



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Monterrey

**Estudio de hidratación de biomoléculas por medio de
espectroscopía dieléctrica**

Tesis que presenta

Yojana Jautzi Pupuri Carreón Herrera

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en
Ingeniería y Física Biomédicas**

Director de Tesis

Dra. Hilda Josefina Mercado Uribe

Apodaca, Nuevo León

Agosto, 2015

Agradecimientos

Agradezco:

A mi familia, amigos y colegas.

A la Dra. Hilda Mercado por ser una excelente mentora y por haber contribuido fuertemente con mi formación académica.

Al Dr. Carlos Ruiz por sus valiosas opiniones.

A mis sinodales, el Dr. Jesús Santana y Dr. Moisés Santillán, por la revisión de tesis y sus oportunos comentarios.

Al CONACYT por su apoyo financiero durante la maestría.

Al CINVESTAV-Monterrey, Apodaca, Nuevo León.

Jautzi

Agosto 2015, Monterrey-México.

Índice general

Resumen	VII
Abstract	VIII
1. Introducción	1
2. Biomoléculas y teoría dieléctrica	7
2.1. Solvatación y biomoléculas	7
2.1.1. Mecanismo de disociación en ácidos y bases	10
2.2. Teoría dieléctrica	13
2.2.1. Espectroscopía dieléctrica	15
2.2.2. Capacitor de placas paralelas	17
3. Materiales y Métodos	21
3.1. Preparación de muestras	21
3.2. Arreglo experimental	23
3.2.1. Capacitor y control de temperatura	24
3.3. Análisis de datos	25
4. Resultados y discusión	27
5. Conclusiones	41

Resumen

La hidratación de proteínas ha sido ampliamente investigada en las últimas décadas por diversas técnicas experimentales. Sin embargo, su estudio a través de espectroscopía dieléctrica a bajas frecuencias (menores a 1 MHz) es escaso. En este trabajo se reportan las propiedades dieléctricas de soluciones acuosas de ovoalbúmina y 7 de sus aminoácidos que la componen, usando espectroscopía dieléctrica en el rango de frecuencias de $10^2 - 10^6$ Hz. Se observó que la respuesta dieléctrica de los aminoácidos depende de la concentración de la solución acuosa y de sus propiedades. El aumento en su respuesta iónica sugiere que en una concentración alta de aminoácido, se facilita el transporte de cargas por medio de alambres. Finalmente, la comparación entre el comportamiento dieléctrico de la solución de ácido glutámico y ovalbúmina, nos permite especular que este aminoácido contribuye significativamente a la respuesta dieléctrica que tiene la proteína. A pesar de que casi en su totalidad, los estudios de proteínas y aminoácidos con espectroscopía dieléctrica son realizados en altas frecuencias (arriba de 1 MHz), su estudio en frecuencias más bajas, muestra que es posible obtener información sobre las interacciones entre dichas moléculas y el agua.

Abstract

In recent decades, the protein hydration has been extensively investigated by several experimental techniques. However, the study by dielectric spectroscopy at low frequencies (below 1 MHz) is limited. In this work, the dielectric properties of aqueous solutions of ovalbumin and 7 of its amino acids are reported using dielectric spectroscopy in the frequency range of $10^2 - 10^6$ Hz. It was observed that the dielectric response of amino acids depends on the concentration of aqueous solution and their properties. The increase in the ionic response suggests that in a high concentration of amino acid, the charge transport is facilitated by wires. Finally, the comparison between the dielectric behavior of glutamic acid and ovalbumin solutions, allows us to speculate that this amino acid contributes mainly to the dielectric response of the protein. Although, almost the studies of proteins and amino acids by dielectric spectroscopy are performed at high frequencies (above 1 MHz), the study at lower frequencies shows that it is possible to obtain information about the interactions between these molecules and water.

1

Introducción

Las biomoléculas son las moléculas constituyentes de los seres vivos, y todos los sistemas vivos existen en un ambiente acuoso.

Actualmente, hay muchas evidencias de que el agua ya no se considera como un solvente inerte modelado como un medio dieléctrico homogéneo. Debido a sus propiedades físicas y químicas únicas, tiene un papel protagónico en la dinámica de los procesos biológicos. Es también un poderoso solvente de sustancias polares y pobre solvente de sustancias apolares.

En este trabajo consideraremos solamente el estado líquido del agua, pues como se sabe, el agua confinada en pequeños sitios, manifiesta propiedades inusuales que no se observan en el agua en bulto (libre). Por ejemplo, cálculos *ab initio* de dinámica molecular han mostrado que la movilidad de protones en *alambres* de agua en nanotubos de carbono hidrófobos, es 40 veces más grande que en el agua en bulto.

El agua líquida es un solvente muy sensible a todo tipo de especies, pero a su vez, el agua tiene un efecto molecular sobre las especies disueltas. Podemos afirmar que las proteínas son las especies moleculares más importantes para que se lleve a cabo la vida; y durante los billones de años de evolución, han estado en un ambiente acuoso en el que se han ido adaptando y también aprovechando las propiedades singulares del agua. Comprender como la conformación y la función de una proteína es afectada por su entorno acuoso, es uno de los temas de gran interés en la biología.

Aunque en la literatura se puede encontrar una cantidad enorme de artículos científicos sobre

plegamiento de proteínas, todavía existe un gran desconocimiento acerca del mecanismo en que las interacciones agua-proteína condicionan el panorama energético para determinar el plegamiento, estructura y función de una proteína.

Para fines prácticos, las moléculas de agua que hidratan a una proteína se suelen clasificar en internas y externas. Las primeras ocupan cavidades dentro de la proteína, y se consideran como parte integral de ella, aunque no son estáticas, pues están continuamente intercambiándose con las moléculas externas. Éstas últimas se encuentran interaccionando con la superficie de la proteína, y el alcance de tal interacción ha sido objeto de muchas controversias. Varios estudios reportan que sólo las moléculas de agua que están en contacto directo con la superficie de la proteína son perturbadas considerablemente. Las moléculas de agua que están en la capa de hidratación suelen considerarse como agua ligada (aunque no están ligadas en el sentido termodinámico) [1]. Esto es, la hidratación en proteínas se puede considerar como el incremento en la adición de moléculas de agua en las proteínas, hasta alcanzar un nivel en el cual la adición de moléculas no produce ningún cambio y sólo diluye la proteína [2].

El agua tiene un papel importante en muchas reacciones químicas y en la conversión de energía en la célula. El acomodo de moléculas de agua mediante la unión de los sitios donadores con los aceptores de puentes de hidrógeno, facilita la transferencia rápida de protones, la cual es considerablemente más alta que en otros cationes monovalentes. En otras palabras, tal acomodo de las moléculas de agua funciona como un *alambre* para el transporte eficaz de protones mediante el mecanismo de Grotthuss, el cual es ilustrado en la Figura 1.1. En este proceso, las moléculas de agua solvatando a un ión hidronio (H_3O^+) facilitan el transporte de un protón mediante el transporte de otro protón; es decir, el protón inicial no es el mismo que se "*difunde*" al final de la cadena de moléculas de agua. Por esta razón, este mecanismo es extremadamente rápido en comparación con un mecanismo de difusión real [3].

En el mecanismo de Grotthuss ocurre una transferencia cooperativa de protones entre moléculas sucesivas, que se logra gracias a una reorganización de la red de puentes de hidrógeno. Tal reorganización precede a la transferencia del protón, y es un proceso tan complejo, que hasta la fecha sigue estudiándose.

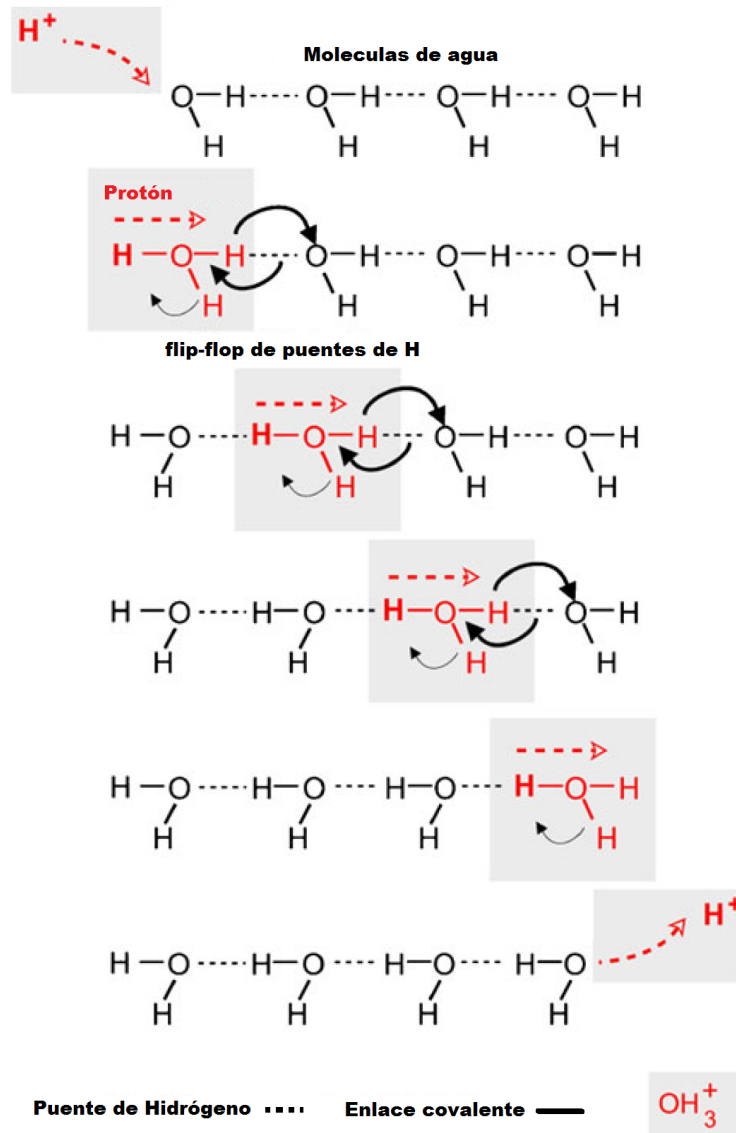


Figura 1.1: Mecanismo de Grotthuss. La transferencia de protones requiere de permutaciones en los enlaces de hidrógeno, de esta forma el protón se difunde desde la primera molécula de agua hasta la última.

