

Series liotrópicas en la Química Macromolecular

Borja Fernández-d'Arlas

Resumen: El estudio de la influencia de la interacción de distintos iones con las macromoléculas puede considerarse en un terreno a medio camino entre la Química Orgánica e Inorgánica. Tal vez por esta razón sea difícil encontrar introducciones a la fenomenología tanto en manuales de la una como de la otra. A más de un siglo después de la publicación por Leweyt y Hofmeister del primer estudio sistemático de la acción de distintas sales sobre disoluciones proteicas, aun hoy la fenomenología sigue sin ser completamente comprendida. Este artículo es una introducción a las series liotrópicas, las aproximaciones existentes para su explicación y a algunas de sus implicaciones fundamentales.

Palabras clave: Series de Hofmeister, serie liotrópica, caótopos, cosmótopos, macromoléculas.

Abstract: The study of the influence of the interaction between ions and macromolecules could be considered in a halfway from the Organic Chemistry and Inorganic Chemistry. That might be the reason why it is difficult to find introductions to the phenomenology in manuals of either field. After more than a century after the publication by Leweyt and Hofmeister of the first systematic study of the influence of different salts on proteins solutions, the phenomenology is still not completely understood. This article is an introduction to the effects of the lyotropic series, the existence approximations to explain them and some of their fundamental implications.

Keywords: Hofmeister series, lyotropic series, chaotrope, kosmotrope, macromolecules.

INTRODUCCIÓN

El efecto de los iones sobre las macromoléculas es de una gran relevancia en un diverso número de disciplinas científicas. La combinación de disoluciones salinas con disoluciones de macromoléculas ha venido siendo empleada tradicionalmente en la separación y cristalización de proteínas.^[1,2] Sin embargo, este casamiento entre iones y macromoléculas comprende un mucho mayor número de fenómenos y sistemas de gran relevancia práctica, y en principio tan dispares, como la efectividad de un surfactante, la calidad del suelo y crecimiento de las plantas, purificación de proteínas, la estabilidad de un anticuerpo en disolución, el sistema nervioso, la digestibilidad, o el procesado de la seda de araña. En la Figura 1a-f se presenta la desnaturalización de las proteínas del huevo, sin aceite ni temperatura, mediante la adición de una solución concentrada ($420 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) de sulfato sódico (Na_2SO_4). La experiencia realizada con NaCl da lugar al mismo efecto pero con una cinética mucho más lenta y una coagulación más incompleta. En la Figura 1g-h se muestran dos viales con

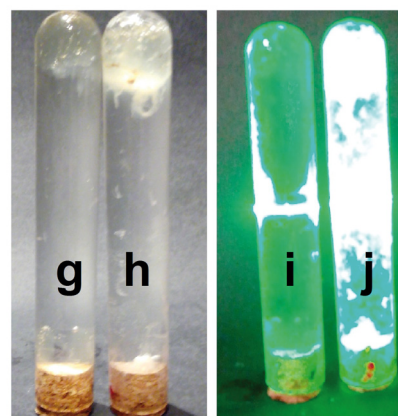
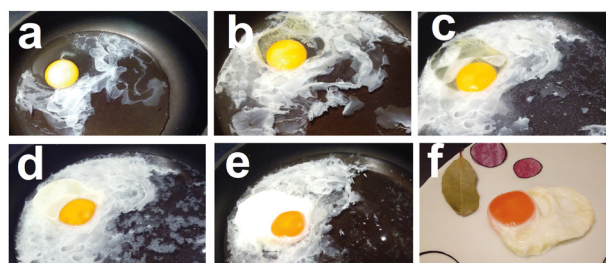


Figura 1. Efectos de sales sobre las proteínas del huevo. Adición de una solución acuosa de $420 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Na_2SO_4 sobre un huevo a distintos tiempos a) inmediatamente, b) 1 min, c) 20 min, d) 7h, e) 24h y f) "emplatado". g,h) disoluciones de 1 g de clara y $250 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl y Na_2SO_4 , respectivamente. i,j) Igual que (g,h) pero con iluminación láser (imágenes del autor)



Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (POLYMAT), Dep. Ciencia y Tecnología de Polímeros, Facultad de Ciencias Químicas de San Sebastián. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), 20018-Donostia-San Sebastián, España.
C-e: borja.fernandezdarlas@ehu.es

B. Fernández-d'Arlas

Recibido: 21/08/2015. Aceptado: 01/06/2016.

1 g de clara de huevo y 12 g de disolución de $\sim 250 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl y Na_2SO_4 , respectivamente. Se observa que el Na_2SO_4 es mucho más efectivo en expulsar la proteína de la disolución, la cual se acumula como un sobrenadante. Asimismo

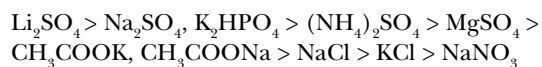
en las Figuras 1i-j se aprecia como la disolución con Na₂SO₄ es capaz de dispersar más la luz de un puntero láser que la disolución con NaCl, la cual genera una dispersión menor. La mayor dispersión de la disolución con Na₂SO₄ se puede asociar con la generación de asociados proteicos más ordenados entre sí capaces de dispersar la luz incidente.

El efecto de los distintos iones sobre el orden o estructura de las macromoléculas ha dado lugar a su ordenamiento según distintas series liotrópicas (del latín "lyo", significando desleír o disolver y "tropos", τροπος, del griego, significando tendencia).^[3,4]

Aunque las propiedades, tales como la viscosidad, de las disoluciones acuosas de distintas sales ya habían sido analizada por Poiseuille,^[5] y el efecto de las sales, álcalis y ácidos sobre la coagulación de la albúmina^[6,7] o gelatina^[8] y otras proteínas^[9] se conocía de anterioridad,^[10] se considera a S. Lewit (alumno) y Franz Hofmeister (profesor) como los primeros en publicar un estudio sistemático sobre la acción de distintas familias de sales sobre disoluciones de proteínas.^[11]

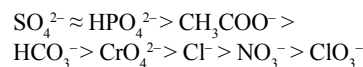
SERIES LIOTRÓPICAS DE HOFMEISTER

El estudio del comportamiento físico-químico de distintas proteínas en medio acuoso en presencia de distintas sales, hizo al químico fisiológico checo Franz Hofmeister establecer relaciones entre su carácter precipitante-disolvente, su asociación con el agua, la presión osmótica y otros fenómenos físico-químicos.^[12,13,14,15] Para clasificar las sales en función de su carácter precipitante de la clara de huevo, Hofmeister y sus colaboradores realizaron distintas adaptaciones de dos metodologías: en la primera la concentración de la proteína se mantenía constante y se añadía sal hasta observar precipitación proteica (Tabla 1). El segundo método consistía en mantener la concentración de sal constante e incrementar la concentración de la proteína hasta dar lugar a su precipitación. Mediante la primera metodología Hofmeister observó que el carácter precipitante de distintas sales seguía la siguiente tendencia:

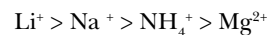


La relación anterior clasifica el efecto de la sal, pero no de los iones independientes. Para determinar la influencia de la naturaleza del catión es necesario realizar experimentos con sales que compartan el mismo anión como Li₂SO₄, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, o MgSO₄. De esta manera Hofmeister ordenó las sales según el ión que compartían y los clasificó según su carácter precipitante tal y como se muestra en la Tabla 1.^[12,16] De la misma manera la comparación de sales con el mismo catión como por ejemplo Na₂SO₄, NaCl, NaNO₃ o NaClO₃, debería permitir evaluar la acción relativa de los distintos aniones sobre la capacidad coagulante o solubilizante. De esta manera Hofmeister clasificó los aniones de distintas sales sódicas según su capacidad

precipitante de las proteínas de la clara de huevo, de la siguiente manera:



De manera análoga a los aniones, mediante la comparación de distintas sales de sulfatos Hofmeister también ordenó los cationes (Tabla 1) según su poder coagulante:



Otras series de afinidad iónica, pero que no tienen que ver con la coagulación o solubilización macromolecular, comprenden las obtenidas por Zarinski^[17] para ciertos oxianiones en cuanto a la capacidad de la eliminación de oxígeno en presencia de sales carboxílicas de tioureas, a lo largo de medidas ionométricas-potenciométricas:

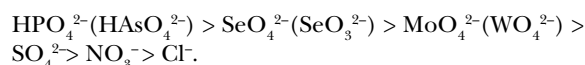


Tabla 1. Cantidad necesaria de distintas sales (g en 100 mL) para la precipitación de la clara de huevo, según Hofmeister.^[12,16]

	Litio Li ⁺	Sodio Na ⁺	Potasio K ⁺	Amonio NH ₄ ⁺	Magnesio Mg ²⁺
Sulfatos SO ₄ ²⁻	8,61	11,39	x	13,39	15,93
Fosfatos PO ₄ ³⁻	–	11,69	13,99	16,57	–
Acetatos CH ₃ COO ⁻	–	13,83	16,38	x	x
Citratos C ₃ H ₅ O(COO) ₃ ³⁻	–	14,42	17,07	21,99	–
Tartratos C ₄ H ₄ O ₂ (COO) ₂ ²⁻	–	15,11	17,08	25,05	–
Bicarbonatos HCO ₃ ²⁻	–	x	25,37	–	–
Cromatos CrO ₄ ²⁺	–	21,22	25,59	x	–
Cloruros Cl ⁻	ψ	21,21	26,28	x	x
Nitratos NO ₃ ⁻	ψ	46,10	x	x	x
Cloratos ClO ₄ ⁻	–	–	x	–	–

x: No precipita; ψ: Altera la proteína (según Hofmeister).

Series inversas

Cabe mencionar que experimentos llevados a cabo por Klobusitzky^[18] pusieron de manifiesto que el orden de la capacidad precipitante de los aniones puede alterarse en función del contra catión de la sal. Así por ejemplo estudiando la velocidad de precipitación de corpúsculos de sangre canina, observo que la fuerza precipitante seguía

el orden $\text{SO}_4^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^-$ cuando se empleaban sales potásicas, mientras que cuando se empleaban sales sódicas el orden era $\text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{SO}_4^-$. Han sido numerosas las investigaciones que han mostrado distintos comportamientos de los cationes y aniones sobre distintas proteínas en diversas condiciones.^[19,20]

Asimismo algunos estudios han determinado que el orden de la serie de Hofmeister en referencia con la capacidad coagulante, puede invertirse cuando el pH es inferior al punto isoeléctrico, pI, de la proteína en cuestión,^[21,22] es decir cuando la carga neta de la proteína es positiva. Experimentos que confirman la tendencia inversa han sido llevados a cabo con lisozima (pI = 10-11).^[23,24,25] En este punto hay que recordar que Hofmeister empleó la clara de huevo para estudiar la precipitación de la ovoalbúmina, con pI = 4,5-5,1, por debajo del pH del agua destilada común, es decir que seguramente en sus experimentos se cumplía que $\text{pH} > \text{pI}$. Hay que recordar que en la época en la que Lewit y Hofmeister presentaron sus resultados (1887), el concepto de pH no estaba aún introducido por Sørensen (1909).^[26]

Otro ejemplo de la inversión de la serie de Hofmeister es el investigado por Medda y col. en el que investigaron la agregación de la hemoglobina (pI = 7,1 ± 0,3) y observaron una capacidad de coagulación de los aniones que seguía la serie inversa de Hofmeister a $\text{pH} < 9$, según $\text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$, para los aniones (sales sódicas) y de $\text{Rb}^+ > \text{K}^+ \sim \text{Na}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+$ para los cationes (cloruros).^[27] Asimismo L. Zhang y col. investigando el efecto de la solubilidad de un anticuerpo proteico han determinado una notable dependencia del orden de la serie iónica en función de la proximidad al pI de anticuerpo.^[28]

Según algunos experimentos otro factor que parece influir en el orden de la serie es la concentración de la sal. Y. Zhang y col., estudiando la lisozima determinaron que a bajas concentraciones de sal ($\leq 0,3$ M) se seguía una serie tipo inversa ($\text{ClO}_4^- > \text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$) en cuanto a la temperatura de nube y a altas concentraciones ($\geq 0,3$ M) una serie de tipo Hofmeister ($\text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{ClO}_4^- > \text{I}^- > \text{SCN}^-$).^[29] Sin embargo, no únicamente los efectos ión-contra ión parecen condicionar el orden de la serie sino también el carácter hidrófobo-hidrófilo de la superficie del soluto.^[30]

