con actividad reguladora.

## **CLASIFICACIÓN**

La estructura cuaternaria puede clasificarse en función del número de subunidades, si son o no distintas entre sí, y el arreglo tridimensional que tienen entre ellas.

### **Así, tendremos las siguientes reglas:**

- Una proteína cuya forma nativa esté compuesta por un sólo polopéptido se dice que es un monómero y que carece de estructura cuaternaria.
- Una proteína cuya forma nativa esté compuesta por dos polopéptidos será un DÍMERO, si son tres será un TRÍMERO y, en general, un oligómero.
- Las proteínas compuestas por la asociación de dos o más copias de una misma cadena polipeptídica se designan como homooligómeros.
- las proteínas compuestas por la asociación de dos o más cadenas polipeptídicas distintas se designan como heterooligómeros. Basta con que dos subunidades posean secuencias de aminoácidos diferentes para considerar las proteínas como heterooligómero, aunque se trate de un heteropentámero con 4 copias de la cadena "A" y una copia de la cadena "B".

## **PROTEÍNAS ESTRUCTURALES**

Las proteínas estructurales son el tipo más abundante de entre todos los tipos de proteínas de nuestro organismo si tenemos en cuenta el porcentaje de proteínas que representan respecto al total.

Las proteínas estructurales son proteínas fibrosas. Entre estas proteínas fibrosas, la queratina es probablemente la proteína estructural más conocida.

Esta proteína constituye la cubierta protectora de todos los vertebrados terrestres, formando el pelo, piel y las uñas en los seres humanos y también el cuero, lana, garras, pezuñas, cuernos, escamas, picos y plumas de muchos animales.

Aunque menos visibles, la proteína actina y la proteína miosina son dos proteínas estructurales que forman el tejido muscular. Otro grupo de proteínas fibrosas estructurales son las sedas y las fibras que generan de insectos. El colágeno es otra proteína estructural, la cual forma los tendones y nervios, que forman los ligamentos del cuerpo y proporciona una sujeción adicional a la piel si es necesario.

### **Funciones estructurales específicas:**

- Constituir el tejido conjuntivo fibroso (colágeno).
- Conformar la queratina de la epidermis.
- Modelar el tejido conjuntivo elástico (elastina).

Además de componer y organizar tejidos, nervios y estructuras como es el caso de las uñas y el pelo, normalizan y regulan funciones vinculadas a los factores de crecimiento. Asimismo, el colágeno se agrupa en fibras cuya función estructural es recubrir y proteger órganos. También establece conexiones entre la matriz extracelular y el colágeno fibrilar oficiando de nexo para la unión entre estas moléculas

## CLASIFICACIÓN

Se pueden aplicar distintos criterios para clasificar a las proteínas y no existe un sistema universal de clasificación. Se ofrecen los que se citan con más frecuencia.

### SEGÚN SU FORMA

- **Fibrosas:** presentan cadenas polipeptídicas largas y una estructura secundaria en la cual predomina un tipo de estructura secundaria: hélice alfa u hoja beta. Tienen secuencias repetitivas de residuos. Usualmente tienen función estructural. Se asocian en forma paralela y con frecuencia las cadenas vecinas están entrecruzadas con enlaces covalentes (disulfuro o de otro tipo). Son insolubles en agua y en disoluciones acuosas. Algunos ejemplos de éstas son queratina, colágeno y fibrina.

- **Globulares:** se caracterizan por doblar sus cadenas en una forma esférica apretada o compacta dejando grupos hidrófobos hacia adentro de la proteína y grupos hidrófilos hacia afuera, lo que hace que sean solubles en disolventes polares como el agua. Presentan elementos diversos de estructura secundaria en una misma cadena polipeptídica (hélices alfa, hojas beta, giros, vueltas, regiones intrínsecamente desordenadas). Las hojas beta comúnmente están enrolladas o envueltas. La mayoría de las enzimas, anticuerpos, algunas hormonas y proteínas de transporte, son ejemplos de proteínas globulares.

- **Mixtas:** posee una parte fibrilar (comúnmente en el centro de la proteína) y otra parte globular (en los extremos).

### SEGÚN SU SOLUBILIDAD

- Proteína Globular.
- Proteínas globulares (ver arriba).
- Proteínas fibrosas (ver arriba).

Proteínas integrales de membrana (o proteínas transmembranales): presentan secuencias de residuos hidrofóbicos, que usualmente adoptan conformaciones de hélice alfa o hebras beta afines a la parte hidrofóbica de las membranas celulares. Siguen mecanismos de plegamiento distintos a las de las proteínas citoplásmicas.

Proteínas intrínsecamente desordenadas. Tienen una estructura flexible que cambia en función de sus interacciones con el disolvente o con otras moléculas que actúan como ligandos.

Usualmente tienen una composición rica en residuos cargados (lisina, arginina, glutamato, aspartato e histidina) y se les encuentra con mayor frecuencia en células eucariontes que en procariontes. Muchas proteínas presentan dominios intrínsecamente desordenados (como p53), pero otras carecen completamente de estructura rígida (por ej. las proteínas ribosomales o del spliceosoma).

## **SEGÚN SU COMPOSICIÓN QUÍMICA**

Las proteínas según su composición química pueden ser clasificadas en:

- Proteínas simples u holoproteínas: en su hidrólisis solo produce aminoácidos. Ejemplos de estas son la insulina y el colágeno (globulares y fibrosas), albúminas.
- Proteínas conjugadas o heteroproteínas: estas proteínas contienen cadenas polipeptídicas y un grupo prostético. La porción no aminoacídica se denomina grupo prostético, estos pueden ser un ácido nucleico, un lípido, un azúcar o ion inorgánico. Ejemplo de estas son la mioglobina y los citocromo. Las proteínas conjugadas o heteroproteínas se clasifican de acuerdo a la naturaleza de su grupo prostético:
  - Nucleoproteínas: Su grupo prostético son los ácidos nucleicos.
  - Lipoproteínas: Su grupo prostético son los fosfolípidos, colesterol y triglicéridos.

- Metaloproteína: El grupo prostético está formado por metales.
- Cromoproteínas: Son proteínas conjugadas por un grupo cromóforo (sustancia coloreada que contiene un metal).
- Glucoproteínas: El grupo prostético está formado por los carbohidratos.
- Fosfoproteínas: Son proteínas conjugadas con un radical que contiene fosfato, distinto de un ácido nucleico o de un fosfolípido.

## CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CATALÍTICAS

Las enzimas son proteínas con función catalítica, aunque también existen RNAs que al desempeñar funciones catalíticas se denominan ribozimas.

Una enzima se unirá a su sustrato (S) para dar un producto (P), formando intermediariamente los complejos ES (enzima-sustrato) y EP (enzima-producto), siguiendo una relación tal que: **E+S libres → ES → EP → E+P libres.**

Los catalizadores funcionan modificando la energía de activación (Ea), haciéndola más estable. Acerca los reactivos orientando sus orbitales electrónicos. La enzima deberá recuperarse en su forma libre sin modificación una vez acabada la reacción.

La especificidad de las enzimas está muy relacionada con su clasificación. Fundamentalmente residen en su centro activo, compuesto por el centro ligante y el centro catalítico (que pueden estar juntos o separados). Cada enzima es específica de su sustrato o mantiene cierta afinidad para determinado tipo de sustratos, el centro ligante es donde se da la unión E y S. Hay enzimas que se especializan en reacciones redox, otras del tipo hidrolíticas, de unión, etc.

