

## La Interacción Hidrofóbica en Sistemas de Interés Biológico. II. Su Evaluación y algunas Aplicaciones

J. RAUL GRIGERA

*Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos\**  
*y Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de La Plata,*  
*Casilla de Correo 565, 1900 La Plata, Argentina*

RESUMEN. En la primera parte de esta serie (*Acta Farm. Bonaerense* 6: 183, 1987) expusimos los conceptos básicos de la interacción hidrofóbica. En este trabajo consideramos los diferentes métodos de evaluación cuantitativa de dicha interacción. Tanto los métodos experimentales, como coeficientes de partición, como teóricos, método de fragmentos y momentos hidrofóbicos, son discutidos. La importancia de la interacción hidrofóbica en la conformación de macromoléculas es presentada brevemente. Como consecuencia de las propiedades hidrofóbicas de las proteínas plasmáticas y de la hidrofobicidad de ciertas sustancias, tales como drogas y ácidos grasos, se produce un transporte cuya eficiencia depende en gran parte de la correcta asociación entre proteínas y ligandos. Consideramos por lo tanto la adsorción de drogas y ácidos grasos a proteínas.

SUMMARY. "The Hydrophobic Interaction in System of Biological Interest. II. Its evaluation and some applications." In the first part of this series (*Acta Farm. Bonaerense* 6: 183, 1987) we gave the foundation of the hydrophobic interaction. In this work we consider the quantitative evaluation of it. Both theoretical and experimental methods (as the method of fragments, hydrophobic moments and partition coefficients) are discussed. The importance of hydrophobic interaction for the macromolecular conformation is briefly presented. As consequence of the hydrophobic properties of plasmatic proteins and the hydrophobicity of some substances, as drugs and fatty acids, there is a transport that depends on the correct association of proteins and ligands. The adsorption of drugs and fatty acids to proteins is also consider.

### INTRODUCCION

En la primera parte de esta serie <sup>1</sup> nos referimos a los conceptos generales de la interacción hidrofóbica. En esta parte pretendemos puntualizar algunas de sus consecuencias en estructuras y agregados relevantes a la función biológica. La ubicuidad de las interacciones hidrofóbicas hacen que, de

pretender abarcar *todos* los sistemas en las que está involucrada deberíamos cubrir la casi totalidad de los sistemas, lo que es obviamente imposible. Por lo tanto estamos empeñados en una tarea que sabemos desde el inicio que será incompleta. Nos concentraremos en algunos casos que creemos de importancia.

\* Instituto Asociado al CONICET y patrocinado por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

PALABRAS CLAVE: Hidrofobicidad; Momentos hidrofóbicos; Coeficientes de partición; Adsorción.  
KEY WORDS: *Hydrophobicity; Hydrophobic moments; Partition coefficients; Adsorption.*

La dilucidación de las relaciones entre estructura y función biológica es un anhelo común de numerosas disciplinas. Lamentablemente, aún no podemos a ciencia cierta establecer dicha relación en todos los casos, como así tampoco conocemos todas las estructuras. En referencia a estas últimas, la difracción de rayos-X ha constituido una poderosa herramienta que, sin embargo, no puede establecer fehacientemente las estructuras en solución, lo que representa una dificultad seria en el campo biológico. Puesto que el medio biológico por excelencia es el agua, la interacción hidrofóbica juega un rol fundamental en la determinación de la conformación de moléculas en solución, como así también en la asociación entre macromoléculas y ligandos.

Los dos aspectos mencionados, la estructura macromolecular y la formación de complejos de éstas con pequeños ligandos, representan un campo enorme de investigación tanto desde el punto de vista estrictamente básico como aplicado. Como ejemplo podemos citar el diseño de drogas y el estudio de los mecanismos de acción, para restringirnos a un simple punto de enorme trascendencia. Hoy más que nunca las empresas farmacéuticas están interesadas en aspectos teóricos y de simulación que pocos años atrás se consideraban confinadas al ámbito académico.

En el campo del diseño de drogas es obvio que la época del trabajo de prueba y error pertenece al pasado. Desde hace más de dos décadas el diseño está ligado al estudio de la relación estructura-actividad, referido generalmente en la literatura como QSAR (*quantitative structure-activity relationship*). Esta línea de estudio tiene muchos aspectos de los cuales uno de ellos es el análisis de la relación lipofílica-lipofóbica de los compuestos. La importancia que se le ha dado a esta relación es tal que se ha llegado a decir que es posible expresar la ac-

tividad biológica como función del coeficiente de partición agua/aceite del compuesto. Sin caer en extremos que sobredimensionan la importancia de algunos aspectos en detrimento de otros de gran relevancia, podemos decir que la relación antedicha tiene, en verdad, una gran importancia en la función biológica.

Es obvio que si la interacción de un compuesto con una macromolécula (receptor o vehículo) depende en gran parte de sus características hidrofóbicas, también dependerá de las características hidrofóbicas de la superficie macromolecular. Esta superficie estará determinada por la conformación de la macromolécula en solución.

Con el objeto de acercarnos al menos al conocimiento de las propiedades hidrofóbicas de sustancias de interés farmacológico y las propiedades de los receptores y vehículos biológicos, hemos organizado el presente trabajo de la siguiente manera: en primer término nos plantearémos la evaluación cuantitativa de la interacción hidrofóbica, ya sea mediante modelos o experimentalmente, y luego nos ocuparemos de algunos aspectos de la conformación de macromoléculas y de la interacción con ligandos.

Puesto que nos ocuparemos de la interacción hidrofóbica éste será el centro de atracción en todos los casos. Esto no significa que —por ejemplo— la conformación macromolecular dependa exclusivamente de ella.

#### LA MEDIDA DE LA INTERACCION HIDROFOBICA

La medición de la interacción hidrofóbica posee dificultades importantes que, como el lector ciertamente ha notado, están relacionadas con las dificultades en definir claramente la interacción hidrofóbica en términos de cantidades experimentales. Por una parte podemos intentar atacar el problema basados en la teoría y, por otra, me-

diante el uso de enfoques experimentales tales como la medición de coeficientes de partición.

*Parámetro de solvatación atómica*

En esta sección nos referiremos a la determinación de una *escala de hidrofobicidad* para diferentes moléculas. Esta es, por supuesto, una sobresimplificación de la realidad puesto que distintas sustancias de interés biológico, tales como aminoácidos, ácidos grasos, etc., que poseen una gran porción de su molécula hidrofóbica tienen también una fracción hidrofílica, es decir se trata de sustancias *amfifílicas*, y, en consecuencia, un único parámetro sólo podrá describir pobremente su carácter.

Existen numerosas formas de calcular una escala de hidrofobicidad; cada metodología nos da diferente valor absoluto pero, en general la ubicación relativa de una serie de compuestos se conserva en las diferentes escalas. La Tabla 1 muestra una escala construída con los valores publicados se aceptación general.

La construcción de la escala puede hacerse en forma experimental, de acuerdo a alguna definición operacional adecuada. Otro punto de vista es el de establecer criterios a nivel atómico que permitan no solamente construir la escala sino además obtener alguna información del comportamiento de los compuestos a nivel microscópico que permitan la *predicción de propiedades*.

Eisenberg *et al.*<sup>2</sup> han propuesto la descripción de la interacción agua-soluto a través de un *parámetro de solvatación atómica (PSA)*. Este parámetro resulta de utilidad para cuantificar la porción de una molécula dada accesible al agua.

