

# Rotación específica de las disoluciones acuosas de gelatina

POR

M. C. Bonmatí Limorte y G. León Albert

## RESUMEN

Se ha realizado un estudio de la rotación específica de las disoluciones acuosas de gelatina, habiéndose determinado a distintos valores de temperatura, pH y concentración salina. Los resultados se han explicado en base a la distinta configuración que poseen las cadenas polipeptídicas que constituyen la molécula de gelatina en las distintas condiciones estudiadas.

## SUMMARY

A study of the specific rotation of aqueous solutions of gelatin has been carried out. The specific rotation was determined on several conditions of temperature, pH and salt concentration. The results have been explained considering the different configurations of polypeptidic chains in gelatin molecule in the different studied conditions.

## INTRODUCCION

La gelatina, forma desnaturalizada de la proteína animal colágeno, está constituida por tres cadenas polipeptídicas ordenadas al azar como consecuencia de la ruptura, en el proceso de desnaturalización, de los en-



laces de hidrógeno responsables de la estructura triple hélice característica de la molécula de colágeno (1).

De acuerdo con Burge y Heyness (2), para los que la rotación específica de una disolución proteica es debida a la contribución de una rotación específica de composición aminoacídica y de una rotación específica de configuración de la molécula proteica en disolución, y teniendo en cuenta la estructura de cadenas desordenadas de la gelatina, es de esperar que para esta proteína la rotación específica de configuración sea nula coincidiendo, por tanto, la rotación específica total con la debida al contenido aminoacídico. Sin embargo, los resultados experimentales ponen de manifiesto la existencia en la gelatina de una rotación específica de configuración distinta de cero, que será reflejo de la adopción por parte de las cadenas polipeptídicas constituyentes de sus moléculas de determinadas configuraciones que se atribuyen a secuencias del tipo glicina-iminoácido-iminoácido (3).

Con objeto de conocer los posibles cambios estructurales de la molécula de gelatina en disolución acuosa para distintas condiciones de temperatura, pH y concentración salina, se ha realizado un estudio de la variación de la rotación específica total (que al permanecer constante la rotación específica debida a la composición aminoacídica será reflejo de variaciones en la rotación específica de configuración) con la temperatura, el pH y la concentración salina.

## PARTE EXPERIMENTAL

La gelatina utilizada en este estudio se obtuvo a partir de tendón de ternero de la raza frisona (*Holstein frisia*).

Una vez cortado en trozos cúbicos, de aproximadamente 1 cm de lado, y lavado varias veces con agua destilada, el material biológico se trató con cloruro sódico al 10 % (4), con objeto de eliminar las proteínas globulares (cuatro tratamientos de 10 horas, con agitación continua), y con éter de petróleo, para la eliminación de componentes lipídicos (cuatro tratamientos, igualmente de 10 horas, con agitación continua). El residuo de estos tratamientos se secó mediante la adición de acetona y de él se extrajo el colágeno en la forma desnaturalizada de gelatina por tratamiento con ácido acético diluido (pH = 3,5-4), a 60° C, durante dos horas (5). El extracto, filtrado a través de un embudo de vidrio sinterizado número 1, se concentró por evaporación a vacío a 35° C, dejando posteriormente secar al aire el concentrado.

En el estudio de la variación de la rotación específica con la tempera-

tura, el pH y la concentración salina se utilizaron disoluciones del 4 % en gelatina, desionizadas según el método descrito por Janus y col. (6). A estas disoluciones se les adicionaba ácido clorhídrico o hidróxido sódico, de forma que su pH cubriera el rango comprendido entre pH = 1 y pH = 12 de unidad en unidad (estudio de la relación rotación específica-pH) o cloruro sódico, de forma que la concentración final en sal fuera 0,1, 0,5, 1,5 y 2 M (estudio de la relación rotación específica-concentración salina), o bien se les determinaba la rotación específica en el intervalo de temperaturas comprendido entre 26 y 55° C (estudio de la relación rotación específica-temperatura).