Las enzimas son capaces de regular su actividad y la base de dicha regulación depende de los cambios conformacionales que varían la disposición de los centros activos.

## CLASIFICACIÓN

Según el tipo de reacción que cataliza un enzima:

- **Oxidorreductasas:** catalizan reacciones redox.
- **Transferasas:** Transfieren un grupo de una molécula a otra.
- **Hidrolasas:** catalizan reacciones de hidrólisis.
- **Liasas:** Reacciones de ruptura de enlaces que no son por hidrólisis ni por reacciones redox.
- **Isomerasas:** transformación de isómeros (ópticos, posicionales, funcionales...).
- **Ligasas:** Formación de enlaces.

## NOMENCLATURA

Hay enzimas que se siguen denominando por el nombre que el autor inicial les dio, aunque no suelen aportar información sobre su funcionalidad. Actualmente hay varias formas de nombrar las enzimas en función del:

- Nombre vulgar: no informan sobre la funcionalidad, como la tripsina.
- Nombre recomendado: dado por el código de nomenclatura EC (enzyme commission) como la etanol NAD oxidorreductasa (EC 1.1.1.1).
- Nombre abreviado: por ejemplo, etanol deshidrogenasa.

- Número EC: como 1.1.1.1, el primer número se refiere al grupo de enzimas al que pertenece.

## **CENTROS ACTIVOS**

- Se localizan en zonas accesibles para el sustrato.

- Tienden a excluir el agua (salvo las hidrolasas), ya que el H<sub>2</sub>O forma puentes de hidrógeno y es un dipolo que puede interferir en la interacción del sustrato con los residuos de los aminoácidos de la enzima.

- Suele haber presencia de aminoácidos ácidos y básicos (grupos electrófilos y neutrófilos) como la lisina y la arginina (electrófilos). Los residuos ácidos y básicos provocan reajustes electrónicos en los sustratos. La histidina es un aminoácido que puede actuar tanto como ácido o como base a pH fisiológico, es por ello que muchas enzimas tienen histidinas en sus centros activos.

En ocasiones, las enzimas necesitan cofactores porque por sí solas no pueden catalizar la reacción, esos cofactores aportan propiedades adicionales que los aminoácidos por sí solos no pueden dar. Los cofactores pueden ser de origen orgánico o inorgánico y las vitaminas son ejemplo de ellos.

Los metales de transición como el zinc tienen muchos orbitales libres, por ello son fuertes electrófilos que atraerán electrones de los enlaces de los sustratos. El magnesio Mg<sup>2+</sup>, el sodio Na<sup>2+</sup> y el potasio K<sup>+</sup> participan en estas interacciones directa o indirectamente.

- El centro activo tiene una especial reactividad; en las oquedades de los centros activos, una serie de residuos aportan un microambiente que aumenta la reactividad de la enzima. El cambio de posición de un residuo específico del centro activo, puede provocar que la enzima se active o inactive.

## CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE DEFENSA

El organismo debe enfrentar a diario la tarea de facilitar el acceso a múltiples sustancias dentro de las células para obtener nutrientes y a la vez, excluir sustancias que pueden ser dañinas o infecciosas, y microorganismos peligrosos.

### **Entre las barreras de protección del cuerpo:**

- Piel.
- Mucosas.
- Lágrimas.
- Algunas secreciones como la saliva.
- Jugo gástrico.

Hay barreras más específicas que atrapan, atenúan y eliminan invasores que hayan logrado ingresar, como es el caso de algunas células y proteínas.

- Acevedo, S.
- Baquero, C.
- Gaviria, M.
- Posada, N.
- Mora, G.
- Téllez, L.
- Wills, C. (1997).

### **Tienen diferentes funciones, una de ellas, la de defensa:**

Protegen al organismo contra posibles ataques de agentes extraños.

### **Entre ellas:**

- Anticuerpos (inmunoglobulinas)
- Interferones
- Mucinas
- fibrinógeno

### **Inmunidad humoral**

Mecanismo específico de defensa que cumplen los linfocitos B gracias a sus productos: los anticuerpos o inmunoglobulinas. Quienes atacan a los antígenos no son las células directamente sino los anticuerpos secretados por activación antigénica.

### **ESTRUCTURAS**

- 2 cadenas pesadas: H (Heavy), unidas covalentemente a un oligosacárido, y un par idéntico de cadenas livianas no glicosiladas: L (Light).

- Las cadenas H y las L están formadas por una unidad estructural básica de 110 aminoácidos (dominio Ig) que se repite de 4-5 veces en las H y dos veces en las L.

Ambas cadenas presentan una zona constante (CH y CL) y una zona variable (VH y VL).

En la región variable, hay una zona hipervariable formada por 10 a 15 aminoácidos que conforman el receptor (r) responsable de la unión con el antígeno.

- Un puente disulfuro y otras uniones no covalentes unen las cadenas pesadas con las livianas.

- Las cadenas pesadas también están unidas entre sí por al menos un puente disulfuro, en una región «bisagra».

- En digestión por papaína, genera 2 fragmentos:

\* Fab responsable de la unión con antígeno.

\* Fc determina diversas funciones biológicas en las diferentes inmunoglobulinas.  
láñez, E.

- Las clases de Ig están determinadas por los diferentes isotipos de las cadenas pesadas.

- Estas pueden ser mu, gamma, alfa, delta o épsilon.

- Las cadenas livianas pueden ser kappa o lambda.

- Cada anticuerpo tiene una meta única conocida como el antígeno presente en el organismo invasor.

- Cuando la clave se inserta, el anticuerpo se activa, marcando o neutralizando al antígeno.

## **FUNCIÓN DE LAS INMUNOGLOBULINAS**

- Inmovilización.

- Neutralización.

- Activación de los fagocitos.

- La activación del complemento, inflamación y fagocitosis.

- Protección del feto y el niño lactante.

- Incremento de la quimiotaxis por activación del complemento.
- Degranulación de mastocitos.
- Facilitar que ciertas células ejerzan funciones citotóxicas.

## **PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE MEMBRANA**

Las proteínas transportadoras de membrana son proteínas ubicadas en la membrana celular que conforman una red intrincada de canales, bombas y sistemas transmembranosos que transfieren nutrientes, productos del metabolismo, sustancias tóxicas, macromoléculas, moléculas de señales, electrones y muchos otros componentes celulares determinando con su funcionamiento las composiciones moleculares y el estado energético de las células. En general, se clasifican en canales, transportadores primarios activos y transportadores secundarios activos.

Los canales funcionan como poros selectivos que se abren en respuesta a estímulos químicos o electrofisiológicos, permitiendo el paso de solutos a favor de un gradiente electroquímico.

### **TIPOS**

#### **Canales**

Los canales son proteínas de membrana que funcionan como poros selectivos que se abren en respuesta a estímulos electrofisiológicos, permitiendo a algún sustrato moverse según el gradiente electroquímico.

#### **Se clasifican en las siguientes subclases:**

- Canales tipo a (alfa).

- Porinas barril B (beta).
- Toxinas formadoras de poros (proteínas y péptidos)
- Canales sintetizados no ribosomales.
- Holinas.
- Poros de fusión vesicular.
- Poros de fusión viral.
- Canales paracelulares.
- Canales unidos a membrana.
- Aperturas piramidales de egreso de visiones.
- Canales de inyección de fagos de ADN.

