

ESTRUCTURA INTERNA DE LAS PROTEINAS

Por el Dr. JULIO CABELLO R.

(Instituto de Química Fisiológica.- Universidad de Chile).

La extraordinaria complejidad estructural de las proteínas se revela de inmediato por su peso molecular, más elevado que el de cualquiera molécula sintetizable en el Laboratorio, y que fluctúa entre límites tan amplios como 8.000 para la clupeína y 10.6000.000 para el virus del achaparramiento del tomate, elegidos arbitrariamente. (Tabla 1). El peso mo-

no ácidos que contienen yodo y que existen en ciertas proteínas especializadas) y se unen mediante la ligadura de los grupos ácidos o básicos de cada unidad con los grupos opuestos de las unidades vecinas.

1.—Posibilidades de Isomería.

La cantidad de edificios moleculares que pueden construirse variando el número de estas unidades, su proporción relativa y la posición que ocupan en el espacio, es ilimitada. La simple modificación de la posición de los amino ácidos influye notablemente sobre las propiedades del compuesto resultante. Así, tomando como ejemplo sencillo un dipeptido, las propiedades de la leucilglicina son enteramente diferentes de las que posee la glicil leucina. Esto revela que el distinto arreglo espacial de las unidades constituyentes de la molécula, da origen a compuestos químicos diferentes y es una primera fuente de isomería. El número de isómeros posibles puede determinarse aplicando el cálculo de permutaciones. Si llamamos N el número de unidades individuales que entran en la combinación, el número total de permutaciones posible es $N!$

Si suponemos un polipeptido formado por 20 amino ácidos que no se repiten en la cadena, el número de diferentes isómeros que se pueden originar es $20! = 24 \times 10^{17}$, cada uno de los cuales contiene los mismos amino ácidos en idéntica proporción y solo difieren en su relación espacial.

Si imaginamos ahora una molécula algo más complicada, como una proteína sencilla, con un peso molecular 6500, constituida por 50 unidades de 20 categorías diversas, el número de permutaciones es 10^{48} . Para apreciar la inmensa magnitud de este número, considérese que la distancia entre uno y otro extremo de la vía láctea es de 300.000 años de luz y que esta distancia expresada en Å ($=10^{-7}$ mm).

PESO MOLECULAR DE ALGUNAS PROTEINAS (por veloc. sedimen.)

Ribonucleasa	12 700
Mioglobina	16 900
Proteína del Bac. tubercul.	32 000
Pepsina	35 000
Insulina	12 000
Hemoglobina	63 000
Toxina Diftérica	74 000
Seroglobulina	176 000
Edestina	310 000
Ureasa	480 000
Hemocianina	6 600 000
Virus del achap. de Tomate	10 600 000

lecular de las proteínas es el valor medio que manifiestan disueltas en su punto isoiónico. En efecto, el peso de las partículas a menudo varía con las condiciones físico químicas del medio, porque pueden experimentar una división reversible en subunidades como ha demostrado Svedberg mediante el empleo de la ultracentrífuga.

A primera vista, el conocimiento de la estructura íntima de moléculas tan complicadas puede parecer una tarea, no solo difícil, sino imposible. Pero afortunadamente la organización de estas moléculas está basada en un principio de construcción sencillo. Las proteínas están constituidas por la combinación de unidades pequeñas que se juntan por sus extremos formando una cadena lineal, recta o helicoidal, o grupos de cadenas que se entrelazan de una manera regular y ordenada. Las unidades que forman estas cadenas pertenecen a más o menos 20 especies diferentes, con un peso molecular que varía entre 75 y 240 (exceptuando los ami-

es 10^{32} A. El número de isómeros originados en los arreglos de posición supera pues, con exceso las magnitudes que, hiperbólicamente, se denominan astronómicas.

Hemos imaginado un caso sencillo y esquemático. Las proteínas reales están constituidas por la asociación de centenares o miles de amino ácidos que al repetirse disminuyen el número de permutaciones posibles, sin alterar su orden de grandeza. No entramos a considerar otras fuentes de isomería como los que provienen de la existencia de diversos tipos de ligadura entre los amino ácidos, de las formas queto-enólicas, de las estructuras cicladas y de las configuraciones internas de la molécula.

2.—Síntesis biológica selectiva de ciertos isómeros.

El número de isómeros a que puede dar margen solamente la colocación espacial de las diferentes clases de amino ácidos en la cadena peptídica es, por lo tanto, incalculable.

Frente a este hecho, hay otro que es, en realidad, sorprendente. La célula viva fabrica uno solo de estos posibles isómeros. De las infinitas permutaciones posibles, escoge una que continúa reproduciendo a lo largo de toda su actividad metabólica. Efectúa, de este modo, una selección cuya realización "in vitro" parece inconcebible. Si colocamos en un matraz 50 u. de amino ácidos de 20 especies diferentes y pudiéramos combinarlos creando las condiciones catalíticas y energéticas adecuadas, es de la más alta improbabilidad, a la luz de nuestras ideas actuales, que algún día sobrevien-

ga la formación de la molécula de una proteína existente en algún ser vivo. En agudo contraste, cualquier organismo que recibe del exterior en proporciones siempre variables las unidades constructivas elementales de la proteína, posee la capacidad de fabricar un ejemplar definido y único durante toda su vida. Existe pues una organización de control maravillosa que realiza una síntesis altamente selectiva en un punto de la célula donde, reunidas las condiciones materiales y energéticas, las micromoléculas aisladas y desorientadas son forzadas a adquirir una estructura asociada, como si allí existiera una matriz de construcción extraordinariamente fina en la cual se depositan en una ordenación constante las unidades constitutivas de la molécula y se produce la soldadura de sus partes.

3.—Enlace de los aminoácidos.

a) *Ligamen peptídico*.—Examinemos ahora la constitución de estas formas escogidas que son las proteínas naturales.

Los estudios realizados sobre la ligadura de los amino ácidos han puesto en evidencia que se unen entre sí por la condensación del grupo ácido de una molécula con el grupo básico de la molécula adyacente. Confirmando las opiniones adelantadas en 1902 por Fisher y Hofmeister, se ha demostrado que el principal vínculo entre los amino ácidos es la ligadura peptídica —NH—C=O (Figura 1). Los hechos experimentales que lo afirman son, entre otros, los siguientes: 1) En la molécula intacta existe un número reducido de gru-

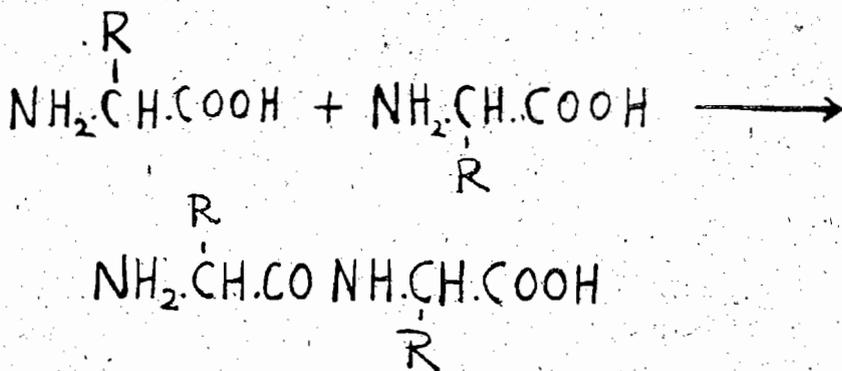


Fig. 1.—Unión peptídica.

Basándose en la observación de que la acción del calor y de reactivos especiales sobre las proteínas y algunos amino ácidos, como el ácido glutámico, da lugar a bases pirrólicas y otros compuestos heterocíclicos, Tronsgaard (1944) ha propuesto una hipótesis que asigna a las estructuras pirrólicas un papel decisivo en la agrupación de los amino ácidos en la molécula proteica (Figura 4).