En la determinación de la rotación específica se utilizó un polarímetro Erma, modelo 1561, y células polarimétricas de 2 dm de longitud. La longitud de onda de la radiación empleada fue la de la línea D del sodio y la temperatura, salvo en los estudios de variación de la rotación específica con la temperatura, fue de 45 y 27° C.

A partir del ángulo de rotación, obtenido por lectura directa en el polarímetro, se calcula la rotación específica, a una temperatura y longitud de onda dadas, a partir de la conocida expresión:

$$[\alpha]_D^t = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot c}$$

donde:

- $\alpha$  es el ángulo de rotación expresado en grados angulares,
- $l$  es la longitud de la célula polarimétrica expresada en dm,
- $c$  es la concentración de la disolución proteica expresada en gramos por cien mililitros.

La composición aminoacídica se determinó mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando un autoanalizador Rank Hilger modelo Chromaspek J 180. La hidrólisis previa se realizaba con HCl 6N, por calentamiento a 105° C y a vacío durante 24 horas.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### ROTACIÓN ESPECÍFICA, COMPOSICIÓN AMINOACÍDICA Y CONFIGURACIÓN.

Como ya se ha indicado anteriormente, la rotación específica de una disolución de proteína es resultado de la contribución de la rotación específica debida a su composición aminoacídica,  $[\alpha]_{AA}$ , y de la debida a la

configuración de la molécula proteica en disolución,  $[\alpha]_{\text{config.}}$ , relación que matemáticamente puede expresarse de la forma:

$$[\alpha]_D^t = [\alpha]_{AA} + [\alpha]_{\text{config.}}$$

El término correspondiente a la contribución de la composición aminoacídica viene dado (2) por:

$$[\alpha]_{AA} = \frac{100 \sum T_i \cdot R_i}{n \cdot (P_r)_m}$$

donde:

$R_i$  es la rotación específica de un residuo determinado,

$T_i$  es la proporción en que ese residuo se encuentra en la proteína, expresada en residuos del aminoácido considerado por mil residuos totales,

$n$  es el número de residuos totales en la proteína, en nuestro caso 1.000,

$(P_r)_m$  es el peso molecular medio de todos los residuos existentes; este peso de residuo medio se calcula sumando los resultados obtenidos al multiplicar el peso de cada residuo (peso del aminoácido menos agua) por la proporción en que se encuentra en la proteína y dividiendo por mil.

Para el caso de la gelatina de tendón de ternero, cuya composición aminoacídica y peso de los distintos residuos se indican en la tabla I, el peso de residuo medio encontrado fue de 90,293.

En cuanto a los valores de rotación específica de los distintos residuos, destacaremos de forma especial tres de ellos. En primer lugar, y dado que la glicina no es ópticamente activa, su contribución a la rotación específica de la proteína es cero. Para la rotación específica del residuo de prolina, tomaremos el valor de  $-250$  obtenido por Steinberg (7), a partir de las rotaciones específicas de series de copolímeros glicina-prolina en los que se va incrementando la relación Gly/Pro, mientras que, como rotación específica del residuo de hidroxiprolina, tomaremos, de acuerdo con Harrington y Von Hippel (8), el valor de  $-200$ . Para el resto de los aminoácidos y dada la ausencia en ellos de rotaciones específicas inusuales, tomaremos, de acuerdo con Schellman (9), el valor medio de  $-110$ .

De acuerdo con todo ello, el valor del sumando de rotación específica debido a la composición aminoacídica, para el caso de la gelatina de tendón de ternero, es de  $-106,93$ .