La idea básica es que la energía libre de interacción de un soluto con el agua puede ser considerada como la suma de las energías de los grupos atómicos. El área superficial accesible al solvente se define como el

residuo	escala
Ile	0,73
Phe	0,61
Val	0,54
Leu	0,53
Trp	0,37
Met	0,26
Ala	0,25
Gly	0,16
Cys	0,04
Tyr	0,02
Pro	-0,07
Thr	-0,18
Ser	-0,26
His	-0,40
Glu	-0,62
Asn	-0,64
Gln	-0,69
Asp	-0,72
Lys	-1,1
Arg	-1,8

Tabla 1. Escala de Hidrofobicidad para aminoácidos. Los valores corresponden a la escala "de consenso" de la referencia 7. Los residuos están ordenados en escala decreciente de hidrofobicidad y las magnitudes constituyen aproximadamente el valor necesario (en kcal.mol<sup>-1</sup>) para la transferencia desde una fase hidrofóbica a una hidrofílica.

área sobre la cual el centro de una molécula de agua (de un radio de 0,14 nm) puede moverse manteniendo contacto con el grupo. La evaluación del PSA requiere el cálculo del área superficial de acceso y la estimación de la energía libre de transferencia. El primer requerimiento se cumple pesando el efecto de cada átomo de acuerdo con su carácter polar y apolar y el segundo calculando las energías de solvatación mediante las coordenadas de los átomos individuales.

Hasta el momento la descripción puede parecer confusa, pero es posible aclararla mediante la figura en la cual se muestra un

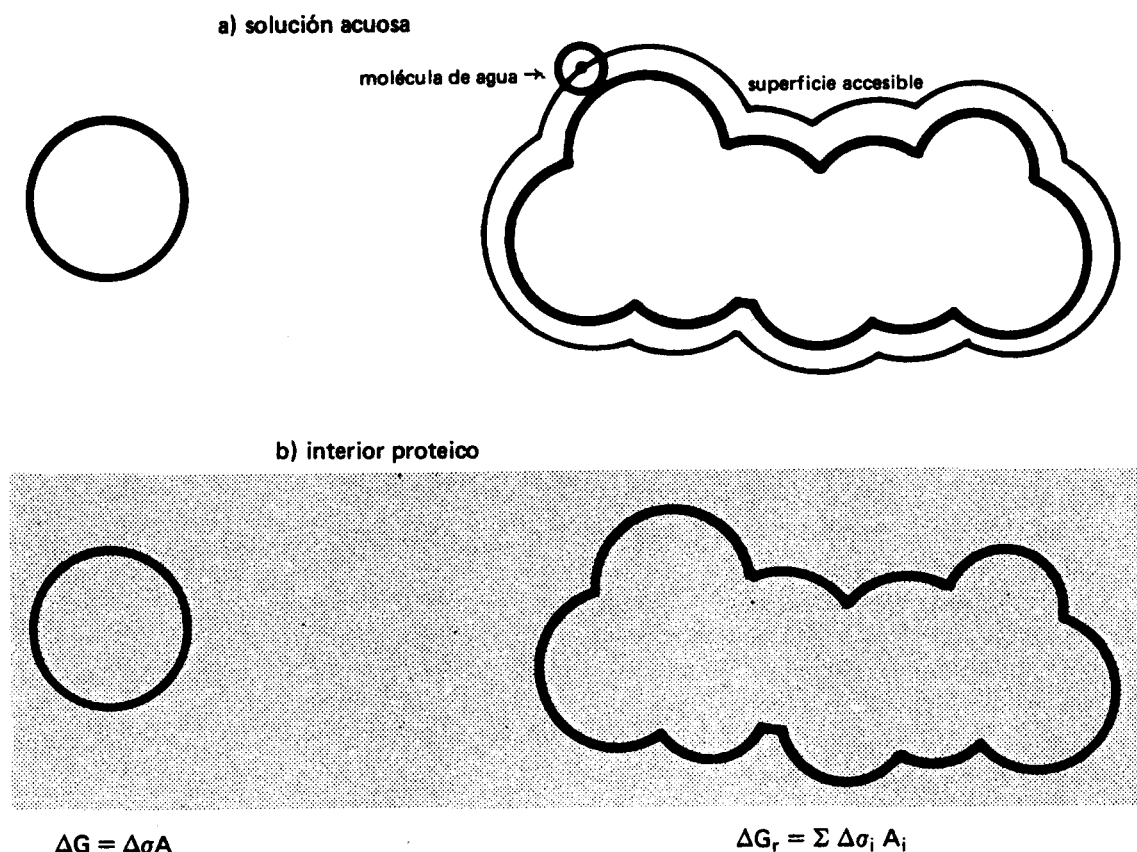


Figura 1. Esquema demostrativo de las ideas utilizadas para el cálculo de la energía libre de interacción de un soluto con agua. En el esquema de la izquierda se transfiere un átomo simple al seno del líquido. El esquema de la derecha muestra una molécula compleja. El área superficial total no es igual a la suma de las áreas superficiales de cada átomo debido al oscurecimiento parcial por la presencia de vecinos y debe considerarse la contribución individual de cada uno de ellos corregida por la configuración molecular. Se muestra el concepto de área superficial expuesta considerando la molécula de agua como esférica.

esquema de transferencia de un átomo  $i$  desde una solución acuosa al interior de una proteína. Suponiendo que el área superficial está dada por  $A_i$  y el parámetro de solvatación atómico por  $\Delta\sigma$ , la energía libre de transferencia será:

$$\Delta G_i = \Delta\sigma_i A_i \quad (1)$$

Consideremos ahora una molécula (por ejemplo un aminoácido) que se introduce en una proteína (Fig. 1, b). El cambio de energía libre del proceso se supone aproximadamente igual a la suma de todas las

contribuciones individuales; en consecuencia podemos escribir:

$$\Delta G_R = \sum_{i=1}^N \Delta\sigma_i A_i \quad (2)$$

Podemos ver que el área expuesta de la superficie  $A_i$  depende de la configuración molecular e incluso en algunos casos puede estar totalmente oscurecida por sus vecinos (ver Fig. 1). La validez de la ecuación (2) dependerá de cómo se calculan las áreas. Puesto que el método fue desarrollado particularmente para aminoácidos puede-

Aminoácido	$\Delta G_{obs}^*$	$\Delta G_R$	$\Delta G_{tr}^{**}$	$\mu_d$	$cos\theta$
Gly	(0)	(0)	(0)	(0)	—
Ala	0,42	0,67	0,50	0	—
Val	1,66	1,5	1,50	0,48	0,84
Leu	2,32	1,9	1,80	1,0	0,89
Ile	2,46	1,9	—	1,2	0,99
Pro	0,98	1,2	—	0,18	0,22
Cys (half)	1,34	0,38	—	0,17	0,76
Met	1,68	2,4	1,30	1,9	0,94
Thr	0,35	0,52	0,40	1,5	0,09
Ser	-0,05	0,01	-0,30	0,73	-0,67
Phe	2,44	2,3	2,50	1,1	0,92
Trp	3,07	2,6	3,40	1,6	0,67
Tyr	1,31	1,6	2,30	1,8	-0,93
Asn	-0,82	-0,60	—	1,3	-0,86
Gln	-0,30	0,22	—	1,9	-1,0
Asp	-1,05	-1,2	—	1,9	-0,98
Glu	-0,87	-0,76	—	3,0	-0,89
His	0,18	0,64	0,50	0,99	-0,75
Lys	-1,35	-0,57	—	5,7	-0,99
Arg	-1,37	-2,1	—	10,0	-0,96

Grupo	$\Delta G_{obs}^{***}$	$\Delta G_R$
-CH <sub>2</sub> -	0,67	0,56
-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	1,90	1,6
-OH	-0,76	-0,66
-CH <sub>2</sub> -CONH-	-1,14	0,66

Tabla 2. Energías libres de solvatación (en kcal.mol<sup>-1</sup>) de aminoácidos y grupos y momentos dipolares hidrofóbicos (en kcal.mol<sup>-1</sup> A), (según referencia 7).

