



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio de la estabilidad termodinámica de la proteína α - quimotripsinógeno en soluciones acuosas de electrolitos fuertes

Yuver Alejandro Beltrán Molina

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias. Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2021

Estudio de la estabilidad termodinámica de la proteína α - quimotripsinógeno en soluciones acuosas de electrolitos fuertes

Yuver Alejandro Beltrán Molina

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ciencias - Química

Directora:

Doctora, Carmen María Romero Isaza

Línea de Investigación:

Termodinámica de soluciones

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Termodinámica Clásica

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias. Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2021

*La preparación y la disciplina nos hacen ser
dueños de nuestro destino.*

Bill Paxton.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Nombre: Yuver Alejandro Beltrán Molina

Fecha 25/11/2021

Agradecimientos

A mis padres por haberme apoyado durante mi formación académica. A mi hermano mayor, sin su apoyo este proyecto no hubiese sido posible, hermano, amigo y modelo a seguir.

A mis hijos, Santiago y Maleja, a mi esposa Silvia, ellos fueron la razón de ser de todos estos años de esfuerzo, han sido y serán mi apoyo moral y mi fortaleza para afrontar los retos y dificultades de la vida.

A la profesora Carmen María Romero, por su ayuda invaluable, por sus correctivos durante mi formación en el doctorado, su apoyo fue clave para culminar este ciclo académico.

A la profesora Gloria Giraldo, y todas las personas que me brindaron su apoyo para realizar parte de esta investigación en la sede de Manizales

A Juan Sebastián Abella, quien me guió durante el tratamiento de datos y escritura de dos artículos asociados a este proyecto

Al profesor Miguel Ángel Montero, amigo que siempre me brindó un espacio para hablar y debatir sobre aspectos relacionados al diario vivir.

A mis compañeros, David Oviedo, Juan Carlos Sanabria, Ginna Trujillo, al profesor Julio Clavijo, gracias por estar a mi lado y poder contar con ustedes a lo largo de este proceso de formación.

Resumen

Estudio de la estabilidad termodinámica de la proteína α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de electrolitos fuertes

La estabilidad termodinámica del α -quimotripsinógeno A, a pH 2,00, 3,00, 3,50 y en soluciones acuosas de los electrolitos NaCl, KCl, NH_4NO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fue analizada por espectroscopía UV-Vis, calorimetría diferencial de barrido (DSC), tensión superficial y por medio de los parámetros de interacción preferencial determinados a partir de medidas de densidad. Los resultados obtenidos a partir de medidas de UV-Vis y DSC determinaron que el aumento en la estabilidad del α -quimotripsinógeno está relacionado con el aumento en la concentración de electrolito y con el aumento del pH. El efecto estabilizante que ejercen las sales sobre la estructura de la proteína aumenta en el siguiente orden: $\text{NaCl} < \text{NH}_4\text{NO}_3 < \text{KCl} < (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

A partir del estudio cinético de adsorción de la proteína en la interfase líquido/aire se determinó que este proceso se puede describir mediante un modelo de tres etapas y los valores obtenidos de la constante cinética k_1 indicaron que el paso que controla el proceso de adsorción es la penetración y adsorción de la proteína en la interfase y que este paso es dependiente de la naturaleza y la concentración de las sales.

Los resultados obtenidos para los parámetros de interacción preferencial indicaron que todos los electrolitos empleados en este estudio son excluidos de la superficie de la proteína y generan una hidratación preferencial que involucra un aumento en la estabilidad de la estructura nativa del α -quimotripsinógeno. Los resultados presentaron la misma tendencia que los obtenidos a partir de UV-Vis y DSC.

Palabras clave: (α -quimotripsinógeno, UV-Vis, DSC, tensión superficial, electrolitos, interacción preferencial).

Abstract

Study of the thermodynamic stability of the protein α -chymotrypsinogen in aqueous solutions of strong electrolytes

The thermodynamic stability of α -chymotrypsinogen A, at pH 2.00, 3.00, 3.50 and in aqueous solutions of the electrolytes NaCl, KCl, NH_4NO_3 , and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was analyzed by UV-Vis spectroscopy, differential scanning calorimetry (DSC), surface tension and through the preferential interaction parameters determined from density measurements. The results obtained from UV-Vis and DSC measurements determined that the increase in the stability of α -chymotrypsinogen is related to the increase in the electrolyte concentration as well as the increase in pH. The stabilizing effect of salts on protein structure increases in the following order: $\text{NaCl} < \text{NH}_4\text{NO}_3 < \text{KCl} < (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

From the kinetic study of protein adsorption at the liquid/air interface, it was determined that this process can be described by a three-stage model and the values obtained from the kinetic constant k_1 indicate that the step that controls the adsorption process is the protein penetration and adsorption at the interface and this step is dependent on the nature and concentration of the salts.

The results obtained for the preferential interaction parameters indicate that all the electrolytes used in this study were excluded from the surface of the protein and generated preferential hydration that involves an increase in the stability of the native structure of α -chymotrypsinogen. The results presented follow the same trend as those obtained from UV-Vis and DSC

Keywords: (α -chymotrypsinogen, UV-Vis, DSC, surface tension, electrolytes, preferential interaction).

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XV
Lista de símbolos y abreviaturas	XVII
Introducción	17
1. Aspectos teóricos	21
1.1 Estructura de proteínas	21
1.2 Interacciones implicadas en el plegamiento y estabilidad de las proteínas.....	23
1.2.1 Puentes disulfuro	23
1.2.2 Interacciones electrostáticas.....	24
1.2.3 Puentes de hidrógeno.....	24
1.2.4 Interacciones tipo van der Waals	25
1.2.5 Interacción hidrofóbica.....	26
1.3 Aspectos termodinámicos de la estabilidad de proteínas	27
1.4 Factores que afectan la estabilidad de las proteínas	30
1.4.1 Efecto de la temperatura en la estabilidad de proteínas.....	31
1.4.2 Efecto del pH sobre la estabilidad de proteínas	32
1.4.3 Efecto de la presión sobre la estabilidad de proteínas	33
1.4.4 Efecto del solvente sobre la estabilidad de proteínas	34
1.5 Determinación de los parámetros de desnaturalización.....	36
1.6 Parámetros de interacción preferencial	40
1.7 Tensión superficial y estabilidad de proteínas	45
1.8 Adsorción de proteínas en la interfase líquido-aire	46
1.9 Características del sistema estudiado	51
1.9.1 Soluciones acuosas de electrolitos	51
1.9.2 Proteína α -quimotripsinógeno A.....	56
2. Métodos experimentales	63
2.1 Reactivos y equipos	63
2.1.1 Reactivos.....	63
2.1.2 Equipos	63
2.1.3 Preparación de soluciones.....	64
2.2 Espectroscopía UV-Vis	65
2.3 Calorimetría diferencial de barrido DSC	65
2.4 Tensión superficial	66

2.5	Parámetros de interacción preferencial.....	67
2.5.1	Volumen parcial específico.....	67
2.5.2	Interacción preferencial.....	69
3.	Resultados y análisis.....	71
3.1	Estabilidad térmica del α -quimotripsinógeno A.....	71
3.1.1	Reversibilidad del proceso de desnaturalización de la proteína a diferentes valores de pH.....	71
3.1.2	Estudio de plegamiento del α -quimotripsinógeno A.....	73
3.1.3	Efecto de electrolitos sobre la estabilidad térmica del α -quimotripsinógeno A.....	76
3.1.4	Curvas de estabilidad del α -quimotripsinógeno A.....	82
3.2	Relación entre la tensión superficial de electrolitos y la estabilidad del α -quimotripsinógeno A.....	90
3.3	Adsorción del α -quimotripsinógeno A en la interfase aire-agua en agua y en soluciones acuosas de electrolitos.....	93
3.4	Parámetros de interacción preferencial.....	103
4.	Conclusiones y recomendaciones.....	119
4.1	Conclusiones.....	119
4.2	Recomendaciones.....	122
A.	Anexo: Desnaturalización térmica del α-quimotripsinógeno A en soluciones acuosas de electrolitos.....	125
B.	Anexo: Parámetros de interacción.....	141
C.	Anexo: Incertidumbres.....	147
	Bibliografía.....	151

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Representación general para el proceso de desnaturalización de una proteína.....	28
Figura 2. Proteína en estado nativo y diferentes estados desplegados estables o intermedarios.....	29
Figura 3. Representación general del comportamiento de la señal espectrofotométrica durante el proceso de desnaturalización de una proteína.....	39
Figura 4. Representación de la determinación de los parámetros de desnaturalización por calorimetría diferencial de barrido	39
Figura 5. Representación de las tres capas de hidratación de una proteína en solución acuosa.....	53
Figura 6. Serie de Hofmeister y descripción del efecto de los iones sobre la estabilidad de proteínas en función de sus características de hidratación	54
Figura 7. Gráfica de volcán para haluros de metales alcalinos.....	55
Figura 8. Estructura tridimensional de la proteína α -quimotripsinógeno A. tomada del Proteín Data Bank	57
Figura 9. Perfiles de desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno obtenidos por medidas de espectroscopía UV-Vis a una longitud de onda de 280 nm y por medidas de calorimetría diferencial de barrido DSC	72
Figura 10. Perfiles de desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno obtenidos por medidas de espectroscopía UV-Vis y calorimetría diferencial de barrido a diferentes valores de pH.....	74
Figura 11. Efecto de la concentración de electrolitos sobre la desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno a pH 2,00 mediante medidas de UV-Vis.....	76
Figura 12. Efecto de la concentración de electrolitos sobre la desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno a pH 2,00 mediante medidas de calorimetría diferencial de barrido.....	77
Figura 13. Temperatura media de desnaturalización y entalpía calorimétrica a pH 2,00 en función de la concentración de cada electrolito	82
Figura 14. Curvas de estabilidad del α -quimotripsinógeno en presencia de electrolitos en buffer pH 2,00 a partir de parámetros termodinámicos obtenidos por calorimetría diferencial de barrido	83
Figura 15. Cambio en la estabilidad del α -quimotripsinógeno en buffer pH 2,00, 3,00 y en agua pH 3,50 determinado a partir de datos de calorimetría diferencial de barrido..	86

Figura 16. Tensión superficial de las soluciones acuosas de electrolitos determinadas a 298,15 K.....	90
Figura 17. Cambio en la temperatura media de desnaturalización del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de electrolitos en función de la tensión superficial de las soluciones acuosas de electrolitos a 298,15 K y pH 3,50.....	93
Figura 18. Evolución de la presión superficial del α -quimotripsinógeno en la interfase agua/aire a 298,15 K.....	95
Figura 19. Efecto de la concentración de cloruro de sodio sobre el perfil de adsorción del α -quimotripsinógeno en solución acuosa a 298,15 K.....	97
Figura 20. Efecto de la concentración de cloruro de potasio sobre el perfil de adsorción del α -quimotripsinógeno en solución acuosa a 298,15 K.....	98
Figura 21. Efecto de la concentración de nitrato de amonio sobre el perfil de adsorción del α -quimotripsinógeno en solución acuosa a 298,15 K.....	99
Figura 22. Efecto de la concentración de sulfato de amonio sobre el perfil de adsorción del α -quimotripsinógeno en solución acuosa a 298,15 K.....	100
Figura 23. Volumen específico aparente de los electrolitos en función de la concentración a 298,15 K	104
Figura 24. Volumen específico aparente del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de NaCl (a) molalidad constante (ϕ_2) y (b) potencial químico constante (ϕ'_2) a 298,15 K.....	107
Figura 25. Volumen específico aparente del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de KCl (a) molalidad constante (ϕ_2) y (b) potencial químico constante (ϕ'_2) a 298,15 K.....	108
Figura 26. Volumen específico aparente del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de NH_4NO_3 (a) molalidad constante (ϕ_2) y (b) potencial químico constante (ϕ'_2) a 298,15 K.....	109
Figura 27. Volumen específico aparente del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (a) molalidad constante (ϕ_2) y (b) potencial químico constante (ϕ'_2) a 298,15 K	109
Figura 28. Parámetro de interacción preferencial en función de la concentración de electrolito.....	111
Figura 29. Variación de $\ln\gamma_3$ en función de la concentración molal de electrolito a 298,15 K.....	112
Figura 30. Coeficiente de actividad medio (γ^\pm) en función de la concentración molal de sulfato de amonio tomados de los datos de Clegg y colaboradores a 298,15 K.....	114
Figura 31. Variación del parámetro de interacción preferencial (a), del parámetro de hidratación (b) y del potencial químico del α -quimotripsinógeno (c), en función de la concentración de electrolito a 298,15 K	116

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Valores de parámetros termodinámicos en función del pH para la proteína α -quimotripsinógeno A, determinados a partir de calorimetría diferencial de barrido.	58
Tabla 2. Parámetros termodinámicos del proceso de desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno a pH 2,00, 3,00 y 3,50 obtenidos por UV-Vis y calorimetría diferencial de barrido... ..	75
Tabla 3. Temperatura media de desnaturalización del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de electrolitos a pH 2,00, 3,00 y 3,50 obtenida a partir de datos espectroscópicos y calorimétricos	78
Tabla 4. Cambios en la entalpía de van't Hoff y la entalpía calorimétrica para el proceso de desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de electrolitos a pH 2,00, 3,00 y 3,50 obtenidos a partir de datos espectroscópicos y calorimétricos	80
Tabla 5. Cambio en la energía de Gibbs de estabilización $\Delta\Delta G$ del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de electrolitos a pH 2,00, 3,00 y 3,50.....	84
Tabla 6. Valores de las pendientes que caracterizan la dependencia de la energía de Gibbs de estabilización $\Delta\Delta G$ del α -quimotripsinógeno en solución acuosa con la concentración de electrolitos a pH 2,00, 3,00 y en agua pH 3,50	88
Tabla 7. Pendientes límite de tensión superficial para soluciones acuosas de electrolitos a 298,15 K y 75 kPa calculadas a partir de datos experimentales y datos reportados en literatura	91
Tabla 8. Temperatura media de desnaturalización del α -quimotripsinógeno y tensión superficial de las soluciones acuosas de electrolitos en función de la fracción molar del electrolito.....	92
Tabla 9. Parámetros de adsorción del modelo cinético de tres pasos para el α -quimotripsinógeno en agua a 298,15 K	97
Tabla 10. Parámetros de adsorción del modelo cinético de tres pasos para el α -quimotripsinógeno A en soluciones acuosas de electrolitos a 298,15 K	101
Tabla 11. Volumen específico aparente (ν) y densidades (ρ) de las soluciones de electrolitos en función de la molalidad (m) a 298,15 K.....	104
Tabla 12. Volumen parcial específico a dilución infinitesimal ν^0 de los diferentes de los electrolitos a 298,15 K	105

Tabla 13. Volúmenes parciales específicos a molalidad constante (ϕ_2^0), a potencial químico constante ($\phi_2'^0$) y valores de parámetros de interacción (ξ_3) e hidratación preferencial ($\frac{\partial g_1}{\partial g_2}$) del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de cloruro de sodio a 298,15 K.....	107
Tabla 14. Volúmenes parciales específicos a molalidad constante (ϕ_2^0), a potencial químico constante ($\phi_2'^0$) y valores de parámetros de interacción (ξ_3) e hidratación preferencial ($\frac{\partial g_1}{\partial g_2}$) del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de cloruro de potasio a 298,15 K.....	107
Tabla 15. Volúmenes parciales específicos a molalidad constante (ϕ_2^0), a potencial químico constante ($\phi_2'^0$) y valores de parámetros de interacción (ξ_3) e hidratación preferencial ($\frac{\partial g_1}{\partial g_2}$) del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de nitrato de amonio a 298,15 K.....	108
Tabla 16. Volúmenes parciales específicos a molalidad constante (ϕ_2^0), a potencial químico constante ($\phi_2'^0$) y valores de parámetros de interacción (ξ_3) e hidratación preferencial ($\frac{\partial g_1}{\partial g_2}$) del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de sulfato de amonio a 298,15 K.....	109
Tabla 17. Coeficiente de actividad medio (γ^\pm) obtenido a partir del modelo extendido de Debye-Hückel para NaCl y valores del coeficiente de actividad medio reportado por varios autores a 298,15 K.....	113
Tabla 18. Coeficiente de actividad medio (γ^\pm) obtenido a partir del modelo extendido de Debye-Hückel para KCl y valores del coeficiente de actividad medio reportado por varios autores a 298,15 K.....	113
Tabla 19. Coeficiente de actividad medio (γ^\pm) obtenido a partir del modelo extendido de Debye-Hückel para NH_4NO_3 y valores del coeficiente de actividad medio reportado por Hamer a 298,15 K.....	114
Tabla 20. Valores de coeficientes de actividad empleados en este estudio para sulfato de amonio, determinados a partir de los datos de Clegg y colaboradores a 298,15 K...	115
Tabla 21. Variación del parámetro de interacción preferencial, de hidratación y variación del potencial químico de la proteína en presencia de electrolito a 298,15 K...	115
Tabla 22. Energía libre de transferencia de la proteína en agua a solución de electrolito a 298,15 K.....	118

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI
$\Delta G^{\circ}_{N \rightarrow D}$	Cambio en la energía de Gibbs durante el proceso de desnaturalización	kJ
G°_D	Energía de Gibbs en el estado desplegado	kJ
G°_N	Energía de Gibbs en el estado nativo	kJ
R	Constante de los gases ideales	$\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$
T	Temperatura	K
ΔH	Cambio de entalpía durante el proceso de desnaturalización	kJ
ΔS	Cambio de entropía durante el proceso de desnaturalización	kJ K^{-1}
K_D	Constante de equilibrio (proceso de desnaturalización)	----
X_N	Fracción proteína nativa	----
X_D	Fracción proteína desnaturalizada	----
Y	Señal observable durante el proceso de desnaturalización	----
Y_N	Señal en el estado nativo	----
Y_D	Señal en el estado desnaturalizado	----
$\Delta H^{\circ}(T_m)$	Cambio de entalpía en la temperatura media de desnaturalización	kJ
$\Delta S^{\circ}(T_m)$	Cambio de entropía en la temperatura media de desnaturalización	kJ K^{-1}
$\Delta G^{\circ}_D(T_m)$	Cambio de la energía de Gibbs en la temperatura media de desnaturalización	kJ
ΔC_p	Cambio en la capacidad calorífica	$\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$
m	molalidad	mol kg^{-1}
M	Peso molecular	g mol^{-1}
D	Difusividad	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
t	Tiempo	s
k	Constante cinética primer orden	s^{-1}
A	Absorbancia	----
b	Paso óptico	cm
$\Delta \Delta G$	Cambio en la energía de Gibbs de estabilidad	kJ mol^{-1}

Símbolo	Término	Unidad SI
$\Delta G^{electrolito}$	Cambio en la energía de Gibbs por presencia de electrolito	kJ mol^{-1}
ΔG^{buffer}	Cambio en la energía de Gibbs por presencia de buffer	kJ mol^{-1}
ΔG_w	Cambio en la energía de Gibbs de la proteína en agua.	kJ mol^{-1}
ΔB	Cambio en la energía de Gibbs de exceso	kJ mol^{-1}
A	Parámetro de ajuste modelo Debye-Hückel	----
B	Parámetro de ajuste modelo Debye-Hückel	----
C	Parámetro de ajuste modelo Debye-Hückel	kg mol^{-1}
I	Fuerza iónica	mol kg^{-1}
z	Carga del ion	----
ΔG_{tr}	Cambio en la energía libre de transferencia	kJ mol^{-1}

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI
Γ	Concentración superficial de exceso	mol m^{-2}
π	Presión superficial	$\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$
γ^o	Tensión superficial disolvente referencia	$\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$
γ	Tensión superficial disolución	$\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$
γ_{\pm}	Coeficiente medio de actividad	----
ξ	Parámetro de interacción preferencial	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
ρ_o	Densidad disolvente de referencia	kg m^{-3}
ϕ_2^o	Volumen parcial específico a molalidad constante de electrolito	$\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$
$\phi_2'^o$	Volumen parcial específico a potencial químico constante de electrolito	$\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$
ρ	Densidad solución	kg m^{-3}
\bar{v}_3	Volumen parcial específico del electrolito	$\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$
ϕ	Volumen específico aparente	$\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$
μ	Potencial químico	kJ mol^{-1}

Subíndices

Subíndice	Término
D	Desplegada o desnaturalizada
N	Nativa
w	Agua
n	Calentamiento n-ésimo
0	Disolvente de referencia
1	Agua
2	Proteína
3	Electrolito
<i>tr</i>	Transferencia

Superíndices

Superíndice	Término
o	Estado estándar
0	Propiedad a dilución infinitesimal
'	Potencial químico constante

Abreviaturas

Abreviatura	Término
CGTA	α -quimotripsinógeno A
<i>Rev</i>	Reversibilidad

Introducción

Las proteínas son macromoléculas biológicas que se encuentran presentes en todos los organismos vivos; son sintetizadas en los ribosomas y su peso molecular se encuentra generalmente por encima de 10 kDa. Estructuralmente las proteínas se forman por la unión de unidades monoméricas básicas que son los aminoácidos; esta unión se conoce con el nombre de enlace peptídico y dependiendo de los aminoácidos que formen la proteína, esta tendrá determinadas propiedades físicas y químicas.

Las proteínas cumplen diferentes funciones dentro de un organismo entre ellas, funciones enzimáticas, hormonales, reconocimiento de señales, de transporte y estructurales. Para que estas funciones sean llevadas a cabo por las proteínas en condiciones fisiológicas es de gran importancia que mantengan su estructura nativa plegada y, más aún, que puedan retener dicha conformación estructural ante eventuales variaciones en el pH, la fuerza iónica, la temperatura o la presión, que pueden presentarse en el medio en el cual la proteína se encuentra disuelta.

Con el fin de evaluar la manera en que la molécula se pliega y de estimar el efecto de las diferentes variables que influyen sobre la estabilidad de la proteína, es decir, sobre la tendencia a permanecer en su estado nativo, se ha desarrollado una nueva disciplina denominada “plegamiento de proteínas”, en la que se incluye el estudio cinético y termodinámico del proceso de plegado, la estabilidad y la estabilización de una proteína.

Una de las principales estrategias para analizar el plegamiento de proteínas es la caracterización de la transición conformacional y de los posibles intermediarios durante el proceso. Debido a la alta cooperatividad del proceso de plegamiento, la descripción detallada de los posibles estados parcialmente plegados es difícil. Varios estudios han mostrado que la cantidad de estructura secundaria y terciaria de los estados intermedios formados en el plegamiento de proteínas varía, dependiendo de la naturaleza de la proteína así como de las condiciones experimentales del proceso.

Se ha demostrado que para dilucidar la naturaleza de las interacciones que estabilizan la conformación nativa de la proteína y para comprender los procesos involucrados en su estabilidad se requiere un entendimiento fundamental del proceso termodinámico de solvatación de la proteína, es decir, de su interacción con el agua así como con otras especies químicas presentes en las células como sales y otros compuestos.

El agua es el medio fisiológico natural de las macromoléculas biológicas. La estructura del agua desempeña un papel fundamental en los procesos involucrados en la estabilidad de las proteínas y cualquier alteración se refleja en la estabilidad de las mismas. Las moléculas de agua interactúan de forma diferente con los grupos polares y no polares de las proteínas: los grupos polares favorecen la interacción directa con moléculas de agua, mientras que los grupos no polares promueven la interacción entre las mismas moléculas de agua.

La interacción con el solvente y la forma como la presencia de otras sustancias afecta las interacciones solvente-solvente juega un papel fundamental en la estabilidad de la conformación nativa de estas moléculas. Se ha encontrado que la adición de algunos compuestos a sistemas proteína-agua, ocasiona cambios en la estabilidad térmica de las proteínas ya sea disminuyendo la estabilidad del estado nativo o aumentándola. Se ha planteado que éstos compuestos pueden interactuar directamente con la proteína o pueden afectar su estabilidad a través de cambios en la estructura del agua alrededor de la macromolécula, sin embargo, la naturaleza de los procesos por los cuales un cosolvente estabiliza o desestabiliza una proteína aún no son claros.

La pregunta de si la estabilidad de las proteínas es consecuencia de la interacción proteína-cosolvente o si resulta de la modificación que los cosolventes inducen en el agua, resume uno de los problemas alrededor del cual se genera más investigación en la actualidad, debido al impacto que tiene la estabilidad de estas macromoléculas por sus aplicaciones biológicas, tecnológicas y farmacéuticas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la concentración de los electrolitos fuertes: cloruro de sodio, cloruro de potasio, nitrato de amonio y sulfato de amonio, sobre el comportamiento termodinámico del α -quimotripsinógeno. Se pretendía obtener información fisicoquímica relacionada con el efecto estabilizante o desestabilizante que

estos cosolventes pueden ejercer sobre la estructura de la proteína, para analizar si los procesos de estabilización o desestabilización son consecuencia de su efecto sobre las capas de hidratación de la proteína o de la interacción directa con la superficie de esta.

Este trabajo hace parte de las investigaciones realizadas por el Grupo de Termodinámica Clásica de la Universidad Nacional de Colombia, dirigido por la Doctora Carmen María Romero Isaza, en el cual se ha analizado el comportamiento termodinámico de soluciones acuosas de diferentes proteínas en presencia de varios tipos de cosolventes.

1.Aspectos teóricos

1.1 Estructura de proteínas

Las proteínas desempeñan un papel fundamental en los seres vivos y son las biomoléculas más versátiles y más diversas. Funcionan como catalizadores, transportan y almacenan otras moléculas como el oxígeno, proporcionan apoyo mecánico y protección inmunológica, generan movimiento, transmiten impulsos nerviosos y controlan el crecimiento y la diferenciación celular. Los organismos han podido generar una gran variedad de productos proteicos con distintas aplicaciones como enzimas, hormonas, anticuerpos, fibras musculares, antibióticos, entre muchas otras, con funciones especiales y características diferenciables [1,2].

Las proteínas están constituidas estructuralmente por cadenas de aminoácidos que se pliegan adquiriendo una conformación tridimensional que les permite llevar a cabo diversas funciones. Están codificadas en el material genético de cada organismo, donde se especifica su secuencia de aminoácidos, y luego son sintetizadas por los ribosomas [2,3]. La estructura de las proteínas se puede dividir en cuatro niveles de organización: primario, secundario, terciario y cuaternario. Cada uno de los niveles resalta un aspecto diferente y depende de distintos tipos de interacciones. Mientras la estructura primaria es simplemente la secuencia lineal de aminoácidos de una cadena polipeptídica, los demás establecen la organización tridimensional de péptidos o conjunto de ellos. La importancia desde el punto de vista químico de la estructura primaria, radica en la secuencia de los grupos laterales de los aminoácidos (cadenas laterales, R) dado que es el componente variable de la molécula que proporciona la identidad a la cadena [2–4].

La estructura secundaria consiste en el enrollamiento de la cadena peptídica sobre su propio eje para formar una hélice o alguna otra estructura tridimensional específica. La estructura secundaria más común es la α -hélice, la cual se caracteriza por formar una

estructura geométrica en espiral, muy uniforme, en la que cada vuelta está constituida por 3,6 aminoácidos [2]. Otro tipo común de estructura secundaria es la hoja β plegada, que se caracteriza por presentarse de forma aplanada y extendida, además posee un máximo de enlaces de hidrógeno entre los enlaces peptídicos. Esta estructura consta de varias cadenas peptídicas que permanecen enfrentadas y se mantienen juntas a través de puentes de hidrógeno en un arreglo a manera de zig-zag. Debido a que toda cadena polipeptídica tiene un extremo C-terminal en una dirección y un extremo N-terminal en la otra, dos cadenas enlazadas con hidrógeno y una al lado de la otra pueden correr en la misma dirección, paralelas, o en dirección opuesta, antiparalela [5].

La estructura terciaria de una proteína se define cuando se alcanza la conformación definitiva y específica de la proteína. Durante el enrollamiento de la cadena peptídica, para dar origen a la estructura terciaria, los puentes de hidrógeno, los puentes disulfuro y las interacciones iónicas entre una parte de la cadena y otra son las fuerzas que mantienen los pliegues en posición y orientación espacial correcta, debido a esto la estructura terciaria es específica para cada proteína y determina su función [5]. Cabe destacar en la estructura terciaria la presencia de regiones compactas semiindependientes denominadas dominios, que se caracterizan por poseer una geometría casi esférica específica con un interior hidrofóbico y un exterior polar. Una proteína puede presentar más de un dominio, a menudo interconectados por un segmento polipeptídico carente de estructura secundaria regular y alternativamente estar separados por una hendidura o una región menos densa en la estructura terciaria de la proteína [6].

La estructura cuaternaria se refiere al ordenamiento espacial de las subunidades y la naturaleza de sus interacciones y puede entenderse esta estructura, como la unión de varias cadenas polipeptídicas con estructura terciaria que forman un complejo proteico en donde las subunidades constitutivas pueden ser idénticas o diferentes. Las proteínas con varias subunidades en las que alguna o todas las subunidades son idénticas se denominan oligómeros. Los oligómeros están formados por protómeros, que pueden estar formados por una o varias subunidades. Un gran número de proteínas oligoméricas contienen dos o cuatro subunidades protoméricas, denominadas dímeros y tetrámeros, respectivamente. Desde el punto de vista biológico la estructura cuaternaria de las

proteínas es de especial interés porque esta conformación modula la actividad biológica de las proteínas y la separación de las subunidades puede conducir a la pérdida de la funcionalidad. Solo unas cuantas proteínas presentan este nivel conformacional y por medio de la organización proteica cuaternaria se forman estructuras de gran importancia biológica como los microtúbulos, microfilamentos, y complejos enzimáticos entre otras [7].

1.2 Interacciones implicadas en el plegamiento y estabilidad de las proteínas.

La actividad y las funciones propias de las proteínas se asocian con una estructura tridimensional altamente específica, la cual se mantiene principalmente por fuerzas no covalentes débiles, cuya formación y estabilidad requieren la presencia del agua. En efecto, las proteínas carecen de actividad cuando no tienen moléculas de agua para su hidratación [8–11].

En los ambientes intracelulares el agua actúa siempre como solvente natural y siempre se encuentra mezclada con cosolventes que influyen la fuerza iónica, los valores de pH, la afinidad química a ciertos grupos moleculares sobre la superficie de la molécula, etc. Todas estas propiedades tienen una gran influencia sobre la estabilidad de las proteínas y pueden inducir cambios significativos de los parámetros físicos que determinan las fronteras entre los estados nativo y desnaturalizado porque afectan los procesos de hidratación de la proteína; los cosolventes juegan un papel fundamental en la conservación de las estructuras nativas y en los procesos de estabilización y de desnaturalización [11,12]. La estructura nativa de las proteínas se mantiene por la acción de varias fuerzas que intervienen en el plegamiento y conformación de las mismas. Dentro de estas fuerzas se encuentran básicamente: puentes disulfuro, puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones tipo van der Waals e interacciones hidrofóbicas [13–15].

1.2.1 Puentes disulfuro

Un puente disulfuro es un enlace covalente formado por dos grupos sulfhidrilos (-SH), cada uno de ellos perteneciente a un residuo de cisteína. Los enlaces S-S se forman *in vivo* catalizados por la acción de la enzima disulfuro isomerasa. Los dos residuos que

forman el puente, pueden estar separados por muchos aminoácidos en la secuencia o bien pueden pertenecer a diferentes cadenas polipeptídicas; el plegamiento de las cadenas polipeptídicas, lleva a los residuos de cisteína a estar muy próximos, lo que permite la formación del enlace disulfuro. La formación de este limita el número de estructuras proteicas posibles y contribuye a la estabilización de la estructura tridimensional de la proteína [16,17].

1.2.2 Interacciones electrostáticas

Las proteínas tienen múltiples grupos ionizables que originan fuerzas atractivas y repulsivas que contribuyen a estabilizar la estructura de éstas y además producen cargas superficiales en la proteína cuando ésta se encuentra en solución acuosa. La presencia de estas cargas en la superficie de las proteínas tiene una fuerte influencia sobre la estructura que adopten las moléculas de agua que solvatan a las proteínas. Las interacciones electrostáticas contribuyen de manera importante a la magnitud de los parámetros termodinámicos de entalpía y a la entropía que caracterizan la interacción entre la proteína y el solvente [18–20].

1.2.3 Puentes de hidrógeno

El enlace de hidrógeno fue reconocido como tal por primera vez por Latimer y Rodebush en 1920. La estructura y propiedades de los biopolímeros así como la del agua, el disolvente biológico universal, están determinadas por este tipo de interacción [21].

Los enlaces de hidrógeno intramoleculares son una de las fuerzas de interacción que desempeñan un factor muy importante en la estructura de las proteínas, especialmente a nivel de estructura secundaria donde aparecen siguiendo un patrón bien definido. La periodicidad de estos enlaces en los elementos de estructura secundaria radica en la repetición del grupo peptídico a lo largo de la cadena y del doble carácter de aceptor y donador de este grupo. En las hélices alfa se forman puentes de hidrógeno en los cuales el oxígeno de un grupo carbonilo actúa como aceptor y el nitrógeno del grupo amida actúa como donador [22].

Además de los puentes de hidrógeno asociados al grupo peptídico, tan importantes para la formación y estabilidad de los elementos de estructura secundaria, un buen número de cadenas laterales de los aminoácidos tienen la capacidad de formar puentes de hidrógeno, pues 11 de los 20 aminoácidos esenciales tienen cadenas laterales con grupos donores o aceptores. Estos aminoácidos pueden formar puentes de hidrógeno intramoleculares que contribuyen a la estabilidad de la estructura terciaria de las proteínas [23].

Los puentes de hidrógeno además de tener una fuerte influencia en la estabilidad de las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas, también son de gran importancia cuando las moléculas de agua solvatan la proteína. Los puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua alrededor de la proteína definen las propiedades características de la capa de hidratación y los puentes de hidrógeno entre los grupos polares de la proteína y el agua (interna y superficial) influyen sobre la flexibilidad de la proteína. Este tipo de interacciones ejercen un aporte fundamental a los parámetros termodinámicos de entalpía y entropía que permiten comprender la influencia de las variables del sistema en los procesos de estabilización o desnaturalización de las proteínas [22,23].

1.2.4 Interacciones tipo van der Waals

Las interacciones tipo van der Waals se presentan como una fuerza eléctrica transitoria débil de atracción o repulsión, entre moléculas o átomos. Estas interacciones existen, porque cada átomo o molécula tiene una nube de electrones que pueden fluctuar, produciendo un dipolo eléctrico temporal. El dipolo transitorio en una especie puede inducir un dipolo complementario en otro átomo o molécula, siempre que las dos especies estén lo bastante cerca. Estos dipolos temporales de corta vida proporcionan una atracción o repulsión electrostática débil. Por supuesto, si las dos nubes de electrones de los átomos adyacentes están demasiado cerca, las fuerzas de repulsión entran en juego a causa de los electrones cargados negativamente. La distancia adecuada requerida para las interacciones de van der Waals difiere de especie a especie, y está basada en el tamaño de cada nube de electrones; esta distancia se conoce como el radio de van der Waals. Estas fuerzas son muy importantes en la formación de la estructura secundaria de las proteínas y más aún en el plegamiento de la estructura terciaria donde se presentan miles de interacciones tipo van der Waals [24].

Las interacciones de van der Waals, aunque transitorias y débiles, pueden proporcionar un componente importante en la estructura de proteínas debido a su gran número. También pueden desempeñar papeles importantes en el reconocimiento proteína-proteína cuando las formas complementarias están involucradas; es el caso del reconocimiento antígeno-anticuerpo, donde las dos moléculas se unen por la presencia de atracciones tipo van der Waals [22].

1.2.5 Interacción hidrofóbica

A finales de 1930 la estructura globular de las proteínas estaba empezando a ser comprendida. Bernal en sus investigaciones concluyó: “Los enlaces iónicos no tienen mayor relevancia en el proceso de plegamiento proteico: son los grupos hidrófobos de las proteínas que deben mantenerla unida y que dan la forma globular a ciertas proteínas; las moléculas de proteína en solución acuosa deben tener sus grupos hidrófobos fuera de contacto con el agua, y por ello en contacto uno con el otro” [25,26]. La importancia de esta sugerencia no fue ampliamente apreciada hasta 1959, cuando la influyente revisión de Kauzmann fue publicada en 1962 y presentó pruebas convincentes que la interacción hidrofóbica es probablemente uno de los factores más importantes implicados en la estabilización del plegamiento y configuración en muchas proteínas nativas [16,26].

Los grupos apolares de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos que conforman la proteína se ubican preferiblemente al interior de la proteína, y dependiendo del tipo de aminoácidos que conformen la proteína, ésta tendrá un mayor o menor carácter hidrofóbico en solución [16,25–27].

En principio las cadenas laterales que son no polares presentan una solubilidad baja en agua y estarán preferiblemente interactuando entre sí al interior de la proteína formando una región hidrofóbica. A esta categoría pertenecen las cadenas alifáticas de los aminoácidos: alanina, valina, isoleucina, leucina. También se pueden incluir los aminoácidos con cadenas laterales aromáticas como: fenilalanina, triptófano y metionina [28]. Las cadenas laterales que son polares presentan una solubilidad mayor en agua y estarán preferiblemente interactuando con las moléculas de agua al exterior de la

proteína, es decir estos grupos se ubican en la superficie de la proteína formando una región hidrofílica. A esta categoría pertenecen las cadenas alifáticas de los aminoácidos: ácido glutámico, ácido aspártico, arginina y lisina. Los aminoácidos que tienen cadenas laterales amídicas como asparagina y glutamina son muy polares. La serina y la treonina presentan polaridad debido al valor del momento dipolar y a la capacidad de formar puentes de hidrógeno del grupo hidroxilo [7,28]. La polaridad de las cadenas laterales de los cinco aminoácidos restantes es relativa. La cisteína y la histidina tienen un pKa próximo al pH fisiológico y pueden presentar carga o no dependiendo del pH del medio. La tirosina a pesar de tener un grupo OH, se comporta como muy poco polar porque la resonancia electrónica del anillo aromático reduce el momento dipolar del grupo OH. La glicina no tiene cadena lateral y es un aminoácido de carácter polar. La prolina es un aminoácido con propiedades conformacionales diferentes pero su cadena lateral se considera polar [16].

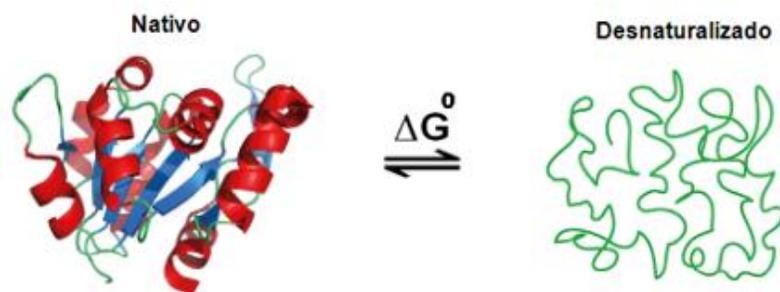
1.3 Aspectos termodinámicos de la estabilidad de proteínas

La estructura primaria de una proteína permite establecer las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria es decir, los niveles superiores de estructura. Sin embargo, la actividad biológica de la proteína depende en gran medida de su estructura terciaria específica mantenida por los enlaces e interacciones que se presentan en el proceso de plegamiento proteico, de tal manera que cuando una proteína se somete a cambios de temperatura, determinadas sustancias químicas, cambios bruscos de pH, etc., su estructura terciaria se desorganiza y las cadenas peptídicas adquieren una conformación al azar que induce a la pérdida de su actividad biológica [3,4].

La pérdida de la estructura terciaria se denomina desnaturalización, y siempre este proceso está acompañado de la alteración de las funciones biológicas normales de las proteínas. La desnaturalización puede ser irreversible, particularmente si muchas proteínas desnaturalizadas interactúan en eventos no específicos al azar, como se presenta en los cuerpos de inclusión característicos de algunas enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, en otros casos la desnaturalización es reversible, y una vez las condiciones del ambiente vuelven a su estado normal, la proteína puede adquirir su forma activa. En este caso se habla de renaturalización y la proteína regresa a su estado nativo sin pérdida de su función biológica [22].

La estabilidad de las proteínas comprende tanto aspectos termodinámicos como aspectos cinéticos. Cuando una proteína es sometida a un proceso de desnaturalización reversible, la conformación nativa (plegada) de la proteína se encuentra en equilibrio con el estado desnaturalizado (desplegado) como se muestra en la Figura 1 [29].

Figura 1. Representación general para el proceso de desnaturalización de una proteína. Estado nativo o plegado y estado desplegado o desnaturalizado [29].



La estabilidad conformacional para este proceso estará dada por la diferencia de energía de Gibbs entre los dos estados. Si el proceso es termodinámicamente estable, el cambio de energía de Gibbs para el proceso de desnaturalización es positivo y por tanto, desfavorable. Así, cuando en el proceso que involucra la proteína se cumple que $\Delta G^{\circ} > 0$, a ciertas condiciones de temperatura, presión, concentración y pH se dice que la proteína es estable, lo que permite estudiarla desde diversos puntos de vista [30].

El proceso de equilibrio que se representa en la Figura 1, se puede describir por una constante de equilibrio aparente K_D o constante de desnaturalización que describe el proceso o transición que ocurre entre el estado nativo (N) y el estado desplegado (D).

El cambio en la energía de Gibbs para este proceso puede entenderse como la diferencia de energía entre el estado desnaturalizado y el estado nativo [30–32]:

$$\Delta G^{\circ}_{N \rightarrow D} = G^{\circ}_D - G^{\circ}_N \quad (1)$$

La constante de equilibrio y el cambio en la energía de Gibbs del proceso se pueden relacionar por medio de la siguiente expresión:

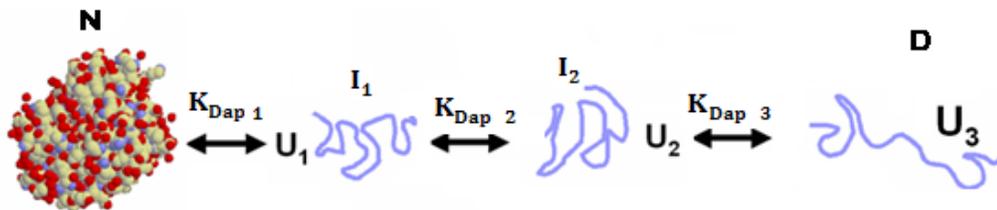
$$\Delta G_D^o = -RT \ln K_D \quad (2)$$

Empleando la ecuación básica de la energía de Gibbs se puede hacer un análisis del comportamiento entálpico y entrópico para el proceso de desnaturalización por temperatura:

$$\Delta G_D^o = \Delta H^o - T\Delta S^o \quad (3)$$

A temperaturas próximas a la de desnaturalización, la diferencia de entalpía del plegamiento presenta valores de entre -100 y -300 kcal mol⁻¹. De acuerdo con el segundo principio de la termodinámica esto implica que el cambio de entropía neto del equilibrio de plegamiento es negativo ($-T\Delta S$ positivo y de valor absoluto próximo al de ΔH). Al plegarse la proteína, la entropía de la cadena polipeptídica disminuye y la del agua aumenta (pero en menor proporción por el efecto hidrofóbico). La estabilidad de las proteínas es pequeña porque durante el proceso la contribución entálpica está casi compensada por la contribución entrópica [31]. Cuando se presentan estados intermedios que pueden ser estables, la transición se representa por más de un equilibrio y la energía del sistema estará dada por la suma de la contribución energética de todos los intermediarios presentes como se muestra en la Figura 2. Estudiar un sistema de estas características es complejo desde el punto de vista experimental [32].