### **TRANSPORTADORES PRIMARIOS ACTIVOS**

Los transportadores primarios activos utilizan alguna fuente de energía para movilizar una sustancia en contra de la gradiente electroquímica. Lo componen las siguientes subclases:

- Transportadores dirigidos por hidrólisis de unión difosfato.
- Las proteínas transportadoras de membrana dependientes de ATP (ABC) acoplan la hidrólisis del adenosín trifosfato (ATP) a la translocación de varios sustratos a través de la membrana. Un ejemplo de este tipo de proteína transportadora es la bomba sodio-potasio.
- Transportadores dirigidos por descarboxilación.

- Transportadores dirigidos por transferencia de metilo.
- Transportadores dirigidos por reducción-oxidación.
- Transportadores dirigidos por absorción de luz.

### **Transportadores secundarios activos**

Los transportadores secundarios activos utilizan el movimiento de solutos a favor de un gradiente electroquímico para movilizar otro sustrato. También se denominan transportadores dirigidos por potencial electroquímico.

### **Podemos encontrar las siguientes subclases:**

- Portadores.
- Uniportadores.
- Simportadores.
- Antiportadores.
- Portadores sintetizados no ribosomales.
- Energizadores conducidos por gradiente de iones.
- Transportadores transcopartimentales.

### **FACTORES ACCESORIOS DE TRANSPORTE TRANSMEMBRANA**

- Proteínas transportadoras auxiliares.

- Péptidos y proteínas sintetizados ribosomalmente que actúan como toxinas o agonistas de canales o transportadores.
- Péptidos y proteínas sintetizados no ribosomalmente que actúan como toxinas o agonistas de canales o transportadores.

### **SISTEMAS DE TRANSPORTE NO CARACTERIZADOS TOTALMENTE**

- Transportadores reconocidos con mecanismos bioquímicos desconocidos.
- Proteínas transportadoras putativas.
- Transportadores caracterizados funcionalmente pero con secuencias perdidas.

## PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LAS PROTEÍNAS

Son sustancias cristalinas, por lo general, soluble en el agua y en soluciones acidas o básicas diluidas, muy poco soluble en, alcohol e insoluble en éter. Poseen un elevado punto de fusión que casi sobrepasa los 200-300 °C. Con valor por encima de estas temperaturas los aminoácidos se descomponen.

### PROPIEDADES FÍSICAS

- **Fibrosas:** presentan cadenas polipeptídicas largas y una estructura secundaria atípica. Son insolubles en agua y en disoluciones acuosas. Algunos ejemplos de éstas son queratina, colágeno y fibrina para fortalecer el cabello.

- **Globulares:** se caracterizan por doblar sus cadenas en una forma esférica apretada o compacta dejando grupos hidrófobos hacia adentro de la proteína y grupos hidrófilos hacia afuera, lo que hace que sean solubles en disolventes polares como el agua. La mayoría de las enzimas, anticuerpos, algunas hormonas y proteínas de transporte, son ejemplos de proteínas globulares.

### Ejemplos:

- **La Carne:** Todas las carnes están englobadas dentro de los alimentos proteicos y nos proporcionan entre un 15 y 20% de proteínas, que son consideradas de muy buena calidad ya que proporcionan todos los aminoácidos esenciales necesarios.

- **El Huevo:** Representa el 60% del peso del huevo. Está constituida por agua (90%) y un 10% de proteínas de alto valor biológico (ovoalbúmina, ovoglobulina, ovomucina, etc). Es una sustancia viscosa, transparente y se coagula a 65 C adquiriendo un color blanco. Estas proteínas también son responsables de la espuma al montar las claras.

- **La Leche:** La leche de vaca contiene de 3-3,5 por ciento de proteínas, distribuida en caseínas, proteínas solubles o seroproteínas y sustancias nitrogenadas no proteicas.

Son capaces de cubrir las necesidades de aminoácidos del hombre y presentan alta digestibilidad y valor biológico. Además del papel nutricional, se ha descrito su papel potencial como factor y modulador del crecimiento.

### **PROPIEDADES QUÍMICAS**

Las proteínas son moléculas tan complejas que es muy difícil conocer con exactitud su estructura química. Se sabe que las cadenas proteicas se enrollan en forma helicoidal y que ciertas proteínas son fibrilares, como el colágeno, mientras otras son globulares, como la albúmina.

### **PROPIEDADES QUÍMICAS**

- **Solubilidad:** Se mantiene siempre y cuando los enlaces fuertes y débiles estén presentes. Si se aumenta la temperatura y el pH, se pierde la solubilidad.

- **Capacidad electrolítica:** Se determina a través de la electroforesis, técnica analítica en la cual si las proteínas se trasladan al polo positivo es porque su molécula tiene carga negativa y viceversa.

- **Especificidad:** Cada proteína tiene una función específica que está determinada por su estructura primaria.

- **Amortiguador de pH (conocido como efecto tampón):** Actúan como amortiguadores de pH debido a su carácter anfótero, es decir, pueden comportarse como ácidos (donando electrones) o como bases (aceptando electrones).

## **ESTRUCTURAS QUÍMICAS**

Es la manera como se organiza una proteína para adquirir cierta forma. Presentan una disposición característica en condiciones fisiológicas, pero si se cambian estas condiciones como temperatura, pH, etc. pierde la conformación y su función, proceso denominado desnaturalización. La función depende de la conformación y ésta viene determinada por la secuencia de aminoácidos.

## **CONFORMACIÓN NATIVA DE PROTEÍNAS**

Proteínas nativas son las que se encuentran en su conformación funcional plegada (la más estable). Las interacciones que estabilizan la conformación nativa de una proteína son los puentes disulfuro y las interacciones no covalentes. La conformación más estable es la que permite la formación del máximo número de puentes de hidrógeno dentro de la proteína. En general los residuos hidrofóbicos quedan orientados hacia el interior de la proteína, lejos del contacto con el entorno acuoso. Los residuos hidrofílicos quedan orientados hacia el exterior.

En las proteínas globulares se asume que la conformación nativa de una proteína es la estructura funcional, la cual consiste en una forma compacta, con los residuos hidrofóbicos localizados en el interior de su estructura y con los residuos polares o cargados expuestos en la superficie de la proteína. Pero la conformación desnaturalizada es aquella en la que están expuestos estos residuos hidrofóbicos. Ambas conformaciones, nativa y desnaturalizada, corresponden a estructuras de mínima energía, ya que las interacciones entre las distintas partes de la proteína y el solvente se encuentran estabilizadas. En muchas ocasiones, las proteínas desnaturalizadas forman agregados inespecíficos y se precipitan. De este modo, la capa de moléculas de agua no recubre completamente a las moléculas proteicas, las cuales tienden a unirse entre sí dando lugar a grandes partículas que precipitan.

## **DESNATURALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS**

En bioquímica, la desnaturalización es un cambio estructural de las proteínas o ácidos nucleicos, donde pierden su estructura nativa, y de esta forma su óptimo funcionamiento y a veces también cambian sus propiedades físico-químicas-estructurales.

## **DESNATURALIZACIÓN DE UNA PROTEÍNA**

Las proteínas se desnaturalizan cuando pierden su estructura tridimensional (conformación espacial) y así el característico plegamiento de su estructura.<sup>1</sup> La palabra desnaturalización indica que la estructura se aleja de la forma nativa debido a un importante cambio en su conformación tridimensional.