\* Fauchere & Pliska (1983) *Eur. J. med. Chem-Chim. ther.* 18: 369

\*\* Nozaki & Tanford (1971) *J. biol. Chem.* 246: 2211

\*\*\* Cohn & Edsall (1943) en *Protein, Amino Acids and Peptides as Ions and Dipolar Ions*, Cap. 9 (ACS Monograph Series, Reinhold, New York)

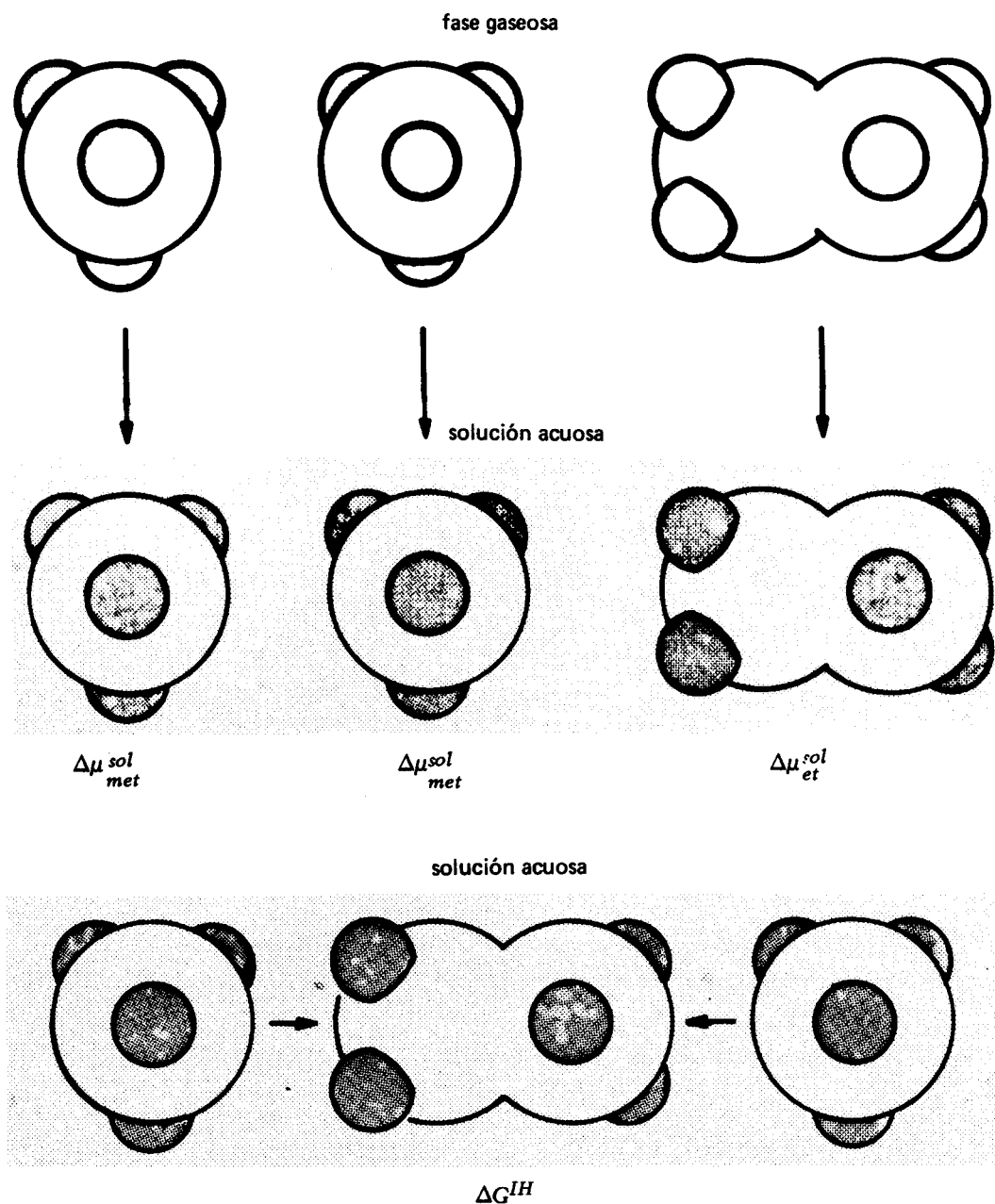


Figura 2. Cálculo de la interacción hidrofóbica de dos moléculas de metano mediante conocimiento del potencial químico de solubilidad del etano y metano. En la parte superior se esquematiza la transferencia de dos moléculas de metano y una de etano de la fase vapor a solución acuosa. En la parte inferior de la figura se representa la asociación de dos moléculas de metano. La diferencia entre el potencial químico de transferencia de etano y el de transferencia de dos moléculas de metano debe diferir esencialmente en la contribución debida a la diferencia de áreas y resultaría ser aproximadamente igual a la energía libre de interacción dependiente del solvente de dos moléculas de metano.

mos esperar que la contribución individual de los átomos que aparecen en los diferentes aminoácidos tendrán aproximadamente la misma contribución en cualesquiera de ellos. Este parece ser el caso y utilizando las áreas de acceso para C, N/O (todos los átomos de nitrógeno y oxígeno no cargados), O<sup>-</sup>, N<sup>+</sup> y S, se obtiene una buena estimación de los datos experimentales, en la medida con que se cuente con valores adecuados del parámetro de solvatación atómica Δ, tal como lo podemos ver en la Tabla 2.

### Evaluación de la interacción hidrofóbica mediante modelos

Una propuesta interesante, aunque controvertida, es la efectuada por Ben Naim<sup>3</sup>, quien, a manera de ejemplo, considera la evaluación de la interacción hidrofóbica entre dos moléculas de metano utilizando como fuente de información la energía libre de transferencia de metano y etano desde la fase gaseosa a una solución acuosa. Las ideas básicas del método se ilustran en la Figura 2.

De la ecuación (4) de la parte 1 ( $\mu_{hc} = \mu^0_{hc} + RT \ln x_{hc}$ ) sabemos que  $\Delta\mu_0$  representa la parte del potencial químico de transferencia dependiente del solvente. Si aceptamos que una molécula de etano está formada por dos de metano en contacto ( $r = 0,154 \text{ nm} = 1,54 \text{ \AA}$ ) podemos estimar la energía libre de interacción hidrofóbica (es decir sólo la parte dependiente del solvente) como

$$\delta G^{ih} \approx \Delta\mu_{et} - 2\Delta\mu_{met} \quad (3)$$

Utilizando este enfoque, Ben Naim<sup>3</sup> ha calculado la energía libre de interacción solvofóbica de dos moléculas de metano en diferentes solventes en función de la temperatura (Figura 3).

Es posible ver en la Figura 2 que el agua muestra una característica distintiva frente al resto de los solventes, en la intensidad de

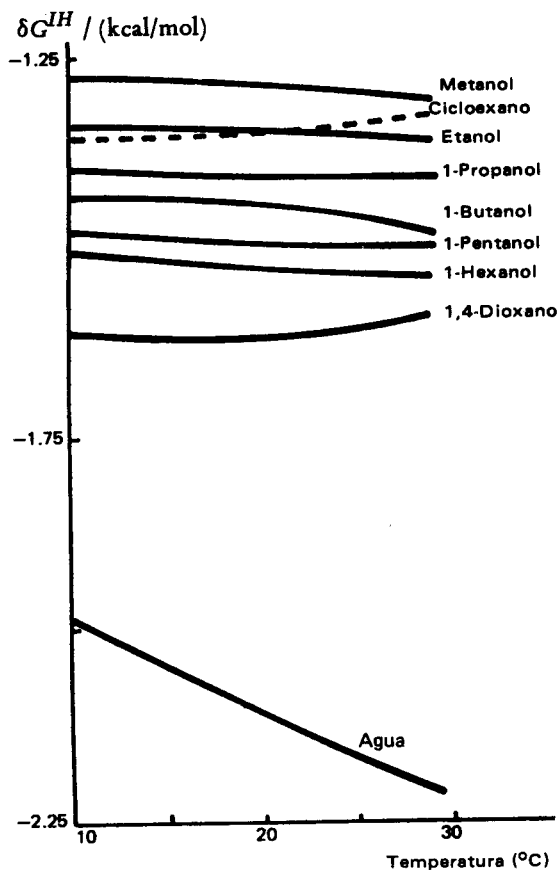


Figura 3. Dependencia con la temperatura de la interacción dependiente del solvente de asociación de metano en diferentes solventes. Los cálculos se efectuaron considerando que tal valor es igual a la diferencia entre el potencial químico de transferencia gas-solución de una molécula de etano y dos de metano. Se destaca el comportamiento del agua tanto en su valor como en su dependencia con la temperatura.

la interacción solvofóbica como en la dependencia con la temperatura. Estos cálculos no pueden considerarse con un valor cuantitativo y, pese a ser muy útiles, sólo poseen el interés de mostrar la tendencia general del fenómeno.

### La energía libre de transferencia

Para evaluar la energía libre de transferencia existen métodos teóricos que combinados con las técnicas de simulación pue-

den dar una muy buena estimación de los valores: se trata de la teoría de la *partícula redimensionada* ('scale particle theory'). No es nuestra intención desarrollar en detalle la teoría, pero sí mostrar los principios generales en forma muy simple.

La energía libre estándar necesaria para transferir un mol de sustancia desde la fase de gas ideal, a presión estándar  $p$  y temperatura  $T$ , a una solución de dilución infinita a la misma presión y temperatura puede expresarse como:

$$\Delta G = \Delta G_c + \Delta G_i + RT \ln(RT/pV) \quad (4)$$

donde  $\Delta G_c$  es el trabajo reversible necesario para crear una cavidad de un cierto radio en una posición fija en el seno del líquido y  $\Delta G_i$  es el trabajo reversible necesario para incorporar a la cavidad la interacción de la partícula con el solvente. La designación de la teoría como de 'la partícula redimensionada' se debe a que el proceso se realiza haciendo 'crecer' (redimensionando) la partícula que originalmente posee radio cero e interacción nula.

Vemos que la expresión (4) muestra en forma separada la contribución de la formación de la cavidad y la interacción del soluto con el solvente. Suponiendo que intentamos calcular la interacción hidrofóbica de un proceso como el indicado en la Figura 2 podemos calcular la energía libre de transferencia de las moléculas individuales y luego la correspondiente al complejo. Podemos así evaluar precisamente la interacción soluto-soluto producida por la presencia del solvente. Este procedimiento se muestra esquematizado en la Figura 4.

El método descrito puede ser llevado a cabo analíticamente sólo para sistemas muy simples tales como esferas rígidas. Es evidente que estamos interesados en sistemas más cercanos a la realidad y es entonces donde la simulación mediante computadoras puede ser un valioso auxiliar. El cálculo

de la energía libre se efectúa, tal como dijimos, mediante el lento aumento del tamaño de la cavidad y de la interacción. Es posible efectuar el procedimiento mediante la simulación por dinámica molecular, donde se sigue el comportamiento dinámico un número considerable de moléculas de solvente en tanto se incorpora la cavidad y su interacción. Este método puede resultar en el futuro de primordial importancia para la predicción de propiedades moleculares en solución, tales como la solubilidad.

### *Coefficientes de partición y su interpretación en términos de la interacción hidrofóbica*

En términos simples, el coeficiente de partición es la razón entre la concentración de una especie molecular en dos fases en equilibrio. Los coeficientes de partición han sido utilizados para el estudio de fuerzas intermoleculares en compuestos orgánicos. El conocimiento y medida de la interacción hidrofóbica puede beneficiarse con tales estudios, por lo que revisaremos brevemente la posible relación entre coeficientes de partición e interacción hidrofóbica.

Suponiendo que dos soluciones de solventes  $o$  y  $a$  y un soluto común se encuentran en equilibrio tenemos:

$$\mu_o + RT \ln x_o = \mu_a + RT \ln x_a \quad (5)$$

donde  $x_o$  y  $x_a$  son las fracciones molares del componente  $i$  en los solventes  $o$  y  $a$  respectivamente; en consecuencia será:

$$\Delta \mu = RT \ln(x_o/x_a) \quad (6)$$

La razón

$$P' = x_o/x_a \quad (7)$$

puede designarse como el *coeficiente de partición termodinámico*, para distinguirlo del coeficiente de partición *experimental*

$$P = c_o/c_a \quad (8)$$



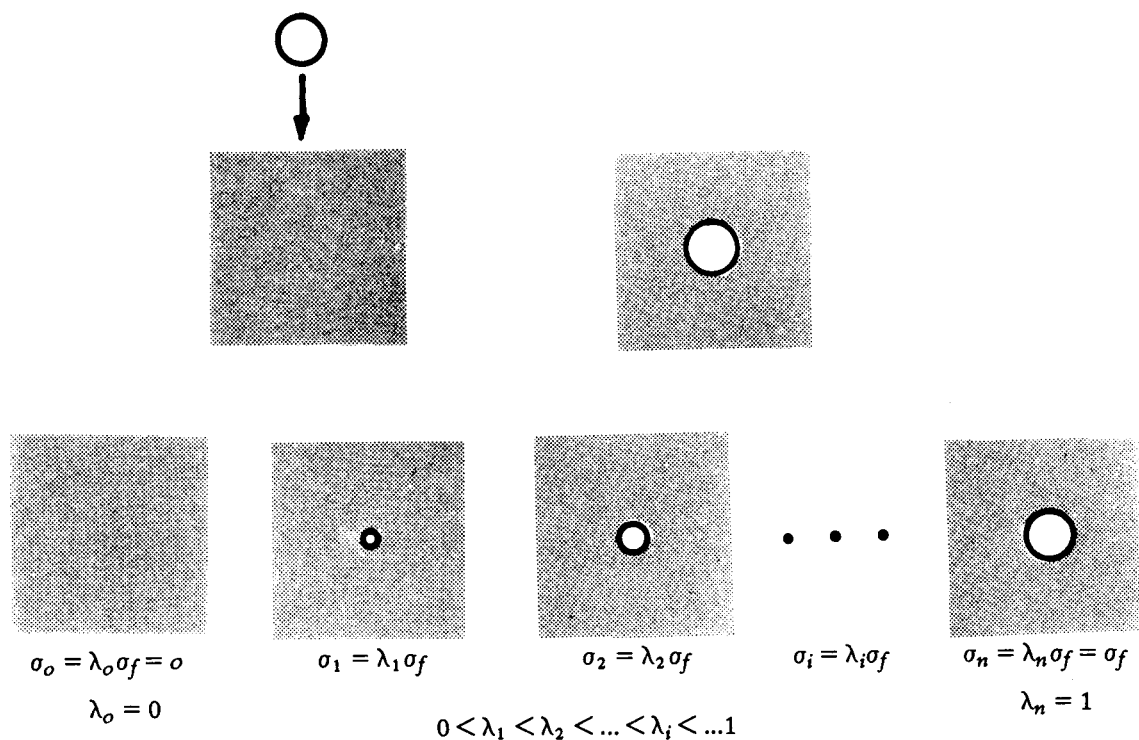


Figura 4. Cálculo de la energía de solvatación considerando el proceso como una perturbación gradual del solvente. En la parte superior de la figura se representa la transferencia directa de un soluto de diámetro  $\sigma$  de la fase vapor a la solución mientras que en la parte inferior se muestra el "crecimiento" de la partícula en el interior. La teoría de la partícula redimensionada hace uso de este último proceso. Vemos que la partícula crece según el parámetro  $\lambda$ , el que se hace variar lentamente. De la misma manera se puede incorporar, posteriormente, una interacción atractiva.