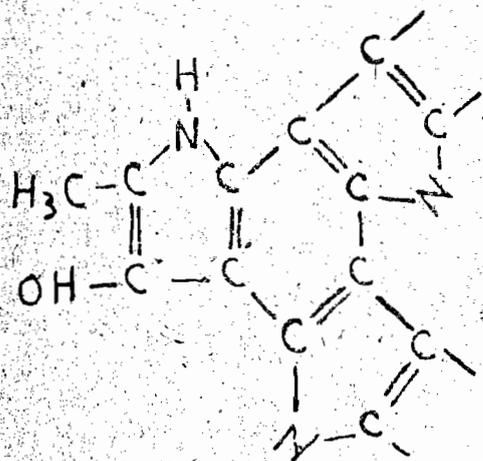


Fig. 4.—Asociación pirrólica

Finalmente, un esquema constitutivo de más amplios alcances es el propuesto por Dorothy Wrinch (1936). Existirían en las cadenas peptídicas uniones entre elementos de una misma cadena con formación de ciclos (Figura 5). El elemento

fundamental sería un hexágono abierto en cuyos extremos se encuentran los grupos NH y CO de la unión peptídica, produciéndose la migración del H del NH al CO con cierre de un ciclo y enolización del grupo CO. Estos hexágonos se agruparían formando redes o mallas que serían el punto de partida de estructuras ciclólicas complicadas.

El examen crítico de estas formas cíclicas de unión demuestra que, sin excluir la posibilidad de que existan en la molécula proteica agrupaciones del tipo de las diketopiperazinas o de las bases pirrólicas, solo pueden presentarse como estructuras no ordinarias en puntos excepcionales de la molécula. Una mayor frecuencia es incompatible con las propiedades ópticas, químicas y bioquímicas de las proteínas naturales.

En cuanto a las formaciones ciclólicas que permitirían edificar totalmente la molécula de proteína, su existencia puede considerarse descartada por razones estéricas, ya que las dimensiones de sus mallas no ofrecen espacio para la ubicación de cadenas laterales más voluminosas que las de la glicocola y alanina, y por razones energéticas que demuestran la imposibilidad de esta unión hipotética.

De cuanto se ha expuesto puede concluirse, por lo tanto, que el tipo fundamental de enlace entre los amino ácidos es la unión peptídica. Esta unión da origen a una asociación en cadenas polipeptídicas alargadas, dispuestas en zig-zag, cadenas que son, en último término, el material de construcción de las moléculas proteicas.

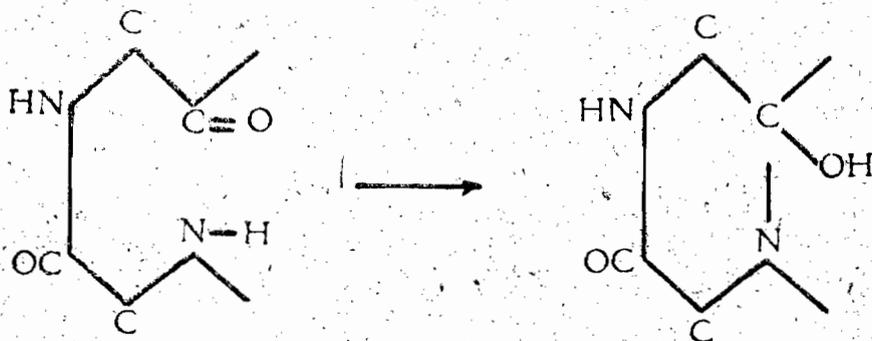


Fig. 5.—Formación de un ciclo

D.—*Ordenación periódica de los amino ácidos.*

Según la opinión de Bergmann y Niemann, los amino ácidos se encontrarían localizados en un orden regular y constante, apareciendo a intervalos periódicos dentro de la cadena peptídica. Las propiedades químicas y biológicas de una proteína dependerían, en último análisis, de la frecuencia con que cada amino ácido se repite en la cadena peptídica.

Desarrollando estas ideas, deducen algunas reglas numéricas que permiten, conociendo la proporción relativa de los amino ácidos y su peso molecular medio, calcular el peso molecular de la proteína y el número de residuos que entran en la composición de cada molécula (Tabla 2). Se ha

$$F_i = \frac{N_t}{N_i}$$

$$N_t = N_i \times F_i$$

$$\begin{aligned} N_t &= 2^m \times 3^n \\ N_i &= 2^{m'} \times 3^{n'} \end{aligned}$$

$$\frac{F_i \times AW}{MW} = \frac{100}{\%}$$

Tabla 2.—Reglas sobre la periodicidad de los amino-ácidos.

- F_i : frecuencia de un amino ácido individual
- N_i : número de un amino ácido individual
- N_t : número total de amino ácidos
- AW : peso molecular medio de todos los amino ácidos en el hidrolizado de proteína.
- MW : peso molecular del amino ácido individual
- %: porcentaje del amino ácido en el hidrolizado

criticado sin embargo, la excesiva amplitud de estas reglas que permiten acomodar fácilmente a la hipótesis los datos dispersos y todavía poco precisos que suministra la investigación químico-analítica de las proteínas.

Los apoyos experimentales de esta teoría residen en el aislamiento a partir de ciertas proteínas (gelatina, fibroína, elastina, caseína) de algunos polipeptidos cuya constitución concuerda con la ubicación de los amino ácidos sugerida por el análisis químico, a la luz de la teoría de la ordenación periódica. Sin embargo, muchas otras proteínas dan por hidrólisis parcial polipeptidos variados que no sugieren la existencia de tal estructura periódica.

A pesar de algunas confirmaciones experimentales, esta teoría no puede, por lo tanto, generalizarse ni ser considerada como una imagen realmente representativa de lo que sucede a lo largo de una cadena peptídica. La posibilidad de averiguar la secuencia de los amino ácidos en las proteínas de un orden más elevado es una tarea casi insuperable. La mayoría de las investigaciones analíticas sugiere una distribución heterogénea de los amino ácidos.

5.—*Constitución de las cadenas polipeptídicas.*

Las cadenas polipeptídicas, que son las subunidades de que se construye la molécula de proteína, están constituidas por una espina dorsal formada por las uniones peptídicas y el C_α de cada amino ácido, que tiene una disposición en zig-zag debido a que las valencias del carbono no están ubicadas en un mismo plano, y por cadenas laterales breves formadas por los residuos de los diferentes amino-ácidos, (es decir, la porción restante después de excluir el C_α y los grupos NH_2 y $COOH$) que alternan regularmente en un plano perpendicular al eje de la cadena (Figura 6).

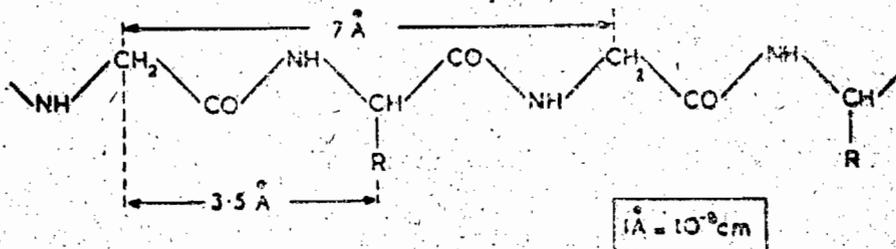


Fig. 6.—Cadena polipeptídica de la fibroína

La naturaleza de estos residuos tiene gran importancia para explicar algunas propiedades físico químicas, como el carácter polar y la hidratación de las proteínas. Estos residuos o cadenas laterales pueden estar reducidos a un átomo de H (glicocola) o tener una estructura alifática o cíclica. Las cadenas alifáticas pueden ser rectilíneas o ramificadas y contienen 1 a 4 átomos de C (alanina, valina, leucina, isoleucina). Las cíclicas son bencénicas (fenilalanina y tirosina), indólicas (triptofano) imidazólicas (histidina) o pirrólicas (prolina e hidroxiprolina).

Estas cadenas laterales pueden tener un carácter catiónico o aniónico. En una molécula formada por ácidos mono amino mono carboxílicos, los grupos de esta naturaleza están situados solamente en los extremos, pero existen también en el centro de la cadena cuando la molécula contienen ácidos diaminados o dicarboxílicos.