TABLA I

COMPOSICION AMINOACIDICA DE LA GELATINA DE TENDON DE TERNERO EN NUMERO DE RESIDUOS POR MIL ( $T_i$ ) Y PESO DE LOS DISTINTOS RESIDUOS AMINOACIDICOS ( $P_i$ )

<i>Residuo</i>	$P_i$	$T_i$
Asp	115,08	39,13
Hyp	113,09	85,96
Thr	101,09	17,04
Ser	87,07	31,58
Glu	129,11	76,06
Pro	97,09	127,77
Gly	57,05	355,24
Ala	71,07	102,45
Val	99,13	25,48
Met	131,19	5,35
Ile	113,15	12,36
Leu	113,15	25,66
Tyr	163,17	3,59
Phe	147,17	13,99
His	137,14	5,81
Hyl	144,17	7,44
Lys	128,17	21,64
Arg	156,18	44,86

Como el valor de la rotación específica obtenido experimentalmente para una disolución del 4 % en gelatina a 45° C es de  $-135,20$ , la rotación específica de configuración de esta proteína, en las condiciones indicadas, es de  $-28,27$ .

#### VARIACIÓN DE LA ROTACIÓN ESPECÍFICA CON LA TEMPERATURA

Los resultados obtenidos (fig. 1) ponen de manifiesto que la variación de la rotación específica con la temperatura es muy pequeña a temperaturas superiores a 35° C, mientras que por debajo de esta temperatura, la variación se hace mucho más pronunciada. Este hecho puede explicarse si se tiene en cuenta la tendencia de las moléculas de gelatina a formar agregados en disolución; agregados que influirán de forma decisiva en el valor del término rotación específica de configuración, y, por tanto, en el valor de la rotación específica total.

A temperaturas superiores a 35° C, la proporción de agregados presentes es pequeña, y de ahí que las variaciones de la temperatura afecten escasamente al valor de la rotación específica.

A temperaturas inferiores a 35° C, la proporción de agregados existentes es ya importante, aumentando al disminuir la temperatura; esto se traduce en un aumento del valor negativo de la rotación específica.