La existencia de alambres de protones [3] ha sido planteada en muchas proteínas, por ejemplo, en la *R. Sphaeroides* hay un alambre de 23 Å en el centro de reacción fotosintética, y cuando se efectúa una modificación en el sitio, mediante un proceso de mutagénesis, la funcionalidad de la proteína queda perturbada.

Los aminoácidos interaccionan entre sí por medio de un grupo amino (NH_2) y un grupo carboxilo (COOH) formando enlaces peptídicos, para constituir la cadena polipeptídica que

forma una proteína, al hacerlo liberan una molécula de agua. Esta reacción tiene lugar de manera natural dentro de las células, en los ribosomas. Entre otras propiedades de los aminoácidos, estos pueden comportarse como ácido y como base, por lo que se denominan sustancias anfóteras.

La hidratación en sistemas biológicos ha sido estudiada extensivamente usando diferentes técnicas; sin embargo, el avance ha sido muy lento y errático. La razón es que hasta ahora, ninguna técnica proporciona la resolución espacial y temporal para entender la complejidad de las interacciones moleculares del agua con la superficie de una proteína, y el papel que tiene el agua en bulto.

A través de dinámica molecular se han estudiado las propiedades de las moléculas de agua que rodean a las proteínas durante el proceso de hidratación. En estos estudios se ha encontrado evidencia de que la dinámica conformacional de las proteínas está regida por las anómalas propiedades difusivas de la capa de hidratación, y del agua en bulto. Esto podría estar relacionado con algunos mecanismos que regulan la actividad biológica. Por ejemplo, el agua en bulto podría promover la captura de sustratos [6, 7, 8]. Experimentalmente se han realizado estudios mediante varias técnicas. Por ejemplo, mediciones infrarrojas por Careri y colaboradores [9] muestran que las moléculas de agua que se unen a las proteínas en el proceso de hidratación, llevan a cabo la transferencia de protones hacia otras proteínas a través de sus grupos carboxilos. Por otro lado, el uso combinado de rayos X y dispersión de neutrones en soluciones de proteínas en H_2O y D_2O proporciona evidencia experimental de la existencia de una primera capa de hidratación con una densidad significativamente mayor que la del solvente en bulto que rodea las proteínas en solución [10].

Otra técnica experimental utilizada es la espectroscopía dieléctrica, generalmente en el rango de frecuencias de MHz a THz ($10^6 - 10^{12} Hz$) en la que se ha encontrado distintos procesos de relajación: β , γ y σ que se presentan en frecuencias características. Éstas se pueden atribuir a la rotación de las moléculas de proteínas polares en su medio acuoso, al movimiento reorientacional de las moléculas de agua en bulto y al movimiento de las moléculas de agua unidas, respectivamente. Otros estudios, proporcionan datos sobre la conductividad dc, derivados del transporte por carga iónica que tiene lugar en el interior de las proteína

[11, 12].

Aún cuando la hidratación de proteínas se ha investigado ampliamente mediante varias técnicas, es menor la cantidad de trabajos que se han enfocado en las unidades fundamentales de las proteínas, los aminoácidos. Particularmente en años recientes se realizó un estudio de la hidratación de aminoácidos, por espectroscopía dieléctrica a altas frecuencias (0.2 a 20 GHz). En él se reportan dos relajaciones a temperatura ambiente, las cuales son debidas principalmente a la rotación de los aminoácidos en el medio acuoso, y al movimiento reorientational de moléculas de agua, respectivamente [13].

El estudio de hidratación de biomoléculas, con espectroscopía dielectrica en bajas frecuencias (menores a 1 MHz) es muy poco frecuente [14], debido a que la señal iónica es compleja y no se puede separar fácilmente, y además esta señal da lugar al fenómeno conocido como Maxwell-Wagner-Sillars (MWS).

Por esta razón, en este trabajo de tesis, a través de espectroscopía dieléctrica en el rango de frecuencias $10^2 - 10^6 Hz$, se probará las siguiente hipótesis.

Hipótesis

El estudio dieléctrico de soluciones de aminoácidos permite obtener información sobre el comportamiento dieléctrico de una proteína.

Objetivo General

-Estudiar del fenómeno de hidratación en biomoléculas por medio de la espectroscopia dieléctrica.

Objetivos particulares

-Estudiar la hidratación de la proteína Ovoalbúmina.

-Estudiar algunos aminoácidos que componen dicha proteína.

2

Biomoléculas y teoría dieléctrica

2.1. Solvatación y biomoléculas

De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, IUPAC por sus siglas en inglés, la solvatación es cualquier interacción estabilizante entre un soluto y un disolvente, o bien; una interacción similar de disolvente con grupos de un material insoluble. Tales interacciones implican generalmente fuerzas electrostáticas y fuerzas de Van der Waals, así como los efectos químicamente más específicos, como la formación de enlaces de hidrógeno [15]. En general, se ha demostrado que la solvatación es un factor determinante en la estructura, dinámica y funcionalidad de biomoléculas.

El agua tiene algunas propiedades físicas y químicas inusuales e importantes para actuar como disolvente y en su capacidad para formar enlaces de hidrógeno. También es un disolvente eficaz para polielectrolitos como el ADN y proteínas, blindando las cargas cercanas de la cadena central una de la otra. Su alta constante dieléctrica, apantalla el potencial efectivo de Coulomb en los iones y evita la agregación y la cristalización de los iones de carga opuesta. La respuesta estructural del agua en su papel como disolvente, particularmente en la célula, depende de si el cuerpo en contacto con ella es hidrófobo o hidrófilo [3].

La molécula de agua como especie polar, puede participar en interacciones de Coulomb favorables con iones y otros solutos polares. Las moléculas de agua solvatan cationes mediante la orientación de sus átomos de oxígeno hacia el ion, mientras que para aniones éstos van a

adoptar una configuración opuesta (Figura 2.1).

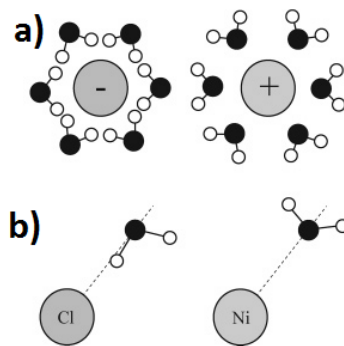


Figura 2.1: **Solvatación de cationes y aniones. (a) Imagen convencional. (b) Orientación de moléculas de agua reveladas por dispersión de neutrones.**

Las proteínas hacen uso de moléculas de agua que las rodean para mediar las interacciones con otras proteínas, o para transportar protones a lugares internos de la proteína, lo que se conoce como percolación [3].

En general, han sido identificados dos tipos de moléculas de agua asociadas con las proteínas: agua interna y agua periférica. El agua periférica (o capa de hidratación) está ligada a la superficie de la proteína. Las moléculas de agua interna forman una parte integral en la estructura de la proteína, disminuyendo las interacciones locales carga-carga y reduciendo los efectos desestabilizadores que surgen del movimiento de protones [16].

Las proteínas son las entidades químicas más estudiadas y ligadas al funcionamiento celular. Estas macromoléculas han sido objeto de muchos estudios en la biología moderna, ya que juegan un papel importante en la célula. Las proteínas son las biomoléculas más numerosas y están presentes en muchos procesos celulares, por ejemplo, las membranas celulares están compuestas esencialmente de una bicapa de lípidos, en la cual están incorporadas moléculas de proteínas, y el funcionamiento de la membrana, típicamente se refleja en la relativa composición de lípidos y proteínas. En muchos casos el contenido de proteínas es cercanamente igual o mayor a la de lípidos [4]. Las proteínas también tienen propiedades especializadas y pueden ser agrupadas en diferentes clases funcionales como: proteínas estructurales, las cuales proveen de rigidez a la célula; proteínas transportadoras, las cuales controlan el flujo de materiales a través de la membrana celular; proteínas reguladoras, que

actúan, como sensores y controlan la actividad de otras proteínas; y proteínas de movimiento que se encargan de movimiento en la célula [17].

Las unidades fundamentales de las proteínas son los aminoácidos. La secuencia y el orden de como se ensamblen, les confiere a las proteínas su característica funcional. Los aminoácidos se enlazan a través de un enlace peptídico (amídico) y forman polímeros, que dependiendo del número de aminoácidos y del solvente, dan lugar a 4 niveles de organización: estructura primaria (polipéptidos), estructura secundaria (hélices alfa y hojas beta plegadas), estructura terciaria (cadena principal) y cuaternaria (unión de dos o más monómeros) (Figura 2.2).

