

1. ¿El “efecto hidrofóbico” es lo mismo que la “interacción hidrofóbica”?

Si bien muchas veces se toman como sinónimos, algunos autores prefieren el uso de efecto más que el de interacción. Esto es debido a que no existe en este proceso una interacción atractiva entre átomos como por ejemplo la que existe entre dos partículas cargadas que se describe por la ley de Coulomb. En el “efecto hidrofóbico” los átomos o moléculas no se atraen por una interacción o “fuerza hidrofóbica”. La configuración final que adopta el sistema se debe a un cambio favorable de entropía, principalmente debido al solvente.

Ref. Biofísica. Volkeshtein. Editorial Mir.

2. ¿Por qué el efecto hidrofóbico aumenta con el aumento de la temperatura?

Desde el punto de vista termodinámico el efecto hidrofóbico está caracterizado por el ΔG del proceso (**Atención!**, en la bibliografía específica el ΔG del efecto hidrofóbico se mide como el ΔG del proceso de transferir un mol de una sustancia hidrofóbica, por ejemplo un alcano, una gas noble, etc, a agua. El sentido de este proceso es el inverso al que generalmente se usa en biología, por ejemplo, para explicar el plegamiento de una proteína).

Para explicar el efecto de la temperatura sobre el efecto hidrofóbico, recordemos que

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

Derivando esta ecuación con respecto a T tenemos:

$\frac{\partial \Delta G}{\partial T} = \frac{\partial \Delta H}{\partial T} - \Delta S - \frac{\partial \Delta S}{\partial T}$ sabiendo que las derivadas de la entalpía y la entropía son iguales a

$$\Delta C_p = \frac{\partial \Delta H}{\partial T} = \frac{T \partial \Delta S}{\partial T} \quad \text{concluimos que}$$
$$\frac{\partial \Delta G}{\partial T} = -\Delta S$$

Esto quiere decir que siempre que tengamos un ΔS positivo (como el que ocurre en el efecto hidrofóbico) la variación del ΔG con la temperatura será negativa, de esta forma favoreciendo el proceso.

De donde sale este $\Delta S > 0$? En el caso de los sistemas con sustancias no-polares disueltas en agua, sabemos que el agua pierde “movilidad” en las proximidades inmediatas de las sustancias no-polares. Estas moléculas de agua no se comportan como el resto de las moléculas de agua que están alejadas de las superficies no-polares. En este tipo de sistemas es característico encontrar un C_p muy elevado dado justamente por la presencia de este tipo de “hidratación” (ver por ejemplo “Las moléculas hidrofóbicas en una

disolución acuosa” pag 43, Bioquímica 3 ed. Mathews, Van Holde). Cuando las sustancias no-polares se “ocultan” esto es disminuye la superficie expuesta al agua, por ejemplo en el plegado de una proteína, las moléculas de agua que estaban formando parte de la capa de hidratación, recuperan su movilidad con un consiguiente aumento de entropía.

El efecto descrito ocurre cuando las temperaturas son relativamente bajas (por ejemplo menos de 80-90 grados). Al ir aumentando la temperatura, la diferencia de movilidad entre las moléculas que forman la capa de hidratación y las moléculas alejadas de esta capa, es prácticamente nula. De esta forma existe una temperatura en la que el ΔS se hace 0 y a estas temperaturas se dice que el efecto hidrofóbico está dominado por el ΔH .

Ref: Proteins. Structures and molecular properties. 2nd Edition. Thomas Creighton.

Hydrophobic effect in protein folding and other noncovalent processes involving proteins. Spolar, R, Ha, J and Record, T. PNAS. Vol 86:8382-8385. 1989.

3. ¿Cómo calculo la carga neta de una molécula a un determinado pH?

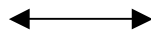
Para resolver esta pregunta usemos el AcH. Supongamos que tenemos 25 ml de una solución acuosa 0.1M, A esta solución se le van agregando volúmenes de una solución 0.1M de NaOH.

Supongamos además que queremos calcular la carga neta a los siguientes pH=0, pH=4.7, pH=9.

En todo momento el pH de la solución va a estar dada por la ecuación de Henderson-Hasselbalch(HH).

$$pH = pk + \log\left(\frac{[base]}{[acido]}\right)$$

sabiendo que el AcH se disocia en agua para dar



AcH

Ac⁻ + H⁺

El ácido será el AcH y la base Ac⁻ si adoptamos la convención de Brownsted-Lowry. Así escribimos:

$$pH = pk + \log\left(\frac{[Ac^-]}{[AcH]}\right)$$

también sabemos que la carga neta de una molécula de AcH tiene carga neta igual a cero y que una molécula de Ac⁻ tiene carga neta igual a -1. Cómo a cualquier pH siempre va a existir un equilibrio entre las formas ácida y básica, nos podemos preguntar cuál es la carga total neta a un determinado pH. Para esto usamos la siguiente ecuación:

$$\text{carga neta} = \sum_{i=0} q_i x_i$$

donde i indica el número de especies químicas que puede formar la molécula, q_i la carga neta formal de esa especie química y x_i su fracción molar (o porcentaje de ocurrencia). En el caso del AcH, tenemos el Ac^- y el AcH.

Calculemos la concentración de AcH en la solución a $\text{pH}=0$. Para esto tengamos en cuenta el balance de masa para el acetato. Así

$$0.1 = [\text{AcH}] + [\text{Ac}^-]$$

Podemos encontrar que la relación $[\text{Ac}^-]/[\text{AcH}]$ usando la ecuación HH, esto da $= 1.8 \cdot 10^{-5}$. Que reemplazando en la ecuación anterior nos da

$$[\text{AcH}] = 0.0999982$$

$$[\text{Ac}^-] = 1.8 \cdot 10^{-6}$$

Calculando las fracciones molares tenemos $x(\text{AcH}) = 0.999982$ y $x(\text{Ac}^-) = 1.8 \cdot 10^{-5}$.

Reemplazando en la fórmula calculamos la carga neta:

$$\text{Carga neta a pH}=0 = \sum_{i=0} (0)0.999982 + (-1)1.8 \cdot 10^{-5} = -1.8 \cdot 10^{-5}$$

Esto quiere decir que a $\text{pH}=0$ la especie predominante es el AcH, que como tiene carga neta $=0$, la carga total es parecida a 0.

Para $\text{pH}=4.7$ (4.7 es igual al pK del ácido acético) tenemos

De la ecuación de HH sacamos que $\text{Ac}^-/\text{AcH} = 1$, esto es ambas especies químicas se encuentran en la misma proporción, de aquí que sus fracciones molares sean iguales a 0.5. Entonces la carga neta a $\text{pH}=4.7 = \sum_{i=0} (0)0.5 + (-1)0.5 = -0.5$

Para $\text{pH}=9$, encontramos usando HH que $\text{Ac}^-/\text{AcH} = 18000$. Otra vez usando el balance de masa tenemos:

$$0.1 = [\text{AcH}] + 18000 [\text{AcH}]$$

$$[\text{AcH}] = 5.55 \cdot 10^{-6}$$

$$[\text{Ac}^-] = 0.0999$$

Calculando las fracciones molares y sustituyendo tenemos que la carga neta será:

$$\sum_{i=0} (0)5.55 \cdot 10^{-5} + (-1)0.99999 = -0.999943$$

Así tenemos que a un pH muy bajo, la carga de la solución es prácticamente 0. Por el contrario la carga a $\text{pH}=9$ es negativa y corresponde mayormente a la especie predominante (Ac^-)

Es muy importante darse cuenta que estas cargas netas están calculadas en base a un mol de AcH. Para comprobar esto noten que si titulamos 1mol de AcH, más allá del punto de equivalencia la especie predominante será el Ac^- . Si tenemos un mol de AcH, la carga neta en esta situación será aproximadamente -1 .

Ref. Problemas de Química. M Sienko. Ed. Reverte.

4. Calcule el volumen de una solución de NaOH 0.1M necesarios para llevar 25 ml de una solución acuosa de AcH 0.1M a pH=0 a los siguientes pH=4.7, 9.

Este problema esta estrechamente relacionado con el anterior y pone de manifiesto una de las aplicaciones de la carga neta de una solución a un determinado pH.

Vimos antes que esta solución a pH=0 tiene carga neta $-1.8 \cdot 10^{-5}$. Si queremos llevar esta solución a un pH = 4.7, sabemos que la solución a este pH tiene carga neta = -0.5.

¿Cómo puedo usar las cargas netas para calcular el volumen de NaOH necesario para producir un determinado cambio de pH?

Uds. saben que las reacciones de neutralización ocurren equivalente a equivalente (esto es el agregado de un equivalente de NaOH (o una molécula de NaOH) a una solución de AcH, me va a generar una molécula de Ac^- .