MODELO DE ORDEN Y DESORDEN DEL AGUA

Los fenómenos de estabilización o desestabilización de las proteínas en medio acuoso en presencia de distintos electrolitos han sido descritos tradicionalmente mediante la capacidad de los mismos para interactuar con el agua alterando su estructura.^[19,31] Según este modelo, a los iones cuya interacción con el agua es mayor que la del agua entre sí se les denomina iones *cosmotrópicos* (del griego “kosmos”, *κόσμος*, significando armonía; y “tropos”, *τρόπος*, significando tendencia), o estructurantes ya que favorecen la red de enlaces de hidrógeno en el agua y que normalmente estabilizan las proteínas o las hacen coagu-

lar si están en disolución. A los iones que interactúan desfavorablemente con el agua se les denomina iones *caotrópicos* (del griego “caos”, *χαος*, significando desorden) ya que inducen desorden en la estructura tridimensional del agua cercana a los iones y tienden a disolver o desnaturar las proteínas u otros solutos.^[32] Una forma de clasificar a los iones y cuantificar su carácter caotrópico/cosmotrópico es mediante su coeficiente *B* de la ecuación de Jones-Dole^[33] para la viscosidad:

$$\eta/\eta_0 = 1 + A \cdot c^{1/2} + B \cdot c \quad (1)$$

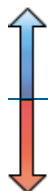
donde η es la viscosidad de la disolución diluida de concentración *c*, y η_0 es la viscosidad del agua pura; *A* es un coeficiente electrostático que define la interacción soluto-soluto, cercano a 1 para disoluciones diluidas, y *B* es un coeficiente que depende de la interacción agua-soluto. Experimentalmente se observa que la adición de pequeñas fracciones de algunos solutos al agua desemboca en un aumento de la viscosidad ($\eta > \eta_0$) mientras la adición de otros da lugar a una disminución de esta propiedad ($\eta < \eta_0$). El hecho que un soluto de lugar a una disminución de la viscosidad, y por ende posea un $B < 0$, supone que bien el catión o el anión, o ambos, proporcionan un entorno químico que da lugar a un fluidificación. Tal como expresaron Cox y Wolfenden en 1934, esto podría explicarse si en estos casos es el agua desarrollara una “despolimerización”.^[34] Debido a las diferencias observadas entre sales que compartían bien el anión o el catión se convirtió en un reto el conocer la contribución de cada ión.

La obtención de los coeficientes *B* para cada especie iónica (Tabla 2) supuso, de hecho, un controvertido reto intelectual. Una solución vino del estudio del soluto KCl, con $B \approx 0$ (-0,0140). Existían dos posibilidades para asignar la contribución de cada ión: que la contribución de uno anulara a la del otro, o que la contribución de cada catión fuese también cercana a cero. A partir de datos de movilidad electroforética se determinó que efectivamente ambos iones tienen un comportamiento semejante, por lo que en realidad la contribución de cada ión a la viscosidad es muy pequeña y cercana a cero.^[35] La contribución tanto de K^+ como Cl^- sería muy parecida y por lo tanto la mitad de la sal KCl, es decir de -0,007 por cada ión. A partir de este valor la deducción de la contribución del resto de iones es inmediata.

Coefficientes $B > 0$ son característicos de iones cosmotrópicos que interactúan fuertemente con el agua, desarrollando una esfera de hidratación y, según este modelo, reforzando los enlaces de hidrógeno entre el agua, lo cual da lugar a un aumento de la viscosidad. Por el contrario los iones con $B < 0$, interactúan débilmente con el agua, y según este modelo tienen carácter caotrópico, favoreciendo el desorden de la red tridimensional de enlaces de hidrógeno del agua y disminuyendo la viscosidad.^[36,37] Coeficientes cercanos a cero sugieren un comportamiento ideal en el que no existen interacciones preferenciales entre iones o de estos con el agua.^[19,37] En la Figura 2a se representa la

Tabla 2. Coeficientes B ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$) de viscosidad Jones-Dole.^[41,42] y su carácter cosmo-caotrópico en función de su interacción con el agua.

Carácter	Cationes	B	Aniones	B
Cosmotrópico	Mg^{2+}	0,385	PO_4^{3-}	0,59
	Ca^{2+}	0,285	CH_3COO^-	0,25
	Ba^{2+}	0,22	SO_4^{2-}	0,208
	Li^+	0,150	F^-	0,10
	Na^+	0,086	HCOO^-	0,052
Iones hidratados	K^+	-0,007	Cl^-	-0,007
	NH_4^+	-0,007	Br^-	-0,032
	Rb^+	-0,030	NO_3^-	-0,046
	Cs^+	-0,045	ClO_4^-	-0,061
			I^-	-0,068
Iones poco hidratados			SCN^-	-0,103



entropía de hidratación, relacionada con el agua estructural de las capas externas, según el modelo de Marcus,^[38,39] de distintos iones en función de B .^[40]

Se observa una relación lineal para distintas familias de iones. En el caso de los cationes, los más cosmotrópicos son aquellos que más arriba se encuentran en el grupo químico.

Existen diversas propuestas para explicar el mecanismo estabilizante o desnaturalizante de los iones sobre sistemas agua-proteína, en base a su carácter cosmotrópico o caotrópico. La más habitual es la que considera el efecto de la inclusión de iones en la tercera capa de hidratación, lo cual modula la interacción de la segunda capa de agua de hidratación sobre la primera. La Figura 2b representa el caso en el que un cosmotropo genera “orden” en el agua, prevaleciendo las interacciones cosmotropo-agua y por lo tanto minimizando la hidratación de la proteína, aquí representada en marrón, y evitando su disolución o *estabilizándola*. La Figura 2c representa el caso normal en el que en ausencia de iones el agua interactúa con el soluto. La Figura 2d ilustra el caso en el que un caotropo interactúa pobremente con el agua y favorece que ésta interactúe con la proteína favoreciendo su hidratación y por lo tanto su desestabilización o *desnaturalización*.^[37]

Actualmente, tras varias evidencias experimentales, se considera que la influencia de los iones sobre la estructura del agua no va más allá de las primeras capas de hidratación, teniendo un impacto mínimo sobre la estructura en el seno.^[43,44] Además, pese a que el parámetro B , pareciera coincidir límpidamente con las series de Hofmeister, en algunos casos como se ha comentado arriba en la sección “Series inversas”, el comportamiento de ciertas macromoléculas en ciertas condiciones puede ser opuesto al predicho según el valor de B . Es por ello que a pesar de ser útil para cuantificar en cierto grado la interacción ión-agua, no es totalmente adecuado para predecir el comportamiento de ciertas proteínas bajo ciertas condiciones de pH, temperatura, etc.

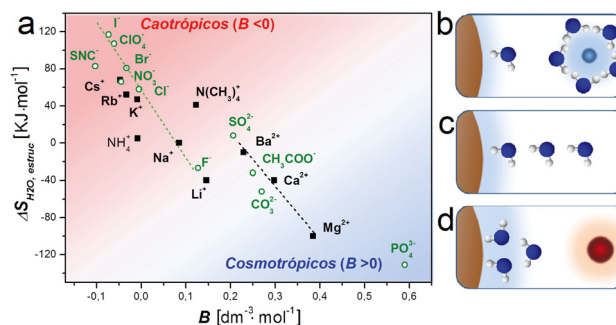


Figura 2. Caotropicidad de los iones en función de su grado de hidratación. a) Entropía de hidratación (según Marcus) en función del parámetro B .^[38,39,40] b) Efecto de un ión cosmotropo sobre la hidratación de un soluto. c) Hidratación normal condicionada por la “estructuración del agua”. d) Efecto de un ión caotropo sobre la hidratación de un soluto.^[37]

Interacciones ión-soluto

El modelo de la modificación de la estructura del agua por los iones no considera las interacciones ión-soluto.

Sin embargo, estudios realizados con proteínas en disoluciones a distintos pH (por encima y por debajo de su punto isoelectrico) sugieren que las interacciones ión-soluto son de gran importancia. Esto es así debido a la presencia de grupos con carácter ácido-base en algunos aminoácidos que se cargan positivamente (Lisina, Histidina, Arginina) y otros negativamente (Asparagina, y Glutamina) así como a interacciones de tipo hidrofóbico, promovidas por la naturaleza del ión (polarizabilidad, densidad de carga, etc.) o del soluto.^[30] Algunas consecuencias pueden ser, como se ha mencionado más arriba, la inversión de la serie de Hofmeister en la capacidad coagulante de una proteína en disolución. Estudios realizados mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y simulaciones de interacciones iónicas con péptidos modelo con distintas terminaciones (N terminal, $-\text{NH}_3^+$, o C terminal, $-\text{COO}^-$), han concluido que la naturaleza del péptido influye notablemente en el ordenamiento de la serie, y que por lo tanto la solubilidad o estabilidad de una proteína no depende únicamente del “orden” o “desorden” del agua generado por los iones.^[45] Asimismo Katime y col.^[46] han estudiado las interacciones entre la lisozima e iones de cobre (Cu^{2+}). Observaron que al añadir concentraciones crecientes de iones de Cu^{2+} a la disolución con lisozima el volumen total de la disolución aumentaba, mientras que al añadir cobre al agua el volumen disminuía. Estos fenómenos podrían explicarse por una fuerte interacción entre el Cu^{2+} y las proteínas, la cual cambiaba la conformación de esta y desplazaba el agua de hidratación hacia el seno del disolvente.

APROXIMACIONES SEMIEMPÍRICAS

Algunas aproximaciones teóricas para la explicación del efecto de la naturaleza del ión sobre la estructura del agua y de ésta sobre las proteínas se basan en el estudio de los pares de iones que conforman las distintas sales. Así, por

ejemplo, Collins^[37] se ha fijado en la relación entre el carácter caotrópico/cosmotrópico de distintos iones en base a la diferencia de entalpías de solución cuando ciertos iones son combinados con distintos contraiones. De esta manera se dio cuenta que la disolución de las sales formadas con iones con similar carácter cao/cosmotrópico requería calor (proceso endotérmico) mientras que las sales formadas por iones con carácter distinto (ej.: anión cosmotrópico-catión caotrópico) liberaban calor tras su disolución (proceso exotérmico).

Para clasificar las sales Collins las ordenó según su capacidad de hidratarse, en base a los trabajos de Morris^[47,48] y Fajans,^[49,50] de acuerdo con la diferencia de entalpías de hidratación de los iones constituyentes, tal y como se presenta en la Figura 3a. De esta manera observó que la diferencia entre las entalpías de hidratación de aniones y cationes caotrópicos son mucho menores que las de cualquier otra combinación (caotrópico-cosmotrópico, cosmotrópico-cosmotrópico o cosmotrópico-caotrópico). Ello ha dado

lugar al denominado modelo de *Afinidades al Agua Equivalentes* (AAE). Este modelo predice que las interacciones interiónicas se darán preferentemente entre iones de radio similar, y por lo tanto que la mayor solvatación del agua se dará con sales cuyos iones tengan la mayor diferencia del radio iónico (o densidad de carga), es decir generalmente aquellos cuyos cationes son cosmotrópicos y cuyos aniones son caotrópicos (Figura 3b). La observación de Collins sobre la relación entre las entalpías de solución e hidratación de los iones y su carácter cosmo-caotrópico tiene cierta consistencia teórica por ser soportada por el modelo de Born-Landé-Ephraim-Fajans,^[51,52] que relaciona la entalpía de solubilización, ΔH_s^0 , con los radios de los iones:

$$\Delta H_s^0 = -N \left(\frac{eZ_+^2}{2r_+} + \frac{eZ_-^2}{2r_-} \right) \left(1 - \frac{1}{D} \right) + \frac{NAe^2 Z_+ Z_-}{r_+ + r_-} \left(1 - \frac{1}{n} \right) \quad (2)$$

