

Ana M. R. Pilosof
Gualterio B. Bartholomai
(editores)

CARACTERIZACION FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE PROTEINAS



Peudeba

CYTED

Programa Iberoamericano
de Ciencia y Tecnología
para el Desarrollo

INDICE

ACERCA DE LOS AUTORES	13
PRÓLOGO, <i>por Gualterio Bartholomai</i>	15
1. PROPIEDADES DE HIDRATACIÓN, <i>por Ana M. R. Pilosof</i>	17
1.1 Introducción	17
1.2 Adsorción de agua	18
1.2.1 Método gravimétrico	19
1.2.2 Métodos basados en la determinación de la presión de vapor de agua y/o A_w	21
1.2.3 Modelos matemáticos para describir las isotermas	22
1.3 Absorción de agua	23
1.3.1 Equipo	23
1.3.2 Metodología	24
1.3.3 Curvas de absorción de agua	24
1.3.4 Ecuación para modelar las curvas de absorción de agua	25
1.3.5 Cinética de absorción de agua	25
1.3.6 Aplicaciones y limitaciones	26
1.4 Retención de agua	26
Bibliografía	28
2. SOLUBILIDAD, <i>por Ana M. R. Pilosof</i>	31
2.1 Introducción	31
2.2 Método para la determinación de la solubilidad	32
2.3 Método de Kjeldahl para la determinación de nitrógeno proteico y/o proteína	33
2.3.1 Procedimiento para macro Kjeldahl	34
2.3.2 Procedimiento para micro Kjeldahl	35
2.3.3 Aplicaciones y limitaciones	35
2.4 Otros métodos para la determinación de proteínas	36

2.4.1 Absorbancia a 280 nm (UV)	36
2.4.2 Absorbancia en el UV lejano	37
2.4.3 Método de Biuret	37
2.4.4 Método de Lowry	37
2.4.5 Método de Bradford	37
2.4.6 Método del ácido 4, 4' - Dicarboxi- 2, 2' - biquinolina (BCA)	38
Bibliografía	39
 3. PROPIEDADES SUPERFICIALES, <i>por Jorge R. Wagner</i>	41
3.1 Concepto de tensioactividad	41
3.2 Definición de emulsión	41
3.3 Análisis del proceso de emulsificación	42
3.4 Propiedades emulsionantes de las proteínas	44
3.4.1 Medida del poder emulsionante	45
3.4.2 Capacidad emulsionante	45
3.4.3 Actividad emulsionante	47
3.4.4 Medida de la estabilidad de la emulsión	49
3.5 Definición de espuma	55
3.6 Análisis de los procesos de formación y estabilización de espumas	56
3.6.1 Formación de la espuma	56
3.6.2 Estabilidad de la espuma	57
3.7 Medida de las propiedades espumantes	59
3.7.1 Medida de la capacidad espumante	60
3.7.2 Medida de la estabilidad de una espuma	65
Bibliografía	71
 4. GELIFICACIÓN, <i>por Ana M. R. Pilosof</i>	75
4.1 Introducción	75
4.2 Gelificación por calor de proteínas globulares	77
4.3 Técnicas de gelificación	77
4.4 Metodología para el seguimiento experimental de la gelificación	78
4.4.1 Reometría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación	78
4.4.2 Caracterización de la transición sol-gel: el punto gel	82
4.5 Caracterización de geles	83
4.5.1 Viscoelasticidad	83
4.5.2 Perfil de textura	87
4.5.3 Viscosidad	89

