PROPIEDADES DE LAS PROTEINAS
(DESNATURALIZACION, DIALISIS Y EQUILIBRIO DE DONNAN)

INTRODUCCION

La caracterización de una proteina en cuanto a su estructura y función biológica, requiere del aislamiento y purificación a partir de la fuente natural. Para ello, es aplicable técnicas que permiten la eliminación de material contaminante; las cuales son métodos suaves que precisan de un trabajo cuidadoso siendo útiles para el aislamiento de proteinas globulares nativas, pero no empleadas para otros compuestos de carbono biologicamente importantes.

Sin embargo para trabajar con estas biomoléculas es necesario una atención estricta a los detalles puesto que son extremadamente sensibles al calor, al pH, radiaciones, solventes orgánicos. étc; y en algunos casos hasta al agua destilada.

OBJETIVO

Trataremos de demostrar experimentalmente el efecto de los factores ambientales como el calor y el pH sobre la integridad de las proteínas, asimismo observaremos la propiedad que tienen estas moléculas de no atravezar membranas semipermeables, así como la capacidad de un ión no difusible (proteinas) de ocasionar una distribución desigual de iones a ambos lados de la membrana semipermeable.

FUNDAMENTO

DESNATURALIZACION: Este fenómeno, es el cambio que experimentan las moléculas de proteína cuando se exponen a diferente condiciones como son: cambios de temperatura, pH, sonicación, exposición a la radiación ultravioleta, agitación, solventes orgánicos, altas concentraciones de compuestos polares, trituración. Las alteraciones ocasionadas por estos factores fisicoquímicos son directamente sobre las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas debido al rompimiento de los enlaces no covalentes que mantienen dichas estructuras.

Los efectos de la desnaturalización se manifiestan como pérdida de la actividad biológica, solubilidad disminuida en el punto isoeléctrico, pérdida de la cristabilidad, así como aumento en la levorrotación, asímetría de la molécula y suceptibilidad incrementada a la hidrólisis efectuada por enzimas proteolíticas. Los agentes que ocasionan la desnaturalización de las proteínas se conocen como AGENTES DESNATURALIZANTES.

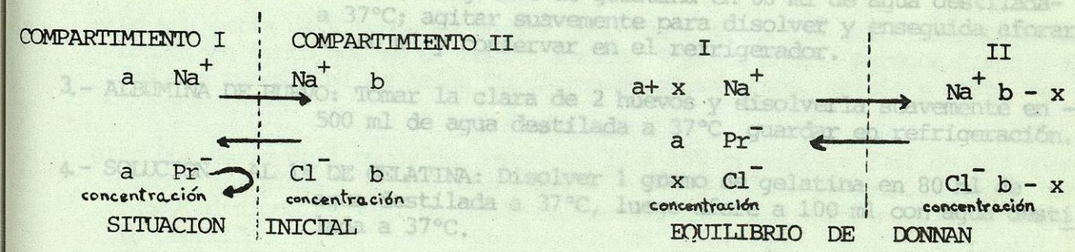
Cuando las proteínas se colocan a temperaturas superiores a los 35°C sufren el fenómeno de desnaturalización y la alteración- es total al llegar a los 80°C. Entre estos límites la solubilidad disminuye observándose la formación de un coagulo (COAGULACION) como ocurre con las albúminas y las globulinas al calentarlas. Este fenómeno se presenta mejor cuando la proteína se encuentra cerca de su punto isoeléctrico.

DESNATURALIZACION POR SOLVENTES ORGANICOS: Sustancias orgánicas como el alcohol, la acetona, éter con una baja constante dieléctrica, al ser adicionadas a soluciones acuosas de proteína, reducen la constante dieléctrica de esas soluciones, abatiendo la afinidad de la proteína por el solvente, por lo que estas biomoléculas se disuelven menos y precipitan de la solución.

PRECIPITACION POR ANIONES: Los iones negativos se combinan con las proteínas cargadas positivamente (a pH ácido con respecto al punto isoeléctrico), precipitando en forma de sales de proteína; algunas de estas sales son insolubles. Entre estos agentes precipitantes figuran el ácido- tricloracético, acido pícrico, ácido tánico, ácido fosfomolíbdico, túngstico, y aniones como el metafosfato.

EQUILIBRIO DE DONNAN: Donnan en 1911, demostró que cuando una solución de proteína cargada se separa de una solución salina mediante una membrana semipermeable, la macromolécula no atravieza la membrana, pero su contraión sí, obteniéndose una distribución desigual de iones a ambos lados de la membrana en el equilibrio, lo cual genera una diferencia de potencial eléctrico a traves de ella. Este tipo de distribución de iones en el equilibrio, debido a la presencia de un ión no-difusible en un compartimiento, se ha llamado EQUILIBRIO DE DONNAN; el cual se rige por las siguientes reglas:

1a. Ley: La suma de cationes es igual a la suma de aniones en cada uno de los compartimientos.
2a. Ley: El producto de los dos iones (anión y catión) de cualquier sal difusible es igual en los dos compartimientos.
3a. Ley: La suma de cationes difusibles es mayor en el compartimiento que contiene el anión coloidal no difusible.
4a. Ley: La suma total de iones es mayor en el compartimiento del coloide iónico.



Este equilibrio de Donnan se puede poner de manifiesto dializando una solución de proteína cargada negativamente contra un mismo volúmen de agua destilada. Como sabemos, la proteína no puede atravezar la bolsa de diálisis pero si contraión sí (el Na^+); esto ocasiona un exceso de cationes en el líquido exterior, por lo que para mantener la neutralidad eléctrica ahí, el agua de disocia generando iones H^+ y OH^-; los iones H^+ migran al interior de la bolsa de diálisis ocasionando una disminución del pH, mientras que el líquido exterior al conservar los OH^- incrementa su pH.