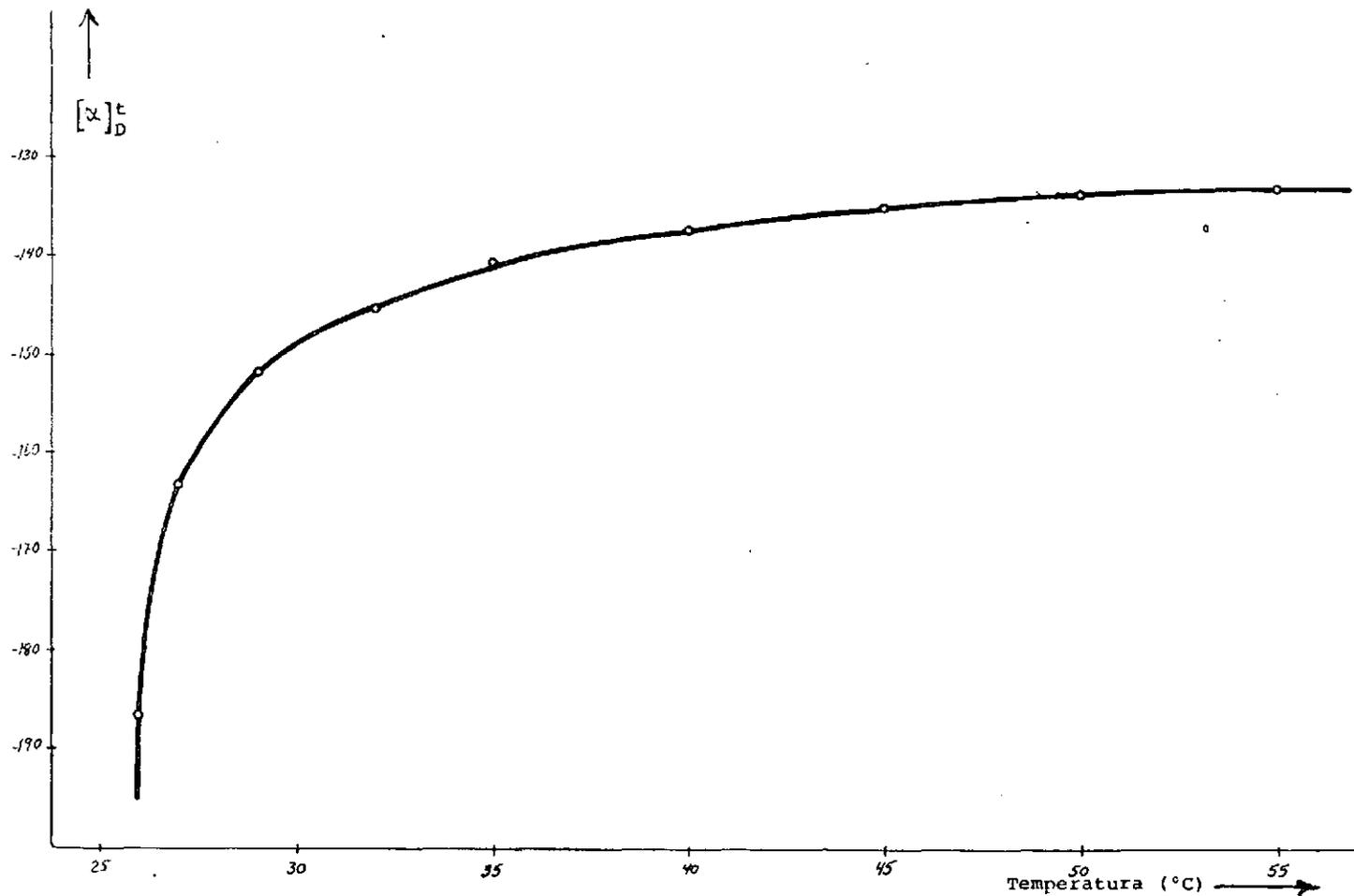


FIGURA 1.—Variación de la rotación específica con la temperatura.

Por debajo de 27° C, temperatura próxima a la de formación del gel, la variación observada es tan pronunciada, que puede afirmarse, basándonos en datos de rotación específica, que el proceso de gelificación podría ser considerado como un proceso de reconversión (pseudo-renaturalización) de gelatina en colágeno.

#### VARIACIÓN DE LA ROTACIÓN ESPECÍFICA CON EL pH.

Se ha observado que la variación de la rotación específica con el pH es despreciable a temperaturas superiores a 35° C. A temperaturas inferiores, 27° C, se observa una pequeña, pero apreciable, variación de la rotación específica con el pH (fig. 2). Así, el valor negativo de tal rotación es máximo en el punto isoiónico de la proteína. Al adicionar  $\text{ClH}$  o  $\text{NaOH}$ , se produce una disminución pronunciada de este valor negativo, que se hace más suave por debajo de  $\text{pH} = 5$  y por encima de  $\text{pH} = 11$ .

Para explicar esta variación nos basaremos en las posibles interacciones entre grupos cargados de la misma molécula y en la posibilidad de establecimiento de interacciones intermoleculares que dan lugar a la formación de agregados.

En el punto isoiónico la molécula tiene la mayor parte de los grupos ionizables en forma disociada, siendo, por tanto, el punto en el que las interacciones entre grupos cargados de la misma molécula son máximas y, como consecuencia, aquél en el que la configuración será lo más compacta posible.

Por otra parte, la temperatura de medida es 27° C, y en ella las moléculas de gelatina tienden a ordenarse estableciendo interacciones intermoleculares con formación de agregados moleculares, que dan lugar a la configuración óptima para la formación del gel. Esto supondrá una elevación del valor negativo del término rotación específica de configuración que hace que la rotación específica total alcance el mayor valor negativo dentro del intervalo de pH de trabajo.