Las proteínas son polímeros lineales de aminoácidos unidos en una secuencia específica. Son sintetizadas por los ribosomas que "leen" codones de los genes y ensamblan en el orden de aminoácidos por la instrucción genética, en un proceso conocido como traducción. Muchas proteínas recién creadas experimentan una modificación post-tradicional en la que se agregan átomos o moléculas adicionales, como el cobre, zinc y hierro.

El plegamiento, es decir, el proceso que conduce a la forma tridimensional del polipéptido, ocurre en seguida o a la par de la traducción sin alterar su secuencia, de forma tal que los residuos hidrófobos de la proteína quedan encerrados dentro de su estructura y los elementos hidrófilos quedan expuestos al exterior. Este proceso de plegamiento es espontáneo, pero con frecuencia requiere la asistencia de enzimas especializadas llamadas chaperonas. La forma final de la proteína determina cómo interaccionará con el entorno.

Si la forma de la proteína es alterada por algún factor externo (por ejemplo, aplicándole calor, ácidos o álcalis), no es capaz de cumplir su función celular. Este es el proceso llamado desnaturalización.

### **Cómo la desnaturalización afecta a los distintos niveles**

- En la desnaturalización de la estructura cuaternaria, las subunidades de proteínas se separan o su posición espacial se corrompen.
- La desnaturalización de la estructura terciaria implica la interrupción de:

- Enlaces no covalentes dipolo-dipolo entre cadenas laterales polares de aminoácidos.
- Enlaces dipolo inducidos por fuerzas de Van Der Waals entre cadenas laterales no polares de aminoácidos.
- En la desnaturalización de la estructura secundaria las proteínas pierden todos los patrones de repetición regulares como las hélices alfa y adoptan formas aleatorias.
- La estructura primaria, la secuencia de aminoácidos ligados por enlaces peptídicos, no es interrumpida por la desnaturalización.

En casos extremos de calentamiento o exposición a los agentes desnaturalizantes, se rompen los enlaces covalentes entre las cadenas laterales de los aminoácidos (como los puentes disulfuros entre las cisteínas) o entre los mismos aminoácidos.

### **PÉRDIDA DE FUNCIÓN**

La mayoría de las proteínas pierden su función biológica cuando están desnaturalizadas, por ejemplo, las enzimas pierden su actividad catalítica, porque los sustratos no pueden unirse más al centro activo, y porque los residuos del aminoácido implicados en la estabilización de los sustratos no están posicionados para hacerlo y así es.

### **REVERSIBILIDAD E IRREVERSIBILIDAD**

En muchas proteínas la desnaturalización no es reversible; esto depende del grado de modificación de las estructuras de la proteína.

Aunque se ha podido revertir procesos de desnaturalización quitando el agente desnaturalizante, en un proceso que puede tardar varias horas, incluso días; esto se debe a que el proceso de reestructuración de la proteína es tentativo, es decir, no asume su forma original inmediatamente, así muchas veces se obtienen estructuras distintas a la inicial, además con otras características como insolubilidad (debido a los agregados polares que puedan unírsele). Recientemente se ha descubierto que, para una correcta renaturalización, es necesario agregar trazas del agente desnaturalizante. Esto fue importante históricamente, porque condujo a la noción de que toda la información necesaria para que la proteína adopte su forma nativa se encuentra en la estructura primaria de la proteína, y por lo tanto en el ADN que la codifica.

## **ALGUNOS EJEMPLOS COMUNES**

Cuando se cocina el alimento, algunas de sus proteínas se desnaturalizan. Esta es la razón por la cual los huevos hervidos llegan a ser duros y la carne cocinada llega a ser firme. En la preparación de ceviches o carne en un ácido como la naranja se observa que adoptan una coloración blanquecina (esto es debido a la desnaturalización).

Un ejemplo clásico de desnaturalización de proteínas se da en la clara de los huevos, que son en gran parte albúminas en agua. En los huevos frescos, la clara es transparente y líquida; pero al cocinarse se torna opaca y blanca, formando una masa sólida intercomunicada. Esa misma desnaturalización puede producirse a través de una desnaturalización química, por ejemplo volcándola en un recipiente con acetona. Otro ejemplo es la nata, que se produce por calentamiento de la lactoalbúmina de la leche (y que no tiene nada que ver con la crema). La proteína de la leche se llama caseína y se desnaturaliza cuando el pH de la leche se modifica. Esto se le conoce en lo cotidiano "Se cortó la leche". La caseína se desnaturaliza cuando se agrega a un vaso de leche suficiente jugo de limón para modificar el pH de la misma.

## **DESNATURALIZACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

La desnaturalización de ácidos nucleicos como el ADN por altas temperaturas produce una separación de la doble hélice, que ocurre porque los enlaces o puentes de hidrógeno se rompen.

Esto se utiliza durante la reacción en cadena de la polimerasa; para separar las cadenas del ácido nucleico y permitir la síntesis de la cadena complementaria bajo condiciones controladas. Después, al bajar la temperatura las cadenas se vuelven a unir (renaturalizarse). Si las condiciones son restauradas rápidamente, las cadenas pueden no alinearse correctamente.

## **FACTORES DESNATURALIZANTES**

Los agentes que provocan la desnaturalización proteica se llaman agentes desnaturalizantes. Se distinguen agentes físicos (calor) y químicos (detergentes, disolventes orgánicos, pH, fuerza iónica). Como en algunos casos el fenómeno de la desnaturalización es reversible, es posible precipitar proteínas de manera selectiva mediante cambios en:

- La polaridad del disolvente.
- La fuerza iónica.
- El pH.
- La temperatura

Cuando la proteína no ha sufrido ningún cambio en su interacción con el disolvente, se dice que presenta una estructura nativa (Figura inferior). Se llama desnaturalización de las proteínas a la pérdida de las estructuras de orden superior (secundaria, terciaria y cuaternaria), quedando la cadena polipeptídica reducida a un polímero estadístico sin ninguna estructura tridimensional fija.

Cualquier factor que modifique la interacción de la proteína con el disolvente disminuirá su estabilidad en disolución y provocará la precipitación. Así, la desaparición total o parcial de la envoltura acuosa, la neutralización de las cargas eléctricas de tipo repulsivo o la ruptura de los puentes de hidrógeno facilitarán la agregación intermolecular y provocará la precipitación. La precipitación suele ser consecuencia del fenómeno llamado desnaturalización y se dice entonces que la proteína se encuentra desnaturalizada (Figura superior).

En una proteína cualquiera, la estructura nativa y la desnaturalizada tan sólo tienen en común la estructura primaria, es decir, la secuencia de AA que la componen. Los demás niveles de organización estructural desaparecen en la estructura desnaturalizada.

#### **La desnaturalización provoca diversos efectos en la proteína:**

- cambios en las propiedades hidrodinámicas de la proteína: aumenta la viscosidad y disminuye el coeficiente de difusión.
- una drástica disminución de su solubilidad, ya que los residuos hidrofóbicos del interior aparecen en la superficie.
- pérdida de las propiedades biológicas.

Una proteína desnaturalizada cuenta únicamente con su estructura primaria. Por este motivo, en muchos casos, la desnaturalización es reversible ya que es la estructura primaria la que contiene la información necesaria y suficiente para adoptar niveles superiores de estructuración. El proceso mediante el cual la proteína desnaturalizada recupera su estructura nativa se llama renaturalización.