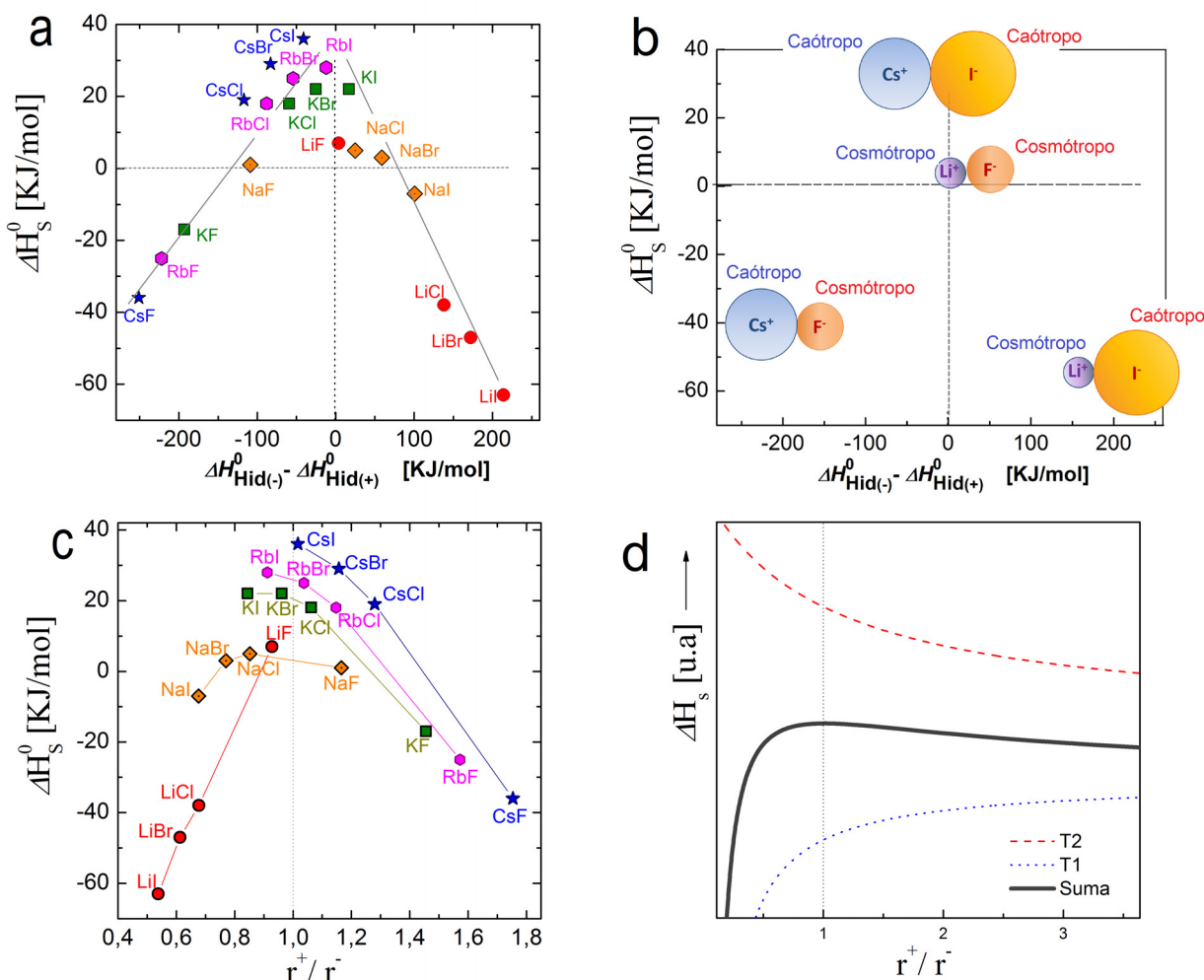


Figura 3. Modelo de afinidades al agua equivalentes (AAE). a) Entalpía de solubilización de distintas sales en función de la diferencia de entalpías de hidratación de sus aniones.^[47-51] b) Modelo de esferas según Collins en el que los iones son agrupados ordenados según su carácter cao-cosmotrópico.^[19,37] c) Entalpías de disolución de distintas sales en función del ratio entre el radio catiónico y aniónico de sus iones. d) Representación del modelo Born-Landé-Ephraim-Fajans (ec. 2) en la que se indica la contribución del primer término (puntos) relacionado con la entalpía de disolución de los iones y del segundo (rayas), relacionado con la energía reticular, a la entalpía de disolución en función del ratio entre el radio catiónico y aniónico^[51]

siendo N es en número de Avogadro, e la carga del electrón, Z_+ y Z_- las cargas del catión y anión, respectivamente, r_+ y r_- los radios iónicos del catión y anión, respectivamente, D la constante dieléctrica del medio, A la constante estructural de Madelung, y n el coeficiente de Born. Esta ecuación resulta de la suma de dos términos, uno correspondiente a las entalpías de solvatación del catión y del anión, y otro a la entalpía de formación de la red cristalina o energía reticular, según Born-Landé. Para ver una deducción de la ecuación (2) se remite a la ref. [51]. En la Figura 3c se representan los valores de ΔH_s^0 de distintas sales en función del ratio entre el radio del catión y del anión, según los valores efectivos de Born. [51-54] Como puede observarse la entalpía de disolución crece cuanto más parecidos son los radios iónicos, es decir cuando $r_+/r_- \approx 1$. Es fácil comprobar que la ecuación (2) tienen también un máximo cuando $r_+/r_- = 1$. En la Figura 3d se ha representado esta función normalizada respecto a eN , considerando $A = 2$, [55] y que los factores $(1-1/D)$ y $(1-1/n)$ son equivalentes a 1. [56] En la Figura 3d además, se han dibujado las curvas correspondientes al primer término (puntos) y al segundo término (rayas). Mientras que las entalpías de solvatación crecen asintóticamente con r_+/r_- la energía reticular decrece de la misma manera sumando ambas curvas un resultante con un máximo en $r_+/r_- = 1$. Aunque esta ecuación no proporciona valores teóricos que concuerdan con los experimentales, si ayuda a comprender la influencia de los ratios relativos entre radios iónicos.

La explicación de Collins a los fenómenos cao-cosmótrópicos introduce también el concepto de interacción ión-soluto, puesto que los solutos tales como proteínas pueden considerarse moléculas con segmentos polares parcialmente cargados ($-\text{COO}^-$ o R_4N^+), alternados con segmentos no-polares, que pueden considerarse como iones con una bajísima densidad de carga. Teniendo en cuenta que los caótrópicos tienden asociarse con los caótrópicos y los cosmótrópicos con los cosmótrópicos, la regla AAE explica el comportamiento de muchas proteínas en solución. Atribuyendo a los aminoácidos que se cargan positivamente (Lis, His, Arg) un carácter análogo al grupo amonio NH_4^+ ($B = -0,007$), es decir relativamente caótrópico, estos grupos interactuarán mejor con iones caótrópicos, según $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$. Los grupos cargados negativamente (Asp y Glu) se pueden considerar cosmótrópicos al compararlos con el CH_3COO^- ($B = 0,236$), por lo que a estos grupos se asociarán cationes cosmótrópicos según $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$, [57] es decir, mejor interacción con los cationes fuertemente hidratados. Comparando acetatos de litios, sodio y potasio, mediante espectroscopía de estructura fina de absorción de rayos-X, Uejio y col. [58] han comprobado la afinidad de unión de estos cationes a los carboxilatos predicha por la AAE. También Kherb y col. [59] han obtenido evidencias de que efectivamente, los cationes más hidratados se unen fuertemente a los carboxilatos.

En-salado y ex-salado

Al igual que el efecto solvente-precipitante ejercido por ciertos solutos iónicos sobre otros co-solutos polares u iónicos, experimentalmente se obtiene el mismo efecto sobre la solubilidad de algunas macromoléculas (fundamentalmente estudiado con proteínas) [7,60,61] al variar la concentración de la sal iónica. A bajas concentraciones de sal se puede observar que la adición de la sal favorece la solubilidad de la proteína, lo cual puede denominarse efecto “en-salado” (ing.: *salting-in*), haciendo referencia a que la proteína “entra” en la solución. Por el contrario, a altas concentraciones salinas se obtienen un efecto de “expulsión” de la proteína de la solución o de “ex-salado” (ing.: *salting-out*; fr. *Relargage*; pt.: *Relargagem*;) (Figura 4).

Se le atribuye a Setschenow [62] (1892) el primer intento de describir de manera semiempírica la variación de la solubilidad de los gases en disoluciones con salinidad creciente de la siguiente manera:

$$\ln S = \ln S_0 + kC \quad (3)$$

donde S_0 representa la solubilidad del en agua, S la solubilidad en presencia del electrolito, C la concentración del electrolito y k un constante dependiente de la naturaleza del electrolito y del gas, que si $k < 0$ disminuye la solubilidad del gas y si $k > 0$, aumenta. De las misma manera Cohn y col. utilizaron una relación similar para describir la solubilización de proteínas y aminoácidos en un soluciones de baja concentración salina. [63-66] Debye [67] estudio la actividad (léase concentración) de un no-electrolito (azúcar) en presencia de bajas concentraciones de electrolito (sal) y comprobó que también era proporcional a la concentración de la sal. Más tarde Hückel [68] incluyó en el modelo de Debye un término para describir el ex-salado de ciertos electrolitos en presencia de otros. La forma simplificada del modelo Debye-Hückel (DH) incluyendo el término de “ex-salado” es:

$$\log S = \log S_0 + \frac{0,5Z_+Z_-\sqrt{\mu}}{1+A\sqrt{\mu}} - K_{\text{ex}}\mu \quad (4)$$

donde Z_+ y Z_- son el tipo de valencia iónica, A una constante dependiente de los radios iónicos, μ la fuerza iónica y K_{ex} la constante de ex-salado. Cuando la concentración de iones es muy baja, su radio es depreciable respecto a la distancia entre ellos, y la ecuación (4) se reduce a $\log S = \log S_0 + 0,5Z_+Z_-\sqrt{\mu}$ que comprende la *ley-límite de DH*. Green ajustó a la ecuación (4) sus datos de solubilidad de la carboxi-hemoglobina en presencia de distintas sales (Figura 4a). [69] Para ello el primer paso fue determinar el coeficiente Z_+Z_- , o “valencia aparente de la proteína”, partiendo de un sistema salino con A conocida, y con poca actividad precipitante de la proteína, como el KCl. En su caso obtuvo un valor de $Z_+Z_- \approx 4$, que usó posteriormente en todos sus ajuste con todas las sales.

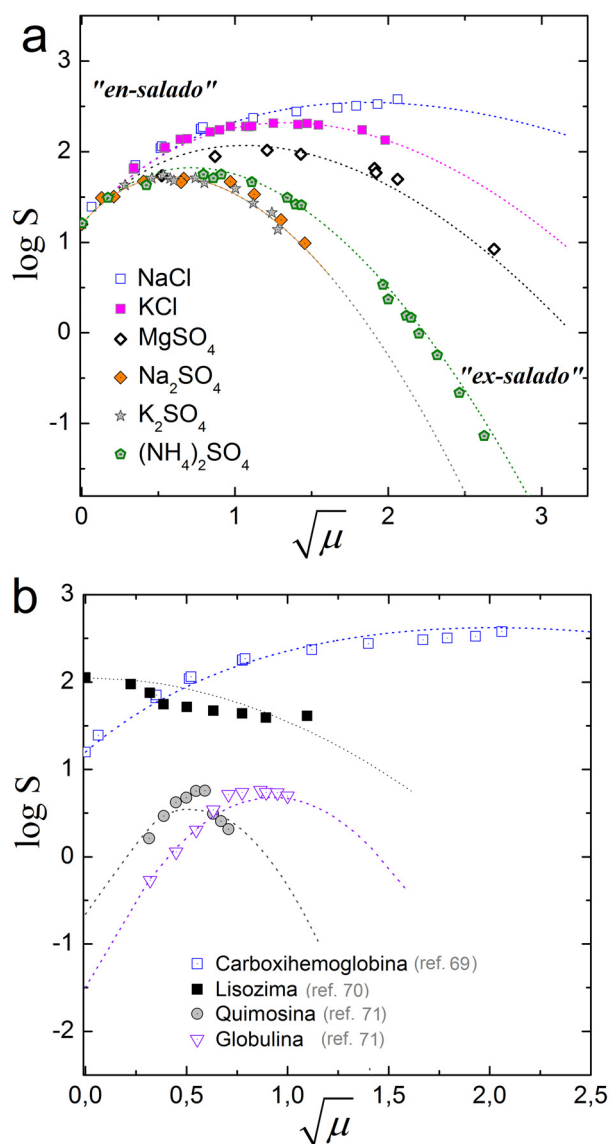


Figura 4. Acción de las sales sobre la solubilidad de las proteínas. a) Solubilidad de la carboxihemoglobina de caballo en distintas soluciones acuosas salinas con distinta concentración. Datos de Green.^[69] b) Solubilidad de distintas proteínas en soluciones acuosas de distinta concentración de NaCl. Puntos: datos experimentales.^[69,70,71] Líneas: Ajustes a la ec. 4. Los datos han sido obtenidos a pH cercanos al pI de cada proteína

Comparó este valor con el de Osborne y col.^[61] para la Edestina (una proteína globular vegetal), que estimo mucho mayor, $Z+Z- \approx 25$. Posteriormente determinó K_{ex} y una vez con este volvió a re-arreglar la ec. (4) para estimar A para cada sistema. Las curvas de puntos de la Figura 4a representan el ajuste a la ec. (4) con los datos de K_{ex} y A así obtenidos. Green también propuso una ecuación empírica que omitía el término dimensional A , reagrupando el primer término dependiente de la concentración y redujo la expresión (4) a:

$$\log S = \log S_0 + K_{en} \sqrt{C} - K_{ex} C \quad (5)$$

donde K_{en} es la constante de "en-salado". Mediante esta ecuación se puede parametrizar el comportamiento a muy bajas concentraciones ($C < 10^{-3}$ M; entonces $\sqrt{C} > C$) y determinar K_{en} , ajustando los datos a $\log S \approx \log S_0 + K_{en} \sqrt{C}$, para posteriormente ajustar los de altas concentraciones para obtener K_{ex} . Sin embargo esta ecuación puede dar errores significativos para altas fuerzas iónicas (altas concentraciones, iones multivalentes u ambas) al omitir la dependencia de K_{en} con la fuerza iónica. Lo que tiene de interesante la ecuación (5) es su carácter didáctico,^[23] al tratar de parametrizar el fenómeno de en-salado y ex-salado mediante constantes. En la ecuación (4) el primer término tiene que ver con la capacidad de la sal de solubilizar la proteína en cuestión, mientras que el segundo tiene que ver con la capacidad contraria.