4.5.4 Capacidad de retención de agua	89
4.5.5 Microscopía electrónica	90
4.5.6 Calorimetría diferencial de barrido	92
Bibliografía	93
5. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO, <i>por M. Cristina Añón</i> <i>y Germán Jovanovich</i>	97
5.1 Fundamento de la técnica	97
5.2 Aplicaciones de la calorimetría diferencial de barrido	101
5.3 Transiciones de primer orden	101
5.3.1 Determinación de la entalpía de desnaturalización y estabilidad térmica de proteínas	101
5.3.2 Calibración	104
5.4 Determinación de cinéticas de reacción	110
5.4.1 Métodos de evolución de calor	110
5.4.2 Método dinámico	113
5.4.3 Método isotérmico	119
5.5 Transiciones de segundo orden	119
5.5.1 Determinación de la capacidad calorífica	119
5.5.2 Determinación de la temperatura de transición vítrea	124
Bibliografía	126
6. CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GELES, <i>por Mauricio R. Terebiznik</i>	127
6.1 Introducción	127
6.2 Aplicaciones	130
6.2.1 Desalinización	130
6.2.2 Fraccionamiento de proteínas	133
6.2.3 Determinación del peso molecular	134
6.3 Técnicas y procedimientos	135
6.3.1 Equipamiento básico y materiales	135
6.3.2 Preparación del gel	135
6.3.3 Empaquetamiento de la columna	136
6.3.4 Aplicación y cromatografía de la muestra	138
6.3.5 Determinación del V_0 y del volumen de separación de la columna	140
6.3.6 Estado y mantenimiento de la columna de cromatografía	140
6.3.7 Consideraciones técnicas según el tipo de proceso a realizar	141
Bibliografía	145

7. ULTRACENTRIFUGACIÓN, por Estela Martínez	147
7.1 Introducción	147
7.2 Métodos de separación en ultracentrífugas preparativas	149
7.2.1 Centrifugación diferencial	149
7.2.2 Centrifugación en gradientes de densidad	149
7.3 Descripción de la técnica de separación en gradientes	151
7.3.1 Forma del gradiente	151
7.3.2 Preparación de gradientes	151
7.3.3 Siembra de la muestra	153
7.3.4 Recuperación de las zonas separadas	153
7.3.5 Identificación de bandas por el coeficiente de sedimentación	154
7.3.6 Rotores utilizados	155
7.3.7 Condiciones de corrida	156
Bibliografía	157
8. ELECTROFORESIS, por María I. Genovese y Franco M. Lajolo	159
8.1 Introducción	159
8.2 Electroforesis en placas o tubos	160
8.3 Electroforesis en sistema discontinuo	160
8.4 Materiales y equipos	160
8.5 Descripción de las técnicas	161
8.5.1 Sistema discontinuo de Ornstein-Davis	161
8.5.2 Sistema discontinuo de Laemmli (SDS-PAGE)	161
8.5.3 Soluciones comunes a ambas técnicas	162
8.5.4 Preparación de los geles de separación	163
8.5.5 Preparación del gel de concentración	164
8.5.6 Procedimiento	164
8.6 Almacenamiento de los geles	166
Bibliografía	167
9. DETERMINACIÓN DE HIDROFOBICIDAD, por María I. Genovese, Franco M. Lajolo y M. Cristina Añón	169
9.1 Introducción	169
9.2 Hidrofobicidad superficial	170
9.2.1 Preparación de la muestra	170
9.2.2 Determinación con ácido cis-parinámico (CPA)	171
9.2.3 Determinación con 1-anilina-naftaleno-8-sulfonato (ANS)	171
9.2.4 Determinación con 1,6 difenil-1,3,5 hexatrieno (DPH)	172
9.3 Capacidad de unión de SDS (SDS-binding capacity)	172
9.4 Bibliografía	173

10. DETERMINACIÓN DE GRUPOS SULFIDRILLO Y DISULFURO,	
por María I. Genovese, Franco M. Lajolo y María C. Añón	175
10.1 Introducción	175
10.2 Determinación de sulfhidrilos libres	176
10.2.1 Materiales y equipos	176
10.2.2 Procedimiento	176
10.3 Determinación de disulfuros	177
10.4 Determinación de grupos disulfuro y sulfhidrilo totales	177
10.4.1 Preparación del reactivo	178
10.4.2 Procedimiento	178
Bibliografía	180

María Cristina Añón

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de La Plata. 47 y 116 (1900) La Plata, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.

María I. Genovese

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 66083, CEP 05389-978, São Paulo, SP, Brasil.

Francina Jovanovich

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de La Plata. 47 y 116 (1900) La Plata, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.

Franco M. Lajolo

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 66083, CEP 05389-978, São Paulo, SP, Brasil.

Patricia N. Scartines

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de La Plata. 47 y 116 (1900) La Plata, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.

Araceli M. R. Pilosof

Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina.