

La interacción Hidrofóbica en Sistemas de Interés Biológico. I. Conceptos Generales.

J. RAUL GRIGERA

*Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos (IFLYSIB) y
Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata, C.C. 565, La Plata 1900, Argentina*

RESUMEN. En este trabajo se considera la *interacción hidrofóbica* en sus aspectos generales a efectos de dar los elementos necesarios como para poder analizar algunos sistemas de interés biológico y farmacéutico. Se presentan algunos elementos sobre la estructura del agua a efectos de considerar la hidratación en forma general y posteriormente la hidratación hidrofóbica en particular. Se presentan evidencias experimentales tanto termodinámicas como provenientes de métodos de relajación para luego plantear la definición de interacción hidrofóbica y algunos factores que la afectan. En trabajos subsiguientes se presentarán diversos métodos de medición de la interacción hidrofóbica y su relación con los coeficientes de partición, la caracterización de las proteínas de acuerdo a los "momentos hidrofóbicos", los métodos de predicción de hidrofobicidad, la relación con el "balance hidrofílico-hidrofóbico (HLB)" y otros aspectos de interés biológico.

SUMMARY. "*The Hydrophobic Interaction in Systems of Biological Interest. I. General concepts*". In this work the general aspects of hydrophobic interaction are considered aiming at giving the necessary background to be able to analyze in the future some system of biological and pharmaceutical relevance. The concept of water structure is given to introduce hydration in general, and hydrophobic hydration in particular. The experimental evidences —both from the thermodynamics and from relaxation methods— are given to present finally the definition of hydrophobic interaction and some factors that modify it. In following papers several methods of measurement of hydrophobic interaction will be given, as well as their relation with partition coefficient, the "hydrophobic moments" of proteins, methods to predict hydrophobicity, the relationship with the hydrophilic-lipophilic balance (HLB) and some other aspects of biological interest.

INTRODUCCION

La interacción hidrofóbica tomó carta de ciudadanía con la aparición del clásico trabajo de Kauzmann¹, donde por primera vez se utilizó tal término para designar las interacciones entre sustancias no polares en

agua. Obviamente la existencia de sustancias "hidrofóbicas" se conoce desde época muy temprana, pero por mucho tiempo no se le brindó un tratamiento especial a los fenómenos de interacción entre sustancias hidrofóbicas en soluciones acuosas. Las sus-

Palabras clave: Hidrofobicidad; Interacción hidrofóbica; Estructura del agua
KEY WORDS: *Hydrophobicity; Hydrophobic Interaction; Water Structure*

tancias hidrofóbicas “repelen” el agua, es lícito sin embargo preguntar por qué causa y cuáles son sus efectos. Desde el punto de vista del estudio de los sistemas biológicos encontramos que es tan relevante la interacción entre sustancias puramente hidrofóbicas como el rol que juegan las porciones hidrofóbicas de un gran número de sustancias con relación a otro tipo de interacciones.

La *hidrofobicidad* y, consecuentemente, la interacción hidrofóbica es un caso particular de la *solvofobicidad*, es decir la repelencia de soluto y solvente en general. Sin embargo la importancia del agua en la vida terrestre y la magnitud relativa de estos efectos en agua comparados con otros solventes justifica que el fenómeno sea considerado en forma especial.

La hidrofobicidad tiene ciertamente importancia en los procesos de solubilidad de una sustancia. Desde el punto de vista de los fenómenos biológicos solubilidad significa casi siempre solubilidad en agua, pero las excepciones son importantes. La permeabilidad a través de membranas biológicas requiere en algunos casos la disolución del permeante en la fase lipídica de la membrana y en este caso la solubilidad del permeante en la membrana es relevante al fenómeno de transporte. Si la sustancia es altamente hidrofóbica tiene alta probabilidad de penetrar en la membrana, sin embargo la concentración en la fase acuosa será muy baja. Si la sustancia es anfifílica, es decir parte de la molécula es hidrofóbica y parte hidrofílica, puede formar *micelas* que son como un todo hidrofílicas, pero pueden interactuar con la membrana autodestruyéndose o formando incluso *micelas invertidas* que son hidrofóbicas.

Existen muchos y muy interesantes problemas en el campo de la hidrofobicidad. Su solución, o por lo menos un intento serio de resolverlos, requiere el conoci-

miento en cierto detalle de la interacción hidrofóbica. Es probable que en algunos casos se haya sobreenfatizado el papel de la interacción hidrofóbica en desmedro de una consideración armoniosa de los distintos tipos de interacciones. Tanto la minimización como la sobrevalorización del efecto no es sino una medida de nuestro escaso conocimiento sobre el tema. Puesto que la hidrofobicidad es una importante propiedad de las sustancias deseamos poseer un buen método para su medida. Desde el punto de vista experimental es posible diseñar diferentes métodos para su medida, sin embargo es importante relacionar estos métodos con los fundamentos teóricos de la interacción hidrofóbica para poder utilizar la información para predicción y diseño.

El origen de la interacción hidrofóbica a nivel molecular no resulta claro hasta el momento. Tal conocimiento depende finalmente de nuestra comprensión de las propiedades del agua líquida a nivel microscópico. Pese al considerable avance en ese sentido en los últimos años aún queda un largo camino por recorrer antes de poder dar una idea cabal de las propiedades del agua líquida, particularmente con referencia a sus propiedades estructurales, de importancia para el problema que nos ocupa.

Como punto de partida definiremos algunos conceptos sobre líquidos y agua antes de dar una definición formal sobre la interacción hidrofóbica y su caracterización termodinámica así como una corta descripción de los factores que afectan.

Existe una dificultad básica en el tratamiento de este tema. Su importancia es ampliamente reconocida y, consecuentemente, las expectativas son grandes. Puesto que nuestro conocimiento es hasta el presente insuficiente como para intentar resolver todos los problemas que se plantean en torno al tema muchas de las expectativas de los lectores no podrán ser satisfechas. Sólo nos

queda por desear que al menos el trabajo pueda allanar el camino hacia la solución de algunos de los problemas que el lector se plantee.

HIDRATACION HIDROFOBICA

Estructura del agua

El agua a temperatura ambiente y presión normal es líquida. Como todo líquido posee propiedades particulares relativas a ese estado, sin embargo existen muchas propiedades que hacen del agua un líquido particularmente diferente. Enfocaremos aquí, por ser de importancia para los temas a tratar más adelante, el problema de la *estructura* del agua. No debe considerarse que el problema de la estructura es único del agua aun cuando el agua tenga una estructura específica. La primera pregunta que nos planteamos es: ¿cuál es el significado de estructura cuando nos referimos a un líquido? Veamos el problema brevemente.

Para definir una estructura debemos ser capaces de definir entidades estructurales en términos de clases bien definidas de estructuras entre vecinos S_k , descritas en términos de ángulos y distancias entre moléculas. El número de clases diferentes debe ser finito, y preferiblemente pequeño, y, finalmente la vida media de las entidades debe exceder holgadamente el período de vibración molecular.

Las estructuras, definidas en los términos del párrafo anterior, como se ha descrito existen claramente en un sólido cristalino en el cual la celda unidad (las entidades estructurales) se repite a lo largo del cristal y posee una larga vida media. En un vidrio las entidades estructurales poseen una larga vida media pero no es posible definir todo el sistema con un número finito de ellas. ¿Qué ocurre en los líquidos?

Mediante experimentos de difracción (rayos X y/o neutrones) es posible obtener la *función de distribución radial*. La Fig. 1

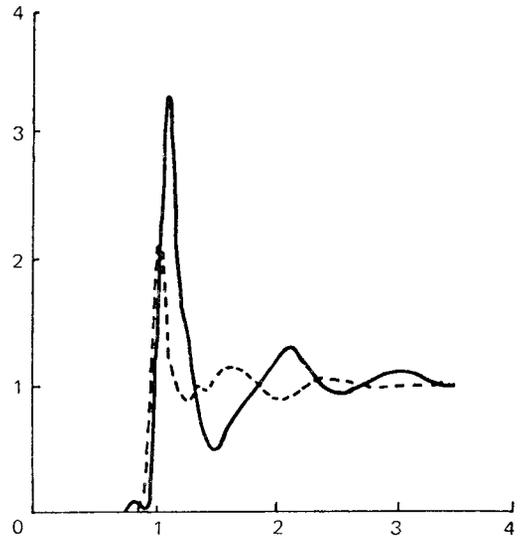


Figura 1. Curvas de la función de distribución radial para argón (—) y agua (---). Las distancias se expresan en unidades del diámetro molecular para cada caso, así para argón el valor $r/\sigma=1$ corresponde a 0,34 nm mientras que para el agua corresponde a 0,27 nm. Nótese que el primer máximo en ambos casos corresponde aproximadamente a $r/\sigma=1$ mientras que el segundo corresponde a $r/\sigma=2$ para el argón y a $r/\sigma=1,6$ para el agua.

muestra la función de distribución radial para argón líquido y agua. Esta función puede interpretarse como la probabilidad (estrictamente densidad de probabilidad) de encontrar una molécula a una distancia r de una dada como referencia. Así vemos en la Fig. 1 que existe a una cierta distancia un primer pico notable que nos indica la posición de los primeros vecinos y un segundo pico (a 0,68 nm para argón) que fija la posición de los segundos vecinos. Más allá de primeros y segundos vecinos no podemos definir otras distancias características puesto que la curva carece de estructura. Esto nos indica que los líquidos en el tiempo característico de los experimentos de difracción (tiempos largos) sólo poseen orden a corta distancia.