Figura 2. Proteína en estado nativo (izquierda) diferentes estados desplegados estables o intermediarios, cada uno asociado a un valor de energía U_i (derecha) [32]



Muchas proteínas no muestran conformaciones intermediarias entre el estado nativo y el desnaturalizado. Otras presentan sólo alguna. Eso refleja que cuando se debilitan algunas interacciones, lo hacen todas a la vez de forma cooperativa. Visto al revés: la

fortaleza de una interacción de la proteína aumenta en presencia de otras interacciones. Esto se debe a que cualquier interacción entre dos residuos de la proteína disminuye el cambio de entropía conformacional (desestabilizante) asociado a la formación de las demás interacciones [30–32].

1.4 Factores que afectan la estabilidad de las proteínas

La estabilidad de las proteínas es el resultado de múltiples interacciones que aportan diferencialmente a la estabilidad de las macromoléculas. Esta estabilidad es marginal porque las contribuciones entrópica y entálpica del proceso de plegamiento son de magnitud similar y tienen signo opuesto, por tanto tienden a compensarse mutuamente [20].

El proceso de desdoblamiento o desnaturalización puede ser reversible o irreversible, dependiendo de las condiciones a que esté sujeta la macromolécula. Cuando durante el proceso la estructura química no se afecta definitivamente y al remover las condiciones extremas, la proteína se repliega y adopta nuevamente su estructura tridimensional nativa, se dice que el proceso ocurre reversiblemente. Cuando esto ocurre, se concluye que el proceso de plegamiento/desdoblamiento es conducido termodinámicamente [20].

El cambio en la estabilidad de una proteína es una consecuencia de cambios en su estructura nativa la cual puede ser fácilmente perturbada por la acción de factores físicos como presión, temperatura, pH, o bien por la adición de sustancias que pueden contribuir a estabilizar el estado nativo de las proteínas (estabilizadores) o bien favorecer el estado desnaturalizado o desdoblado sobre el estado nativo (desnaturalizantes) [30–32]. El seguimiento del cambio en la estabilidad de proteínas se hace por medio de las curvas de desnaturalización. En ellas se define como temperatura media de desnaturalización (T_m) la temperatura en la cual la proteína se encuentra 50% en estado nativo y 50% en estado desplegado [30–32].

1.4.1 Efecto de la temperatura en la estabilidad de proteínas

Evolutivamente, la arquitectura de las proteínas se ha desarrollado para que las diversas funciones de estos importantes polímeros puedan ejercerse de manera óptima *in vivo* dentro del intervalo de temperatura fisiológica al interior de un organismo. Los estrechos márgenes de estabilidad aseguran que las proteínas mantienen suficiente flexibilidad para cumplir con sus diversas funciones. Dado que el agua existió en este planeta mucho antes que la evolución de las proteínas, es probable que cualquier proceso que afecte la estructura u otras propiedades físicas del agua también influya en la integridad estructural y funcional de las proteínas en el estado nativo [33].

La sensibilidad de las proteínas a la desnaturalización térmica depende de numerosos factores, tales como la naturaleza y concentración de proteínas, la actividad del agua, el pH, la fuerza iónica y la naturaleza de los cosolventes presentes. Esta desnaturalización, frecuentemente, va acompañada de un descenso de la solubilidad, de segregación de moléculas proteicas desplegadas, así como de un aumento de la capacidad de absorción de agua por la proteína. Generalmente la máxima estabilidad de muchas proteínas se encuentra alrededor de las condiciones intracelulares o condiciones fisiológicas [30].

La temperatura de máxima estabilidad de las proteínas es aquella en la cual la energía de desnaturalización es máxima. Cuando la temperatura cambia, la energía de Gibbs disminuye hasta llegar a cero y se produce el desdoblamiento o desnaturalización. Cuando la temperatura es mayor a la de máxima estabilidad se conoce como temperatura de desnaturalización térmica y cuando es menor se denomina temperatura de desnaturalización fría [30].

Las bajas temperaturas pueden inducir la desnaturalización de varias proteínas. Así, algunas enzimas que son estables a temperatura ambiente, pueden inactivarse a 0,0 °C y algunas proteínas se agregan y precipitan cuando alcanzan temperaturas de congelación. Este efecto se puede observar en las personas que sufren un cuadro de hipotermia, en donde las proteínas del cuerpo se desnaturalizan y pierden momentáneamente su funcionalidad, se agregan y precipitan en el torrente sanguíneo o en el interior de las células [34].

En condiciones óptimas de pH, la temperatura de desnaturalización de pequeñas proteínas globulares se encuentra en el intervalo de 50-65 °C. John Brandts fue el primero en describir la forma parabólica aparente del perfil ΔG en función de la temperatura de la proteína α -quimotripsinógeno, y predijo la posibilidad de una desnaturalización fría [35]. La desnaturalización fría como un proceso real fue posteriormente demostrada por Hatley y Franks, basados en experimentos de proteína en agua súper-enfriada. Ellos también encontraron que la temperatura real de desnaturalización fría, se encuentra cerca del valor estimado a partir de los experimentos de Brandts [36].

Durante la desnaturalización térmica, una de las características que se observa es el aumento de la capacidad calorífica de la proteína después del proceso de desnaturalización. Mientras que la capacidad calorífica de la proteína nativa varía linealmente con la temperatura, el comportamiento de la proteína desnaturalizada es más complejo. Las diferencias en la capacidad calorífica entre los estados nativo y desnaturalizado dan información directa sobre los cambios energéticos en el proceso de desnaturalización [13,30–32].

1.4.2 Efecto del pH sobre la estabilidad de proteínas

Los iones H^+ y OH^- en el medio, además de afectar las capas de hidratación de las proteínas también afectan la carga eléctrica de los grupos ácidos y básicos de las cadenas laterales de los aminoácidos. Esta alteración de la carga de las proteínas afecta las interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura terciaria y a menudo provoca su precipitación. La solubilidad de una proteína es mínima en su punto isoeléctrico, porque su carga neta es cero y desaparece cualquier fuerza de repulsión electrostática que pudiera dificultar la formación de agregados [34].

La mayoría de las proteínas a pH fisiológico están por encima de sus puntos isoeléctricos y tienen una carga neta negativa. Cuando se ajusta el pH al punto isoeléctrico de la proteína, su carga neta será cero. Si el pH disminuye muy por debajo del punto isoeléctrico, la proteína perderá su carga negativa y obtendrá una carga positiva neta. En las zonas de alta densidad de carga, la repulsión intramolecular puede ser lo

suficientemente grande para producir el despliegue de la proteína. Esto tendrá un efecto similar al del tratamiento térmico en la estructura de la proteína [37–39].

En algunos casos, el despliegue puede ser lo suficientemente grande para exponer grupos hidrofóbicos y causar la agregación irreversible. Hasta que esto ocurra, tal despliegue será en gran parte reversible. Algunas proteínas contienen grupos lábiles en medio ácido e incluso el tratamiento con ácido diluido puede causar la pérdida irreversible de la función. La exposición a concentraciones altas de ácido y temperaturas elevadas puede incluso conducir a la hidrólisis de enlaces peptídicos. Los efectos de un pH alto son análogos a los de pH bajo. Los grupos COOH presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos: ácido aspártico y ácido glutámico se pueden ionizar, los grupos NH_3^+ en las cadenas laterales de los aminoácidos lisina y arginina pueden perder un átomo de H dejando a esta parte de la molécula sin carga. En consecuencia a pH alto las proteínas tienden a obtener mayor carga negativa que puede causar el despliegue e incluso la agregación. Para proteínas como lisozima, citocromo C, RNasa, α -quimotripsina, aumentando el pH en un intervalo relativamente corto, la temperatura media de desnaturalización también aumenta es decir se presenta un aumento en la estabilidad [37–39].

1.4.3 Efecto de la presión sobre la estabilidad de proteínas

Los efectos de la presión sobre la estructura y función de una proteína pueden variar drásticamente dependiendo de la magnitud de la presión y el balance global de las fuerzas responsables de mantener la estructura de la proteína. En general, el cambio de energía libre asociado con la desnaturalización de proteínas disminuye a medida que aumenta la presión, al menos por encima de un cierto umbral de presión. El efecto de la presión está relacionado con el cambio de volumen entre el estado nativo y el estado desnaturalizado. En general, el cambio de volumen es negativo porque la estructura del estado nativo tiene espacios vacíos de modo que su volumen se reduce durante la transición y, por lo tanto, el proceso de desnaturalización se ve favorecido bajo alta presión [20]. El comportamiento sin embargo es complejo. Las interacciones entre la proteína y el solvente son críticos en la determinación de la respuesta de una proteína a la presión.

Durante mucho tiempo la presión ha sido reconocida como un desnaturalizante potencial de proteínas, a menudo promoviendo la ruptura de proteínas multiméricas, pero también se han reportado ejemplos de estabilización inducida por la presión. Estos efectos globales pueden ser explicados en términos de efectos de la presión sobre las interacciones moleculares individuales dentro de las proteínas, incluyendo interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y de van der Waals [40].

Dependiendo de la naturaleza y del tipo de proteína, el sistema de estudio responde de manera diferente a la presión. Por ejemplo, la rubredoxina sometida a 500 bar de presión se desestabiliza a 110 °C, en contraste con la glutamato deshidrogenasa que al ser sometida a 500 bar de presión se estabiliza a 103 °C [41].

1.4.4 Efecto del solvente sobre la estabilidad de proteínas

Dado que el agua es el medio natural en el que existen y operan las proteínas, la estructura y dinámica del proceso de hidratación está directamente relacionado con la flexibilidad y estabilidad de las proteínas. En consecuencia, dependiendo de su naturaleza, los cosolventes afectan la hidratación y por ello pueden favorecer el estado desnaturalizado o bien el estado nativo [16].

La adición de un solvente miscible con agua, pero que es menos polar disminuye la constante dieléctrica del sistema. Esto tenderá a aumentar la fuerza de todas las interacciones electrostáticas entre las moléculas que estaban en contacto con el agua [42].

Las proteínas en disolventes hidrofóbicos conservan su estructura nativa como resultado de un aumento en la fuerza de interacción de los puentes de hidrógeno intramoleculares que conduce a una estructura más rígida en ausencia de agua. En mezclas inmiscibles como agua-solvente hidrofóbico, cualquier molécula de agua que pueda estar presente tenderá a permanecer en la superficie de la proteína debido a la naturaleza hidrófila y solvofóbica de la superficie de esta [43].

Por el contrario la presencia de cosolventes polares que pueden interactuar fácilmente con el agua en la superficie de la proteína y que compiten fuertemente por enlaces de hidrógeno entre átomos de la proteína (por ejemplo, dimetilsulfóxido [DMSO], dimetilformamida [DMF]) por lo general desnaturalizan la estructura nativa de la proteína y por consiguiente la conducen a un estado desplegado [43].

Los alcoholes tienen un componente hidrofílico, pero son moderados competidores por enlaces de hidrógeno del grupo amida. Tienden a perturbar la estructura terciaria y dejar las interacciones de la estructura secundaria en gran parte inalteradas. De hecho, el metanol ha ganado algo de atención como un desnaturalizante que aumenta la concentración de posibles intermediarios de plegamiento y por tanto se ha empleado en estudios de transiciones conformacionales en los péptidos sintéticos [44,45].

Algunos estudios de plegamiento de proteínas en una variedad de solventes han demostrado que la estructura nativa de una proteína se puede recuperar en algunos solventes no acuosos, tales como polioles y azúcares, en los que la proteína se pliega nuevamente recobrando el estado nativo y la estructura resultante es termodinámicamente estable como si se plegara en presencia de agua [46,47].

La adición de cosolventes puede modular la estabilidad conformacional de las proteínas. De acuerdo con su efecto sobre la estabilidad de la proteína, los cosolventes se clasifican como cosolventes compatibles, que no alteran la funcionalidad de la proteína, y cosolventes no compatibles. Los cosolventes que desplazan el equilibrio hacia el estado desplegado se denominan desnaturalizantes y los cosolventes que desplazan el equilibrio hacia el estado nativo se denominan estabilizantes u osmolitos [48].

Los cosolventes comúnmente empleados para la extracción y purificación de proteínas tienen diversas funcionalidades químicas y exhiben una amplia gama de comportamientos en solución. Polietilenglicoles de bajo peso molecular y sales inorgánicas como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se emplean con frecuencia para inducir la cristalización de proteínas, los polioles y azúcares se utilizan a menudo para mejorar el crecimiento de cristales mediante la reducción conformacional de proteínas. Los alcoholes monohidroxilados, por otro lado, pueden desestabilizar la estructura terciaria nativa de las proteínas, lo que lleva a la agregación [49].

El efecto de cosolventes sobre soluciones acuosas de proteínas se puede caracterizar en términos de interacciones moleculares preferenciales entre moléculas de proteína y moléculas de agua cuando se adiciona un cosolvente. Estas interacciones moleculares pueden ser analizadas a partir de mediciones termodinámicas macroscópicas como: equilibrio de diálisis, medidas de densidad, osmometría o medidas de presión de vapor. El denominado parámetro de interacción preferencial derivado de estas mediciones cuantifica el cambio en el potencial químico del soluto (proteína) en respuesta a la adición de un cosolvente a la solución [50].

Los cosolventes que aumentan la estabilidad del estado plegado de las proteínas, son excluidos de la esfera de hidratación preferencial alrededor de la proteína. En presencia de agentes estabilizadores a elevada concentración, las proteínas tratan de minimizar su área superficial permaneciendo en su estado nativo agregándose, para formar un precipitado. Se minimiza así el área superficial del cual los agentes estabilizadores son excluidos. Los agentes desnaturizantes por el contrario tienden a aumentar la solubilidad de las proteínas e interaccionan preferentemente con la superficie de la proteína. En su presencia las proteínas responden aumentando su área superficial desplegándose [51].

1.5 Determinación de los parámetros de desnaturalización

El proceso de desnaturalización reversible de una proteína se puede describir a partir de la constante aparente de equilibrio o constante de desnaturalización K_D para determinadas condiciones de temperatura, pH, fuerza iónica, etc. La constante de equilibrio se puede calcular a partir de la relación que existe entre las especies en el equilibrio, es decir, entre la fracción de proteína en estado desplegado (D) y en estado nativo (N) como se muestra en la siguiente expresión [32,52–56]:

$$K_D = \frac{X_D}{X_N} \quad (4)$$

El comportamiento de propiedades que dependen directamente (entre otras variables) de la concentración de las especies presentes en el sistema, es decir, de la concentración

de proteína en el estado desplegado y en el estado nativo y su relación con la constante de equilibrio se puede representar por medio de la siguiente expresión [32,52–56]:

$$K_{D(T)} = \frac{X_D}{X_N} = \frac{Y - Y_N}{Y_D - Y} \quad (5)$$

En donde X_D , X_N representan la fracción de la proteína en estado desplegado y en estado nativo respectivamente; Y representa la propiedad experimental u observada a una temperatura T ; Y_D , Y_N representan el valor de la propiedad para el estado desplegado y el estado nativo respectivamente. La determinación de los parámetros termodinámicos puede hacerse a partir del estudio de diversas técnicas experimentales como UV, fluorescencia, dicroísmo circular, calorimetría diferencial de barrido, entre otras, siendo las más usadas las propiedades espectroscópicas [32,52–56].

El cambio en la propiedad observable durante la transición está dado por:

$$Y = Y_N X_N + Y_D X_D \quad (6)$$

Donde Y_N y Y_D representan el valor de la propiedad en el estado nativo y desplegado respectivamente; se considera que la señal en ambos estados depende linealmente de la temperatura [32,52–56].

Para el cálculo de la constante de equilibrio se emplea el método de extrapolación lineal, en donde básicamente se toma la región previa a la desnaturalización y la región posterior a la desnaturalización y se hace un ajuste de tipo lineal, esto con el fin de obtener expresiones que permitan describir la señal en el estado nativo y el estado desnaturalizado en términos de la temperatura [32,52–56].

$$Y_N = Y_{N0} + m_{N0} T \quad (7)$$

$$Y_D = Y_{D0} + m_{D0} T \quad (8)$$

Donde Y_{N0} y Y_{D0} son los valores de la propiedad cuando $T=0$ para la proteína nativa y desnaturalizada respectivamente, m_N y m_D son las pendientes de la relación lineal con la temperatura en la región previa a la desnaturalización y en la región posterior a la desnaturalización.

Combinando las anteriores ecuaciones con la ecuación 2, la siguiente relación es obtenida para determinar el valor de la propiedad observable a cualquier temperatura dentro del rango de la transición [32,52–56].

$$Y = \frac{Y_{N0} + m_N T - (Y_{D0} + m_D T) e^{-\frac{\Delta G_D^0}{RT}}}{1 + e^{-\frac{\Delta G_D^0}{RT}}} \quad (9)$$

En la temperatura de desnaturalización (T_m) la fracción de moléculas de proteína en estado nativo y en estado desplegado son iguales y el cambio en la energía de Gibbs es cero, por tanto se cumple la siguiente relación [32,52–56].

$$\Delta G_D^0(T_m) = \Delta H^0(T_m) - T_m \Delta S^0(T_m) = -RT_m \ln K_D = 0 \quad (10)$$

A partir de la relación anterior se puede obtener el valor del cambio de entropía para el proceso:

$$\Delta S^0(T_m) = \frac{\Delta H^0(T_m)}{T_m} \quad (11)$$

Asumiendo que el cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p) de desnaturalización es constante en el rango de temperatura considerado, el cambio de entropía y de entalpía se pueden definir como [32,52–56]:

$$\Delta H^0(T) = \Delta H^0(T_m) + \Delta C_p (T - T_m) \quad (12)$$

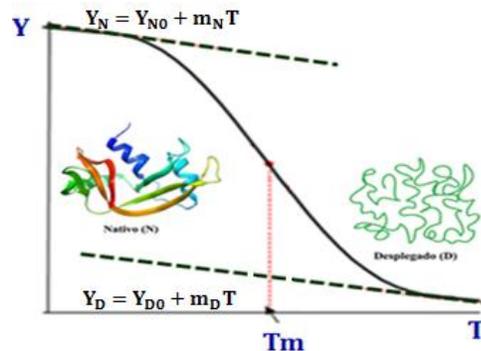
$$\Delta S^0(T) = \Delta S^0(T_m) + \Delta C_p \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \quad (13)$$

Mediante la ecuación de Gibbs-Helmholtz se puede calcular el cambio en la energía de Gibbs a cualquier temperatura dentro del rango considerado [32,52–56]:

$$\Delta G_D^0 = \Delta H_{T_m}^0 \left(1 - \frac{T}{T_m} \right) - \Delta C_p \left[T_m - T + T \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right] \quad (14)$$

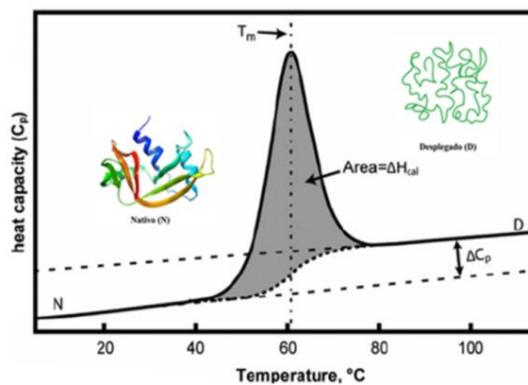
A partir de medidas espectroscópicas y ajustando los datos a la ecuación 9, se pueden obtener los parámetros termodinámicos que permiten describir el proceso de despliegue térmico de la proteína cuando el proceso es reversible.

Figura 3. Representación general del comportamiento de la señal espectrofotométrica durante el proceso de desnaturalización de una proteína [31].



La estabilidad se puede medir también mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Como se muestra en la siguiente figura, esta técnica permite obtener directamente $\Delta H_{(T_m)}$, el cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p) entre el estado nativo y el estado desplegado y también la temperatura de desnaturalización (T_m). Con los datos obtenidos se puede usar la ecuación de Gibbs-Helmholtz y de esta manera obtener los valores de ΔG_D^0 dentro del intervalo de temperatura considerado [29,31,47,56].

Figura 4. Representación de la determinación de los parámetros de desnaturalización por calorimetría diferencial de barrido [57].



1.6 Parámetros de interacción preferencial

El efecto de cosolventes sobre soluciones acuosas de proteínas se puede caracterizar en términos de interacciones moleculares preferenciales entre moléculas de proteína y moléculas de agua cuando se adiciona un cosolvente. Varias teorías han sido propuestas para tratar de explicar el mecanismo por el cual los cosolventes estabilizan o desnaturalizan las proteínas, y entre ellas, el modelo de interacción preferencial planteado por Timasheff ha sido ampliamente utilizado [58].

Según la propuesta, cuando un cosolvente favorece el estado nativo de la proteína, es excluido de los dominios de la superficie de la macromolécula. De esta manera se presenta una interacción mayor entre las moléculas de agua de los niveles de hidratación de la proteína y el cosolvente es excluido. Se genera una estabilización extra que se refleja en el aumento del cambio de la energía de Gibbs de desnaturalización y se dice entonces que la proteína presenta hidratación preferencial. Este efecto se puede cuantificar por el exceso o déficit de cosolvente alrededor de la proteína. Caso contrario ocurre con cosolventes que favorecen el estado desplegado de las proteínas. El cosolvente puede retirar moléculas de agua de los niveles de hidratación de la proteína e inducir el despliegue de la misma, conduciéndola de esta manera al estado desnaturalizado [59].

Timasheff y Arakawa estudiaron la estabilidad de varias proteínas en presencia de cosolventes como lactosa, glucosa, aminoácidos, óxido de trimetilamina, y determinaron que el efecto estabilizante o desnaturalizante de un cosolvente puede explicarse calculando los parámetros interacción preferencial. Estos estudios también demostraron que los parámetros de interacción preferencial dependen entre otros factores de la naturaleza de la proteína, el tamaño y la naturaleza de la superficie y que todos estos factores tienen una incidencia directa en el comportamiento de la interacción e hidratación preferencial de la proteína. Valores positivos de los parámetros interacción preferencial son una medida del aumento en la actividad de la proteína. Este efecto termodinámico es desfavorable y tiene como consecuencia una disminución en la solubilidad de las proteínas y en términos de estabilidad significa que el estado nativo es favorecido, luego se presenta una estabilización en la proteína. Por el contrario un valor

negativo en los parámetros de interacción preferencial indica un efecto termodinámico favorable y tiene como consecuencia un aumento en la solubilidad de las proteínas, y por tanto el estado desnaturalizado se favorece indicando de esta manera que se presenta una desestabilización en la proteína [49,59,60].

Tanto en el estado nativo como en el estado desplegado la esfera de hidratación de la proteína está involucrada; la estructura y el comportamiento de esta esfera puede ser afectada por la presencia de cosolventes. Cuando un cosolvente solvofóbico se adiciona a una solución acuosa de proteína el efecto hidrofóbico es más fuerte y al hacer contacto con las regiones no polares de la proteína se produce un efecto termodinámicamente desfavorable y genera una fuerte hidratación preferencial. Este efecto se ha estudiado en proteínas globulares donde parece ser que las cargas superficiales de la proteína repelen el cosolvente y favorecen la hidratación [61].

Los parámetros de interacción preferencial de los componentes del solvente con la proteína se pueden determinar a partir de medidas de densidad, calculando el volumen parcial específico de la proteína. Este tratamiento debe considerar las siguientes condiciones: la molalidad del cosolvente debe ser igual en la solución sin proteína y en la solución con proteína y el potencial químico del cosolvente sin proteína debe ser igual al potencial químico del solvente con proteína, esta última condición se puede obtener por medio de equilibrios de diálisis [49].

De acuerdo con la notación generalmente aceptada de Scatchard y Stockmayer, en un sistema de tres componentes, el agua se designa como componente 1, la proteína como componente 2, y el cosolvente como componente 3 [62,63]. Cuando la concentración se expresa en unidades termodinámicas, el parámetro de interacción preferencial, ξ_3 puede obtenerse a partir de las siguientes expresiones [64,65]:

$$\xi_3 = \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2} \right)_{T, \mu_1, \mu_3} = \frac{\left(\frac{\partial \rho}{\partial g_2} \right)_{T, P, \mu_3} - \left(\frac{\partial \rho}{\partial g_2} \right)_{T, P, m_3}}{\left(\frac{\partial \rho}{\partial g_3} \right)_{T, P, m_2}} \quad (15)$$

$$\xi_3 = \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2} \right)_{T, \mu_1, \mu_3} = \frac{\rho_o (\phi_2^0 - \phi_2'^0)}{(1 - \rho_o \bar{v}_3)} \quad (16)$$

donde g_i es la concentración del componente i , expresado como gramos de componente i por gramo de agua, μ_i es el potencial químico del componente i , T es la temperatura expresada en Kelvin, P es la presión, ρ_o es la densidad del disolvente de referencia (cosolvente-agua), \bar{v}_3 es el volumen parcial específico del cosolvente, ϕ_2^0 es el volumen parcial específico de la proteína a concentración molal constante del cosolvente, $\phi_2'^0$ es el volumen parcial específico de la proteína a potencial químico constante del cosolvente. Los valores de ϕ_2^0 y $\phi_2'^0$ se obtienen extrapolando a dilución infinitesimal el volumen específico aparente ϕ y medido para cada conjunto de condiciones experimentales [64,65].

El volumen específico aparente ϕ de la proteína se puede calcular a partir de medidas de densidad por medio de la siguiente expresión:

$$\phi = \frac{1}{\rho_o} \left(1 - \frac{\rho - \rho_o}{C_2} \right) \quad (17)$$

ρ_o es la densidad del disolvente de referencia (cosolvente-agua), ρ la densidad de la solución con proteína, y C_2 es la concentración de proteína expresada en gramos por mililitro.

El parámetro de interacción preferencial $\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2} \right)_{T, \mu_1, \mu_3}$ es una medida del exceso del componente 3 en los dominios de la proteína respecto a su concentración en el seno de la solución. Un valor positivo de este parámetro indica un exceso de componente 3; un valor negativo significa una deficiencia del componente 3, que se traduce como un exceso del componente 1 el agua, en el dominio de la proteína, es decir se presenta una hidratación preferencial y el cosolvente es excluido de los dominios de la proteína [60,64,65].

El parámetro de hidratación preferencial, se puede expresar mediante la siguiente relación:

$$\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} = \frac{1}{g_3} \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} \quad (18)$$

Los parámetros de interacción preferencial pueden considerarse también como una expresión directa del cambio en la energía de Gibbs del sistema inducida por la adición de un cosolvente en una solución acuosa de proteína, y se puede relacionar con la composición y el potencial químico mediante la siguiente expresión [64,65]:

$$\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} = -\frac{\left(\frac{\partial \mu_3}{\partial m_2}\right)_{T,P,m_3}}{\left(\frac{\partial \mu_3}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2}} \quad (19)$$

Cuando la proteína y el cosolvente están mezclados en agua, cada uno induce en el otro, cambios en el potencial químico. Cuando se alcanza el equilibrio dentro del sistema se cumple la siguiente expresión [64,65]:

$$\left(\frac{\partial \mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} = \left(\frac{\partial \mu_3}{\partial m_2}\right)_{T,P,m_3} \quad (20)$$

Donde m_i es la molalidad del componente i , μ_i es el potencial químico del componente i siguiendo la notación de Scatchard y Stockmayer. Despejando el numerador de la ecuación 19 y reemplazando en la expresión anterior se obtiene [64,65]:

$$\left(\frac{\partial \mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} = -\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} \left(\frac{\partial \mu_3}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} \quad (21)$$

El último término de la igualdad se puede reemplazar por:

$$\left(\frac{\partial \mu_3}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} = \frac{RT}{m_3} + \left(\frac{\partial \ln \gamma_3}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} \quad (22)$$

Donde γ_3 es el coeficiente de actividad del cosolvente. Reemplazando en la expresión 21 se obtiene [64,65]:

$$\left(\frac{\partial \mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} = - \left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} \left[\frac{nRT}{m_3} + \left(\frac{\partial \ln \gamma_3}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} \right] \quad (23)$$

El parámetro de interacción preferencial y el parámetro de hidratación preferencial se pueden expresar en mol mol^{-1} mediante las siguientes ecuaciones [64,65]:

$$\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} = \frac{M_2}{M_3} \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} \quad (24)$$

$$\left(\frac{\partial m_1}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} = \frac{M_2}{M_1} \left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} \quad (25)$$

Donde M_1 es el peso molecular del agua, M_2 es el peso molecular de la proteína y M_3 es el peso molecular del cosolvente. En la expresión 23, el término diferencial puede obviarse porque experimentalmente se ha comprobado que para concentraciones bajas de cosolvente el valor de este diferencial es mucho más pequeño que el factor $1/m_3$; este término diferencial puede evaluarse por medio del cálculo de los coeficientes osmóticos usando la osmometría y el método isopiástico [60,61,64–66].

Finalmente para evaluar el cambio en el potencial químico de la proteína respecto al cambio de molalidad de cosolvente a temperatura, presión y concentración constante de proteína, se reemplaza cada término de la expresión 23 por los términos ya analizados anteriormente y obviando el término diferencial como se mencionó anteriormente se llega a la siguiente ecuación [64,65]:

$$\left(\frac{\partial \mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} = - \frac{M_2}{M_3} \left(\frac{\rho_o(\phi_2^0 - \phi_2'^0)}{(1 - \rho_o \bar{v}_3)} \right) \left[\frac{RT}{m_3} \right] \quad (26)$$

En la expresión anterior todos los términos se pueden determinar experimentalmente por medio de medidas de densidad y de esta manera se pueden evaluar los parámetros de interacción preferencial.

1.7 Tensión superficial y estabilidad de proteínas

La tensión superficial es una propiedad muy sensible a los cambios en las interacciones moleculares en solución. Los estudios sugieren que el efecto que ejercen los cosolventes sobre la estabilidad de las proteínas es consecuencia de los cambios que inducen en la tensión superficial del solvente y son consistentes con la correlación reportada entre el cambio de la tensión superficial del agua por osmolitos y la estabilización observada de proteínas respecto a la desnaturalización térmica [60,66,67]. Se han presentado muchas propuestas para explicar el efecto de los osmolitos sobre la estabilidad de las proteínas. Entre ellos, algunos autores han propuesto que el efecto estabilizador de los osmolitos es consecuencia del cambio de la tensión superficial de la solución debido a la interacción osmolito-agua y la modificación inducida de la estructura del agua [60,61,66–68].

Sinanoglu y Abdunur plantearon por primera vez en 1965 que la estabilidad de proteínas en solución acuosa se puede relacionar con la energía superficial necesaria para crear una cavidad en el disolvente antes de la introducción de una molécula de proteína [69]. Posteriormente Breslow y Guo en 1990 demostraron que este efecto puede modificarse por la presencia de cosolventes y se vería reflejado sobre la tensión superficial del agua y la energía de solvatación de la proteína [70].

Nicholls y colaboradores en 1991 determinaron que la tensión superficial en sistemas agua-solvente orgánico, la energía libre de transferencia y la energía de formación de cavidad en el solvente para una serie de alcanos lineales, proporcionan información sobre el efecto hidrofóbico que interviene marcadamente en la estabilidad y el plegamiento de proteínas [68].

El resultado de estos estudios está en acuerdo con los resultados obtenidos por Lee y Timasheff en 1981, quienes analizaron el comportamiento de la tensión superficial para soluciones acuosas de proteínas en presencia de sacarosa y su relación con la estabilidad frente a la desnaturalización térmica. Se encontró que la temperatura de transición T_m , de las proteínas en presencia de sacarosa ocurría a valores constantes de tensión superficial, y las proteínas desplegadas exhibían valores constantes en la energía libre de formación de cavidad [71].

Timasheff y colaboradores determinaron que cosolventes como azúcares, aminoácidos y varias sales inorgánicas, son preferencialmente excluidas de la superficie de las proteínas ejerciendo un aumento en la tensión superficial. Una buena correlación entre los parámetros de interacción preferencial y el incremento en la tensión superficial en presencia de estos cosolventes llevó a proponer que este parámetro puede explicar porqué termodinámicamente la interacción de estos cosolventes con la proteína es un proceso energéticamente desfavorable [59,71–73]. Estas observaciones han sugerido que la estabilización de las proteínas por estos cosolventes es debido al aumento de la tensión superficial en su presencia con respecto a la tensión superficial del agua.

Varias moléculas, sin embargo, que elevan la tensión superficial del agua, han presentado una pobre correlación entre los parámetros de interacción preferencial y el comportamiento de la tensión superficial. Kita y colaboradores determinaron que no existe una relación clara entre estos parámetros y el comportamiento de la tensión superficial para la proteína BSA en presencia de ArgHCl y LysHCl [74].

En el grupo de investigación se ha analizado el comportamiento superficial de las proteínas globulares β -Lactoglobulina, α -Lactoalbúmina y α -quimotripsinógeno A en presencia de cosolventes [75–77]. En general se observa que los cosolventes que ejercen un efecto estabilizador sobre la estructura de la proteína como eritritol, inositol, xilitol, sorbitol, y glucosa aumentan la tensión superficial del agua y la temperatura de desnaturalización de la proteína. Para el etilenglicol, se observa que la temperatura disminuye y la tensión superficial disminuye con el aumento de la concentración del poliol mientras que el glicerol muestra un comportamiento complejo [75–77].

1.8 Adsorción de proteínas en la interfase líquido-aire

Las proteínas son moléculas que estructuralmente presentan carácter anfifílico, por lo que tienden a concentrarse en la interfase aire / líquido comportándose como tensoactivos y por esta razón se utilizan como estabilizadores de dispersiones, incluidas espumas y emulsiones [67,78–80].

La adsorción de proteínas es un proceso complejo que depende de varios factores como la estructura de la proteína, las fuerzas intermoleculares entre las moléculas adsorbidas y el solvente, las interacciones soluto-soluto y solvente-solvente y la adición de cosolventes. La actividad superficial de una proteína se rige por la hidrofobicidad y la flexibilidad de la molécula. La hidrofobicidad de la superficie controla la tendencia de la molécula a adsorberse en la interfase, mientras que la flexibilidad ayuda a la molécula a aumentar el tiempo de residencia en la superficie porque las moléculas en la superficie suelen sufrir cambios conformacionales que pueden inducir el despliegue de la proteína [81–85].

La adsorción de proteínas en la interfase aire-agua es un proceso dinámico que implica varias etapas distintas que incluyen procesos de difusión, orientación y reorganización de las moléculas de proteína. El tiempo de cada etapa depende de la naturaleza de las proteínas, de las condiciones experimentales, incluyendo la presencia de cosolventes y del efecto dominante durante el intervalo de tiempo considerado [81–85]. Dentro de las etapas se incluye la difusión a la interfase aire-líquido, la adsorción y penetración de nuevas moléculas en la capa adsorbida y reordenamientos con cambios conformacionales de las moléculas adsorbidas. Algunos autores incluyen una etapa inicial de inducción, que se ha observado experimentalmente en algunos sistemas [84].

A baja concentración de proteína, usualmente no se observa una barrera energética para que la proteína alcance la interfase. Se puede considerar que durante la primera etapa, la difusión es el efecto dominante. Después de algún tiempo, la concentración de proteína en la interfase aumenta y la velocidad del proceso es controlada por la adsorción de la proteína. Dependiendo del sistema se puede producir reorientación y cambios conformacionales en la proteína.

El objetivo de varios estudios de adsorción de proteínas ha sido entender la variación de los distintos procesos que contribuyen a que la presión superficial alcance su máximo valor. El exceso superficial o concentración superficial en la interfase aire-agua se expresa mediante la relación de Gibbs que describe la isoterma de adsorción [81]:

$$\Gamma = - \frac{1}{RT} \left(\frac{d\gamma}{d \ln C_b} \right) \quad (27)$$

Γ es la concentración superficial, γ es la tensión superficial, R es la constante universal de los gases, T la temperatura y C_b es la concentración en el seno de la solución.

La presión superficial π definida como la diferencia entre la tensión superficial del solvente γ_0 y la tensión superficial de la solución de proteína γ , y la concentración superficial se pueden relacionar mediante las siguientes expresiones [81]:

$$-A \frac{d\pi}{dA} = \Gamma \frac{d\pi}{d\Gamma} \quad (28)$$

$$\frac{d\Gamma}{dt} = \left(\frac{d\Gamma}{d\pi} \right) \left(\frac{d\pi}{dt} \right) \quad (29)$$

La expresión 28 relaciona la variación en la presión superficial con la concentración y el área (A) que ocupan las moléculas en la interfase y la expresión 29 relaciona la variación de la concentración en la interfase respecto al tiempo con la variación en la concentración y la presión en la interfase [81].

Algunos autores han demostrado que la velocidad de cambio de la presión superficial π depende de la estructura de la proteína. Moléculas flexibles como la apolipoproteína del suero de rata o la E-caseína generan una disminución más rápida en la tensión superficial del disolvente que las proteínas globulares en condiciones similares [86,87].

Generalmente, cambios en la presión superficial durante un periodo prolongado de tiempo han sido asignados a una disminución de la penetración de moléculas de proteína en la superficie, acompañada de un reordenamiento lento de las moléculas en la región superficial. El proceso global de adsorción se puede analizar por el comportamiento del sistema en términos de los siguientes pasos [81]:

1. Si π y Γ cambian, el proceso es controlado por la difusión de moléculas de proteína desde el seno de la solución a la región interfacial.

2. Si π y Γ cambian y el valor de la energía superficial es positiva, se presenta el fenómeno de adsorción de moléculas desde la superficie a la interfase acompañado de un reordenamiento de moléculas en esta región.

3. Si π cambia y Γ permanece constante, se presentan cambios conformacionales en la capa adsorbida.

Cada una de estas etapas puede representarse por ecuaciones semi-empíricas que pueden dar una buena aproximación a los modelos de adsorción. Sin embargo se debe tener en cuenta que el comportamiento de las proteínas en la interfase aire-agua depende de muchos factores que incluyen la cinética del proceso, la temperatura la presión, el pH, la naturaleza de la proteína y de los cosolventes [81].

Se han utilizado dos modelos cinéticos generales para describir la adsorción de proteínas asumiendo que no hay convección debido a gradientes térmicos o de concentración [77,84,85,88,89].

Modelos de tres etapas:

1. La proteína se mueve rápidamente desde el seno de la solución a la superficie y la velocidad del proceso está controlado por difusión.
2. En un segundo paso, la molécula de proteína se adsorbe en la interfase.
3. Un tercer paso en el que a través de un proceso lento puede inducir cambios en la estructura tridimensional y reordenamiento molecular de la proteína adsorbida. En este paso puede ocurrir un desdoblamiento parcial.

Modelos de dos etapas:

1. La proteína pasa de la solución a la interfase fluida de una manera rápida generalmente controlada por difusión.
2. Un paso más lento que implica reorganización y desnaturalización.

La etapa uno correspondiente a un proceso rápido controlado por la difusión, se puede representar por la siguiente expresión:

$$\pi(t) = 2kTC_b \sqrt{\frac{Dt}{3,14}} \quad (30)$$

C_b es la concentración de proteína en el seno de la solución, D la difusividad de la proteína en la solución, t es el tiempo de formación de la gota, k es la constante de Boltzman y π es la presión superficial.

La etapa dos y la etapa tres que representan básicamente la adsorción y el rearrreglo de las moléculas adsorbidas en la interfase se pueden representar mediante ecuaciones semiempíricas de primer orden que se pueden expresar por la siguiente ecuación:

$$\ln \frac{\pi_f - \pi_t}{\pi_f - \pi_o} = -kt \quad (31)$$

Donde π_f y π_o son las presiones superficiales en el tiempo final e inicial de cada etapa, respectivamente: π_t es la presión a cualquier tiempo, t es el tiempo medido de formación de gota y k es la constante cinética de primer orden.

Para proteínas globulares pequeñas a baja concentración, se acepta generalmente que la adsorción en la interfase aire-agua se produce en dos pasos principales: difusión y reordenamiento. Sin embargo, la tasa de adsorción depende también de la naturaleza de la proteína, el disolvente, el pH, cosolventes y otros factores como la temperatura. En sistemas que contienen proteínas y cosolventes, puede producirse una adsorción competitiva en la interfase entre las dos clases de moléculas [88,90–92].

Varios estudios han demostrado que el efecto de las sales sobre la estabilidad de las proteínas depende de la concentración y naturaleza química de la sal, sin embargo, el comportamiento es complejo debido al diferente tipo de interacciones específicas y no específicas entre los iones y la proteína [72,93–95].

1.9 Características del sistema estudiado

1.9.1 Soluciones acuosas de electrolitos

Los electrolitos existen como disoluciones de ácidos, bases o sales. Según el grado de disociación los electrolitos se dividen básicamente en dos grupos; electrolitos fuertes y electrolitos débiles. Los electrolitos en solución, se separan en iones de signo contrario; la carga de cada ion es igual a su valencia y el número total de cargas positivas y negativas en la solución son iguales cumpliéndose el principio de electroneutralidad. En compuestos iónicos los iones existen en todo momento, aún en estado sólido, por eso, cuando se funden los cristales iónicos, los iones también quedan libres para conducir la corriente. Al disolverse en agua los iones se separan de la red cristalina y son rodeados por las moléculas de agua para sufrir el proceso de hidratación. Luego de este proceso se puede considerar cada ion como una partícula individual cargada [96].

Las propiedades termodinámicas de las soluciones de electrolitos dependen de la naturaleza y la carga de los iones en solución. Una correlación analítica generalizada se presentó para el coeficiente de actividad, coeficiente osmótico, entalpía y capacidad calorífica de sales y otros electrolitos fuertes por Leroy en 1973. A partir de datos experimentales y empleando el modelo de Debye-Hukel modificado por Pitzer, plantea un nuevo parámetro que relaciona el coeficiente de actividad con las interacciones de corto alcance de tipo binario que se pueden presentar en las soluciones acuosas de sales. La introducción de este parámetro para la predicción de coeficientes de actividad está en muy buen acuerdo con los coeficientes de actividad experimentales [97].

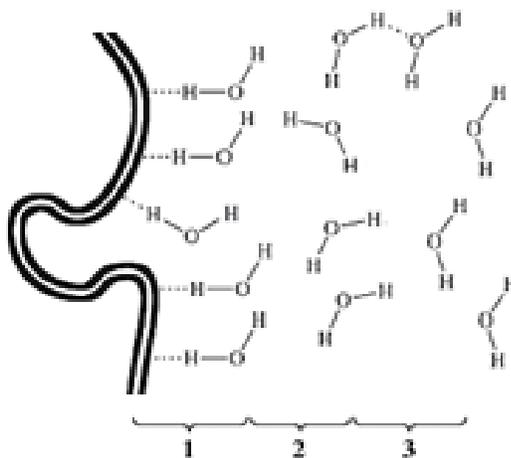
Adicionalmente, el modelo permitió calcular coeficientes osmóticos y coeficientes de actividad para sales en solución acuosa que hasta ese entonces no habían sido analizadas. El autor analiza los resultados en términos de la naturaleza y carga de los iones deduciendo que el comportamiento de las propiedades termodinámicas de las soluciones acuosas de electrolitos depende en sí de la naturaleza de los iones en solución; cada ion actúa de manera distinta sobre la estructura del agua y esto se ve reflejado en la variación de estas propiedades [97].

Efectos específicos de iones se producen en soluciones acuosas simples de electrolitos. Propiedades tales como la viscosidad, densidad, índice de refracción, capacidad calorífica, coeficiente de actividad, disminución del punto de congelación y elevación del punto de ebullición, y la presión osmótica, dependen de la naturaleza, la composición y las concentraciones de la sal presentes en el medio [98]. Existe una variedad de información acerca de la hidratación de los iones en solución. Varios estudios hacen referencia al número de moléculas de agua que se unen a los iones y su distribución. Desafortunadamente los datos no son claros; existen varios métodos de medición de los diferentes aspectos de la hidratación iónica y, por tanto, se presenta una diferencia entre las fuentes de información. Además, las moléculas de agua que se unen a un ion, disminuyen con el aumento de la temperatura y la concentración, y varían con la naturaleza de los contra-iones y cualquier otra sustancia presente [99].

El agua es un líquido altamente estructurado y hay poco acuerdo sobre la forma de representar su estructura y cómo determinarla experimentalmente. La presencia de cualquier soluto puede alterar la estructura del agua, modificando el equilibrio que se puede presentar entre el agua estructurada y el agua menos estructurada. En el caso de las sales en solución acuosa esta alteración es función de la carga y el radio del ion. Los iones que desestabilizan y rompen la red de puentes de hidrógeno en el agua se denominan caótopos y los iones que tienen el efecto contrario se denominan cosmótopos. En el caso de las proteínas, la esfera de solvatación está relacionada directamente con la composición del medio, luego la presencia de sales en solución es un factor que repercute directamente sobre el comportamiento de esta esfera de hidratación y sobre los estados plegado y desnaturalizado de las proteínas [49].

Una proteína en solución acuosa puede presentar diferentes capas de hidratación. La primera capa, inmediatamente frente a la superficie de la proteína, es la capa de solvatación, seguido por una capa de transición, y las capas del seno de la solución. La estructura específica, la carga, y la composición de la proteína determinan las características de la capa de solvatación, mientras que la composición y las propiedades de la solución determinan el comportamiento de la capa del seno de la solución. La primera y tercera capa, compiten por los puentes de hidrógeno con la segunda capa [98].

Figura 5. Representación de las tres capas de hidratación de una proteína en solución acuosa. 1- capa de solvatación, 2- capa de transición, 3- capa del seno de la solución [98].



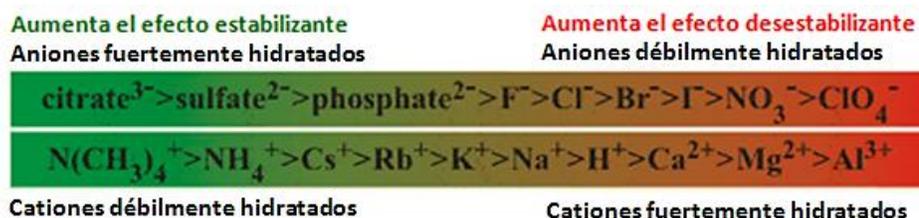
La presencia de iones en solución puede influir sobre la capacidad de la capa de transición para solvatar la superficie de la proteína. Los iones cosmótopos en la solución de proteína, distorsionan la red de moléculas de agua y promueven una reducción en la capa de transición llevando consigo a una reducción en el volumen de la capa solvatación. Esto conduce a la proteína a un estado más compacto y en términos de estabilidad, se presenta una estabilización extra por este efecto y se favorece el estado nativo de la proteína. De otro lado, la presencia de iones caótopos promueve la desnaturalización de las proteínas. Este efecto se debe principalmente a la ruptura de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua de la capa de solvatación y la capa de transición por efecto de estos iones, lo cual conduce a la proteína a un estado desplegado para compensar el efecto deshidratante de estos iones [100].

Un estudio detallado del efecto de iones sobre la estabilidad de proteínas fue llevado a cabo por Franz Hofmeister entre 1880 y 1890. Analizó el efecto de una serie de sales y su capacidad para precipitar una mezcla de proteínas de la clara de huevo. El proceso de precipitación fue analizado por Hofmeister en función de la capacidad de los iones para formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua que hidratan la proteína. Luego de estos estudios Hofmeister propuso una serie para ordenar los aniones y los cationes en orden decreciente respecto a la capacidad de estabilizar o desnaturalizar proteínas.

La serie fue publicada en 1888 y demostró en estudios posteriores tener una buena utilidad para predecir comportamientos de propiedades de soluciones acuosas de proteínas en presencia de sales [94].

Los iones que estabilizan a las proteínas, aumentan la tensión superficial del solvente, disminuyen la solubilidad, pueden producir salting-out y en general favorecen el estado nativo de las proteínas. Los iones que desnaturalizan las proteínas disminuyen la tensión superficial, aumentan la solubilidad, producen salting-in y favorecen el estado desplegado de las proteínas [100]. La serie de Hofmeister fue el punto de partida para proponer un nuevo modelo que sirviera para predecir el comportamiento de sales sobre la estabilidad de proteínas. En 2004 Collins propone un modelo basado en los calores de hidratación de los iones en solución conocido como el modelo de congruencia de la afinidad de los iones por el agua [101].

Figura 6. Serie de Hofmeister y descripción del efecto de los iones sobre la estabilidad de proteínas en función de sus características de hidratación [100].

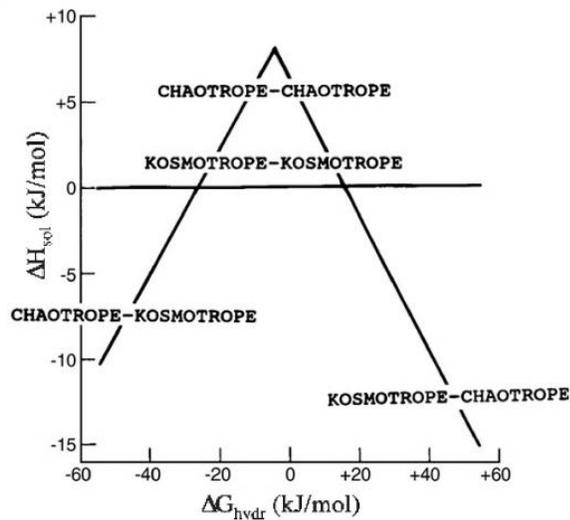


Collins propone que para los iones de valencia individual, hay una fuerte atracción de iones de tamaño similar en comparación con iones de diferente tamaño en agua. El modelo se refiere a la capacidad de los iones de carga opuesta para formar pares iónicos en solución y a la diferencia de energía de Gibbs de hidratación de los iones que constituyen la sal. La distinción aproximada de aniones y cationes en cosmótopos (K) o caótopos (C) conduce a cuatro posibles combinaciones: catión (K)- anión (C) como LiI, catión (C) - anión (K) como RbF, catión (K)-anión (K) como LiF, catión (C) - anión (C) como CsI. Collins propone una gráfica de ΔH de solución para haluros de metales alcalinos en función del cambio en la energía de Gibbs de hidratación para el par iónico anión - catión. El resultado es una gráfica denominada gráfica de volcán, la cual sirve

para predecir el comportamiento de este tipo de sales en solución acuosa respecto al efecto en la estabilidad de proteínas [101]. Según el modelo, la entalpía de solución de sales compuestas por iones caótropro- caótropro o cosmótropro-cosmótropro tiende a ser positivo. Para que la entalpía de solución sea negativa se necesita que la sal esté compuesta por iones caótropro-cosmótropro [101].

La serie de Hoffmeister y el modelo de Collins permiten hacer predicciones del efecto que pueden ejercer las sales sobre la estabilidad de las proteínas, lo cual ha sido de gran utilidad en procesos de obtención y purificación de proteínas. Los efectos de sales sobre enzimas liofilizadas han demostrado buen acuerdo entre estos modelos y los resultados experimentales. Ru y colaboradores emplearon predicciones basadas en la serie de Hofmeister para activar la enzima proteasa alcalina luego del proceso de liofilización [102].

Figura 7. Gráfica de volcán para haluros de metales alcalinos [101].



Para este fin emplearon sales de sodio y de potasio variando el anión. Los resultados obtenidos están de acuerdo con las predicciones hechas por la serie de Hofmeister: a medida que aumentaba el carácter cosmótropro del anión, la enzima liofilizada en presencia de estas sales presentaba una mayor actividad enzimática en comparación con sales de aniones caótropros y en comparación con la enzima sin presencia de sal [102].

La serie de Hofmeister como se mencionó anteriormente permite hacer predicciones del efecto de las sales sobre la estabilidad de las proteínas, pero las predicciones no siempre concuerdan con los resultados experimentales. La serie fue propuesta inicialmente para proteínas cuya carga superficial es negativa, es decir proteínas que en el medio están a un valor de pH mayor a su punto isoeléctrico y para proteínas que tienen un carácter hidrofóbico en la superficie. Cuando el valor de pH es menor al punto isoeléctrico de la proteína esta presenta una carga superficial positiva y la serie de Hofmeister presenta discrepancias respecto a los resultados experimentales. No solo el valor de pH influye en los resultados; varios autores han reportado series de Hofmeister invertidas o alteradas que demuestran que el orden de la serie también depende de factores como la concentración de electrolito, la polaridad y la carga superficial de la proteína; todos estos factores influyen directamente sobre las interacciones que pueden establecer los iones con los grupos superficiales de la proteína y con las moléculas de agua que hacen parte de la esfera de solvatación de la proteína [103–108].

1.9.2 Proteína α -quimotripsinógeno A

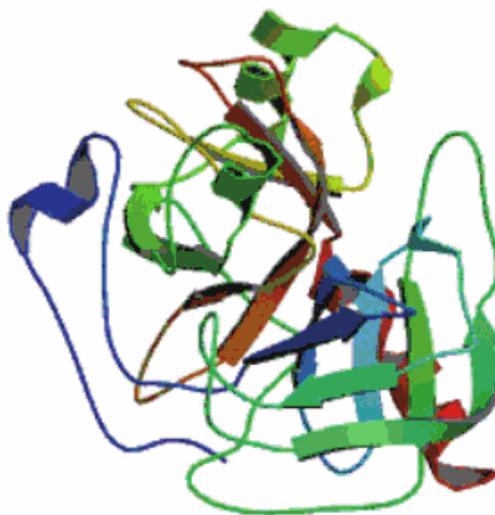
La proteína α -quimotripsinógeno A es una proteína globular con una masa molecular de 25,7 kDa y está formada por una única cadena polipeptídica de 245 residuos de aminoácidos. Contiene en su estructura 5 puentes disulfuro distribuidos de la siguiente manera: cys1- cys 122, cys 42- cys 58, cys 136 – cys 201, cys 168 – cys 182, cys 191 – cys 220. Su estructura se compone de 9% de α hélice y 34% de hojas β [53,109].

Esta proteína tiene gran importancia biológica porque es la forma inactiva o zimógeno de la enzima quimotripsina. Se produce en las células acinares del páncreas. Luego de ser sintetizada por los ribosomas unidos al retículo endoplasmático rugoso al igual que muchas otras proteínas, termina su maduración en el complejo de Golgi y finalmente es almacenada en gránulos rodeados de membrana o gránulos de zimógeno [34].

El punto de isoelectrico de esta proteína ha sido determinado por diferentes investigadores empleando diferentes métodos. Aunque son varios los valores del punto isoelectrico registrados, se puede concluir que el punto isoelectrico se encuentra en un intervalo entre 8,0 y 9,5. [110–115].

La temperatura media de desnaturalización T_m para el α -quimotripsinógeno A al igual que cualquier otra proteína depende de las condiciones del medio como el pH, la fuerza iónica entre otras. Chalikian y colaboradores analizaron el efecto del pH sobre la temperatura media de desnaturalización encontrando que a pH 4 $T_m = 62^\circ\text{C}$ y a pH 7 $T_m = 50^\circ\text{C}$ [53].

Figura 8. Estructura tridimensional de la proteína α -quimotripsinógeno A. tomada del Proteín Data Bank, PDB IB 1EX3: obtenida por difracción de rayos X con resolución de 3,00 Å [116].



Brandts y colaboradores reportan valores de T_m y otros parámetros termodinámicos en función del pH para esta proteína, obtenidos a partir de calorimetría diferencial de barrido. Determinan de esta manera que no solo la temperatura media de desnaturalización es fuertemente dependiente del pH sino que también parámetros como el cambio en la capacidad calorífica y la entalpía del proceso dependen de este factor [117].

Tabla 1. Valores de parámetros termodinámicos en función del pH para la proteína α -quimotripsinógeno A, determinados a partir de calorimetría diferencial de barrido [117].

pH	^a Temp (°C)	Direct Calorimetric Anal.		Calorimetric van't Hoff Anal.
		^b ΔH° (kcal)	ΔC_p (cal/mole deg)	^b ΔH° (kcal)
1.95	40.6	103	4200	94
2.03	42.0	102	3300	98
2.08	42.0	99	3900	98
2.59	48.0	126	3200	126
2.99	53.9	145	2800	133
3.02	54.2	135	2800	137

^aTemp hace referencia a la temperatura media de desnaturalización.

^b Los valores de entalpia están reportados para soluciones de concentración 1,85 % de proteína.

Se han realizado varios estudios acerca de la estabilidad termodinámica del α -quimotripsinógeno en diferentes condiciones experimentales y en presencia de diferentes cosolventes. Los estudios realizados por Khan con alcoholes monohidroxilados demostraron que estos cosolventes tienen un efecto desnaturalizante sobre la proteína [118]. Urea y alquilureas también presentan un efecto desnaturalizante según los estudios de Poklar [119]. La sacarosa presenta un efecto estabilizante según los estudios realizados por Timasheff, quien analizó el efecto de la sacarosa sobre varias proteínas incluida el α -quimotripsinógeno A y determinó que la sacarosa presenta un efecto estabilizante sobre esta [59]. Estudios con polioles realizados por Romero y Abella demostraron que el etilenglicol presenta un efecto desestabilizante sobre el α -quimotripsinógeno A y que los polioles glicerol, eritritol, sorbitol e inositol presentan un efecto estabilizante que se incrementa a medida que el número de grupos hidroxilo aumenta [56,120].

Al igual que todas las proteínas, la conformación, estabilidad y solubilidad del α -quimotripsinógeno son parámetros sensibles a la composición del solvente. El efecto de las sales en estas propiedades de las proteínas en solución acuosa depende fuertemente de las especies iónicas presentes [72]. Los estudios acerca de la estabilidad termodinámica de esta proteína son abundantes, sin embargo no existen muchas

investigaciones que ilustren claramente el efecto de algunos electrolitos sobre la estabilidad del quimotripsinógeno.

El efecto de salting-out inducido por altas concentraciones de sulfato de amonio y citrato de sodio para la lisozima y α -quimotripsinógeno A, fue analizado por Coen y colaboradores. En el estudio se empleó la técnica de dispersión de luz láser de bajo ángulo (low-angle laser-light scattering DILLS) para seguir el comportamiento del proceso salting-out en función del pH. Los resultados determinaron que a bajos valores de pH y altas concentraciones de sulfato de amonio la cantidad de proteína presente en la fase acuosa o sobrenadante aumenta y lo contrario ocurre con el aumento del pH. Este mismo efecto se observó para soluciones de proteína en presencia de citrato de sodio. Los resultados obtenidos fueron analizados en términos de interacciones moleculares y se concluyó que el proceso salting-out es reversible y es fuertemente dependiente del pH [121].

Osborne y colaboradores analizaron el efecto del ion Ca^{++} en las proteínas α -quimotripsinógeno A y α -quimotripsina. Los autores emplearon pH alcalino para producir la precipitación de las proteínas y por medio de la adición de Ca^{++} solubilizaron nuevamente las proteínas. Los resultados obtenidos demostraron que este ion actúa como agente desnaturizante de las proteínas y que en el precipitado básicamente rompe las asociaciones entre moléculas de proteína [122].

Los efectos del pH y la concentración de NaCl en las interacciones proteína-proteína en soluciones de lisozima y α -quimotripsinógeno fueron investigados por dispersión de luz estática (SLS) y por ángulo de dispersión de neutrones (SANS) por Velez y colaboradores. Los resultados obtenidos determinaron que el NaCl es estabilizante de estas dos proteínas y que la formación de cristales de proteína es favorecida en presencia de bajas concentraciones de electrolito. Los autores trataron los datos por medio de la teoría de McMilan-Mayer y calcularon el segundo coeficiente virial de las proteínas B_{22} el cual es un coeficiente de interacción que los autores relacionan directamente con la cantidad de NaCl y el comportamiento de los diferentes sistemas. A baja concentración de electrolito, los valores del coeficiente virial dependen en gran medida del pH y cambian de positivo a negativo con el aumento de pH. Todos los

coeficientes a alta concentración de sal son ligeramente negativos y dependen débilmente del pH [123].

Allison estudió el proceso de agregación del α -quimotripsinógeno, cuando la proteína es sometida a un proceso de liofilización y rehidratación en presencia de tiocianato de sodio. Los resultados obtenidos por calorimetría diferencial de barrido y espectroscopía infrarroja indicaron que el NaSCN se comporta como agente desnaturizante cuando la proteína es sometida a rehidratación, luego del proceso de liofilización en presencia de NaSCN se producen agregados, caso contrario ocurre en ausencia de NaSCN. Los autores atribuyen este efecto a una alteración de la estructura secundaria en presencia de esta sal [124].

El efecto de las sales KClO_4 , Na_2SO_4 , K_3FeCN_6 , KCl y alcoholes sobre la estabilidad termodinámica del α -quimotripsinógeno en presencia de urea 2M y pH 2, fue analizado por Khan y colaboradores. Los resultados obtenidos por dicroísmo circular y fluorescencia demostraron que estas sales se comportan como desnaturizantes o estabilizantes de acuerdo a la serie de Hofmeister. A 222 nm se determinaron valores de elipticidad para la proteína en presencia de diferentes cosolventes y se obtuvieron los siguientes resultados: con Na_2SO_4 y KCl un valor de 7300, para KClO_4 un valor de 7700 y para K_3FeCN_6 un valor de 7800; estos resultados junto con los valores obtenidos de concentración media de desnaturización mostraron que las sales Na_2SO_4 , KCl se comportan como estabilizantes y las sales KClO_4 , K_3FeCN_6 tienen efecto desnaturizante. El autor atribuye los dos efectos a los aniones de estas sales, lo cual estaría en acuerdo con la serie de Hofmeister [118].

Chervenka analizó el efecto de las sales KCl, MgCl_2 , CaCl_2 , SrCl_2 , K_2SO_4 y MgSO_4 sobre el efecto desnaturizante de la urea en la proteína α -quimotripsinógeno empleando medidas de UV-Vis. Los resultados indicaron que las sales KCl, MgCl_2 , K_2SO_4 , MgSO_4 actúan como estabilizantes; una disminución en la constante global de desnaturización en comparación con el valor de la constante global de desnaturización en presencia de urea indicaría que el estado nativo de la proteína se favorece en presencia de estas sales cuando se trata con un agente desnaturizante como la urea. Las sales CaCl_2 y SrCl_2 se comportan como desnaturizantes dado que se presentó un aumento en el valor de la

constante global de desnaturalización. En el caso de estas dos sales en comparación con los otros cloruros analizados, los autores atribuyen el efecto desnaturalizante a los cationes, lo cual estaría de acuerdo con la serie de Hoffmeister en donde estos cationes se presentan como desestabilizantes de proteínas [125].

La desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno fue analizada en función del pH y la concentración de NaCl por Brandts y colaboradores empleando medidas de espectroscopía ultravioleta. Los resultados indicaron que se presenta un equilibrio reversible en el intervalo de pH 2,0-3,6 y a concentración de NaCl 0,001 M. A concentraciones mayores a 0,001 M se forma un precipitado por disminución en la solubilidad. Los resultados sugieren que esta sal se comporta como estabilizante de esta proteína. Estos resultados estarían en acuerdo con el efecto del anión y del catión en la serie de Hoffmeister y los resultados serían confirmados por Kroetsch en 2012 [126, 127].

Estudios con polietilenglicol (PEG 1000) mostraron que la proteína en presencia de este cosolvente presenta una mayor interacción con moléculas de agua y que el parámetro de interacción preferencial entre el polietilenglicol (PEG 1000) y la proteína tiene un valor negativo indicando de esta manera que el polietilenglicol es excluido de los dominios de la proteína generando un efecto estabilizante [128].

Estudios del α -quimotripsinógeno A en presencia de polioles indican que el eritritol, sorbitol e inositol presentan valores negativos de unión preferencial y los valores se incrementan con el aumento de la concentración del polioliol, indicando de esta manera que estos polioles son excluidos del dominio de la proteína, favoreciendo la hidratación preferencial de la proteína, es decir se presenta un aumento de las moléculas de agua que interactúan con la superficie de la proteína favoreciendo el estado nativo y actúan como cosolventes estabilizantes de la proteína. El efecto contrario se presenta en el caso del etilenglicol y del glicerol los cuales actúan como agentes desnaturalizantes y presentan valores positivos de unión preferencial [120]. Es importante señalar que el glicerol ejerce un efecto complejo que ha sido observado en varios estudios actuando algunas veces como desestabilizante y otras como estabilizante, dependiendo del sistema considerado [56,75,77,120].

2. Métodos experimentales

2.1 Reactivos y equipos

2.1.1 Reactivos

α -Quimotripsinógeno A tipo II, libre de sales, polvo liofilizado cristalizado 6 veces (Sigma)

Cloruro de sodio $\geq 99,5$ % (Sigma)

Cloruro de potasio $\geq 99,0$ % (Sigma)

Nitrato de amonio $\geq 99,0$ % (Merck)

Sulfato de amonio $\geq 99,0$ % (Sigma),

Ácido clorhídrico 37% Grado analítico (Merck)

Ácido fosfórico 85% Grado analítico (Merck)

Agua purificada y desionizada con una conductividad menor a $1 \mu\text{S cm}^{-1}$

Membranas de diálisis Spectra/Por^R. Membrana de celulosa.

2.1.2 Equipos

Balanza Mettler Toledo AT 261 de rango dual y sensibilidad de $\pm 1 \times 10^{-5}$ g en el rango bajo de pesada entre 0 y 60 g.

Purificador de agua Barnstead Easy-Rodi DI 3321 que genera agua tipo 1 con conductividad menor a $1 \mu\text{S cm}^{-1}$.

Baño de ultrasonido Cole Palmer 8895-25 que permite desgasificar soluciones y disolventes.

pH meter OAKTON ION 700 con una precisión de $\pm 0,01$ unidades de pH.

Espectrofotómetro UV-Vis Lambda 20 PERKIN ELMER con rango de longitud de onda de 200 a 900 nm, sistema de doble haz con precisión de $\pm 0,003$ unidades de absorbancia acoplado un sistema de control de temperatura tipo Peltier con una precisión de $\pm 0,1$ K.

Microcalorímetro Setaram μ DSC7 evo. Según el fabricante, el instrumento tiene una resolución de 0,015 a 0,0015 μ W, la precisión en temperatura es de $\pm 0,15$ K y la precisión calorimétrica es de $\pm 0,7\%$. El calorímetro se calibró utilizando naftaleno puro.

Densímetro de tubo vibrante Anton Paar DSA 5000M que opera a una frecuencia de 3 MHz. El instrumento se calibró de acuerdo con las recomendaciones del fabricante realizando una calibración típica con aire, agua desgasificada y ultrapura a 293,15 K antes de cada serie de medidas. La incertidumbre en las mediciones de temperatura es $\pm 0,01$ K, de densidad es $\pm 1,5 \cdot 10^{-4}$ g cm⁻³ y de velocidad de sonido es 0,5 m s⁻¹.

Tensiómetro Lauda TVT-2 de volumen de gota. El volumen de la jeringa de inyección es de 2,50 mL y el diámetro externo de la punta es 1,380 mm. El equipo está acoplado a un baño termostatado LAUDA E100 de circulación que permite un control de temperatura de $\pm 0,01$ K. La calibración del tensiómetro se realizó con agua pura a 298,15 K. En estas condiciones la incertidumbre es $\pm 0,01$ mN/m.

2.1.3 Preparación de soluciones

Las soluciones se prepararon por pesada, usando agua previamente purificada y desgasificada. Las soluciones buffer se prepararon a partir de los ácidos concentrados realizando las respectivas diluciones para obtener concentraciones 0,010 M de ácido fosfórico y clorhídrico. Se preparó una solución stock de α -quimotripsinógeno A disolviendo la proteína en soluciones buffer de pH 2,00, pH 3,00 y en agua pH 3,50 para obtener la concentración adecuada.

Las soluciones de electrolito se prepararon también por pesada empleando como disolvente solución buffer o agua. Los estudios en presencia de electrolitos se hicieron diluyendo la solución de proteína en las soluciones de electrolito para obtener la concentración final de proteína.

La concentración de proteína en las soluciones fue determinada por espectroscopía UV-Vis empleando un coeficiente de extinción de $\mathcal{E}_{280} = 1,97$ mL mg⁻¹ cm⁻¹. Las medidas se realizaron a una longitud de onda de 280 nm que corresponde a la longitud de onda de máxima absorción del α -quimotripsinógeno A.

2.2 Espectroscopía UV-Vis

La longitud de máxima absorción del α -quimotripsinógeno fue determinada por UV-Vis obteniendo un valor de 280 nm. A partir de este valor y empleando la ley de Lambert – Beer, se verificó la concentración de proteína en las soluciones empleadas para este estudio.

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot b} \quad (32)$$

Donde c es la concentración de proteína expresada en g/mL, ε_{280} es el coeficiente de extinción con valor de $1,97 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm, A es la absorbancia y b es el paso óptico de la celda de 1,0 cm. Los perfiles de desnaturalización térmica de la proteína en presencia de electrolitos y diferentes valores de pH se determinaron a 280 nm empleando un espectrofotómetro UV-Vis [53,117]. El calentamiento se realizó desde 293,15 K hasta 360,15 K con una velocidad de calentamiento de $1,0 \text{ K min}^{-1}$. Las celdas empleadas para realizar las mediciones fueron celdas de cuarzo y la concentración de proteína en las soluciones de estudio fue de $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$. Las concentraciones de NaCl, KCl y NH_4NO_3 se trabajaron en un intervalo de 0,010 hasta $0,050 \text{ mol kg}^{-1}$; en el caso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ las concentraciones fueron más bajas y se trabajaron en un rango de 0,002 hasta $0,01 \text{ mol kg}^{-1}$ a pH 2,00 y 3,00, a pH 3,50 se trabajó en un rango de concentración de 0,002 hasta $0,008 \text{ mol kg}^{-1}$ debido a la capacidad de esta sal para precipitar proteínas. Los datos obtenidos se ajustaron a la ecuación 9 empleando el programa Origin Pro 9.5 (OriginLab Corporation) para obtener los parámetros termodinámicos de desnaturalización.

2.3 Calorimetría diferencial de barrido DSC

La calorimetría diferencial de barrido DSC es una técnica de análisis térmico que permite determinar cambios energéticos en forma de calor cuando una muestra es mantenida a temperatura constante o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante en un determinado intervalo de temperatura. En esta técnica se emplean dos celdas, una de ellas contiene la muestra y la otra es una celda de referencia que puede estar vacía o no dependiendo del sistema de estudio. Cada celda cuenta con un sistema de calentamiento independiente y el equipo detecta si se producen diferencias de temperatura entre las

celdas. Sí se detecta alguna diferencia los sistemas de calentamiento compensan esta diferencia de manera que se logre mantener la temperatura igual en las dos celdas. Es decir cuando se genere un proceso exotérmico o endotérmico el instrumento compensa la energía necesaria para mantener la misma temperatura en las dos celdas [29].

Las medidas calorimétricas para el α -quimotripsinógeno A, se realizaron en agua pH 3,50 y en buffers pH 2,00 y 3,00 y en presencia de electrolitos. La concentración de proteína en todos los ensayos fue de $1,50 \text{ mg mL}^{-1}$. Las concentraciones de NaCl, KCl y NH_4NO_3 se trabajaron en un intervalo de 0,010 hasta $0,050 \text{ mol kg}^{-1}$, en el caso de sulfato de amonio las concentraciones se trabajaron en un rango de 0,002 hasta $0,01 \text{ mol kg}^{-1}$ a pH 2,00 y 3,00, a pH 3,50 se trabajó en un rango de concentración de 0,002 hasta $0,008 \text{ mol kg}^{-1}$.

Las muestras fueron desgasificadas durante 5 minutos antes de introducirlas al calorímetro. Se empleó una velocidad de calentamiento de $1,00 \text{ K min}^{-1}$ y se trabajó en un intervalo de temperatura de 293,15 K hasta 360,15 K. Las soluciones de referencia fueron los buffers y las soluciones de electrolito en buffer sin proteína. Para determinar la línea base a partir de las soluciones de referencia se hicieron varios barridos durante 24 horas y se seleccionó en cada caso la mejor línea base.

2.4 Tensión superficial

Las medidas de tensión superficial se realizaron a 298,15 K a pH 3,50. Todas las soluciones se prepararon por pesada y las muestras fueron desgasificadas antes de introducirlas en la jeringa. La concentración de proteína en todas las medidas fue de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ y las sales NaCl, KCl y NH_4NO_3 se trabajaron en un intervalo de concentración entre 0,010 y $0,050 \text{ mol kg}^{-1}$; en el caso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ las concentraciones fueron más bajas y se trabajaron en un intervalo entre 0,002 y $0,008 \text{ mol kg}^{-1}$.

Las muestras en la cámara de inyección se dejaron durante dos horas para alcanzar el equilibrio térmico. La tensión superficial de las soluciones de electrolito se midió utilizando el método dinámico con un tiempo de formación de gota de 60 segundos para evitar efectos hidrodinámicos en la formación de gota. El valor reportado es el promedio

de los resultados individuales de 20 gotas. La tensión superficial de la solución del α -quimotripsinógeno en agua y en soluciones acuosas de electrolitos se midió utilizando el método cuasiestático. En este método, se forma una gota muy rápidamente en el capilar con un volumen definido que corresponde a una cierta tensión superficial. La formación de la gota se mide a diferentes volúmenes para obtener la tensión superficial en función del tiempo. El valor de la tensión superficial corresponde al promedio de tres mediciones independientes.

La densidad de las soluciones se midió usando un densímetro Anton Paar DSA 5000M de tubo vibrante. La medida de la densidad de todas las soluciones se realizó por triplicado y el dato reportado es el promedio de esas medidas.

2.5 Parámetros de interacción preferencial

Los cosolventes pueden modular la estabilidad conformacional de las proteínas en soluciones acuosas a través de interacciones preferenciales que ocurren entre grupos ubicados en la superficie de la proteína y los componentes del solvente. Se han empleado diferentes técnicas como densimetría, cromatografía de absorción en gel, equilibrio de presión de vapor, refractometría y equilibrio de diálisis para determinar las interacciones preferenciales. En este estudio se emplearon medidas de densidad bajo dos condiciones: medidas a concentración molal constante de electrolito y medidas de densidad a potencial químico constante de electrolito que han sido descritas en la literatura [64,65]. Para analizar los sistemas de estudio se utilizó la notación de Scatchard y Stockmeyer para un sistema de tres componentes (1) el agua, (2) la proteína y (3) el cosolvente, en este caso la concentración de electrolito [62,63].

Las medidas de densidad se realizaron usando un densímetro Anton Paar DSA 5000M. Todas las soluciones se prepararon por pesada y fueron desgasificadas antes de realizar las medidas de densidad.

2.5.1 Volumen parcial específico

El volumen específico aparente (ϕ) de las soluciones del α -quimotripsinógeno fue determinado a pH 3,50 en cada una de las soluciones de electrolito variando la concentración de proteína desde 0,10 hasta 1,00 mg mL⁻¹. Para llevar a cabo la

determinación de este parámetro se realizaron medidas de densidad. El volumen específico aparente se calculó haciendo uso de la ecuación 17:

$$\phi = \frac{1}{\rho_o} \left(1 - \frac{\rho - \rho_o}{c_2} \right) \quad (17)$$

ρ_o es la densidad de la solución de electrolito sin proteína, ρ es la densidad de la solución de electrolito con proteína, c_2 es la concentración de proteína. Las medidas de densidad se llevaron a cabo teniendo las dos condiciones para determinar los parámetros de interacción preferencial. Las medidas de densidad manteniendo constante la concentración molal de electrolito permitieron determinar el volumen específico aparente (ϕ_2) que es un parámetro que no tiene en cuenta las interacciones de los componentes del solvente. Las medidas de densidad bajo condiciones de potencial químico constante de electrolito permitieron determinar el volumen específico aparente de la proteína (ϕ'_2), parámetro que da cuenta del equilibrio químico que se establece entre la proteína y los componentes del solvente (agua, electrolito) y tiene en cuenta las interacciones que se pueden presentar en el sistema. [65,129].

Para llevar a cabo las medidas de densidad a potencial químico constante de electrolito se empleó la técnica de diálisis. En esta técnica se empleó una membrana de diálisis Spectra/Por1 la cual fue sumergida en una solución de bicarbonato de sodio al 2,0% y EDTA 1,0 mM durante dos horas. Posterior a este tratamiento, se lavó la membrana con agua desionizada varias veces hasta que el agua de lavado tuviera una conductividad menor a $1 \mu\text{S cm}^{-1}$. En la membrana de diálisis se colocó un volumen de 4,0 mL de una solución compuesta por agua, electrolito y proteína. La membrana fue sumergida en una solución de electrolito de igual concentración a la que se encontraba en la membrana de diálisis teniendo en cuenta que la relación de volumen dentro de la membrana con el volumen de la solución dializadora debía ser de 1:100. El proceso de diálisis se llevó a cabo durante 24 horas a una temperatura de 273,15 K usando 400 mL de solución dializadora. Luego de ese tiempo se extrajo la solución de la membrana de diálisis y se realizaron medidas de densidad a 298,15 K [65].

A partir de las gráficas de los volúmenes específicos aparentes en función de la concentración de proteína bajo las dos condiciones experimentales descritas anteriormente se determinó el volumen parcial específico (ϕ_2^0) a concentración molar constante de electrolito y el volumen parcial específico ($\phi_2'^0$) a potencial químico constante de electrolito.

A partir de medidas de densidad de las soluciones acuosas de electrolitos se determinó el volumen parcial específico (\bar{v}_3) en un rango de concentraciones de 0,010 hasta 0,050 mol kg⁻¹ para NaCl, KCl, NH₄NO₃ y para (NH₄)₂SO₄ se trabajó en un intervalo de concentración de 0,002 hasta 0,008 mol kg⁻¹.

2.5.2 Interacción preferencial

A partir de los datos obtenidos de volúmenes parciales específicos se determinó el parámetro de interacción preferencial (ξ_3) haciendo uso de la ecuación 16:

$$\xi_3 = \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2} \right)_{T, \mu_1, \mu_3} = \frac{\rho_0 (\phi_2^0 - \phi_2'^0)}{(1 - \rho_0 \bar{v}_3)} \quad (16)$$

Por medio de esta expresión se obtiene el parámetro de interacción preferencial en unidades de g g⁻¹ y haciendo uso de la ecuación 24 este parámetro se puede expresar en unidades de mol mol⁻¹

$$\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2} \right)_{T, \mu_1, \mu_3} = \frac{M_2}{M_3} \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2} \right)_{T, \mu_1, \mu_3} \quad (24)$$

Donde ρ_0 es la densidad de las soluciones de electrolito, \bar{v}_3 el volumen parcial específico de las soluciones de electrolitos, M_2 y M_3 la masa molar de la proteína y el electrolito respectivamente, ϕ_2^0 el volumen parcial específico de la proteína a concentración molar constante de electrolito y $\phi_2'^0$ el volumen parcial específico de la proteína a potencial químico constante de electrolito.

3. Resultados y análisis

Los resultados y análisis se presentan a continuación divididos en tres secciones: (I) estabilidad térmica del α -quimotripsinógeno A en presencia de los electrolitos seleccionados para este estudio, (II) determinación de la tensión superficial de las soluciones de electrolitos y análisis del proceso de adsorción de la proteína en la interfase aire-agua, y (III) parámetros de interacción preferencial entre los electrolitos y la proteína a 298,15K.

3.1 Estabilidad térmica del α -quimotripsinógeno A

3.1.1 Reversibilidad del proceso de desnaturalización de la proteína a diferentes valores de pH

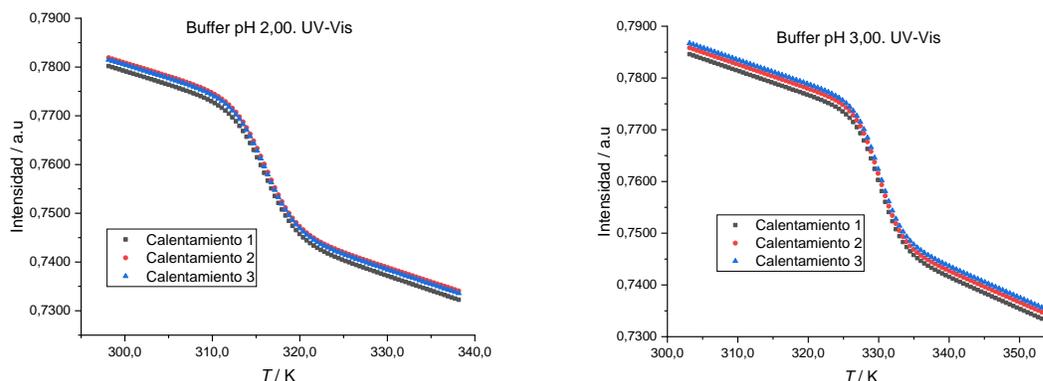
El proceso de desnaturalización térmica puede ser analizado termodinámicamente si se presenta un equilibrio reversible entre la forma nativa y la forma desnaturalizada. La reversibilidad del proceso depende de la naturaleza de la proteína misma y de los factores implicados en el proceso. Para evaluar la reversibilidad del proceso de despliegue térmico de una proteína se realiza un calentamiento entre temperatura ambiente (293,15 K) y una temperatura superior a la temperatura de desnaturalización, en este caso de 360,15 K, para asegurar que la proteína se ha desnaturalizado. Se deja enfriar nuevamente a temperatura ambiente y el proceso de calentamiento y enfriamiento se repite varias veces. Un solapamiento de las curvas que describen el proceso de desnaturalización térmica indica que el proceso es reversible. La reversibilidad se puede cuantificar comparando el valor de las entalpías de cada uno de los calentamientos sucesivos como lo muestra la siguiente ecuación:

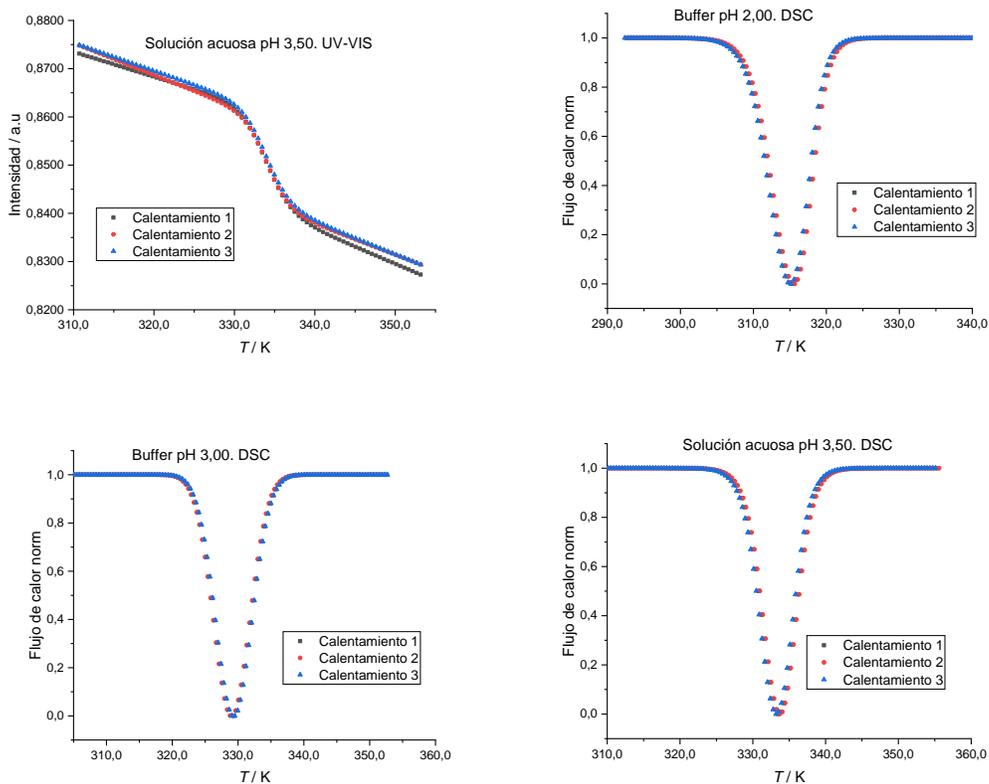
$$Rev = \frac{\Delta H_n}{\Delta H_1} \quad (33)$$

Siendo ΔH_n la entalpía de desnaturalización del n-ésimo calentamiento de la muestra y ΔH_1 la entalpía de desnaturalización del calentamiento inicial. Cuando la relación de las entalpías es uno o muy cercana se verifica la reversibilidad del proceso.

Los estudios de reversibilidad del α -quimotripsinógeno se siguieron a pH 2,00, 3,00 y 3,50 mediante espectroscopía UV-Vis y calorimetría diferencial de barrido DSC comparando las curvas obtenidas tras sucesivos calentamientos. La Figura 9 muestra los perfiles de desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno determinados a pH 2,00, 3,00, 3,50 y una concentración de proteína de $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ por medidas de UV-Vis; en el caso de las medidas por calorimetría diferencial de barrido la concentración de proteína fue de $1,50 \text{ mg mL}^{-1}$. En el caso de las medidas de UV-Vis las medidas se llevaron a cabo a 280 nm que corresponde a la longitud de máxima adsorción de la proteína en su forma nativa y con una rampa de calentamiento de $1,0 \text{ K min}^{-1}$, en el caso de las medidas calorimétricas la rampa de calentamiento fue de $1,00 \text{ K min}^{-1}$.

Figura 9. Perfiles de desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno obtenidos por medidas de espectroscopía UV-Vis a una longitud de onda de 280 nm y por medidas de calorimetría diferencial de barrido DSC.





Los resultados indican que el proceso de desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno es reversible a pH 2,00, 3,00 y cuando la proteína esta disuelta en agua a pH 3,50. Los resultados también indican que el proceso es reversible en el intervalo de temperatura usado en este estudio (293,15 K a 360,15 K). Los perfiles de desnaturalización térmica obtenidos para cada calentamiento se superponen entre sí, indicando de esta manera que la proteína bajo las condiciones de estudio presenta un proceso de desnaturalización reversible. Las curvas también indican que el proceso ocurre como un equilibrio entre el estado nativo y desplegado de la proteína y no presenta intermediarios durante el proceso, lo cual concuerda con el comportamiento descrito para varias proteínas globulares pequeñas [32,35,117,130–133].