en donde las concentraciones  $c$  no se expresan como fracciones molares sino en moles por litro. Claramente, la diferencia entre ambos coeficientes debe ser cuidadosamente establecida. Podemos escribir:

$$\Delta\mu = RT \ln P' \quad (9)$$

en tanto que utilizando  $P$  será:

$$\Delta\mu = RT \ln P + \ln(V_o/V_a) \quad (10)$$

$V_o$  y  $V_a$  son los volúmenes molares en los solventes  $o$  y  $a$  respectivamente.

Obviamente  $P$  y  $P'$  están relacionados con la energía libre de transferencia de una fase a la otra y, por lo tanto, podemos hacer uso de este resultado ventajosamente.

Los valores citados generalmente en la literatura son el logaritmo decimal del coeficiente de partición experimental ( $\log P$ ), existiendo extensas tablas con tales valores<sup>4</sup>. Lamentablemente los volúmenes molares necesarios para obtener el coeficiente de partición termodinámico, generalmente no se incluyen en dichas tablas.

Si se considera el coeficiente de partición de una sustancia dada entre agua y un solvente orgánico se puede obtener información sobre la hidrofobicidad de una sustancia. Para una colección de sustancias utilizando como referencia la misma sustancia orgánica será posible obtener una escala de hidrofobicidad. La escala que se puede ob-

Atomo o grupo	valor	
<i>Hidrocarbonados</i>		
CH <sub>3</sub>		0,70
CH <sub>2</sub>		0,53
CH (saturado)		0,24
CH (no saturado)		0,36
C (saturado)		0,14
C (no saturado)		0,16
C (no saturado compartido por dos anillos aromáticos)		0,30
CH=CH <sub>2</sub>		0,93
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>		1,90
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>		1,73
C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>		1,48
C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N		1,22
<i>No-hidrocarbonados</i>		
	<i>Alifáticos</i>	<i>Aromáticos</i>
F	-0,41	0,43
Cl	0,06	0,93
Br	0,24	1,17
I	0,59	1,46
S	-0,51	0,14
SH	0,00	0,62
O	-1,54	-0,46
OH	-1,44	-0,37
OCH <sub>3</sub>	-0,83	0,24

Tabla 3. Valores de  $f$  según Nys y Rekker<sup>5</sup> para algunos átomos y grupos.

tener mediante este procedimiento será, en general, diferente de la que se obtendrá mediante otro enfoque.

La mayoría de los coeficientes de partición publicados se refieren al sistema octano-agua y el mismo se ha convertido en la referencia estándar para correlacionar datos de interés biológico. Puesto que el conocimiento del coeficiente de partición es de importancia en diferentes campos, particularmente en el diseño de drogas, es útil poseer un método que permita calcular el mismo para una sustancia arbitraria. Se han propuesto fórmulas semi-empíricas para expresar el coeficiente de partición de un compuesto en términos de sus componen-

tes. Una de esas propuestas<sup>5</sup> está basada en el análisis estadístico de un gran número de compuestos, definiendo un coeficiente  $f$  tal que:

$$\log P = \sum_{i=1}^N a_i + \sum_{j=1}^N b_j c_{jM} \quad (11)$$

donde  $a_i$  es el factor de incidencia del fragmento  $i$  y  $b_j$  es el número de término de corrección. Los valores de  $f$  (la *constante hidrofóbica de fragmento*) para algunos átomos y grupos comunes se muestra en la Tabla 3, en tanto que el producto  $b_j c_{jM}$  ( $c_{jM}$  es la "constante mágica" = 0,289) que tiene en cuenta el factor de corrección, se muestra, para algunos casos, en la Tabla 4.

Efectos de proximidad de grupos polares	
Separación de 1 C	0,867
Separación de 2 C	0,578
H en grupos polares	0,289
conjugación cruzada	0,289
conjugación aril-aril	0,289
condensación de unidad aromática	0,289

Tabla 4. Algunos factores de corrección en el sistema de Rekker (de Ref. 11).

El método de fragmentos es muy útil para la predicción de coeficientes de partición y es ampliamente utilizado en el diseño de drogas, para lo cual las propiedades de un nuevo compuesto debe, de ser posible, conocerse *a priori*. La aplicación a casos prácticos requiere cierta habilidad. Existen programas y bancos de datos a tal efecto <sup>6</sup>. Un ejemplo simple puede ser ilustrativo. Consideremos el *L*-sorbitol (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>): la aplicación del método requiere considerar los términos indicados en la Tabla 5.

2f <sub>CH<sub>2</sub></sub>	=	2(0,519)	=	1,038
4f <sub>CH</sub>	=	4(0,337)	=	1,348
6f <sub>OH</sub>	=	6(-1,47)	=	-8,820
5 x 2c <sub>M</sub>	=	10(0,289)	=	2,890
		logP		-3,544

Tabla 5. Cálculo de logP de *L*-sorbitol por el método de fragmentos.

El término de corrección se refiere al efecto de proximidad del grupo polar (una separación de dos carbonos, Tabla 4). Se han considerado cinco de estos términos. El presente ejemplo sirve para destacar las dificultades del método, ya que por ejemplo el manitol daría el mismo resultado, por tratarse de un esteroisómetro que difiere sólo en la posición de un oxidrilo, a menos que se introduzca un nuevo factor de corrección. Experimentalmente sabemos que el sorbitol es mucho más soluble en agua que el manitol.

Es de primordial importancia la consideración del pH y el estado de ionización de los compuestos. En los casos que la carga neta del compuesto depende del pH la aplicación del método en los diferentes casos puede dar lugar a serios errores si no se tiene en cuenta tal dependencia.

A manera de ejemplo consideremos un ácido débil, para el cual la concentración relativa de cada especie está dada por la ecuación de Henderson-Hasselbach.

$$pH - pK_a = \log[A^-]/[HA] \quad (12)$$

Así como un ácido libre y su anion tienen diferente solubilidad, también tienen diferente coeficiente de partición. El coeficiente de partición aparente estará compuesto por la contribución de cada componente, de tal manera que el resultado final dependerá de la fracción *f* de cada uno de ellos y de su propio coeficiente de partición. Esto se puede expresar como:

$$PC_{obs} = f_A - PC_{A^-} + f_{AH}PC_{AH} \quad (13)$$

Si se considera, como es habitual, que PC<sub>A<sup>-</sup></sub> es despreciable frente al resto y teniendo en cuenta la ecuación (12) tenemos:

$$PC_{obs} = f_{AH}PC_{AH} = (1 - H/K)PC_{AH} \quad (14)$$

La ecuación (14) nos indica que el coeficiente de partición dependerá linealmente del cociente *H/K*. Es decir que para altas concentraciones de iones hidrógeno (bajo pH) tendremos coeficientes mayores que a baja concentración (alto pH). Este aspecto debe tenerse en cuenta cuando se utiliza el criterio de fragmentos.