Esta propiedad es de gran utilidad durante los procesos de aislamiento y purificación de proteínas, ya que no todas las proteínas reaccionan de igual forma ante un cambio en el medio donde se encuentra disuelta. En algunos casos, la desnaturalización conduce a la pérdida total de la solubilidad, con lo que la proteína precipita. La formación de agregados fuertemente hidrofóbicos impide su renaturalización, y hacen que el proceso sea irreversible.

Los agentes que provocan la desnaturalización de una proteína se llaman agentes desnaturalizantes. Se distinguen agentes físicos (calor) y químicos (detergentes, disolventes orgánicos, pH, fuerza iónica). Como en algunos casos el fenómeno de la desnaturalización es reversible, es posible precipitar proteínas de manera selectiva mediante cambios en:

- la polaridad del disolvente.
- la fuerza iónica.
- el pH.
- la temperatura.

## **ENLACES**

### **Efecto de la polaridad del disolvente sobre la estructura de las proteínas.**

La polaridad del disolvente disminuye cuando se le añaden sustancias menos polares que el agua como el etanol o la acetona. Con ello disminuye el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la molécula proteica, provocando la agregación y precipitación. Los disolventes orgánicos interaccionan con el interior hidrofóbico de las proteínas y desorganizan la estructura terciaria, provocando su desnaturalización y precipitación. La acción de los detergentes es similar a la de los disolventes orgánicos.

### **Efecto de la fuerza iónica sobre la estructura de las proteínas.**

Un aumento de la fuerza iónica del medio (por adición de sulfato amónico, urea o hidrocloreuro de guanidinio, por ejemplo) también provoca una disminución en el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la proteína, ya que estos solutos (1) compiten por el agua y (2) rompen los puentes de hidrógeno o las interacciones electrostáticas, de forma que las moléculas proteicas se agregan y precipitan.

En muchos casos, la precipitación provocada por el aumento de la fuerza iónica es reversible. Mediante una simple diálisis se puede eliminar el exceso de soluto y recuperar tanto la estructura como la función original. A veces es una disminución en la fuerza iónica la que provoca la precipitación. Así, las proteínas que se disuelven en medios salinos pueden desnaturalizarse al dializarlas frente a agua destilada, y se renaturalizan cuando se restaura la fuerza iónica original.

### **Efecto del pH sobre la estructura de las proteínas.**

Los iones  $H^+$  y  $OH^-$  del agua provocan efectos parecidos, pero además de afectar a la envoltura acuosa de las proteínas también afectan a la carga eléctrica de los grupos ácidos y básicos de las cadenas laterales de los aminoácidos. Esta alteración de la carga superficial de las proteínas elimina las interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura terciaria y a menudo provoca su precipitación. La solubilidad de una proteína es mínima en su punto isoeléctrico, ya que su carga neta es cero y desaparece cualquier fuerza de repulsión electrostática que pudiera dificultar la formación de agregados.

### **Efecto de la temperatura sobre la estructura de las proteínas.**

Cuando la temperatura es elevada aumenta la energía cinética de las moléculas con lo que se desorganiza la envoltura acuosa de las proteínas, y se desnaturalizan.

Asimismo, un aumento de la temperatura destruye las interacciones débiles y desorganiza la estructura de la proteína, de forma que el interior hidrofóbico interacciona con el medio acuoso y se produce la agregación y precipitación de la proteína desnaturalizada.

## TÉCNICAS DE SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS

- **Electroforesis:** Cuando una mezcla de moléculas ionizadas son colocadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, así, las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo).
- **El movimiento de las moléculas está gobernado también por dos fuerzas adicionales:** la fricción con el solvente dificultará este movimiento originando una fuerza que se opone y por otro lado las moléculas tienen que moverse en forma aleatoria o movimiento browniano debido a que poseen energía cinética propia denominado difusión.
- La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión.
- La suma de todas estas fuerzas provoca que las moléculas no migren de una manera homogénea, sino que comenzarán a moverse formando un frente cuya anchura aumentará con el tiempo.
- Para reducir la anchura de este frente podemos reducir el movimiento de las moléculas. Una forma común de hacer esto es formar un gel.
- El gel consiste de un polímero soluble de muy alto peso molecular que atrapa moléculas de agua y forma un tamiz que dificulta el movimiento de los solutos, consecuentemente, la migración de las moléculas será más lenta, pero el ensanchamiento del frente se verá reducido.

Esta separación se basa en la diferente velocidad de migración de partículas con carga diferente dentro de un campo eléctrico.

$$V = \mu \cdot E$$

La movilidad electroforética de una partícula dependerá de su carga, de su masa, del medio en el que tiene lugar la separación y del campo eléctrico.

$$\mu = \frac{Q}{6\pi\eta r}$$

En el laboratorio clínico, la aplicación más importante de la electroforesis consiste en separar las proteínas presentes en el suero, orina y otros fluidos biológicos (LCR, líquido sinovial.).

- La carga de las proteínas, por su naturaleza anfipática, depende del pH del medio.
- Cuando en un campo eléctrico el pH del medio es igual al punto isoeléctrico (PI) de la proteína, no hay migración.
- Para valores de pH por debajo del PI, predominan las cargas positivas y las proteínas migran hacia el cátodo (-).
- Para valores de pH superiores al PI, las proteínas están cargadas negativamente y migran hacia el ánodo (+).

#### **TIPOS DE ELECTROFORESIS:**

- Electroforesis de frente móvil o libre
- Electroforesis de zona: (convencional)

- En papel
- En acetato de celulosa
- En gel (agarosa, poliacrilamida y almidón)
- Electroforesis capilar

### **Electroforesis de frente móvil o libre:**

El campo eléctrico se aplica a disoluciones o suspensiones. Históricamente, es el origen de la electroforesis tal y como hoy la conocemos. Actualmente está en desuso, ya que al ser un fluido el medio en el que se desarrolla.

Las diferentes proteínas se desplazan a velocidades diferentes según sus cargas y coeficientes de fricción respectivos, formándose nubes que se van desplazando en la disolución tampón y que puede seguirse con diversos sistemas ópticos, poniéndose de manifiesto las sustancias que se van separando tiene poco poder de resolución.

### **Electroforesis de zona:**

La muestra se desplaza sobre un soporte sólido.

Fuente de alimentación: Proporciona el campo eléctrico mediante los dos electrodos, estableciendo una diferencia de potencial.

- **Cubeta:** Recipiente en cuyos extremos se sitúan los electrodos.

- Soporte electroforético: Es el elemento fundamental. Debe ser inerte. La pequeña cantidad necesaria de muestra permite que las moléculas migren en discretas zonas o bandas.

### **Detección y cuantificación de las fracciones separadas:**

- Para revelar las proteínas separadas por electroforesis, el soporte se trata con colorantes.
- Las bandas de proteínas adsorben el colorante más intensamente que el soporte, de forma que se puede eludir el exceso de colorante del soporte mientras que las proteínas quedan teñidas con el colorante.
- Se mide densitométricamente, integrando las áreas correspondientes a cada fracción proteica y calculando el porcentaje de cada fracción sobre el total de proteínas.

La sensibilidad analítica alcanzada varía en función del colorante empleado. De mayor a menor sensibilidad: violeta ácido > azul comassie > negro amido.