Al adicionar  $\text{ClH}$  o  $\text{NaOH}$  en cantidad relativamente grande (necesaria para llevar el pH de la disolución, de tan elevada concentración proteica, desde el punto isoiónico al valor deseado), se produce una alteración desfavorable en los dos efectos anteriormente citados. Así, por una parte, los grupos disociados de la molécula quedan con cargas del mismo signo, produciéndose, como consecuencia de las repulsiones, una extensión de la molécula de proteína y una ligera disminución del término rotación específica de configuración. Por otra parte, la presencia de iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  reduce las interacciones intermoleculares (10), que a esta temperatura tienen gran importancia, produciéndose igualmente un efecto de dismi-

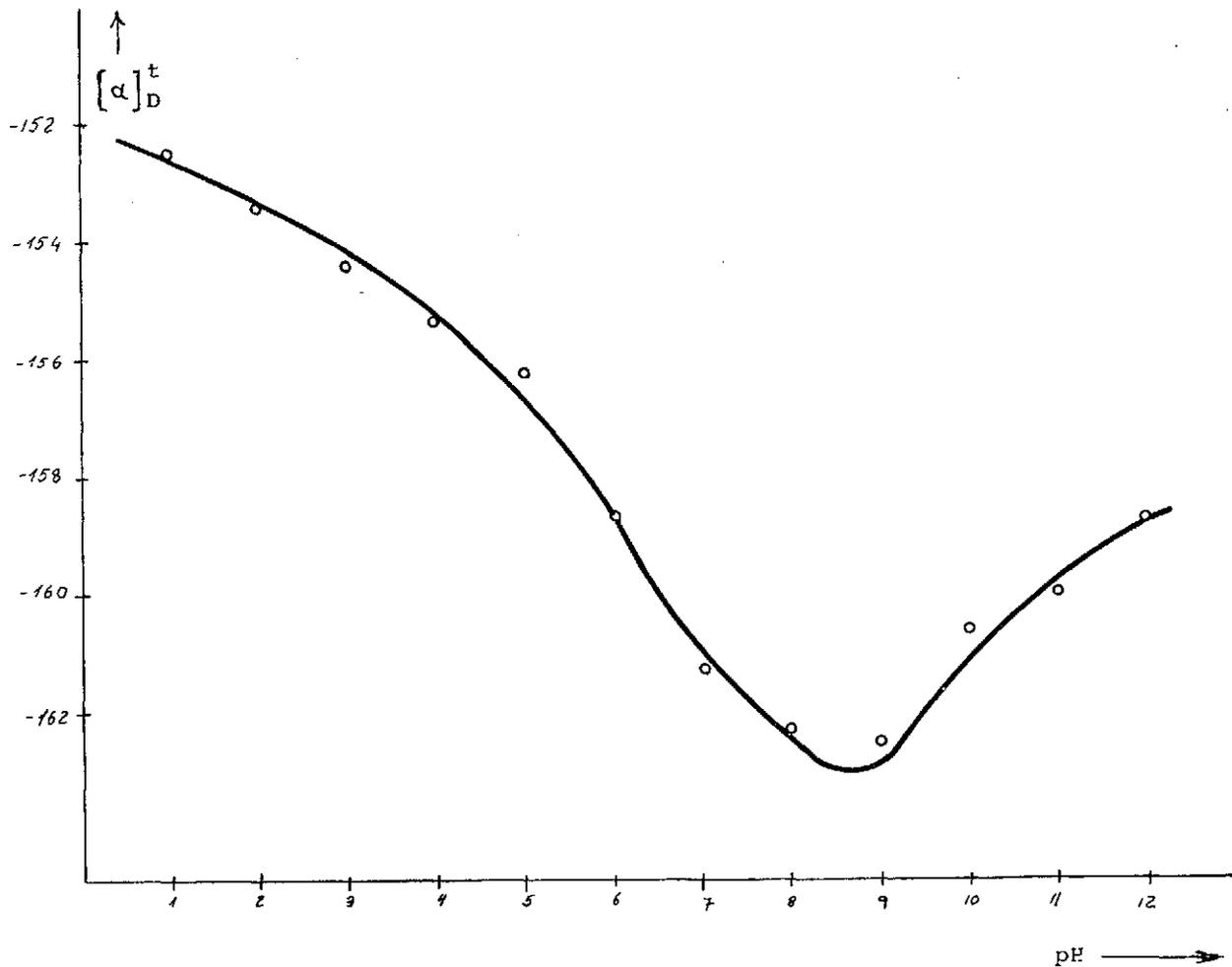


FIGURA 2.—Variación de la rotación específica con el pH.