#### Medición de hidrofobicidad en proteínas

La hidrofobicidad de una proteína puede considerarse tanto desde el punto de vista de la hidrofobicidad de sus componentes —los aminoácidos que la componen— como de la hidrofobicidad de su superficie, es decir la hidrofobicidad de la molécula protei-

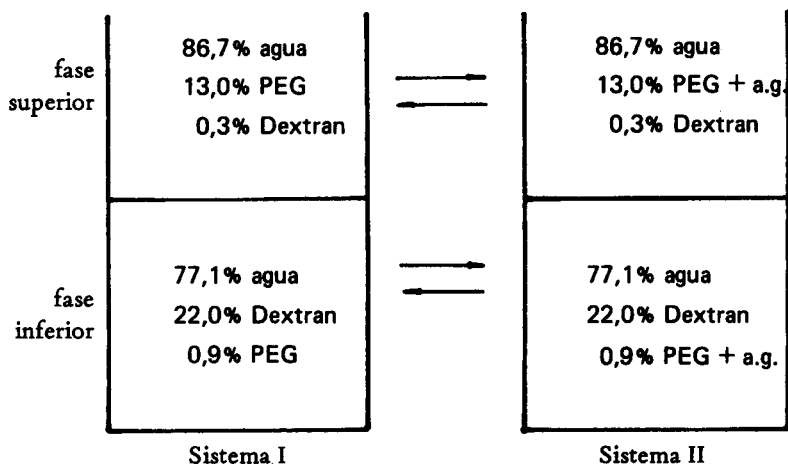
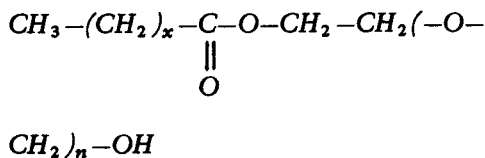


Figura 5. Esquema de los dos sistemas utilizados para la medición de la hidrofobicidad de proteínas.

ca en su estructura nativa. El primer punto de vista es importante en cuanto a la conformación final de la proteína en solución, punto que consideraremos más adelante. El segundo, que resulta de mayor interés en cuanto a la interacción de la molécula con el resto de los componentes del medio en que se encuentre, posee un considerable interés práctico. Experimentalmente <sup>7</sup> se ha considerado mediante estudios de partición entre dos fases acuosas, cada una de ellas con diferente composición. La Figura 5 muestra un esquema que representa los dos sistemas utilizados para la medida. Ambos sistemas contienen agua, dextranos y polietilenglicol (PEG) y forman dos fases. En el sistema, que llamaremos II, parte del PEG se reemplaza por un éster de un ácido graso del mismo. La composición del resto del sistema no cambia. La fórmula estructural del mencionado compuesto es



El valor de  $x$  determina la longitud —hidrofobicidad— del ácido graso en tanto que  $\bar{n} = 135$ . Una proteína dada se repartirá en forma diferente en cada fase para los sistemas I y II. Es posible cambiar al éster a efectos de observar las variaciones en presencia de un medio de mayor o menor hidrofobicidad, sin embargo la idea desarrollada durante los experimentos fue la de utilizar un único éster (palmitato) y comparar diferentes proteínas.

Supongamos que  $S$  representa la proteína a estudiar, la que se distribuye entre las dos fases. En el sistema I tendremos para la energía libre de transferencia:

$$\Delta G_{tr}^I(u \rightarrow l) = -RT \ln(\rho_S^{I,l} / \rho_S^{I,u})_{eq} \quad (15)$$

donde  $\rho_S^{I,l}$  y  $\rho_S^{I,u}$  son las concentraciones de la proteína en la fase inferior ( $l$ ) y superior ( $u$ ) respectivamente. El subíndice  $eq$  indica equilibrio.

En forma similar tendremos para la fase II:

$$\Delta G_{tr}^{II}(u \rightarrow l) = -RT \ln(\rho_S^{II,u})_{eq} \quad (16)$$

Si se hace la suposición que la energía

libre de transferencia se puede dividir en dos contribuciones, la eléctrica y la hidrofóbica

$$\Delta G_{tr} = \Delta G_{el} + \Delta G_{hi} \quad (17)$$

y con la suposición adicional que en ambos medios la contribución eléctrica es igual, es decir

$$\Delta G_{el}^I = \Delta G_{el}^{II} \quad (18)$$

obtendremos

$$\Delta(\Delta G) = \Delta G_{tr}^I - \Delta G_{tr}^{II} \approx \Delta G_{hi}^I - \Delta G_{hi}^{II} \quad (19)$$

La ecuación (19) puede ser utilizada como una definición operacional de hidrofobicidad de proteínas. Se pueden hacer varias consideraciones respecto del sistema y sus condiciones, después de las cuales se arriba a que la diferencia de diferencias de energía libre, lo que se obtiene de la ecuación (19), puede ser escrita como:

$$\Delta(\Delta G) \approx (\mu_S^{II,u} - \mu_S^{I,u}) \quad (20)$$

Vemos que el valor de  $\Delta(\Delta G)$  puede ser obtenido a partir de las relaciones (15) y (16), las que provienen de datos experimentales.

Los resultados experimentales <sup>7</sup> muestran que, para las proteínas estudiadas, las diferencias son imperceptibles para longitudes de cadena del ácido graso de hasta aproximadamente ocho carbonos. A partir de ese número el resultado es independiente de la longitud de cadena y se obtuvo en orden de hidrofobicidad: albúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, CO-hemoglobina y citocromo c.

Esta hidrofobicidad (superficial) relativa está de acuerdo con lo que se podría esperar de la función de cada una de las proteínas bajo estudio. El resultado no significa que el citocromo c no posea residuos hidrofóbicos, sino que éstos se encuentran en el interior.

Es importante destacar que esta metodología provee información directa de la hi-

drofobicidad en la superficie proteica pero el aporte a la dilucidación de la estructura a partir de la secuencia es escaso. En muchas ocasiones se plantean aparentes discrepancias originadas en una falta de clarificación entre hidrofobicidad superficial y contenido de aminoácidos hidrofóbicos. Para moléculas pequeñas esta alternativa, en general, no se plantea. La excepción son las moléculas de cadena larga que puedan plegarse, disminuyendo así su carácter hidrofóbico externo. En el ejemplo anterior, la longitud máxima de cadena estudiada del ligando alifático del PEG fue de 18 carbonos. Una longitud mucho mayor podría resultar en una disminución de su efecto.

#### *Balance hidrofílico-lipofílico (HLB)*

Puesto que el coeficiente de partición se refiere al equilibrio del soluto entre una fase orgánica y otra acuosa, es evidente que estará relacionada con el carácter anfifílico de la sustancia. En términos generales depende de la totalidad de las interacciones del soluto con ambos solventes y, evidentemente, relacionado solamente con la hidrofobicidad es una sobresimplificación. El cambio de coeficiente de partición entre una serie de solventes —ninguno de ellos orgánico— es la base del método de fraccionamiento de proteínas por contracorriente, que tanta importancia tuvo en las etapas tempranas de la investigación de proteínas.