Es sumamente instructivo detenerse a analizar las posibles causas que marcan las diferencias entre las funciones de distribu-

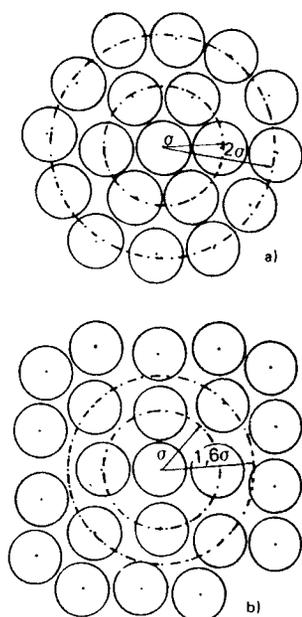


Figura 2. Esquema de empaquetamiento compacto (a) y una red exagonal abierta (b). En el primer caso los segundos vecinos se encuentran a una distancia 2σ de la molécula de referencia y en el segundo a $1,6\sigma$ (σ representa el diámetro de las esferas).

ción radial de agua y argón. Supongamos que tenemos un líquido formado por esferas rígidas bien empaquetadas de radio σ . Podemos observar en la Fig. 2 que dada una molécula de referencia sus primeros vecinos estarán a una distancia σ mientras que los segundos vecinos se encontrarán a una distancia 2σ . Esto es lo que observamos en la función de distribución radial que se muestra en la Fig. 1 para el argón, no así para el agua. En el agua la posición del segundo pico (segundos vecinos) no corresponde a 2σ sino a una distancia menor ($1,6\sigma$). Esto puede explicarse mediante la existencia de una estructura abierta, tal como se muestra en la Fig 2b. Esta situación marca una diferencia importante, mientras que el argón (y muchos otros líquidos) simplemente se acomodan como bolitas en un frasco, el agua requiere un ordenamiento más cuidadoso, del que los enlaces de hidrógeno serían en

gran parte responsables. Si volvemos a la Fig. 1 observaremos entonces que la diferencia de posición del segundo pico en el agua con respecto a un líquido como argón nos da cuenta de una propiedad estructural distintiva para el agua. En base a la comparación entre los diagramas de rayos X de agua e hielo Ih (el hielo a presión atmosférica) se ha sugerido que el agua tiene una estructura hexagonal. Si bien la sugerencia es razonable aún no existen pruebas contundentes en este sentido.

En relación al tiempo de vida de las entidades estructurales características del agua la información proviene de los experimentos de relajación dieléctrica. Sin entrar en detalles sobre los mismos podemos decir que tales experimentos indican que la vida media de la estructura del agua es el orden de 10^{-11} segundos, la que es mayor que el período de vibración molecular ($\approx 2 \times 10^{-13}$ s). Los anchos de línea de espectroscopía Raman e infrarrojo coinciden con la información de relajación dieléctrica. Es en consecuencia pertinente hablar de la *estructura del agua*, teniendo en cuenta siempre que estamos frente a estructuras de corta vida media. Este aspecto lo consideraremos nuevamente en relación a la hidratación.

Hidratación

La hidratación puede ser definida desde diferentes puntos de vista. Uno de ellos, que resulta de mucha utilidad, se refiere a la dinámica de la hidratación. Definamos el índice de hidratación como² :

$$R = \tau_i / \tau_a \quad (1)$$

donde τ_i y τ_a son los tiempos de residencia de una *molécula de agua* en las proximidades de la sustancia en estudio y en las proximidades de otra molécula de agua respectivamente. Si $R > 1$ tenemos la llamada *hidratación positiva* mientras que si $R < 1$ estamos frente a la llamada *hidratación negativa*.

Esta definición, muy útil, no nos indica nada acerca de la *estructura* de la hidratación, ya que se refiere solamente a una propiedad dinámica. Desde el punto de vista experimental la información respecto a tiempos de residencia puede ser obtenida mediante relajación dieléctrica, resonancia magnética nuclear (rmn), viscosidad y difusión.

En muchas ocasiones estamos interesados en la estructura de la hidratación. Los resultados experimentales en relación a la estructura son escasos, pese al considerable avance realizado en los últimos tiempos. En ocasiones es interesante comparar la estructura del agua alrededor de un cierto tipo de sustancia con la estructura regular del agua. La nueva estructura puede ser similar o no a la del agua y aparecen las designaciones de sustancias "formadoras" o "destructoras" de estructura. Estos términos pueden producir enormes confusiones si no se los define cuidadosamente. Una sustancia formadora de estructura, podría definirse, por una parte, como aquella que induce una estructura estable no necesariamente como la estructura regular del agua. Alternativamente podríamos adoptar como definición que una sustancia formadora de estructura es aquella que estabiliza (es decir aumenta el tiempo de vida) de la estructura regular del agua. Obviamente el significado es muy diferente en cada caso. En lo que sigue llamaremos a una sustancia *formadora de estructura* si induce la formación de una estructura del tipo de la del agua pero más estable. Esto pone como sustancias *destructoras de estructura* a aquellas sustancias que producen una rígida estructura de hidratación a su alrededor, de gran estabilidad pero que no posee las características de la estructura regular del agua. Es importante notar que, con la definición dinámica dada previamente estas últimas sustancias poseen hidratación positiva, no obstante resultan destruc-

toras de estructura. La diferencia reside en el enfoque dinámico y estructural, no resulta apropiado hablar de estructura cuando sólo se posee información dinámica.

No nos detendremos a analizar las características de la hidratación de sustancias polares y cargadas, pese a la enorme importancia que ellas tienen, a efectos de no apartarnos del tema central de este artículo. Pondremos énfasis en la interacción de partículas no polares con el agua. Puesto que las sustancias hidrofóbicas no tienen casi interacción directa con el agua —ya que la única interacción presente es la de van der Waals (débil y de corta distancia)— sería de esperar que la hidratación de estas sustancias será escasa o inexistente. Sin embargo la evidencia experimental indica que existe una *hidratación hidrofóbica* de considerable importancia y cuyas características veremos más adelante.

Información experimental

Termodinámica. La solubilidad de gases no polares en agua decrece con la temperatura. Esta es una información importante en relación con el comportamiento termodinámico de estas soluciones. El decrecimiento de la solubilidad significa un aumento de la energía libre de solubilización. Recordemos que:

$$\Delta G_{sol} = \Delta H_{sol} - T \Delta S_{sol} \quad (2)$$

donde ΔG_{sol} , ΔH_{sol} y ΔS_{sol} son la energía libre de Gibbs, la entalpía y la entropía de solubilidad y T la temperatura absoluta. Para cambios pequeños de temperatura podemos suponer que la entalpía y entropía de solubilidad no se alteran, por lo tanto, si un aumento de temperatura da como resultado una disminución de la solubilidad y, consecuentemente un aumento de la energía libre, debemos concluir que la entropía de solubilidad es negativa. En otras palabras *la solubilización de una sustancia no polar en agua produce una disminución de la entropía*.

pía del sistema, lo que resulta realmente llamativo. Si estamos en presencia de una molécula larga, como por ejemplo una cadena hidrocarbonada, podemos atribuir el decremento de la entropía del sistema a una pérdida de grados de libertad en la cadena. Por el contrario si se trata de un gas monoatómico resulta evidente que la disminución de entropía necesariamente se debe a modificación de las propiedades del solvente, en este caso el agua, con lo que debemos concluir que la introducción de una sustancia no polar en agua produce una disminución de la entropía del agua. Es posible obtener información más detallada de la termodinámica.

El potencial químico de una molécula hidrocarbonada en *agua* puede escribirse como³:

$$\mu_a = \mu^0_a + RT \ln x_a f_a \quad (3)$$

donde x_a es la fracción molar de soluto, f_a es el *coeficiente de actividad* a la concentración estudiada y μ^0 es el potencial químico estándar en escala unitaria. El estado de referencia es el estado de dilución infinita *en agua* lo que significa que la interacción entre las moléculas hidrocarbonadas y el agua están incluidas en μ^0 , mientras que la interacción entre las moléculas hidrocarbonadas entre ellas está incluida en el coeficiente de actividad f_a . A concentraciones diluidas, como las que consideraremos aquí, y tratándose de moléculas no-polares es posible aceptar la aproximación de que el coeficiente de actividad es igual a la unidad.

Utilizando la definición anterior podemos ver que el término $RT \ln x_a$ contiene la contribución debida a la entropía de mezcla y que el potencial químico estándar representa la energía libre del soluto y la energía libre de la interacción soluto-solvente. Debe tenerse en cuenta que para que sea válida la definición anterior la concentración *debe* ser expresada en fracciones

molares, es decir debemos trabajar en el sistema unitario.

Similarmente el potencial químico de una molécula hidrocarbonada en un solvente *hidrocarbonado* será

$$\mu_{hc} = \mu^0_{hc} + RT \ln x_{hc} \quad (4)$$

donde el coeficiente de actividad ha sido tomado igual a uno. En principio el potencial químico estándar μ^0_{hc} cambiará con el solvente, pero si consideramos solventes similares (como por ejemplo *n*-hexano y *n*-decano) se puede considerar equivalente en vista de las diferencias que aparecen entre sustancias no polares y agua.

Puesto que los potenciales químicos estándar no contienen contribución alguna de la entropía de mezcla y la contribución de la energía libre interna será igual en cualquier solvente, la diferencia entre potenciales químicos estándar de la misma sustancia en un solvente hidrocarbonado y en agua representará la energía libre molar. En consecuencia podemos escribir:

$$\mu^0_{hc} - \mu^0_a = \Delta g_{sol} \quad (5)$$

donde indicamos con Δg_{sol} a la energía libre de solubilidad.

Es posible separar la entalpía y entropía de solubilidad si podemos conocer la energía libre de solubilidad a diferentes temperaturas ya que sabemos que:

$$\Delta g_{sol} = (h_{hc} - h_a) - T(s_{hc} - s_a) \quad (6)$$

y, por lo tanto, resulta

$$d(\Delta g_{sol}/T)/d(1/T) = h_{hc} - h_a \quad (7)$$

El primer miembro de la ec. (7) no es más que la pendiente de la curva de energía libre de solubilidad en función de la inversa de la temperatura.

La entalpía de solubilidad varía con la temperatura y su variación está relacionada con los valores de la capacidad calorífica a presión constante. Es posible por lo tanto calcular la capacidad calorífica de transferencia desde un medio hidrocarbonado a un medio acuoso mediante:

$$d(H_a - H_{hc})/dt = (C_p)_a - (C_p)_{hc} \quad (8)$$

La capacidad calorífica de transferencia puede obtenerse también por medición calorimétrica directa.

Experimentos de relajación. Por mucho tiempo la información termodinámica fue la única evidencia experimental disponible para describir el fenómeno de interacción hidrofóbica, no existía información experimental directa que indicara que la disminución de entropía del sistema provenga de la restricción de las moléculas de agua.

Los alcoholes y los ácidos carboxílicos son moléculas modelo sumamente interesantes para estudiar el fenómeno. La ligera polaridad producida por los grupos hidroxilo permiten disponer de una solubilidad aceptable en tanto que la longitud de la cadena hidrocarbonada puede ser seleccionada a voluntad por el experimentador mediante la selección adecuada del compuesto. Estas sustancias fueron utilizadas por Hallenga *et al.*⁴ para estudiar el comportamiento dieléctrico en altas frecuencias del agua en presencia de pequeñas cantidades de diversos alcoholes y ácidos carboxílicos. Obviamente el experimento debió ser llevado a cabo a muy altas diluciones a efectos de evitar asociación entre las moléculas presentes. La determinación del *tiempo de relajación* del agua en la solución permite obtener información directa sobre la movilidad de las moléculas de agua. El resultado más relevante de estos experimentos se muestra en la Fig. 3. Se puede observar una buena correlación entre el corrimiento del tiempo de relajación (hacia tiempos más largos, es decir menor movilidad) con la disminución de la entropía de solubilización. Esto muestra claramente que la disminución de entropía resulta como consecuencia de la restricción en el movimiento rotacional de las moléculas del agua.

La resonancia magnética nuclear (r.m.n.) es también una técnica útil para mostrar

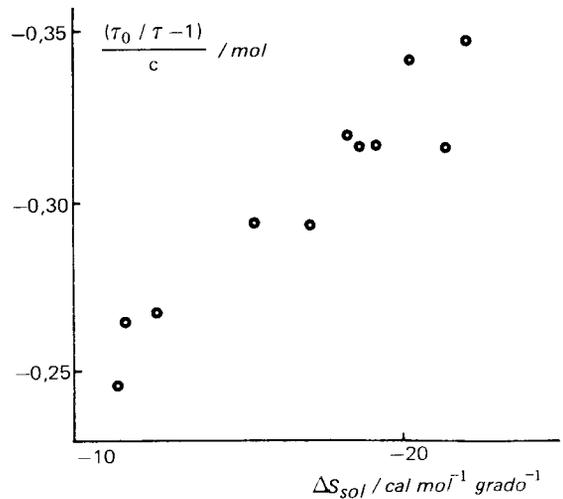


Figura 3. Corrimiento relativo del tiempo de relajación dieléctrico del agua por mol de soluto en función de la entropía de solubilización para una serie de alcoholes y ácidos carboxílicos⁴. Puesto que τ_0 representa el tiempo de relajación del agua pura puede verse que si el valor $(\tau_0 / \tau - 1)/c$ es negativo --como en el presente caso-- significa que el tiempo de relajación se corre hacia valores mayores, a este corrimiento se corresponde una mayor *disminución* de entropía de solubilización.

la hidratación hidrofóbica. Puesto que la resonancia magnética depende de cada caso en particular es posible "sintonizar" el experimento para medir el tiempo de correlación rotacional (τ_c) de los diferentes componentes de la mezcla. En la Fig. 4 se muestran algunos resultados obtenidos para mezclas de acetona y agua⁵. Se puede ver que la presencia de acetona disminuye el tiempo de correlación rotacional del agua cuando la fracción molar de acetona es de alrededor de 0,3–0,4, dependiendo de la temperatura.

Como consecuencia tanto de la información termodinámica como de los experimentos de relajación concluimos que la presencia de sustancias no polares en agua reduce la movilidad de las moléculas de agua al menos en los alrededores de las moléculas apolares. Este efecto es lo que llamamos *hidratación hidrofóbica*.

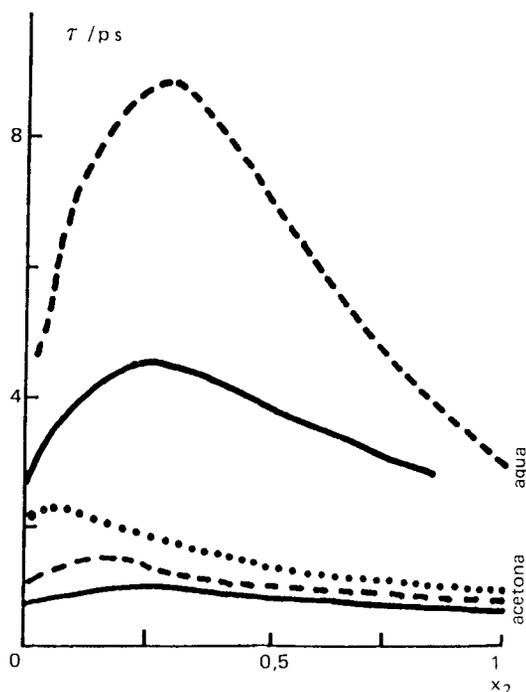


Figura 4. Tiempo de correlación rotacional del agua y acetona para diferentes concentraciones de acetona. Las líneas llenas corresponden a 25 °C y las líneas quebradas a 5 °C. La línea de puntos corresponde a la relajación de ^{17}O en acetona a 25 °C. En los otros casos se trata de relajación de protones (^1H). Se puede ver que mientras el tiempo de correlación rotacional de la acetona varía muy poco en las diferentes soluciones la incorporación de acetona produce un considerable aumento del mismo en el agua. Una mayor incorporación de acetona conduce finalmente a una disminución del tiempo de correlación rotacional.

La interacción hidrofóbica

Estamos ahora en condiciones de precisar el origen de la interacción hidrofóbica. Si la introducción de una molécula no polar en agua reduce la entropía del sistema por reducción de la movilidad del agua en el entorno no polar, la agregación de dos o más moléculas apolares reducirá el área expuesta al agua y, consecuentemente, algunas moléculas de agua deberán abandonar la región de hidratación hidrofóbica y pasar al medio, donde recuperarán la movilidad regular. Este pasaje de una región a otra re-

dundará en un crecimiento de la movilidad total, con el inmediato resultado de un crecimiento de la entropía de todo el sistema. Es obvio que dos moléculas apolares se atraerán también por fuerzas de van der Waals. Esto es también cierto en vacío, en disolventes no polares y en agua. Esta contribución a la atracción se suma a la contribución entrópica, la cual se basa en la ventaja termodinámica al producir un sistema más desordenado. La asociación de moléculas de un mismo tipo tiene como resultado una disminución de entropía (al "clasificar" las moléculas del medio) que normalmente debe compensarse energéticamente a costa de la interacción mutua. En el caso que nos ocupa esta disminución de entropía se ve ampliamente compensada por el aumento de la misma producido por el desorden en el solvente.

Podemos desdoblar la interacción entre dos moléculas no polares en dos términos, uno debido a la atracción por fuerzas de van der Waals —independientes del solvente— y otra debida exclusivamente al efecto del solvente. Si existe en realidad contribución del solvente esa será la *interacción solvofóbica* que, en nuestro caso particular, por tratarse de agua llamaremos *interacción hidrofóbica*. Podemos expresar más rigurosamente lo que hemos dicho.

Comencemos por el caso más simple en el cual dos solutos simples, tales como argón o metano, en agua entran en contacto. Ambas moléculas están en un principio a una separación infinita. Si r_1 y r_2 son las posiciones de las partículas tendremos que la separación inicial será $r_{12} = |r_2 - r_1| = \infty$. Consideraremos que la separación final será del orden del diámetro de las partículas, es decir $r_{12} \approx \sigma$, donde σ es el diámetro molecular.

Tanto la presión P como la temperatura T permanecen constantes. Podemos escribir entonces la energía libre de Gibbs del pro-

ceso de llevar las moléculas desde el infinito al contacto como:

$$\Delta G(\infty \rightarrow \sigma) = G(T, P, \text{composición del solvente}, r_{12} = \sigma) - G(T, P, \text{composición del solvente}, r_{12} = \infty) \quad (9)$$

La energía libre así escrita contiene todas las contribuciones al proceso, para destacar la participación del solvente podemos dividirla en dos partes, es decir:

$$\Delta G(\infty \rightarrow \sigma) = U(\sigma) + \Delta G^{ih}(\sigma) \quad (10)$$

donde $\Delta U(\sigma)$ representa la contribución directa a la interacción y es independiente de la del solvente. La otra contribución, $\Delta G^{ih}(\sigma)$ es la correspondiente a la interacción debida al solvente. Es la que en nuestro caso llamamos la *interacción hidrofóbica*.

Efectos de temperatura. El comportamiento de la interacción hidrofóbica con la temperatura es uno de los aspectos que hace a ésta, una vez más, un tipo de interacción que se aparta del comportamiento del resto de las interacciones. Si ponemos atención en la fuerza impulsora de la interacción vemos que el término $T\Delta S^{ih}$ es el que decide el comportamiento con la temperatura. El cambio de energía libre en la interacción hidrofóbica es:

$$\Delta G^{ih} = \Delta H^{ih} - T\Delta S^{ih} \quad (11)$$

Puesto que $\Delta S^{ih} > 0$, si consideramos que para un intervalo de temperatura pequeño tanto las variaciones de entropía como de entalpía son constantes, vemos que un aumento de temperatura representa una disminución de la energía libre de la interacción, es decir que el proceso se torna más favorable. Este simple razonamiento muestra que la interacción hidrofóbica *aumenta* con la temperatura. Por supuesto que podemos preguntarnos sobre la validez de la suposición que la entropía de interacción se mantiene constante con la temperatura. En principio esto no puede ser cierto

para un rango grande de temperatura ya que el aumento de entropía de la interacción está relacionado con la disminución de la misma durante la hidratación hidrofóbica. Este proceso depende de la estructura del agua la que, evidentemente se debilita con la temperatura. Vemos así que existen dos contribuciones que se oponen con un aumento de la temperatura.

Podemos intentar observar las tablas de variación de ΔH^{ih} y de $T\Delta S^{ih}$ para establecer cuán constante resultan en el intervalo de temperatura estudiado. Sin embargo debemos estar alertas dado que existen serias dificultades para obtener estos parámetros en función de la temperatura con precisión suficiente, particularmente en soluciones suficientemente diluidas. Desde el punto de vista de la observación experimental directa vemos que la interacción hidrofóbica efectivamente aumenta con la temperatura, dentro de cierto rango (aproximadamente entre 0 y 60 °C). Podemos concluir que el proceso de interacción hidrofóbica mostrará un comportamiento bifásico con un mínimo a la izquierda del cual el aumento de temperatura es el factor dominante en el producto $T\Delta S^{ih}$ mientras que a la derecha del mismo las variaciones en la estructura del agua impiden una eficiente hidratación hidrofóbica y, consecuentemente la variación de entropía de interacción es menor que a temperaturas más bajas.

A temperaturas moderadas la interacción hidrofóbica efectivamente aumenta con la temperatura y, en los casos más críticos, se llega a la separación de fases. La separación de fases de mezclas con el aumento de temperatura se caracteriza por el punto crítico de separación (*lower critical demixing*) que se puede observar, por ejemplo, en la mezcla agua-tetrahidrofurano. Una experiencia diaria más común es el calentamiento de una bebida gaseosa en la cual el CO₂ se desprende del líquido.

Efecto de la presión. El efecto de la presión sobre la interacción hidrofóbica es fácil que racionalizar considerando el efecto de la presión sobre la estructura del agua. A muy altas presiones el agua se comporta como un líquido “normal”, es decir que pierde las características de un líquido altamente asociado. Bajo estas condiciones es evidente que la interacción hidrofóbica debe estar considerablemente debilitada. Existen experimentos que así lo indican. Las proteínas compuestas por diferentes subunidades se disocian fácilmente a altas presiones. Pareciera que un efecto cualquiera que se produce a presiones del orden de los $Kbar$ es irrelevante en biología (excepto para la biología de los abismos marinos). Sin embargo no es así. La electroforesis de alta presión está siendo utilizada ventajosamente en Bioquímica y el poder de resolución se basa precisamente en el debilitamiento de la interacción hidrofóbica con la presión.

Otros factores que afectan la interacción hidrofóbica. Tal como lo hemos indicado la interacción hidrofóbica depende de la pre-existencia de orden en el agua. Este orden, que no puede ser aun definido precisamente en términos de estructura, está inducido por la presencia de grupos apolares. Cambios considerables de temperatura y/o presión —que desplazan las propiedades del agua hacia las de los líquidos no-asociados— produce un decrecimiento en la intensidad de la interacción hidrofóbica (casi intuitivamente podríamos decir que no existe ventaja termodinámica en el contacto ya que “hay menos orden para destruir”).

Además de la presión y temperatura en la solución, podemos cambiar sus propiedades adicionando otra sustancia. Así como las sustancias no-polares inducen orden, a través de la hidratación hidrofóbica, podría ocurrir que otras sustancias desordenen el

sistema. Este parecería ser el caso de algunos compuestos pero la explicación del fenómeno no es simple.