En la Figura 4b se muestra la solubilidad de cuatro proteínas en diferentes medios acuosos, a pH \approx pI, con distinta proporción de NaCl, representadas en función de $\sqrt{\mu}$. Puede observarse que la liozima^[70] no presenta fenómeno de en-salado por lo cual su comportamiento se ha ajustado a un modelo de Cohn. Sin embargo tanto la quimosina como la globulina de semilla de calabaza (datos de ref.^[71]), al igual que la carboxihemoglobina, presentan un marcado comportamiento de en-salado y posteriormente de ex-salado. El comportamiento de estas proteínas se ha ajustado a la ec. (4).^[72] La Figura 4b ilustra el hecho de que en un mismo medio proteínas diferentes pueden exhibir comportamientos muy diferentes. Es de esperar que dependiendo de la proporción y naturaleza de los aminoácidos en la secuencia peptídica, los efectos específicos de los iones sean muy diferentes.^[73-75]

Nuevos ensayos experimentales sobre la solubilidad y precipitación de proteínas han sido reportados más recientemente para proteínas globulares,^[71] amiloides,^[76] inmunoglobulina,^[77] o la caseína.^[78]

El estudio sistemático de la ecuación (4) aplicada a macromoléculas representativas de estructura química conocida y la combinación de este modelo con otros modelos como el de Born-Landé-Ephraim-Fajans (ec. 2) y consideraciones termodinámicas como las propuestas por Record y col.,^[79] puede que nos ofrezca de un mayor significado físico de cada uno de los parámetros y ayudar a entender la fenomenología de las series liotrópicas.

Interacciones iones- cabezas de surfactantes e iones-polímeros cargados

Las combinaciones de sales con agentes surfactivos,^[80,81] y el estudio de las interfaces^[82,83] son aproximaciones interesantes por su nivel práctico y porque ayudan a comprender la fenomenología de efectos específicos de iones,^[84,85] debido a la mayor simplicidad de estas macromoléculas en comparación con las proteínas naturales. La Figura 5 muestra los radios hidrodinámicos, R_H , de los agregados de dos sistemas surfactivos con presencia

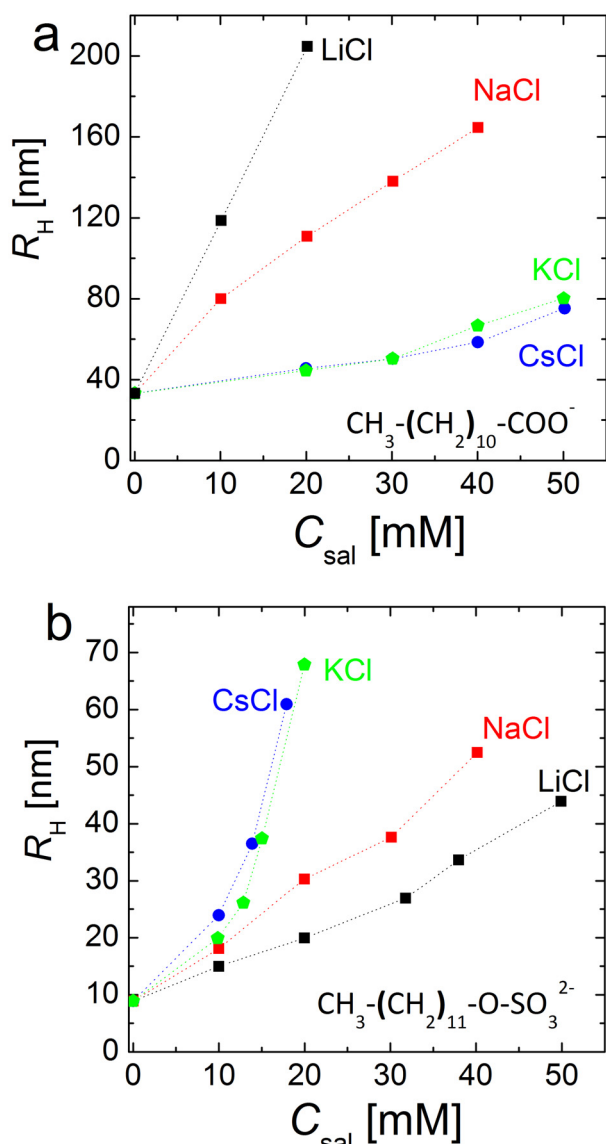


Figura 5. Influencia de la naturaleza del catión en el radio hidrodinámico de los agregados de sistemas con distintos surfactantes aniónicos. a) dodecanoato y b) dodecil sulfato^[87]

de distintas cabezas aniónicas, carboxilato (Figura 5a) y sulfato (Figura 5b), en función de la concentración de distintas sales. Puede observarse que la influencia de las sales R_H es inversa. Vlachy y col.^[80] han argumentado que los carboxilatos actúan como cosmótrofos y tienden a asociarse con los cosmótrofos como el Li^+ . Por el contrario el sulfato, con mayor carácter caótrofo, formaría pares iónicos más estables con los caótrofos como el Cs^+ . La formación de pares iónicos estables daría lugar a un mayor apantallamiento de la carga y a la formación de agregados micelares de mayor tamaño. De esta manera tras la observación de varios fenómenos específicos sobre distintos surfactantes, realización de simulaciones moleculares y medidas de radios de agregados micelares, Kunz y col.^[80,86] han deducido que la formación de pares iónicos

de acuerdo con la regla de Collins, AAE, es capaz de explicar las observaciones experimentales. La Figura 6 ilustra la ordenación de las cabezas iónicas de los surfactantes y sus contraiones en función de su naturaleza cosmo-caótrópica.^[87] La formación de pares iónicos es más probable entre contraiones colocados en los extremos de las series, con similar carácter cao-cosmotrópico.

Este orden de afinidades explica numerosos resultados como por ejemplo el hecho de que la concentración crítica micelar aumente en los surfactantes de trialquilamonio ($R^1R^2_3N^+$) cuando el bromuro (Br^-) es remplazado por el acetato (CH_3COO^-) como contraión. El alquilamonio (caótrofo) se une menos fuertemente al acetato (cosmótrofo) que al bromuro (caótrofo), por lo tanto la carga efectiva del alquilamonio en presencia del acetato es mayor, y mayor su dificultad en empaquetarse en micelas.^[86]

De esta misma manera es de esperar que en las proteínas, con grupos $RCOO^-$ (cosmótrofos) y $R^1R^2_3N^+$ (caótrofos), interactúen más favorablemente con cationes cosmótrofos y aniones caótrofos que con cationes caótrofos y aniones cosmótrofos. De esta manera también la AAE explicaría la mayor especificidad y efecto de los aniones sobre la estabilidad o solubilidad de las proteínas ya que esta predice que los aniones caótrofos, menos hidratados, interactuarán mejor con las proteínas, que los cationes cosmótrofos, fuertemente hidratados.^[88,89] Para profundizar sobre fenómenos específicos de iones individuales sobre la función celular y diversas biomacromoléculas tales como proteínas, ADN o ARN y fosfolípidos se remite a los lectores a la revisión realizada por Collins (ref.^[90]).

López-León y col. determinaron las concentraciones críticas de distintas sales sódicas para la coagulación de partículas de látex modelo, cargadas positivamente con grupos amidina, $R_1C(=NHR)NR_2^+$ y negativamente con grupos sulfato, RSO_4^- , y observaron que las tendencias seguían las series de Hofmeister inversa y directa, respectivamente. Para los látex cargados positivamente inversa en cuanto a carácter caótrópico. Sin embargo con los látex cargados negativamente observaron una estabilidad con el orden $SCN^- > NO_3^- > Cl^-$, es decir una serie directa.^[91] Nuevamente estos resultados están de acuerdo con los observados con proteínas, ya que éstas a $pH < pI$ presentan cargas predominantemente positivas y en paralelo a los látex positivos, presentan series inversas.^[23,24,25] Aunque López-León y col. no interpretaron sus resultados en función de la regla AAE, ésta predice en parte sus observaciones. Por ejemplo, el grupo amidina podría clasificarse como un grupo caótrópico (a la derecha de la Figura 5b), en paralelo al grupo alquilamonio. Según la AAE este grupo formará pares iónicos más estables con aniones caótrópicos, es decir, formará pares más estables con el NO_3^- que con el Cl^- . Al tener mayor carga neta en presencia del Cl^- que en presencia del NO_3^- , en presencia de Cl^- tenderá menos a coalescer. Por la misma razón, la formación de pares iónicos estables del grupo amidina con el SCN^- sería la causa de la mayor inestabilidad observada para el látex.

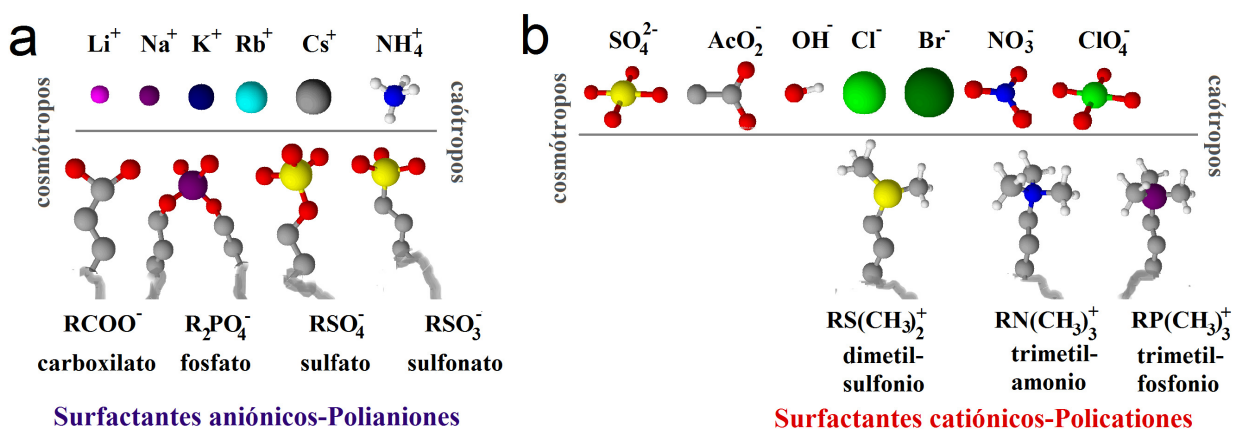


Figura 6. Pares iónicos entre cabezas surfactivas y distintos iones. a) surfactantes aniónicos y contraiones catiónicos y b) surfactantes catiónicos y contraiones aniónicos. Los grupos más cosmótrópicos a la izquierda y los más caótrópicos a la derecha. Las interacciones más fuertes se darán entre pares cosmótrópo-cosmótrópo o caótrópo-caótrópo (según ref. [86,87])

López-León y col. también observaron cambios en la especificidad al cambiar el balance hidrófilo/hidrófobo de los látex. [92,93,94]

De manera análoga a los resultados de López-León y col. con látex cargados positivamente con grupos amidina, se han encontrado [95] tendencias similares en la precipitación de un poliuretano (PU) catiónico, con grupos amonio cuaternario (NR_3H^+) que por su alta densidad de uretano puede considerarse un modelo sintético para explicar el comportamiento de algunas proteínas a $\text{pH} < \text{pI}$. La estructura del PU y de la intensidad de luz dispersada por sus disoluciones al adicionar distintas sales sódicas se muestran en la Figura 7. La turbidez

encontrada con sales con menor densidad de carga (i.e., más caótrópicos) se relaciona con su capacidad, según la regla AAE de formar pares iónicos más cercanos con el grupo NR_3H^+ (Figura 6).

Interacciones iones-polímeros sin carga

Los efectos específicos de iones o de Hofmeister parecen no ser exclusivos entre sistemas ión-contracción ya que distintos experimentos han observado especificidades análogas sobre propiedades de disoluciones de macromoléculas no cargadas. disoluciones poliméricas. Zhang y col. [96] han estudiado la influencia de distintos aniones sobre la temperatura inferior crítica de solubilidad de la poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM), como polímero modelo para proteínas, y han observado que la especificidad de los aniones para su mayor solubilidad sigue una serie de Hofmeister directa ($\text{ClO}_4^- > \text{SCN}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$) y que la solubilidad de estas macromoléculas se puede explicar mediante la modificación de la tensión superficial de los caótrópicos y su interacción directa con los grupos amida.