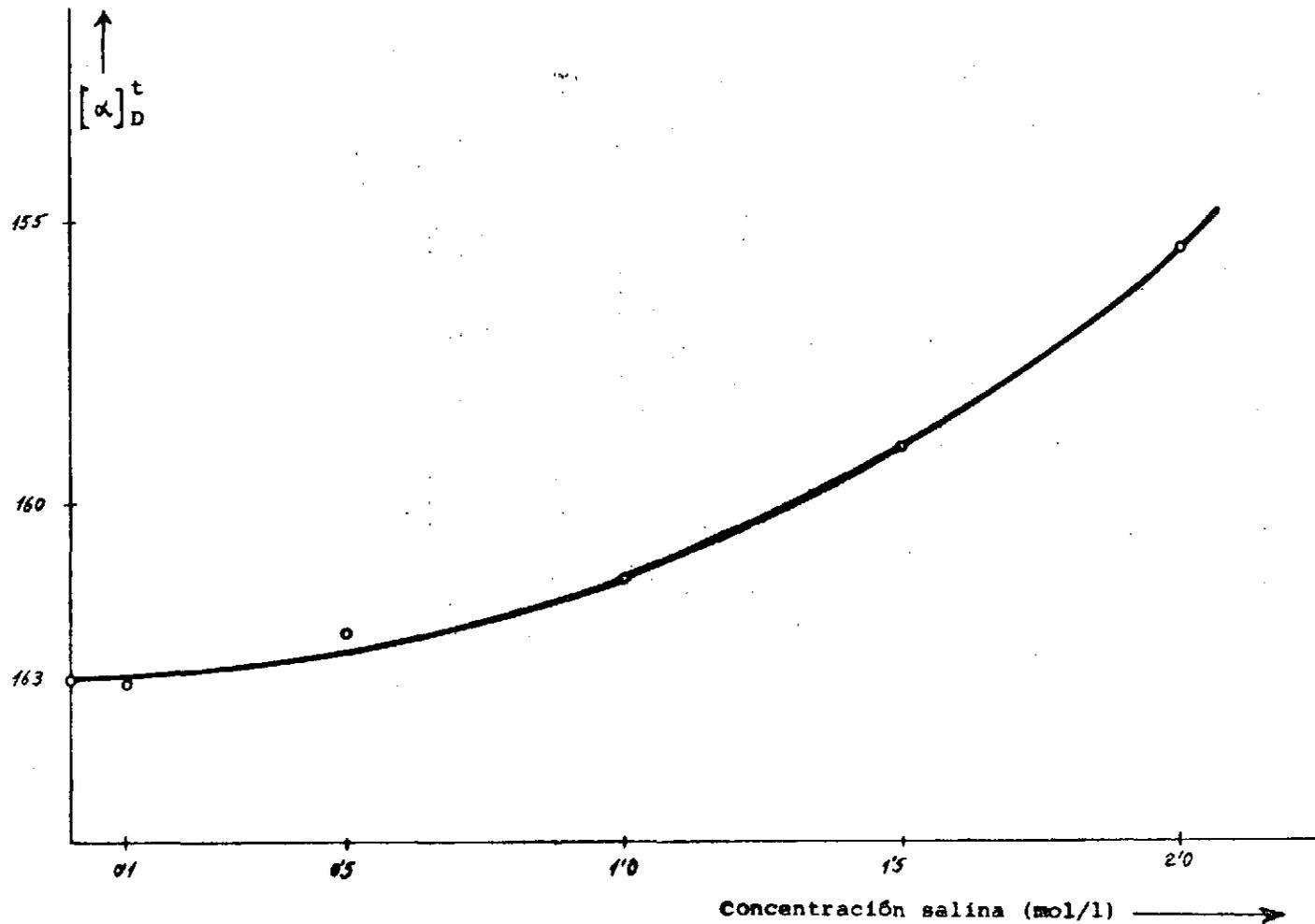


FIGURA 3.—Variación de la rotación específica con la concentración salina.

nución en la rotación específica de configuración. En conjunto, tiene lugar una disminución del valor negativo de la rotación específica total.

Al aumentar aún más la cantidad de ácido o de base adicionados ( $\text{pH} = 5$  o  $\text{pH} = 11$ ), los efectos anteriores actúan en sentido opuesto. Por una parte, y a pesar de que la molécula tenga todos sus grupos ionizados con carga neta del mismo signo, la gran cantidad de iones presentes disminuye en alguna medida las repulsiones y ello favorece una configuración de la molécula algo más plegada. Sin embargo, y por otra parte, la cantidad de iones  $\text{Cl}^-$  o  $\text{Na}^+$ , que ya considerábamos en el caso anterior como suficientemente grande para disminuir interacciones intermoleculares, ha aumentado, y su efecto será mucho más pronunciado en este aspecto que en el de reorganizar la molécula, de ahí que se siga produciendo una disminución del valor negativo de la rotación específica.

#### VARIACIÓN DE LA ROTACIÓN ESPECÍFICA CON LA CONCENTRACIÓN SALINA.

Al igual que con el pH, la variación de la rotación específica con la concentración salina es despreciable a temperaturas superiores a  $35^\circ\text{C}$ . A temperaturas inferiores ( $27^\circ\text{C}$ ) existe una disminución pequeña pero gradual del valor negativo de la rotación específica al aumentar la concentración salina, variación que es más apreciable cuando la concentración salina sobrepasa el valor 1M (fig. 3).