La úrea es una sustancia interesante para considerar en relación al problema. El mismo es muy interesante puesto que la úrea puede formar “buenos” enlaces de hidrógeno con el agua. En principio parecería que la úrea, al formar enlaces de hidrógeno, debería inducir orden en el agua, es aquí donde nos debemos preguntar cuál es el significado de orden en relación a la interacción hidrofóbica. En el caso de la *hidratación hidrofóbica* los detalles del orden producido son irrelevantes ya que el contacto mutuo destruye ese orden y aumenta la entropía del sistema. Cuando una tercera sustancia se introduce, por ejemplo úrea, la pregunta es si la nueva sustancia inhibe o favorece la formación de tal orden. En realidad no nos interesa si la sustancia es “formadora” o “destructora” de estructura (“*structure forming*” o “*structure breakers*” como se las denomina habitualmente en la literatura). Lo que nosotros estamos considerando son inhibidores o promotores de hidratación hidrofóbica, lo que es, en suma, la clave del problema. Parecería que hasta el momento no existe forma de detectar promotores o inhibidores de hidratación hidrofóbica directamente y el único camino es estudiar el efecto sobre la interacción hidrofóbica. La simulación mediante computadoras puede potencialmente resolver el problema y es de esperar que en el futuro así resulte.

Volvamos al problema de la úrea. Es bien conocido el hecho que a altas concentraciones la úrea desnaturaliza las proteínas. Por mucho tiempo se consideró que la acción se efectuaba por competencia de la misma con los enlaces de hidrógeno intermoleculares. Es posible considerar la intensidad relativa de las uniones hidrógeno úrea-proteína, agua-proteína y agua-úrea a

efectos de calcular hacia donde se desplazará el equilibrio. La situación no es simple ya que los puentes de hidrógeno de todos los pares mencionados poseen intensidades del mismo orden de magnitud y sería necesario contar con determinaciones altamente precisas para dirimir el problema. Una prueba más contundente proviene de los experimentos de Klotz⁶ quien estudió soluciones de un polímero sintético (polivinilmetil-oxazolidiona) que carece de puentes de hidrógeno para estabilizar su conformación en agua. Sin embargo la úrea produce un efecto similar al de la desnaturalización de proteínas, efecto que —obviamente— no se debe a la acción sobre los puentes de hidrógeno. Actualmente está universalmente aceptado que el agua produce “desorden” en la estructura del agua, es decir, inhibe la hidratación hidrofóbica y por ende produce debilitamiento en la interacción hidrofóbica. Otro sistema interesante para el estudio del mecanismo de acción de la úrea en la interacción hidrofóbica lo representan las micelas.

Es evidente que el poder formador de enlaces de hidrógeno de la úrea hace que ésta se hidrate. Sin embargo es claro, a la luz de los resultados mencionados, que esa hidratación no es compatible con la estructura del agua necesaria para la hidratación hidrofóbica. La (o las) capas de hidratación de la úrea parecerían ser incompatibles con la estructura normal del agua. El concepto de sustancias destructoras de estructura puede identificarse con el de inhibidor de hidratación hidrofóbica sólo si entendemos que la formación de estructura de hidratación incompatibles con la estructura normal del agua. Con respecto a los “formadores” de estructura deberíamos adoptar un criterio similar y observar la compatibilidad de la estructura formada con la estructura del agua antes que determinar el tiempo de vida de la propia esfera de hidratación. Con

este criterio sustancias poseedoras de fuerte esfera de hidratación (ej. el ion litio) pueden llegar a ser “destructoras” de estructura, tal como la úrea. Resulta por demás evidente que no es difícil encontrar en la literatura los términos “destructores” y “formadores” de estructura utilizados en forma opuesta.

Surge aquí una diferencia importante entre la hidratación hidrofílica y la hidratación hidrofóbica. Mientras que la primera depende fundamentalmente del poder de fijar agua por el soluto y, obviamente, de las propiedades *moleculares* del agua, en la segunda pareciera que el soluto es un inductor de la hidratación pero que la misma depende fundamentalmente de las características *estructurales* del solvente (agua).

Si bien los aspectos mencionados previamente tienen considerable consenso su validez no ha sido definitivamente probada.

CONCLUSIONES

En esta somera revisión es posible apreciar que el estado de definición del problema está lejos de ser el óptimo. No obstante existe información suficiente como para aprovechar la misma en aplicaciones Biológicas. En un próximo trabajo consideraremos este aspecto.

AGRADECIMIENTOS. Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) y la Organización de los Estados Americanos (OEA). El autor es miembro de la Carrera del Investigador del CONICET.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Kauzmann, W. (1959) *Adv. Protein Chem.* 14: 1
2. Samoilov, O. Ya. (1965) "*Structure of aqueous electrolyte solutions and the hydration of ions*". Consultant Bureau, New York
3. Tandford, C. (1973) "*The Hydrophobic Interactions*". J. Wiley (Ed.), New York
4. Hallenga, K., J.R. Grigera y H.J.C. Berendsen (1980) *J. Chem. Phys.*, 84: 2381
5. Franks, F. (1984) "*Water*". Royal Soc. of Chem. Londres
6. Klotz, I.M. (1965) *Fed. Proc.* 24: S24