Pattel y col. [97] han estudiado la micelización de surfactantes no-iónicos tipo POE/POP/POE (polióxido de etileno, polióxido de polipropileno, polióxido de etileno) en presencia de sales sódicas, y han determinado que su capacidad de disminución del punto de nube sigue el orden $\text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^-$, es decir, que los aniones más hidratados (cosmótrópicos, en el sentido de ordenamiento del agua) generan una mayor agregación del polímero.

Thormann [98] también ha estudiado el efecto de distintos aniones (sales potásicas) sobre la separación de fases inducida por el incremento de la temperatura sobre disoluciones acuosas del homopolímero POP (Figura 8). Con una concentración de sales de 1 M ha observado que mientras el SCN^- aumenta la temperatura de separación de fases, T_{sf} , los demás aniones la disminuyen en el siguiente orden $\text{I}^- < \text{Br}^- < \text{Cl}^- < \text{F}^-$, siendo el F^- el que más disminuía la

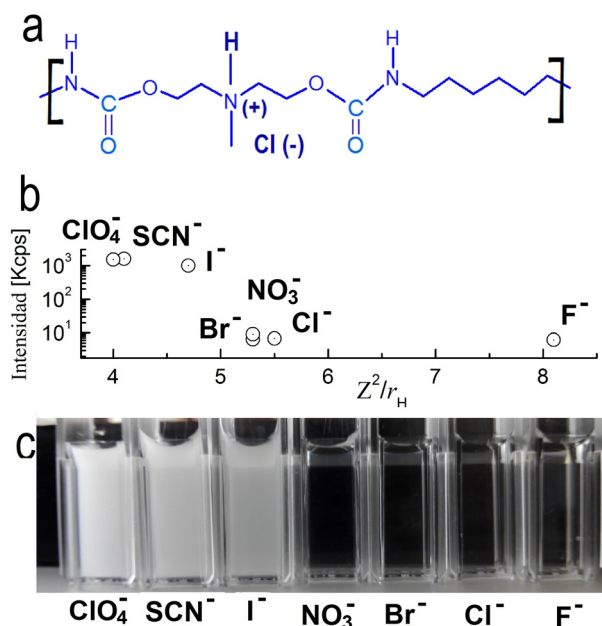


Figura 7. Fenómenos liotrópicos en un PU catiónico. [95] a) Estructura del poliuretano. b) Intensidad de luz dispersada a 90° en función un parámetro proporcional a la densidad de carga del anión. c) apariencia de las disoluciones acuosas del PU con distintas sales sódicas

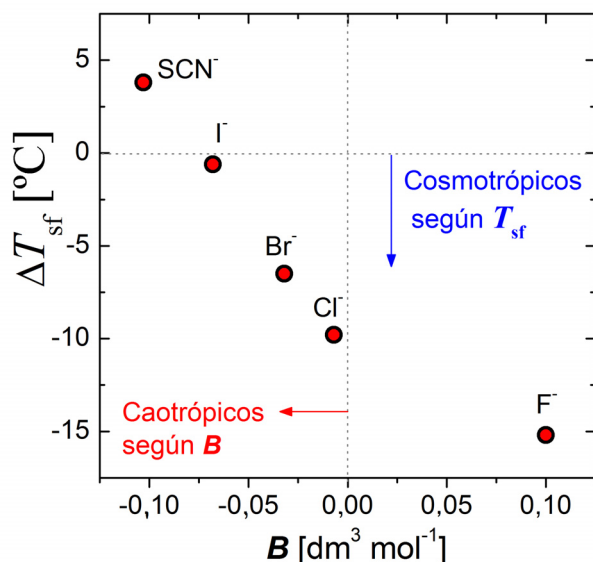


Figura 8. Variación de la temperatura de separación de fases del POE/POP/POE en medio acuoso en función del anión de la sal sódica. Disparidad entre la variación observada y la predicción según B de cada anión (Datos de T_{sf} de ref. [98])

T_{sf} . Pese a que el orden de la serie se corresponde con una serie directa, esto es, los iones menos hidratados (menor coeficiente B) actúan en proporcionalmente en base a B , a la hora de modificar la T_{sf} , es interesante estudiar la magnitud de estos efectos. De entre los aniones halogenados el I^- , clasificado como fuerte caótropro, según B , produce un efecto leve sobre T_{sf} , mientras que el Br^- (también caótropro según B) tienen un efecto cosmótropro sobre el polímero descendiendo T_{sf} (Figura 7). Estas observaciones hacen reconsiderar que el modelo simple de orden-desorden del agua no es tampoco adecuado para explicar el comportamiento de macromoléculas sin carga, y es necesario considerar también las interacciones ión-polímero.

Wilkes y col. han estudiado el efecto de sales tales como el $LiCl$ o el $LiBr$ sobre poliuretanos (PU) u poliureas sintéticas, que al igual que las poliamidas y proteínas, tienen un grupo carbonilo ($C=O$) en su unidad repetitiva, el grupo uretano ($-O-CO-NH-$) o urea ($-NH-CO-NH-$). Han encontrado que la adición de $LiCl$ modifica la interacción entre puentes de hidrógeno de estos polímeros disminuyendo las interacciones inter-macromoleculares. [99,100] Estos autores han explicado la interacción entre el $LiCl$ y el grupo uretano mediante la interacción directa del Li^+ con el oxígeno del carbonilo ($C=O$, polarizado negativamente) y del Cl^- con el hidrógeno ($N-H$, polarizado positivamente).

Interacción de iones con el enlace peptídico

Para el caso de las proteínas, Collins [101] siguiendo la línea del modelo de AAE, ha sugerido en base a la observación de von Hippel, en los que en una columna de poli-acrilamida (con grupos amida, análogos a los grupos amida de las proteínas) los iones caotrópicos pero no los

cosmotrópicos como el F^- son retardados, [102] y en base a que la solubilidad de la formamida aumenta con la presencia de aniones caotrópicos pero no cosmótropicos, [103] que el grupo amida podría tener cierto carácter de zwitterión, donde el nitrógeno amídico, cargado positivamente, actuaría como un caótropro. Debido a la favorable interacción caótropro-caótropro, ello explicaría el retardo de los caótropos en las columnas de acrilamida. Por otro lado la solubilidad de las proteínas podría relacionarse con la estabilización de la estructura zwitteriónica, debido a la formación de pares iónicos más estables de tipo caótropro-caótropro. Aunque probablemente esta no sea la única interacción que condiciona la solubilidad de las proteínas, tal y como apunta Collins. Una revisión interesante sobre el efecto de distintas sales sobre péptidos se puede leer en la referencia [74].

AGENTES COSMO-CAOTRÓPICOS NO IÓNICOS

Es bien conocido que la urea es un agente desnaturalizante de las proteínas, en el sentido que favorece su disolución, cuando estas se encuentran en estado sólido. [104,105] La urea parece interactuar tanto con el agua como con las proteínas, minimizando las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de agregados macromoleculares, según simulaciones de dinámica molecular [106] y la explicación más extendida para el caso de las proteínas es que interactúa fuertemente con el grupo carbonilo ($C=O$) y con el grupo $N-H$, disociando los puentes de hidrógeno intermoleculares. De nuevo en este caso, al igual que con los iones, existe una controversia sobre qué efecto prevalece, el de la modificación de la estructura del agua debido a las interacciones caótropro-agua o a las debidas a las interacciones directas entre caótropro-proteína. [107] Otras moléculas no cargadas capaces de actuar como caótropos incluyen típicos disolventes orgánicos polares tales como el etanol, formamidas o el fenol debido a su capacidad de disminuir la actividad enzimática y crecimiento de bacterias. [108] Existen otras sustancias como la trehalosa que pueden actuar como cosmótropos, estabilizando la actividad enzimática, [109] o como caótropos, facilitando la fusión de ADN. [110]

IONES Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Desde los trabajos pioneros de Roughton, [111] Walaas, [112] Curzon, [113] Warren y col. [114,115] diversos autores [116,117,118] han determinado la influencia de la naturaleza de los aniones y cationes sobre la actividad de distintas enzimas. Estudiando la actividad de enzimas como la α -quimotripsina, renil acilasa, lipasa del germen de trigo, estradiol-17 β dehidrogenasa, b -amilasa y b -galactosidasa, Warren y col. determinaron que la capacidad inhibitoria de su actividad por parte de los aniones de sales sódicas era $CH_3COO^- < Cl^- < Br^- \approx NO_3^- < I^- < ClO_4^- \approx SCN^-$. Para los cationes (cloruros) la tendencia era $(CH_3)_4N^+ < Cs^+ < K^+ < Na^+ < Li^+$. [114,115] Estas tendencias eran similares a las obtenidas anteriormente

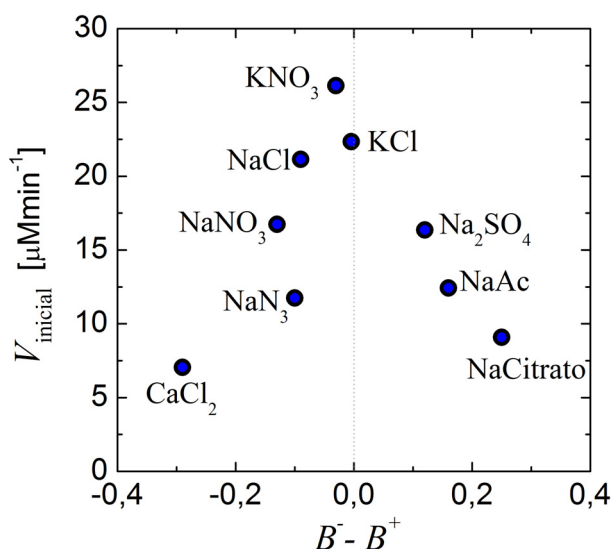


Figura 9. Variación de la velocidad de la reacción catalizada por la enzima fosfatasa, en presencia de distintas sales, e función de la diferencia de los coeficientes B de sus iones^[120]

por otros autores^[119] en cuanto a la capacidad disruptiva de la estructura macromolecular terciaria, por lo cual la pérdida de la actividad enzimática podía relacionarse con la modificación de su estructura.

Yang y col. han estudiado la influencia de distintas sales sobre la actividad catalítica de la enzima fosfatasa.^[120] La Figura 9 muestra los resultados de la velocidad inicial de la reacción catalizada por la fosfatasa, en función de la diferencia de los parámetros de Jones-Doyle, B , del anión y del catión. Como puede observarse pareciera que las máximas velocidades se obtuvieran cuando la diferencia $B^- - B^+$ fuese menor, es decir cuando los iones tuviesen la misma caotropicidad (o cosmotropicidad). Este fenómeno también podría estar explicado por la regla de AAE: interactuando los iones entre ellos en lugar de con la enzima, menos modificarán su actividad.

Otros estudios han encontrado que enzimas con actividad catalítica sobre dos reacciones distintas, presentan comportamientos opuestos frente a la concentración creciente de sal, acelerando una reacción y decelerando la otra.^[121]

IMPACTO EN EL SUELO Y PLANTAS

De la misma manera que las series liotrópicas (o de Hofmeister) se traducen en una mayor o menor interacción de ciertos iones con los solutos, la presencia o ausencia de ciertos iones (inclusive los protones H^+) en el suelo puede condicionar la disponibilidad de otros iones. Este fenómeno se ve a su vez condicionado por la naturaleza de los suelos^[122,123] y la presencia de arcillas con distinta capacidad de intercambio catiónico.^[124,125,126]

También, siendo las sales inorgánicas una fuente habitual de nutrientes para la fertilización de suelos, es intere-

sante considerar el impacto de la naturaleza de las mismas sobre las plantas y materia orgánica del suelo. Por ejemplo, Lorenzo-Andreu^[127] estudió el efecto de la naturaleza de los cationes y aniones sobre los cromosomas de las células de las raíces de la cebolla (*Allium Cepa*). La actividad de los cationes sobre la modificación cromática y la alteración de la división celular seguía el orden $Li^+ > Na^+ > K^+ \approx NH_4^+$, de acuerdo con las series de Hofmeister. Resultados paralelos fueron obtenidos posteriormente por Meletti.^[128]

IONES Y ALIMENTOS

La especificidad de las interacciones de los iones no es exclusiva a las proteínas y sus fenómenos se extienden a los lípidos,^[129] o polisacáridos como el almidón.^[130,131] Un trabajo que revisa los fenómenos Hofmeister enfocados en la carne y otros tejidos proteicos relacionados ha sido recientemente publicado por Puolanne y col.^[132] Algunas investigaciones sobre proteínas de relevancia alimentaria incluyen el gluten,^[132] sueros de leche,^[133] o colágeno.^[134]