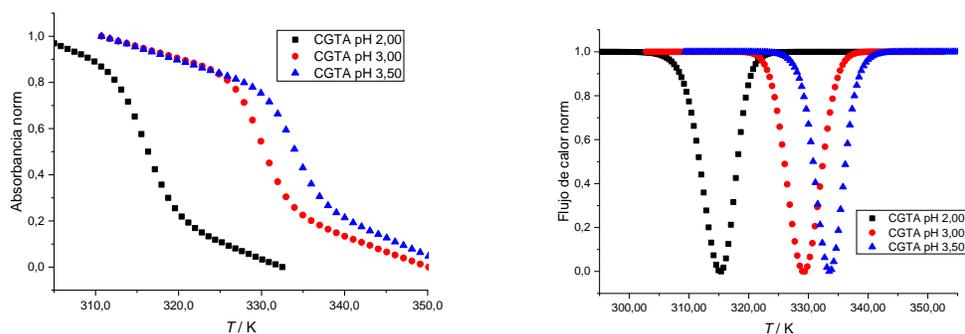
3.1.2 Estudio de plegamiento del α -quimotripsinógeno A.

A partir de los ensayos de reversibilidad se definieron las condiciones experimentales en las cuales el proceso de desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno sucedió reversiblemente. A partir de medidas de espectroscopía UV-Vis y medidas de

calorimetría diferencial de barrido DSC se obtuvieron los perfiles de desnaturalización para cada valor de pH.

La Figura 10 muestra los perfiles de desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno, obtenidos por medidas de UV-Vis con una concentración de proteína de $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$, una rampa de calentamiento de $1,0 \text{ K min}^{-1}$, y mediante calorimetría diferencial de barrido con una concentración de proteína de $1,50 \text{ mg mL}^{-1}$ y una rampa de calentamiento de $1,00 \text{ K min}^{-1}$. En los dos casos las medidas se realizaron para cada valor de pH previamente determinado en los ensayos de reversibilidad. Los datos obtenidos por UV-Vis fueron ajustados a la ecuación 9 empleando el software Origin Pro 9.5 (OriginLab Corporation). La señal obtenida en cada estudio fue normalizada entre 0 y 1 para comparar las curvas obtenidas en cada técnica.

Figura 10. Perfiles de desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno obtenidos por medidas de espectroscopía UV-Vis y calorimetría diferencial de barrido a diferentes valores de pH.



Los parámetros termodinámicos obtenidos del proceso de despliegue térmico del α -quimotripsinógeno utilizando las técnicas espectroscópica y calorimétrica se resumen en la Tabla 2. Los datos fueron obtenidos a partir de las curvas de desnaturalización térmica utilizando métodos descritos por varios autores [30,32,35,53,56,132,134].

Tabla 2. Parámetros termodinámicos del proceso de desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno a pH 2,00, 3,00 y 3,50 obtenidos por UV-Vis y calorimetría diferencial de barrido.

Técnica	Buffer pH 2,00		Buffer pH 3,00		Agua pH 3,50	
	^a T_m /K	^b ΔH /kJ mol ⁻¹	^a T_m /K	^b ΔH /kJ mol ⁻¹	^a T_m /K	^b ΔH /kJ mol ⁻¹
UV-Vis	316,0	461,9	330,0	553,5	334,0	668,6
DSC	316,0	366,6	329,4	537,8	333,0	595,5

^a La desviación estándar típica de la temperatura y la entalpía determinada a partir de medidas espectroscópicas es de 0,1 K y 15 kJ mol⁻¹ respectivamente.

^b La desviación estándar típica de la temperatura y la entalpía determinada a partir de las medidas de DSC es de 0,1 K y 0,7%, respectivamente

Los resultados obtenidos muestran claramente que el proceso de desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno depende del pH y que el proceso es reversible y se presenta como un equilibrio entre la forma nativa y la forma desnaturalizada de la proteína, sin la presencia de intermediarios. La temperatura de desnaturalización determinada por ambas técnicas es casi la misma. Los cambios de entalpía obtenidos por ambos métodos siguen la misma tendencia, aumentando conforme aumenta el pH, sin embargo el método calorimétrico es de mayor sensibilidad y presenta diferencias con respecto a las entalpías de van't Hoff obtenidas a partir de medidas espectroscópicas que de acuerdo con algunos autores son menos sensibles [135].

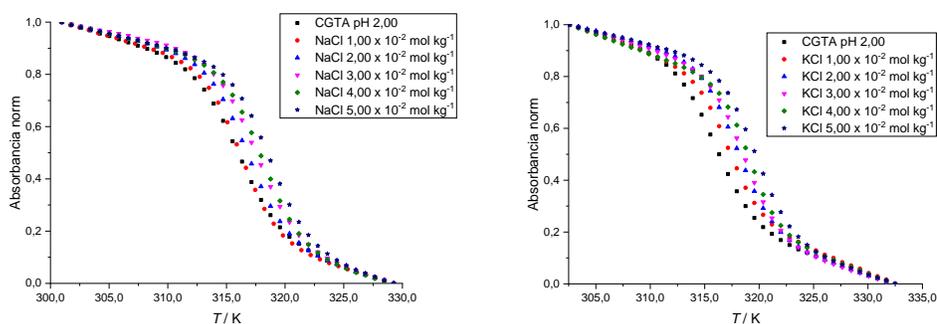
La temperatura de desnaturalización y el cambio de entalpía aumentan a medida que aumenta el pH porque este parámetro afecta los grupos ionizables y por tanto influye directamente sobre las interacciones de estos grupos con las moléculas de agua de las esferas de solvatación. Los resultados obtenidos por otros autores en condiciones similares están en buen acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio [56,126,136–138].

3.1.3 Efecto de electrolitos sobre la estabilidad térmica del α -quimotripsinógeno A.

Para analizar el efecto de electrolitos sobre la estabilidad térmica del α -quimotripsinógeno se emplearon las siguientes sales: NaCl, NH_4NO_3 , KCl y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las curvas de desnaturalización fueron obtenidas a partir de medidas UV-Vis y de calorimetría diferencial de barrido. Se emplearon concentraciones de electrolito en el rango de $0,01 \text{ mol kg}^{-1}$ – $0,05 \text{ mol kg}^{-1}$ con excepción del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que se trabajó en el rango de $0,002 \text{ mol kg}^{-1}$ – $0,01 \text{ mol kg}^{-1}$ a pH 2,00 y 3,00; a pH 3,50 esta sal se trabajó en un rango de $0,002 \text{ mol kg}^{-1}$ – $0,008 \text{ mol kg}^{-1}$, porque a valores mayores de concentración se presentaba precipitación de la proteína y por tanto el proceso ya no era reversible. Los perfiles de desnaturalización térmica de la proteína en presencia de cada una de las sales y a diferentes concentraciones, fueron obtenidos para cada uno de los valores de pH establecidos.

Las Figuras 11 y 12 muestran los perfiles de desnaturalización térmica de la proteína obtenidos por UV-Vis y calorimetría diferencial de barrido a pH 2,00. Los perfiles de desnaturalización térmica de la proteína a pH 3,00 y 3,50 presentan el mismo comportamiento y se muestran en el Anexo A, Figuras A1-A4.

Figura 11. Efecto de la concentración de electrolitos sobre la desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno a pH 2,00 mediante medidas de UV-Vis.



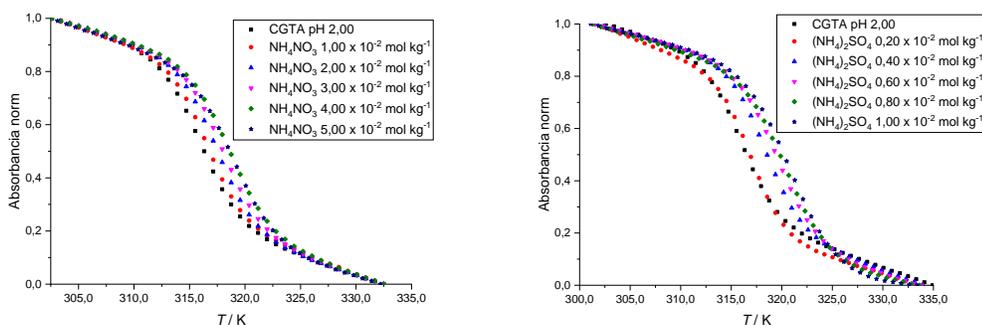
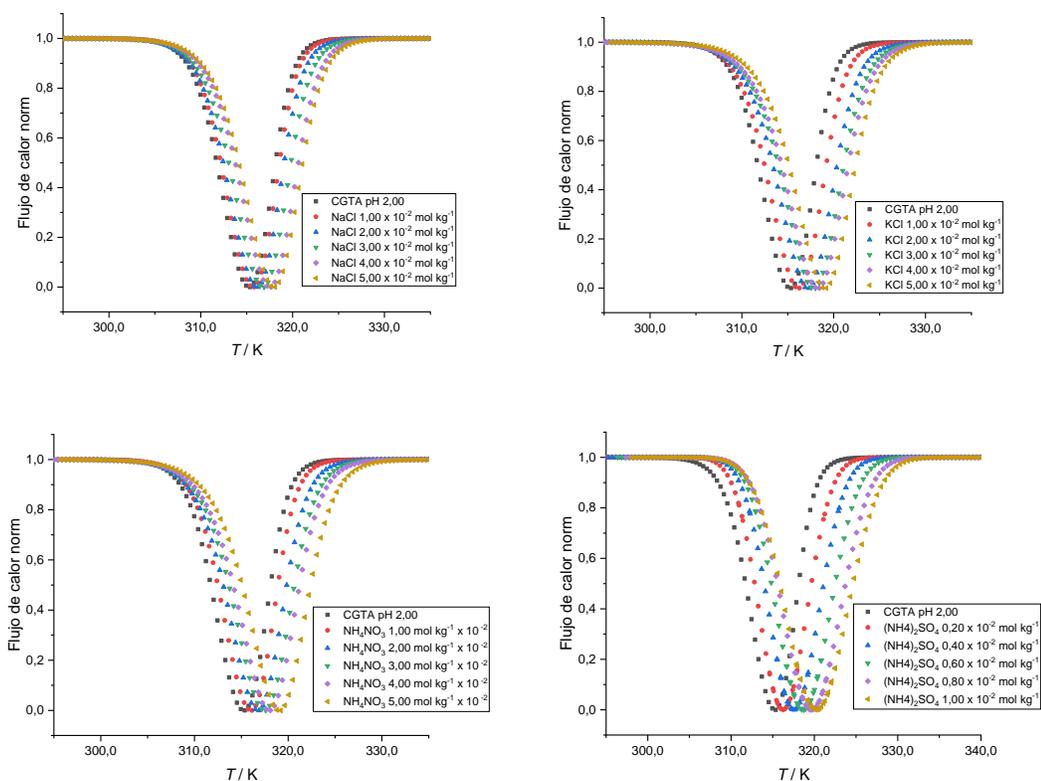


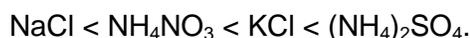
Figura 12. Efecto de la concentración de electrolitos sobre la desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno a pH 2,00 mediante medidas de calorimetría diferencial de barrido.



Los datos obtenidos por UV-Vis y por calorimetría diferencial de barrido fueron analizados utilizando el software Origin Pro 9.5 para determinar los parámetros termodinámicos que permiten caracterizar el proceso de desnaturalización térmica de la proteína, es decir, la temperatura media de desnaturalización, y la entalpía del proceso.

Las señales fueron normalizadas entre 0 y 1 para poder observar más claramente el comportamiento del proceso de desnaturalización térmica de la proteína.

Las curvas obtenidas por UV-Vis y por calorimetría diferencial de barrido muestran que la adición de sales no afecta el proceso de desnaturalización de la proteína el cual involucra dos estados: el estado nativo y el estado desplegado. Los resultados muestran que todos los electrolitos utilizados en este estudio aumentan la temperatura media de desnaturalización y la entalpía asociada al proceso a medida que aumenta la concentración de sal. También se puede observar que la adición de electrolitos genera un efecto estabilizante que aumenta a medida que aumenta la concentración. Se observa que a pH 2,00 y concentraciones equivalentes de electrolito el efecto estabilizante de las sales aumenta en el siguiente orden:



El mismo comportamiento se observa a pH 3,00 y 3,50.

Las Tablas 3 y 4 presentan la temperatura media de desnaturalización y la entalpía asociada al proceso de despliegue del α -quimotripsinógeno en buffer a diferentes concentraciones de electrolitos. Los resultados muestran que la temperatura de desnaturalización y las entalpías de despliegue en agua y en los dos buffers son consistentes con los publicados por otros autores [56,126,136–138].

Tabla 3. Temperatura media de desnaturalización del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de electrolitos a pH 2,00, 3,00 y 3,50 obtenida a partir de datos espectroscópicos y calorimétricos.

Electrolito/ mol kg ⁻¹ x 10 ²	Buffer pH 2,00		Buffer pH 3,00		Agua pH 3,50	
	UV-Vis	DSC	UV-Vis	DSC	UV-Vis	DSC
	T_m^a / K					
NaCl						
0,00	316,0	316,0	330,0	329,4	334,0	333,2
1,00	316,4	316,4	330,4	329,6	334,3	333,7
2,00	316,9	316,9	330,9	329,8	334,6	334,2

3,00	317,4	317,4	331,4	330,1	335,0	334,8
4,00	318,0	318,1	332,0	330,5	335,5	335,6
5,00	318,7	318,7	332,7	330,9	336,0	336,4

KCl

0,00	316,0	316,0	330,0	329,4	334,0	333,2
1,00	317,1	317,0	331,1	329,7	334,5	333,9
2,00	318,0	317,9	332,0	330,2	335,0	334,8
3,00	318,7	318,7	332,7	330,7	335,7	335,6
4,00	319,2	319,2	333,3	331,3	336,4	336,5
5,00	319,6	319,7	333,8	331,9	337,3	337,5

NH₄NO₃

0,00	316,0	316,0	330,0	329,4	334,0	333,2
1,00	316,7	316,7	330,7	329,7	334,4	333,8
2,00	317,4	317,3	331,3	330,0	334,8	334,5
3,00	318,0	318,0	331,9	330,4	335,3	335,3
4,00	318,6	318,6	332,5	330,9	335,9	336,1
5,00	319,1	319,3	333,1	331,5	336,5	337,0

(NH₄)₂SO₄

0,00	316,0	316,0	330,0	329,4	334,0	333,2
0,20	317,2	317,8	331,2	330,7	334,8	334,4
0,40	318,4	319,4	332,4	331,9	335,8	335,8
0,60	319,5	320,7	333,5	332,9	336,9	337,5
0,80	320,4	321,7	334,4	333,8	338,1	339,4
1,00	321,3	322,6	335,2	334,6		

^a La desviación estándar típica en la temperatura media de desnaturalización determinada a partir de medidas espectroscópicas y medidas calorimétricas es 0,1 K.

La Tabla 4 presenta los cambios de entalpía para el despliegue térmico del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de electrolitos a pH 2,00, 3,00 y 3,50 obtenidos a partir de datos espectroscópicos y calorimétricos.

Tabla 4. Cambios en la entalpía de van't Hoff y la entalpía calorimétrica para el proceso de desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de electrolitos a pH 2,00, 3,00 y 3,50 obtenidos a partir de datos espectroscópicos y calorimétricos.

Electrolito/ mol kg ⁻¹ x 10 ²	Buffer pH 2,00		Buffer pH 3,00		Agua pH 3,50	
	UV-Vis ^a	DSC ^b	UV-Vis ^a	DSC ^b	UV-Vis ^a	DSC ^b
$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$						
NaCl						
0,00	461,9 ± 14,2	366,6 ± 3	553,5 ± 15,9	537,8 ± 4	668,6 ± 23,4	595,5 ± 4
1,00	536,8 ± 15,9	371,2 ± 3	589,1 ± 16,3	551,1 ± 4	679,5 ± 40,6	610,8 ± 4
2,00	503,8 ± 17,6	395,2 ± 3	573,6 ± 20,5	569,8 ± 4	670,3 ± 33,5	625,9 ± 4
3,00	471,5 ± 16,7	408,0 ± 3	562,3 ± 16,7	592,5 ± 4	660,7 ± 31,4	643,8 ± 4
4,00	492,0 ± 11,7	430,8 ± 3	579,9 ± 17,2	612,0 ± 4	628,0 ± 28,0	660,5 ± 5
5,00	505,8 ± 17,2	437,6 ± 3	530,1 ± 23,0	622,1 ± 4	684,9 ± 24,7	667,2 ± 5
KCl						
0,00	461,9 ± 14,2	366,6 ± 3	553,5 ± 15,9	537,8 ± 4	668,6 ± 23,4	595,5 ± 4
1,00	554,4 ± 23,4	396,1 ± 3	607,9 ± 20,1	578,9 ± 4	638,9 ± 43,5	635,7 ± 4
2,00	495,0 ± 32,6	438,6 ± 3	508,8 ± 12,1	618,7 ± 4	565,7 ± 47,3	678,3 ± 5
3,00	517,6 ± 24,7	465,6 ± 3	543,1 ± 13,0	641,6 ± 5	621,7 ± 29,3	701,3 ± 5
4,00	638,1 ± 36,0	480,2 ± 3	555,6 ± 16,7	661,0 ± 5	575,7 ± 35,1	716,1 ± 5
5,00	538,9 ± 23,8	489,3 ± 3	550,2 ± 17,6	677,3 ± 5	595,0 ± 30,1	734,4 ± 5
NH₄NO₃						
0,00	461,9 ± 14,2	366,6 ± 3	553,5 ± 15,9	537,8 ± 4	668,6 ± 23,4	595,5 ± 4
1,00	533,5 ± 21,8	385,2 ± 3	572,8 ± 29,7	560,4 ± 4	678,2 ± 41,4	626,8 ± 4
2,00	470,7 ± 15,1	419,9 ± 3	528,0 ± 20,9	591,0 ± 4	629,7 ± 27,2	650,7 ± 5
3,00	478,6 ± 15,5	435,6 ± 3	534,7 ± 26,8	612,5 ± 4	729,3 ± 30,1	686,1 ± 5
4,00	455,6 ± 13,4	457,9 ± 3	523,8 ± 20,5	635,2 ± 4	703,7 ± 20,5	695,2 ± 5
5,00	446,4 ± 12,1	473,2 ± 3	589,5 ± 28,5	651,1 ± 5	782,0 ± 46,0	707,9 ± 5
(NH₄)₂SO₄						
0,00	461,9 ± 14,2	366,6 ± 3	553,5 ± 15,9	537,8 ± 4	668,6 ± 23,4	595,5 ± 4
0,20	516,7 ± 14,2	412,6 ± 3	559,8 ± 24,7	581,9 ± 4	629,7 ± 21,8	631,8 ± 4
0,40	470,7 ± 20,9	447,7 ± 3	539,7 ± 21,3	611,6 ± 4	533,0 ± 14,2	668,2 ± 5
0,60	427,2 ± 18,4	484,3 ± 3	583,7 ± 19,2	644,3 ± 4	683,7 ± 27,6	702,1 ± 5
0,80	409,6 ± 22,6	544,4 ± 4	563,6 ± 20,5	700,6 ± 5	604,6 ± 40,2	825,6 ± 6
1,00	376,1 ± 23,0	631,4 ± 4	453,5 ± 13,4	773,6 ± 5		

^a La desviación estándar típica promedio de la entalpía determinada a partir de mediciones espectroscópicas es de 15 kJ.mol⁻¹.

^b La desviación estándar típica promedio de la entalpía determinada a partir de las mediciones de DSC es de 0,7%.

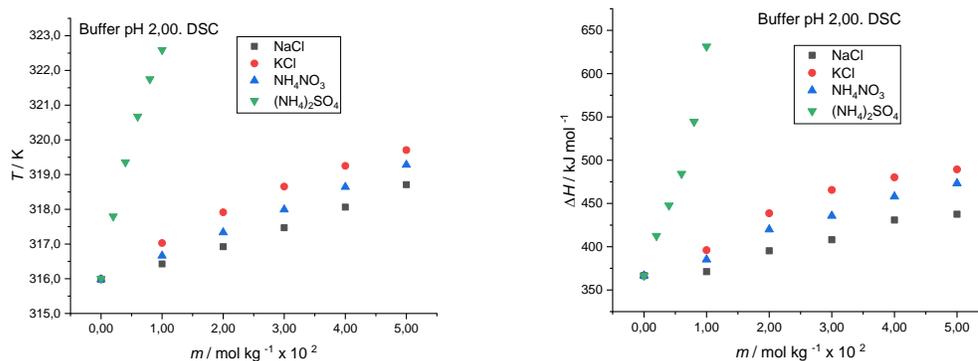
Los valores de entalpía obtenidos a partir de medidas espectroscópicas presentan una mayor desviación en comparación con los datos de entalpía obtenidos a partir de medidas calorimétricas. Este comportamiento se atribuye al error asociado en la determinación de este parámetro porque las medidas espectroscópicas se ajustan al modelo matemático descrito por la ecuación 9, a diferencia de la entalpía determinada por medidas calorimétricas la cual se obtiene directamente.

Para todas las condiciones de pH consideradas en este estudio y a concentraciones equivalentes de electrolitos, el efecto estabilizante de las sales aumenta en el mismo orden observado en la temperatura de desnaturalización, mostrando además que el mayor efecto es debido al $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, seguido por KCl y NH_4NO_3 . El efecto más bajo se debe al NaCl.

Los resultados muestran que el efecto estabilizante es mayor en agua y disminuye a medida que el pH disminuye. Los parámetros termodinámicos obtenidos del proceso de despliegue térmico de la proteína indican claramente que el proceso de despliegue es reversible en agua y buffer y que la adición de sales no afecta la transición entre los dos estados.

La Figura 13 muestra el comportamiento de la temperatura media de desnaturalización y de la entalpía asociada al proceso de despliegue de la proteína en función de la concentración de electrolitos en buffer pH 2,00 obtenido por calorimetría diferencial de barrido. Se puede observar que estos parámetros presentan una tendencia clara con el aumento de la concentración de cada electrolito: aumentan conforme aumenta la concentración de electrolito. Los resultados muestran que todos los electrolitos utilizados en este estudio ejercen un efecto estabilizante sobre la proteína α -quimotripsinógeno A. Las entalpías de desnaturalización siguen una clara tendencia con el aumento de la concentración de electrolitos, lo que coincide con el cambio en la temperatura de desnaturalización. El efecto de la concentración sobre la temperatura media de desnaturalización y la entalpía de despliegue es mayor a medida que aumenta el pH. Comportamientos similares se obtuvieron a pH 3,00 y pH 3,50. Los resultados se muestran en el Anexo A, en las Figuras A5 y A6.

Figura 13. Temperatura media de desnaturalización y entalpía calorimétrica a pH 2,00 en función de la concentración de cada electrolito.



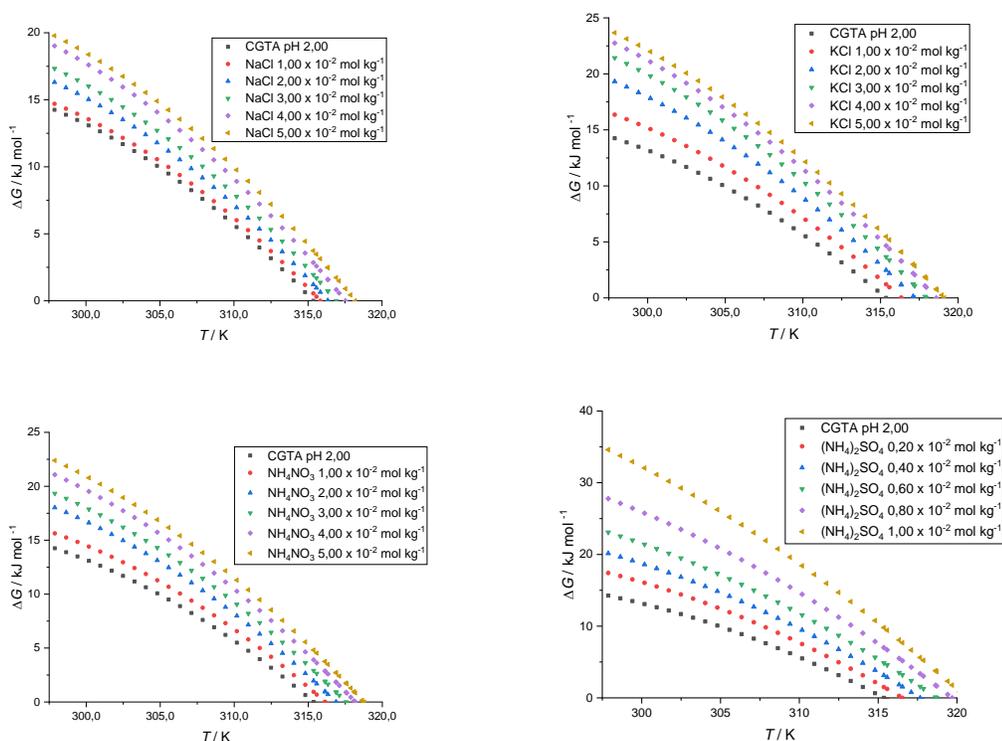
3.1.4 Curvas de estabilidad del α -quimotripsinógeno A.

Para determinar el cambio en la energía de Gibbs (ΔG), que corresponde a la diferencia de energía de Gibbs entre el estado nativo y el estado desplegado, se determinó el cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p). Este parámetro corresponde a la diferencia que existe de capacidad calorífica cuando la proteína pasa del estado nativo al estado desnaturalizado.

El cambio en la capacidad calorífica del α -quimotripsinógeno en buffer pH 2,00, 3,00 y en agua pH 3,50 en presencia de los diferentes electrolitos seleccionados para este estudio, se obtuvo a partir de medidas de calorimetría diferencial de barrido empleando una concentración de proteína de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ y una velocidad de calentamiento de $1,00 \text{ K min}^{-1}$. Los valores obtenidos a pH 2,00, 3,00 y 3,50 fueron respectivamente $12,30 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $12,30 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ y $12,31 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ indicando que, en el rango de pH considerado, el cambio en la capacidad calorífica permanece constante y que las diferencias están dentro de la incertidumbre experimental. El valor promedio obtenido fue de $12,30 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ y concuerda con los valores reportados por otros autores; 3000 , 3200 y $2800 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ a pH 2,03, 2,59 y 3,02 [117]; $13,3 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ y $13,3 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ a pH 2,0 y 3,0 [56]; $2200 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ [138].

A partir de los datos obtenidos para el cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p), la temperatura media de desnaturalización y la entalpía del proceso para cada uno de los valores de pH y para cada una de las concentraciones de electrolito, se determinaron las curvas de estabilidad usando la ecuación integrada de Gibbs-Helmholtz. Los datos obtenidos del cambio en la energía de Gibbs para cada valor de pH y para cada electrolito empleado en este estudio se muestran en el Anexo A, Tablas A1-A12. La Figura 14 muestra las curvas de estabilidad para cada concentración de electrolito a pH 2,00 determinadas a partir de los parámetros termodinámicos obtenidos por calorimetría diferencial de barrido.

Figura 14. Curvas de estabilidad del α -quimotripsinógeno en presencia de electrolitos en buffer pH 2,00 a partir de parámetros termodinámicos obtenidos por calorimetría diferencial de barrido.



El cambio en la energía de Gibbs determinada a partir de parámetros termodinámicos obtenidos por medidas de calorimetría diferencial de barrido presenta una tendencia clara con respecto al aumento de la concentración de electrolito. El comportamiento del

cambio en la energía de Gibbs sigue la misma tendencia de los datos de entalpía y de la temperatura media de desnaturalización: aumentan a medida que aumenta el pH y también conforme aumenta la concentración de sal. Las gráficas muestran además que un aumento en la concentración de electrolito y también de pH genera un aumento en el intervalo de temperatura en el cual la forma nativa de la proteína es estable. La forma de las gráficas concuerda con lo reportado por otros autores para sistemas donde se emplean cosolventes estabilizantes de proteínas [56]. Las curvas de estabilidad a partir de parámetros termodinámicos obtenidos por medidas de calorimetría diferencial de barrido a pH 3,00 y 3,50 tienen comportamientos similares y se presentan en el Anexo A, Figuras A7-A8.

El cambio en la estabilidad de la proteína $\Delta\Delta G$ se determinó como la diferencia entre el cambio en la energía de Gibbs de la proteína en presencia de electrolitos y en buffer.

$$\Delta\Delta G = \Delta G^{electrolito} - \Delta G^{buffer} \quad (34)$$

El cambio en la energía de Gibbs de estabilización $\Delta\Delta G$ del α -quimotripsinógeno en presencia de electrolitos y en buffer y en agua a la temperatura media de transición de la proteína, donde $\Delta G = 0$ en buffers pH 2,00 y 3,00 y en agua pH 3,50 se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Cambio en la energía de Gibbs de estabilización $\Delta\Delta G$ del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de electrolitos a pH 2,00, 3,00 y 3,50.

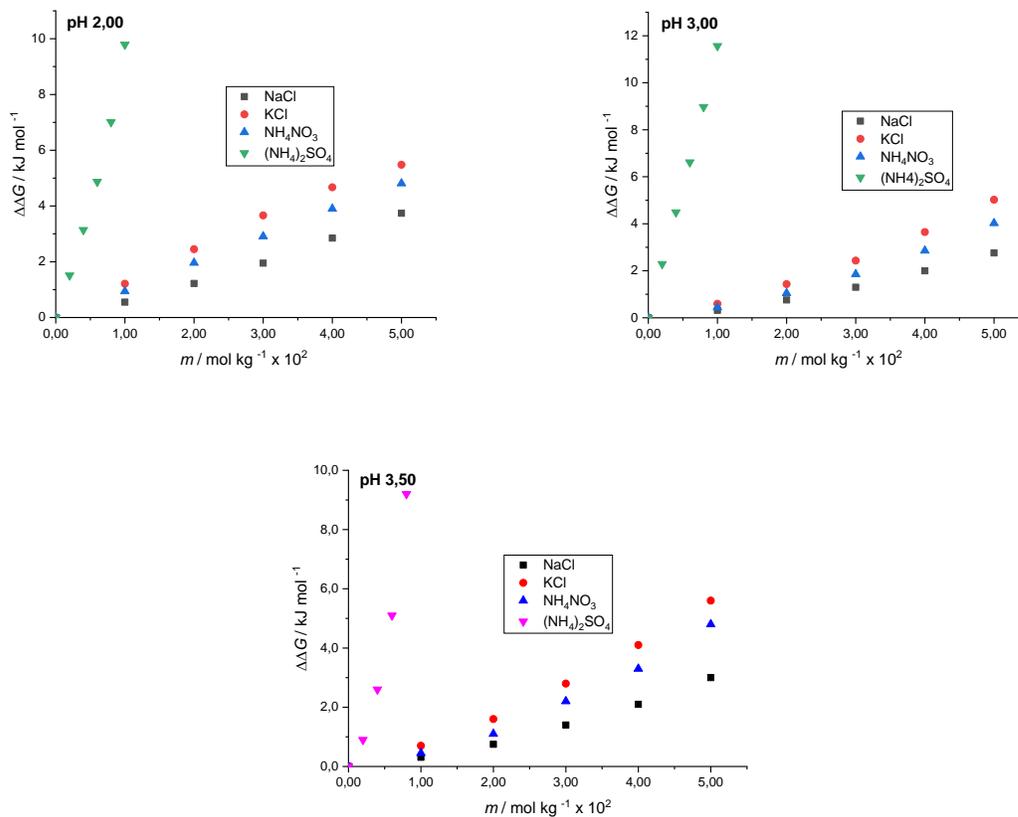
Electrolito/ mol kg ⁻¹ x 10 ²	Buffer pH 2,00		Buffer pH 3,00		Agua pH 3,50	
	<i>T_m</i> / K	$\Delta\Delta G$ / kJ mol ⁻¹	<i>T_m</i> / K	$\Delta\Delta G$ / kJ mol ⁻¹	<i>T_m</i> / K	$\Delta\Delta G$ / kJ mol ⁻¹
NaCl						
0,00	316,0	0,0	329,4	0,0	333,2	0,0
1,00	316,4	0,6	329,6	0,3	333,7	0,3
2,00	316,9	1,2	329,8	0,8	334,2	0,8
3,00	317,4	2,0	330,1	1,3	334,8	1,4
4,00	318,1	2,9	330,5	2,0	335,6	2,1
5,00	318,7	3,7	330,9	2,8	336,4	3,0

KCl						
0,00	316,0	0,0	329,4	0,0	333,2	0,0
1,00	317,0	1,2	329,7	0,6	333,9	0,7
2,00	317,9	2,5	330,2	1,4	334,8	1,6
3,00	318,7	3,7	330,7	2,4	335,6	2,8
4,00	319,2	4,7	331,3	3,6	336,5	4,1
5,00	319,7	5,5	331,9	5,0	337,5	5,6
NH₄NO₃						
0,00	316,0	0,0	329,4	0,0	333,2	0,0
1,00	316,7	0,9	329,7	0,4	333,8	0,5
2,00	317,3	2,0	330,0	1,1	334,5	1,1
3,00	318,0	2,9	330,4	1,9	335,3	2,2
4,00	318,6	3,9	330,9	2,9	336,1	3,3
5,00	319,3	4,8	331,5	4,0	337,0	4,8
(NH₄)₂SO₄						
0,00	316,0	0,0	329,4	0,0	333,2	0,0
0,20	317,8	1,5	330,7	2,3	334,4	0,9
0,40	319,4	3,1	331,9	4,5	335,8	2,6
0,60	320,7	4,9	332,9	6,6	337,5	5,1
0,80	321,7	7,0	333,8	9,0	339,4	9,2
1,00	322,6	9,8	334,6	11,6		

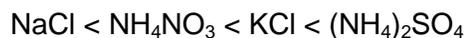
La desviación estándar típica en la temperatura y en el cambio de energía de Gibbs determinada a partir de las mediciones de DSC es de 0,1 K y 0,7%, respectivamente.

El cambio en la estabilidad de la proteína $\Delta\Delta G$ sigue el mismo comportamiento que la temperatura media de desnaturalización, la entalpía y la energía de Gibbs. La Figura 15 muestra que el cambio en la estabilidad de la proteína $\Delta\Delta G$ presenta una tendencia clara con la concentración y este comportamiento se presentó para los tres valores de pH usados en este estudio.

Figura 15. Cambio en la estabilidad del α -quimotripsinógeno en buffer pH 2,00, 3,00 y en agua pH 3,50 determinado a partir de datos de calorimetría diferencial de barrido.



En todas las condiciones de pH ácido consideradas en este estudio, el efecto estabilizante de las sales aumenta con la concentración de electrolito. Al comparar el efecto estabilizante a concentraciones equivalentes de electrolitos se observa que el mayor efecto estabilizante se presentó en el caso del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, seguido por KCl y NH_4NO_3 . El menor efecto estabilizante se presentó con NaCl. Los resultados muestran que el efecto estabilizante es mayor en agua y disminuye a medida que el pH desciende. En las condiciones de este estudio se confirma que el efecto estabilizante que ejercen los electrolitos sobre la proteína se incrementa en el siguiente orden:



Varios modelos han sido propuestos para representar la dependencia de la energía de Gibbs de despliegue ΔG_D y de la constante de equilibrio K_D con la concentración de cosolventes. Algunos estudios muestran que en el caso de desnaturalización química, los parámetros termodinámicos presentan una tendencia lineal respecto a la concentración del agente desnaturalizante que puede describirse por el Método de Extrapolación Lineal (LEM) [103,139–141].

El modelo LEM fue propuesto por Pace a partir de estudios de desnaturalización química y surge de observaciones realizadas previamente por Tanford para la desnaturalización isotérmica de proteínas, es decir, desnaturalización química a temperatura constante [139,140] y se puede representar mediante la siguiente ecuación lineal:

$$\Delta G = \Delta G_w - mC \quad (35)$$

Donde ΔG representa el cambio de energía de Gibbs de desnaturalización de la proteína, ΔG_w representa la energía de Gibbs de desnaturalización de la proteína en agua, m es la pendiente experimental y C la concentración de cosolvente generalmente expresada en mol L⁻¹.

Según Pace, el término ΔG_w da información la estabilidad de la conformación nativa de la proteína con respecto a la conformación desplegada [103,139–141]. La pendiente m ha sido interpretada en términos de la diferencia de los coeficientes viriales entre el estado nativo y el estado desplegado de la proteína ΔB_{23} el cual está relacionado directamente con el cambio de la energía de Gibbs de exceso Δb_{23} generada por la adición de cosolvente y se puede determinar a partir de la pendiente m por medio de la siguiente ecuación [140]:

$$\Delta B = \Delta b = -\frac{m}{RT} \quad (36)$$

Donde m es la pendiente experimental, R la constante universal de los gases ideales y T la temperatura absoluta a la cual se realizó la desnaturalización química.

En este estudio el proceso de desnaturalización térmica se realizó analizando el efecto que generan los distintos electrolitos sobre la estabilidad térmica de la proteína, es decir no se realizó un proceso de desnaturalización química isotérmico. Sin embargo la dependencia de la energía de Gibbs de estabilización $\Delta\Delta G$ de la proteína muestra una relación lineal respecto a la concentración de electrolito en cada uno de los valores de pH empleados en este estudio como se muestra en la Figura 15. Por esta razón los datos fueron ajustados por medio de mínimos cuadrados a una ecuación lineal similar a la ecuación propuesta por Pace [142]. El valor de las pendientes obtenidas por medio del ajuste de los datos experimentales se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 6. Valores de las pendientes que caracterizan la dependencia de la energía de Gibbs de estabilización $\Delta\Delta G$ del α -quimotripsinógeno en solución acuosa con la concentración de electrolitos a pH 2,00, 3,00 y en agua pH 3,50.

Electrolito	pH 2,00	pH 3,00	pH 3,50
	$m / \text{kJ kg mol}^{-1}_{\text{proteína}} \text{mol}^{-1}_{\text{electrolito}}$		
NaCl	74,9 \pm 3,1	56,0 \pm 4,3	60,0 \pm 5
KCl	112,0 \pm 4,5	100,0 \pm 7,3	112,6 \pm 7
NH ₄ NO ₃	96,9 \pm 1,3	81,1 \pm 6,7	95,7 \pm 9
(NH ₄) ₂ SO ₄	961,4 \pm 57,6	1145,7 \pm 19,6	1130,0 \pm 177

Los valores experimentales de la pendiente m son positivos y la magnitud sigue el mismo orden observado para el efecto estabilizante de los electrolitos siendo el efecto mayor debido al (NH₄)₂SO₄ y el efecto menor debido al NaCl.

La serie de Hofmeister ordena los iones respecto al efecto estabilizante que estos ejercen sobre las proteínas y fue propuesta teniendo en cuenta proteínas con carácter hidrofóbico y con superficies cargadas negativamente. Por lo general, la serie funciona bien en el caso de los aniones pero en el caso de los cationes la serie falla con frecuencia. Varios estudios han reportado series de Hofmeister invertidas o alteradas que demuestran que el orden de la serie puede alterarse por diferentes factores, como la

polaridad y la carga de la superficie de la proteína, la temperatura, la concentración de electrolito y el pH [103–107].

El efecto estabilizante de las sales utilizadas en este estudio muestra que el efecto de los diferentes iones depende de la naturaleza de las sales, de la proteína y de las condiciones experimentales de estudio. Estos factores pueden afectar las interacciones directas ion-proteína, y las interacciones indirectas que resultan de cambios en la hidratación de las proteínas por la presencia de iones [104].

En este estudio los valores de pH son menores al valor del punto isoeléctrico del α -quimotripsinógeno el cual es de 9,2 [115]. La proteína bajo estas condiciones de pH presenta una carga superficial positiva que puede modificar las interacciones con las moléculas de agua que la rodean y con los iones presentes en el medio, por tanto es posible encontrar un comportamiento diferente al propuesto por la serie de Hofmeister [104].

En el caso del sulfato de amonio, el anión y el catión se encuentran en la región estabilizante de la serie de Hofmeister y su efecto es mayor en comparación con las otras sales de este estudio. El efecto de esta sal puede estar relacionado con efectos electrostáticos más fuertes entre los iones y la superficie cargada positivamente de la proteína y con los efectos que generan los iones de esta sal sobre la estructura de las moléculas del agua que solvatan la proteína [98,104,143]. Cuando se comparan las dos sales de amonio, el efecto ejercido por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es mayor que el efecto debido al NH_4NO_3 probablemente porque el anión SO_4^{2-} es más grande que el anión NO_3^- y puede ejercer una mayor interacción con la superficie cargada positivamente de la proteína [104].

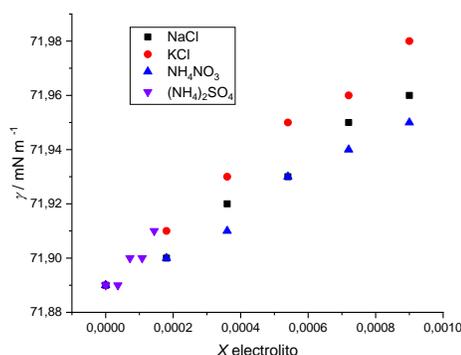
Para el cloruro de potasio, el catión está en la región estabilizante y el anión está en el punto neutro de la serie, mientras que en el caso del cloruro de sodio, tanto el anión como el catión están en el punto neutro de la serie y su efecto estabilizante es menor entre todas las sales usadas en este estudio.

El comportamiento observado de los electrolitos empleados en este estudio sobre la estabilidad del α -quimotripsinógeno puede ser analizado asumiendo que el efecto que ejercen los iones se puede alterar considerablemente por las propiedades superficiales cambiantes de la proteína, en particular, la carga superficial [22, 28-30]. Se han observado efectos estabilizantes similares utilizando NaCl, KCl y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con otras proteínas como la albúmina de suero bovino y la lisozima [144–148].

3.2 Relación entre la tensión superficial de electrolitos y la estabilidad del α -quimotripsinógeno A

Se determinó la tensión superficial a 298,15 K de las soluciones de electrolitos en agua empleando el método de gota, para determinar si existe una relación con el efecto estabilizante sobre la proteína. La Figura 16 muestra el comportamiento de la tensión superficial de soluciones acuosas de electrolitos a diferentes valores de concentración.

Figura 16. Tensión superficial de las soluciones acuosas de electrolitos determinadas a 298,15 K.



Los resultados obtenidos están en buen acuerdo con los reportados por otros autores [149–154]. Como se esperaba para las sales inorgánicas, la tensión superficial de la solución aumenta a medida que aumenta la fracción molar del electrolito.

En el rango de concentración, el cambio en la tensión superficial es directamente proporcional a la fracción molar del electrolito. Los datos experimentales se ajustaron mediante regresión de mínimos cuadrado a una línea recta. Los valores de las pendientes límites se muestran en la Tabla 7 junto con los valores de la literatura. Los

valores de literatura fueron convertidos de molalidad a fracción molar para hacer la comparación de los resultados obtenidos en este estudio [149–154]. Los resultados muestran que las pendientes límites de las curvas de tensión superficial son positivas, indicando que el exceso superficial es negativo en la interfase líquido / aire. Las pendientes están dentro del rango de valores reportados en la literatura y las diferencias pueden atribuirse a la variedad de métodos y la diferencia en el rango de concentración utilizado [149–154].

Tabla 7. Pendientes límite de tensión superficial para soluciones acuosas de electrolitos a 298,15 K y 75 kPa calculadas a partir de datos experimentales y datos reportados en literatura.

Electrolito	$(\partial\gamma / \partial X_2)_{X_2 \rightarrow 0}$ (mN m ⁻¹) Experimental	$(\partial\gamma / \partial X_2)_{X_2 \rightarrow 0}$ (mN m ⁻¹) Literatura
NaCl	80,96 ± 3,89	85,40 [149], 98,97 [150], 117,64 [151], 97,84 [152], 82,57 [153]
KCl	98,42 ± 4,29	88,79 [149], 93,32 [150], 104,63 [151], 89,92 [152]
NH ₄ NO ₃	69,84 ± 3,89	65,04 [151], 61,08 [152], 54,86 [153], 54,86 [26]
(NH ₄) ₂ SO ₄	138,91 ± 27,78	129,51 [152], 110,85 [153], 113,11 [154]

^a Las incertidumbres estándar son: $u(T) = 0,01$ K y $u(\partial\gamma / \partial X_2)_{X_2 \rightarrow 0} = 0,90$ mN m⁻¹ (max).

El α -quimotripsinógeno A se comporta como un tensioactivo, lo que indica que las moléculas de proteína tienden a adsorberse en la interfase debido a su naturaleza anfílica dando como resultado un exceso superficial positivo.

Para establecer si existe una relación entre la tensión superficial del solvente y el cambio en la estabilidad térmica del α -quimotripsinógeno en presencia de sales, el cambio en la temperatura de desnaturalización de la proteína y el valor de la tensión superficial de las soluciones acuosas de electrolitos se presentan en la Tabla 8. Las temperaturas de desnaturalización de la proteína en presencia de soluciones acuosas de electrolitos se tomaron de las medidas de calorimetría diferencial de barrido debido a la sensibilidad de

esta técnica y porque los valores comparados con los obtenidos por UV-Vis no difieren mucho entre sí.

Tabla 8. Temperatura media de desnaturalización del α -quimotripsinógeno y tensión superficial de las soluciones acuosas de electrolitos en función de la fracción molar del electrolito.

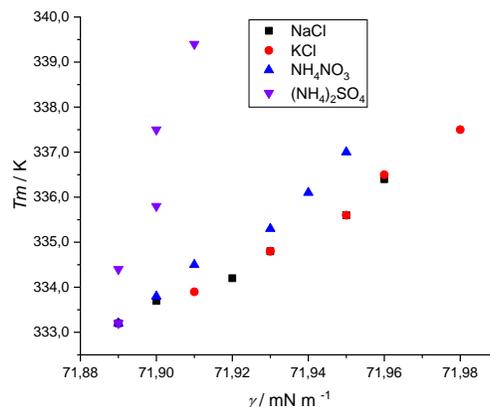
$X_{\text{electrolito}}$ $\times 10^3$	NaCl		KCl		NH ₄ NO ₃		(NH ₄) ₂ SO ₄		
	$T_m /$ K	γ (mN m ⁻¹)	$T_m /$ K	γ (mN m ⁻¹)	$T_m /$ K	γ (mN m ⁻¹)	X (NH ₄) ₂ SO ₄ $\times 10^3$	$T_m /$ K	γ (mN m ⁻¹)
0,00	333,2	71,89	333,2	71,89	333,2	71,89	0,00	333,2	71,89
0,18	333,7	71,90	333,9	71,91	333,8	71,90	0,04	334,4	71,89
0,36	334,2	71,92	334,8	71,93	334,5	71,91	0,07	335,8	71,90
0,54	334,8	71,93	335,6	71,95	335,3	71,93	0,11	337,5	71,90
0,72	335,6	71,95	336,5	71,96	336,1	71,94	0,14	339,4	71,91
0,90	336,4	71,96	337,5	71,98	337,0	71,95			

^a Las incertidumbres estándar son: $u(x_2 \times 10^4) = 0,02$, $u(T) = 0,01$ K, $u(\gamma) = 0,06$ mN m⁻¹.

Los datos de la Tabla 8 muestran que la adición de los electrolitos empleados en este estudio genera un pequeño incremento en la tensión superficial del agua, indicando que el comportamiento superficial de la proteína en solución acuosa no es muy sensible a la adición de sales. La presencia de electrolitos incrementa la estabilidad conformacional del α -quimotripsinógeno porque incrementa la temperatura media de desnaturalización como se observa en la Tabla 8.

En la Figura 17 se presenta el comportamiento de la temperatura media de desnaturalización de la proteína en soluciones acuosas de electrolitos en función de la tensión superficial. Los resultados muestran que la estabilización térmica del α -quimotripsinógeno mediante la adición de los electrolitos seleccionados presenta una correlación con el aumento de la tensión superficial del disolvente, como han mostrado otros estudios para proteínas globulares [67,155].

Figura 17. Cambio en la temperatura media de desnaturalización del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de electrolitos en función de la tensión superficial de las soluciones acuosas de electrolitos a 298,15 K y pH 3,50.



Los resultados sugieren que la estabilidad de la proteína en soluciones acuosas de electrolitos posiblemente esté relacionada con el cambio en la tensión superficial del disolvente y es una consecuencia de que los cosolventes se excluyen preferencialmente de la interfase aire-agua. Las especies fuertemente hidratadas como el sulfato de amonio generan un mayor aumento en la tensión superficial del agua y las especies débilmente hidratadas como el cloruro de sodio generan un menor incremento en la tensión superficial del agua [156].

3.3 Adsorción del α -quimotripsinógeno A en la interfase aire-agua en agua y en soluciones acuosas de electrolitos

Se estudió la adsorción del α -quimotripsinógeno en la interfase aire-agua, en agua y en soluciones acuosas de electrolitos siguiendo el cambio de la tensión superficial en función del tiempo para la proteína disuelta en agua y en las soluciones acuosas de las sales $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NaCl , KCl a 298,15K empleando el método cuasi-estático. A partir de los datos de tensión superficial de la proteína en función del tiempo y con los datos de la tensión superficial de las soluciones acuosas de electrolitos se calculó la presión superficial (π) a partir de la diferencia de la tensión superficial de la solución de

electrolito (γ^o) y la tensión superficial de la solución acuosa de electrolito con la proteína (γ) como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\pi = \gamma^o - \gamma \quad (37)$$

Se ha encontrado que el proceso de adsorción de la proteína en la interfase agua/aire se puede representar por modelos cinéticos suponiendo que no existen gradientes de temperatura o de concentración mientras ocurre el proceso.

Un primer modelo sugiere que el proceso de adsorción de la proteína en la interfase agua/aire ocurre en dos etapas, la primera etapa corresponde al proceso de difusión de la proteína desde el seno de la solución hasta la interfase agua/aire, es decir se trata de un primer paso controlado por difusión seguido de una segunda etapa que implica la adsorción de moléculas de proteína junto con el rearrreglo de las moléculas en la interfase

El segundo modelo sugiere que el proceso de adsorción de la proteína en la interfase líquido/aire ocurre en tres etapas, una primera etapa controlada por el proceso difusivo, la segunda etapa implica la adsorción de moléculas de proteína en la interfase, y una tercera etapa que a través de un proceso lento, puede implicar cambios en la estructura tridimensional y reordenamiento molecular de la proteína adsorbida y que puede ocurrir con un despliegue parcial de la estructura proteica.

El paso de difusión generalmente se presenta por la siguiente expresión [77,81,157–159]:

$$\pi(t) = 2kTC_b \sqrt{\frac{Dt}{3,14}} \quad (30)$$

Donde k es la constante de Boltzman, C_b es la concentración de la proteína en la solución, D es el coeficiente de difusión de la proteína en el disolvente, T es la temperatura absoluta y t es el tiempo de formación de la gota a la cual se le mide la tensión superficial.

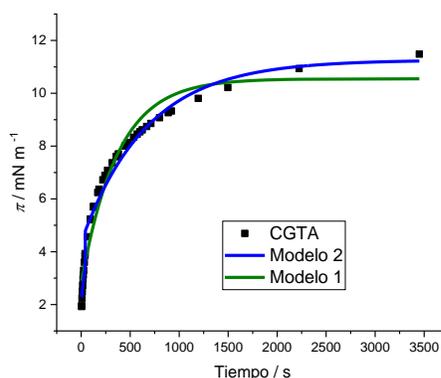
La adsorción y el rearreglo de las moléculas de proteína en la interfase en uno o dos pasos usualmente se representa por expresiones cinéticas semiempíricas de primer orden como se muestra en la siguiente ecuación [77,81,157–159]:

$$\ln \frac{\pi_f - \pi_t}{\pi_f - \pi_0} = -kt \quad (31)$$

Donde π_f y π_0 son las presiones superficiales en el tiempo final e inicial de adsorción de cada etapa respectivamente; π_t es la presión durante la etapa correspondiente, t es el tiempo medido de formación de gota y k es la constante cinética de primer orden.

La isoterma de adsorción para el α -quimotripsinógeno A en la interfase agua/aire se presenta en la Figura 18 y fue determinada empleando una concentración de proteína de $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$; los datos obtenidos se ajustaron a los dos modelos descritos anteriormente, el modelo uno corresponde al modelo de dos etapas y el modelo dos corresponde al modelo de tres etapas. El ajuste de los datos se realizó haciendo uso del software Origin Pro 9.5.

Figura 18. Evolución de la presión superficial del α -quimotripsinógeno en la interfase agua/aire a 298,15 K.



El perfil de adsorción de la proteína α -quimotripsinógeno en agua sigue la misma tendencia observada en estudios reportados por otros autores [77,119]. Los resultados experimentales muestran que no se observa un desfase de tiempo lo que indica que no

hay período de inducción. La proteína provoca la rápida disminución de la tensión superficial del agua, lo que indica que las moléculas de proteína tienden a adsorberse en la interfase debido a su naturaleza anfifílica. En consecuencia, la presión superficial aumenta rápidamente durante un breve período de tiempo y luego el aumento de la presión superficial disminuye hasta que se alcanza el valor de equilibrio.

Como se muestra en la Figura 18 los datos se ajustaron a los dos modelos cinéticos. El modelo uno, de dos pasos no se ajusta al comportamiento experimental del α -quimotripsinógeno en la interfase agua-aire, mientras que el modelo dos, de tres pasos se ajusta bien a los datos experimentales. Esto significa que el proceso de adsorción del α -quimotripsinógeno en la interfase agua-aire puede representarse mediante un modelo de tres pasos. Inicialmente sucede un paso de difusión que en este caso es demasiado rápido para ser medido con precisión usando el método cuasiestático, pues el tiempo para el paso de difusión está por debajo del tiempo experimental más bajo medido (30 s). Después de la rápida etapa de difusión, la velocidad de adsorción de las moléculas de proteína disminuye y está controlada por los procesos de penetración, reordenamiento y el despliegue parcial de la proteína en la interfase. Estos dos pasos se pueden describir por una cinética de primer orden y el comportamiento logarítmico para estas dos etapas se puede expresar por medio de la ecuación 31 [77,81,157–159].

Los parámetros del modelo de tres etapas que permiten describir la adsorción en la interfase agua-aire para una solución de α -quimotripsinógeno en agua con una concentración de $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ se muestran en la Tabla 9. π_{f1} y π_{f2} representan la presión final del primer y segundo paso logarítmico, k_1 representa la constante de penetración de las moléculas de proteína en la interfase agua-aire y k_2 representa la constante de reordenamiento de moléculas de proteína en la interfase.

Los resultados presentados en la Tabla 9 muestran que la velocidad del proceso de penetración del α -quimotripsinógeno en el agua en la interfase líquido-aire es mucho mayor que la velocidad de reordenamiento.

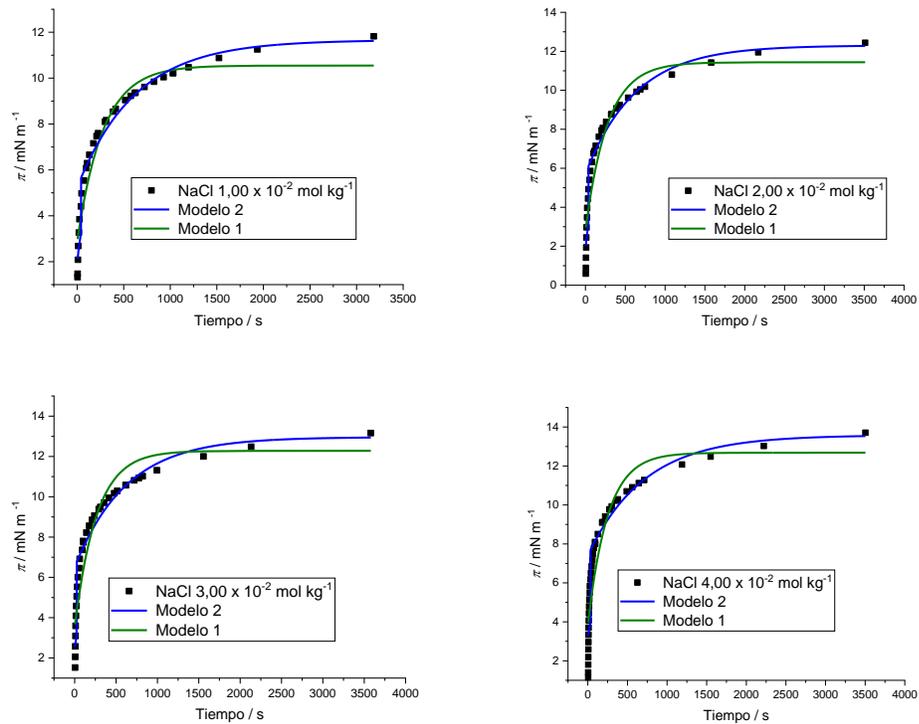
Tabla 9. Parámetros de adsorción del modelo cinético de tres pasos para el α -quimotripsinógeno en agua a 298,15K.

π_l (mN m ⁻¹)	π_f (mN m ⁻¹)	k_1 (s ⁻¹)	k_2 (s ⁻¹)
7,28	11,36	0,0052	0,0014

^a Las incertidumbres estándar son: $u(\pi) = 0,6$ mN m⁻¹, $u(k_1) = 0,0002$ s⁻¹, $u(k_2) = 0,0004$ s⁻¹

La adsorción en la interfase líquido-aire de la proteína en presencia de electrolitos a 298,15 K se determinó siguiendo el procedimiento descrito previamente. El efecto de la concentración de sales sobre los perfiles de adsorción se muestra en las Figuras 19-22.

Figura 19. Efecto de la concentración de cloruro de sodio sobre el perfil de adsorción del α -quimotripsinógeno en solución acuosa a 298,15 K.



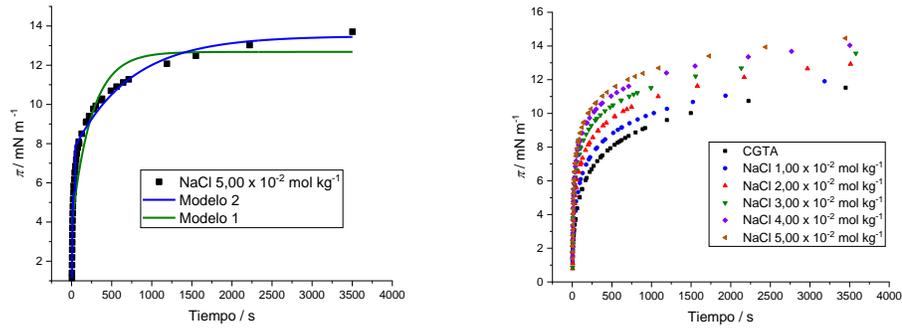
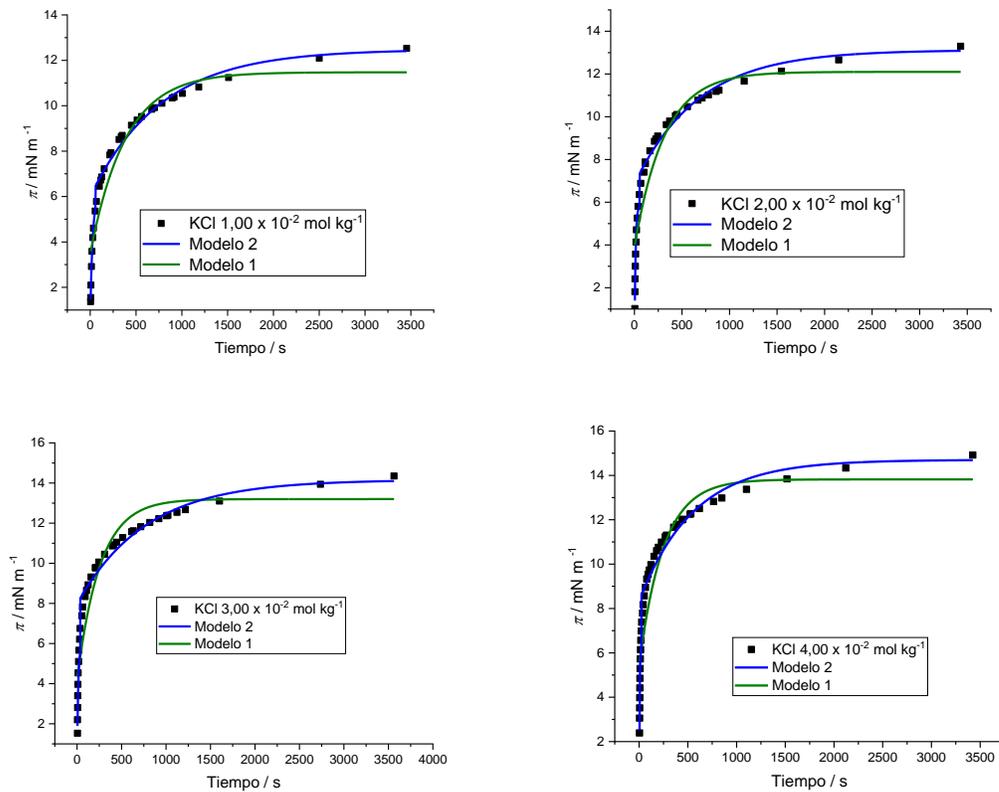


Figura 20. Efecto de la concentración de cloruro de potasio sobre el perfil de adsorción del α -quimotripsinógeno en solución acuosa a 298,15 K.



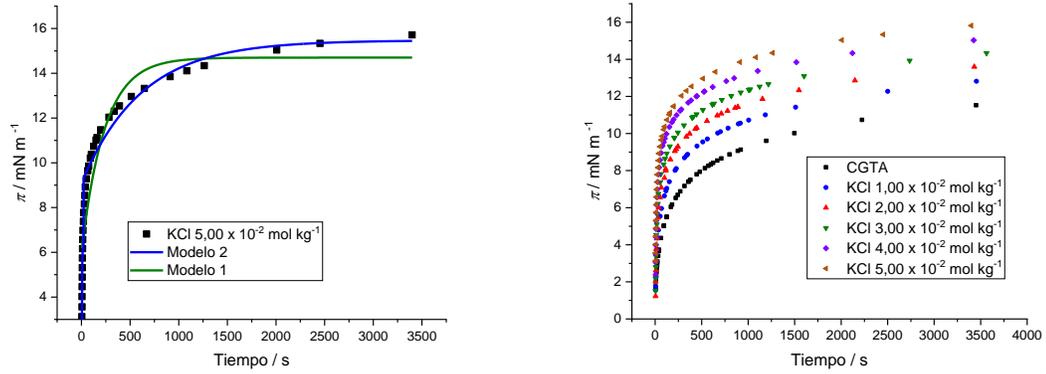
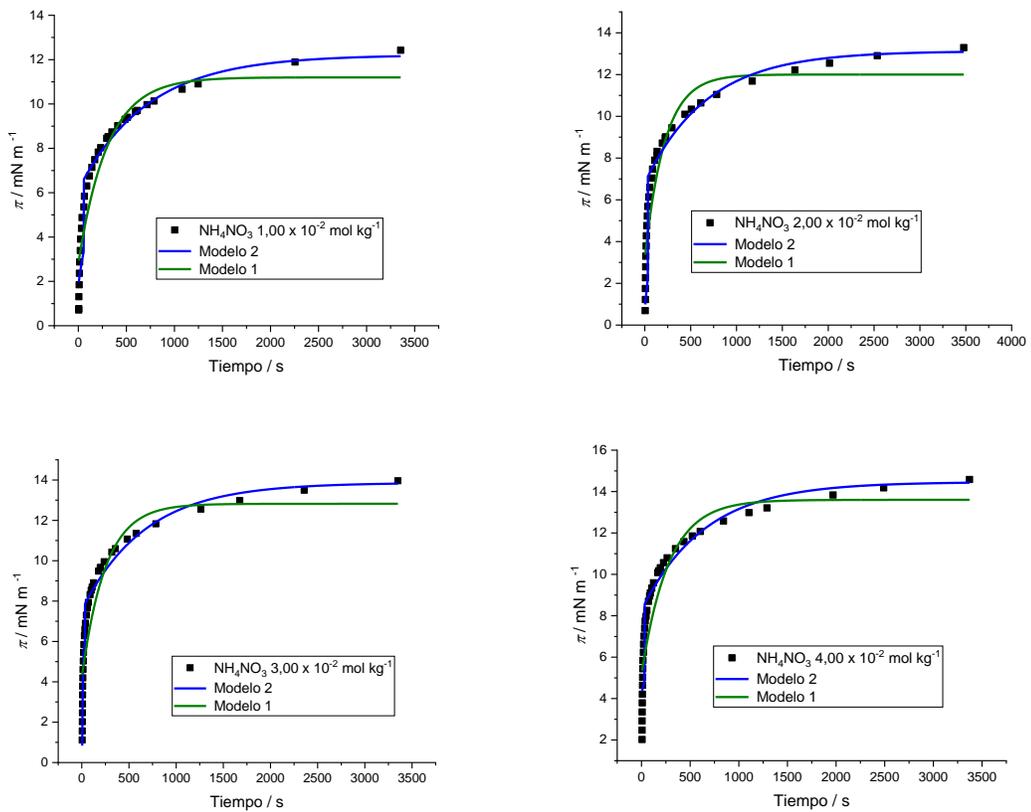


Figura 21. Efecto de la concentración de nitrato de amonio sobre el perfil de adsorción del α -quimotripsinógeno en solución acuosa a 298,15 K.



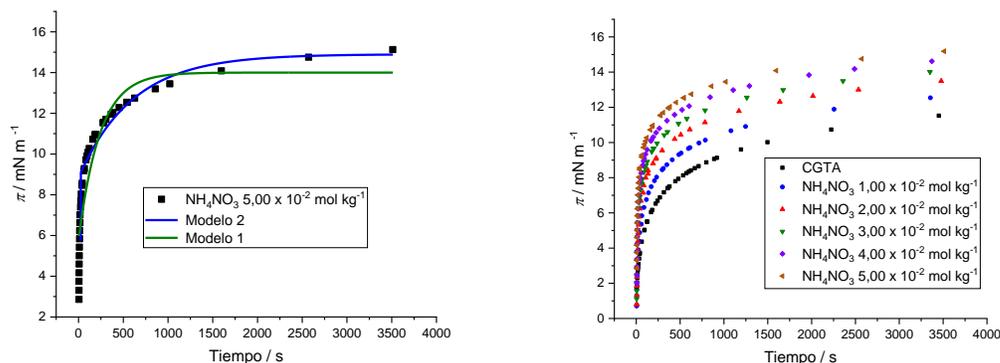
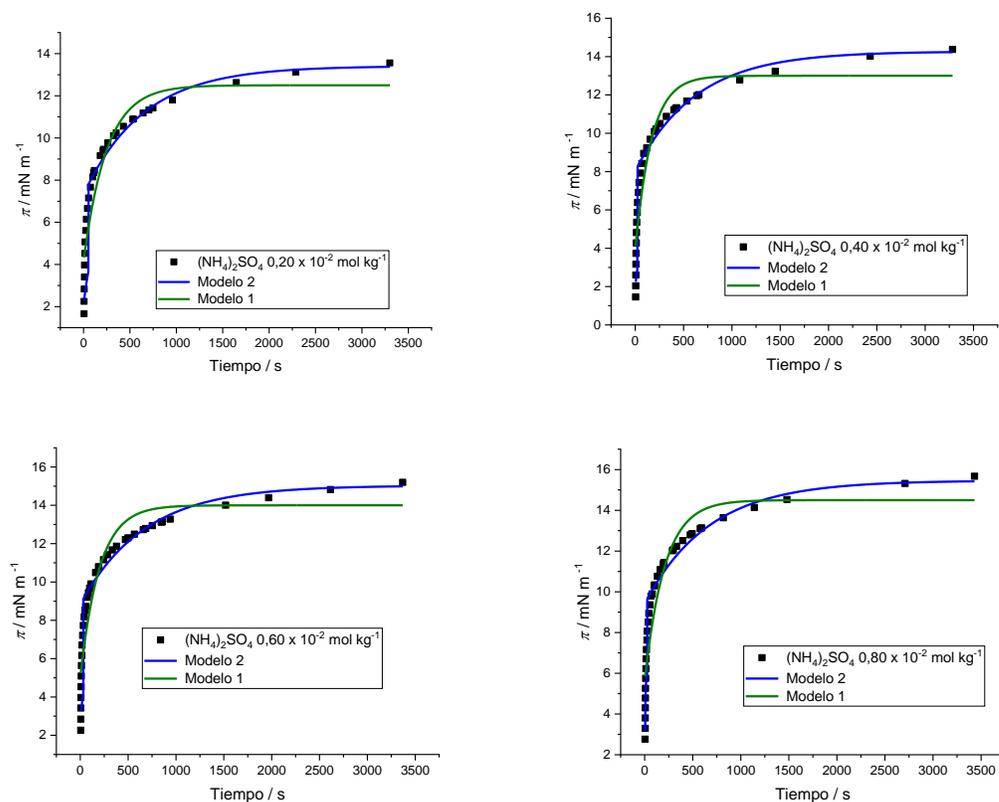
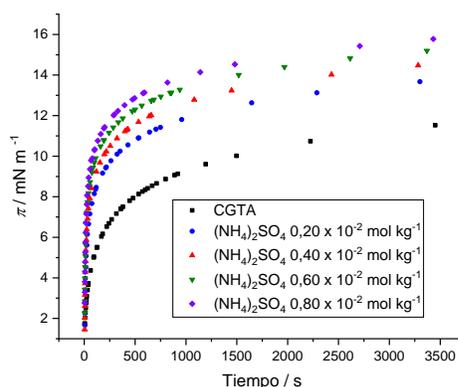


Figura 22. Efecto de la concentración de sulfato de amonio sobre el perfil de adsorción del α -quimotripsinógeno en solución acuosa a 298,15 K.





Las Figuras 19-22 muestran que la adición de electrolitos aumenta la presión superficial respecto a la presión superficial de la proteína en solución acuosa siendo el efecto mayor a medida que aumenta la concentración de electrolito. Los perfiles de adsorción se ajustan bien al modelo cinético de tres pasos y no reflejan la existencia de un período de inducción al igual que se observó para la proteína en agua. La siguiente tabla muestra los parámetros cinéticos del proceso de adsorción de la proteína en la interfase aire-agua en presencia de electrolitos a 298,15 K.

Tabla 10. Parámetros de adsorción del modelo cinético de tres pasos para el α -quimotripsinógeno A en soluciones acuosas de electrolitos a 298,15 K.

Electrolito / mol kg ⁻¹ x 10 ²	π_{f1} (mN m ⁻¹)	π_{f2} (mN m ⁻¹)	k_1 (s ⁻¹)	k_2 (s ⁻¹)
NaCl				
0,0	7,28	11,36	0,0052	0,0014
1,0	7,31	11,72	0,0092	0,0016
2,0	7,36	12,30	0,0098	0,0016
3,0	7,40	12,96	0,0102	0,0018
4,0	7,40	13,62	0,0114	0,0015
5,0	7,44	13,92	0,0124	0,0016
KCl				
0,0	7,28	11,36	0,0052	0,0014
1,0	7,32	12,51	0,0096	0,0013
2,0	7,40	13,12	0,0112	0,0015
3,0	7,38	14,18	0,0119	0,0013

4,0	7,38	14,81	0,0128	0,0015
5,0	7,42	15,52	0,0140	0,0016
NH₄NO₃				
0,0	7,28	11,36	0,0052	0,0014
1,0	7,28	12,18	0,0093	0,0014
2,0	7,34	13,12	0,0100	0,0015
3,0	7,36	13,86	0,0108	0,0016
4,0	7,33	14,51	0,0114	0,0015
5,0	7,34	14,90	0,0126	0,0016
(NH₄)₂SO₄				
0,00	7,28	11,36	0,0052	0,0014
0,02	7,36	13,42	0,0114	0,0016
0,04	7,40	14,23	0,0124	0,0017
0,06	7,38	15,04	0,0136	0,0015
0,08	7,36	15,48	0,0144	0,0015

^a Las incertidumbres estándar son: $u(\pi) = 0,6 \text{ mN m}^{-1}$, $u(k_1) = 0,0002 \text{ s}^{-1}$, $u(k_2) = 0,0004 \text{ s}^{-1}$.

Comparando la presión superficial de equilibrio de la proteína en presencia de sales con el comportamiento de la proteína en el agua, se observa que la adición de sales provoca un pequeño aumento de la presión final (π_{r1}) del primer paso logarítmico (paso de adsorción) y un mayor aumento en la presión final del segundo paso logarítmico π_{r2} (paso de reordenamiento). La presión final de la etapa de adsorción muestra que la adición de cloruro de sodio y cloruro de potasio provoca un pequeño aumento de la presión superficial con respecto a la proteína en solución acuosa, siendo el incremento mayor a medida que aumenta la concentración de la sal. Para el nitrato de amonio y el sulfato de amonio, el cambio observado es muy pequeño y las diferencias están dentro de la incertidumbre determinada. Los datos de la presión superficial de equilibrio π_{r2} muestran que la adición de sales ejerce un aumento significativo de la presión de equilibrio la cual aumenta a medida que aumenta la concentración de sal. El efecto aumenta en el siguiente orden: $\text{NaCl} < \text{NH}_4\text{NO}_3 < \text{KCl} < (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

El aumento de la presión final de la etapa de rearreglo y despliegue parcial de la proteína sigue la misma tendencia observada para el aumento de la temperatura media de desnaturalización ejercida por las sales y su efecto estabilizante sobre la proteína α -quimotripsinógeno A. Para todos los sistemas estudiados, la constante cinética k_1 aumenta con la concentración de sal, mientras que la constante cinética k_2 tiende a ser constante, lo que sugiere que el proceso de reordenamiento de la proteína en la interfase es independiente de la naturaleza y la concentración de electrolito.

La constante cinética k_1 , que representa la tasa de penetración y adsorción de la proteína en la interfase líquido-aire, es mayor que la constante cinética k_2 , para todos los perfiles de adsorción, lo que sugiere que el paso que controla el proceso de adsorción es la penetración y adsorción de la proteína en la interfase líquido-aire. La constante cinética k_1 aumenta a medida que aumenta la concentración de electrolito y el cambio es muy similar para los diferentes electrolitos utilizados, mientras que k_2 es muy pequeño y permanece aproximadamente constante con el cambio de concentración de sal y con todas las sales utilizadas en este estudio, lo que sugiere que el proceso de reordenamiento de la proteína en la interfase es independiente de la naturaleza y la concentración de sales.

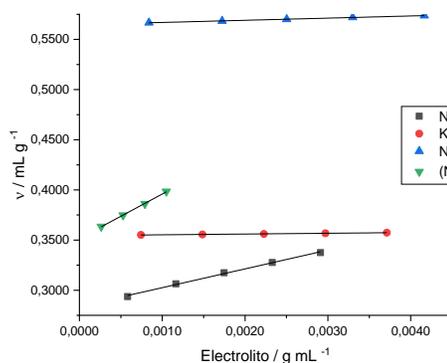
3.4 Parámetros de interacción preferencial

Los parámetros de interacción preferencial entre los electrolitos y el α -quimotripsinógeno A, fueron determinados a 298,15 K a partir de medidas de densidad. Se determinó en primer lugar el volumen específico aparente para cada concentración de electrolito y a partir del ajuste lineal ponderado y extrapolando a dilución infinitesimal se determinó el volumen aparente específico a dilución infinita para cada electrolito como se muestra en la Figura 23. A dilución infinita, el volumen aparente específico se hace igual al volumen parcial específico. La Tabla 11 presenta los valores de densidad y volumen específico aparente en función de la molalidad de electrolito a 298,15 K. Los datos de densidad para las soluciones de electrolitos fueron graficados en función de la concentración y se muestran en el Anexo B, Figura B1.

Tabla 11. Volumen específico aparente (v) y densidades (ρ) de las soluciones de electrolitos en función de la molalidad (m) a 298,15 K.

NaCl			KCl		
$m / \text{mol kg}^{-1}$	$\rho^a / \text{g mL}^{-1}$	$v / \text{mL g}^{-1}$	$m / \text{mol kg}^{-1}$	$\rho^a / \text{g mL}^{-1}$	$v / \text{mL g}^{-1}$
0,0000	0,997043		0,0000	0,997043	
$0,0100 \pm 4,5\text{E-}05$	0,997455	$0,2936 \pm 0,0059$	$0,0100 \pm 5,5\text{E-}05$	0,997523	$0,0100 \pm 6,8\text{E-}05$
$0,0200 \pm 5,5\text{E-}05$	0,997852	$0,3064 \pm 0,0055$	$0,0200 \pm 5,2\text{E-}05$	0,998002	$0,0200 \pm 5,6\text{E-}05$
$0,0300 \pm 4,8\text{E-}05$	0,998237	$0,3175 \pm 0,0048$	$0,0300 \pm 4,6\text{E-}05$	0,998480	$0,0300 \pm 4,8\text{E-}05$
$0,0400 \pm 4,9\text{E-}05$	0,998611	$0,3277 \pm 0,0046$	$0,0400 \pm 4,9\text{E-}05$	0,998957	$0,0400 \pm 4,7\text{E-}05$
$0,0500 \pm 4,3\text{E-}05$	0,998974	$0,3375 \pm 0,0043$	$0,0500 \pm 4,1\text{E-}05$	0,999432	$0,0500 \pm 4,9\text{E-}05$
NH_4NO_3			$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		
$m / \text{mol kg}^{-1}$	$\rho^a / \text{g mL}^{-1}$	$v / \text{mL g}^{-1}$	$m / \text{mol kg}^{-1}$	$\rho^a / \text{g mL}^{-1}$	$v / \text{mL g}^{-1}$
0,0000	0,997043		0,0000	0,997043	
$0,0100 \pm 4,7\text{E-}05$	0,997390	$0,5667 \pm 0,0061$	$0,0020 \pm 4,8\text{E-}05$	0,997211	$0,3634 \pm 0,0063$
$0,0200 \pm 4,1\text{E-}05$	0,997734	$0,5684 \pm 0,0055$	$0,0040 \pm 4,1\text{E-}05$	0,997373	$0,3748 \pm 0,0055$
$0,0300 \pm 4,4\text{E-}05$	0,998075	$0,5701 \pm 0,0051$	$0,0060 \pm 3,7\text{E-}05$	0,997529	$0,3861 \pm 0,0052$
$0,0400 \pm 3,8\text{E-}05$	0,998412	$0,5721 \pm 0,0044$	$0,0080 \pm 4,4\text{E-}05$	0,997678	$0,3985 \pm 0,0049$
$0,0500 \pm 3,6\text{E-}05$	0,998747	$0,5737 \pm 0,0044$			

^a La incertidumbre en las medidas de densidad es de $1,50\text{E-}04 \text{ g mL}^{-1}$

Figura 23. Volumen específico aparente de los electrolitos en función de la concentración C (g mL^{-1}) a 298,15 K.

Los volúmenes parciales específicos obtenidos a partir de medidas de densidad a 298,15 K están en buen acuerdo con los valores reportados por varios autores para los

electrolitos empleados en este estudio, y las diferencias se pueden presentar posiblemente por el intervalo de concentración en el cual se llevaron a cabo las medidas.

La Tabla 12 muestra los valores de los volúmenes parciales específicos reportados por algunos autores y los valores obtenidos en este estudio. Para poder realizar la comparación los datos de literatura fueron convertidos de mL mol⁻¹ a mL g⁻¹.

Tabla 12. Volumen parcial específico a dilución infinitesimal (v^0) de los diferentes de los electrolitos a 298,15 K.

Electrolito	v^0 / mL g ⁻¹
NaCl	0,2838 ± 0,0081 0,2779 [160], 0,2863 [161]
KCl	0,3576 ± 0,0077 0,3603 [161], 0,3612 [162],
NH ₄ NO ₃	0,5648 ± 0,0073 0,5876 [163]
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3518 ± 0,0076 0,3775 [164] – 0,4426 [164]

Los volúmenes específicos aparentes del α -quimotripsinógeno en las soluciones acuosas de electrolitos se determinaron a partir de medidas de densidad bajo la condición de molalidad constante de electrolito (ϕ_2) y bajo la condición de potencial químico constante (ϕ_2') empleando la siguiente ecuación:

$$\phi = \frac{1}{\rho_o} \left(1 - \frac{\rho - \rho_o}{C_2} \right) \quad (17)$$

ρ_o es la densidad del disolvente de referencia (electrolito-agua), ρ la densidad de la solución con proteína, y C_2 es la concentración de proteína expresada en gramos por mililitro. Los datos de densidad y de volumen específico aparente de la proteína para cada concentración de electrolito a molalidad constante y potencial químico constante se muestran en el Anexo B, Tablas B1-B4.

A partir de las gráficas de volumen específico aparente en función de la concentración de proteína, se realizó un ajuste lineal ponderado de los datos para determinar a dilución infinitesimal el volumen parcial específico de la proteína en las soluciones de electrolito a molalidad constante (ϕ_2^0) y a potencial químico constante ($\phi_2'^0$) como se muestra en las Figuras 24-27. A partir de estos parámetros se determinó el parámetro de interacción preferencial entre la proteína y los electrolitos empleando la siguiente ecuación:

$$\xi_3 = \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2} \right)_{T, \mu_1, \mu_3} = \frac{\rho_o (\phi_2^0 - \phi_2'^0)}{(1 - \rho_o \bar{v}_3)} \quad (16)$$

donde ρ_o es la densidad del disolvente de referencia (electrolito-agua), \bar{v}_3 es el volumen parcial específico del electrolito, ϕ_2^o es el volumen parcial específico de la proteína a concentración molal constante del electrolito, $\phi_2'^o$ es el volumen parcial específico de la proteína a potencial químico constante de electrolito [64,65].

El correspondiente parámetro de hidratación preferencial se determinó a partir del parámetro de interacción preferencial como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2} \right)_{T, \mu_1, \mu_3} = \frac{1}{g_3} \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2} \right)_{T, \mu_1, \mu_3} \quad (18)$$

Donde g_3 es la concentración del componente 3 (electrolito) expresado en gramos por gramo de agua.

Las Tablas 13-16 presentan los valores de volumen parcial específico de la proteína y los correspondientes valores del parámetro de interacción preferencial e hidratación preferencial.

Tabla 13. Volúmenes parciales específicos a molalidad constante (ϕ_2^0), a potencial químico constante ($\phi_2^{\prime 0}$) y valores de parámetros de interacción (ξ_3) e hidratación preferencial ($\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T, \mu_1, \mu_3}$) del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de cloruro de sodio a 298,15 K.

NaCl $m / \text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	$\phi_2^0 / \text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	$\phi_2^{\prime 0} / \text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	$\xi_3 / \text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	$\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T, \mu_1, \mu_3}$
0,0100	$0,6035 \pm 0,0068$	$0,6053 \pm 0,0078$	$-0,00253 \pm 2,7\text{E-}04$	$4,339 \pm 0,040$
0,0200	$0,4453 \pm 0,0064$	$0,4474 \pm 0,0073$	$-0,00292 \pm 6,5\text{E-}04$	$2,516 \pm 0,056$
0,0300	$0,4819 \pm 0,0054$	$0,4844 \pm 0,0068$	$-0,00334 \pm 4,1\text{E-}04$	$1,926 \pm 0,019$
0,0400	$0,3753 \pm 0,0058$	$0,3781 \pm 0,0065$	$-0,00391 \pm 3,7\text{E-}04$	$1,685 \pm 0,026$
0,0500	$0,4032 \pm 0,0056$	$0,4063 \pm 0,0058$	$-0,00432 \pm 6,1\text{E-}04$	$1,494 \pm 0,013$

Figura 24. Volumen específico aparente del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de NaCl (a) molalidad constante (ϕ_2) y (b) potencial químico constante (ϕ_2^{\prime}) a 298,15 K.

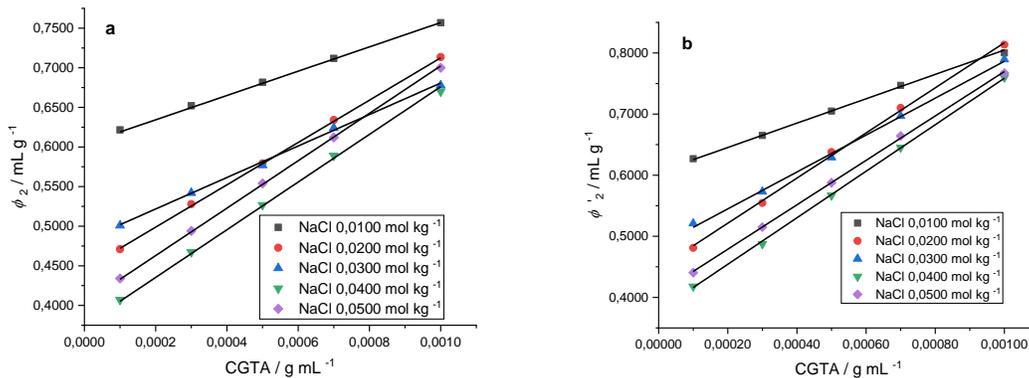


Tabla 14. Volúmenes parciales específicos a molalidad constante (ϕ_2^0), a potencial químico constante ($\phi_2^{\prime 0}$) y valores de parámetros de interacción (ξ_3) e hidratación preferencial ($\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)$) del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de cloruro de potasio a 298,15 K.

KCl $m / \text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	$\phi_2^0 / \text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	$\phi_2^{\prime 0} / \text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	$\xi_3 / \text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	$\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T, \mu_1, \mu_3}$
0,0100	$0,7086 \pm 0,0084$	$0,7130 \pm 0,0092$	$-0,0069 \pm 1,8\text{E-}04$	$9,286 \pm 0,016$
0,0200	$0,7406 \pm 0,0081$	$0,7455 \pm 0,0088$	$-0,0074 \pm 7,3\text{E-}04$	$4,971 \pm 0,049$
0,0300	$0,7190 \pm 0,0077$	$0,7242 \pm 0,0080$	$-0,0080 \pm 1,2\text{E-}04$	$3,592 \pm 0,055$
0,0400	$0,6947 \pm 0,0076$	$0,7004 \pm 0,0086$	$-0,0088 \pm 2,9\text{E-}04$	$2,986 \pm 0,044$
0,0500	$0,7289 \pm 0,0068$	$0,7349 \pm 0,0078$	$-0,0093 \pm 3,9\text{E-}04$	$2,489 \pm 0,024$

Figura 25. Volumen específico aparente del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de KCl (a) molalidad constante (ϕ_2) y (b) potencial químico constante (ϕ_2^{\prime}) a 298,15 K.

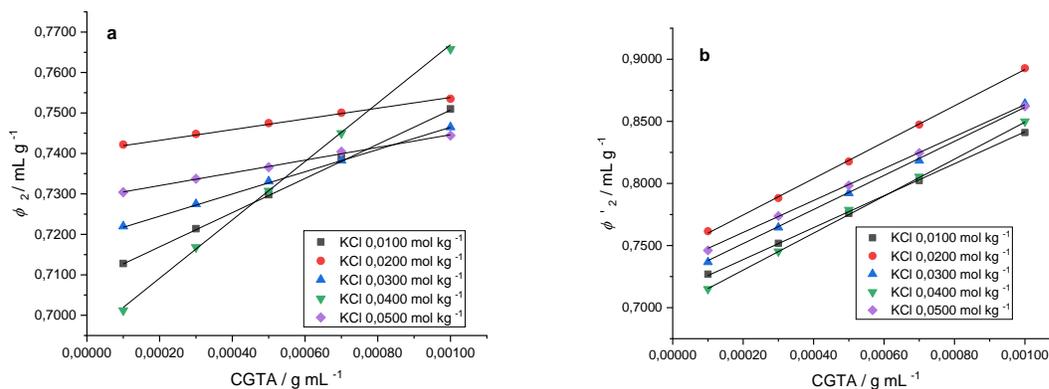


Tabla 15. Volúmenes parciales específicos a molalidad constante (ϕ_2^0), a potencial químico constante ($\phi_2^{\prime 0}$) y valores de parámetros de interacción (ξ_3) e hidratación preferencial ($\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)$) del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de nitrato de amonio a 298,15 K.

NH_4NO_3 $m / \text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	$\phi_2^0 / \text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	$\phi_2^{\prime 0} / \text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	$\xi_3 / \text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	$\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T, \mu_1, \mu_3}$
0,0100	$0,6407 \pm 0,0091$	$0,6423 \pm 0,0081$	$-0,0037 \pm 6,3\text{E-}04$	$4,336 \pm 0,096$
0,0200	$0,6751 \pm 0,0088$	$0,6772 \pm 0,0072$	$-0,0048 \pm 5,2\text{E-}04$	$2,774 \pm 0,042$
0,0300	$0,6022 \pm 0,0061$	$0,6048 \pm 0,0068$	$-0,0059 \pm 7,1\text{E-}04$	$2,366 \pm 0,032$
0,0400	$0,7186 \pm 0,0058$	$0,7213 \pm 0,0056$	$-0,0062 \pm 2,8\text{E-}04$	$1,864 \pm 0,026$
0,0500	$0,6198 \pm 0,0068$	$0,6227 \pm 0,0076$	$-0,0066 \pm 3,3\text{E-}04$	$1,586 \pm 0,048$

Figura 26. Volumen específico aparente del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de NH_4NO_3 (a) molalidad constante (ϕ_2) y (b) potencial químico constante (ϕ_2') a 298,15 K.

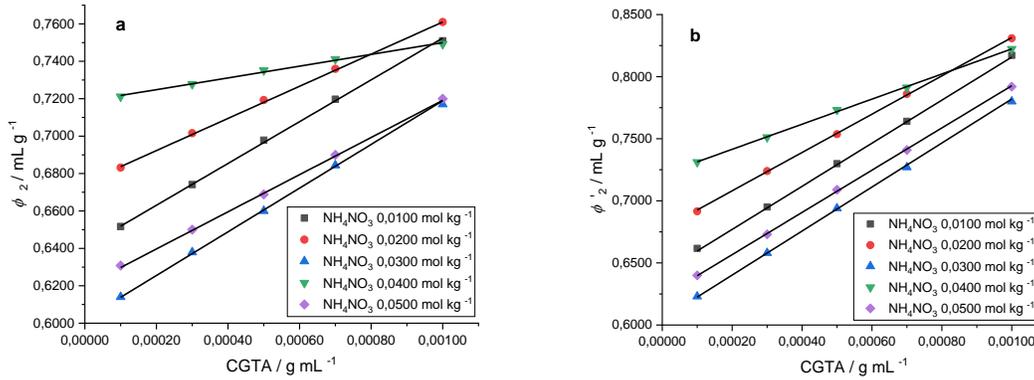
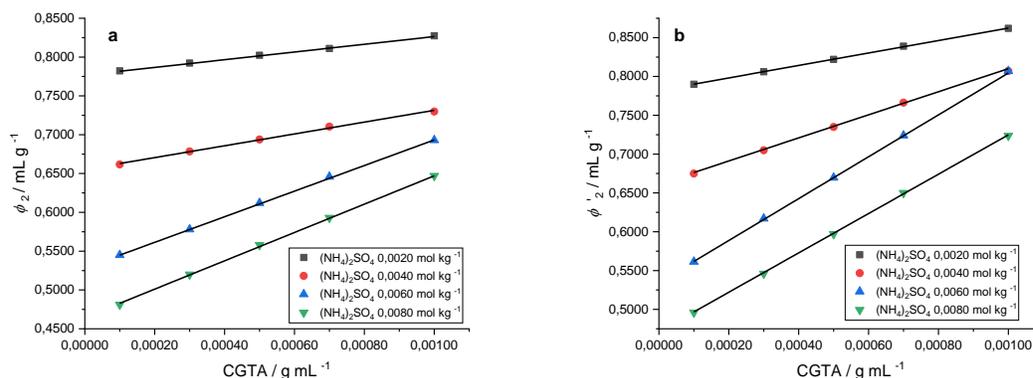


Tabla 16. Volúmenes parciales específicos a molalidad constante (ϕ_2^0), a potencial químico constante ($\phi_2'^0$) y valores de parámetros de interacción (ξ_3) e hidratación preferencial ($\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)$) del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de sulfato de amonio a 298,15 K.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $m/\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$	$\phi_2^0 / \text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$	$\phi_2'^0 / \text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$	$\xi_3 / \text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3}$
0,0020	$0,7767 \pm 0,0087$	$0,7821 \pm 0,0091$	$-0,0083 \pm 6,1\text{E-}04$	$31,33 \pm 0,042$
0,0040	$0,6553 \pm 0,0077$	$0,6614 \pm 0,0086$	$-0,0094 \pm 2,8\text{E-}04$	$17,72 \pm 0,061$
0,0060	$0,5284 \pm 0,0068$	$0,5348 \pm 0,0075$	$-0,0098 \pm 3,4\text{E-}04$	$12,39 \pm 0,035$
0,0080	$0,4646 \pm 0,0062$	$0,4714 \pm 0,0070$	$-0,0104 \pm 2,2\text{E-}04$	$9,916 \pm 0,021$

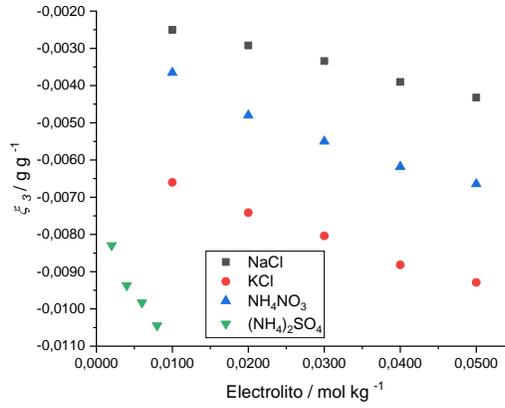
Figura 27. Volumen específico aparente del α -quimotripsinógeno en soluciones acuosas de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (a) molalidad constante (ϕ_2) y (b) potencial químico constante (ϕ_2') a 298,15 K.



Los valores de interacción preferencial (ξ_3) entre la proteína y las diferentes sales empleadas en este estudio son negativos indicando de esta manera que los electrolitos son excluidos del dominio de la proteína. Como se puede observar en las Tablas 13-16 el valor de este parámetro se hace más negativo a medida que aumenta la concentración de electrolito indicando que a mayor concentración de electrolito habrá una mayor exclusión de moléculas de sal del dominio de la proteína. La Figura 28 presenta el comportamiento del parámetro de interacción preferencial en función de la concentración de electrolito. En todos los casos las pendientes son negativas y el mayor valor lo presenta el sulfato de amonio indicando que esta sal genera un mayor efecto estabilizante en la estructura plegada de la proteína.

La exclusión de moléculas de electrolito genera una estabilización extra sobre la estructura nativa de la proteína que concuerda con los resultados obtenidos en los perfiles de desnaturalización térmica obtenidos por calorimetría diferencial de barrido y por UV-Vis en este estudio. Los valores del parámetro de hidratación preferencial en todos los casos son positivos indicando que la proteína excluye de su dominio las moléculas de electrolito y se rodea preferencialmente de moléculas de agua generando un efecto estabilizante. Resultados similares se han obtenido en el caso del cloruro de sodio con proteínas como la lisozima, y albumina sérica bovina [72].

Figura 28. Parámetro de interacción preferencial en función de la concentración de electrolito.



Los parámetros de interacción preferencial (ξ_3) y de hidratación preferencial $\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)$ se pueden expresar en mol/mol mediante las siguientes ecuaciones:

$$\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} = \frac{M_2}{M_3} \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} \quad (24)$$

$$\left(\frac{\partial m_1}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} = \frac{M_2}{M_1} \left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} \quad (25)$$

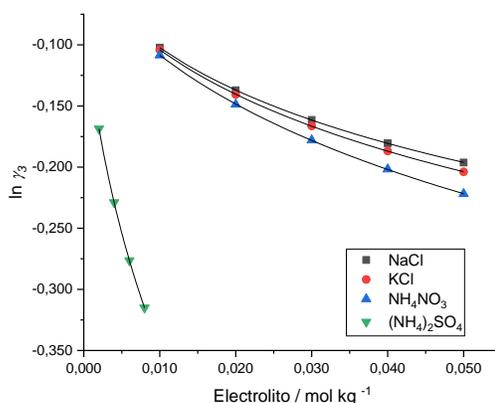
Donde M_1 es el peso molecular del agua, M_2 es el peso molecular de la proteína y M_3 es el peso molecular del electrolito.

El parámetro de interacción preferencial está relacionado con las perturbaciones mutuas de los potenciales químicos del α -quimotripsinógeno y el electrolito en solución. Este efecto se puede relacionar mediante la siguiente expresión [65]:

$$\left(\frac{\partial \mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} = - \left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} \left[\frac{nRT}{m_3} + \left(\frac{\partial \ln \gamma_3}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} \right] \quad (23)$$

Donde $\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3}$ es el parámetro de interacción preferencial expresado en mol/mol, R es la constante universal de los gases ideales, T la temperatura en Kelvin, $\ln \gamma_3$ es el logaritmo natural del coeficiente de actividad medio del electrolito y n el número de partículas que genera el electrolito cuando se disocia: para NaCl, KCl, y NH_4NO_3 n tiene un valor de dos y para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ un valor de tres. El término $\left(\frac{\partial \ln \gamma_3}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2}$ fue evaluado en cada punto de concentración de electrolito a partir de la derivada de la gráfica de $\ln \gamma_3$ en función de la concentración molal de electrolito (m_3).

Figura 29. Variación de $\ln \gamma_3$ en función de la concentración molal de electrolito a 298,15 K.



Los valores del coeficiente de actividad fueron obtenidos a partir del modelo extendido de Debye-Hückel empleando los datos obtenidos por Hammer quien determinó las constantes de este modelo para varios electrolitos 1:1. Los valores de los coeficientes de actividad empleados en este estudio para los electrolitos NaCl, KCl y NH_4NO_3 se determinaron a partir de la siguiente ecuación [165].

$$\log \gamma_{\pm} = \left[\frac{-A |z_- z_+| \sqrt{I}}{1 + B\sqrt{I}} \right] + CI \quad (38)$$

Donde γ_{\pm} es el coeficiente de actividad medio, A , B , y C son constantes que dependen del electrolito y la temperatura, I es la fuerza iónica expresada en kg mol^{-1} , $z_- z_+$ son la

carga del anión y del catión respectivamente. Esta ecuación es válida para concentraciones menores a 1,0 molal en donde las interacciones de orden superior no son predominantes. Para concentraciones mayores a 1,0 molal es necesario introducir términos superiores en la ecuación [165].

Los datos obtenidos con este modelo están en buen acuerdo con los datos experimentales reportados por varios autores para estas sales y a concentraciones iguales de electrolito. Las Tablas 17-19 muestran los valores obtenidos a partir de la ecuación 38 y los valores de literatura. Los valores de los parámetros A , B , y C para cada electrolito se presentan en el Anexo B, Tabla B5.

Tabla 17. Coeficiente de actividad medio (γ^{\pm}) obtenido a partir del modelo extendido de Debye-Hückel para NaCl y valores del coeficiente de actividad medio reportado por varios autores a 298,15 K.

NaCl $m / \text{mol kg}^{-1}$	γ^{\pm} Ecuación 38 [165]	γ^{\pm} Partanen [166]	γ^{\pm} Brown [167]	γ^{\pm} Hamer [165]
0,0100	0,9027	0,9028	0,9034	0,903
0,0200	0,8718	0,8718	0,8726	0,872
0,0300	0,8508	0,8508	0,8513	NR
0,0400	0,8347	0,8347	0,8354	NR
0,0500	0,8217	0,8217	0,8221	0,822

Tabla 18. Coeficiente de actividad medio (γ^{\pm}) obtenido a partir del modelo extendido de Debye-Hückel para KCl y valores del coeficiente de actividad medio reportado por varios autores a 298,15 K.

KCl $m / \text{mol kg}^{-1}$	γ^{\pm} Ecuación 38 [165]	γ^{\pm} Partanen [166]	γ^{\pm} Shedlovsky [168]	γ^{\pm} Hamer [165]	γ^{\pm} Spencer [169]
0,0100	0,9011	0,9014	0,9021	0,901	0,9033
0,0200	0,8688	0,8693	NR	0,869	0,8711
0,0300	0,8466	0,8473	NR	NR	NR
0,0400	0,8295	0,8303	NR	NR	NR
0,0500	0,8154	0,8164	0,8172	0,816	0,8171

Tabla 19. Coeficiente de actividad medio (γ^\pm) obtenido a partir del modelo extendido de Debye-Hückel para NH_4NO_3 y valores del coeficiente de actividad medio reportado por Hamer a 298,15 K.

NH_4NO_3 $m / \text{mol kg}^{-1}$	γ^\pm Ecuación 38 [165]	γ^\pm Hamer [165]
0,0100	0,8971	0,897
0,0200	0,8617	0,862
0,0300	0,8368	NR
0,0400	0,8171	NR
0,0500	0,8007	0,801

Los valores de coeficiente de actividad medio en el caso de sulfato de amonio se obtuvieron a partir de los datos reportados por Clegg y colaboradores [170]. Los datos fueron graficados y ajustados a una función logarítmica para realizar el cálculo de los coeficientes de actividad para las concentraciones de sulfato de amonio empleadas en este estudio como se muestra en la Tabla 20. La Figura 30 muestra los valores del coeficiente de actividad medio en función de la molalidad reportados por Clegg.

Figura 30. Coeficiente de actividad medio (γ^\pm) en función de la concentración molar de sulfato de amonio tomados de los datos de Clegg y colaboradores a 298,15 K [170].

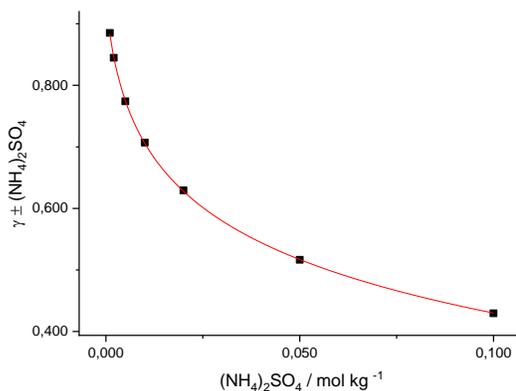


Tabla 20. Valores de coeficientes de actividad empleados en este estudio para sulfato de amonio, determinados a partir de los datos de Clegg y colaboradores a 298,15 K.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $m / \text{mol kg}^{-1}$	γ_{\pm}
0,0020	0,8448
0,0040	0,7954
0,0060	0,7585
0,0080	0,7298

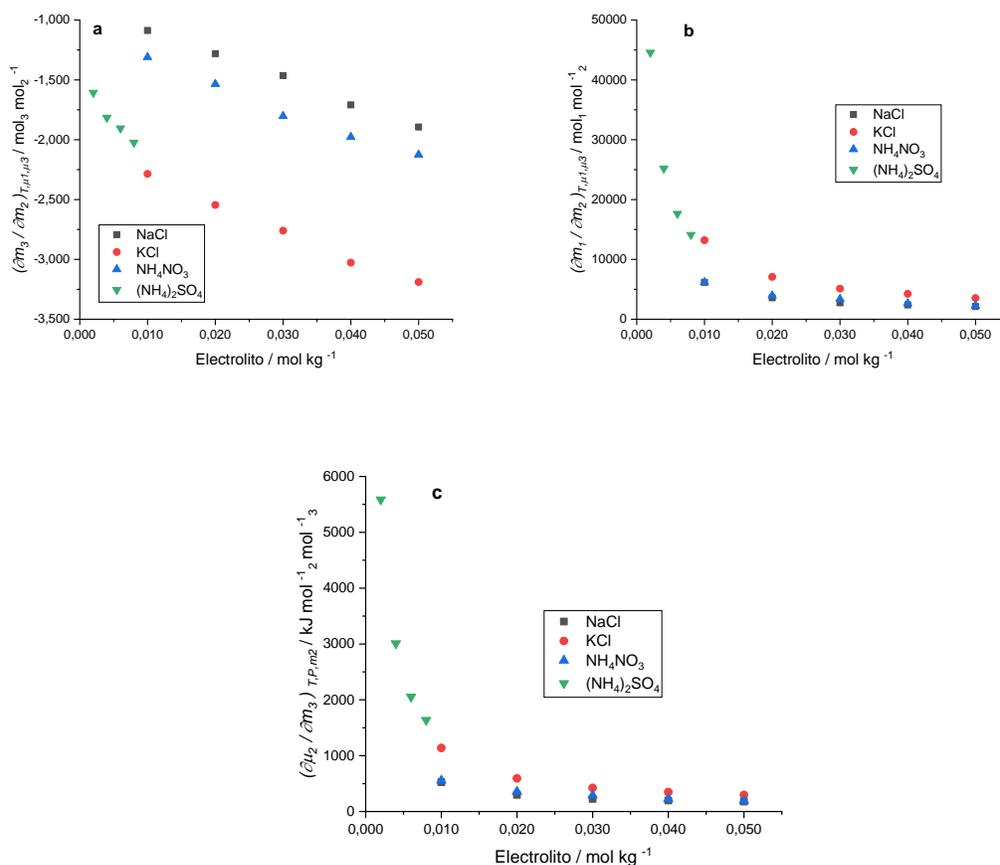
La Tabla 21 muestra los valores del parámetro de interacción preferencial, y del parámetro de hidratación, expresados en mol mol^{-1} y de la variación del potencial químico de la proteína por la presencia de electrolito a 298,15 K.

Tabla 21. Variación del parámetro de interacción preferencial, de hidratación y variación del potencial químico de la proteína en presencia de electrolito a 298,15 K.

NaCl $m / \text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$	$\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} / \text{mol}_3\cdot\text{mol}_2^{-1}$	$\left(\frac{\partial m_1}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} / \text{mol}_1\cdot\text{mol}_2^{-1}$	$\left(\frac{\partial \mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} / \text{kJ}\cdot\text{mol}_2^{-1} \text{mol}_3^{-1}$
0,010	-1,097 ± 0,060	6171,03 ± 79	524,58 ± 10,81
0,020	-1,281 ± 0,028	3577,78 ± 62	298,83 ± 9,22
0,030	-1,464 ± 0,018	2739,15 ± 28	225,21 ± 10,12
0,040	-1,709 ± 0,026	2397,13 ± 37	197,51 ± 6,49
0,050	-1,893 ± 0,020	2125,39 ± 30	177,67 ± 7,23
KCl $m / \text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$	$\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} / \text{mol}_3\cdot\text{mol}_2^{-1}$	$\left(\frac{\partial m_1}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} / \text{mol}_1\cdot\text{mol}_2^{-1}$	$\left(\frac{\partial \mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} / \text{kJ}\cdot\text{mol}_2^{-1} \text{mol}_3^{-1}$
0,010	-2,385 ± 0,058	13206,74 ± 125	1138,36 ± 18,38
0,020	-2,546 ± 0,041	7070,24 ± 81	592,07 ± 12,31
0,030	-2,760 ± 0,044	5109,41 ± 53	422,45 ± 9,96
0,040	-3,027 ± 0,030	4247,18 ± 77	347,49 ± 10,79
0,050	-3,189 ± 0,026	3540,36 ± 62	297,27 ± 8,91
NH_4NO_3 $m / \text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$	$\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} / \text{mol}_3\cdot\text{mol}_2^{-1}$	$\left(\frac{\partial m_1}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} / \text{mol}_1\cdot\text{mol}_2^{-1}$	$\left(\frac{\partial \mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} / \text{kJ}\cdot\text{mol}_2^{-1} \text{mol}_3^{-1}$
0,010	-1,169 ± 0,071	6166,14 ± 126	555,71 ± 9,98
0,020	-1,535 ± 0,063	3945,36 ± 108	354,32 ± 8,22
0,030	-1,902 ± 0,057	3365,31 ± 81	287,98 ± 7,41

0,040	$-1,977 \pm 0,065$	$2651,75 \pm 92$	$223,99 \pm 8,01$
0,050	$-2,125 \pm 0,051$	$2256,94 \pm 76$	$194,96 \pm 7,81$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $m / \text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	$\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{T, \mu_1, \mu_3} / \text{mol}_3 \cdot \text{mol}_2^{-1}$	$\left(\frac{\partial m_1}{\partial m_2}\right)_{T, \mu_1, \mu_3} / \text{mol}_1 \cdot \text{mol}_2^{-1}$	$\left(\frac{\partial \mu_2}{\partial m_3}\right)_{T, P, m_2} / \text{kJ} \cdot \text{mol}_2^{-1} \cdot \text{mol}_3^{-1}$
0,0020	$-1,606 \pm 0,096$	$44562,16 \pm 392$	$5585,43 \pm 23,71$
0,0040	$-1,815 \pm 0,079$	$25206,54 \pm 360$	$3009,55 \pm 17,68$
0,0060	$-1,904 \pm 0,065$	$17635,16 \pm 321$	$2054,42 \pm 18,93$
0,0080	$-2,024 \pm 0,070$	$14103,85 \pm 347$	$1637,39 \pm 15,26$

Figura 31. Variación del parámetro de interacción preferencial (a), del parámetro de hidratación (b) y del potencial químico del α -quimotripsinógeno (c), en función de la concentración de electrolito a 298,15 K.



El parámetro de interacción preferencial es una representación mensurable de las interacciones y perturbaciones del potencial químico de la superficie de una proteína con los componentes de una solución. Generalmente estos estudios se realizan en soluciones acuosas en la región de alta dilución. De las anteriores gráficas y sus respectivas tablas se puede observar que todas las sales en el rango de concentraciones trabajadas en este estudio, presentaron un aumento en la estabilidad de la proteína debido a la exclusión de estos electrolitos de la superficie de la proteína. Se puede observar que el sulfato de amonio se presenta en un rango de concentraciones más diluidas porque a concentraciones mayores precipita la proteína; esta última sal mostró una pendiente más negativa como se puede apreciar en la Figura 31. Lo anterior indica que el sulfato de amonio a bajas concentraciones genera un mayor cambio en la perturbación del potencial químico de la proteína en comparación a los demás electrolitos estudiados, y también como es de esperarse por su baja concentración muestra un parámetro de hidratación de mayor magnitud.

El parámetro de hidratación preferencial es positivo para todas las sales estudiadas a concentración diluida; esto indica que la proteína prefiere interactuar en su superficie con moléculas de agua y estas últimas actúan posiblemente como una barrera de hidratación que restringe la interacción directa de los electrolitos con la superficie de la proteína y por tanto inhibe el despliegue de la proteína favoreciendo su estructura nativa generando un incremento en su estabilidad. Los valores del parámetro de hidratación preferencial disminuyen en magnitud con la concentración de las sales, lo cual supone que a medida que la concentración de la sal se incrementa, la interacción de la superficie de la proteína con las moléculas de agua se debilita y supone un punto de transición en concentraciones mayores donde la proteína pierde la estabilidad generada por efecto de las moléculas de agua e interacciones electrostáticas directas con los electrolitos en solución dando lugar a la desestabilización de la estructura de la proteína.

Los valores del cambio diferencial del potencial químico de la proteína por efecto de un cambio diferencial de la concentración de la sal son positivos y disminuyen cuando la concentración de las sales aumenta; la naturaleza del signo positivo indica que no existe perturbación alguna de la proteína por los electrolitos en solución, pero al disminuir drásticamente estos valores en algún punto, la concentración de estos solutos podría perturbar el potencial químico de la proteína generando una interacción mutua.

La energía libre de transferencia de la proteína desde el agua a la solución de los electrolitos ($\Delta\mu_2$) a 298,15 K se obtiene a partir de la siguiente expresión [171–173]:

$$\Delta G_{tr} = \Delta\mu_2 = \int_0^{m_3} (\partial\mu_2/\partial m_3)_{T,P,m_2} dm_3 \quad (39)$$

Para determinar esta integral se ajustaron las gráficas del cambio en el potencial químico de la proteína en función de la concentración molal de los electrolitos a funciones polinómicas y se evaluó la integral. La Tabla 22 resume los valores de la energía libre de transferencia de la proteína en las soluciones de los electrolitos obtenidos por la ecuación 39.

Tabla 22. Energía libre de transferencia de la proteína en agua a solución de electrolito a 298,15 K.

NaCl		KCl	
$m/\text{mol kg}^{-1}$	$\Delta G_{tr}/\text{kJ mol}^{-1}$	$m/\text{mol kg}^{-1}$	$\Delta G_{tr}/\text{kJ mol}^{-1}$
0,0100	6,252 \pm 0,86	0,0100	13,775 \pm 0,94
0,0200	10,402 \pm 0,78	0,0200	22,520 \pm 0,88
0,0300	13,101 \pm 0,92	0,0300	27,786 \pm 0,76
0,0400	15,007 \pm 0,70	0,0400	31,124 \pm 0,81
0,0500	16,770 \pm 0,68	0,0500	34,089 \pm 0,90
NH_4NO_3		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
$m/\text{mol kg}^{-1}$	$\Delta G_{tr}/\text{kJ mol}^{-1}$	$m/\text{mol kg}^{-1}$	$\Delta G_{tr}/\text{kJ mol}^{-1}$
0,0100	6,440 \pm 0,96	0,0020	14,211 \pm 0,97
0,0200	11,030 \pm 0,85	0,0040	22,012 \pm 0,90
0,0300	14,280 \pm 0,91	0,0060	24,836 \pm 0,85
0,0400	16,671 \pm 0,77	0,0080	25,028 \pm 0,88
0,0500	18,712 \pm 0,80		

En soluciones diluidas de las sales empleadas en este estudio se observa que en todos los casos la energía libre de transferencia es positiva, lo cual confirma la anterior discusión con respecto a la no favorabilidad de la interacción proteína con electrolitos y posiblemente se presente un efecto estabilizante mediado por la restructuración de las moléculas de agua alrededor de la molécula de proteína.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

El proceso de desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno fue estudiado a pH 2,00, 3,00 y 3,50 a partir de medidas de UV-Vis y calorimetría diferencial de barrido. Los resultados obtenidos son novedosos y mostraron que el proceso es reversible en estos valores de pH y que es reversible en el intervalo de temperatura utilizado en este estudio (293,15 K a 360,15 K).

A partir de los perfiles de desnaturalización térmica obtenidos por UV-Vis y calorimetría diferencial de barrido se pudo determinar que los perfiles se superponen entre sí para todos los calentamientos, indicando que el α -quimotripsinógeno bajo las condiciones de estudio presentó un proceso de desnaturalización reversible. Además las curvas muestran que el proceso de desnaturalización involucra dos estados: el estado nativo y el estado desnaturalizado y no se observa la presencia de estados intermedios.

Los resultados obtenidos a partir de medidas de UV-Vis y calorimetría diferencial de barrido indican claramente que el proceso de desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno A es dependiente del pH, efecto que se refleja en los valores de la temperatura media de desnaturalización y de la entalpía asociada al proceso de despliegue, los cuales son mayores cuando la proteína esta disuelta en agua (pH 3,50) indicando de esta manera que la proteína es más estable en este valor de pH.

Los cambios de entalpía obtenidos a partir de medidas de UV-Vis y calorimetría diferencial de barrido presentan la misma tendencia: aumentan conforme aumenta el pH, porque este parámetro afecta los grupos ionizables y por tanto influye directamente sobre las interacciones de estos grupos con las moléculas de agua de las esferas de solvatación.

Todos los electrolitos utilizados en este estudio aumentan la temperatura media de desnaturalización y la entalpía asociada al proceso y este efecto aumenta con la concentración de sal, mostrando además que el mayor efecto es debido al $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, seguido por KCl y NH_4NO_3 y que el efecto es más bajo en presencia de NaCl. Los resultados muestran además que la adición de sales no afecta el proceso de desnaturalización de la proteína el cual involucra un equilibrio entre el estado nativo y el estado desplegado sin la presencia de especies intermedias.

El cambio en la capacidad calorífica ΔC_p fue determinado por calorimetría diferencial de barrido obteniéndose un valor de $12,30 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para los tres valores de pH empleados en este estudio. Los resultados obtenidos muestran claramente que, en el rango de pH considerado, el cambio en la capacidad calorífica permanece constante y que este parámetro no depende del pH del medio.

El cambio en la energía de Gibbs asociada al proceso de despliegue de la proteína sigue el mismo comportamiento de la temperatura media de desnaturalización y de la entalpía asociada al proceso de despliegue de la proteína; aumenta con el aumento de pH y conforme aumenta la concentración de electrolito, generando un aumento en la estabilidad de la proteína que se refleja en el incremento del intervalo de temperatura en el cual la forma nativa de la proteína es estable.

El cambio en la estabilidad de la proteína evaluado a partir del $\Delta\Delta G$ en presencia de electrolitos y para cada uno de los valores de pH empleados en este estudio, muestra una clara relación con la concentración de electrolito, aumenta con el incremento en la concentración, y el aumento de la estabilidad $\Delta\Delta G$ es mayor en presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, seguido por KCl, NH_4NO_3 y menor en el caso de NaCl.

El efecto estabilizante que ejercen los electrolitos empleados en este estudio, sobre la estructura del α -quimotripsinógeno no sigue el orden de la serie propuesta por Hofmeister debido a que el efecto que ejercen los iones puede cambiar considerablemente por las propiedades superficiales de la proteína que varían según la composición y el pH del medio. Se concluye de esta manera que el efecto de los

diferentes iones depende de la naturaleza de las sales, de la proteína y de las condiciones experimentales de estudio.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que existe una correlación entre el aumento de la tensión superficial del disolvente por la adición de electrolitos y el aumento en la temperatura media de desnaturalización, siendo el efecto mayor en el caso del sulfato de amonio que genera iones fuertemente hidratados en solución. Esto indica que la presencia de los electrolitos seleccionados en este estudio aumenta la estabilidad conformacional de la proteína posiblemente por el aumento en la tensión superficial del disolvente efecto generado por la exclusión de electrolitos de la interfase aire/agua.

Los resultados del estudio cinético de la adsorción de la proteína en la interfase aire/agua en presencia de electrolitos, muestran claramente que el proceso se puede describir bajo un modelo de tres etapas: una primera etapa de difusión de la proteína desde el seno del líquido hacia la interfase líquido-aire, una segunda etapa correspondiente a la penetración de la proteína en la interfase y una tercera etapa de reorganización en la interfase. La primera etapa ocurre tan rápidamente que no puede detectarse en forma fiable con la técnica empleada.

La adición de electrolitos aumenta la presión superficial respecto a la presión superficial de la proteína en solución acuosa siendo el efecto mayor a medida que aumenta la concentración de electrolito y mayor en el caso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seguido de KCl, NH_4NO_3 y NaCl.

Los valores de la constante cinética k_1 que representa la tasa de penetración y adsorción de la proteína en la interfase líquido-aire, es mayor que la constante cinética k_2 , para todos los perfiles de adsorción, y aumenta conforme aumenta la concentración de electrolito, indicando que el paso que controla el proceso de adsorción es la penetración y adsorción de la proteína en la interfase líquido-aire y que este paso es dependiente de la naturaleza y la concentración de sales, los valores de k_2 permanecen prácticamente constantes en todas las condiciones del estudio cinético lo que sugiere que el proceso de reordenamiento de la proteína en la interfase es independiente de la composición del medio.

Todas las sales empleadas en este estudio presentan valores negativos del parámetro de interacción preferencial con el α -quimotripsinógeno, indicando de esta manera que los electrolitos son excluidos de la superficie de la proteína y generan una estabilidad adicional sobre la estructura nativa de la proteína. Este efecto concuerda con los resultados obtenidos por UV-Vis y calorimetría diferencial de barrido y siguen el mismo orden de estabilidad obtenido a partir de estas técnicas. El efecto es mayor en el caso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seguido de KCl, NH_4NO_3 y más bajo en el caso de NaCl, efecto que se ve reflejado en los valores de la energía libre de transferencia de la proteína desde agua a la solución de los electrolitos que en todos los casos presenta signo positivo indicando que el proceso de interacción entre la proteína y los electrolitos no es favorable.

Los valores del parámetro de hidratación son positivos en todos los casos indicando de esta manera que los iones provenientes de los electrolitos son excluidos de la superficie de la proteína. La disminución de este parámetro posiblemente puede indicar que la interacción de la superficie de la proteína con las moléculas de agua se debilita indicando que puede existir un punto de concentración de electrolito que puede dar lugar a la desestabilización de la estructura de la proteína. La disminución de este parámetro es mayor en el caso el caso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seguido de KCl, NH_4NO_3 y más bajo en el caso de NaCl.

4.2 Recomendaciones

Realizar medidas de dicroísmo circular para determinar los cambios en la estructura de la proteína por el efecto de pH, temperatura y la presencia de electrolitos.

Realizar procesos de desnaturalización química isotérmica con las sales empleadas en este estudio para poder aplicar el método de extrapolación lineal (LEM) y de esta manera calcular el cambio en la energía de Gibbs de exceso en la proteína generada por la adición de electrolito.

Realizar estudios en un rango mayor de concentración de electrolito para obtener mayor información acerca del efecto estabilizante de estas sales sobre la estructura nativa de la proteína.

Realizar estudios de densidad en el intervalo de temperatura empleado en este estudio para determinar el cambio en el volumen específico de la proteína durante el proceso de desnaturalización.

Estudiar el proceso de adsorción del α -quimotripsinógeno utilizando diferentes técnicas como la de anillo que permite determinar la tensión superficial para tiempos superiores a 3600 s lo cual permitiría determinar la presión de equilibrio en la interfase. Usar la técnica del perfil de gota que permitiría obtener datos de tensión superficial para tiempos menores a 30 segundos y de esta manera determinar el coeficiente de difusión.

Realizar estudios de adsorción de la proteína en presencia de las sales consideradas y a diferentes temperaturas, incluida la temperatura de desnaturalización. Lo anterior permitiría analizar la influencia de las sales sobre la adsorción de la proteína en su estado nativo y desnaturalizado.

A. Anexo: Desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno A en soluciones acuosas de electrolitos

Figura A1. Efecto de la concentración de electrolito sobre la desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno a pH 3,00 mediante medidas de UV-Vis.

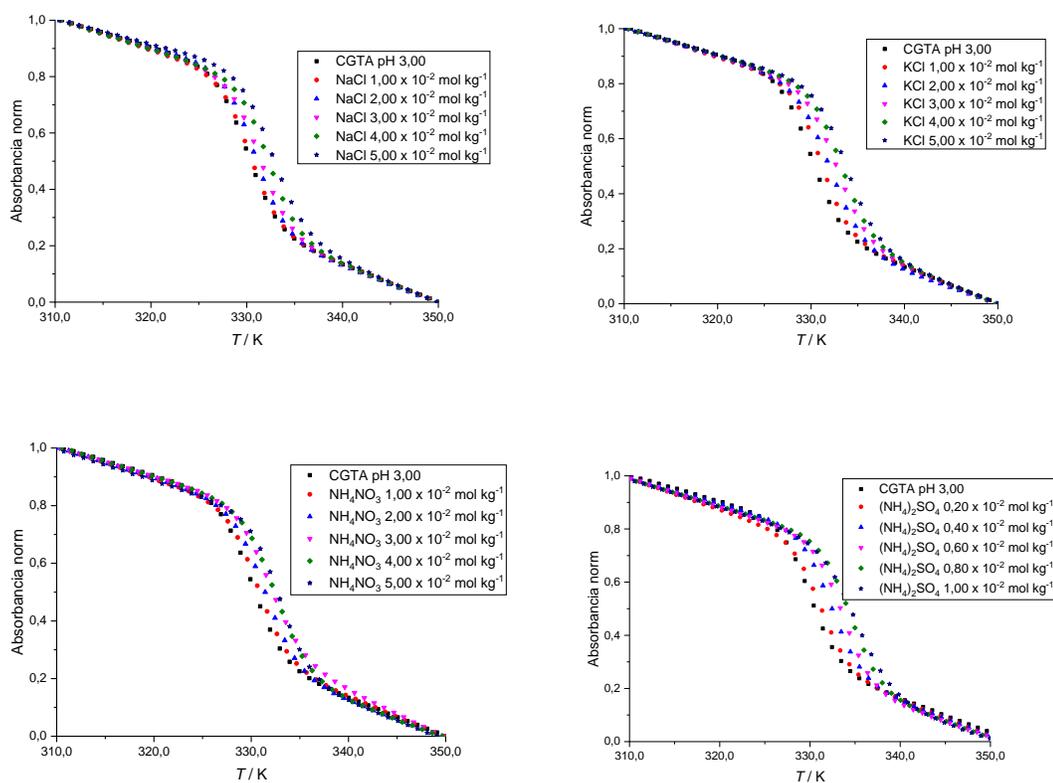


Figura A2. Efecto de la concentración de electrolito sobre la desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno a pH 3,50 mediante medidas de UV-Vis.

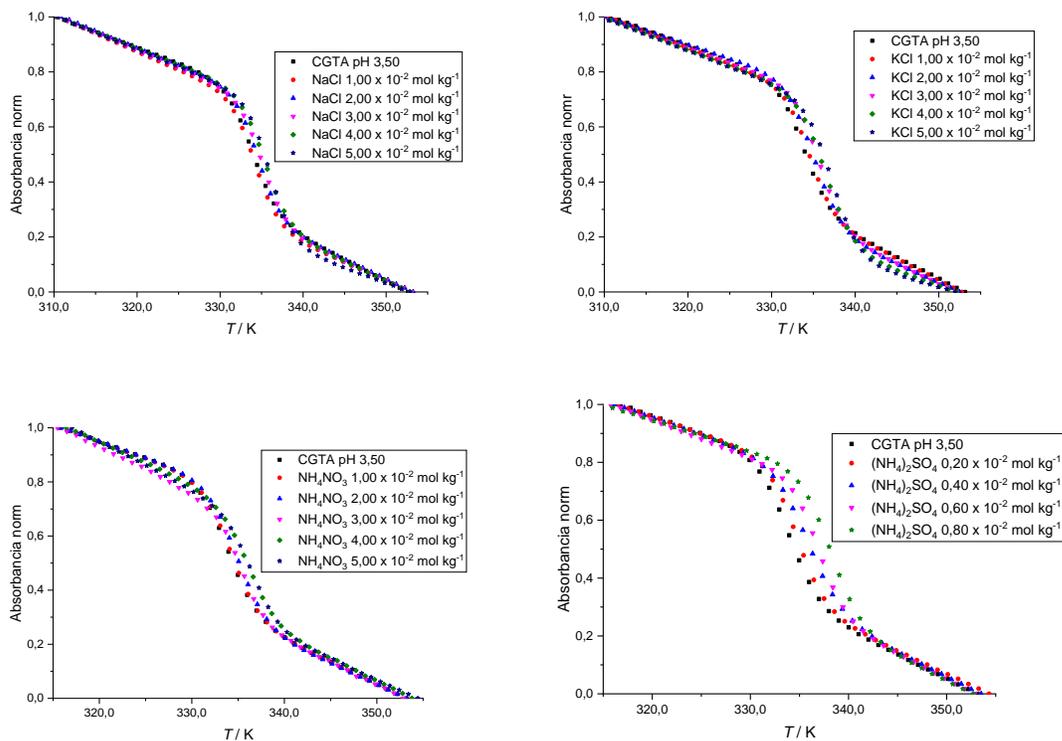
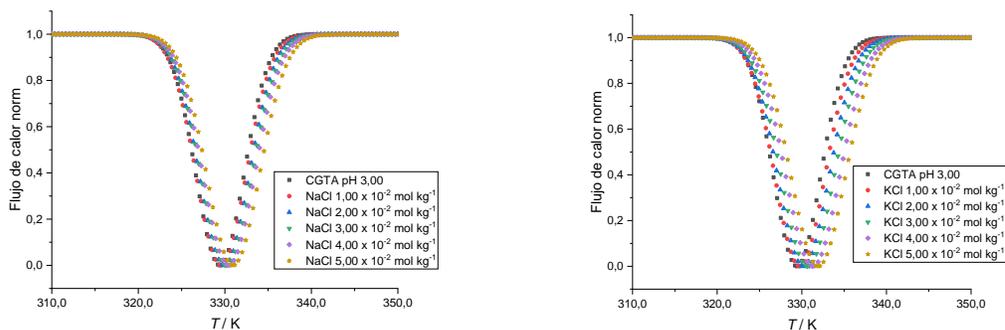


Figura A3. Efecto de la concentración de electrolito sobre la desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno a pH 3,00 mediante medidas de calorimetría diferencial de barrido.



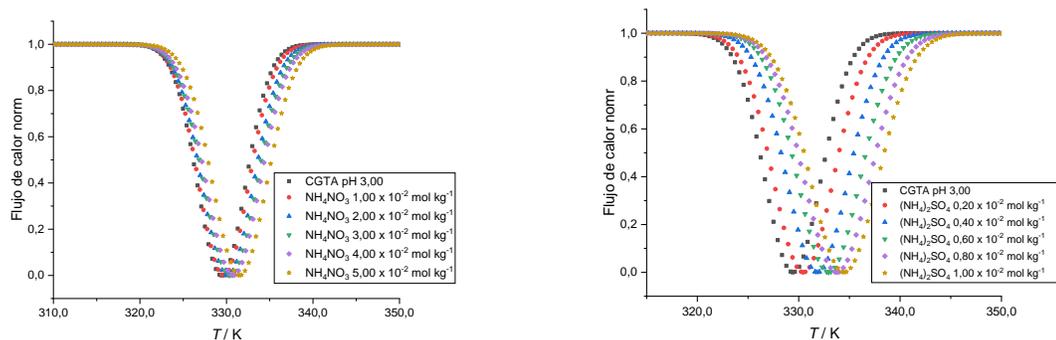


Figura A4. Efecto de la concentración de electrolito sobre la desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno a pH 3,50 mediante medidas de calorimetría diferencial de barrido.