### **TIPOS DE SOPORTES:**

- **Papel:** En desuso
- **Acetato de celulosa:** Ventajas: presenta poca adsorción, necesita cantidades pequeñas de muestra, porosidad uniforme, transparente, sin contaminantes y resultados precisos. Inconvenientes: débil resolución y electroósmosis. Se ha quedado obsoleta.
- **Gel de agarosa:** Es un polisacárido, cuyas disoluciones poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50° C y formar un gel, semisólido al enfriarse.

Este gel está constituido por una matriz o trama tridimensional de fibras poliméricas embebida en gran cantidad de medio líquido. El tamaño de poro no opone impedimento al paso de las moléculas (soporte no restrictivo tipo I). Se usa usualmente para separar moléculas grandes. Ventajas: No presenta fenómenos de adsorción, pequeña cantidad de muestra, mejor visualización y resolución. Inconvenientes: electroósmosis.

**Gel de poliacrilamida (PAGE):** Es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis, ya que es con el que mejor se logra separaciones electroforéticas. Es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible.

- Forma geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permite buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado.

- Tiene la ventaja que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro.

- El tamaño de poro opone resistencia al paso de las moléculas (soportes restrictivos tipo II), ya que el tamaño del poro es similar al de las proteínas, de tal modo que existe un efecto de tamizado molecular y la separación electroforética depende de la densidad de carga de las moléculas y de su tamaño.

- Inconvenientes: Neurotoxicidad.

## **SDS-PAGE:**

- Se fundamenta en eliminar las cargas de las proteínas por tratamiento con SDS (sodiododecilsulfato) que las desnaturaliza y se fijan a él, tomando carga neta negativa.

- La migración de los derivados proteína-SDS hacia el ánodo es inversamente proporcional al logaritmo de su PM. La relación carga/masa es aproximadamente igual para todas las proteínas de la muestra, por lo que el tamaño de esta es un factor determinante de la separación.

- La electroforesis con SDS es un excelente método para identificar y monitorizar las proteínas durante un proceso de purificación y para la determinación del PM de las diferentes subunidades proteicas.

La electroforesis convencional ha sido y continúa siendo de gran utilidad; sin embargo este tipo de separación electroforética es lenta, laboriosa, poca reproducibilidad, difícil de automatizar, y además no proporciona resultados cuantitativos precisos.

## **PURIFICACIÓN DE PROTEINAS**

Las técnicas de la ingeniería de la proteína son una parte esencial de modificar o de producir las proteínas para requisitos particulares con las propiedades específicas que se pueden aplicar en diversos procesos industriales. Así son cruciales a la investigación biotecnológica.

Sin embargo, estos métodos dependen pesados de poder aislar y purificar las proteínas deseadas para poder entender sus propiedades físicas y químicas, junto con sus estructuras terciarias y acciones recíprocas con ligandos y sustratos.

La intensidad a la cual se persigue este proceso de la purificación depende del uso al cual la proteína debe ser puesta. Por ejemplo, las proteínas farmacéuticas y de la comida necesitan ser traídas a una alta pendiente de la pureza, y pasan con varios pasos secuenciales, únicamente posibles, puesto que en cada paso un poco de proteína será pérdida inevitable.

La purificación de las moléculas de proteína es más simple que complejos de la proteína de la purificación.

### **PASO 1: Crear un extracto de la proteína cruda**

Los extractos crudos de proteínas intracelulares son preparados lysing la célula usando procesos químicos o mecánicos. Los escombros entonces son quitados por la centrifugación. El resultar supernatant es a lejos de la forma pura, siendo mezclado con muchos otra macro y macromolecular.

Las proteínas extracelulares son obtenidas centrifugando la solución y quitando las células.

Un método específico para obtener un extracto crudo de enzimas termoestables es calentar la mezcla para desnaturalizar otras proteínas, y después la enfría para reformar las proteínas termoestables del interés, finalmente centrifugándola para quitar las proteínas desnaturalizadas.

## **PASO 2: Purificación intermedia**

### **Salazón**

Las proteínas en un extracto crudo son purificadas después precipitándolas en una solución de sal altamente concentrada, tal como sulfato del amonio. Esto trabaja en base de la solubilidad más inferior de la proteína en las altas concentraciones de sal. Sin embargo, todas las proteínas no se precipitan en la misma concentración de sal, que significa que la salazón también ayuda a fraccionar las proteínas. Puede también ser utilizada para concentrar las proteínas en la solución. Este paso aumenta la pureza tres veces y el 92% de la proteína en la solución se recupera.

### **Diálisis**

Las proteínas son moléculas grandes, y ésta significa que las sales de las proteínas serán conservadas pasando la solución a través de una membrana semipermeable. La celulosa es una membrana típica de la diálisis. La diálisis no se puede utilizar para separar las proteínas de diversos pesos moleculares.

### **Cromatografía**

Otras técnicas usadas para quitar fuera saladas las proteínas incluyen la cromatografía y la filtración de la exclusión del gel.

Éstos están disponibles ahora como estuches preformados para muchas proteínas estándar, y son a menudo convenientes para los procesos en grande.

La filtración de gel trabaja en base de la separación de talla a través de una columna de las molduras porosas del polímero, tales como dextrano o agarosa.

Las moléculas grandes pueden fluir solamente a través de los espacios entre las molduras, mientras que las más pequeñas ocupan estos espacios y el espacio dentro de las molduras, reduciéndolas. Así el eluyente contiene las moléculas que emergen en orden de su talla, de la más grande al más pequeño. Al Reverso-fase o las técnicas de intercambio iónico de la cromatografía también se utiliza, operando en base de propiedades hidrofóbicas diferenciadas y carga respectivamente. La cromatografía inversa se puede limitar en su uso debido a la desnaturalización posible de la proteína por los disolventes orgánicos.

Diálisis y resultado de intercambio iónico en una solución que es 9 veces tan puras, pero con el solamente 77% de la proteína original que está ahora disponible. Después de cromatografía de la exclusión del gel, el rendimiento es el solamente 50% pero la pureza es de cien veces.

### **PASO 3: Purificación final**

#### **Cromatografía de afinidad**

Este proceso depende de usar los ligandos limitados a las molduras que atan específicamente a la proteína del interés que se puede entonces enjuagar fuera con otra solución de ligandos libres. Esto da lugar a las muestras extremadamente puras de la proteína que tienen la actividad específica más alta entre todas las técnicas de uso corriente. Un ejemplo es la purificación de la concanavalina A usando los residuos de la glucosa sujetos a las molduras en una columna.

La solución ahora es el doblez 3000 más puro pero el rendimiento es el solamente 35% de la proteína original.

## **Electroforesis del gel de poliacrilamida**

La electroforesis del gel de poliacrilamida se utiliza para descubrir la pureza de la muestra de la proteína después de cada paso basado en la talla. La carga neta en la molécula hace que baja la columna o la hoja del gel en un campo eléctrico, permitiendo separar las proteínas basadas en su velocidad de la migración, que a su vez depende de su carga, así como la fricción y la fuerza de campo. El gel actúa como filtro químicamente inerte y fácilmente formado, con las moléculas de proteína estando casi inmóviles en la columna porque se adhieren entre los poros mucho más pequeños entre las moléculas del gel. Una serie de bandas se visualiza inicialmente que representen diversas proteínas en la mezcla, que reducen gradualmente en gran número hasta que el paso final muestra solamente una banda.