En el caso de los lípidos García-Celma y col. observaron una tendencia que podía ser explicada según las reglas de Collins o AAE para los lípidos con grupos cargados (e.j. cosmótopo: PO_4^- o caótopo: $N(CH_3)_3^+$). Sin embargo, para los lípidos sin grupos cargados la tendencia observada no era explicable según la AAE.^[129] Trabajando con disoluciones acuosas de almidón y distintas sales Ahmad y col. encontraron que los aniones seguían la relación de Hofmeister ($SO_4^{2-} > Cl^- > Br^- > NO_3^- > I^- > SCN^-$) en cuanto al módulo de cizalla reológico y a la temperatura de gelatinización de sus disoluciones. En el caso del almidón, al no presentar cargas, los autores argumentaron que los fenómenos respondían a la explicación clásica de la modificación de las propiedades del agua como capacidad solvante o de viscosidad.^[130,135]

Carmona y col. estudiando la reología y la gelificación térmica de la yema de huevo en presencia de iones Na^+ y Ca^{2+} observaron que el Ca^{2+} desarrollaba geles con mayor viscosidad y que gelificaban a tiempos menores que con presencia de Na^+ , de manera paralela a la predicha según su carácter cosmo-caotrópico sobre el agua (Figura 2a).^[136]

Aunque no estrictamente relacionado con la alimentación cabe mencionar que un fenómeno cosmotrópico análogo conocido desde hace tiempo es la capacidad de los taninos de precipitar la gelatina, lo cual constituye el principio del curtido de las pieles.^[8]

Cabe destacar que los fenómenos cosmo-caotrópicos sobre ciertas macromoléculas, difieren, en principio, de los fenómenos de coagulación de algunas biomoléculas de relevancia alimentaria, tales como el empleo de los alginos en esferificaciones,^[137] los cuales se explican mediante la coordinación de los grupos carboxilatos (COO^-) de distintas cadenas macromoleculares con cationes divalentes, tales como el Ba^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} o el Zn^{+2} , mediante el modelo de caja de huevos.^[138,139]

Debido a los marcados efectos de especificidad iónicas sobre las macromoléculas es de esperar que futuras investi-

gaciones proporcionen mayor información sobre el efecto de los iones sobre las distintas rutas metabólicas así como su influencia en distintos procesos como los sinápticos, osteogénesis, digestión o asimilación de fármacos, por citar algunos relevantes.

VEHICULIZACIÓN DE FÁRMACOS

Los fenómenos cosmotrópicos de algunas sales pueden emplearse para el desarrollo de nanopartículas proteicas con estructura bien definida (Figura 10a).^[140]

Posteriormente estas partículas se pueden impregnar con fármacos y ser empeladas para una liberación controlada. También se ha visto que se pueden obtener vesículas cargadas de fármacos modelo cuando una disolución polimérica en presencia del fármaco determinado se somete a una alta fuerza iónica (régimen ex-salado del polímero en cuestión). Con este procedimiento el polímero es expulsado de la disolución formando vesículas micrométricas a la vez de arrastra parte del fármaco en su seno (Figura 10b-g).^[141,142]

BIOMÍMESIS Y PROCESADO DE LA SEDA

La seda, además de por sus excelentes propiedades mecánicas,^[143-147] es un material interesante desde el punto de vista biomédico debido a su composición proteica y su carácter generalmente biocompatible y biodegradable, y por ello ha suscitado un renovado interés.^[148,149] Sin embargo, debido a su alta densidad de puentes de hidrógeno es un material difícilmente procesable con solventes convencionales. Entre uno de los trabajos realizados por Vollrath y col.^[150] en relación con la seda de araña, cabe citar en el contexto de esta revisión,

su investigación en la que observaron un gradiente en la concentración de ciertos iones y pH a lo largo del conducto de hilado de la seda, previo a su secreción.^[151] El enriquecimiento en aniones y cationes cosmotrópicos tales como el PO_4^{3-} y el H^+ a lo largo del conducto, en detrimento de otros más caotrópicos como el Cl^- y el Na^+ , puede ofrecer un modelo para explicar la coagulación de la seda según es secretada (Figura 11a). La comprensión del mecanismo no es únicamente de interés académico sino que puede explotarse en el desarrollo de hilos y materiales derivados de la seda artificial^[152] o natural.^[149,153] Scheibel y col. han estudiado el efecto de distintas sales sobre la capacidad disolvente o coagulante de la seda de araña con el fin de biomimetizar la síntesis y procesado de sus fibras.^[154,155]

Varios autores han desarrollado protocolos de hilado de la seda, que en su conjunto biomimetizan el proceso de la seda, esto es, conseguir una disolución de proteína mediante sales solubilizantes (típicamente bromuro de litio, LiBr), y posteriormente tras proceder al hilado por coagulación en un baño con sales coagulantes (típicamente sulfato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).^[156] El típico proceso de lavado y disolución de la fibroína de la seda de gusano (*Bombyx-mori*) se muestra en la Figura 11b-f, y un esquema de un proceso experimental para el hilado de la seda se muestra en la Figura 11g.

Algunas otras sales con carácter solubilizante empleadas en la disolución de la seda incluyen LiCl , CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{SNC})_2$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, o NH_4SCN .^[150,157,158]

Es interesante resaltar que mientras que disoluciones concentradas de sales desestabilizantes como el $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ son capaces de disolver fibroínas como las de las sedas, no son capaces de disolver queratinas como las de las lanas.^[159] Esto se atribuye a la gran abundancia de grupos cistina ($R_1\text{-S-S-}R_2$) en las queratinas, que actúan como agentes entrecruzantes. Para la disolución de queratinas es necesario el uso de tioalcoholes o tioglicolatos, con el fin de romper los entrecruzamientos.^[160,161]

Como agentes coagulantes en la regeneración de la seda además del sulfato de amonio cabe destacar que también se han usado alcoholes como el metanol, etanol o isopropanol^[157,162] Cabe mencionar la contradicción, al menos en la terminología, respecto a los trabajos discutidos en el apartado de agentes cosmo-caotrópicos no iónicos, en los que se dotaba a los alcoholes de un carácter caotrópico debido a su capacidad de inhibir la actividad enzimática.^[108]

El avance en la comprensión sobre los efectos de los iones sobre proteínas como las sedas podría ayudar a desarrollar procesos de preparación de fibras proteicas o biomiméticas en medios acuosos, mucho menos agresivos que los empleados en la preparación de materiales como el Kevlar u otras fibras sintéticas. Ello, también podría expandir el uso tradicional en la medicina española^[164] de materiales como la seda de araña mediante el desarrollo de ungüentos, sistemas vesiculares de liberación controlada^[140] o soportes celulares proteicos.^[148,149]

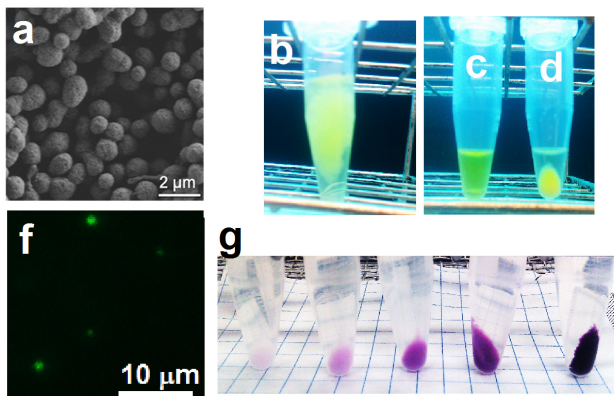


Figura 10. Micelación mediante agentes cosmotrópicos. a) formación de partículas de seda de gusano mediante su ex-salado en presencia alta concentración de aniones $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$.^[140] b) Ex-salado de un poliuretano catiónico en presencia de fluoresceína con NaCl 2M. c) vial con NaCl y F pero sin PU d) con PU, F y NaCl tras su centrifugación. f) Micropartículas de PU con fluoresceína encapsulada mediante ex-salado.^[141] g) Viales con partículas de poliuretano ex-salado con distinta proporción de azul de hidroxinaftol^[142]

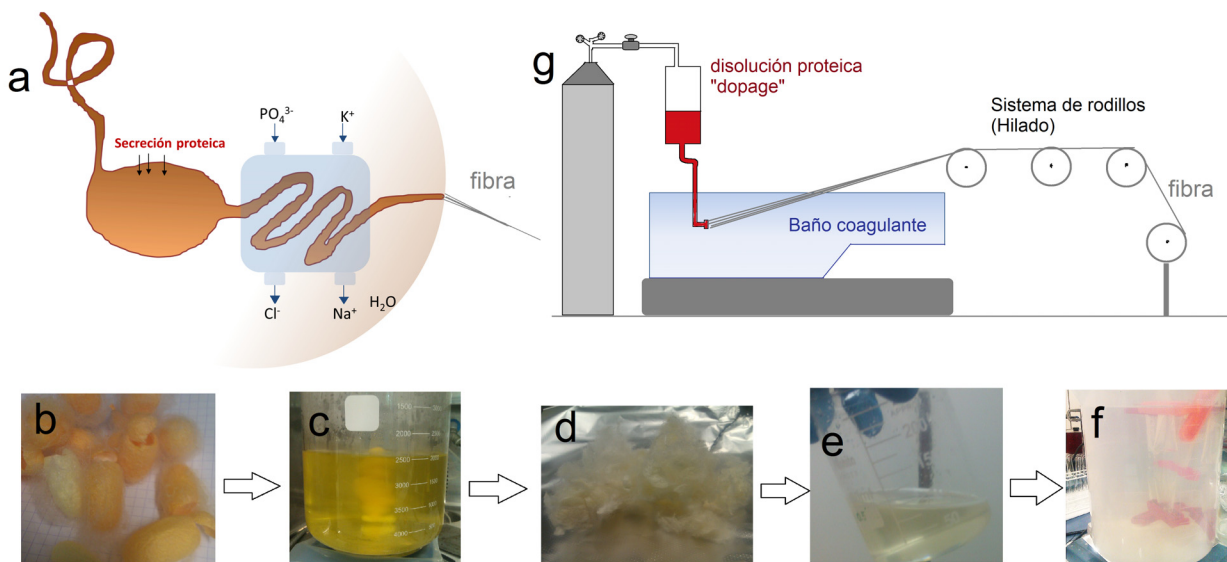


Figura 11. Fenómenos co-cosmotrópicos sobre la seda. a) Bio-procesado de la seda de araña indicándose el cambio de iones caotrópicos por cosmotrópicos antes de su secreción. b) capullos de seda *Bombyx mori*, c) extracción de la sericina, d) fibroína lavada, e) disolución de seda en $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ concentrado ($\sim 10\text{M}$), f) diálisis para la obtención de una dispersión de seda en agua.^[163] g) Montaje para el hilado por coagulación de soluciones concentradas de proteínas de seda, con baños de sales *estabilizantes* (coagulantes) como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.^[156]

EL PRINCIPIO ANTRÓPICO, LA EVOLUCIÓN Y LA SERIE LIOTRÓPICA

El principio antrópico sugiere que unas condiciones físicas muy específicas han tenido que venir desarrollándose para que seres con capacidad suficiente como para preguntarse por ellas puedan haber existido.^[165-166,167,168] De esta manera los efectos específicos de los iones sobre macromoléculas esenciales para la vida tales como los ácidos nucleicos o las proteínas nos ayudará a entender mejor los procesos evolutivos que han tenido lugar en el desarrollo de la vida. Recíprocamente el estudio de la evolución de distintos organismos en distintos ambientes salinos nos ayudará a comprender mejor los efectos específicos de iones sobre macromoléculas. Millet y col.^[169] han venido estudiando procesos haloadaptativos^[170] de diversas cepas de bacterias halófilas en base a la especificidad iónica para la estabilidad de ciertas enzimas. Han observado que la introducción de ciertas mutaciones sobre enzimas base pueden favorecer su estabilidad frente a agentes altamente caotrópicos o cosmotrópicos.^[171]

Algunos trabajos recientes también han observado que la unión entre el ADN y ciertas proteínas está condicionada por la presencia de sales con distinto carácter co-cosmotrópico.^[172] Estos trabajos, además de tener relevancia por el estudio estructural de estas interacciones, podrían también explicar las condiciones de salinidad necesarias para desarrollar la replicación del ARN o ADN o la teogénesis.

Las implicaciones de este tipo de investigaciones exceden sobre el entendimiento cosmogónico y adaptativo de la evolución de la vida ya que podrían ayudar a diseñar enzimas resistentes que catalizaran reacciones de formación de productos de interés humano,^[169] o nos ayudarían a diseñar plantas cuyas raíces pudieran soportar suelos de salinidad extrema ayudándonos tanto a repoblar zonas desertizadas como, tal vez, colonizar nuevos planetas.