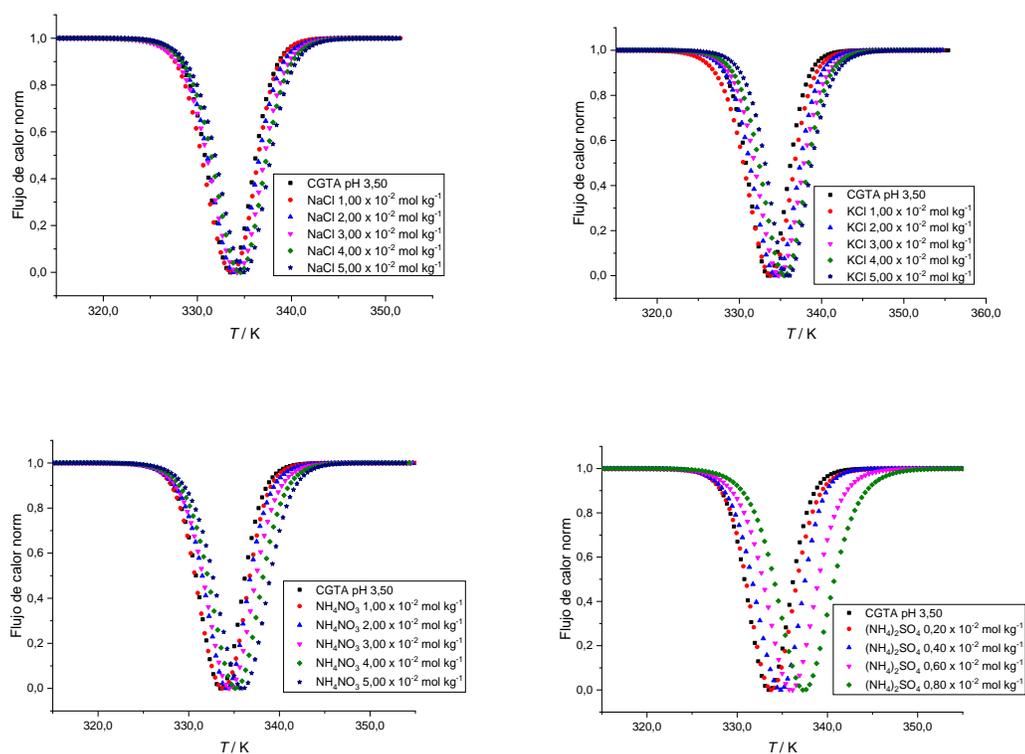
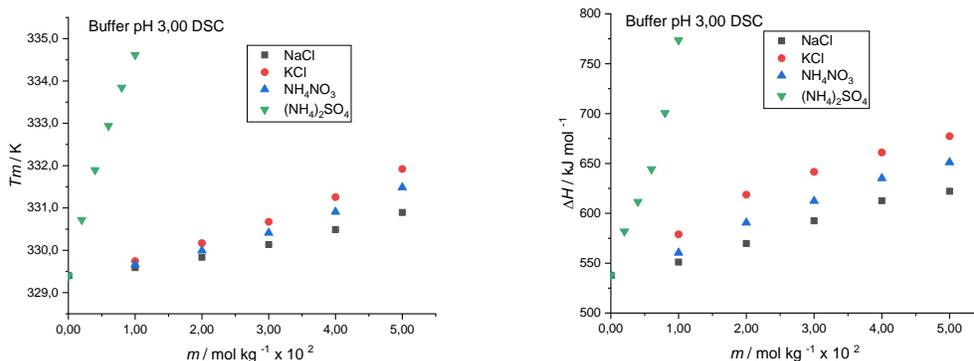
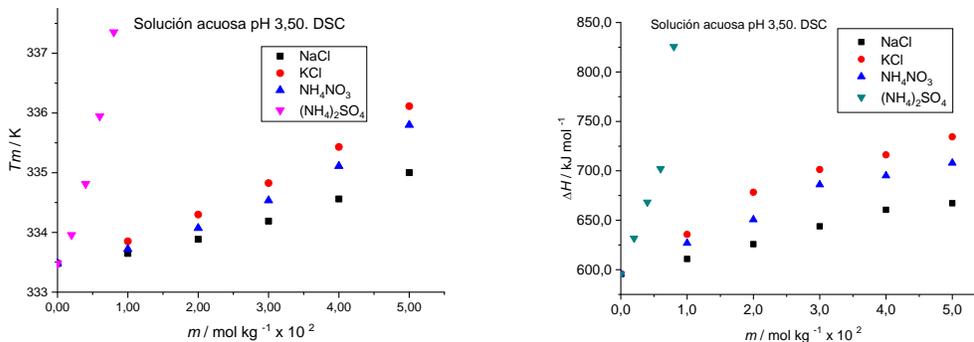


Figura A5. Temperatura media de desnaturalización y entalpía calorimétrica a pH 3,00 en función de la concentración de electrolito.**Figura A6.** Temperatura media de desnaturalización y entalpía calorimétrica a pH 3,50 en función de la concentración de electrolito.**Tabla A1.** Valores de ΔG durante el proceso desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno en buffer pH 2,00 y diferentes concentraciones de cloruro de sodio a partir de medidas de calorimetría diferencial de barrido.

T / K	ΔG (kJ·mol ⁻¹)					
	CGTA	0,010 m	0,020 m	0,030 m	0,040 m	0,050 m
297,1	14,7	15,1	16,7	17,8	19,5	20,3
298,6	13,9	14,4	15,9	16,9	18,6	19,4
300,7	12,8	13,2	14,7	15,7	17,2	18,0

302,5	11,7	12,1	13,5	14,4	15,9	16,7
304,3	10,4	10,9	12,2	13,1	14,5	15,3
306,1	9,0	9,5	10,7	11,6	12,9	13,7
307,9	7,5	8,0	9,1	9,9	11,2	12,0
309,7	5,9	6,4	7,4	8,2	9,4	10,2
311,5	4,1	4,7	5,5	6,3	7,4	8,3
313,3	2,2	2,8	3,6	4,3	5,3	6,2
315,1	0,2	0,8	1,5	2,2	3,1	4,0
316,3	-1,1	-0,6	0,0	0,7	1,6	2,5
317,0	-1,9	-1,3	-0,8	-0,1	0,8	1,7
318,8	-4,2	-3,6	-3,1	-2,4	-1,7	-0,8
320,6	-6,6	-6,0	-5,6	-4,9	-4,3	-3,4
322,4	-9,1	-8,5	-8,2	-7,6	-7,0	-6,1
324,2	-11,7	-11,1	-10,9	-10,3	-9,8	-8,9
323,0	-14,5	-13,9	-13,8	-13,2	-12,8	-11,8
327,8	-17,4	-16,8	-16,8	-16,2	-15,9	-14,9
329,6	-20,4	-19,8	-19,9	-19,4	-19,1	-18,1
331,4	-23,6	-22,9	-23,1	-22,6	-22,5	-21,5
333,2	-26,8	-26,2	-26,5	-26,0	-25,9	-24,9
335,0	-30,2	-29,6	-30,0	-29,6	-29,5	-28,5

Tabla A2. Valores de ΔG durante el proceso desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno en buffer pH 2,00 y diferentes concentraciones de cloruro de potasio a partir de medidas de calorimetría diferencial de barrido.

T / K	ΔG (kJ·mol ⁻¹)					
	CGTA	0,010 m	0,02 m	0,030 m	0,040 m	0,050 m
297,1	14,7	16,8	19,8	22,0	23,3	24,2
298,6	13,9	16,0	18,9	20,9	22,2	23,2
300,7	12,8	14,7	17,3	19,3	20,6	21,5
302,5	11,7	13,4	15,9	17,7	19,0	19,9
304,3	10,4	12,0	14,3	16,0	17,2	18,1
306,1	9,0	10,4	12,6	14,2	15,4	16,3
307,9	7,5	8,8	10,7	12,3	13,4	14,2
309,7	5,9	6,9	8,7	10,2	11,3	12,1
311,5	4,1	5,0	6,6	7,9	9,0	9,8
313,4	2,2	2,9	4,3	5,6	6,6	7,4
315,2	0,2	0,7	1,9	3,1	4,1	4,9

316,3	-1,1	0,0	1,2	2,3	3,3	4,1
317,0	-1,9	-1,7	-0,6	0,4	1,4	2,2
318,8	-4,2	-4,2	-3,3	-2,3	-1,4	-0,6
320,6	-6,6	-6,8	-6,1	-5,2	-4,3	-3,6
322,4	-9,1	-9,6	-9,1	-8,3	-7,4	-6,7
324,2	-11,7	-12,5	-12,1	-11,5	-10,6	-9,9
323,0	-14,5	-15,5	-15,3	-14,8	-14,0	-13,2
327,8	-17,4	-18,7	-18,7	-18,2	-17,5	-16,7
329,6	-20,4	-22,0	-22,2	-21,8	-21,1	-20,4
331,4	-23,6	-25,4	-25,8	-25,5	-24,8	-24,1
333,2	-26,8	-29,0	-29,6	-29,4	-28,7	-28,0
335,0	-30,2	-32,7	-33,4	-33,4	-32,7	-32,1

Tabla A3. Valores de ΔG durante el proceso desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno en buffer pH 2,00 y diferentes concentraciones de nitrato de amonio a partir de medidas de calorimetría diferencial de barrido.

T / K	ΔG (kJ·mol ⁻¹)					
	CGTA	0,010 m	0,02 m	0,030 m	0,040 m	0,050 m
297,1	14,7	16,1	18,5	19,8	21,6	22,9
298,6	13,9	15,1	17,4	18,7	20,4	21,7
300,7	12,8	12,8	14,9	16,1	17,6	18,8
302,5	11,7	11,5	13,4	14,6	16,0	17,2
304,3	10,4	10,0	11,8	12,9	14,3	15,4
306,1	9,0	8,4	10,0	11,1	12,4	13,5
307,9	7,5	6,7	8,1	9,2	10,4	11,5
309,7	5,9	4,8	6,1	7,2	8,3	9,3
311,5	4,1	2,9	4,0	5,0	6,1	7,0
313,4	2,2	0,7	1,7	2,7	3,7	4,6
315,2	0,2	0,0	1,0	1,9	2,9	3,8
316,4	-1,2	-0,9	0,0	0,9	1,8	2,7
317,0	-1,9	-1,5	-0,7	0,2	1,1	2,0
318,8	-4,2	-3,9	-3,2	-2,3	-1,5	-0,7
320,6	-6,6	-6,4	-5,9	-5,0	-4,3	-3,5
322,4	-9,1	-9,1	-8,7	-7,9	-7,2	-6,5
324,2	-11,7	-11,9	-11,6	-10,8	-10,2	-9,6
323,0	-14,5	-14,8	-14,7	-13,9	-13,4	-12,8
327,8	-17,4	-17,8	-17,9	-17,2	-16,7	-16,1

329,6	-20,4	-21,0	-21,2	-20,5	-20,2	-19,6
331,4	-23,6	-24,3	-24,6	-24,0	-23,7	-23,2
333,2	-26,8	-27,8	-28,2	-27,6	-27,5	-27,0
335,0	-30,2	-31,4	-31,9	-31,4	-31,3	-30,9

Tabla A4. Valores de ΔG durante el proceso desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno en buffer pH 2,00 y diferentes concentraciones de sulfato de amonio a partir de medidas de calorimetría diferencial de barrido.

T / K	ΔG (kJ·mol ⁻¹)					
	CGTA	0,002 m	0,004 m	0,006 m	0,008 m	0,010 m
297,1	14,7	17,9	20,7	23,7	28,5	35,5
298,6	13,9	16,8	19,4	22,3	26,8	33,4
300,7	12,8	14,1	16,5	19,1	23,1	28,8
302,5	11,7	12,6	14,9	17,3	21,0	26,3
304,3	10,4	10,9	13,1	15,4	18,8	23,6
306,1	9,0	9,1	11,1	13,3	16,5	20,8
307,9	7,5	7,1	9,0	11,1	13,9	17,8
309,7	5,9	5,0	6,8	8,7	11,3	14,8
311,5	4,1	2,7	4,4	6,2	8,5	11,5
313,4	2,2	0,3	1,9	3,6	5,6	8,2
315,2	0,2	-2,2	-0,7	0,8	2,5	4,6
316,4	-1,2	-4,9	-3,5	-2,1	-0,7	1,0
317,0	-1,9	-7,7	-6,5	-5,2	-4,1	-2,8
318,8	-4,2	-10,7	-9,6	-8,4	-7,5	-6,8
320,6	-6,6	-13,8	-12,8	-11,8	-11,2	-10,8
322,4	-9,1	-17,0	-16,2	-15,3	-15,0	-15,1
324,2	-11,7	-20,4	-19,7	-18,9	-18,9	-19,4
326,0	-14,5	-24,0	-23,3	-22,7	-23,0	-23,9
327,8	-17,4	-27,6	-27,1	-26,7	-27,2	-28,6
329,6	-20,4	-30,1	-29,7	-29,4	-30,0	-31,8
331,4	-23,6	-30,2	-29,8	-29,4	-30,1	-31,8
333,2	-26,8	-31,4	-31,1	-30,7	-31,5	-33,4
335,0	-30,2	-35,4	-35,2	-35,0	-36,0	-38,3

Tabla A5. Valores de ΔG durante el proceso desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno en buffer pH 3,00 y diferentes concentraciones de cloruro de sodio a partir de medidas de calorimetría diferencial de barrido.

T / K	ΔG (kJ·mol ⁻¹)					
	CGTA	0,010 m	0,02 m	0,030 m	0,040 m	0,050 m
297,1	32,6	34,0	35,9	38,3	40,5	41,6
298,9	31,9	33,2	35,0	37,3	39,4	40,5
300,7	31,0	32,3	34,0	36,2	38,2	39,3
302,5	30,0	31,2	32,9	34,9	36,9	37,9
304,3	28,9	30,0	31,6	33,5	35,4	36,4
306,1	27,6	28,7	30,2	32,0	33,8	34,8
307,9	26,2	27,2	28,7	30,4	32,1	33,1
309,7	24,7	25,7	27,0	28,7	30,3	31,2
311,5	23,1	24,0	25,2	26,8	28,3	29,3
313,4	21,3	22,1	23,3	24,8	26,2	27,1
315,2	19,4	20,2	21,3	22,6	24,0	24,9
316,4	18,1	18,8	19,9	21,1	22,4	23,3
317,0	17,4	18,1	19,1	20,4	21,6	22,5
318,8	15,2	15,9	16,8	18,0	19,2	20,0
320,6	13,0	13,6	14,4	15,5	16,6	17,4
322,4	10,6	11,1	11,9	12,8	13,8	14,7
324,2	8,0	8,5	9,2	10,1	11,0	11,8
326,0	5,4	5,8	6,4	7,2	8,0	8,8
327,8	2,6	3,0	3,5	4,1	4,9	5,7
329,4	0,0	0,3	0,8	1,3	2,0	2,8
329,6	-0,3	0,0	0,5	1,0	1,7	2,4
331,4	-3,3	-3,1	-2,7	-2,3	-1,7	-0,9
333,2	-6,5	-6,3	-6,0	-5,7	-5,2	-4,4
335,0	-9,8	-9,6	-9,4	-9,2	-8,8	-8,1

Tabla A6. Valores de ΔG durante el proceso desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno en buffer pH 3,00 y diferentes concentraciones de cloruro de potasio a partir de medidas de calorimetría diferencial de barrido.

T / K	ΔG (kJ·mol ⁻¹)					
	CGTA	0,010 m	0,02 m	0,030 m	0,040 m	0,050 m
297,1	32,6	36,8	40,9	43,5	45,8	47,8

298,9	31,9	35,8	39,8	42,3	44,5	46,5
300,7	31,0	34,8	38,5	40,9	43,1	45,0
302,5	30,0	33,6	37,1	39,4	41,5	43,5
304,3	28,9	32,2	35,6	37,8	39,9	41,8
306,1	27,6	30,8	34,0	36,1	38,1	39,9
307,9	26,2	29,2	32,2	34,2	36,2	38,0
309,7	24,7	27,5	30,3	32,3	34,1	35,9
311,5	23,1	25,6	28,3	30,1	32,0	33,7
313,4	21,3	23,7	26,1	27,9	29,7	31,4
315,2	19,4	21,6	23,9	25,5	27,2	28,9
316,4	18,1	20,1	22,3	23,9	25,6	27,2
317,0	17,4	19,4	21,5	23,1	24,7	26,3
318,8	15,2	17,0	18,9	20,4	22,0	23,6
320,6	13,0	14,5	16,3	17,7	19,2	20,8
322,4	10,6	11,9	13,5	14,8	16,3	17,8
324,2	8,0	9,2	10,6	11,8	13,2	14,7
326,0	5,4	6,4	7,6	8,7	10,0	11,5
327,8	2,6	3,4	4,4	5,5	6,7	8,1
329,6	-0,3	0,3	1,1	2,1	3,3	4,7
331,4	-3,3	-2,9	-2,3	-1,4	-0,3	1,1
333,2	-6,5	-6,3	-5,9	-5,0	-3,9	-2,6
335,0	-9,8	-9,8	-9,5	-8,8	-7,8	-6,5

Tabla A7. Valores de ΔG durante el proceso desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno en buffer pH 3,00 y diferentes concentraciones de nitrato de amonio a partir de medidas de calorimetría diferencial de barrido.

T / K	ΔG (kJ·mol ⁻¹)					
	CGTA	0,010 m	0,02 m	0,030 m	0,040 m	0,050 m
297,1	32,6	34,9	38,1	40,4	42,9	44,9
298,9	31,9	34,1	37,0	39,3	41,7	43,6
300,7	31,0	33,1	35,9	38,1	40,4	42,3
302,5	30,0	31,9	34,6	36,7	39,0	40,8
304,3	28,9	30,6	33,2	35,2	37,4	39,1
306,1	27,6	29,2	31,6	33,5	35,6	37,3
307,9	26,2	27,7	30,0	31,8	33,8	35,4
309,7	24,7	26,0	28,1	29,9	31,8	33,4
311,5	23,1	24,2	26,2	27,8	29,7	31,3

313,4	21,3	22,3	24,1	25,7	27,4	29,0
315,2	19,4	20,2	21,9	23,4	25,0	26,5
316,4	18,1	19,5	21,2	22,6	24,2	25,7
317,0	17,4	18,6	20,2	21,6	23,2	24,7
318,8	15,2	18,0	19,6	21,0	22,5	24,0
320,6	13,0	15,7	17,1	18,4	19,9	21,3
322,4	10,6	13,2	14,5	15,7	17,1	18,5
324,2	8,0	10,7	11,8	12,9	14,2	15,5
326,0	5,4	7,9	8,9	9,9	11,1	12,4
327,8	2,6	5,1	5,9	6,8	8,0	9,2
329,6	-0,3	-1,0	-0,5	0,3	1,2	2,4
331,4	-3,3	-4,3	-3,9	-3,2	-2,3	-1,2
333,2	-6,5	-7,7	-7,4	-6,8	-6,0	-5,0
335,0	-9,8	-11,2	-11,1	-10,6	-9,9	-8,9

Tabla A8. Valores de ΔG durante el proceso desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno en buffer pH 3,00 y diferentes concentraciones de sulfato de amonio a partir de medidas de calorimetría diferencial de barrido.

T / K	ΔG (kJ·mol ⁻¹)					
	CGTA	0,002 m	0,004 m	0,006 m	0,008 m	0,010 m
297,1	32,6	37,4	40,9	44,8	51,3	59,9
298,9	31,9	36,7	40,1	43,9	50,2	58,2
300,7	31,0	36,5	39,9	43,7	50,0	56,3
302,5	30,0	35,4	38,7	42,4	48,4	54,3
304,3	28,9	34,1	37,4	41,0	46,8	52,1
306,1	27,6	32,8	35,9	39,4	44,9	49,8
307,9	26,2	31,2	34,3	37,7	43,0	47,3
309,7	24,7	29,6	32,6	35,8	40,9	44,7
311,5	23,1	27,8	30,7	33,8	38,7	42,0
313,4	21,3	25,8	28,7	31,7	36,3	39,1
315,2	19,4	23,7	26,5	29,4	33,8	36,1
316,4	18,1	19,1	21,7	24,5	28,3	32,2
317,0	17,4	18,5	21,1	23,8	27,6	32,1
318,8	15,2	18,4	21,0	23,7	27,5	29,6
320,6	13,0	16,6	19,1	21,8	25,3	26,2
322,4	10,6	13,9	16,4	18,9	22,2	22,6
324,2	8,0	11,1	13,5	15,9	19,0	18,9

326,0	5,4	8,2	10,5	12,8	15,6	15,0
327,8	2,6	5,1	7,3	9,5	12,1	11,0
329,6	-0,3	-1,5	0,6	2,6	4,6	2,5
331,4	-3,3	-5,1	-3,0	-1,1	0,7	-0,4
333,2	-6,5	-8,7	-6,8	-5,0	-3,4	-1,9
335,0	-9,8	-12,5	-10,6	-8,9	-7,6	-6,5

Tabla A9. Valores de ΔG durante el proceso desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno en agua pH 3,50 y diferentes concentraciones de cloruro de sodio a partir de medidas de calorimetría diferencial de barrido.

T / K	ΔG (kJ·mol ⁻¹)					
	CGTA	0,010 m	0,02 m	0,030 m	0,040 m	0,050 m
297,1	39,6	41,3	43,0	45,1	47,1	48,0
298,9	38,8	40,5	42,1	44,2	46,1	47,0
299,4	38,6	40,2	41,9	43,9	45,8	46,7
300,7	38,0	39,5	41,1	43,1	44,9	45,9
302,5	37,0	38,5	40,0	41,9	43,7	44,6
304,3	35,8	37,3	38,7	40,5	42,3	43,2
306,1	34,6	35,9	37,3	39,1	40,8	41,7
307,9	33,2	34,5	35,8	37,5	39,1	40,0
309,7	31,7	32,9	34,2	35,8	37,3	38,2
311,5	30,0	31,2	32,4	33,9	35,4	36,3
313,4	28,3	29,4	30,5	31,9	33,4	34,3
315,2	26,4	27,4	28,5	29,8	31,2	32,1
317,0	24,4	25,3	26,3	27,6	28,9	29,8
318,8	22,2	23,1	24,1	25,3	26,5	27,4
320,6	20,0	20,8	21,7	22,8	24,0	24,9
322,4	17,6	18,3	19,1	20,2	21,3	22,2
326,0	12,4	13,0	13,7	14,6	15,6	16,5
327,8	9,6	10,1	10,8	11,6	12,6	13,4
329,6	6,7	7,2	7,7	8,5	9,4	10,3
331,4	3,7	4,0	4,6	5,3	6,1	7,0
333,2	0,5	0,8	1,3	1,9	2,6	3,5
335,0	-2,8	-2,5	-2,2	-1,6	-0,9	0,0

Tabla A10. Valores de ΔG durante el proceso desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno en agua pH 3,50 y diferentes concentraciones de cloruro de potasio a partir de medidas de calorimetría diferencial de barrido.

T / K	ΔG (kJ·mol ⁻¹)					
	CGTA	0,010 m	0,02 m	0,030 m	0,040 m	0,050 m
297,1	39,6	43,9	48,8	51,6	53,6	56,0
298,9	38,8	43,0	47,6	50,4	52,3	54,7
299,4	38,6	42,7	47,3	50,1	52,0	54,4
300,7	38,0	41,9	46,3	49,0	50,9	53,2
302,5	37,0	40,6	44,9	47,5	49,3	51,6
304,3	35,8	39,3	43,3	45,8	47,6	49,9
306,1	34,6	37,8	41,6	44,0	45,8	48,0
307,9	33,2	36,1	39,8	42,1	43,8	46,0
309,7	31,7	34,4	37,8	40,0	41,7	43,9
311,5	30,0	32,4	35,7	37,8	39,5	41,6
313,4	28,3	30,4	33,5	35,5	37,1	39,2
315,2	26,4	28,2	31,1	33,0	34,6	36,6
317,0	24,4	25,9	28,5	30,4	32,0	33,9
318,8	22,2	23,4	25,9	27,7	29,2	31,1
320,6	20,0	20,8	23,1	24,8	26,3	28,1
322,4	17,6	18,1	20,1	21,8	23,2	25,0
324,2	15,0	15,2	17,1	18,6	20,0	21,8
326,0	12,4	12,2	13,9	15,3	16,7	18,4
327,8	9,6	9,1	10,5	11,9	13,3	14,9
329,6	6,7	5,8	7,0	8,3	9,6	11,2
331,4	3,7	2,4	3,4	4,6	5,9	7,5
333,2	0,5	-1,2	-0,3	0,8	2,0	3,5
335,0	-2,8	-4,9	-4,2	-3,2	-2,0	-0,5

Tabla A11. Valores de ΔG durante el proceso desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno en agua pH 3,50 y diferentes concentraciones de nitrato de amonio a partir de medidas de calorimetría diferencial de barrido.

T / K	ΔG (kJ·mol ⁻¹)					
	CGTA	0,010 m	0,02 m	0,030 m	0,040 m	0,050 m
297,1	39,6	42,9	45,6	49,8	51,0	52,8
298,9	38,8	42,0	44,6	48,6	49,9	51,6

299,4	38,6	41,7	44,4	48,3	49,6	51,3
300,7	38,0	41,0	43,5	47,3	48,6	50,3
302,5	37,0	39,8	42,2	45,9	47,1	48,8
304,3	35,8	38,5	40,8	44,3	45,6	47,3
306,1	34,6	37,1	39,3	42,6	43,9	45,5
307,9	33,2	35,5	37,6	40,8	42,0	43,7
309,7	31,7	33,8	35,8	38,8	40,1	41,7
311,5	30,0	31,9	33,9	36,7	38,0	39,6
313,4	28,3	30,0	31,8	34,5	35,7	37,3
315,2	26,4	27,9	29,6	32,1	33,4	35,0
317,0	24,4	25,6	27,2	29,6	30,9	32,4
318,8	22,2	23,3	24,8	27,0	28,2	29,8
320,6	20,0	20,8	22,2	24,2	25,5	27,0
322,4	17,6	18,1	19,4	21,3	22,6	24,1
324,2	15,0	15,4	16,6	18,3	19,5	21,0
326,0	12,4	12,5	13,6	15,2	16,4	17,9
327,8	9,6	9,4	10,4	11,9	13,1	14,6
329,6	6,7	6,3	7,1	8,4	9,6	11,1
331,4	3,7	3,0	3,7	4,9	6,1	7,5
333,2	0,5	-0,5	0,2	1,2	2,4	3,8
335,0	-2,8	-4,0	-3,5	-2,7	-1,5	0,0

Tabla A12. Valores de ΔG durante el proceso desnaturalización térmica del α -quimotripsinógeno en agua pH 3,50 y diferentes concentraciones de sulfato de amonio a partir de medidas de calorimetría diferencial de barrido.

T / K	ΔG (kJ·mol ⁻¹)				
	CGTA	0,002 m	0,004 m	0,006 m	0,008 m
297,1	39,6	43,5	47,9	52,2	67,4
298,9	38,8	42,6	46,8	51,0	65,7
299,4	38,6	41,5	45,5	49,7	63,8
300,7	38,0	38,8	42,6	46,6	59,5
302,5	37,0	37,3	41,0	44,8	57,1
304,3	35,8	35,7	39,2	42,9	54,6
306,1	34,6	33,8	37,2	40,8	52,0
307,9	33,2	31,9	35,1	38,6	49,2
309,7	31,7	29,8	32,9	36,3	46,3
311,5	30,0	27,5	30,5	33,8	43,2

313,4	28,3	25,1	28,0	31,2	40,0
315,2	26,4	22,6	25,3	28,4	36,6
317,0	24,4	19,9	22,5	25,5	33,1
318,8	22,2	17,1	19,5	22,4	29,5
320,6	20,0	14,1	16,4	19,2	25,7
322,4	17,6	11,0	13,2	15,9	21,8
324,2	15,0	7,8	9,8	12,4	17,7
326,0	12,4	4,4	6,2	8,8	13,5
327,8	9,6	0,8	2,6	5,0	9,1
329,6	6,7	-1,6	0,0	2,4	6,1
331,4	3,7	-1,6	0,0	2,3	6,1
333,2	0,5	-2,8	-1,3	1,1	4,6
335,0	-2,8	-6,7	-5,2	-3,0	-0,1

Figura A7. Curvas de estabilidad del α -quimotripsinógeno en presencia de electrolitos en buffer pH 3,00 a partir de parámetros termodinámicos obtenidos por calorimetría diferencial de barrido.

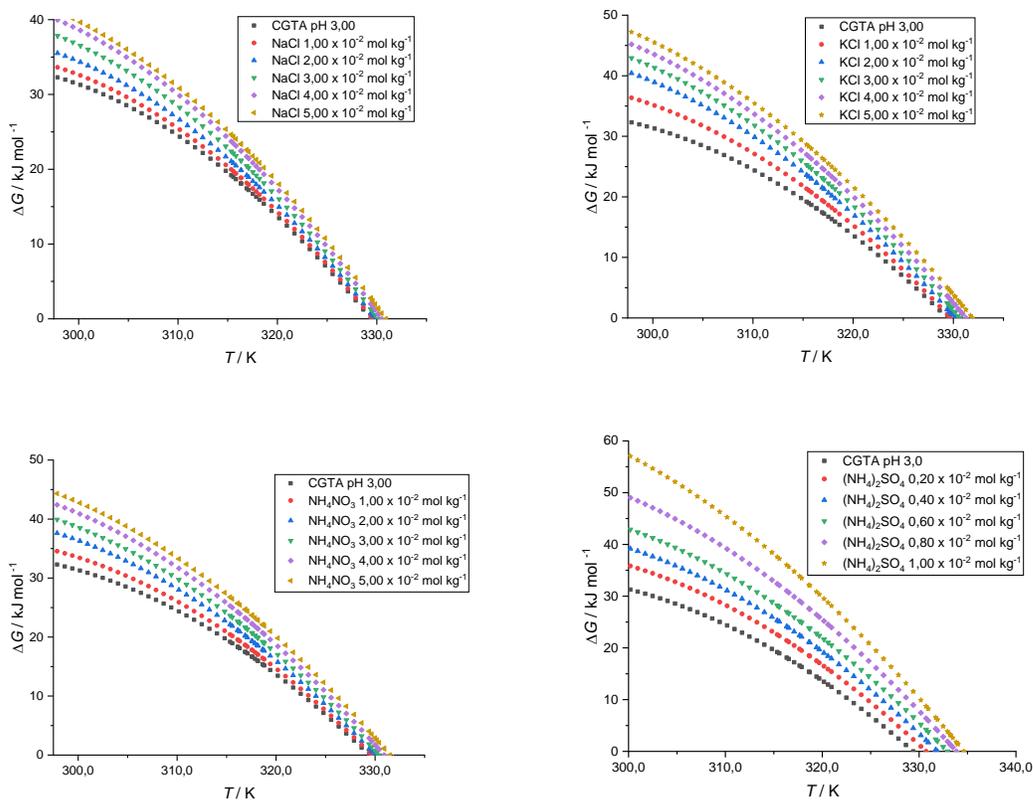
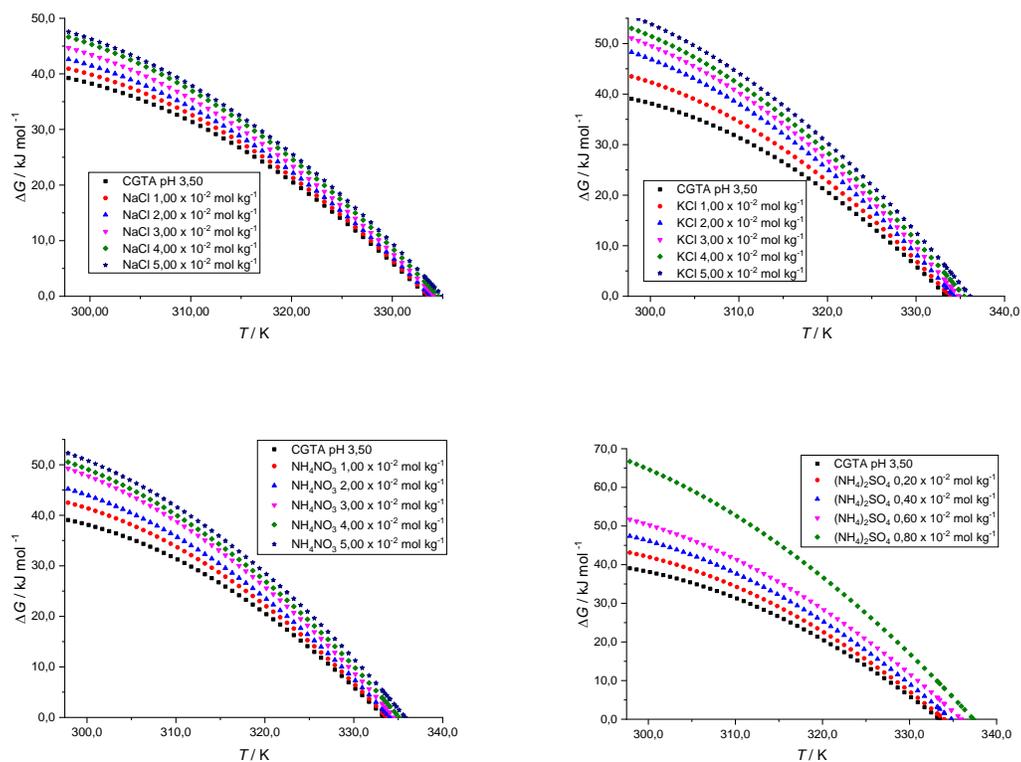


Figura A8. Curvas de estabilidad del α -quimotripsinógeno en presencia de electrolitos en agua pH 3,50 a partir de parámetros termodinámicos obtenidos por calorimetría diferencial de barrido.



B. Anexo: Parámetros de interacción

Figura B1. Densidades de electrolitos en función de la concentración a 298,15 K.

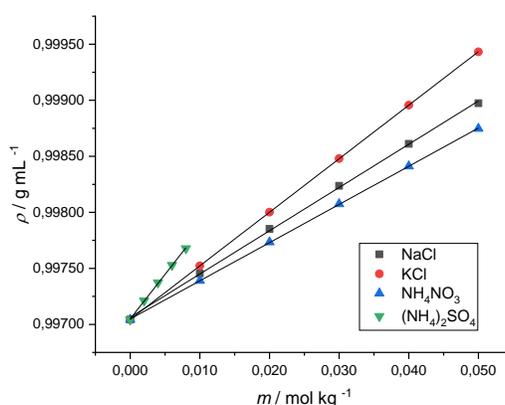


Tabla B1. Densidades y volúmenes específicos aparentes de las soluciones del α -quimotripsinógeno en presencia de NaCl en condiciones de molalidad y potencial químico constante a 298,15 K.

NaCl 0,010 mol kg ⁻¹				
CGTA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
<i>C</i> /g mL ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	$\phi_2' / \text{mL g}^{-1}$
0,0001	0,997493	0,6216 ± 0,0071	0,997493	0,6216 ± 0,0081
0,0003	0,997562	0,6450 ± 0,0066	0,997556	0,6650 ± 0,0072
0,0005	0,997615	0,6817 ± 0,0057	0,997601	0,7098 ± 0,0065
0,0007	0,997658	0,7118 ± 0,0050	0,997632	0,7490 ± 0,0062
0,0010	0,997700	0,7569 ± 0,0048	0,997657	0,8000 ± 0,0058
NaCl 0,020 mol kg ⁻¹				
CGTA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
<i>C</i> /g mL ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	$\phi_2' / \text{mL g}^{-1}$
0,0001	0,997905	0,4710 ± 0,0064	0,997904	0,4810 ± 0,0071
0,0003	0,997994	0,5278 ± 0,0058	0,997986	0,5545 ± 0,0066

0,0005	0,998063	$0,5792 \pm 0,0056$	0,998033	$0,6394 \pm 0,0060$
0,0007	0,998112	$0,6299 \pm 0,0044$	0,998054	$0,7130 \pm 0,0056$
0,0010	0,998140	$0,7135 \pm 0,0038$	0,998044	$0,8097 \pm 0,0052$
NaCl 0,030 mol kg ⁻¹				
CGTA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
<i>C</i> /g mL ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	0,998287	$0,5009 \pm 0,0061$	0,998285	$0,5209 \pm 0,0072$
0,0003	0,998376	$0,5376 \pm 0,0057$	0,998366	$0,5710 \pm 0,0068$
0,0005	0,998444	$0,5870 \pm 0,0049$	0,998423	$0,6291 \pm 0,0057$
0,0007	0,998501	$0,6240 \pm 0,0048$	0,998450	$0,6969 \pm 0,0055$
0,0010	0,998561	$0,6772 \pm 0,0043$	0,998449	$0,7894 \pm 0,0051$
NaCl 0,040 mol kg ⁻¹				
CGTA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
<i>C</i> /g mL ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	0,998671	$0,4006 \pm 0,0066$	0,998669	$0,4206 \pm 0,0070$
0,0003	0,998771	$0,4673 \pm 0,0061$	0,998765	$0,4873 \pm 0,0066$
0,0005	0,998848	$0,5267 \pm 0,0056$	0,998828	$0,5668 \pm 0,0058$
0,0007	0,998896	$0,5937 \pm 0,0048$	0,998860	$0,6452 \pm 0,0055$
0,0010	0,998942	$0,6699 \pm 0,0046$	0,998852	$0,7601 \pm 0,0050$
NaCl 0,050 mol kg ⁻¹				
CGTA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
<i>C</i> /g mL ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	0,999031	$0,4304 \pm 0,0071$	0,999030	$0,4405 \pm 0,0076$
0,0003	0,999127	$0,4905 \pm 0,0067$	0,999121	$0,5105 \pm 0,0071$
0,0005	0,999196	$0,5566 \pm 0,0059$	0,999177	$0,5946 \pm 0,0065$
0,0007	0,999241	$0,6192 \pm 0,0053$	0,999208	$0,6664 \pm 0,0058$
0,0010	0,999278	$0,6967 \pm 0,0049$	0,999211	$0,7638 \pm 0,0055$

^a La incertidumbre en las medidas de densidad es de 1,50E-04 g mL⁻¹

Tabla B2. Densidades y volúmenes específicos aparentes de las soluciones del α -quimotripsinógeno en presencia de KCl en condiciones de molalidad y potencial químico constante a 298,15 K.

KCl 0,010 mol kg ⁻¹				
CGTA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
<i>C</i> /g mL ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	0,997552	$0,7118 \pm 0,0062$	0,997551	$0,7243 \pm 0,0077$

0,0003	0,997607	0,7218 ± 0,0057	0,997598	0,7519 ± 0,0068
0,0005	0,997659	0,7298 ± 0,0050	0,997636	0,7759 ± 0,0057
0,0007	0,997707	0,7390 ± 0,0047	0,997658	0,8091 ± 0,0050
0,0010	0,997775	0,7499 ± 0,0039	0,997687	0,8381 ± 0,0041
KCl 0,020 mol kg ⁻¹				
CGTA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
<i>C</i> /g mL ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	0,998028	0,7415 ± 0,0079	0,998026	0,7615 ± 0,0085
0,0003	0,998079	0,7448 ± 0,0063	0,998066	0,7882 ± 0,0079
0,0005	0,998129	0,7475 ± 0,0058	0,998094	0,8176 ± 0,0066
0,0007	0,998178	0,7501 ± 0,0041	0,998110	0,8474 ± 0,0053
0,0010	0,998250	0,7535 ± 0,0033	0,998111	0,8928 ± 0,0041
KCl 0,030 mol kg ⁻¹				
CGTA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
<i>C</i> /g mL ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	0,998508	0,7211 ± 0,0078	0,998506	0,7411 ± 0,0092
0,0003	0,998562	0,7278 ± 0,0066	0,998551	0,7645 ± 0,0081
0,0005	0,998614	0,7331 ± 0,0055	0,998586	0,7892 ± 0,0069
0,0007	0,998664	0,7383 ± 0,0048	0,998608	0,8184 ± 0,0053
0,0010	0,998735	0,7461 ± 0,0044	0,998617	0,8643 ± 0,0048
KCl 0,040 mol kg ⁻¹				
CGTA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
<i>C</i> /g mL ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	0,998987	0,7007 ± 0,0068	0,998986	0,7107 ± 0,0086
0,0003	0,999042	0,7174 ± 0,0055	0,999033	0,7474 ± 0,0077
0,0005	0,999092	0,7308 ± 0,0050	0,999068	0,7788 ± 0,0062
0,0007	0,999135	0,7465 ± 0,0047	0,999093	0,8066 ± 0,0059
0,0010	0,999192	0,7658 ± 0,0044	0,999112	0,8459 ± 0,0055
KCl 0,050 mol kg ⁻¹				
CGTA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
<i>C</i> /g mL ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	0,999459	0,7304 ± 0,0059	0,999457	0,7504 ± 0,0089
0,0003	0,999512	0,7338 ± 0,0066	0,999500	0,7738 ± 0,0071
0,0005	0,999564	0,7364 ± 0,0050	0,999534	0,7965 ± 0,0063
0,0007	0,999614	0,7404 ± 0,0047	0,999558	0,8205 ± 0,0054
0,0010	0,999688	0,7444 ± 0,0040	0,999565	0,8675 ± 0,0051

^a La incertidumbre en las medidas de densidad es de 1,50E-04 g mL⁻¹

Tabla B3. Densidades y volúmenes específicos aparentes de las soluciones del α -quimotripsinógeno en presencia de NH_4NO_3 en condiciones de molalidad y potencial químico constante a 298,15 K.