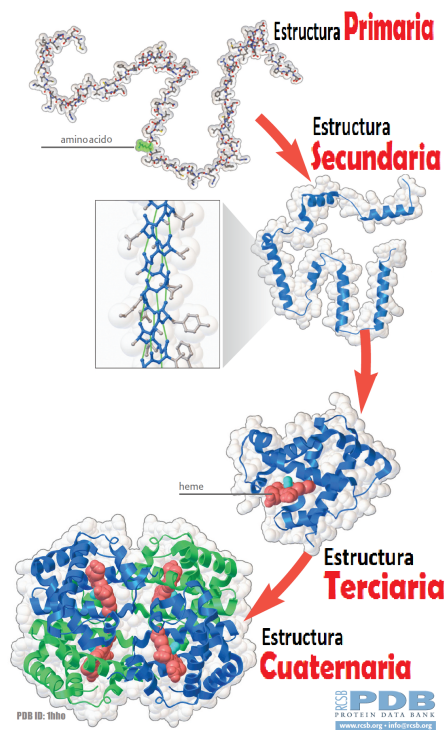


Figura 2.2: Niveles de ensamblaje de aminoácidos. Adaptada de www.rcsb.org/pdb-101.

Los aminoácidos se caracterizan por poseer un carbono asimétrico (C), llamado carbono α , al cual se unen un grupo carboxílico (COOH), un grupo amino (NH₂) y un grupo R que puede ser alifático o aromático y que además, determina las propiedades dieléctricas y electroquímicas de las proteínas (ver Figura 2.3). Esta estructura la podríamos encontrar presente en un número grande de compuestos químicos, pero en los organismos vivos solo se han descrito 20 tipos de aminoácidos que son el núcleo de toda la diversidad de mecanismos

biológicos. En los organismos vivos el solvente de reacción es el agua y el mecanismo para la síntesis de proteínas está enmarcado en el dogma central de la biología molecular [18].

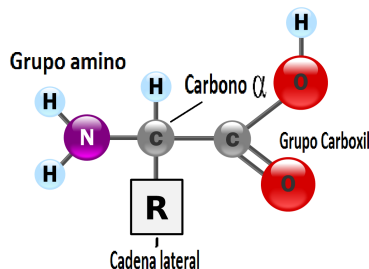


Figura 2.3: Estructura química de un aminoácido.

2.1.1. Mecanismo de disociación en ácidos y bases

La disociación de un ácido ó una base en agua, es una de las manifestaciones más espectaculares de transferencia de protones. Para entender este proceso, se han estudiado sistemas simples como la mezcla de ácido clorhídrico (HCl) en agua líquida. Se sabe que al mezclar estas dos moléculas, el agua disocia las moléculas de HCl en iones de Cl^- y H_3O^+ , las cuales indican que los protones se han transferido de las moléculas de HCl a las moléculas de agua. En este caso, la red de puentes de hidrógeno es excepcionalmente densa, y toda la reacción generada por la disociación de HCl requiere de al menos dos pasos, con dos diferentes tipos de transferencia de protones: ionización y difusión de iones [19].

La pregunta que surge al intentar explicar el mecanismo de ionización es la siguiente: ¿La molécula de HCl espontáneamente transfiere un protón a una molécula de H_2O con la cual ha estabilizado un puente de hidrógeno? o ¿es necesario la presencia de una red de puentes de hidrógeno cerca de la molécula de HCl para que tal transferencia ocurra? se han realizado estudios con espectroscopía infrarroja (IR) en mezclas gaseosas de HCl y H_2O en varias proporciones a bajas temperaturas [20], mostrando que una molécula de H_2O sólo forma complejos del tipo $Cl-H \cdots OH_2$. Sistemas relacionados a éste pero con mezclas de HCl y NH_3 , han demostrado la presencia de dímeros neutrales como $Cl-H \cdots NH_3$ y la ausencia de las especies iónicas correspondientes $Cl^- \cdots H^+NH_3$ [21]. La molécula NH_3 acepta (amarra) protones de forma más fuerte que las moléculas de agua, o en lenguaje de química clásica, la

molécula NH_3 es una molécula más básica, entonces podemos pensar que en una mezcla de HCl y H_2O es necesario un mayor número de moléculas de agua para que moléculas ácidas, como las del HCl sean ionizadas, pero ¿cuántas? Los experimentos reportados hasta ahora en la literatura no han dado una respuesta definitiva a esta pregunta. Estudios realizados en IR con HCl ó HBr en H_2O muestran que 4 a 5 moléculas de agua son suficientes para ionizar estos ácidos [22, 23]. Tales resultados indican que hay una alta sensibilidad de los protones hacia los puentes de hidrógeno que los rodean. Por otro lado la teoría sugiere que la adición de una o dos moléculas de H_2O al dímero $Cl - H \cdots NH_3$ es suficiente para que la transferencia de protones ocurra [24, 25]. Un estudio en dinámica molecular en el sistema $HCl \cdots glicerol$ muestra que la ionización de HCl comienza cuando el átomo de cloro de la molécula del HCl acepta al menos dos enlaces de hidrógeno provenientes del glicerol, esto demuestra que la red de puentes de hidrógeno alrededor de una molécula neutra, como el HCl, influencia fuertemente la ionización [26].

Otro modelo simple que nos da información sobre el mecanismo de ionización y lleva a la misma conclusión, son las moléculas aisladas de aminoácidos, las cuales son neutrales en fase gaseosa y en ausencia de H_2O , pero se convierten en su forma zwitterion en presencia de moléculas de agua [27, 28]. Un aminoácido en su forma zwitteriónica es eléctricamente neutro pero tiene cargas formales positivas y negativas sobre átomos diferentes. La espectroscopía fotoelectrónica acoplada con espectroscopía de masa, indica que se necesita un mínimo de cinco moléculas de agua para ionizar al aminoácido glicina en su forma zwitteriónica [27]. Estudios realizados en espectroscopía en IR de moléculas de glicina, atrapadas en matrices sólidas a bajas temperaturas, muestran que la forma neutral es estable con menos de tres moléculas de agua, mientras que en su forma zwitteriónica es estable con cuatro o más moléculas de H_2O ; así que con tres moléculas de agua, el aminoácido no presenta una forma zwitterionica y la glicina adopta una configuración como la que se muestra en la parte izquierda de la Figura 2.4 [28]. Con cuatro moléculas de agua, la configuración más estable de la glicina en su forma zwitterion se muestra en la parte derecha de la Figura 2.4, con un NH_3^+ en la parte catiónica y COO^- en la parte aniónica, lo cual significa que un protón ha sido transferido del grupo neutral carboxil $COOH$ al grupo neutral amino NH_2 . Sin embargo, las

cuatro moléculas de agua no forman un "alambre de agua" para conectar al grupo COOH con el grupo NH₂. Esto es realizado por tres moléculas de agua, y la cuarta extiende la red de puentes de hidrógeno en todo el sistema al estabilizar un enlace de hidrógeno con el otro átomo de oxígeno del grupo carboxil COO⁻ que no está directamente unido a las primeras tres moléculas de agua. Lo anterior sugiere que la formación de puentes de hidrógeno con esta cuarta molécula de agua es responsable de la estabilidad zwitteriónica.

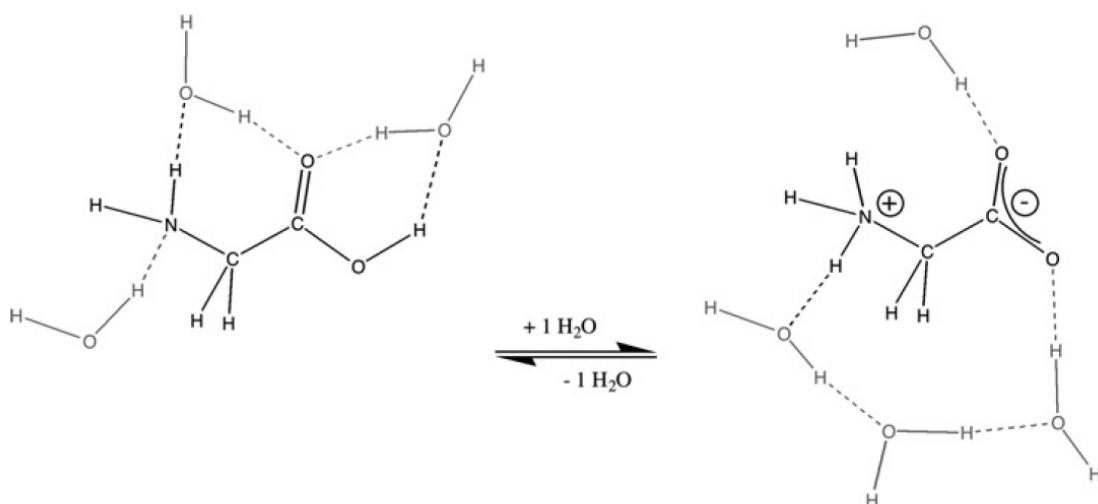


Figura 2.4: En la parte izquierda de la imagen se observa la configuración estable de la glicina y moléculas de agua en estado gaseoso: glicina+ 3H₂O. En la parte derecha se observa a la glicina en su forma zwitterion: glicina+ 4H₂O [28].

El segundo mecanismo molecular encontrado en el proceso de solvatación de ácidos /base en agua, es la difusión de iones de H₃O⁺ ó OH⁻ formados durante el mecanismo de ionización descrito anteriormente. En la Figura 2.5 se representan ambos iones.

La difusión o transporte virtual del ion H₃O⁺ esquematizado en la Figura 2.5 (a) se le conoce como mecanismo de Grotthuss. En este mecanismo ocurre una transferencia cooperativa de protones entre moléculas sucesivas, que se logra gracias a una reorganización en la red de puentes de hidrógeno y tal reorganización precede la transferencia de protones.

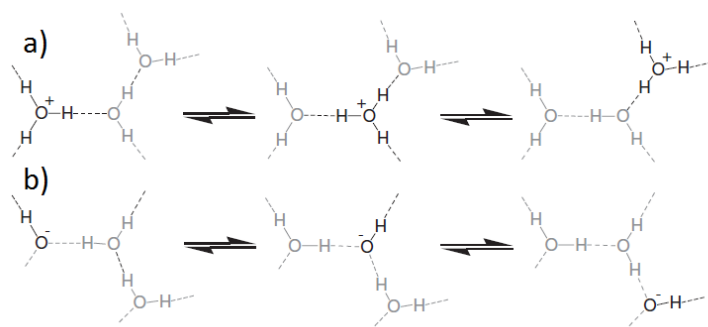


Figura 2.5: Difusión del ion H_3O^+ en (a), y del ion OH^- (b) en agua líquida. En (a) se muestra la solvatación de ion hidronio por las moléculas de agua, facilitando la difusión de un protón que "salta" de una molécula a otra; en (b) ocurre el mismo proceso en forma análoga para el anión hidróxilo [19].

2.2. Teoría dieléctrica

La característica estructural del agua cerca de la superficie de las proteínas está determinada no sólo por los puentes de hidrógeno de las moléculas de agua hacia los sitios que ceden o aceptan protones en la proteína, sino también a través de fuerzas electrostáticas que surgen debido a un momento dipolar eléctrico asociado a la molécula de agua. Al aplicar un campo eléctrico \vec{E} al sistema proteína-agua, los momentos dipolares de las moléculas se alinearán en dirección del campo externo aplicado. El tiempo de relajación τ , es el tiempo requerido para que $1/e$ de las moléculas orientadas con el campo se reorienten aleatoriamente al quitar el campo. El grado de polarización y el tiempo de relajación dependen de como los dipolos de las moléculas son influenciados por una fuerza electrostática local y del rompimiento o formación de puentes de hidrógeno requeridos debido a los cambios orientacionales de las cargas.

La polarización de un material que contiene moléculas dipolares libres puede ser caracterizada en términos de su permitividad relativa ϵ , parámetro también conocido como constante dieléctrica. Ésta se puede interpretar como una medida del número de moléculas dipolares orientadas por un campo eléctrico \vec{E} externo. A esta orientación se le oponen fuerzas de fricción que en cierta medida, dependen de la frecuencia ω del campo sinusoidal y el

tiempo de relajación τ característico del material, definido anteriormente. A bajas frecuencias $\omega\tau \ll 1$, esta reorientación supera a las fuerzas de fricción y el material presenta una alta permitividad relativa ε_s , también llamada permitividad estática. A altas frecuencias $\omega\tau \gg 1$, las fuerzas de fricción superan a la orientación de moléculas y la permitividad relativa toma un valor bajo ε_∞ .

La capacitancia C de un material que se encuentra entre dos electrodos planos y paralelos de área A separados por una distancia d , es definida como:

$$C = \frac{A\varepsilon_s\varepsilon_0}{d}, \quad (2.1)$$

donde $\varepsilon_0 = 8,85 \times 10^{-12} F/m$ es la permitividad dieléctrica del vacío. Debye desarrolló una teoría que describe este comportamiento [31], de acuerdo con él, la permitividad puede ser descrita como una función compleja de la siguiente forma:

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + i\omega\tau}, \quad (2.2)$$

o bien, en su forma general;

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon' - i\varepsilon'', \quad (2.3)$$

donde ε' es la parte real que aparece en la ecuación (2.1) que está dada por:

$$\varepsilon'(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + \omega^2\tau^2}, \quad (2.4)$$

y la componente imaginaria ε'' conocida como el factor de pérdida dieléctrica que está dada por:

$$\varepsilon''(\omega) = \omega\tau \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + \omega^2\tau^2}, \quad (2.5)$$

que es una medida de la energía absorbida por ciclo.

Estas dos cantidades, ε'' y ε' se relacionan de la siguiente forma:

$$\frac{\varepsilon''}{\varepsilon'} = \tan(\delta), \quad (2.6)$$

donde el significado físico de la cantidad $\tan(\delta)$ es:

$$\tan(\delta) = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'} \propto \frac{\text{energía_disipada/ciclo}}{\text{energía/ciclo}}, \quad (2.7)$$

$\tan(\delta)$ es usualmente llamada tangente de pérdida dieléctrica o factor de disipación.

ε' y ε'' son cantidades experimentales que pueden ser usadas para caracterizar la respuesta iónica y molecular de un material en un rango de frecuencias. Para interpretar este comportamiento es necesario construir una relación entre cantidades macroscópicas y propiedades moleculares y plantear un modelo que describa la forma en que las moléculas responden a un campo aplicado.

2.2.1. Espectroscopía dieléctrica

La espectroscopía dieléctrica es un método experimental que mide las propiedades dieléctricas de un medio en función de la frecuencia con la que cambia la dirección de un campo eléctrico aplicado [33, 34, 35]. Para ello se utiliza un capacitor.

Existen diferentes mecanismos dieléctricos predominantes asociados a un medio al aplicar un campo eléctrico, ver Figura 2.6. Cada mecanismo dieléctrico se centra alrededor de una frecuencia característica, que es recíproca al tiempo característico del proceso. En general, los mecanismos dieléctricos se pueden dividir en procesos de relajación y de resonancia, los cuales son:

Polarización electrónica .- Este proceso de resonancia se produce en un átomo neutro, cuando el campo eléctrico desplaza la densidad de electrones en relación con el núcleo atómico que rodea. El desplazamiento se produce debido al equilibrio entre las fuerzas eléctricas. La polarización electrónica puede entenderse asumiendo a un átomo como un núcleo puntual rodeado por una nube electrónica esférica de densidad de carga uniforme. Este proceso ocurre en regiones superiores a 10^{14} Hz.

Polarización atómica.- Se observa polarización atómica cuando el núcleo de un átomo se reorienta en respuesta al campo eléctrico. Es un proceso de resonancia. La polarización atómica es intrínseca a la naturaleza del átomo. Dicho proceso surge en frecuencias cercanas a 10^{11} Hz.

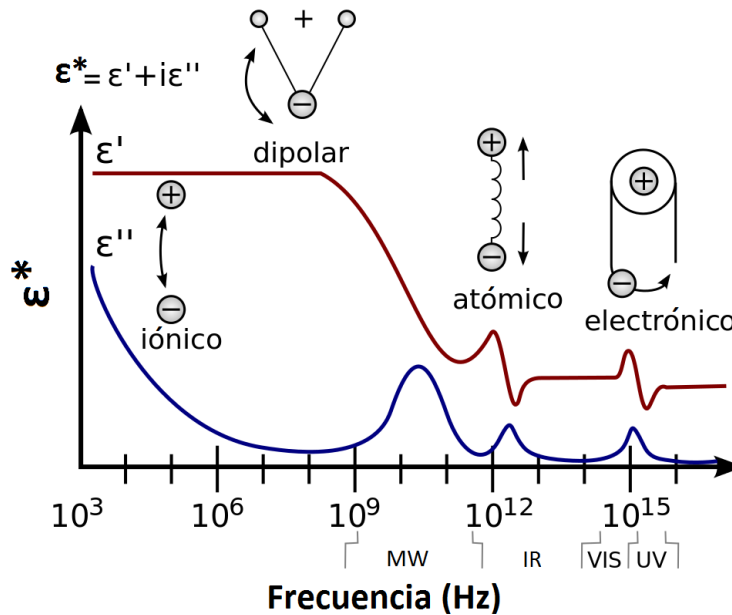


Figura 2.6: Esquema general de la respuesta dieléctrica en función de la frecuencia de un campo eléctrico aplicado.

Relajación dipolar.- Este proceso se origina a partir de dipolos permanentes e inducidos con respecto a un campo eléctrico. Su orientación es perturbada por el tiempo requerido de los dipolos para relajarse (alcanzar sus condiciones iniciales), y se encuentra determinado por la viscosidad local. Tal proceso ocurre en un rango de frecuencias de $10^4 - 10^{10}$ Hz.

Relajación Iónica.- La relajación iónica comprende la conductividad iónica y la relajación interfacial. La conductividad iónica predomina en bajas frecuencias y representa la migración de iones en el sistema. La relajación interfacial se produce cuando los portadores de carga se encuentran atrapados en las interfaces de sistemas heterogéneos. Un efecto relacionado es la polarización de Maxwell-Wagner-Sillars (MWS). Se le llama así a los efectos en las propiedades dieléctricas atribuidas a las discontinuidades del material dieléctrico. En otras palabras, el campo eléctrico aplicado induce una separación de fases en la muestra, produciéndose una acumulación de cargas en la superficie de las placas [31, 36]. La relajación iónica domina en frecuencias inferiores a 10^4 Hz.