Se admite que los residuos de un carácter químico similar se presentan en un lado de la cadena y los residuos de carácter químico diferente en el lado opuesto. Así, los residuos polares NH_2 , COOH , OH y SH se proyectan en un lado y los residuos menos reactivos no polares de tipo hidrocarburo en el otro. De este modo las cadenas polipeptídicas poseen dos superficies de naturaleza química diferente. Esto explicaría la adsorción de las proteínas tanto en las superficies acuosas (los grupos polares son hidrosolubles) como en las superficies lipóideas (los grupos no polares son liposolubles) y la orientación de las cadenas formando fibras semicristalinas.

6.—Forma de las cadenas peptídicas.

Las cadenas polipeptídicas se describen generalmente como bandas o cintas extendidas en un plano y de disposición zizagueante. Esta representación es suficientemente satisfactoria para fines prácticos y no está en conflicto con las medidas experimentales. Además de esta configuración, Pauling, Corey y Branson (1951), determinando la estructura cristalina de amino ácidos y peptidos para establecer las distan-

cias interatómicas, los ángulos de las uniones y otros parámetros, describen dos configuraciones helicoidales que cumplen la condición de que estas medidas sean equivalentes a las determinadas en los compuestos más simples y los grupos CO y NH formen una unión H. (Figura 7). El primer tipo de representación es la espiral de 3 residuos (que contiene 3,7 residuos por vuelta) que existiría en la α -queratina, miosina, colágeno, hemoglobina; y el segundo es la espiral de 5 residuos (que contiene 5,1 residuos por vuelta) y existiría en la miosina y queratina supercontraídas. Estas representaciones reflejan con mayor

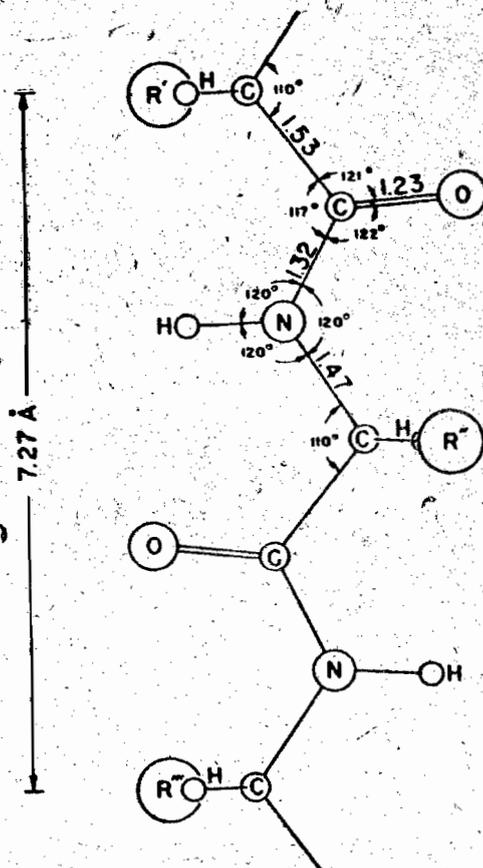


Fig. 7.—Dimensiones de la cadena polipeptídica

realismo la verdadera configuración de las cadenas peptídicas naturales (Figura 8).

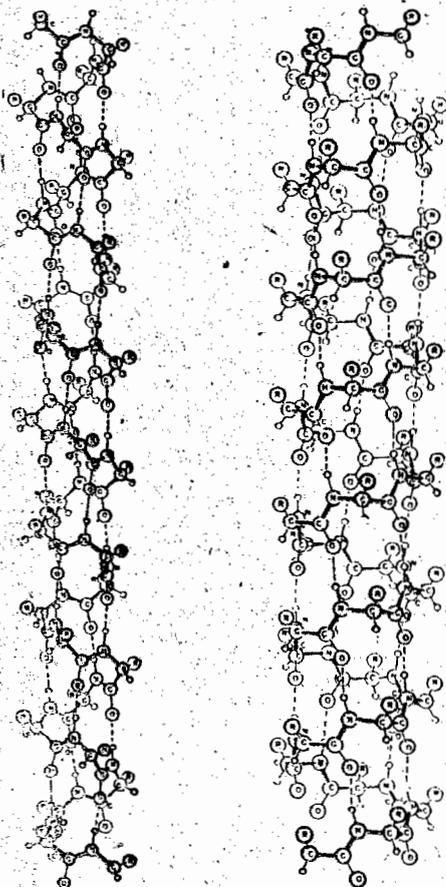


Fig. 8.—Modelos de cadenas peptídicas espirales

7.—Asociación de las cadenas polipeptídicas. Proteínas fibrosas y globulares.

Estas cadenas se reúnen para formar la molécula de proteína. De acuerdo con la disposición de tales cadenas en el espacio, desde las investigaciones de Astbury, se distinguen dos tipos de proteínas: fibrosas y globulares.

Las proteínas fibrosas están constituidas por largas cadenas reunidas en paralelo y asociadas por uniones transversales originadas en los grupos activos de los residuos laterales. El paralelismo de estas cadenas confiere a los diferentes amino ácidos que las constituyen una ordenación re-

gular que explica su apariencia semicristalina en las imágenes obtenidas por difracción de los rayos X.

Las moléculas fibrosas son largas y asimétricas; el eje principal es a lo menos 30 veces mayor que los dos ejes menores. Esta forma las hace poco móviles y altamente viscosas; por la misma causa tienen gran tendencia a asociarse y formar estructuras de gran tamaño.

Algunas proteínas fibrosas insolubles en agua forman parte de estructuras rígidas (queratina, colágeno, seda, lana); otras, solubles, integran estructuras móviles (miosina, fibrinógeno). Un carácter común de estas proteínas es su elasticidad que se atribuye a la contracción y estiramiento de las cadenas. Es también característica su estabilidad que las hace resistentes a la denaturación.

Las proteínas globulares, de armadura más compleja, están constituidas por cadenas peptídicas que no se extienden longitudinalmente, sino que se enrollan o doblan creándose uniones entre partes de una misma cadena y con las cadenas adyacentes, que estabilizan su forma plegada. Sus moléculas son pequeños glóbulos de forma simétrica, cilíndrica o elipsoidal; por esta causa son móviles, no tienden a asociarse y poseen poca viscosidad. Se encuentran de preferencia en los líquidos del organismo; son solubles en agua y en alcohol. Su estructura interna es complicada y no aparece cristalina al examen por rayos X. Son denaturadas fácilmente por leves modificaciones de su ambiente. Pertenecen a esta categoría, las albúminas, globulinas, histonas y algunas proteínas vegetales (prolaminas y glutelinas).

8.—Configuración interior de la molécula de proteína.

Para caracterizar una proteína no es suficiente conocer su peso molecular, las dimensiones y forma anatómica externa de la molécula, ni la naturaleza de las unidades que intervienen en su composición, sobre lo cual nos informan las determinaciones de la química y fisico-química. Es necesario además, conocer su configuración interna que se refiere a la orientación, posición y tabicamiento de las cadenas peptí-

dicas que, estiradas o contraídas, plegadas o enrolladas forman la armadura de la molécula proteica. Esta estructura confiere su especificidad a las proteínas y explica por qué proteínas de composición química semejante, constituidas por los mismos amino ácidos en proporción más o menos idéntica, tienen sin embargo, propiedades físicas, químicas y biológicas enteramente distintas.

Las proteínas requieren ser tratadas con gran delicadeza porque son extremadamente lábiles y pierden con facilidad sus características individuales específicas. Será por lo tanto de mucho interés conocer también la naturaleza y magnitud de las fuerzas que estabilizan la configuración molecular.

9.—Estructura de las proteínas fibrosas.

¿Qué sabemos respecto a la estructura interna de las proteínas?

La respuesta más clara puede darse examinando algunas proteínas fibrosas cuya estructura regular es casi cristalina.