DIALISIS: Las membranas dialíticas son permeables al agua y solutos verdaderos, pero impiden el paso a los solutos coloidales debido a su gran tamaño. Por ello, mediante la DIALISIS, podemos separar solutos (cristaloides) de solutos coloidales (proteínas), en virtud a que los coloides por sus grandes dimensiones quedan retenidos dentro de la membrana.

La diálisis se emplea durante la purificación de proteínas para separar los agentes precipitantes de proteínas utilizados en el primer paso de su aislamiento como son las sales neutras (NH_4SO_4) ó etanol.

MATERIAL POR EQUIPO DE CUATRO PERSONAS

3 vasos de precipitados de 250 ml (ó frascos Gerber)
2 pipetas de 10 ml
2 pipetas de 1 ml
10 tubos de ensaye de 18 x 150
5 tubos de ensaye de 13 x 100
1 gradilla
1 pinzas para tubos de ensaye
Mechero
Tripié y tela de asbesto

REACTIVOS

1.-FENOLFTALEINA AL 0.5%:Disolver 0.5 gramos de fenolftaleina en 100 ml etanol.

2.- GELATINA AL 2%: Disolver 2 gramos de gelatina en 80 ml de agua destilada a 37°C; agitar suavemente para disolver y enseguida aforar a 100 ml y conservar en el refrigerador.

3.- ALBUMINA DE HUEVO: Tomar la clara de 2 huevos y disolverla suavemente en 500 ml de agua destilada a 37°C. guardar en refrigeración.

4.- SOLUCION AL 1% DE GELATINA: Disolver 1 gramo de gelatina en 80 ml de agua destilada a 37°C, luego afore a 100 ml con agua destilada a 37°C.

5.-SOLUCION DE CASEINA AL 0.1% Disolver 0.1 gramo de caseína en 80 ml de agua destilada a 37°C y luego afore a 100 ml con agua a 37°C

6 -SOLUCION DE PEPTONA AL 1%: Disuelva suavemente 1 gramo de peptona en 100 ml de agua destilada tibia a 37°C.

7.-REGULADOR DE ACETATOS pH 4.6: Mezclar 15.5 ml de la solución A y 24.5 ml de la solución B y aforar a 100 ml con agua destilada.
SOLUCION A: HOAc 0.2M: Diluir 11.5 ml de acido acético concentrado a 1 litro con agua destilada
SOLUCION B: NaOAc 0.2M: Disolver 16.31 gramos de acetato de sodio anhidro ó 27.22 gramos de acetato de sodio trihidratado en 800 ml de agua destilada y luego aforar a un litro.

8.-REACTIVO DE BIURET.

PARTE EXPERIMENTAL

I.-DESNATURALIZACION POR CALOR (COAGULACION).

Prepare tres tubos de ensaye de 18 x 150 como se indica enseguida:

TUBO	Albumina 1%	Reg.Acetatos pH 4.6	HCl 0.1M	NaOH 0.1M
1	9 ml	---	1 ml	---
2	9 ml	---	----	1 ml
3	9 ml	1 ml	----	---

Coloque los tres tubos en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos, y enfríelos al chorro de agua corriente. Anote en cuales tubos ocurrió coagulación. En los tubos donde no se haya presentado este fenómeno, adicioneles 2 ml de Regulador de acetatos pH 4.6, y anote sus observaciones.

II.-DESNATURALIZACION POR SOLVENTES ORGANICOS

a) En 4 tubos de 18 x 150, coloque 2 ml de las soluciones de proteína proporcionadas. Enseguida, agréguelos 2 ml de acetona y anote sus observaciones. En un 5o. tubo adicione 2 ml de agua destilada y 2 ml de acetona.

b) En 4 tubos de ensaye de 18 x 150, coloque 2 ml de las soluciones proteícas bajo estudio, y en un 5o. tubo adicione 2 ml de agua destilada. A todos los tubos añádales 2 ml de etanol, y observe. Anote los cambios ocurridos.

III.-PRECIPITACION POR ANIONES

a) En una serie de 4 tubos de ensaye deposite 2 ml de las soluciones bajo estudio, en tanto que en el tubo 5 agregue 2 ml de agua . Agregue luego a todos los tubos 1 ml de Acido Tricloroacético saturado, mezcle y anote sus observaciones.

b) En una serie de 4 tubos de ensaye de 18 x 150 transfiera 2 ml de las soluciones proteícas y en un tubo número 5 coloque 2 ml de agua. A todos los tubos adicioneles 1 ml de Acido Sulfosalicílico saturado, mezcle, y anotelo ocurrido.

IV.- DIALISIS

a) Corte un tubo de celofán de 25 cm de longitud

b) Humedezcalo con agua destilada y átelo cuidadosamente por un extremo.
c) Transfiera dentro de la bolsa de celofán 20 ml de Albúmina al 1% y cierre la bolsa atando el otro extremo.
d) Introduzca la bolsa de diálisis en un vaso de precipitados de 400 ml conteniendo 300 ml de agua destilada, y déjela ahí por 90 minutos.
e) Corra un blanco colocando 20 ml de NaCl 0.85% dentro de la bolsa de diálisis
f) Una vez transcurrido el tiempo indicado, efectue la Prueba de Biuret tanto al líquido exterior como a la solución del interior de la bolsa de diálisis.
g) Registre sus resultados.