CONCLUSIONES

Los efectos específicos de iones sobre macromoléculas comprenden una gran variedad de fenomenologías como la coagulación de proteínas en disolución, la disolución de proteínas sólidas, la actividad enzimática, el autoensamblado de los agregados de surfactantes o la coagulación de la seda de araña. En esta revisión se han abordado algunas de las aproximaciones barajadas para la explicación de los fenómenos tales como la regla de Afinidades al Agua Equivalentes (AAE) o el modelo ampliado de la Ley de Debye-Hückel. Se ha puesto sobre el tablero la ecuación de Born-Landé-Ephraim-Fajans para la entalpía de disolución de una sal, comúnmente olvidada en las revisiones actuales.

También se ha tratado los efectos específicos de iones sobre macromoléculas sin carga así como los efectos cosmo-caotrópicos sobre macromoléculas de sustancias no iónicas tales como la urea.

Finalmente se han discutido algunas implicaciones de los efectos específicos de los iones en campos como la agricultura, el sector alimentario, la vesiculización y vehiculización de fármacos o la mimesis del hilado de la seda.

AGRADECIMIENTOS

El autor querría agradecer a todas las fuentes de financiación durante mi etapa posdoctoral: Universidad del País Vasco (UPV/EHU) y Ministerio de Economía y Competitividad. También quisiera agradecer a la Dra. Arantxa Eceiza por su apoyo en esta etapa. El autor también quisiera agradecer al Ministerio de Empleo y Seguridad Social, por "financiarme" durante el comienzo de la redacción de este trabajo, a lo largo del desempleo, por no existir suficientes medios para la incorporación de docto-

res tras un posdoctorado en España aun contando con experiencia internacional. Espera el autor esta reflexión en este epígrafe más que un aliento a esta "vía" de financiación de la Ciencia sea más bien recibida como una crítica social. Quisiera también agradecer al Profesor Alejandro Müller por su confianza para mi nuevo puesto de trabajo. El autor quisiera agradecer a CYS-Lab de San Sebastián por el patrocinio de este trabajo mediante la aportación del sulfato de sodio empleado en los experimentos introductorios.

REFERENCIAS Y NOTAS

- [1] C. Bernard en *Traité de chimie anatomique*, Ed. C. Robin, F. Verdeil, 299, París, **1853**.
- [2] A. A. Green, *J. Biol. Chem.* **1931**, 93, 495-516.
- [3] R. C. Pasquali, C. Bregni, R. Serrao R, *Acta Farm. Bonaerense* **2005**, 24(3), 453-7.
- [4] RAE. Alotropía. Del griego ἄλλος (allos), y τρόπος (tropos), significando "otro" y "orden o tendencia", respectivamente.
- [5] J. L. Poiseuille, *Ann. Chim. Phys.* **1847**, 21, 76-110.
- [6] J. Liebig J en *Nuevas cartas sobre la química*. Ed. R. Torres-Muñoz. Impr. A. Espinosa y Cía., Madrid, **1853**, pp.
- [7] P. S. Denis. *Acad. Sci. Ed. Baillièrre*, París, **1858**, pp.
- [8] R. Torres-Muñoz, en *La Química en sus principales aplicaciones a la Agricultura*. Impr. D. Félix-Bona, Madrid, **1856**, *Tanino*: pp. 39-40.
- [9] C. Bernard, en *Traité de chimie anatomique*, Ed. Robin C y Verdeil F, París, **1853**, pp. 299.
- [10] S. Bonilla-Mirat. *Tratado Elemental de Química General*. Impr. Hijos de Rodríguez, Valladolid, **1881**.
- [11] S. Lewith, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* **1887**, 24, 1-6.
- [12] F. Hofmeister, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* **1887**, 24, 247-260.
- [13] F. Hofmeister, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, **1888**, 25, 1-30.
- [14] F. Hofmeister, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* **1891**, 28, 210-238.
- [15] J. L. Abernethy, *Proc. California Ass. Chem. Tech.* **1967**, 44, 177.
- [16] W. Kunz, J. Henle, B. W. Ninham, *Curren. Op. Coll. Interf. Sci.* **2004**, 9, 19-37.
- [17] В.А. Заринский, Л.К. Шпигун, В.М. Шкинев, Б.Я.Спиваков, Ю.А. Золотов, *Ж. аналит. химии*, **1980**, 35(11), 2143.
- [18] V. Klobusitzky, *Biochem. Z.* **1925**, 157, 229.
- [19] K. D. Collins, M. W. Washabaugh, *Q. Rev. Biophys.* **1985**, 18(4), 323-422.
- [20] C. A. Cassou, E. R. Williams, *Anal Chem.* **2014**, 86(3): 1640-1647.
- [21] T. B. Robertson, *J. Biol. Chem.* **1911**, 9, 303-326.
- [22] M. Lund, P. Jungwirth, *J. Phys. Condens. Matter* **2008**, 20, 494218.
- [23] M. M. Ries-Kautt, A. F. Ducruix AF, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264(2): 745-8.
- [24] R. Piazza, M. Pierno, *J. Phys.: Condens. Matter* **2000**, 12A, 443-A449.
- [25] P. Lo-Nostro, N. Peruzzi, M. Severi, B. W. Niham, P. Baglioni, *J. Am. Chem Soc.* **2010**, 132(18): 6571-7.
- [26] S. P. L. Sørensen, *Compt. rend. du Lab. de Carlsberg*, **1909**, 8, 1-168.
- [27] L. Medda, C. Carucci, D. F. Parsons, B. W. Ninham, M. Monduzzi, A. Salis, *Langmuir* **2013**, 29, 15350-15358.
- [28] L. Zhang, H. Tan, R. M. Fesinmeyer, C. Li, D. Catrone, D. Le, R. L. Remmele, J. Zhang, *J. Pharm. Sci.* **2012**, 101, 965-977.
- [29] Y. Zhang, P. Cremer, *PNAS*, **2009**, 106(36), 15249-15253.
- [30] J. M. Peula-García, J. L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-González. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 11133-11139.
- [31] J. Lyklema, *Molecul. Phys.* **2002**, 19, 3177.
- [32] E. Puolanne, M. Halonen, *Meat Sci.* **2010**, 86, 151-161.
- [33] G. Jones, M. Dole, *J. Amer. Chem. Soc.* **1929**, 11, 2950 .
- [34] W. M. Cox and J. H. Wolfenden, *Proc. Roy. Soc.* **1934**, 146A, 486.
- [35] R. W. Gurney. *Ionic Processes in Solution*. McGrawHill, Nueva York, **1953**.
- [36] C. Franco , J. M. Costa, *Real Soc. Esp. Fis. Quím. XVIII Reunión Bienal*, 29 Sept-3 Oct, Burgos (España), **1980**.
- [37] K. D. Collins, *Methods* **2004**, 34, 300.
- [38] Y. Marcus Y. (1987). *Pure & Appl. Chem.*, 59, 1093.
- [39] Y. Marcus Ions in Water and Biophysical Implications. Springer, Dordrech. **2012**.
- [40] J. R. Grigera. *Temas de Biofísica structural*. Eudeba, Universidad de Buenos Aires, **2011**.
- [41] J. B. Robinson, J. M. Strottmann, E. Stellwagen, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, 78, 2287.
- [42] G. A. Krestoy. *Thermodynamics of Solvation: Solution and dissolution, ions and Solvents, Structure an Energetics*. Hoorwood, Nueva York, **1991**.
- [43] A. W. Omta, M. F. Kropman, S. Woutersen, H. J. Bakker. *Science* **2003**, 5631, 347-9.
- [44] W. Wachter, W. Kunz, R. Buchner, G. Hefter. *J. Phys. Chem. A* **2005**, 109, 8675-8683.
- [45] J. Peterova, K. B. Rembert, J. Heyda, Y. Kurra, H. I. Okur, W. R. Liu, C. Hilty, P. S. Cremer, P. Jungwirth, *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 8150-8158.
- [46] I. A. Katime, C. Abad, A. Campos, *Afnidad* **1983**, 40(385), 257-261.
- [47] D. F. C. Morris, *Struct. Bond.* **1968**, 4, 63-82.
- [48] D. F. C. Morris, *Struct. Bond.* **1969**, 6, 157-159.
- [49] K. Fajans, *Naturwissenschaften* **1921**, 9, 729-738.
- [50] K. Fajans, *Rev. Soc. Quím. Méx.* **1963**, 7(1), 3-28.
- [51] E. Gutiérrez-Ríos. *Química Inorgánica*. Cap. 4. Reacciones en Medio Acuoso. Ed. Reverté, Barcelona (España) **1994**.
- [52] M. Born, A. Landé, *Preuss. Akad. Wiss. Berlin* **1918**, 76, 1048-1068.
- [53] L. Pauling, *General Chemistry*. Cap. 13. The properties of ionic solutions. Dover Publications, San Francisco (EE. UU.), **1970**.
- [54] M. Born, *Zeitschrift für Physik* **1920**, 1, 45-48.
- [55] La constante de Madelung es distinta para cada par de iones. La tendencia es a aumentar según aumenta el ratio r+/r-. (ver ref. 51), por lo que estrictamente no sería un constante en la ecuación (2); se ha considerado aproximadamente igual a 2 al ser este un valor medio dentro de su rango.
- [56] La constante dieléctrica del agua es $D \approx 81$ y $n = 9$ (ver ref. 51).
- [57] A. Salis, B. W. Ninham, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 7358-7377.
- [58] J. S. Uejio, C. P. Schwarts, A. M. Duffin, W. S. Drisdell, R. C. Cohen, R. J. Saykally, *PNAS* **2008**, 105(19), 6809-6812.
- [59] J. Kherb, S. C. Flores, P. S. Cremer. *J. Phys. Chem. B.* **2012**, 116, 7389-7397.