Los estudios de Meyer y Mark relativos a la fibroína de la seda, demostraron que su molécula está formada por cadenas rectilíneas sobre cuya espina dorsal se proyec-

tan alternadamente los residuos a cada lado de la cadena. Estas cadenas alargadas no han sufrido deformación, lo que se atribuye a la ausencia de cadenas laterales importantes.

Una estructura igualmente sencilla se encuentra en la β queratina que es la forma existente en un cabello totalmente estirado.

Algo más elaborada, es la configuración de la α queratina y del colágeno, en que cada cadena — cuya espina dorsal y residuos laterales se disponen como en el caso anterior — se contrae formando bucles hexagonales incompletos. En estas moléculas aparecen ligaduras entre porciones de una misma cadena. Los hexágonos abiertos de la queratina y del colágeno en cuyos extremos se afrontan los grupos CO y NH de dos amino ácidos se cierran por una migración del H del NH al CO, creándose un ciclo no piperazínico y produciéndose una forma enólica. La tracción aplicada en los extremos de tales cadenas permite hasta triplicar su longitud original, por roturas de las uniones y desaparición de los ciclos, convirtiéndose la estructura α en β queratina (Figura 9). Las cadenas del colágeno son apenas extensibles.

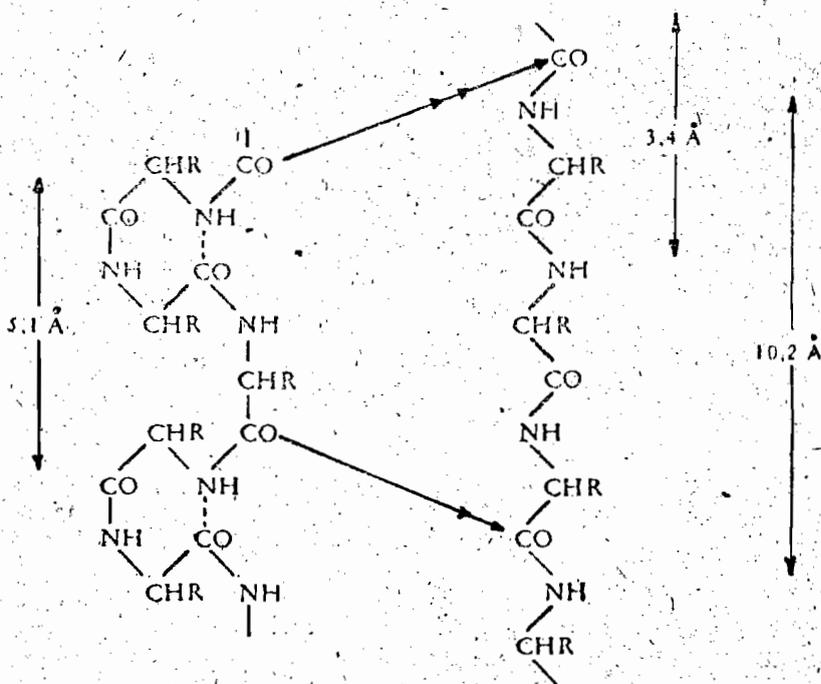


Fig. 9.—Reajuste molecular por elongación de la queratina.

La asociación de las cadenas paralelas de estas proteínas se efectúa por intermedio de los grupos funcionales de los residuos laterales. Las uniones se establecen a través de los grupos dithio S-S de la cistina, que abunda en la queratina y forman poderosos eslabones; entre las funciones básicas catiónicas H_3N^+ y las funciones ácidas aniónicas COO^- ; entre un grupo $COOH$ de una cadena y la función alcohol de otra cadena vecina dando una ligadura de tipo éster, o entre dos grupos OH produciendo una función eter-óxido. Finalmente, se forma una unión coordinativa entre los grupos NH y CO de dos cadenas contiguas que se enfrentan por migración alternativa resonante del H entre el átomo de N y el átomo de C.

10.—Estructura Interna de las Proteínas Globulares.

La estructura interna de las proteínas globulares es mucho más complicada y menos conocida. Los diagramas de rayos X no dan una información definida.

Los datos relativos al peso molecular y dimensiones de estas moléculas indican la imposibilidad de que las cadenas de aminoácidos se encuentren estiradas. Para ajustarse al volumen molecular conocido las cadenas peptídicas deben estar plegadas o enrolladas. Tal enrollamiento no puede ser uno cualquiera arbitrario, pues en tal caso no existirían las marcadas diferencias que presentan las proteínas homólogas de diversas especies, sino que debe ser altamente definido y característico y mantenido por fuerzas de unión adicionales interatómicas que estabilizan la arquitectura interior de las moléculas basada en la contracción de las cadenas.

La fragilidad de esta estructura permite verificar su estudio solamente aplicando procesos químicos de gran suavidad. Otras herramientas útiles para atacar este problema son los métodos basados en la absorción de la luz, la medida de las propiedades eléctricas y el análisis termodinámico. La facilidad con que se provoca el colapso de la estructura interna revela la naturaleza débil de las fuerzas que la mantienen. Será esta estructura, por lo tanto, la primera en

sufrir el impacto de los agentes físicos, químicos o biológicos que modifican el ambiente y crean perturbaciones electrónicas en el interior de la molécula.

A pesar de su escasa magnitud, estas fuerzas son suficientes para determinar la forma de la molécula y conferirle sus manifestaciones específicas, sosteniendo una estructura cuya rigidez no se altera cuando la proteína se cristaliza, se disuelve en agua o se precipita por adición de sales.

La gran labilidad de esta organización queda demostrada, además, por la tendencia de las proteínas globulares a formar capas monomoleculares en las interfases. La formación de estas películas dilatadas no sería posible si las moléculas de proteínas fueran redes tridimensionales con sólidas ataduras transversales como las que componen las resinas sintéticas. La facilidad con que las proteínas se extienden en la superficie del agua demuestra que las moléculas consisten en largas cadenas unidimensionales o en mallas bidimensionales de cadenas, que están plegadas de acuerdo con un orden regular, y no en una masa de cadenas intrincadas e irregularmente enredadas.

Pero no solo la forma y dimensiones de la molécula proteica dependen de la estructura plegada de las cadenas. Las propiedades químicas se alteran también en un sistema de esta clase por la formación de puentes entre cadenas paralelas, hecho que ilustra la química de las macromoléculas por la comparación de las propiedades disímiles del caucho nativo y del caucho vulcanizado.

a) Número de cadenas peptídicas en la molécula.

El número de cadenas que integran una molécula de proteína puede determinarse por métodos químicos. Suponiendo que las cadenas estén abiertas y que tengan 2° extremos terminales libres ocupados por un grupo $COOH$ y por un grupo NH_2 , el número de estos grupos corresponde al N° de cadenas y puede determinarse teóricamente con cierta seguridad por la cantidad de ácido o de álcali con que la proteína se combina. Pero la titulación electrométrica no da una idea precisa por 2 razones, 1)

porque las curvas de titulación no dan un punto final neto; 2) porque además de los grupos COOH y NH₂ libres terminales, existen en la cadena otros grupos similares libres que previenen de los ácidos diaminados y dicarboxílicos. La determinación independiente de los ácidos aminados portadores de estos grupos no terminales permite deducirlos de la cifra total de funciones ácidas y básicas tituladas electrometricamente, pero está sujeta a los errores considerables que afectan esta rama del análisis químico.

La misma objeción puede hacerse a cualquier otro procedimiento de medida de los grupos NH₂ y COOH. El número de cadenas que posee la molécula es generalmente pequeño. Chibnall ha mostrado así que la molécula de edestina está formada por 6 cadenas, la β lactoglobulina por 9, la ovalbumina por 5 y la insulina por 18.

Un método más preciso para establecer el número de grupos NH₂ y COOH terminales consiste en marcarlos por medio de un compuesto químico sustituyente y reconocerlos en los productos de hidrólisis. Este método permite además identificar a los amino ácidos situados en los extremos de la cadena.