## **Immunoblotting**

Immunoblotting es otra técnica útil combinada a menudo con cromatografía de afinidad. Utiliza los anticuerpos para que la proteína sea aislada como ligands en la columna. El anticuerpo se sujeta a veces a los isótopos o a los tintes para etiqueta los y para hacer la detección más fácil después de la separación.

Cualquier técnica cromatográfico se perfecciona usando la presión para forzar la solución a través de una columna de materiales finos divididos, está cargada o las molduras ligand-bajo fianza. La superficie creciente da lugar a la mayor acción recíproca que empuja hacia arriba la resolución y la velocidad de la técnica. Esto se refiere como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Todos estos pasos se incluyen en el esquema ideal, que debe concentrar en niveles del rendimiento y de la purificación para ofrecer cantidades adecuadas de proteína a la corrida con un experimento así como ofrecer suficiente pureza para hacer la interpretación relativamente directa.

## **CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS**

La cuantificación precisa de las proteínas de una muestra es fundamental para el estudio de las mismas en unidad de ámbitos de investigación.

Mientras que la cuantificación de una proteína específica puede llevarse a cabo mediante ensayos como Western Blot o ELISA, por espectrometría de masas (MS) o mediante otros métodos como los basados en nanopartículas, existen ensayos que permiten cuantificar la concentración de proteína total presente en una muestra.

Este último caso es en el que nos centramos esta semana, recopilando una breve descripción de los 5 principales métodos para cuantificar proteínas totales.

### **MÉTODOS PARA CUANTIFICAR PROTEÍNAS**

#### **ÁCIDO BICINCONINICO (BCA)**

- Rango de concentración 20-2000 ug/ml.

- **características:**

- Desarrollado en 1985

- Ensayo colorimétrico donde la absorbancia será proporcional a la concentración de proteína presente en la muestra

#### **Reacción en dos pasos:**

- Formación de complejos proteína-iones de cobre.
- Formación de un quelato Cu-BCA que da lugar a una intensa coloración púrpura que absorbe a 562nm.
- Es un método recomendado en el caso de muestras que contengan >5% de detergentes y/o agentes desnaturizantes como urea o cloruro de guanidinio.

#### **Limitaciones:**

Las muestras que contengan sustancias que interaccionan con el cobre, como por ejemplo el amoníaco, al igual que el EDTA, los azúcares reductores o los lípidos, pueden interferir con este ensayo.

#### **ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA (UV)**

- Rango de concentración: 0,1-100 ug/ml.

#### **- Características:**

- Este método, mediante la medición de la absorción característica que presentan el triptófano y la tirosina a 280nm, estima la cantidad de proteína presente en la muestra.

### **Limitaciones:**

- Es incompatible con los métodos de extracción de proteínas que emplean detergentes y/o agentes desnaturizantes.
- No es un método específico para proteínas, ya que otros compuestos que podría haber en la muestra también absorben a 280nm (como alcoholes o ácidos nucleicos, entre otros).

### **ENSAYO DE BRADFORD O AZUL COOMASINE**

Rango de concentración: 20-2000 ug/ml.

#### **- características:**

- método descrito en 1976.
- se caracteriza por ser un método rápido, sencillo y compatible con los agentes reductores utilizados para estabilizar las proteínas en solución.
- La tinción azul Coomassine cargada negativamente, se une a proteínas con carga positiva.
- Se une principalmente a residuos de arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina.
- La tinción en solución es de color rojo y absorbe a 465nm, mientras que al unirse a los aminoácidos básicos de una proteína se vuelve azul y absorbe a 595nm.
- La medición de la absorbancia se compara con los valores de una curva estándar para determinar la concentración de proteína de la muestra.

**Limitaciones:**

- No es válido para detectar proteínas de <3kDa>.
- Es incompatible con detergentes como el SDS o el triton x-100.

**ENSAYO DE LOWRY**

- Rango de concentración: 10-1000 ug/ml.

**- Características:**

- Uno de los métodos para cuantificar proteínas más utilizado, fue desarrollado en 1951.

- Es un ensayo muy sensible y preciso.

**- Al igual que el ensayo BCA, se da una reacción en dos pasos:**

- Formación de complejos Cu-N (presente en la proteína).

- Los complejos de tirosina y triptófano reaccionan con el reactivo FolinCiocalteau, dando lugar a un color azul verdoso que absorbe entre 650 y 750nm.

- La medición de la absorbancia se compara con los valores de una curva estándar para determinar la concentración de proteína de la muestra.

**Limitaciones:**

Es incompatible con determinados reactivos químicos de uso común como el Tris, EDTA, DDT, 2-mercaptoetanol, carbohidratos, etc.

**ENSAYO      CBQCA      (3-(4-CARBOXIBENZOIL)      QUINOLINA-2-CARBOXIALDEHIDO)**

- Se trata de un agente orogénico de alta sensibilidad que se utiliza para la detección de aminas primarias en las proteínas.
- La intensidad de la fluorescencia emitida será directamente proporcional a la concentración de proteína presente en la muestra.
- No interacciona con compuestos lipídicos.

**Limitaciones:**

- El resultado depende del número de determinados aminoácidos presentes en la proteína.

## BIBLIOGRAFIA

- <https://es.wikipedia.org/wiki/Amino%C3%A1cido>
- <https://dnangelica.com/dnangelica/index.php/2015/09/30/bioquimica-1-estructura-de-los-aminoacidos/>
- <https://sites.google.com/site/bq2014iruizcruzmariaconcepcion/i-fundamentos-de-la-bioquimica/proteinas/1-2-1-1-aminoacidos-estructura-clasificacion-propiedades-estereoquimica-y-metodos-de-obtencion>
- <https://es.wikipedia.org/wiki/Estereoisomer%C3%ADa>
- [https://biologia-geologia.com/biologia2/422\\_propiedades\\_de\\_los\\_aminoacidos.html](https://biologia-geologia.com/biologia2/422_propiedades_de_los_aminoacidos.html)
- [1bdc8e817b83914e1a7ff55cd9de499d-Antologia de Bioquímica.pdf](#)
- <https://definicion.de/peptido/>
- <http://www.ehu.es/biomoleculas/peptidos/pep4.htm>
- <https://es.wikipedia.org/wiki/P%C3%A9ptido>
- <https://cuidateplus.marca.com/alimentacion/diccionario/proteinas.html#:~:text=Las%20prote%C3%ADnas%20son%20mol%C3%A9culas%20formadas,Carbono>
- <https://www.um.es/molecula/prot06.htm#:~:text=Las%20proteinas%20son%20solubles%20en,con%20las%20mol%C3%A9culas%20de%20agua>
- [https://biologia-geologia.com/biologia2/442\\_propiedades\\_de\\_las\\_proteinas.html](https://biologia-geologia.com/biologia2/442_propiedades_de_las_proteinas.html)
- <https://okdiario.com/salud/tipos-proteinas-sus-funciones-74794>