Llamaremos relajación dieléctrica al resultado del movimiento dipolar (relajación dipolar) y de cargas eléctricas (relajación iónica) debido a un campo alterno aplicado, y se observa

por lo general en el rango de frecuencia $10^2 - 10^{10}$ Hz. Los mecanismos de relajación son relativamente lentos en comparación con las transiciones electrónicas resonantes o vibraciones moleculares, que suelen tener frecuencias superiores a 10^{12} Hz.

En el caso del agua, su comportamiento dieléctrico a bajas frecuencias ($10^2 - 10^6$ Hz) muestra dos procesos de relajación simultáneos: relajación iónica y dipolar [37]. En el rango de frecuencias de $10^2 - 10^4$ Hz los pares iónicos se mueven hacia los electrodos que contienen la muestra (relajación iónica), y aún si el número de dipolos alineados al campo es grande, el fenómeno de MWS es dominante. Ésta es la razón por la cual la permitividad relativa es alta. Para frecuencias más altas ($10^4 - 10^6$ Hz) la polaridad de los electrodos cambia tan rápidamente que sólo los dipolos pueden responder efectivamente; y el valor de la permitividad relativa disminuye [38].

2.2.2. Capacitor de placas paralelas

Un capacitor de placas paralelas está formado por dos placas metálicas, sobre las que se aplica una diferencia de potencial, ΔV . Las superficies se encuentran cargadas en igual magnitud con cargas opuestas (+Q,-Q). Al existir una diferencia de potencial ΔV entre las placas, se induce un campo eléctrico \vec{E} . Las líneas de campo atraviesan el espacio desde +Q a -Q (para una partícula cargada el campo se propaga de forma radial). El campo total \vec{E} que existe entre las placas, es la resultante de la sumatoria de la contribución de los campos de cada una de las cargas en cada placa. Debido a la geometría de las superficies cargadas, las líneas del campo total siguen una trayectoria perpendicular a las placas y los bordes siguen una trayectoria curva, a este efecto se le conoce como efecto de borde. Si el área de las placas A , es muy grande comparada con la distancia de las placas d ($A \gg d$), el efecto de los bordes es despreciable y se considera que el campo es constante. Para un capacitor con esta geometría, se puede calcular la diferencia de potencial ΔV asociada al campo \vec{E} usando la ley de Gauss:

$$\Delta V = - \int_a^b \vec{E} \cdot \vec{dl}, \quad (2.8)$$

donde el potencial se obtiene calculando la integral del campo eléctrico a lo largo de la

distancia que separa las placas. Esta integral se realiza de cátodo a ánodo (de $-Q$ a $+Q$), por lo que el signo negativo permite que la integral se calcule en dirección de las líneas de campo. En el caso ideal, el campo eléctrico es constante y paralelo a la distancia que separa a las placas. La ec.(2.8) se reescribe como:

$$\Delta V = -E \int_a^b dl. \quad (2.9)$$

El campo puede expresarse en función de la densidad de carga superficial de las placas σ , y posteriormente en función de la carga en la superficie Q , de la siguiente manera:

$$E = \frac{\sigma}{k'\epsilon_0} = \frac{Q}{Ak'\epsilon_0}, \quad (2.10)$$

donde ϵ_0 es la permitividad eléctrica del vacío y k' la constante dieléctrica, valor característico del material que se encuentra entre las placas, cuya magnitud es proporcional a la polarizabilidad del mismo.

Sustituyendo el campo en función de Q y resolviendo la integral en la ec. (2.9) se obtiene:

$$\Delta V = \frac{Qd}{Ak'\epsilon_0}. \quad (2.11)$$

Por otra parte, la razón entre la carga almacenada y la diferencia de potencial entre las placas, es conocida como la capacitancia:

$$C = \frac{Q}{\Delta V}. \quad (2.12)$$

Si la carga se mantiene constante y en la región entre las placas se introduce un material dieléctrico, la capacitancia se incrementa. Esto quiere decir que la diferencia de potencial eléctrico ΔV es menor, lo que implica que el campo eléctrico \vec{E} también lo es. Pero si la carga entre las placas no cambia, entonces el campo producido tampoco. Esto es debido a que existe un mecanismo que produce otro campo inducido que compensa parcialmente el campo de las cargas sobre las placas. Este otro mecanismo se conoce como polarización.

Al sustituir la ec. (2.11) en la ec. (2.12) para el arreglo de placas paralelas, se obtiene:

$$C = \frac{k'\epsilon_0 A}{d}. \quad (2.13)$$

Esta expresión puede ser utilizada para encontrar la constante dieléctrica de un material a partir de la capacitancia C_0 obtenida cuando no existe material entre las placas:

$$k' = \frac{C}{C_0}. \quad (2.14)$$

La constante dieléctrica de un material define el grado de polarización del mismo cuando sobre él se aplica un campo eléctrico.

3

Materiales y Métodos

En este capítulo se describe la preparación de las muestras utilizadas en los experimentos realizados. Se describe también el arreglo experimental empleado y el método de medición; así como el protocolo de limpieza. Y por último, las herramientas empleadas para el análisis de datos.

3.1. Preparación de muestras

Para cubrir los objetivos mencionados al inicio de esta tesis se utilizaron 2 tipos de muestras: proteínas y aminoácidos. En el grupo de las proteínas se realizaron experimentos con soluciones acuosas con proteínas nativas y desnaturalizadas. Las proteínas que se utilizaron fueron: ovoalbúmina (ovoalbúmina de clara de huevo de pollo, grado II, A5253, Sigma Aldrich) y lisozima (lisozima, L6876, Sigma Aldrich).

Las soluciones de proteínas se prepararon disolviendo cada una de ellas en agua bidestilada-MiliQ ($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) tratando de cubrir un amplio rango de solubilidad, de 5 mg/mL a 50 mg/mL para la ovoalbúmina; y de 0.5 mg/mL a 10 mg/mL para la lisozima. La desnaturalización de las proteínas se realizó a través de un tratamiento térmico. Cada proteína se calentó a 90°C durante 9 minutos y después se enfriaron lentamente hasta llegar a la temperatura ambiente.

La selección de aminoácidos se basó en las propiedades de su grupo **R** y la frecuencia de

aparición en la secuencia peptídica de las proteínas antes mencionadas. La solubilidad de los aminoácidos en agua varía respecto al tamaño de la molécula, la naturaleza de su grupo **R** y su pH.

Las soluciones de aminoácidos se prepararon disolviendo cada uno de ellos en agua MilliQ, y al igual que las proteínas, se trató de cubrir un amplio rango de solubilidad en cada aminoácido de 5 mg/mL a 50 mg/mL. Los valores de pH de cada solución fueron determinados mediante un pH-metro (pH meter, modelo FE20, Mettler Toledo). Estos valores fueron cercanos a su punto isoelectrico (*pI*).

Los aminoácidos utilizados fueron los siguientes: L-alanina (ácido 2-aminopropanoico, A7627), L-prolina (ácido pirrolidin-2-carboxílico, P0380), L-Leucina (ácido 2-amino-4-metilpentanoico, L8000), L-isoleucina (ácido 2-amino-3-metil-pentanoico, I2752), L-serina (ácido 2-Amino-3-hidroxi-propanoico, S4500), L-triptófano (ácido 2-amino-3-(1H-indol-3-il) propanoico, T0254), L-ácido glutámico (ácido 2-aminopentanodioico, G1251) y L-ácido aspártico (ácido 2-aminobutanoico, A9256). Todos ellos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. En la Figura 3.1 se muestra la estructura de los aminoácidos.

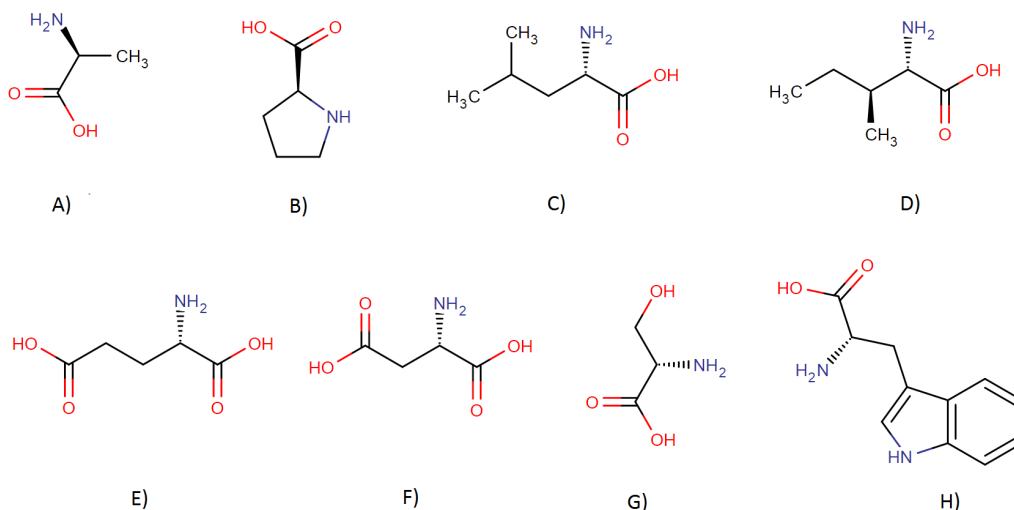


Figura 3.1: A) L- Alanina (Ala), B) L-Prolina (Pro), C) L- Leucina (Leu), D) L-Isoleucina (Ile). Estos aminoácidos pertenecen al grupo R apolares alifáticos. E) L- ácido glutámico (Glu) y F) L- ácido aspártico (Asp), son aminoácidos pertenecientes al grupo R cargados negativamente. G) L-Serina (Ser), aminoácido correspondiente al grupo R polares sin carga y H) L- Triptófano (Trp), aminoácido correspondiente al grupo R aromático.