El procedimiento de Sanger y Porter para marcar el grupo NH₂ consiste en alquilar las proteínas con 1. fluor 2.4 dinitrobenceno. Las N-dinitrofenil proteínas se hidrolizan, los ácidos difenilaminados de color amarillo se separan por cromatografía de partición en papel. De este modo han encontrado en la hemoglobina de caballo 6 grupos NH₂ terminales provenientes de 6 moléculas de valina. En la insulina se han encontrado 2 moléculas de dinitrofenilglicina y 2 de nitrofenilalanina por sub unidad de peso 12.000. Se encuentran además en estos hidrolizados los derivados dinitrofenilados de la lisina.

Estos resultados han permitido establecer que estas moléculas no consisten en una sola cadena peptídica doblada o enrollada sobre sí misma, sino en cadenas múltiples ligadas por uniones cistina u otras.

Los grupos COOH terminales pueden reconocerse por su capacidad de condensarse con el tiocianato dando lugar a tiohidantoínas en los productos de hidrólisis, reacción que no se produce con los grupos

β y γ de los ácidos aspártico o glutámico.

b) Grupos funcionales ocultos.

En las moléculas de proteína hay numerosos grupos funcionales que pueden reconocerse por reacciones particulares: los grupos OH, los anillos bencénico y fenólico, el grupo guanidina, el heterociclo imidazol, etc. Los resultados obtenidos aplicando estos reactivos a moléculas de proteína revelan que son muy pocos los que se encuentran libres o accesibles; la mayor proporción se encuentra oculta entre los pliegues de la cadena, inaccesibles a sus reactivos específicos. Solamente se exteriorizan durante la denaturación lo que constituye una nueva demostración de la plegadura de las cadenas.

c) Existencia de ciclos y ramificaciones.

¿Es siempre aplanada y lineal la forma de la cadena peptídica, sea que se encuentre extendida o doblada sobre sí misma? A priori nada parecería indicarlo. Pero los hechos experimentales indican que es esa la forma predominante. Existe naturalmente la posibilidad de que los amino ácidos se engarzen de una manera diferente formando ciclos de diverso tamaño como han sugerido Abderhalden con su diquetopiperazinas y Wrinch con sus cicloles. Incluso se han encontrado estructuras cíclicas en ciertos polipeptidos naturales como la gramicidina y tirocidina. Sin embargo, tales anillos deben considerarse como estructuras excepcionales ya que su existencia habitual sería incompatible con las propiedades ópticas y las exigencias estéricas.

De igual manera, es también poco probable la existencia en la cadena peptídica de ramificaciones importantes que den origen a cadenas secundarias que al unirse con otras cadenas formen anillos rígidos de mayor amplitud. Tales ramificaciones pueden existir también a título ocasional y pueden originarse a partir de la cistina, del grupo COOH del ácido glutámico y del grupo carbamino de la glutamina, como se ha señalado para explicar algunas propiedades de la gelatina y del colágeno.

Pero, como los ciclos, estas ramificaciones no son una formación dominante y la cadena peptídica tiene la forma de una cinta, recta o helicoidal, estirada o plegada, de acuerdo con las medidas físico-químicas.

d) *Naturaleza y fuerza de las uniones que mantienen la plegadura de las cadenas.*

El repliegue sostenido de las cadenas polipeptídicas de las moléculas no es debido a fuertes uniones químicas, sino a fuerzas electrostáticas débiles, de origen iónico o polar, que estabilizan los pliegues y asocian las cadenas próximas.

Desempeñan un papel importante los enlaces que se establecen por intermedio de los grupos dithio de la cistina que le permiten anclar por sus extremos entre dos pliegues de la cadena o entre dos cadenas.

Los grupos iónicos positivos y negativos se vinculan por su atracción electrostática. Los grupos COOH que provienen de los ácidos aspártico y glutámico, y los grupos NH₂ de la lisina y guanido de la arginina tienden, entre los pliegues de la cadena o entre cadenas vecinas, puentes salinos de carácter sólido.

Los grupos polares se atraen igualmente uno a otro formando uniones dipolares mucho más débiles que los puentes salinos. En tanto que la mutua atracción de los grupos iónicos decrece en proporción al valor recíproco del cuadrado de la distancia, la atracción dipolar decrece en proporción a la potencia 6 ó 7 de esta distancia, lo que significa que las fuerzas que operan entre los dipolos son de corto radio de acción y sólo pueden ligar moléculas íntimamente adyacentes.

Pero existe otra unión mucho más importante, aunque de menor valor energético. Es la unión H que se establece primordialmente entre los imino grupos de los ligámenes peptídicos de una cadena y los grupos carbonilo de una cadena vecina o de otro pliegue de la misma cadena (Figura 10).

En la fórmula electrónica de esta unión H, se observa que el núcleo de este elemento o protón es atraído por la pareja solitaria del O, abandonando la pareja del N y creando una polarización en este sitio de la molécula, con generación de fuerzas electrostáticas que determinan una atracción del N hacia el protón, que continúa vibrando alternativamente, es decir, reso-

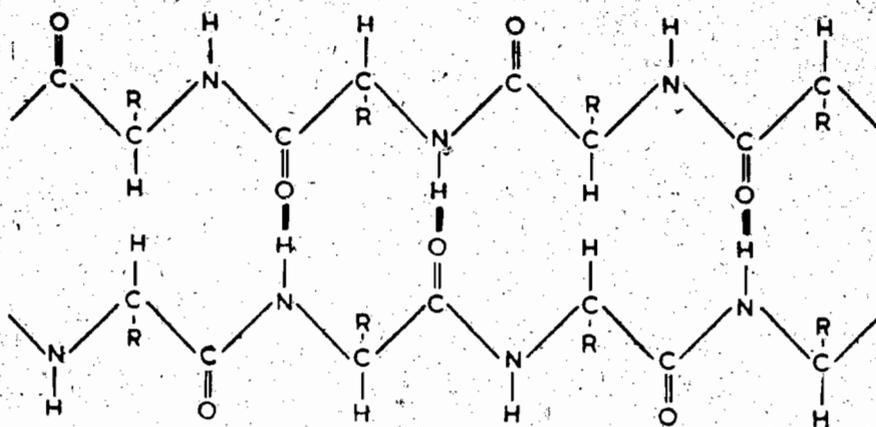


Fig. 10:—Unión Hidrógeno entre cadenas paralelas.

nando entre los átomos de O y de N. (Figura 11).

Pero este tipo de unión H no es el único que enlaza las cadenas polipeptídicas vecinas. También se forman uniones H entre 2 átomos de C. o entre 2 átomos de O. Así se establece por ejemplo una unión entre el grupo fenólico de la tirosina y un grupo COOH libre, lo que se demuestra por la desviación del máximo de absorción de la tirosina en el ultravioleta.

La energía requerida para romper esta unión es del orden de 2000 a 9000 calorías por mol., muy inferior a las 80.000 a 1000.000 calorías que, por contraste son necesarias para romper una unión covalente fuerte del tipo H:H y C:C. Esta energía guarda una relación inversa con las distancias interatómicas que son de 2,3 a 3,4 Å para la unión H y de 1,5 Å para la unión covalente.

Por este motivo, los enlaces longitudinales entre los amino ácidos que se alinean en la cadena peptídica son mas energéticos y se desdoblán bajo la acción de influencias drásticas, en tanto que las uniones transversales son deshechas por agentes suaves que ponen en juego una cantidad mínima de energía. Como el enlace peptídico está contenido en la molécula de proteína en una proporción muy superior a cualquier otro tipo de enlace, las ligaduras trasversales de las cadenas se deben a la vincula-

ción de las uniones peptídicas y de este modo la unión H es el principal medio de sostén de la estructura específica interna de las proteínas globulares.

Cuando el acercamiento de las cadenas por estas fuerzas electrostáticas es íntimo y existen además superficies complementarias, las fuerzas de atracción dipolar de corto radio de acción entran a desempeñar un papel importante y contribuyen a mantener la estructura interna de las proteínas.

e) *Detalles complementarios precisados por la investigación física.*

Las determinaciones del índice de refracción y de la rotación de la luz polarizada, que son propiedades aditivas de los átomos, no han arrojado informaciones de importancia sobre la estructura de la molécula proteica.