- <https://www.asturnatura.com/articulos/proteinas/clasificacion-proteinas.php>
- <https://www.tuasaude.com/es/alimentos-ricos-en-proteinas/#:~:text=Los%20alimentos%20m%C3%A1s%20ricos%20en,por%20el%20organismo%20m%C3%A1s%20f%C3%A1cilmente.>
- <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/11%20CROMATOGRFOA%20DE%20CAPA%20FINA%20DE%20AAs.pdf>
- [https://www.news-medical.net/life-sciences/Bioactive-Peptides-An-Overview-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Bioactive-Peptides-An-Overview-(Spanish).aspx)
- <https://es.wikipedia.org/wiki/Oxitocina#:~:text=La%20oxitocina%20es%20un%20p%C3%A9ptido,masa%20molecular%20de%201007%20daltons.>
- <https://psicologiaymente.com/neurociencias/oxitocina-hormona>
- [https://www.cuerpomente.com/salud-natural/terapias-naturales/que-es-hormona-oxitocina-para-que-sirve\\_264](https://www.cuerpomente.com/salud-natural/terapias-naturales/que-es-hormona-oxitocina-para-que-sirve_264)
- [https://es.wikipedia.org/wiki/Glutati%C3%B3n#:~:text=El%20glutati%C3%B3n%20\(tambi%C3%A9n%20glutaciona\)%20\(%20glutamato%20ciste%20adina%20y%20glicina.&text=En%20efecto%20el%20glutati%C3%B3n%20reduce,como%20un%20donante%20de%20electrones.](https://es.wikipedia.org/wiki/Glutati%C3%B3n#:~:text=El%20glutati%C3%B3n%20(tambi%C3%A9n%20glutaciona)%20(%20glutamato%20ciste%20adina%20y%20glicina.&text=En%20efecto%20el%20glutati%C3%B3n%20reduce,como%20un%20donante%20de%20electrones.)
- <https://www.farmaciaserra.com/blog/que-es-glutation-para-que-sirve.html>
- [https://www.gonadotropina.com/hormona\\_liberadora\\_de\\_gonadotropina\\_gnrh](https://www.gonadotropina.com/hormona_liberadora_de_gonadotropina_gnrh)
- [https://es.wikipedia.org/wiki/Estructura\\_primaria\\_de\\_las\\_prote%C3%ADnas](https://es.wikipedia.org/wiki/Estructura_primaria_de_las_prote%C3%ADnas)

[https://es.wikipedia.org/wiki/Secuencia\\_de\\_amino%C3%A1cidos#:~:text=M%C3%A1s%20espec%C3%ADficamente%2C%20son%20pol%C3%ADmeros%20lineales,de%20las%20prote%C3%ADnas%2C%20los%20amino%C3%A1cidos.&text=La%20secuencia%20de%20amino%C3%A1cidos%20de,del%20gen%20que%20la%20codifica.](https://es.wikipedia.org/wiki/Secuencia_de_amino%C3%A1cidos#:~:text=M%C3%A1s%20espec%C3%ADficamente%2C%20son%20pol%C3%ADmeros%20lineales,de%20las%20prote%C3%ADnas%2C%20los%20amino%C3%A1cidos.&text=La%20secuencia%20de%20amino%C3%A1cidos%20de,del%20gen%20que%20la%20codifica.)

- [https://es.wikipedia.org/wiki/Estructura\\_secundaria\\_de\\_las\\_prote%C3%ADnas](https://es.wikipedia.org/wiki/Estructura_secundaria_de_las_prote%C3%ADnas)

- <https://www.lifeder.com/helice-alfa/>

<http://iesmonre.educa.aragon.es/alumnos0607/websnov/proteinas/strucproteinas.htm>

- [https://es.wikipedia.org/wiki/Fuerza\\_por\\_puente\\_de\\_hidr%C3%B3geno](https://es.wikipedia.org/wiki/Fuerza_por_puente_de_hidr%C3%B3geno)

- [https://es.wikipedia.org/wiki/Fuerza\\_por\\_puente\\_de\\_hidr%C3%B3geno](https://es.wikipedia.org/wiki/Fuerza_por_puente_de_hidr%C3%B3geno)

<https://www.sebbm.es/BioROM/contenido/JCorzo/temascompletos/InteraccionesNC/hidrogeno/hidrogeno1.htm>

- <https://definicion.de/puente-de-hidrogeno/>

<https://www.sebbm.es/BioROM/contenido/JCorzo/temascompletos/InteraccionesNC/ionicos/ionicos1.htm#:~:text=Se%20llevar%20a%20cabo%20entre,repulsi%C3%B3n%2C%20si%20presentan%20igual%20carga.>

- [https://es.wikipedia.org/wiki/Fuerzas\\_de\\_Van\\_der\\_Waals](https://es.wikipedia.org/wiki/Fuerzas_de_Van_der_Waals)

[https://www.ecured.cu/Fuerzas\\_de\\_Van\\_der\\_Waals](https://www.ecured.cu/Fuerzas_de_Van_der_Waals)

- <https://www.quimicas.net/2015/05/enlace-de-van-der-waals.html>

- <https://www.lifeder.com/interacciones-hidrofobicas/>

- <https://es.wikipedia.org/wiki/Disulfuro>

- <http://www.ehu.eus/biomoleculas/proteinas/prot44.htm>

- <https://proteinas.org.es/proteinas-estructurales>
- [https://es.wikipedia.org/wiki/Prote%C3%ADnas\\_estructurales](https://es.wikipedia.org/wiki/Prote%C3%ADnas_estructurales)
- <https://dnangelica.com/dnangelica/index.php/2015/11/27/bioquimica-5-enzimas-funcionalidad-de-las-proteinas/>
- <https://es.slideshare.net/fasanfisi/proteinas-de-defensa-anticuerpos-y-gammaglobulinas>
- [https://es.wikipedia.org/wiki/Prote%C3%ADna\\_transportadora\\_de\\_membrana](https://es.wikipedia.org/wiki/Prote%C3%ADna_transportadora_de_membrana)
- <https://es.slideshare.net/OyuukiDaiki/proteinas-12789581#:~:text=6.,con%20exactitud%20su%20estructura%20qu%C3%ADmica.&text=Propiedades%20f%C3%ADsicas%EF%82%A7%20Fibrosas%3A%20presentan,agua%20y%20en%20disoluciones%20acuosas.>
- [https://ocw.unican.es/pluginfile.php/1327/course/section/1638/Tema5\\_estructuras\\_proteinas.pdf](https://ocw.unican.es/pluginfile.php/1327/course/section/1638/Tema5_estructuras_proteinas.pdf)
- [https://es.wikipedia.org/wiki/Desnaturalizaci%C3%B3n\\_\(bioqu%C3%ADmica\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Desnaturalizaci%C3%B3n_(bioqu%C3%ADmica))
- [https://www.news-medical.net/life-sciences/Protein-Purification-Techniques-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Protein-Purification-Techniques-(Spanish).aspx)
- <http://www.ehu.eus/biomoleculas/proteinas/desnaturalizacion.htm#:~:text=Se%20llama%20desnaturalizaci%C3%B3n%20de%20las,sin%20ninguna%20estructura%20tridimensional%20fija.>
- [http://www.hgucr.es/wp-content/uploads/2011/12/tecnicas\\_de\\_separaci%C3%B3n\\_prote%C3%ADca.pdf](http://www.hgucr.es/wp-content/uploads/2011/12/tecnicas_de_separaci%C3%B3n_prote%C3%ADca.pdf)
- <https://www.abynetek.com/5-metodos-para-cuantificar-proteinas/#:~:text=Mientras%20que%20la%20cuantificaci%C3%B3n%20de,total%20presente%20en%20una%20muestra.>