Podemos decir entonces que la diferencia de cargas neta entre el pH=0 y pH=4.7 me dará el número de equivalentes que tengo que agregar de NaOH. Así,

$$\Delta \text{carga neta} = (\text{carga neta a pH=9}) - (\text{carga neta a pH=0}) = -1.8 \cdot 10^{-5} + 0.5 = 0.4999982$$

El valor absoluto de esta diferencia es el número de equivalentes por **mol** que debo agregar para producir la variación de pH deseada. La cuestión es que nosotros no tenemos 1 mol de AcH sino que tenemos 25 ml de una solución 0.1M. Entonces nuestra concentración de AcH es $2.5 \cdot 10^{-3}$ moles

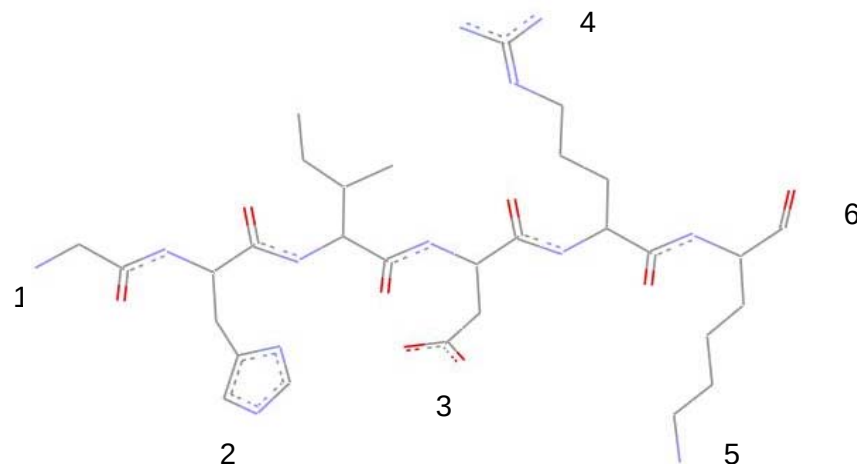
Así, si para 1mol de AcH $\longrightarrow$ 0.49999 equivalentes de NaOH
Para $2.5 \cdot 10^{-3}$ moles de AcH $\longrightarrow$ $x = 1.2499 \cdot 10^{-3}$ equivalentes de NaOH

Si la solución de NaOH es 0.1M (= 0.1 N) tenemos que 0.1 equivalente $\longrightarrow$ 1000ml
 3.1210^{-3} equivalentes $\longrightarrow$ x=
12.45 ml.

Este cálculo es muy importante. Debemos notar que si conocemos el volumen de NaOH empleado entre dos pH dados, sabiendo la diferencia de cargas que se puede calcular en forma teórica como vimos, uno podría estimar la concentración de una determinada sustancia (en el caso del ejemplo el AcH). Este tipo de cálculo se usa en varios problemas del seminario 2 y el TP de titulación de aminoácidos.

4. ¿Cómo determino el PI de un polipéptido?

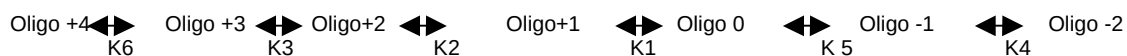
Supongamos que queremos determinar el PI del péptido Gly-His-Ile-Asp-Arg-Lys. Lo primero que tenemos que hacer es escribir la fórmula desarrollada del oligopéptido y encontrar cuales son los grupos funcionales que tienen comportamiento ácido-base.



En este oligopéptido tenemos:

1. Alfa amino de la Gly, $pK = 9.58$
2. Imidazol de la His, $pK = 6.04$
3. Beta carboxílo del Asp, $pK = 3.71$
4. Guanidinio de la Arg, $pK = 12.10$
5. Epsilo Amino de la Lys, $pK = 10.67$
6. Carboxilo terminal de la Lys, $pK = 2.9$

Una vez identificados estos grupos debemos escribir todas las formas iónicas del oligopéptido. De esta forma tenemos:



El PI de este oligopéptido estará entre K1 y K5, ya que es entre estos pK donde encontramos la forma neutra del oligopéptido.

La forma más aproximada de encontrar el PI es considerar que sólo las especies Oligo+1, Oligo 0 y Oligo -1 son importantes en cuanto a determinar la concentración de Oligo 0.