La absorción de la luz ultravioleta por las proteínas presenta un máximo en la zona de 270 mμ, que corresponde al máximo de absorción del triptofano, fenil-alanina y tirosina. La hidrólisis enzimática no altera este máximo, de lo que se deduce que existen las mismas estructuras absorbentes en la proteína intacta y en su hidrolizado y descarta la presencia de cantidades apreciables de anillos heterocíclicos postulados por algunos autores. La luz visible es absorbida por el grupo prostético

UNIONES H

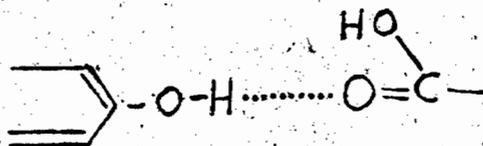
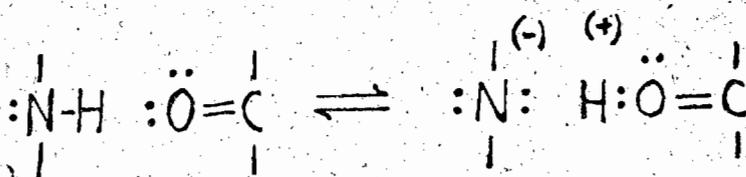


Fig. 11.—Estructura de la unión Hidrógeno

de las cromoproteínas. El estudio de la absorción infrarroja revela un máximo en $30\text{ m}\mu$ que corresponde al grupo NH de la unión peptídica y otro en $6\text{ m}\mu$ que depende del grupo CO de la misma unión y ha demostrado, además, que no existe una proporción significativa de grupos enolizados, como se suponía en la hipótesis cíclica.

Finalmente las determinaciones de la constante dieléctrica han revelado que tanto los amino ácidos como las proteínas son moléculas altamente polares, con una polaridad equivalente por unidad de masa. Además de permitir la medida del volumen molecular, los estudios de la constante dieléctrica han demostrado que la distribución de los grupos positivos y negativos es más o menos simétrica, siendo más abundante cierto tipo de carga en la superficie que en el interior de la molécula.

11.—*Dinámica de la configuración interna de la molécula proteica.*

La molécula de proteína —como cualquiera otra molécula— es una estructura dinámica en la cual se producen continuos reajustes de su organización interna, reflejo de la vibración de sus átomos. Estas macromoléculas son verdaderas máquinas electrónicas, poseedoras de electrones libres no localizados que forman una capa móvil en la superficie de la molécula y que, como tal, recibe y ejerce influencias del exterior. Algunos aspectos de esta organización dinámica pueden conocerse mediante la inducción de alteraciones estructurales y el estudio de las modificaciones energéticas concomitantes. Sobre esta materia se han obtenido informaciones significativas por el examen del proceso de denaturación de las proteínas.

12.—*Denaturación.*

Ya hemos dicho que la molécula de proteína es extraordinariamente lábil. Numerosos agentes físicos o químicos suaves producen un conjunto de cambios en las propiedades físicas, químicas y biológicas de las proteínas nativas, que se engloban en el término denaturación. Estas alteraciones no proteolíticas que no afectan la integridad química de la molécula, producen los siguientes efectos principales en la proteína denaturada: 1) disminución de la solubilidad; 2) mayor susceptibilidad a los enzimos proteolíticos; 3) exteriorización de grupos químicos ocultos, especialmente sulfhidrilos; 4) pérdida de las propiedades enzimáticas; 5) modificación de las propiedades inmunológicas. Estos efectos no se manifiestan siempre con la misma intensidad ni se desarrollan simultáneamente.

Los agentes denaturantes son muy variados y pueden ser físicos: calor, agitación, irradiación con luz ultravioleta u ondas ultrasónicas; o químicos: ácidos, álcalis, solventes orgánicos, sales de metales pesados, urea, guanidina, salicilatos, detergentes y otros compuestos. La variedad de los agentes denaturantes indica, con toda probabilidad que existen múltiples procesos diferentes que conducen a la denaturación.

Según la teoría formulada por Wu y generalmente aceptada, la denaturación consiste en una reordenación de las cadenas peptídicas de la molécula que se extienden y despliegan por ruptura de las débiles uniones que las juntan, es decir, es una alteración de la estructura interna específica de la proteína (Figura 12). Según la intensidad del agente denaturante y la mayor, o menor complicación de su

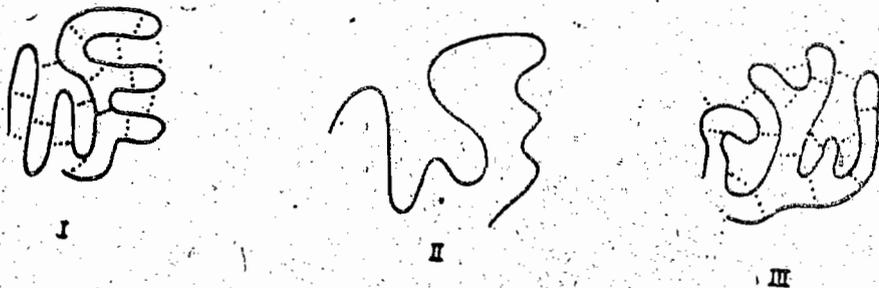


Fig. 12.—Esquema de la denaturación

estructura, el proceso es reversible o irreversible. Parece existir por lo tanto una eficaz barrera energética que protege a la proteína y evita que la agitación térmica desenlace sus cadenas. Esta barrera es superada por el denaturante.

Entre otras pruebas que demuestran que la denaturación se ejerce desorganizando la estructura interna de las moléculas, mencionaremos, la intensificación de las reacciones coloreadas de los grupos funcionales de los aminoácidos, la facilidad con que se produce, la hidrólisis enzimática, el aumento de la birrefringencia de flujo y la desviación del PIE hacia valores más elevados del pH.

En algunos casos la denaturación produce la formación de agregados proteicos mayores (ovalbúmina); en otros causa una ruptura de la molécula en subunidades menores (hemoglobina, caseína, lactoglobulina, insulina).

El mecanismo de acción de los agentes denaturantes es muy variado y diferente. Los ácidos y alcalis actúan rompiendo los puentes iónicos salinos, que pueden reconstruirse en parte por neutralización. Cuando se forman además nuevos puentes salinos intermoleculares sobreviene la agregación en grandes partículas insolubles o coagulación. El calor opera por igual mecanismo; la violenta agitación cinética

rompe los puentes salinos y produce coagulación. La agitación mecánica, el batido, conduce a la denaturación porque determina la creación de amplias interfaces en las cuales las cadenas se despliegan en superficie monololecular.

La denaturación por la luz ultravioleta de 270 m μ produce la rotura de las uniones peptídicas adyacentes a los anillos aromáticos. Su rendimiento es bajo y se calcula que de 400 quanta solo 1 es eficaz. Las ondas ultrasónicas actúan por varios mecanismos; disgregación mecánica, elevación de temperatura y liberación de O₂ que ataca los anillos aromáticos.

Peró talvez los agentes mas interesantes son las sustancias neutras o indiferentes, como la urea y derivados guanidínicos. La urea no es ácida ni básica, no es tóxica ni tensioactiva. Sin embargo, aumenta la constante dieléctrica del agua, lo que significa que en solución la estructura no polar normal se convierte en estructura dipolar. La acción denaturante de la urea se atribuye a la formación de uniones H entre estos dipolos y el ligamen peptídico. Las pequeñas moléculas de urea se insinúan como cuñas entre las cadenas peptídicas rompiendo las uniones H y estableciendo una nueva combinación de los ligámenes, lo que determina el despliegue de las cadenas (Figura 13).