- [60] W. B. Hardy, *J. Phys.* **1905**, 33(4-5), 251-337.
- [61] T. B. Osborne, I. F. Harris, *Am. J. Physiol.* **1905**, 14, 151-171.
- [62] M. Setschenow, *Ann. Chim. et Phys.* **1892**, 6, 25, 226-234.
- [63] E. J. Cohn, *J. Gen. Physiol.* **1922**, 20, 4(6), 697-722.
- [64] E. J. Cohn, *Physiol. Rev.* **1925**, 5, 349-437.
- [65] E. J. Cohn, A. M. Prentiss, *J. Gen. Physiol.* **1926**, 697-722.
- [66] J. T. Edsall. En "Edwin Joseph Cohn". Biografía. *Nat. Acad. Sci.* **1961**, Washington DC, EE.UU.
- [67] P. Debye, J. MacAuley, *Physik. Z.* **1925**, 26, 22.
- [68] E. Hückel, *Physik. Z.* **1925**, 26, 93-147.
- [69] A. A. Green, *J. Biol. Chem.* **1932**, 95, 47-66.
- [70] P. Retailleu, M. Riés-Kautt, A. Ducruix, *Biophys. J.* **1997**, 73, 2156-2163.
- [71] R. W. Maurer, S. I. Sandler, A. M. Lenhoff, *Biophys. Biochem.* **2011**, 156, 72-78.
- [72] Procedimiento de ajuste. 1°. Estimación de la "Valencia efectiva", Z_+Z_- , y $\log S_0$, mediante una representación de $\log S$ vs $\sqrt{\mu}$. 2°. Determinación de k_{ex} mediante una representación de $\log S - \log S_0 - (0.5Z_+Z_- \sqrt{\mu} / (1+A \sqrt{\mu}))$ vs μ , con $A = 0.775$ (ver ref 64) 3°. Recálculo de A mediante una representación de $0.5Z_+Z_- \sqrt{\mu} / (\log S - \log S_0 + k_{ex}\mu)$ vs $\sqrt{\mu}$. 4°. Reafinamiento de Z_+Z_- y $\log S_0$ mediante una representación de $\log S + k_{ex}\mu$ vs $\sqrt{\mu} / (1+A \sqrt{\mu})$. 5°. Iteración a través de los pasos 2-4.
- [73] E. J. Cohn, J. T. Edsall, *Proteins, Amino Acids and Peptides*. Reinhold Publishing, Nueva York, **1943**.
- [74] R. L. Baldwin, *Biophys. J.* **1996**, 71, 2056-2063.
- [75] M. Sodupe, A. Rimola, P. Ugliengo, *Anal. Quím.* **2011**, 107(2), 137-143.
- [76] V. Yeh, J. M. Broering, A. Romanyuk, B. Chen, Y. O. Chernoff, A. S. Bommarius, *Protein Sci.* **2010**, 19, 47-56.
- [77] F. P. Piován, C. M. Marinho, E. O. Watanabe, *Blucher Chem. Engin. Proceed.* **2014**, 1(1), 266-271.
- [78] C. R. Vieira, E. A. B. Biasutti, M. Capobianco, W. O. Afonso, M. P. C. Silvestre, *Ars. Pharm.* **2006**, 47(3), 281-292.
- [79] L. M. Pegram, M. Thomas-Record, *J. Phys. Chem B*, **2008**, 112, 9428-9436.
- [80] N. Vlachy, M. Drechsler, J. M. Verbavatz, D. Touraud, W. Kunz, *J. Coll. Interf. Sci.* **2008**, 319, 542-548.
- [81] C. C. Díaz-Ramírez, L. Villafuerte-Robbles, *Rev. Mex. Cienc. Fram.* **2011**, 43(2), 31-45.
- [82] N. L. Jarvis, M. A. Scheiman, *J. Phys. Chem.* **1968**, 72, 74-78.
- [83] V. S. J. Craig, *Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.* **2004**, 9, 178-184.
- [84] P. Lo Nostro, B. W. Ninham, *Chem. Rev.* **2012**, 112, 2286-2322.
- [85] S. Murgia, M. Monduzzi, B. W. Ninham, *Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.* **2004**, 9, 102-106.
- [86] W. Kunz, *Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.* **2010**, 15, 34-39.
- [87] N. Vlachy, B. Jagoda-Cwiklik, R. Vácha, D. Touraud, P. Jungwirth, W. Kunz, *Adv. Coll. Interf. Sci.* **2009**, 146, 42-47.
- [88] Y. R. Gokarn, R. M. Fesinmeyer, A. Saluja, V. Razinkov, S. F. Chase, T. M. Laue, D. N. Brems, *Protein Sci.* **2011**, 20, 580-587.
- [89] M. Lund, L. Vrbka, P. Jungwirth, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 11582-11583.
- [90] K. D. Collins, *Biophys. Chem.* **2006**, 119, 271-281.
- [91] T. López-León. *Efectos Hofmeister en sistemas coloidales*. Paper VI, Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 2004.
- [92] T. López-León, A. B. Jódar-Reyes, D. Bastos-González, J. L. Ortega-Vinuesa, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 5696-5708.
- [93] T. López-León, J. L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-González, A. Elaissari, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 4629-4636.
- [94] T. López-León, M. J. Santander-Ortega, J. L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-González, *J. Phys. Chem. C* **2008**, 112(41), 16060-16069.
- [95] B. Fernández-d'Arlas, A. J. Müller. *Rev. Iber. Polím.*, **2016** (en revisión)
- [96] Y. Zhang, S. Furryk, D. E. Bergbreiter, P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 14505-14510.
- [97] K. Patel, B. Bharatiya, Y. Kadam, P. Bahadur, J. Surf. Deter. **2010**, 13(1), 89-95.
- [98] E. Thormann E, *RSC Advances* **2012**, 2, 8297-8305.
- [99] A. Anja, G. L. Wilkes, I. Yilgor, E. Yilgor, E. Yurtsever, J. Macromol. *Sci. Part B Phys.* **2003**, 42(6), 1125-1139.
- [100] J. P. Sheth, A. Aneja, G. L. Wilkes, *Polymer* **2004**, 45, 5979-5984.
- [101] K. D. Collins, *Biophys. J.* **1997**, 2, 65-76.
- [102] P. H. von Hippel, V. Peticolas, L. Shack, L. Karlson, *Biochemistry* **1973**, 12, 1256-1264.
- [103] P. K. Nandi, D. R. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 1299-1308.
- [104] X. Fuentes-Arderiu, M. J. Castiñeiras-Lacambra, *Bioquímica clínica y Patología molecular*. Ed. Reverté, Barcelona (España), **1998**.
- [105] M. Francisco-Márquez, *Desnaturalización de proteínas inducida por temperatura y desestabilizantes químicos*. Universidad metropolitana Iztapalapa, División CBI (México), **1999**.
- [106] C. Gastón-Ferrara, *J. Cienc. Ingen.* **2014**, 6(1) 23-27.
- [107] S. Shimizu, *Chem. Phys. Lett.* **2011**, 517(1-3), 76-79.
- [108] P. Bhaganna, R. J. M. Volkers, A. N. W. Bell, K. Kluge, D. J. Timson, J. W. McGrath, H. J. Ruijsenaars, J. E. Hallworth, *Microbi. Biotech.* **2010**, 3(6), 701-716.
- [109] D. Barreca, E. Bellocco, G. Lagana, U. Leuzi, S. Magazù, F. Migliardo, A. Galtieri, *Food Chem.* **2008**, 106, 1438-1442.
- [110] S. Bezrukvnikov, A. Mashaghi, R. J. van Wijk, C. Gu, L. J. Yang, Y. Q. Gao, S. J. Tans, *Soft Matt.* **2014**, 10, 7269-7277.
- [111] F. J. W. Roughton, V. H. Booth, *Biochem J.* **1945**, 40, 309-319.
- [112] E. Walaas, O. Walaas, *Acta. Chem. Scand.* **1956**, 10, 122-133.
- [113] G. Curzon, *Biochemistry* **1960**, 77, 66-73.
- [114] J. C. Warren, S. G. Cheatam, *Biochemistry* **1966**, 5, 1702-1707.
- [115] J. C. Warren JC, L. Stowring, M. F. Morales, *J. Biolog. Chem.* **1965**, 241(2), 309-316.
- [116] C. H. Ramos, R. L. Baldwin, *Prot. Sci.* **2002**, 11(7) 1771-1778.
- [117] P. Baudin, A. Renoncourt, D. Touraud, W. Kunz, B. W. Ninham, *BW, Curre. Op. Coll. Interf. Sci.* **2004**, 9, 43-47.
- [118] M. A. Pinna, A. Salis, M. Monduzzi, B. W. Ninham *J. Phys. Chem. B. Lett.* **2005**, 109, 5406-5408.
- [119] P. H. von Hippel, K. Y. Wong, *Science*, **1964**, 145, 577-580.
- [120] Z. Yang, X. J. Ziu, C. Chen, P. J. Halling, *Biochim Biophys. Acta* **2010**, 1804(4), 821-8.
- [121] N. J. Brown-Peterson, M. L. Salin, *J. Bacteriol.* **1993**, 175(13), 4197-202.
- [122] S. Sadeghian-Khalajabadi, R. D. Zapata-Hernández, *Cenicafé* **2012**, 63(2), 79-89.
- [123] L. Pérez-García, C. Sam-Palanco, A. Rodríguez-Ferrer, L. R. Garcell-Puyáns, *Tecnol. Quím.* **2007**, 27(3), 30-38.
- [124] D. D. Eberl, *Clay. Clay Miner.* **1980**, 28(3), 161-172.
- [125] R. Bugarín-Montoya, A. Galvis-Spinola, T. M. Hernández-Mendoza, D. García-Paredes, *Agricul. Tècn. Méx.* **2007**, 33(1), 73-81.

- [126] J. L. Havlin, S. L. Tisdale, J. D. Beaton, W. L. Nelson, *Soil Fertility and Fertilizers*. 7.^a Ed. Nueva Delhi, **2010**.
- [127] L. Lorenzo-Andreu, *An. Estac. Exp. Aula Dei* **1951**, 2(2): 174-186.
- [128] P. Meletti, *Caryologia* **1957**, 10(2), 161-180.
- [129] J. J. García-Celma, L. Hatahet, W. Kunz, K. Fendler, *Langmuir* **2007**, 23, 10074-10080.
- [130] F. B. Ahmad, P. A. Williams, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 3359-3366.
- [131] O. Paredes-López, D. Hernández-López, *Starch* **1991**, 43(2), 57-61.
- [132] H. Larsson, U. Hedlund, *Publ. R. Soc. Chem.* **2004**, 295, 247-50.
- [133] E. L. Bowland, E. A. Foegeding, D. D. Hamann, *Food Hydrocoll.* **1995**, 9(1), 57-64.
- [134] R. Komsa-penkova, R. Koynova, G. Kostov, B. Tenchov, *Biophys. Act.* **1996**, 1297, 171-181.
- [135] J. L. Jane, *Starch* **1993**, 45, 161-166.
- [136] J. A. Carmona, F. Cordobés, A. Guerrero, I. Martínez, P. Partal, *Gras. Aceit.* **2007**, 58(3), 289-296.
- [137] C. Mans, P. Castells, *Investig. Cienc.* **2011**, 421, 56-63
- [138] A. Haug, O. Smidrød, *Acta Chem. Scand.* **1965**, 19(2), 341-351.
- [139] B. Fernández-d'Arlas, C. Castro, A. Eceiza, *Rev. Latin. Am. Metal. Mat.* **2015**, 35(2), 189-200.
- [140] A. S. Lammel, X. Hu, S. H. Park, D. L. Kaplan, T. R. Scheibel, *Biomaterials* **2010**, 31, 4583-4591.
- [141] B. Fernández-d'Arlas, M. A. Corcuera, A. Eceiza, *Avan. Quím.* **2014**, 9(3), 115-123.
- [142] B. Fernández-d'Arlas, A. Eceiza, *Macromol. Chem. Phys.* **2015**, 216, 1914-1924.
- [143] F. Vollrath, D. P. Knight, *Nature* **2001**, 410, 541-548.
- [144] G. R. Plaza, A. Musa, J. Pérez-Rigueiro, A. Pons, G. B. Perea, M. Elices, G. V. Guinea, *Anal. Mecá. Fract.* **2008**, 25(1), 41-46.
- [145] T. A. Blackledge, C. Y. Hayashi, *J. Exp. Biol.* **2006**, 209, 3131-3140.
- [146] V. Jauzien, *Etude de la microstructure et du comportement mécanique de la fibre de soie*. Materials. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris, **2010**.
- [147] I. Agnarsson, M. Kuntner, T. A. Blackledge, *PlosONE* **2010**, 5(9), e11234.
- [148] G. H. D. Altman, F. Díaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, D. L. Kaplan, *Biomaterials* **2003**, 24, 401-416.
- [149] J. L. Cenis, *Eubacteria*, **2008**, 20, 19-22.
- [150] F. Vollrath, D. Porter, C. Holland, *Soft Matt.* **2011**, 7, 9595-9600.
- [151] D. P. Knight, F. Vollrath, *Naturwissenschaften* **2001**, 88, 179-182.
- [152] L. Römer, T. Scheibel, *Prion* **2008**, 2(4), 154-161.
- [153] D. N. Rockwood, R. C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M. L. Lovett, D. L. Kaplan, *Nature Prot.* **2011**, 6(10), 1612-1631.
- [154] L. Eisoldt, J. G. Hardy, M. Heim, T. Scheibel, *J. Struct. Biol.* **2010**, 170, 413-419.
- [155] J. G. Hardy JG, Römer LM, Scheibel TR. *Polymer*, **2008**, 49, 4309-4327.
- [156] J. Y. Yan, G. Zhou, D. P. Knight, Z. Shao, X. Chen, *Biomacromolecules* **2010**, 11, 1-5.
- [157] H. Liu, W. Xu, X. Liu, J. Xu, W. Li, X. Liu, *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, 114, 3428-3433.
- [158] K. T. Addis, S. K. Raina, *Pakis. J. Biolog. Sci.* **2013**, 16(20), 1199-1203.
- [159] Fernández-d'Arlas, C. Peña, A. Eceiza. *Rev. Iber. Polím.* **2016**, 17, 110-121.
- [160] D. R. Goddard, L. Michaelis, *J. Biol. Chem.* **1934**, 106, 605-614.
- [161] M. V. Salazar-Cedillo. *Determinación del método para la obtención de queratina cosmética a partir de plumas gallináceas*. Trabajo fin de Carrera, Universidad Central de Ecuador, Quito, **2013**.
- [162] G. R. Plaza, P. Corsini, J. Pérez-Rigueiro, M. Elices, E. Marsano, G. V. Guinea, *Anal. Mecán. Fract.* **2007**, 1, 315-320.
- [163] Resultados obtenidos a lo largo de la investigación de la referencia 159.
- [164] J. A. González, J. R. Vallejo, *Rev. Iber. Aracnol.* **2012**, 21, 169-174.
- [165] H. Velázquez-Fernández, *Finalidad y Principio Antrópico. Entre la Filosofía y la Ciencia*. Facultad de Filosofía, Universidad Panamericana, México, **2005**.
- [166] P. J. Hernández, *El escléptico* **2000**, 9, 9-16.
- [167] P. Davies, *El Universo Accidental*. Salvat Ed., 59, Barcelona (España), **1989**.
- [168] J. D. Barrow, F. J. Tipler. *The anthropic cosmological principle*. Oxford University Press, Oxford (Inglaterra), **1986**.
- [169] O. Millet, *Anal. Quím.* **2011**, 107(4), 304-309.
- [170] Haloadaptación. Sufijo proveniente del griego "Halos": sal. Proceso evolutivo de adaptación a ambientes salinos.
- [171] X. Tadeo, B. López-Méndez, D. Castaño, T. Trigueros, O. Millet, *Biophys. J.* **2009**, 97, 2595-2603.
- [172] A. Falero-Morejón, S. Trigueros-Soler, R. Fando-Calzada, *Rev. CENIC Cien. Biol.* **2012**, 43(1), 41-44.