NH_4NO_3 0,010 mol kg^{-1}				
CGTA	m (cte)		μ (cte)	
$C/\text{g mL}^{-1}$	${}^a\rho / \text{g mL}^{-1}$	$\phi_2 \text{ mL g}^{-1}$	${}^a\rho / \text{g mL}^{-1}$	$\phi_2' / \text{mL g}^{-1}$
0,0001	0,997425	$0,6517 \pm 0,0076$	0,997424	$0,6617 \pm 0,0084$
0,0003	0,997489	$0,6718 \pm 0,0064$	0,997483	$0,6918 \pm 0,0078$
0,0005	0,997541	$0,6998 \pm 0,0055$	0,997526	$0,7299 \pm 0,0066$
0,0007	0,997587	$0,7197 \pm 0,0048$	0,997558	$0,7620 \pm 0,0057$
0,0010	0,997641	$0,7510 \pm 0,0049$	0,997575	$0,8171 \pm 0,0054$
NH_4NO_3 0,020 mol kg^{-1}				
CGTA	m (cte)		μ (cte)	
$C/\text{g mL}^{-1}$	${}^a\rho / \text{g mL}^{-1}$	$\phi_2 \text{ mL g}^{-1}$	${}^a\rho / \text{g mL}^{-1}$	$\phi_2' / \text{mL g}^{-1}$
0,0001	0,997766	$0,6815 \pm 0,0067$	0,997765	$0,6916 \pm 0,0077$
0,0003	0,997824	$0,7016 \pm 0,0058$	0,997817	$0,7250 \pm 0,0072$
0,0005	0,997875	$0,7196 \pm 0,0053$	0,997858	$0,7537 \pm 0,0065$
0,0007	0,997919	$0,7374 \pm 0,0049$	0,997885	$0,7861 \pm 0,0058$
0,0010	0,997977	$0,7587 \pm 0,0041$	0,997905	$0,8309 \pm 0,0056$
NH_4NO_3 0,030 mol kg^{-1}				
CGTA	m (cte)		μ (cte)	
$C/\text{g mL}^{-1}$	${}^a\rho / \text{g mL}^{-1}$	$\phi_2 \text{ mL g}^{-1}$	${}^a\rho / \text{g mL}^{-1}$	$\phi_2' / \text{mL g}^{-1}$
0,0001	0,998114	$0,6112 \pm 0,0067$	0,9981134	$0,6172 \pm 0,0074$
0,0003	0,998184	$0,6379 \pm 0,0059$	0,9981769	$0,6616 \pm 0,0066$
0,0005	0,998244	$0,6633 \pm 0,0055$	0,9982284	$0,6945 \pm 0,0058$
0,0007	0,998296	$0,6856 \pm 0,0052$	0,998262	$0,7343 \pm 0,0055$
0,0010	0,998360	$0,7164 \pm 0,0047$	0,9982994	$0,7771 \pm 0,0051$
NH_4NO_3 0,040 mol kg^{-1}				
CGTA	m (cte)		μ (cte)	
$C/\text{g mL}^{-1}$	${}^a\rho / \text{g mL}^{-1}$	$\phi_2 \text{ mL g}^{-1}$	${}^a\rho / \text{g mL}^{-1}$	$\phi_2' / \text{mL g}^{-1}$
0,0001	0,998440	$0,7211 \pm 0,0061$	0,998438	$0,7312 \pm 0,0076$
0,0003	0,998494	$0,7278 \pm 0,0057$	0,998486	$0,7512 \pm 0,0071$
0,0005	0,998545	$0,7352 \pm 0,0054$	0,998525	$0,7732 \pm 0,0066$
0,0007	0,998594	$0,7412 \pm 0,0048$	0,998558	$0,7913 \pm 0,0062$
0,0010	0,998664	$0,7492 \pm 0,0046$	0,998590	$0,8223 \pm 0,0058$

NH ₄ NO ₃ 0,050 mol kg ⁻¹				
CGTA	m (cte)		μ(cte)	
C/g mL ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	φ ₂ mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	φ' ₂ / mL g ⁻¹
0,0001	0,998784	0,6308 ± 0,0073	0,998783	0,6368 ± 0,0080
0,0003	0,998853	0,6475 ± 0,0067	0,998844	0,6768 ± 0,0073
0,0005	0,998913	0,6688 ± 0,0055	0,998893	0,7089 ± 0,0067
0,0007	0,998963	0,6923 ± 0,0049	0,998929	0,7409 ± 0,0056
0,0010	0,999030	0,7179 ± 0,0046	0,998956	0,7920 ± 0,0048

^a La incertidumbre en las medidas de densidad es de 1,50E-04 g mL⁻¹

Tabla B4. Densidades y volúmenes específicos aparentes de las soluciones del α-quimotripsinógeno en presencia de (NH₄)₂SO₄ en condiciones de molalidad y potencial químico constante a 298,15 K.

(NH ₄) ₂ SO ₄ 0,0020 mol kg ⁻¹				
CGTA	m (cte)		μ(cte)	
C/g mL ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	φ ₂ mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	φ' ₂ / mL g ⁻¹
0,0001	0,997233	0,7822 ± 0,0074	0,997232	0,7922 ± 0,0082
0,0003	0,997274	0,7922 ± 0,0067	0,997270	0,8056 ± 0,0077
0,0005	0,997312	0,8002 ± 0,0055	0,997302	0,8203 ± 0,0066
0,0007	0,997345	0,8108 ± 0,0049	0,997327	0,8366 ± 0,0058
0,0010	0,997386	0,8273 ± 0,0047	0,997349	0,8644 ± 0,0053
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0,0040 mol kg ⁻¹				
CGTA	m (cte)		μ(cte)	
C/g mL ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	φ ₂ mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	φ' ₂ / mL g ⁻¹
0,0001	0,997407	0,6617 ± 0,0067	0,997406	0,6718 ± 0,0073
0,0003	0,997470	0,6784 ± 0,0056	0,997461	0,7085 ± 0,0065
0,0005	0,997527	0,6938 ± 0,0051	0,997504	0,7399 ± 0,0057
0,0007	0,997577	0,7104 ± 0,0049	0,997538	0,7663 ± 0,0052
0,0010	0,997645	0,7299 ± 0,0046	0,997568	0,8071 ± 0,0050
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0,0060 mol kg ⁻¹				
CGTA	m (cte)		μ(cte)	
C/g mL ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	φ ₂ mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	φ' ₂ / mL g ⁻¹
0,0001	0,997575	0,5413 ± 0,0075	0,997573	0,5614 ± 0,0081
0,0003	0,997656	0,5781 ± 0,0071	0,997644	0,6182 ± 0,0076
0,0005	0,997722	0,6155 ± 0,0064	0,997695	0,6697 ± 0,0070
0,0007	0,997778	0,6459 ± 0,0059	0,997727	0,7189 ± 0,0063
0,0010	0,997841	0,6897 ± 0,0056	0,997724	0,8070 ± 0,0060

(NH ₄) ₂ SO ₄ 0,0080 mol kg ⁻¹				
CGTA	<i>m</i> (cte)		μ (cte)	
<i>C</i> / g mL ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ_2 mL g ⁻¹	^a ρ / g mL ⁻¹	ϕ'_2 / mL g ⁻¹
0,0001	0,997730	0,4811 ± 0,0078	0,997728	0,5012 ± 0,0084
0,0003	0,997822	0,5212 ± 0,0074	0,997816	0,5413 ± 0,0080
0,0005	0,997902	0,5533 ± 0,0067	0,997881	0,5954 ± 0,0074
0,0007	0,997961	0,5971 ± 0,0060	0,997921	0,6544 ± 0,0066
0,0010	0,998035	0,6445 ± 0,0059	0,997956	0,7237 ± 0,0061

^a La incertidumbre en las medidas de densidad es de 1,50E-04 g mL⁻¹

Tabla B5. Valores de los coeficientes *A*, *B*, y *C* a 298,15 K reportados por Hamer para el modelo extendido de Debye-Hückel.

Electrolito	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i> / kg mol ⁻¹
NaCl	0,5108	1,4495	2,044E-02
KCl	0,5108	1,2950	7,000E-05
NH ₄ NO ₃	0,5108	0,9250	3,475E-02

C. Anexo: Incertidumbres

Las incertidumbres fueron evaluadas de la expresión general para cualquier función.

$$\Delta f = \pm \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^2 (\Delta x_i)^2}$$

Incertidumbre en la molalidad:

$$\Delta m = \sqrt{\left(\frac{1}{M_{sto}m_{ste}}\right)^2 (\Delta W)^2 + \left(\frac{m_{sto}}{M_{sto}m_{ste}^2}\right)^2 (\Delta W)^2}$$

Donde M_{sto} es la masa molar del soluto, m_{ste} es la masa del solvente, m_{sto} es la masa del soluto y ΔW es la incertidumbre asociada al proceso de pesada.

Incertidumbre del volumen específico aparente

$$\Delta \varphi = \sqrt{\left(\frac{\rho_{sln} - c}{c\rho_{ste}}\right)^2 (\Delta \rho)^2 + \left(\frac{1}{c\rho_{ste}}\right)^2 (\Delta \rho)^2 + \left(\frac{\rho_{sln} - \rho_{ste}}{c^2\rho_{ste}}\right)^2 (\Delta c)^2}$$

Donde ρ_{sln} , ρ_{ste} y c son la densidad del solvente, la densidad de la solución y la concentración del electrolito o de la proteína.

Incertidumbre en el volumen parcial específico

Para determinar la incertidumbre en el volumen parcial específico se hizo un ajuste lineal ponderado de los datos obtenidos de volumen específico aparente para las soluciones de electrolitos y las soluciones de proteína con electrolito a molalidad constante y potencial químico constante de electrolito. El intercepto de las gráficas corresponde al volumen parcial específico y la incertidumbre se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$\Delta\varphi^o = \frac{\left(\sum \frac{C_i}{e_i^2}\right)\left(\sum \frac{\varphi_i}{e_i^2}\right) - \left(\sum \frac{C_i\varphi_i}{e_i^2}\right)\left(\sum \frac{1}{e_i^2}\right)}{\left(\sum \frac{C_i}{e_i^2}\right)^2 - \left(\sum \frac{C_i^2}{e_i^2}\right)\left(\sum \frac{1}{e_i^2}\right)}$$

Donde C_i es la concentración de electrolito o proteína según sea el caso, e_i es la incertidumbre para cada valor de concentración, φ_i es el volumen específico aparente del electrolito o de la proteína a molalidad constante de electrolito (ϕ_2) o potencial químico constante (ϕ_2').

Incertidumbre del parámetro de interacción preferencial:

$$\Delta\xi_3 = \sqrt{\left(\frac{\phi_2^o - \phi_2'^o}{(v^o\rho_0 - 1)^2}\right)^2 (\Delta\rho_0)^2 + \left(\frac{\rho_0}{1 - v^o\rho_0}\right)^2 (\Delta\phi_2^o)^2 + \left(\frac{\rho_0}{v^o\rho_0 - 1}\right)^2 (\Delta\phi_2'^o)^2 + \left(\frac{\rho_0^2(\phi_2^o - \phi_2'^o)}{(v^o\rho_0 - 1)^2}\right)^2 (\Delta v^o)^2}$$

Donde $\phi_2^o, \phi_2'^o$ son los volúmenes parciales específicos de la proteína en condiciones de molalidad constante y potencial químico constante de electrolito, ρ_0 es la densidad del disolvente de referencia (agua – electrolito) y v^o es el volumen parcial específico del electrolito.

Incertidumbre en el cambio del potencial químico de la proteína por efecto de electrolito

$$\left(\frac{\partial \mu_2}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} = \sqrt{\left(-\frac{nRT}{m_3} - RT\left(\frac{\partial \ln \gamma_3}{\partial m_3}\right)\right)^2 \left(\Delta\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)\right)^2 + \left(\frac{\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)\left(Rm_3\left(\frac{\partial \ln \gamma_3}{\partial m_3}\right) + R\right)}{m_3}\right)^2 (\Delta T)^2 + \left(\frac{nRT\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)}{m_3^2}\right)^2 (\Delta m_3)^2 + \left(nRT\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)\right)^2 \left(\Delta\left(\frac{\partial \ln \gamma_3}{\partial m_3}\right)\right)^2}$$

Donde $\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)$ es la unión preferencial en escala molar, γ_3 es el coeficiente de actividad del electrolito, m_3 es la molalidad del electrolito, R y T la constante de los gases y la temperatura en escala absoluta respectivamente.

Bibliografía

- [1] C. Vieille, J.G. Zeikus, Thermozyms: Identifying molecular determinants of protein structural and functional stability, *Trends Biotechnol.* 14 (6) (1996) 183–190.
- [2] D. Voet, J.G. Voet, *Bioquímica*. 3 ed. Médica Panamericana 2006, Buenos Aires. pp 287-320.
- [3] P.J. Halling, Proteins: Structures and molecular properties *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 62 (1) (1995) 105–105
- [4] M.K. Campbell, S.O. Farrell, *Bioquímica* 6 ed. Cengage Learning Latin America 2009, Mexico D.F. pp 200-260
- [5] T. McKee, J.R. McKee, *Bioquímica: la base molecular de la vida*, 2 ed McGraw-Hill. 2014, Mexico D.F. 228–259.
- [6] A. V. Finkelstein, O. V. Galzitskaya, Physics of protein folding, *Phys. Life Rev.* 1 (1) (2004) 23–56.
- [7] J. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*. 5ed Freeman, W. H. & Company, 2012, New York. pp. 83-106, 287-290
- [8] C.M. Dobson, Protein folding and misfolding, *Nature*.426 (6968) (2003) 884–890.
- [9] M. Mathlouthi, Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs, *Food Control.* 12 (7) (2001) 409–417.
- [10] L. Zhang, L. Wang, Y.T. Kao, W. Qiu, Y. Yang, O. Okobiah, D. Zhong, Mapping hydration dynamics around a protein surface, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (47) (2007) 18461–18466.

- [11] S. Ebbinghaus, S.J Kim, M. Heyden, An extended dynamical hydration shell around proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (52) (2007) 20749–20752.
- [12] V.A. Parsegian, Protein-water interactions, *Int. Rev. Cytol.* 215 (2) (2002) 1–31.
- [13] P.L. Privalov, Thermodynamics of protein folding, *J. Chem. Thermodyn.* 29 (4) (1997) 447–474.
- [14] R.L. Baldwin, How Hofmeister ion interactions affect protein stability, *Biophys. J.* 71 (4) (1996) 2056-2063.
- [15] G. Vogt, S. Woell, P. Argos, Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs, *J. Mol. Biol.* 269 (4) (1997) 631–643.
- [16] W. Kauzmann, Some factors in the interpretation of protein denaturation, *Adv. Protein Chem.* 14 (1) (1959) 1–63.
- [17] D. Lorient, J.C. Cheftel, J.L. Cuq, *Proteínas alimentarias: bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas* 1 ed. Acribia S.A 1989, España. pp 150-200.
- [18] T.P. Creamer, R. Srinivasan, G D. Rose, Modeling unfolded states of proteins and peptides. II. Backbone solvent accessibility, *Biochemistry.* 36 (10) (1997) 2832–2835.
- [19] P.L. Privalov, S.J. Gill, Stability of protein structure and hydrophobic interaction, *Adv. Protein Chem.* 39 (1) (1988) 191–234.
- [20] C. Scharnagl, M. Reif, J. Friedrich, Stability of proteins: Temperature, pressure and the role of the solvent, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1749 (2) (2005) 187–213.
- [21] K.A. Dill, Dominant forces in protein folding, *Biochemistry.* 29 (31) (1990) 7133–7155.

- [22] C.N. Pace, J.M. Scholtz, G.R. Grimsley, Forces stabilizing proteins, *FEBS Lett.* 588 (14) (2014) 2177–2184.
- [23] K. Takano, Y. Yamagata, K. Yutani, Contribution of polar groups in the interior of a protein to the conformational stability, *Biochemistry.* 40 (15) (2001) 4853–4858.
- [24] C.I. Branden, J. Tooze, *Introduction to Protein Structure*, 2ed Garland Science 1999, Nueva York. pp 50-120
- [25] C.N. Pace, H. Fu, K.L. Fryar, J. Landua, S.R. Trevino, B.A. Shirley, M.N. Hendricks, S. Iimura, K. Gajiwala, J.M. Scholtz, G.R. Grimsley, Contribution of hydrophobic interactions to protein stability, *J. Mol. Biol.* 408 (3) (2011) 514–528.
- [26] J.D. Bernal, Structure of proteins, *Nat.* 143 (625) (1939) 663–667.
- [27] C. Tanford, Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins, *J. Am. Chem. Soc.* 84 (22) (1962) 4240–4247.
- [28] L. Wesson, D. Eisenberg, Atomic solvation parameters applied to molecular dynamics of proteins in solution, *Protein Sci.* 1 (2) (1992) 227–235.
- [29] S. Romero, D.A. Fernández, M. Costas, Estabilidad termodinámica de proteínas, *Educ. Química.* 29 (3) (2012) 3-17.
- [30] A. Cooper, *Protein: A comprehensive treatise. Thermodynamics of protein folding and stability.* JAI Press Inc 1999, Scotland, UK. pp 217-270
- [31] C. Gómez, J. Sancho, *Estructura de proteínas* 1 ed. Ariel S.A 2003, Barcelona España. pp 147-198
- [32] J. Sancho, The stability of 2-state, 3-state and more-state proteins from simple spectroscopic techniques... plus the structure of the equilibrium intermediates at the same time, *Arch. Biochem. Biophys.* 531 (2) (2013) 4–13.
- [33] F. Franks, Protein stability: the value of old literature, *Biophys. Chem.* 96 (2) (2002) 117–127.

- [34] T.M. Devlin, *Bioquímica : libro de texto con aplicaciones clínicas* 4 ed. Reverte S.A, 2004, Barcelona España. pp 365-450
- [35] J.F. Brandts, The thermodynamics of protein denaturation. I. The denaturation of chymotrypsinogen, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (20) (1964) 4291–4301.
- [36] R.H. Hatley, F. Franks, The cold-induced denaturation of lactate dehydrogenase at sub-zero temperatures in the absence of perturbants, *FEBS Lett.* 257 (1) (1989) 171–173.
- [37] M. Tollinger, K.A. Crowhurst, L.E. Kay, J.D. Forman-Kay, Site-specific contributions to the pH dependence of protein stability, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (8) (2003) 4545–4550.
- [38] N.V. Russo, D.A. Estrin, M.A. Marti, A.E. Roitberg, pH-Dependent conformational changes in proteins and their effect on experimental pKa: the case of Nitrophorin 4, *PLoS Comput. Biol.* 8 (11) (2012) 1-10.
- [39] D.L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry* 7ed. W.H. Freeman 2017, New York. pp 293–340.
- [40] V.V. Mozhaev, K. Heremans, J. Frank, P. Masson, C. Balny, High pressure effects on protein structure and function., *Proteins.* 24 (1) (1996) 81–91.
- [41] B.B. Boonyaratanakornkit, C.B. Park, D.S. Clark, Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1595 (1-2) (2002) 235–249.
- [42] C. Mattos, D. Ringe, Proteins in organic solvents, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 (6) (2001) 761–764.
- [43] L. Dai, A.M. Klibanov, Striking activation of oxidative enzymes suspended in nonaqueous media, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 (17) (1999) 9475–9478.

- [44] K.R. Babu, D.J. Douglas, Methanol-induced conformations of myoglobin at pH 4.0, *Biochemistry*. 39 (47) (2000) 14702–14710.
- [45] S.K. Awasthi, S.C. Shankaramma, S. Raghothama, P. Balaram, Solvent-induced-hairpin to helix conformational transition in a designed peptide, *Biopolymers*. 58 (5) (2001) 465–476.
- [46] T.V. Burova, N. V. Grinberg, V.Y. Grinberg, R. V. Rariy, A.M. Klibanov, Calorimetric evidence for a native-like conformation of hen egg-white lysozyme dissolved in glycerol, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1478 (2) (2000) 309–317.
- [47] J.F. Back, D. Oakenfull, M.B. Smith, Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols, *Biochemistry*. 18 (23) (1979) 5191–5196.
- [48] D.R. Canchi, A.E. Garcia, Cosolvent effects on protein stability, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 64 (1) (2013) 273–293.
- [49] S.N. Timasheff, Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated, *Adv. Protein Chem.* 51 (1) (1998) 355–432.
- [50] M.H. Priya, H.S. Ashbaugh, M.E. Paulaitis, Cosolvent preferential molecular interactions in aqueous solutions, *J. Phys. Chem. B.* 115 (46) (2011) 13633–13642.
- [51] P.E. Smith, Chemical potential derivatives and preferential interaction parameters in biological systems from Kirkwood-Buff theory, *Biophys. J.* 91 (3) (2006) 849–856.
- [52] M.R. Eftink, The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins., *Biophys. J.* 66 (2) (1994) 482-501.

- [53] T. V. Chalikian, J. Völker, D. Anafi, K.J. Breslauer, The native and the heat-induced denatured states of α -chymotrypsinogen A: thermodynamic and spectroscopic studies, *J. Mol. Biol.* 274 (2) (1997) 237–252.
- [54] S. Komal, D. Shashank, Relationship between the wavelength maximum of a protein and the temperature dependence of its intrinsic tryptophan fluorescence intensity, *Eur. Biophys. J.* 39 (10) (2010) 1445–1451.
- [55] L. Hamborg, E.W. Horsted, K.E. Johansson, M. Willemoës, K. Lindorff-Larsen, K. Teilum, Global analysis of protein stability by temperature and chemical denaturation, *Anal. Biochem.* 605 (1) (2020) 113-133.
- [56] C.M. Romero, J.S. Abella, A. Velázquez, J. Sancho, Thermal denaturation of α -chymotrypsinogen A in presence of polyols at pH 2.0 and pH 3.0, *J. Therm. Anal. Calorim.* 120 (1) (2015) 489–499.
- [57] G. Bruylants, J. Wouters, C. Michaux, Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design, *Curr. Med. Chem.* 12 (17) (2005) 2011–2020.
- [58] S.N. Timasheff, Protein-solvent interactions and protein conformation, *Acc. Chem. Res.* 3 (2) (1970) 62–68.
- [59] T. Arakawa, S.N. Timasheff, The stabilization of proteins by osmolytes, *Biophys. J.* 47 (3) (1985) 411-414.
- [60] T. Arakawa, Protein–solvent interaction, *Biophys. Rev.* 10 (1) (2018) 203-208.
- [61] S.N. Timasheff, Solvent effects on protein stability, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2 (1) (1992) 35–39.
- [62] W.H. Stockmayer, Light scattering in multi-component systems, *J. Chem. Phys.* 18 (58) (1950) 58–61.

- [63] G. Scatchard, Physical chemistry of protein solutions. I. Derivation of the equations for the osmotic pressure, *J. Am. Chem. Soc.* 68 (11) (1946) 2315–2319.
- [64] J.C. Lee, S.N. Timasheff, Partial specific volumes and interactions with solvent components of proteins in guanidine hydrochloride, *Biochemistry.* 13 (2) (1974) 257–265.
- [65] J.C. Lee, K. Gekko, S.N. Timasheff, Measurements of preferential solvent interactions by densimetric techniques, *Methods Enzymol.* 61 (1) (1979) 26–49.
- [66] J.K. Kaushik, R. Bhat, Thermal stability of proteins in aqueous polyol solutions: role of the surface tension of water in the stabilizing effect of polyols, *J. Phys. Chem.* 102 (36) (1998) 7058–7066.
- [67] T.Y. Lin, S.N. Timasheff, On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins., *Protein Sci.* 5 (2) (1996) 372-381.
- [68] A. Nicholls, K.A. Sharp, B. Honig, Protein folding and association: Insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 11 (4) (1991) 281–296.
- [69] O. Sinanoglu, S. Abdalnur, Effect of water and other solvents on the structure of biopolymers, *Fed. Proc.* 24 (1) (1965) 12-23.
- [70] R. Breslow, T. Guo, Surface tension measurements show that chaotropic salting-in denaturants are not just water-structure breakers, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 (1) (1990) 167–169.
- [71] J.C. Lee, S.N. Timasheff, The stabilization of proteins by sucrose, *J. Biol. Chem.* 256 (14) (1981) 7193–7201.
- [72] T. Arakawa, S.N. Timasheff, Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions, *Biochemistry.* 21 (25) (1982) 6545–6552.

- [73] T. Arakawa, S.N. Timasheff, Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions, *Arch. Biochem. Biophys.* 224 (1) (1983) 169–177.
- [74] Y. Kita, T. Arakawa, T.Y. Lin, S.N. Timasheff, Contribution of the surface free energy perturbation to protein-solvent interactions, *Biochemistry.* 33 (50) (1994) 15178–15189.
- [75] C.M. Romero, R.A. Albis, N. Mendieta, Influence of 1-butanol, 1,2-butanediol and 1,2,3,4-butanetriol on the adsorption of β -lactoglobulin at the air-water interface, *Rev. Colomb. Química.* 40 (3) (2011) 367–380.
- [76] C.M. Romero, A. Albis, Influence of polyols and glucose on the surface tension of bovine α -lactalbumin in aqueous solution, *J. Solut. Chem.* 39 (12) (2010) 1865–1876.
- [77] C.M. Romero, J.S. Abella, Surface behavior of α -chymotrypsinogen A in aqueous solutions at 298.15 K, *J. Mol. Liq.* 285 (1) (2019) 89–95.
- [78] D.J. McClements, Modulation of globular protein functionality by weakly interacting cosolvents, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42 (5) (2002) 417–471.
- [79] K. Hill, E. Horvath-Szancsics, G. Hajos, E. Kiss, Surface and interfacial properties of water-soluble wheat proteins, *Colloids Surf, A Physicochem. Eng. Asp.* 319 (3) (2008) 180–187.
- [80] M. Auton, A.C. Ferreón, D.W. Bolen, Metrics that differentiate the origins of osmolyte effects on protein stability: a test of the surface tension proposal, *J. Mol. Biol.* 361 (5) (2006) 983–992.
- [81] S. Magdassi, *Surface activity of proteins: chemical and physicochemical modifications* 1ed. Marcel Dekker Inc 1996, New York. pp 5-30
- [82] A. Sadana, Protein adsorption and inactivation on surfaces. Influence of heterogeneities, *Chem. Rev.* 92 (8) (1992) 1799–1818.

- [83] T. Sengupta, L. Razumovsky, S. Damodaran, Energetics of protein–interface interactions and its effect on protein adsorption, *Langmuir*. 15 (20) (1999) 6991–7001.
- [84] G. Yampolskaya, D. Platikanov, Proteins at fluid interfaces: adsorption layers and thin liquid films, *Adv. Colloid Interface Sci.* 128 (1) (2006) 159–183.
- [85] C.S. Rao, S. Damodaran, Is surface pressure a measure of interfacial water activity? Evidence from protein adsorption behavior at interfaces, *Langmuir*. 16 (24) (2000) 9468–9477.
- [86] G. Camejo, G. Colacicco, M.M. Rapport, Lipid monolayers: interactions with the apoprotein of high density plasma lipoprotein, *J. Lipid Res.* 9 (5) (1968) 562–569.
- [87] J. Mitchell, L. Irons, G.J. Palmer, A study of the spread and adsorbed films of milk proteins, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct.* 200 (1) (1970) 138–150.
- [88] R. Baeza, C.C. Sanchez, A.M.R. Pilosof, J.M. Rodríguez, Interactions of polysaccharides with β -lactoglobulin adsorbed films at the air–water interface, *Food Hydrocoll.* 19 (2) (2005) 239–248.
- [89] D. Guzey, D.J. McClements, J. Weiss, Adsorption kinetics of BSA at air–sugar solution interfaces as affected by sugar type and concentration, *Food Res. Int.* 36 (7) (2003) 649–660.
- [90] V.S. Alahverdijeva, V.B. Fainerman, E.V. Aksenenko, M.E. Leser, R. Miller, Adsorption of hen egg-white lysozyme at the air–water interface in presence of sodium dodecyl sulphate, *Colloids Surf A Physicochem. Eng. Asp.* 317 (1-3) (2008) 610–617.
- [91] K.D. Martinez, C.C. Sanchez, V.P. Henestrosa, J.M. Patino, A.M.R. Pilosof, Soy protein–polysaccharides interactions at the air–water interface, *Food Hydrocoll.* 21 (5) (2007) 804–812.

- [92] R.A. Ganzevles, M.A. Stuart, T. Vliet, H.J. Jongh, Use of polysaccharides to control protein adsorption to the air–water interface, *Food Hydrocoll.* 20 (6) (2006) 872–878.
- [93] W. Melander, C. Horváth, Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series, *Arch. Biochem. Biophys.* 183 (1) (1977) 200–215.
- [94] W. Kunz, P. Lo Nostro, B.W. Ninham, The present state of affairs with Hofmeister effects, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 9 (1-2) (2004) 1–18.
- [95] K.D. Collins, Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process, *Methods.* 34 (3) (2004) 300–311.
- [96] A.A. Zavitsas, Properties of water solutions of electrolytes and nonelectrolytes, *J. Phys. Chem. B.* 105 (32) (2001) 7805–7817.
- [97] L.A. Bromley, Thermodynamic properties of strong electrolytes in aqueous solutions, *AIChE J.* 19 (2) (1973) 313–320.
- [98] P. Lo Nostro, B.W. Niham, Hofmeister phenomena: an update on ion specificity in biology, *Chem. Rev.* 112 (4) (2012) 2286–2322.
- [99] Y. Marcus, Effect of Ions on the structure of water: structure making and breaking, *Chem. Rev.* 109 (3) (2009) 1346–1370.
- [100] Y. Zhang, P.S. Cremer, Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10 (6) (2006) 658–663.
- [101] K.D. Collins, G.W. Neilson, J.E. Enderby, Ions in water: characterizing the forces that control chemical processes and biological structure, *Biophys. Chem.* 128 (2) (2007) 95–104.

- [102] M.T. Ru, S.Y. Hirokane, A.S. Lo, J.S. Dordick, J. A. Reimer, D. S. Clark, On the salt-induced activation of lyophilized enzymes in organic solvents: effect of salt kosmotropicity on enzyme activity, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (8) (2000) 1565–1571.
- [103] J.M. Scholtz, G.R. Grimsley, C.N. Pace, Solvent denaturation of proteins and interpretations of the *m* value, *Methods Enzymol.* 466 (1) (2009) 549–565.
- [104] N. Schwierz, D. Horinek, U. Sivan, R.R. Netz, Reversed Hofmeister series: the rule rather than the exception, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 23 (1) (2016) 10–18.
- [105] Y. Zhang, P.S. Cremer, The inverse and direct Hofmeister series for lysozyme, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (36) (2009) 15249–15253.
- [106] N. V. Nucci, J.M. Vanderkooi, Effects of salts of the Hofmeister series on the hydrogen bond network of water, *J. Mol. Liq.* 143 (2) (2008) 160-170.
- [107] P. Jungwirth, P.S. Cremer, Beyond Hofmeister, *Nat. Chem.* 6 (4) (2014) 261–263.
- [108] N. Schwierz, D. Horinek, R.R. Netz, Reversed anionic Hofmeister series: the interplay of surface charge and surface polarity, *Langmuir.* 26 (10) (2010) 7370–7379.
- [109] L.B. Smillie, B.S. Hartley, The disulphide bridges of bovine chymotrypsinogen B, *Biochem. J.* 105 (3) (1967) 1125-1133.
- [110] R.A. Alberty, E.A. Anderson, J. W. Williams, Homogeneity and the electrophoretic behavior of some proteins, *J. Phys. Colloid Chem.* 52 (1) (1948) 217–230.
- [111] V.M. Ingram, Isoelectric point of chymotrypsinogen by a Donnan equilibrium method, *Nat.* 170 (4319) (1952) 250–251.
- [112] V. Kubacki, K.D. Brown, M. Laskowski, Electrophoresis and solubility of chymotrypsinogen B and chymotrypsin B, *J. Biol. Chem.* 180 (1) (1949) 73–78.

- [113] J.A. Beeley, S.M. Stevenson, J.G. Beeley, Polyacrylamide gel isoelectric focusing of proteins: determination of isoelectric points using an antimony electrode, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct.* 285 (2) (1972) 293–300.
- [114] M.R. Salaman, A.R. Williamson, Isoelectric focusing of proteins in the native and denatured states. Anomalous behaviour of plasma albumin, *Biochem. J.* 122 (1) (1971) 93–99.
- [115] M. Poitevin, K. Hammad, I. Ayed, P.G. Righetti, G. Peltre, S. Descroix, Use of quasi-isoelectric buffers to limit protein adsorption in capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis.* 29 (15) (2008) 3164–3167.
- [116] J.M. Andrews, Non-native aggregation of alpha-chymotrypsinogen occurs through nucleation and growth with competing nucleus sizes and negative activation energies, *Biochemistry.* 26 (45) (2007) 7558-7571
- [117] W.M. Jackson, J.F. Brandts, Thermodynamics of protein denaturation. Calorimetric study of the reversible denaturation of chymotrypsinogen and conclusions regarding the accuracy of the two-state approximation, *Biochemistry.* 9 (11) (1970) 2294–2301.
- [118] F. Khan, R. H. Khan, S. Muzammil, Alcohol-induced versus anion-induced states of alpha-chymotrypsinogen A at low pH, *Biochim. Biophys. Acta.* 1481 (2) (2000) 229–236.
- [119] N. Poklar, G. Vesnaver, S. Lapanje, Interactions of alpha-chymotrypsinogen A with alkylureas., *Biophys. Chem.* 57 (2) (1996) 279–289.
- [120] C.M. Romero, J.S. Abella, Preferential interaction of chymotrypsinogen in aqueous solutions of polyols at 298.15 K, *J. Solut. Chem.* 48 (11) (2019) 1591–1602.
- [121] C.J. Coen, H.W. Blanch, J.M. Prausnitz, Salting out of aqueous proteins: phase equilibria and intermolecular potentials, *AIChE J.* 41 (4) (1995) 996–1004.

- [122] J. Osborne, A. Lunasin, R.F. Steiner, The binding of calcium by chymotrypsinogen A, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49 (4) (1972) 923–929.
- [123] O.D. Velev, E.W. Kaler, A.M. Lenhoff, Protein interactions in solution characterized by light and neutron scattering: comparison of lysozyme and chymotrypsinogen, *Biophys. J.* 75 (6) (1998) 2682–2697.
- [124] S.D. Allison, A. Dong, J.F. Carpenter, Counteracting effects of thiocyanate and sucrose on chymotrypsinogen secondary structure and aggregation during freezing, drying, and rehydration, *Biophys. J.* 71 (4) (1996) 2022–2032.
- [125] C.H. Chervenka, The urea denaturation of chymotrypsinogen as determined by ultraviolet spectral changes. The influence of pH and salts, *J. Am. Chem. Soc.* 82 (3) (1960) 582–585.
- [126] J. Brandts, R. Lumry, The reversible thermal denaturation of chymotrypsinogen. I. Experimental characterization, *J. Phys. Chem.* 67 (7) (1963) 1484–1494.
- [127] A.M. Kroetsch, E. Sahin, H.Y. Wang, S. Krizman, C.J. Roberts, Relating particle formation to salt- and pH-dependent phase separation of non-native aggregates of alpha-chymotrypsinogen A, *J. Pharm. Sci.* 101 (10) (2012) 3651–3660.
- [128] J.C. Lee, L.L. Lee, Preferential solvent interactions between proteins and polyethylene glycols, *J. Biol. Chem.* 256 (2) (1981) 625–631.
- [129] I.L. Shulgin, E. Ruckenstein, Preferential hydration and solubility of proteins in aqueous solutions of polyethylene glycol, *Biophys. Chem.* 120 (3) (2006) 188–198.
- [130] N.N. Khechinashvili, J. Janin, F. Rodier, Thermodynamics of the temperature-induced unfolding of globular proteins, *Protein Sci.* 4 (7) (1995) 1315–1324.
- [131] P.L. Privalov, Stability of proteins small globular proteins, *Adv. Protein Chem.* 33 (1) (1979) 167–241.

- [132] J.F. Brandts, The thermodynamics of protein denaturation. II. A model of reversible denaturation and interpretations regarding the stability of chymotrypsinogen, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (20) (1964) 4302–4314.
- [133] M.A. Eisenberg, G.W. Schwert, The reversible heat denaturation of chymotrypsinogen, *J. Gen. Physiol.* 34 (5) (1951) 583–606.
- [134] C.M. Romero, A. Albis, J.M. Lozano, J. Sancho, Thermodynamic study of the influence of polyols and glucose on the thermal stability of holo-bovine α -lactalbumin, *J. Therm. Anal. Calorim.* 98 (1) (2009) 165–171.
- [135] H. Naghibi, A. Tamura, J.M. Sturtevant, Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetric enthalpies, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 (12) (1995) 5597–5599.
- [136] N. Poklar, G. Vesnaver, Thermal denaturation of proteins studied by UV spectroscopy, *J. Chem. Educ.* 77 (3) (2000) 380–382.
- [137] R. Singh, M.I. Hassan, A. Islam, F. Ahmad, Cooperative unfolding of residual structure in heat denatured proteins by urea and guanidinium chloride, *PLoS One.* 10 (6) (2015) 1-16.
- [138] P.L. Privalov, N.N. Khechinashvili, A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: A calorimetric study, *J. Mol. Biol.* 86 (3) (1974) 665–684.
- [139] J.A. Schellman, Fifty years of solvent denaturation, *Biophys. Chem.* 96 (2) (2002) 91–101.
- [140] J.A. Schellman, Protein stability in mixed solvents: a balance of contact interaction and excluded volume, *Biophys. J.* 85 (1) (2003) 108–125.
- [141] J.K. Myers, C.N. Pace, J.M. Scholtz, Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding, *Protein Sci.* 4 (10) (1995) 2138-2148.

- [142] R.F. Greene, C.N. Pace, Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, α -chymotrypsin, and β -lactoglobulin, *J. Biol. Chem.* 249 (17) (1974) 5388–5393.
- [143] Z. Zhang, S. Witham, E. Alexov, On the role of electrostatics on protein-protein interactions, *Phys. Biol.* 8 (3) (2011) 1-10.
- [144] H. Goshima, K.M. Stevens, M. Liu, K.K. Qian, M. Tyagi, M.T. Cicerone, M.J. Pikal, Addition of monovalent electrolytes to improve storage stability of freeze-dried protein formulations, *J. Pharm. Sci.* 105 (2) (2016) 530–541.
- [145] L. Pradeep, J. Udgaonkar, Differential salt-induced stabilization of structure in the initial folding intermediate ensemble of barstar, *J. Mol. Biol.* 324 (2) (2002) 331–347.
- [146] A. Pica, G. Graziano, On the effect of sodium chloride and sodium sulfate on cold denaturation, *PLoS One.* 10 (7) (2015) 1-13.
- [147] Y. Goto, N. Ichimura, K. Hamaguchi, Effects of ammonium sulfate on the unfolding and refolding of the variable and constant fragments of an immunoglobulin light chain, *Biochemistry.* 27 (5) (1988) 1670–1677.
- [148] C. Mitchinson, R.H. Pain, Effects of sulphate and urea on the stability and reversible unfolding of beta-lactamase from staphylococcus aureus. Implications for the folding pathway of beta-lactamase, *J. Mol. Biol.* 184 (2) (1985) 331–342.
- [149] N. Matubayasi, K. Yamamoto, S.I. Yamaguchi, H. Matsuo, N. Ikeda, Thermodynamic quantities of surface formation of aqueous electrolyte solutions: III. aqueous solutions of alkali metal chloride, *J. Colloid Interface Sci.* 214 (1) (1999) 101–105.
- [150] K. Johansson, J.C. Eriksson, γ and $d\gamma/dT$ measurements on aqueous solutions of 1,1-electrolytes, *J. Colloid Interface Sci.* 49 (3) (1974) 469–480.

- [151] P.K. Weissenborn, R.J. Pugh, Surface tension of aqueous solutions of electrolytes: relationship with ion hydration, oxygen solubility, and bubble coalescence, *J. Colloid Interface Sci.* 184 (2) (1996) 550–563.
- [152] L.M. Pegram, M.T. Record, Hofmeister salt effects on surface tension arise from partitioning of anions and cations between bulk water and the air–water interface, *J. Phys. Chem. B.* 111 (19) (2007) 5411–5417.
- [153] R. Tuckermann, Surface tension of aqueous solutions of water-soluble organic and inorganic compounds, *Atmos. Environ.* 41 (29) (2007) 6265–6275.
- [154] N. Matubayasi, K. Takayama, T. Ohata, Thermodynamic quantities of surface formation of aqueous electrolyte solutions: IX. Aqueous solutions of ammonium salts, *J. Colloid Interface Sci.* 344 (1) (2010) 209–213.
- [155] B.C. Tripp, J.J. Magda, J.D. Andrade, Adsorption of globular proteins at the air/water interface as measured via dynamic surface tension: concentration dependence, mass-transfer considerations, and adsorption kinetics, *J. Colloid Interface Sci.* 173 (1) (1995) 16–27.
- [156] A.P. Santos, A. Diehl, Y. Levin, Surface tensions, surface potentials, and the Hofmeister series of electrolyte solutions, *Langmuir.* 26 (13) (2010) 10778–10783.
- [157] J.M. Gómez, V.P. Henestrosa, C.C. Sánchez, J.M. Patino, The role of static and dynamic characteristics of diglycerol esters and β -lactoglobulin mixed films foaming. 1. Dynamic phenomena at the air–water interface, *Food Hydrocoll.* 22 (7) (2008) 1105–1116.
- [158] V.P. Henestrosa, C.C. Sánchez, M.M Escobar, J.P. Jiménez, F.M. Rodríguez, J.M. Patino, Interfacial and foaming characteristics of soy globulins as a function of pH and ionic strength, *Colloids Surf A Physicochem. Eng. Asp.* 309 (3) (2007) 202–215.

- [159] E.M. Hernández, E.I. Franses, Adsorption and surface tension of fibrinogen at the air/water interface, *Colloids Surf A Physicochem. Eng. Asp.* 214 (3) (2003) 249–262.
- [160] F.J. Millero, The apparent and partial molal volume of aqueous sodium chloride solutions at various temperatures, *J. Phys. Chem.* 74 (2) (1970) 356–362.
- [161] L.A. Dunn, Apparent molar volumes of electrolytes. Part 2. Some 1–1 electrolytes in aqueous solution at 25°C, *Trans. Faraday Soc.* 64 (1) (1968) 1898–1903.
- [162] F.J. Millero, W. Hansen, Apparent molal volumes of aqueous monovalent salt solutions at various temperatures, *J. Chem. Eng. Data.* 13 (3) (1968) 330–333.
- [163] A. Roux, G.M. Musbally, G. Perron, J.E. Desnoyers, P.P. Singh, E.M. Woolley, L.G. Hepler, Apparent molal heat capacities and volumes of aqueous electrolytes at 25 °C: NaClO₃, NaClO₄, NaNO₃, NaBrO₃, NaIO₃, KClO₃, KBrO₃, KIO₃, NH₄NO₃, NH₄Cl, and NH₄ClO₄, *Can. J. Chem.* 56 (1) (1978) 24–28.
- [164] S.L. Clegg, A.S. Wexler, Densities and apparent molar volumes of atmospherically important electrolyte solutions. The solutes H₂SO₄, HNO₃, HCl, Na₂SO₄, NaNO₃, NaCl, (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, and NH₄Cl from 0 to 50 °C, including extrapolations to very low temperature and to the pure liquid state, and NaHSO₄, NaOH, and NH₃ at 25 °C, *J. Phys. Chem. A.* 115 (15) (2011) 3393–3460.
- [165] W.J. Hamer, Y. Wu, Osmotic coefficients and mean activity coefficients of univalent electrolytes in water at 25°C, *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 1 (4) (2009) 1047.
- [166] J.I. Partanen, Mean activity coefficients and osmotic coefficients in dilute aqueous sodium or potassium chloride solutions at temperatures from (0 to 70) °C, *J. Chem. Eng. Data.* 61 (1) (2016) 286–306.
- [167] A.S. Brown, D.A. MacInnes, The determination of activity coefficients from the potentials of concentration cells with transference. I. Sodium chloride at 25°, *J. Am. Chem. Soc.* 57 (7) (1935) 1356–1362.

- [168] T. Shedlovsky, D.A. MacInnes, The determination of activity coefficients from the potentials of concentration cells with transference. III. Potassium chloride. IV. Calcium chloride, *J. Am. Chem. Soc.* 59 (3) (1937) 503–506.
- [169] H.M. Spencer, The activity coefficients of potassium chloride. An application of the extended Debye-Hückel theory to interpretation of freezing point measurements, *J. Am. Chem. Soc.* 54 (12) (1932) 4490–4497.
- [170] S.L. Clegg, S. Milioto, D.A. Palmer, Osmotic and activity coefficients of aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as a function of temperature, and aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - H_2SO_4 mixtures at 298.15 K and 323.15 K, *J. Chem. Eng. Data.* 41 (3) (1996) 455–467.
- [171] R. Bhat, S.N. Timasheff, Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols, *Protein Sci.* 1 (9) (1992) 1133–1143.
- [172] G. Xie, S.N. Timasheff, Mechanism of the stabilization of ribonuclease A by sorbitol: preferential hydration is greater for the denatured than for the native protein, *Protein Sci.* 6 (1) (1997) 211–221.
- [173] K. Gekko, S.N. Timasheff, Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures, *Biochemistry.* 20 (16) (1981) 4667–4676.