Como ya mencionamos, la interacción hidrofóbica tiene gran importancia en sustancias sólo parcialmente hidrofóbicas. Como simplificación podríamos suponer que una sustancia posee una fracción puramente hidrofóbica y otra puramente hidrofílica. El balance entre una y otra parte determinará su solubilidad en agua así como numerosas propiedades en detergencia y en el poder emulsificante. Estas ideas dan fundamento al llamado *balance hidrofílico-lipofí-*

lico (HLB), el cual fue establecido con bases puramente empíricas<sup>8</sup>, resultando de suma utilidad en la tecnología de emulsiones. Es evidente que debe existir una relación entre el HLB y el coeficiente de partición, aún cuando puede ser difícil de establecer rigurosamente. Se ha sugerido<sup>9</sup> que ambos parámetros se relacionan mediante:

$$HLB - 7 = 0,36 \ln(1/P) \quad (21)$$

Esta relación no tiene un sólido fundamento teórico, pese a lo cual puede ser utilizada como referencia.

#### CONTRIBUCION DE LA SOLVATACION AL PLEGAMIENTO DE PROTEINAS

La solvatación, o la exclusión de la misma debido a la hidrofobicidad, son sin duda factores importantes en el plegamiento de las proteínas en solución. Su evaluación cuantitativa no es simple, sobre todo desde el punto de vista de la predicción. Veremos a continuación algunos de los enfoques que se han intentado, siempre en torno a la importancia de la interacción hidrofóbica que nos ocupa en este trabajo.

Siguiendo los argumentos de la sección "Parámetro de solvatación atómica" y contando con valores de  $\Delta\sigma$  es posible evaluar la contribución de la solvatación a la energía libre de plegamiento de proteínas. Suponiendo que podemos evaluar el área accesible al solvente de un estado de referencia y en el estado plegado, la contribución de la energía libre de plegamiento puede escribirse como:

$$\Delta G_R = \sum_{i=1}^N \Delta\sigma_i (A_i - A_i') \quad (22)$$

donde  $A_i$  es el área accesible al solvente del átomo  $i$  en el estado plegado y  $A_i'$  es la correspondiente al estado de referencia. Cuando se comparan diferentes conformaciones el estado particular de referencia no es im-

portante, en tanto sea el mismo en todos los casos.

Estas expresiones nos permiten comparar estados de una misma macromolécula en diferentes condiciones. Con respecto a la conformación nativa —en solución acuosa— el principal objetivo es poder predecir la conformación a partir de la secuencia de aminoácidos. ¿Cómo puede ser evaluada la contribución del carácter hidrofóbico de cada residuo? Una propuesta es la consideración de los *momentos hidrofóbicos*.

#### Los momentos hidrofóbicos

Utilizando la analogía con los multipolos eléctricos, Eisenberg *et al.*<sup>2</sup> definen los momentos hidrofóbicos. El momento de orden cero (el análogo a la carga eléctrica) se define como la suma de la hidrofobicidad de los grupos que componen la proteína (la suma de la hidrofobicidad de los aminoácidos y grupos prostéticos). El primer momento (el análogo al momento dipolar) llamado momento dipolar hidrofóbico, mide el carácter anfifílico de la estructura. Así como el momento dipolar describe la asimetría de cargas en una estructura dada, el momento hidrofóbico describe la asimetría entre los grupos polares y no polares. Similarmente pueden definirse momentos hidrofóbicos de mayor orden (cuadrupolos, octupolos, etc.).

El dipolo eléctrico se representa como un vector que apunta a la carga positiva. El momento hidrofóbico se representa como un vector que apunta al extremo hidrofóbico del grupo considerado y se define como:

$$\mu_h = \sum_{i=1}^N H_i r_i - \langle H_i \rangle \sum r_i \quad (23)$$

donde  $r_i$  es un vector desde cualquier origen al centro del  $i$ ésimo grupo y  $H_i$  es la hidrofobicidad del  $i$ ésimo grupo. El segundo término asegura la independencia del

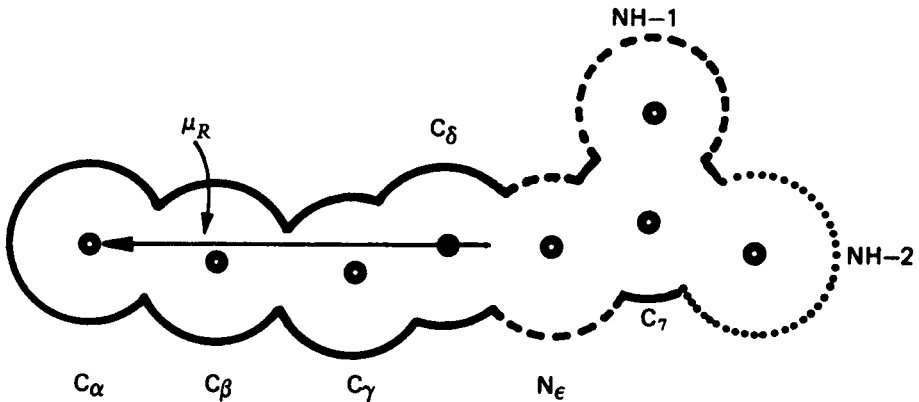


Figura 6. Momento hidrofóbico de la arginina. Vemos que la punta del vector apunta hacia la región más hidrofóbica de la molécula.

origen. Una representación gráfica de lo expuesto se muestra en la Figura 6 para arginina.

Para una macromolécula completa, el momento hidrofóbico será igual a la suma vectorial de los momentos hidrofóbicos individuales de sus componentes. Una proteína con un gran momento hidrofóbico tendrá un extremo predominantemente hidrofóbico y un extremo predominantemente hidrofílico. Una proteína globular soluble en agua tendrá dipolos hidrofóbicos apuntando predominantemente al interior de la misma, la suma vectorial de los mismos tenderá a un valor cercano a cero. Para una proteína de membrana integral (del interior de la membrana) también encontraremos un momento hidrofóbico cercano a cero, pero los vectores individuales apuntarán hacia la superficie.

Es evidente que para calcular momentos hidrofóbicos se requiere una escala de hidrofobicidad de los aminoácidos que componen la proteína en particular. Una escala que puede ser utilizada es la que mencionamos en la Tabla 1.

Otra forma de calcular hidrofobicidades es a partir del PSA ( $H_i = \Delta\sigma_i A_i$ ) y ésta es la forma en la que se han obtenido los dipolos

hidrofóbicos que se muestran en la Tabla 2 (obsérvense las columnas correspondientes a  $\mu_a$  y  $\cos\theta$ ). Se puede ver que mientras que la glicina (Gly) tiene momento dipolar cero (carente de anfifilicidad), cisteína (Cys) y aspártico (Asp) ambos tienen un valor no nulo igual a 1,9. Sin embargo si atendemos al ángulo que forma el dipolo con la línea que va desde el carbono  $\alpha$  al centro de la molécula (indicado como  $\cos\theta$  en la tabla) vemos que ambos dipolos se encuentran en direcciones opuestas.

#### INTERACCION PROTEINA LIGANDO

La acción de diferentes agentes en los medios biológicos dependen de la interacción con determinados receptores. Asimismo, el transporte de dichos agentes a través del torrente sanguíneo requiere una asociación temporaria con el vehículo lo suficientemente estable como para llegar a destino y lo suficientemente lábil como para ser liberado con facilidad frente al receptor. La asociación de carácter hidrofóbico es propicia para satisfacer las condiciones exigidas.

#### Hidrofobicidad general y específica

Una interacción como la hidrofóbica en la cual no existen enlaces parecería que

siempre será inespecífica, lo que significa que dos o más partículas cualesquiera con un cierto carácter hidrofóbico interactuarán entre sí más o menos arbitrariamente, en cuanto a sus sitios de unión. Esta aseveración puede, en general, considerarse como verdadera, aun cuando existen casos en los que se podría encontrar cierta especificidad. Este es el caso de pequeños ligandos a proteínas donde las (escasas) regiones hidrofóbicas de las mismas que se encuentran en la superficie resultan centros de interacción. Cuando existe una buena correlación entre las posiciones de regiones hidrofóbicas de ambos ligandos es de esperar que la interacción será preferida frente a aquellos casos en que esto no ocurre. Esta situación generaría un cierto grado de especificidad que, aunque débil, podría tener relevancia funcional.