Para experimentos complementarios relacionados con el pH del ácido glutámico y el agua MiliQ, que se explicarán más adelante, se utilizó ácido clorhídrico (HCl). La concentración empleada fue de 1 mM.

En cada experimento se realizaron mediciones de la permitividad del vacío y del agua para asegurar su reproducibilidad.

3.2. Arreglo experimental

El arreglo experimental consistió en un capacitor de placas paralelas que se colocó dentro de un dispositivo que controlaba la temperatura, el cual se explicará a detalle más adelante. Para medir las propiedades dieléctricas de las soluciones acuosas, el capacitor se conectó a un medidor de inductancia, capacitancia y resistencia (LCR por sus siglas en inglés) que es controlado a través de una pc, ver Figura 3.2.

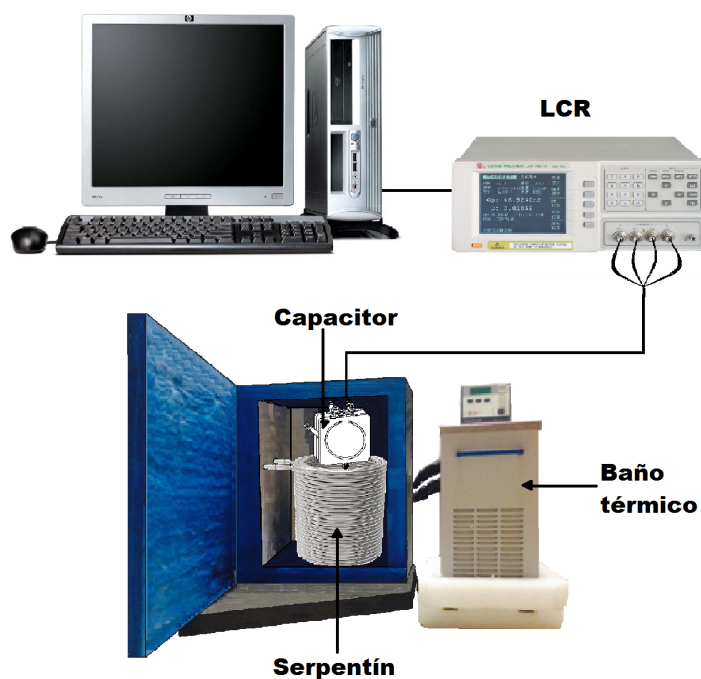


Figura 3.2: Arreglo experimental utilizado para medir las propiedades dieléctricas de proteínas y aminoácidos.

3.2.1. Capacitor y control de temperatura

Se utilizó un capacitor de placas paralelas (modelo 16452A, Liquid Test Fixture, LTF, Agilent Technologies) con capacidad de 3.4 cc (los detalles se muestran en la Figura 3). El LTF es conectado al medidor LCR (modelo 4284A, Hewlett Packard) que opera dentro de un intervalo de frecuencias que va de 20 a 10^6 Hz; y con precisión de $\pm 0.05\%$ y $\pm 0.0005\%$, respectivamente. A través del LCR se obtuvo la capacitancia y $\tan(\delta)$ de las soluciones acuosas bajo un intervalo de frecuencias de 10^2 a 10^6 Hz.

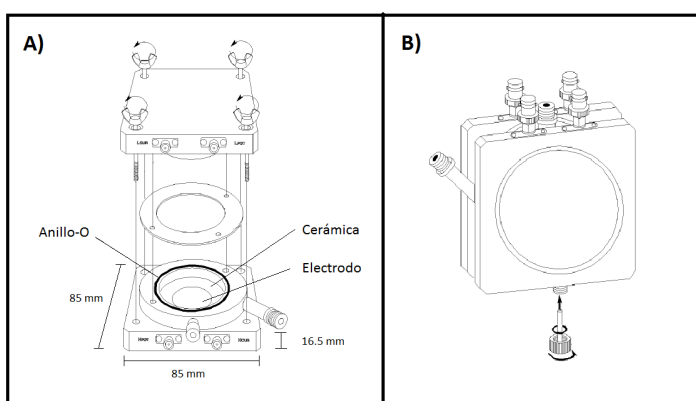


Figura 3.3: A) Especificaciones generales del capacitor de placas paralelas. B) Vista lateral del capacitor.

Para controlar la temperatura de las muestras bajo estudio, el capacitor se colocó dentro de un serpentín de plástico, por el cual circulaba agua a 25°C suministrada por un recirculador (modelo 9106A11B, PolyScience) . El serpentín a su vez es colocado en una celda que aísla al sistema térmicamente. Cada experimento inicia cuando el capacitor está en equilibrio térmico con el agua del serpentín.

Debido a que las muestras dejaban residuos después de haber sido evaluadas por el LCR, se requirió implementar un riguroso protocolo de limpieza en el capacitor, que consistió en colocarlo dentro de un sonicador (modelo 5510, Ultrasonic Cleaner, Branson). El tiempo dentro del sonicador variaba de 1 a 2 horas y dependía de las características de los materiales residuales. Para secar el capacitor, éste era colocado en un horno (modelo 19200, Thermolyne) durante 30 minutos a 37°C . Para asegurar que el capacitor se encontraba libre de residuos,

entre cada experimento realizado se verificaba su limpieza midiendo la permitividad relativa del agua.

3.3. Análisis de datos

Los valores de la capacitancia y la $\tan(\delta)$ de cada muestra se obtuvieron a través de un programa realizado en el software VEE, versión 9.01. Posteriormente usando la ec. (2.14) se obtuvo la constante dieléctrica, k' , que se graficó usando el software Origin Pro, versión 8.0.

4

Resultados y discusión

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de los experimentos realizados en este trabajo. Antes de iniciar en ello, discutiremos brevemente algunas características relevantes de la respuesta dieléctrica del agua encontradas en nuestro laboratorio, que nos permitirán explicar con mayor claridad lo que ahora reportamos.

El valor alrededor de 80 de la permitividad (a 20°C) del agua, es ampliamente aceptado. Se mide en general arriba de 0.1 GHz, y se extrapola a bajas frecuencias. Sin embargo, experimentos realizados en nuestro laboratorio muestran que para un rango de frecuencias $10^2 - 10^6 \text{ Hz}$ la permitividad relativa varía en función de la frecuencia y la temperatura. Para entender el comportamiento del agua, ésta puede ser vista como un sistema de dos especies: iones y dipolos [38]. En la Figura 4.1 se muestra la permitividad relativa (a) y la $\tan(\delta)$ (b) en función de la frecuencia de un campo externo, obtenidas en nuestro laboratorio para agua desionizada a diferentes temperaturas. Se encontró que la permitividad relativa aumentaba drásticamente cerca de 100 Hz y, a frecuencias intermedias (cerca de 1 MHz), toma un valor cercano a 75. En el inset de la Figura 4.1 (a) podemos observar que hay una frecuencia a la cual todas las curvas a diferentes temperaturas se cruzan. Por debajo de este punto, la permitividad relativa se incrementa mientras aumenta la temperatura, por arriba de este punto, la permitividad relativa disminuye. Cuando la temperatura aumenta, la disociación de las moléculas de agua en pares iónicos aumenta. A bajas frecuencias, los dipolos del agua se alinean en dirección del campo externo mientras que los iones se mueven hacia los electrodos

(MWS). A frecuencias más altas, el cambio de polaridad en los electrodos es tan rápido que sólo los dipolos son capaces de responder. En la Figura 4.1 (b) se muestra el cambio en la curva del factor de disipación ($\tan(\delta)$) justo en la región donde la actividad iónica termina.

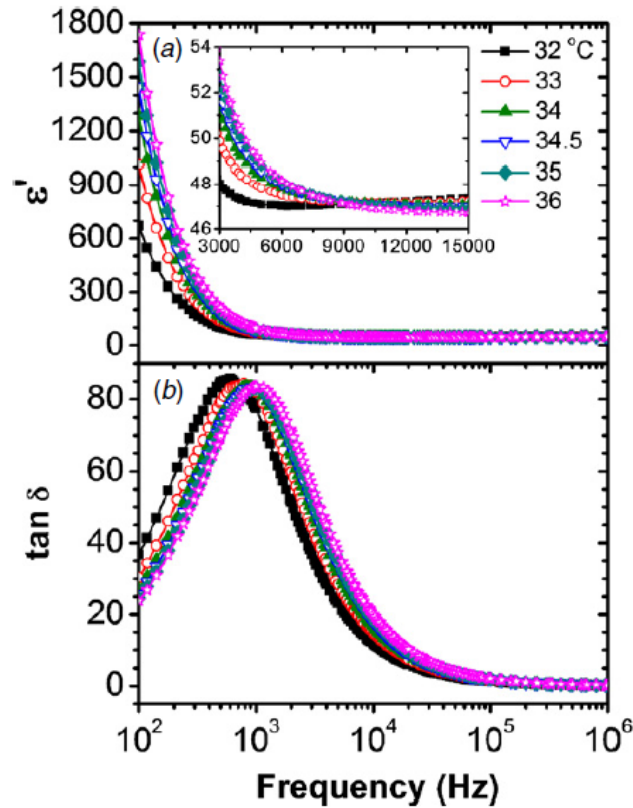


Figura 4.1: Permitividad relativa (a) y factor de disipación (b) de agua desionizada en función de la frecuencia (100 Hz - 1 MHz) a diferentes temperaturas. El inset muestra el punto iso permitivo [40].