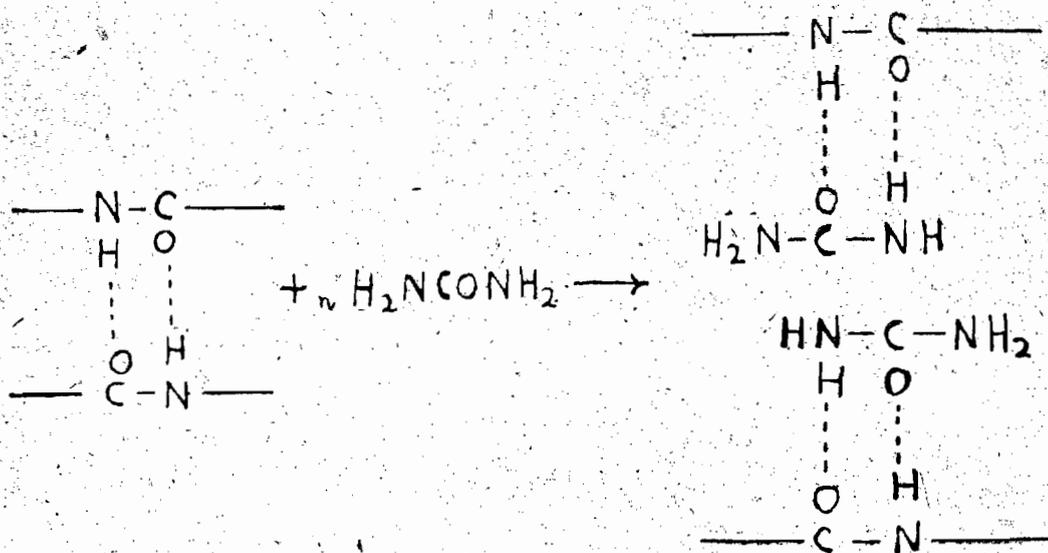


Fig. 13.—Acción de la urea sobre el ligamen Hidrógeno

La denaturación puede ser inhibida por numerosos agentes entre los cuales son de gran importancia las soluciones concentradas de glucosa y otros azúcares y las soluciones alcalinas de ácidos grasos. Se explica este efecto por su adsorción sobre la superficie de la partícula de manera que la proteína encapsulada entre estas moléculas pequeñas, sería el centro de un gran complejo soluble.

La denaturación es inhibida también por el empleo de solventes de alta viscosidad que retardan el movimiento de las cadenas e impiden su despliegue. Por igual mecanismo actúan las altas presiones.

La denaturación no es siempre un proceso irreversible. En ciertas oportunidades, la proteína tiende a volver a su estado nativo cuando se retira el agente denaturante o se anula su acción. Así se ha observado la regeneración de enzimas denaturados por el calor y de la hemoglobina tratada con alcalis. Pero talvez el ejemplo más típico de una denaturación reversible se observa con el inhibidor de la tripsina, que es una proteína extraída de la soya. En la zona de temperaturas comprendida entre 35° y 50° existe una mezcla de proteína nativa y denaturada, equilibrio afectado por la temperatura. La proteína denaturada es insoluble a pH 4,5, propiedad que permite estudiar éste equilibrio. También es reversible la denaturación que sufre entre 45 y 60° la proteína de Bence-Jones.

A pesar de todo, las proteínas renaturadas, siendo muy similares a las nativas, presentan pequeñas diferencias que se refieren a la susceptibilidad a la hidrólisis, a la solubilidad, a su forma cristalina y movilidad electroforética. Desde un punto de vista estadístico, la restauración de la estructura primitiva en todos sus minúsculos detalles es altamente improbable. Pero si la configuración de las cadenas en la molécula nativa es muy estable e impone menor esfuerzo y distorsión que cualquiera otra ordenación, es natural que la mayoría de las cadenas tienda a recuperar su estado original cuando la acción denaturante cesa.

13.—Energética de la denaturación.

Como todas las reacciones químicas, el proceso de denaturación envuelve transfor-

maciones de energía cuyo curso está regido por las leyes de la Termodinámica. Por su estudio, podremos apreciar las fuerzas que operan en el mantenimiento de la estructura interna de las proteínas.

Generalizando el segundo principio de la Termodinámica, en toda reacción química se produce una variación del contenido de energía de una o múltiples sustancias, que se descompone en una fracción de energía noble que puede ser intercambiada en cualquier otra forma de energía y otra fracción de energía degradada calórica que, en las condiciones isotérmicas del organismo, es enteramente inaprovechable.

Esta transformación se expresa por la ecuación $\Delta H = \Delta F + T\Delta S$ idéntica a la ecuación de Carnot para las máquinas térmicas. ΔH es la diferencia entre el contenido energético, expresado en calor, del sistema, antes y después de la reacción, que convencionalmente se representa como valor positivo cuando la energía es absorbida y negativo cuando es desprendido; ΔF es la cantidad de energía libre o transformable en trabajo que se libera (—) o consume (+) por efecto de la reacción. T es la temperatura absoluta y ΔS la variación de entropía, o sea, la cantidad de calor no aprovechable por grado de temperatura. Si el contenido energético de la proteína nativa es H^N y el de la denaturada es H^D , el calor de denaturación $\Delta H = H^D - H^N$. Un valor positivo de ΔH corresponde a una reacción endotérmica y uno negativo a una reacción exotérmica.

Durante algún tiempo se creyó que el curso de una reacción química está indicado por el signo de ΔH y que sólo las reacciones exotérmicas pueden tener lugar sin aporte de energía exterior. Pero esta opinión no es exacta. En toda reacción química, la energía libre tiende a disminuir. Todo cambio en que se produce pérdida de energía libre tiende a realizarse de manera espontánea y sin ayuda externa. Las reacciones en que ΔF es negativa y disminuye se llaman exérgicas; aquellas en que es positiva y aumenta son endérgicas.

$$\Delta F = \Delta H - T\Delta S$$

ΔF será negativa por lo tanto, cuando ΔH es negativo y ΔS positivo o ligeramente negativo, o bien cuando ΔH es

positivo y ΔS tiene un valor positivo aún más alto. Esta última circunstancia, como veremos en seguida, es la que presenta la denaturación.

El contenido energético expresado en calor de una sustancia no es accesible a una medida directa, pero se le puede calcular, en caso de que la reacción sea reversible, por la determinación de la constante de equilibrio a dos temperaturas diferentes. Aplicando este método a la denaturación reversible del inhibidor de la tripsina, Kunitz encuentra $\Delta H = + 57.000$ calorías por mol de proteína. Empleando un método de calorimetría directa de dos reacciones que parten, una de la proteína nativa y otra de la proteína denaturada, llegando ambas al mismo producto final, se ha determinado el calor de denaturación de la pepsina que es de $+ 85.000$ calorías por mol.

Estas investigaciones han conducido al sorprendente resultado de que la denaturación de las proteínas es una reacción endotérmica, siendo entonces necesario aumentar el contenido de energía de la proteína nativa para convertirla en denaturada. Decimos que tal resultado es paradójico si se considera la extrema labilidad de las proteínas nativas y la arquitectura complicada de sus cadenas, que parecerían indicar que la molécula nativa se encuentra a un nivel más alto de energía que la molécula denaturada.

¿Cómo se explica este hallazgo inesperado? La explicación se encuentra en los términos de la ecuación de la energía libre

$$\Delta F = \Delta H - T\Delta S$$

¿En qué sentido varía la energía libre en la denaturación de las proteínas? Analicemos el segundo término de la ecuación. El producto de $T\Delta S$ tiene la magnitud de una

energía y corresponde a la porción inaprovechable que no puede convertirse en trabajo, porque es el mínimo requerido para mantener el movimiento térmico de las moléculas. Cuando este movimiento disminuye, como ocurre cuando un líquido pasa isotérmicamente al estado sólido, el producto $T\Delta S$ disminuye.

Ya hemos visto que la denaturación es una reacción endotérmica que requiere el suministro de 10^5 calorías por mol. de proteína. Por otra parte es sabido que se efectúa fácilmente a la temperatura ordinaria, aún por agentes tan débiles como la urea y los detergentes. Debemos suponer entonces que ΔF es negativo, para lo cual es necesario que la entropía aumente y adquiera un valor positivo más elevado que el término ΔH al cual se resta. El proceso de denaturación de las proteínas es una reacción del mismo tipo que la fusión isotérmica del hielo, es decir, una reacción que absorbe energía y es endotérmica y que tiene por otra parte un curso espontáneo debido a un aumento relativamente mayor de la entropía, lo que determina una liberación de energía libre, por lo cual tiene un carácter exergónico.