Así sólo tendremos dos ecuaciones de Henderson-Hasselbalch (para $pK1$ y $pK5$). Usando estas dos ecuaciones tenemos que

$$PI = (pK1 + pK5)/2 = 10.25$$

La resolución exacta del problema consistiría en resolver las 6 ecuaciones de Henderson-Hasselbalch, más la del balance de masa y el balance de carga (en este caso 8 ecuaciones con 8 incógnitas). Sabemos que cuando el $pH = pI$ la suma de las cargas positivas con las negativas debe ser igual a cero. La resolución de este sistema da

$$PI = 10.1872$$

Vemos que la aproximación en este caso no es tan mala debido a que las especies Oligo+4, Oligo +3, Oligo +2 y Oligo +1 son despreciables a un pH=pl.

Una forma alternativa de resolver el sistema de las 8 ecuaciones es expresar la fracción de cargas positivas y negativas por la siguiente fórmulas:

$$q^+ = \frac{1}{1 + 10^{(pH - pK)}}$$

$$q^- = -\frac{1}{1 + 10^{(pK - pH)}}$$

si pH=pl se debe cumplir que $\sum_i q_i^+ + q_i^- = 0$. De esta ecuación podemos sacar el PI del oligopeptido. (Esta ecuación se puede resolver por ejemplo usando el Matemática)

Ref. A graphical approach to determine the isoelectric point and charge of small peptides from pH 0 to 14. G D'Andrea and G Di Nicolantonio. J.C.E. 79:972-975. 2002.

Cálculos de Bioquímica. Irwin Segel 2 Ed. Editorial Acribia.

Polypeptide amino acid composition and isoelectric point. Comparison between experiment and theory. Costas S. Patrickios and Edna Yamasaki. Analytical Biochemistry 231:82-91. 1995

5. ¿Por qué varían los pK de los aminoácidos?

Si tomamos los valores de pK de los aminoácidos del problema anterior de distintas fuentes encontramos:

Grupo	Bioquímica. Mathews 3 Ed	Biochemistry. Zubay 3 Ed	J. Chem. Educ 79, 2002
Alfa amino de la Gly	9.6	9.78	9.58
Imidazol de la His	6.0	6.04	6.04
Beta carboxilo del Asp	3.9	3.90	3.71
Guanidinio de la Arg	12.5	12.48	12.10
Epsilo Amino de la Lys	10.0	10.79	10.67
Carboxilo terminal de la Lys	2.2	2.16	2.9

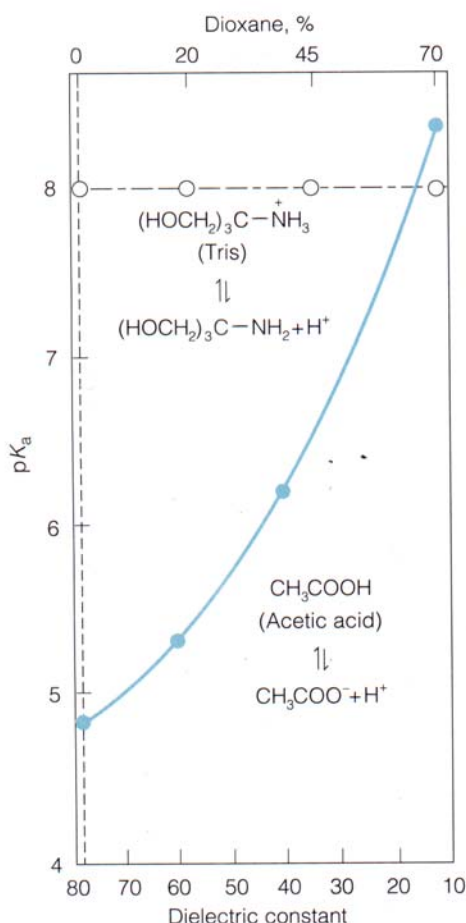
Como se puede observar vemos ligeras variaciones. Si calculamos el PI usando la ecuación del problema anterior obtenemos valores muy distintos: 9.79, 10.27 y 10.18 respectivamente para los valores de la tabla.

Recordemos que el pK es el $-\log(K_a)$, esto es el logaritmo de una constante de equilibrio. ¿De qué depende la constante de equilibrio? Si recordamos que :

$\Delta G^\circ = -RT \ln(K_{eq})$ vemos que K_{eq} tiene las mismas variables que el ΔG° . En el caso de una constante de equilibrio en una solución, la constante de equilibrio dependerá de la temperatura, de la presión, y de características fisicoquímicas del solvente. En principio

debemos esperar que estas variaciones son propias de cualquier determinación experimental.