En base a lo descrito anteriormente, haremos referencia a estos mecanismos en los resultados de esta tesis, y para fines comparativos en todas ellas se presentará el comportamiento del agua en círculos de color naranja.

En la Figura 4.2 se muestra la permitividad relativa de la ovoalbúmina (en líneas continuas a diferentes concentraciones) y del agua (con círculos naranjas) como función de la frecuencia del campo aplicado. Se observa que la respuesta dieléctrica en las frecuencias más bajas aumenta a medida que la concentración lo hace, y que alrededor de $10^4 Hz$ esta tendencia cambia completamente. Esto se debe a que antes de $10^4 Hz$ esta señal está compuesta por la

contribución de los iones del agua en bulto que llegan a los electrodos, como consecuencia de un fenómeno difusivo, y por la contribución de los protones que llegan a las placas a través de alambres de protones, mediante el mecanismo de Grotthuss, que como se explicó en el capítulo 1 y 2.1 es un transporte cooperativo de protones entre moléculas de agua sucesivas a través de puentes de hidrógeno, siendo éste un proceso mucho más rápido que el primero. En otras palabras, la señal dieléctrica es la suma de la señal del agua que está gobernada por el movimiento de los iones, y la señal de la proteína, que está regida por el transporte de protones a través de los aminoácidos mediante alambres de protones.

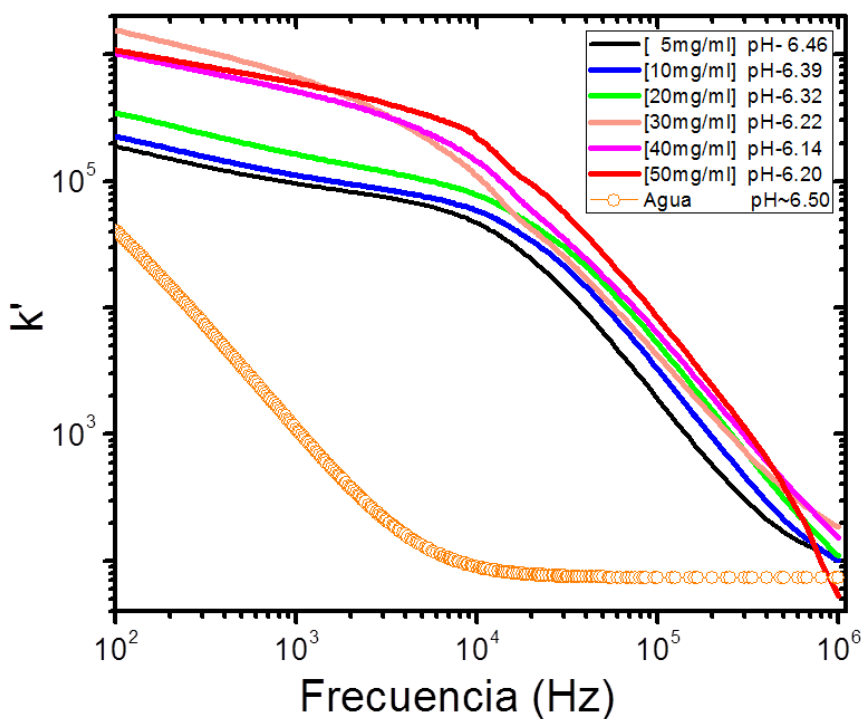


Figura 4.2: Constante dieléctrica de la ovalbúmina en función de la frecuencia para distintas concentraciones. Se muestra también la señal del agua en círculos naranjas para fines comparativos.

A partir de $10^4 Hz$ la contribución iónica del agua no es detectable; es decir, la frecuencia del campo eléctrico es muy alta como para que los iones puedan alcanzar a llegar a los electrodos. Sin embargo, la contribución debida a la proteína sigue existiendo, pero disminuye en función de la concentración, siendo todavía un proceso iónico, como se observa en la

Figura 4.3, que presenta la respuesta de la $\tan(\delta)$ en función de la frecuencia asociada a la permitividad para cada concentración de la Figura 4.2. Es claro que en esta ventana de frecuencias de medición, prácticamente sólo es posible ver el inicio de los procesos de relajación iónicos, a diferencia del caso del agua, que se observa completamente, con un tiempo de respuesta aproximado de $3,3 \times 10^{-4}$ s. Nótese también que al depender de la concentración, tanto la permitividad como la $\tan(\delta)$ tienen un comportamiento que depende a su vez del pH de la solución.

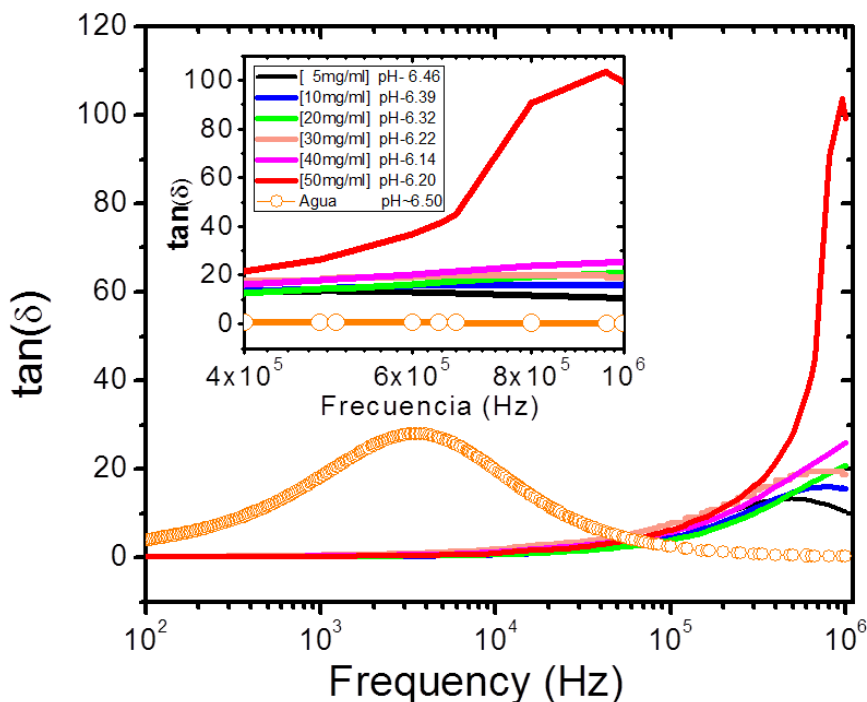


Figura 4.3: Factor de disipación como función de la frecuencia de la ovoalbúmina a diferentes concentraciones. Se muestra también la señal del agua (en círculos naranjas) para fines comparativos.

Encontramos que el comportamiento dieléctrico de la proteína lisozima es notablemente diferente al de la ovoalbúmina (ver Figura 4.4a). A bajas frecuencias, la permitividad de la lisozima es menor comparada a la de la ovoalbúmina y decrece en forma gradual. La respuesta del factor de disipación asociado se presenta en la Figura 4.4b. A diferencia de la ovoalbúmina, en esta ventana de medición observamos claramente los picos de relajación iónica casi por completo. Notemos que mientras la ovoalbúmina muestra que la amplitud de

sus picos depende de la concentración, en el caso de la lisozima, la amplitud prácticamente no cambia; sin embargo, el tiempo de respuesta de los iones que dependen de la concentración de la solución es mayor que el caso de la ovoalbúmina; es decir, la contribución de los iones del agua en bulto y de los protones de los aminoácidos, se va extinguendo a la par, lo que ocurre a frecuencias menores que en el caso de la ovoalbúmina.

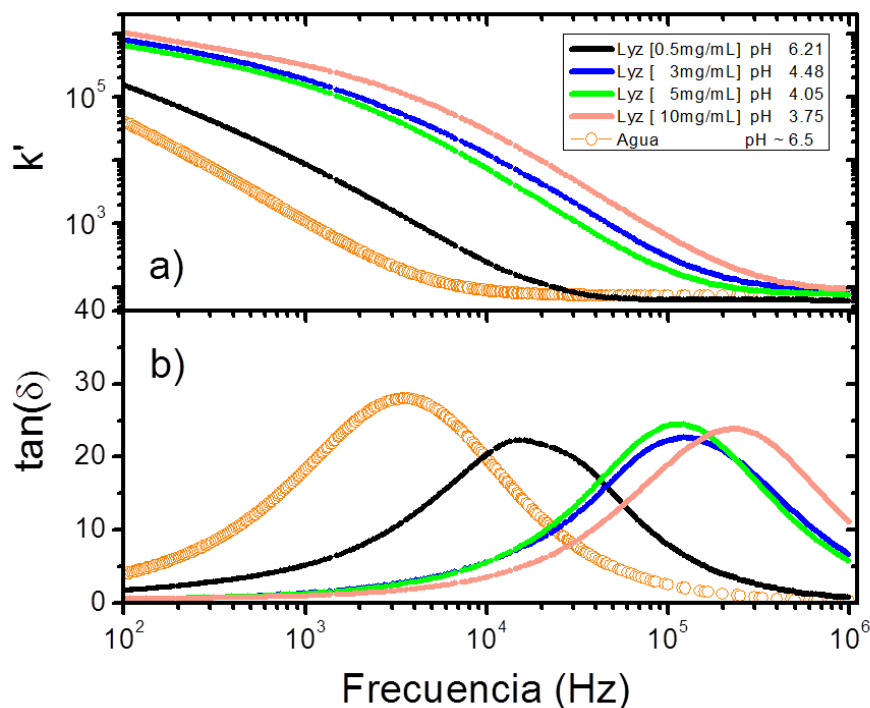


Figura 4.4: Permitividad relativa (a) y $\tan(\delta)$ (b) en función de la frecuencia de la proteína lisozima a diferentes concentraciones.