El caso más estudiado de interacción de una proteína con pequeños ligandos es el de la albúmina. Nos detendremos brevemente sobre el particular en la siguiente sección.

#### FIJACION DE PEQUEÑOS LIGANDOS A PROTEINAS PLASMATICAS

Se ha destinado mucho del esfuerzo experimental en el estudio de la fijación de drogas —o modelos de drogas— a proteínas plasmáticas. Estos estudios, dirigidos a establecer qué tipo de fuerzas intervienen en la asociación, tienen evidentemente gran importancia práctica.

Desde un punto de vista práctico es importante conocer la concentración de una determinada droga en la sangre. Esta concentración no depende solamente de la solubilidad de la droga sino también de la habilidad de la misma para fijarse a las proteínas plasmáticas. Si es posible conocer las fuerzas que intervienen en la fijación, será más probable que se pueda mejorar el dise-

ño de nuevas drogas y aumentar la eficiencia terapéutica.

Los estudios de Davis <sup>10</sup> referentes a la distribución de varias sulfamidas en los líquidos del cuerpo, indicaron que existe una relación entre la eficiencia terapéutica de la droga y la constante de asociación de las proteínas. Otros estudios en la misma línea también tuvieron valor indicativo pero en general carecían de rigor desde el punto de vista fisicoquímico. La necesidad del rigor no debe basarse en un criterio académico purista sino en que sólo trabajando en condiciones bien controladas es posible obtener información precisa, que luego se podrá generalizar a otras situaciones.

La medición de la fijación de naranja de metilo y azosulfatiazol a albúmina de suero bovino fue hecha por Klotz y colaboradores <sup>11</sup> en condiciones controladas. El análisis de los resultados se hizo mediante la isoterma de adsorción de Laugmuir. Esta isoterma se puede escribir como:

$$\frac{1}{\rho_l} = \frac{1}{MK\rho_s} + \frac{1}{M} \quad (24)$$

donde  $\rho_l$  y  $\rho_s$  son las concentraciones del ligando fijo y en solución,  $M$  el número de sitios de unión y  $K$  la constante de asociación. En esta forma la ecuación resulta muy práctica en cuanto es posible graficar  $1/\rho_l$  versus  $1/\rho_s$  y obtener  $M$  de la intersección de la curva y  $K$  de su pendiente.

Es evidente que la isoterma de Laugmuir es un caso extremadamente simple. Para tomar en cuenta los apartamientos entre el comportamiento real y la isoterma de Langmuir se han propuesto diferentes soluciones. La más común es considerar la isoterma real como una suma de isotermas de Langmuir. La isoterma de Langmuir, pese a que fue derivada en base a conceptos cinéticos (y no de equilibrio) y para la adsorción de gases sobre sólidos, ha encontrado una



aceptación amplia, aun en casos como el que consideramos. No obstante las limitaciones en las suposiciones iniciales restringen su aplicación. Es evidente que una suma de isotermas de Langmuir, con dos constantes cada una, serán capaces de ajustar cualquier curva experimental. Sin embargo, una curva ajustada con cuatro, seis o más parámetros carece de credibilidad\*. Un enfoque más apropiado sería el uso de una isoterma que describa el proceso físico adecuadamente <sup>12</sup>.

Al margen de las dificultades, es claro que el trabajo con las isotermas puede ser importante. Tanto el número de sitios como la (o las) constantes de asociación resultan de mucho interés. Tendría que ser posible encontrar una relación entre  $K$  y los parámetros de hidrofobicidad de la droga estudiada. Aún no se ha podido dar una respuesta clara a este problema. Sin embargo, las mediciones de adsorción de ácidos grasos a albúmina sérica muestran que las constantes de interacción resultan más fuertes cuando aumenta la longitud de cadena <sup>14</sup>. Las mediciones de la unión de iones orgánicos a albúmina sérica <sup>13</sup> en función de la temperatura muestran una entropía de unión positiva. Estos hechos indican el origen predominantemente hidrofóbico de las interacciones que controlan el transporte de drogas en la sangre.

## CONCLUSION

En esta segunda parte hemos completado el somero análisis de alguno de los aspectos

\* Recordamos el comentario de Cauchy '...dadme tres parámetros ajustables y construiré un elefante. Con cuatro ¡lo haré caminar!

importantes de la interacción hidrofóbica que nos hemos impuesto. Asimismo desarrollamos algunas aplicaciones de tal concepto a la conformación proteica y a las interacciones de pequeños ligandos. La idea que con algunos parámetros experimentales se puede describir el carácter hidrofóbico de una sustancia tiene asidero. No obstante hemos visto que aún existen dificultades para establecer sin lugar a duda la relación entre la información experimental y el comportamiento microscópico.

La interacción hidrofóbica tiene un lugar en casi la totalidad de los sistemas biológicos. No es posible, por lo tanto, pretender cubrir *todas* las situaciones en las que la interacción hidrofóbica está presente. La evaluación de su importancia relativa, frente a otras características del sistema considerado, puede hacerse solamente con un conocimiento adecuado tanto del sistema como de la interacción hidrofóbica. El objetivo de esta serie de trabajos se habrá cumplido si la información suministrada resulta útil para poder evaluar esa importancia relativa en el sistema de trabajo del lector.

AGRADECIMIENTOS. El presente trabajo ha sido realizado con apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) (PID 3-056100/88). Las discusiones con el Lic. L. Bruno Blanch resultaron de suma utilidad para incorporar a este trabajo comentarios sobre aplicaciones que, de otro modo, hubieran estado ausentes. El autor es miembro de la Carrera del Investigador del CONICET.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Grigera, J.R. (1987) *Acta Farm. Bonaerense* 6: 183-94
2. a) Eisenberg, D. y D. Mc. Lachlan (1986) *Nature* 319: 199; b) Eisenberg, D., R.M. Weiss, C. Terwilliger y W. Wilcox (1982) *Faraday Symp. Chem. Soc.* 17: 109
3. Ben Naim, A. (1983) *Hydrophobic Interactions in Biological Systems en: Topics in Molecular Pharmacology*. Elsevier. Amsterdam
4. Leo, A., C. Hans y D. Elkins (1971) *Chem. Rev.* 17: 525
5. Nys, G.G. y R.F. Rekker (1973) *Eur. J. Med. Chem.* 8: 525
6. van de Waterbeemd, H. (1986) *Hydrophobicity of organic compounds*. Compudrug. Viena
7. Shanbhag, V.P. y C.G. Axelsson (1975) *Eur. J. Biochem.* 60: 17
8. Griffin, W.J. (1949) *Soc. Cosm. Chem.* 1: 311
9. Griffin, W.J. (1954) *Soc. Cosm. Chem.* 5: 249
10. Davis, B.D. (1946) *J. Clin. Inv.* 22: 753
11. Klotz, I.M., F.M. Walker y R.B. Pivan (1947) *J. Am. Chem. Soc.* 68: 1486
12. Grigera, J.R. y I.G. Mogilner (1980) *Indian Chem. Eng.* 22: 42
13. Klotz, I. y J.M. Urganhart M. (1949) *J. Am. Chem. Soc.* 71: 847
14. Boyer, P.D., G.A. Ballon y J.M. Luck (1947) *J. Biochem.* 167: 407