En sus estudios sobre el inhibidor de la tripsina, Kunitz ha dado una prueba experimental de este punto de vista. Calculando F según la ecuación

$\Delta F = -RT \ln K = -2,3 RT \log K$ que se aplica solamente a sistemas reversibles como el considerado y conociendo ΔH , se encuentra que la reacción $P_N \rightarrow P_D$ se acompaña de un aumento de la entropía de 180 cal/grado/mol. En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos a diferentes temperaturas y se aprecia que una

Temperatura, °C	30	35	40	45	47	50
$K = D/N$	0,010	0,042	0,0220	0,870	2,03	4,35
$\Delta F = -4,58T \log K$	2780	1920	950	87,5	-450	-950
$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta F}{T}$	180	180	180	180	180	180

Tabla 3.—Análisis Termodinámico de la Denaturación Reversible del Inhibidor de la Tripsina Cristalino.

situación de perfecto equilibrio existe entre 45 y 47°, llegando ΔF a ser 0. Este gran aumento de la entropía y en consecuencia de la energía no utilizable $T\Delta S$ es la fuerza dirigente de la denaturación, la causa de su carácter espontáneo y la razón de que ΔF adquiera un valor negativo a temperaturas elevadas, para las cuales la denaturación se efectúa a mayor velocidad.

Interpretando estos resultados termodinámicos, en términos de cinética molecular, la denaturación es de nuevo comparable a la fusión del hielo. El agente denaturante determina una verdadera "fusión" de las uniones H, que se aflojan, adquiriendo las moléculas una más alta movilidad térmica. Este aumento de la energía cinética molecular es una expresión del aumento de la entropía del sistema.

Pero no solo sorprende el carácter endotérmico de la denaturación. Es también sorprendente la magnitud considerable del calor de denaturación H, del orden de 10^5 calorías por mol. Este valor es más alto que el observado en muchas reacciones químicas y es del orden de la energía necesaria para la separación de una unión covalente fuerte como la que se requiere para el clivaje del C y el O en el CO_2 o del H y el O en el agua.

La explicación de este alto valor energético se deduce de la compleja estructura interna de las proteínas, siendo debida la denaturación, no a la ruptura de una o pocas uniones fuertes, sino a la ruptura de muchas uniones débiles.

Si se considera por ejemplo, la pepsina cuyo PM es 35.000, cada molécula contiene alrededor de 300 amino ácidos y un número máximo de 150 uniones H entre los grupos peptídicos adyacentes. Las otras clases de unión son tan escasas que, sin grave error, pueden menospreciarse. Siendo el calor de denaturación de la pepsina de + 85.000 calorías/mol esto correspondería a 85.000/150 por unión H, lo que da para cada unión H separada un valor de 570 calorías por unión. Este valor, muy inferior a la energía de las uniones H que fluctúa entre 2000 y 8000 calorías, está indicando que no todas las uniones se rompen o que se forman nuevas uniones entre gru-

pos no ligados y con las moléculas del solvente.

El calor de denaturación es sólo aparentemente alto. Comparando el alto PM de las proteínas con el de las moléculas de metabolitos, se puede observar fácilmente que su magnitud es despreciablemente pequeño en condiciones de igualdad de masa. Supongamos, para simplificar, que el PM de una proteína es 100.000 y el calor de denaturación 100.000 calorías por mol. Por lo tanto la diferencia de contenido de energía entre 1 gr. de proteína nativa y 1 gr. de proteína denaturada es de 1 caloría. Por otra parte, la oxidación completa de 1 gr. de glucosa hasta CO_2 y agua produce 3.900 calorías. Evidentemente, el calor de denaturación es tan pequeño que no desempeña un papel significativo en los balances energéticos.

La diferencia entre los contenidos de entropía de la proteína natural y de la proteína denaturada, se llama entropía configuracional y se le asigna un valor negativo ya que el contenido de entropía de la proteína denaturada es más alto. Para la pepsina el cálculo da una entropía de — 5 calorías por grado por residuo de amino ácido, que a la temperatura de 27°C ($T: 300^\circ$) da un valor de —1500 calorías por residuo. Por otro lado, el calor de denaturación H es + 85.000 calorías, o sea, 300 calorías por residuo. Evidentemente el término $T\Delta S$ es muy superior a ΔH , denotando el gran aumento de la entropía configuracional que acompaña a la denaturación.

14.—Comentario final.

De acuerdo con lo ya expuesto, la molécula de proteína puede representarse como un manojo de cadenas de amino ácidos unidos por ligámenes peptídicos dispuestas en paralelo o replegadas, poseedoras en todo caso de una ordenación regular y estable. La constitución de estas cadenas, su forma y posición, su orientación dentro de la molécula, su mútua asociación y el estudio de las fuerzas que mantienen la forma molecular, son algunos aspectos que definen la estructura interna de las proteínas.

Esta arquitectura interna es el factor determinante de la especificidad de las proteínas, que se manifiesta en la sutil diferencia de propiedades entre proteínas homólogas de especies próximas, diferencia que escapa al análisis químico.

La importancia funcional de esta estructura interna es considerable, porque es también un factor determinante de las propiedades físicas, químicas y biológicas de cada proteína. El organismo mantiene intacta esta estructura por medio de una barrera energética que permite a la molécula conservar su estabilidad cuando se la disuelve, cristaliza o precipita.

Si por una causa u otra esta barrera es superada, sobreviene la denaturación y con ello un aumento de la entropía.

Consideradas desde un punto de vista bioquímico general — dejando aparte otras consideraciones — las proteínas naturales desempeñan funciones características como moléculas dinamicamente organizadas.

Desde luego son el soporte esencial y directivo de la actividad enzimática que influye sobre la velocidad de las reacciones a través de la activación de las moléculas y que permite la adaptación del metabolismo a las variaciones del ambiente.

Su condición de macromoléculas con electrones libres, no localizados, en su superficie, les asigna un papel importante en la regulación de la tonalidad electrónica del protoplasma, de la cual dependerá la velocidad de las reacciones de oxido-reducción tan decisivas por su rendimiento energético.

Las proteínas pueden coordinar en su estructura otras moléculas, especialmente agua, y regular de esta manera la hidratación en los pequeños espacios intracelulares en que muchas reacciones de importancia biológica se producen.

La realización de estas funciones exige la permanencia de la arquitectura interna, bien definida, del estado nativo. Si se produce el colapso de esta organización tan delicada, la alteración en la distribución de las capas electrónicas y en la capacidad coordinativa es tan grande que la molécula no puede desempeñar su trabajo. El mantenimiento de la estructura interna de las proteínas es uno de los frentes en que el organismo lucha contra el aumento de la entropía, es decir, contra el descenso del nivel organizativo y la degradación de la energía.

Principales fuentes bibliográficas

- 1.—Florkin M.—*Biochimie generale* — Masson et Cie. Liège, 1946.
- 2.—Gortner R. A. y Gortner W. A. — *Outlines of Biochemistry*. J. Wiley and Sons. New York. 1950.
- 3.—Greenberg D. M. — *Amino Acids and Proteins*. C. C. Thomas, Springfield, 1951.
- 4.—Haurowitz F.—*Chemistry and Biology of Proteins*. Acad. Press N. York, 1950.
- 5.—Neurath H., Greenstein J. P., Putnan F. W. y Erickson, J. O.—*Chemical Reviews* 34:157, 1944.
- 6.—Pauling L., Corey R. B. y Branson, H. R.—*Proc. Nat. Acad. Sciences* 37:205, 1951.
- 7.—Pauling L. y Corey R. B.—*Proc. Nat. Acad. Sciences* 37:235, 1951.
- 8.—Schmidt C. L. A.—*The Chemistry of the Amino acids and proteins*. C. C. Thomas, Springfield, 1944.