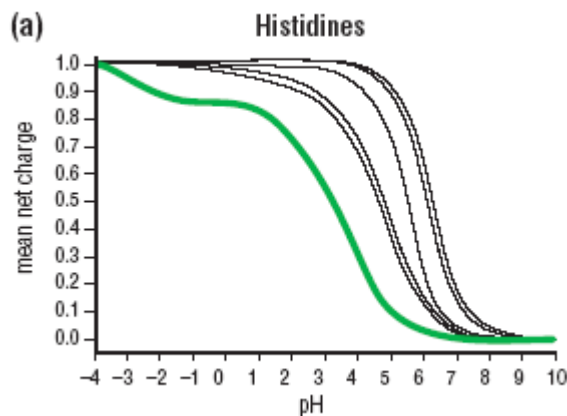
Sin embargo, existen modificaciones del pK mucho más importantes desde el punto de vista cuantitativo. Estas variaciones se deben a modificaciones en las propiedades del solvente o a la modificación del entorno fisicoquímico de un amino ácido. Una de estas propiedades fisicoquímicas es la constante dieléctrica del solvente. Por ejemplo sabemos que la constante de disociación del ácido acético en agua es $1.8 \cdot 10^{-5}$, dando un $pK=4.76$. También sabemos que el ACh se disocia dando un protón y un Ac^- . Cómo la constante dieléctrica mide la capacidad del solvente de estabilizar cargas, esperamos que si modificamos la constante dieléctrica seguramente la K_{eq} del ácido se modificará. Así podemos modificar la constante del medio (por ejemplo agregando cantidades crecientes de dioxano, que baja la constante dielectrica de la mezcla) veremos que el ácido acético se hace un ácido mucho más débil al disminuir la constante dieléctrica del medio como se ve en la siguiente figura:



De la misma forma se ven modificados los pK de los amino ácidos cuando la constante dieléctrica varía, por ejemplo para un amino ácido en la superficie de la proteína (en contacto con el agua y constante dieléctrica parecida a 80) o uno en el interior de la proteína (constante dieléctrica entre 10-40 veces más chica que en el agua). En este ultimo caso los pK de un amino ácido pueden modificarse aumentando ya sea la acidez o la basicidad de los mismos dependiendo del entorno fisicoquímico. Pensemos, por

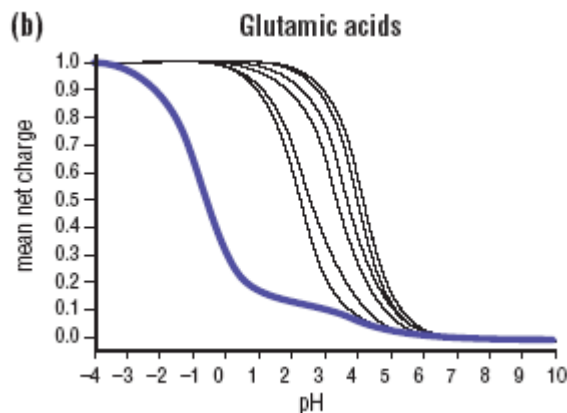
ejemplo que este entorno fisicoquímico puede estabilizar a un anión (por ejemplo por la presencia de cargas parciales positivas) o lo puede desestabilizar completamente (por ejemplo un medio hidrofóbico).

Los gráficos que se muestran a continuación representan la variación de la carga de un determinado tipo de amino ácido en función del pH. Por ejemplo para el amino ácido His, se tomaron todas las His de una proteína dada y se le calculó la variación de la carga en función del pH.



Es posible ver en el gráfico que no todas las His tienen el mismo pK aunque la mayoría tiene un pK de 6.5 en promedio. Sin embargo, existe una His que se aleja mucho del promedio (indicada con verde). Esta His está involucrada en ciertas reacciones enzimáticas y evolutivamente se ha creado un ambiente fisicoquímico para que esta His tenga un pK muy bajo.

Otro ejemplo lo podemos ver para los Glu de la misma enzima:



El Glu en línea azul posee un valor de pK exageradamente bajo (¿Qué entorno fisicoquímico esperarían encontrar para este Glu?)

Algunos autores han encontrado que los amino ácidos con pK anómalos están estrechamente ligados a la función biológica que sostiene la proteína.

Ref. Biochemistry. Mathews-Van Holde. 2 Edición

Ondrechen, M.J. et al.: THEMATICIS: a simple computational predictor of enzyme function from structure. *Proc.Natl Acad. Sci. USA* 2001, 98:12473–12478.