Las causas que producen esta disminución deben ser las ya aducidas en el apartado anterior. El aumento de la concentración de sal disminuye, por un lado, las interacciones intermoleculares responsables de la formación de agregados y desfavorece, por otro, las fuerzas electrostáticas atractivas entre grupos de carga opuesta de la misma molécula como consecuencia del efecto de apantallamiento de los iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ . Esto trae consigo una disminución del término rotación específica de configuración y con él de la rotación específica total (valores negativos).

BIBLIOGRAFIA

1. BONMATI, M. C., y LEÓN, G., «Estudio del proceso de transformación de colágeno en gelatina», el mismo número, estos Anales.
2. BURGE, R. E., y HEYNESS, R. D., *Nature*, 184 (1959), 1562.
3. HARRINGTON, W. F., *Nature*, 181 (1958), 997.
4. YOUNG, E. G., y LORIMER, J. W., *Archs. Biochem. Biophys.*, 88 (1960), 373.
5. EASTOE, J. E., *Biochem. J.*, 61 (1955), 589.
6. JANUS, J. W.; KENCHINGTON, A. W., y WARD, A. G., *Research*, 4 (1951), 247.
7. STEINBERG, I. Z.; HARRINGTON, W. F.; BERGER, A.; SELA, M., y KATCHULSKY, E., *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (1960), 5263.
8. HARRINGTON, W. F., y VON HIPPEL, P. H., *Adv. Protein Chem.*, 16 (1961), 1.
9. SCHELLMAN, C., y SCHELLMAN, J. A., *Comp. rev. trab. lab. Calsberg*, 30 (1958), 463.
10. BOEDTKER, H., y DOTY, P., *J. Phys. Chem.*, 58 (1954), 968.