Las proteínas en su forma nativa se encuentran plegadas. Una pregunta natural a responder es: ¿cómo son los mecanismos dieléctricos de la proteína si todos los aminoácidos que la componen están expuestos a las moléculas de agua; es decir, cuando la proteína está desnaturalizada (desdoblada)?

En la Figura 4.5 se presenta la permitividad relativa de la ovoalbúmina nativa y desnaturalizada a una concentración fija, en función de la frecuencia del campo aplicado. Se observa que en el caso de la proteína desnaturalizada, a frecuencias más bajas, esta propiedad va aumentando hasta llegar a ser un orden de magnitud más grande que en el caso de la proteína nativa. La explicación es que ahora los aminoácidos han quedado más

expuestos al agua y el transporte de protones entre ellos es facilitado. Notoriamente, a medida que la frecuencia aumenta, la caída en el proceso iónico es más pronunciada que en el caso de la muestra nativa, lo cual se explica porque en ésta última existen más vías en las cuales los protones se pueden transferir por medio de alambres.

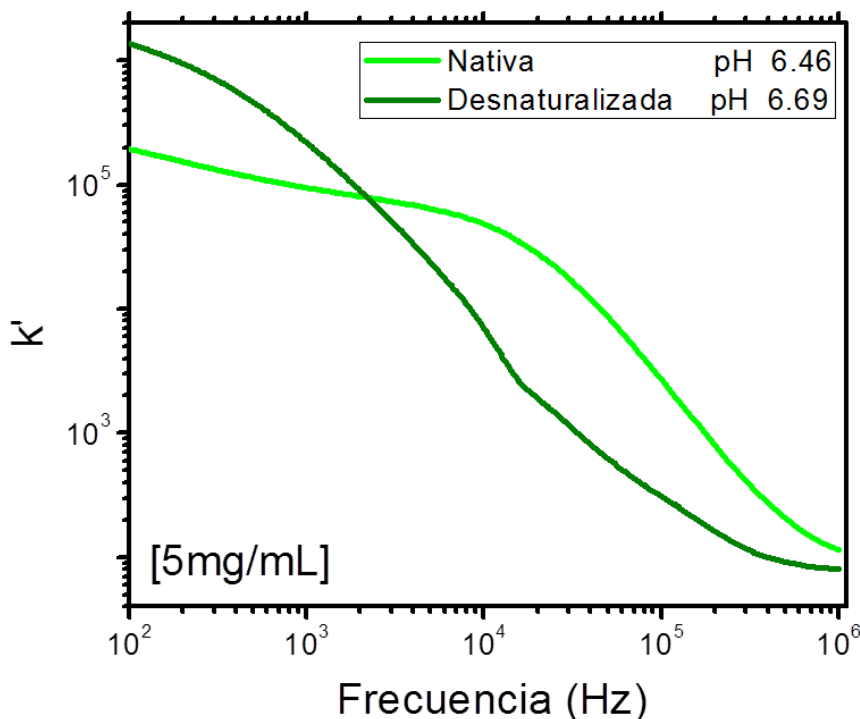


Figura 4.5: Constante dieléctrica de la ovalbúmina nativa y desnaturada en función de la frecuencia. La proteína se desnaturizó por temperatura a 90°C durante 9 min.

Al desnaturar la lisozima nos percatamos de que el perfil obtenido para dicha proteína en su forma nativa y desnaturada no cambiaba. Esto nos llevo a realizar un mayor número de mediciones, aumentando también la temperatura a la que se sometía antes de las mediciones dieléctricas. Sin embargo, encontramos problemas de reproducibilidad. Por ello no era posible asegurar que la proteína se encontraba en su forma desnaturada o nativa. Para resolver este problema realizamos un estudio calorimétrico de la proteína, que consistió en someter a la proteína a un incremento gradual de temperatura, luego enfriarla, y nuevamente repetir el proceso diez veces, midiendo su capacidad calorífica.

En la Figura 4.6 observamos el comportamiento calorimétrico de la lisozima durante

10 barridos. Se presenta la capacidad calorífica a presión constante (C_p) en función de la temperatura ($T^{\circ}C$). Observamos que para el primer barrido (en color negro), se da una pre-tansición de fase alrededor de $55^{\circ}C$ y su punto de transición de fase (T_m) principal es alrededor de $77^{\circ}C$. Esta es la temperatura a la cual la proteína cambia de fase, es decir, hay un reordenamiento en la cadena de aminoácidos de dicha proteína. Es claro que son necesarios más de 10 barridos para que la proteína se desnaturalice, ya que después de cada escaneo, la proteína se dejaba enfriar y ésta volvía a su configuración similar a su estado nativo.

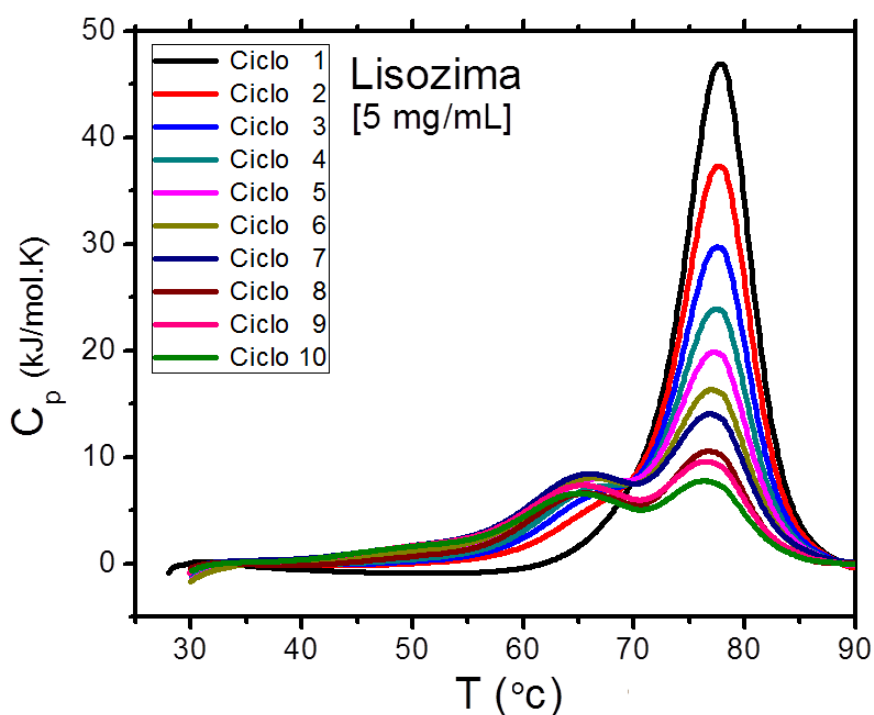


Figura 4.6: Termograma de la proteína lisozima durante 10 barridos consecutivos.

Los resultados obtenidos por calorimetría para la lisozima nos llevan a concluir que en los experimentos realizados por espectroscopia dieléctrica en la lisozima, a pesar de que dicha proteína se sometió a un proceso de desnaturalización, ésta se encontraba en su forma nativa. Por otro lado, estos resultados confirman la naturaleza del estado de la ovoalbúmina, es su forma nativa y desnaturalizada.

Regresando los resultados de la ovoalbúmina, para entender de forma más profunda el comportamiento dieléctrico de esta proteína en su forma nativa y desnaturalizada, decidimos

estudiar sus aminoácidos en forma aislada.

En la Figura 4.7a se presenta la respuesta de la permitividad relativa en función de la frecuencia de diferentes aminoácidos a la misma concentración, 38 mM, sin regular el pH. Se puede apreciar que la mayoría de los aminoácidos estudiados tienen una respuesta en la permitividad relativa semejante a la del agua. Sin embargo, notamos que en el ácido glutámico es mucho más alta, y la señal tiene otro perfil. Lo anterior significa que, en todos los aminoácidos medidos, el comportamiento iónico es más acentuado que en el agua, dando como resultado una mayor acumulación de carga en los electrodos (como se puede ver en las frecuencias bajas). En el caso del ácido glutámico, lo que ocurre es que además de mostrar un aumento en el número de protones (el pH bajó), se presenta una transferencia rápida de protones. En la Figura 4.7b se muestra el factor de disipación en función de la frecuencia, correspondiente a los casos anteriores. En todos los casos se muestra un cambio en la curva de disipación justo en la región donde la actividad iónica termina y comienza la actividad dipolar. Particularmente observamos que para el ácido glutámico el cambio en la curva de la $\tan(\delta)$ se recorre a la derecha en el rango de frecuencias, y éste corresponde al desplazamiento, del perfil de la permitividad relativa, observado en la Figura 4.7a.

Es importante recalcar que la interacción entre el aminoácido y el agua induce un cambio en el pH. Si se introduce un agente que controle el pH no se observaría de forma directa la interacción aminoácido-agua, sino aminoácido-agente-agua. Durante los experimentos, encontramos que el valor en el pH de todos los aminoácidos fueron cercanos a su punto isoeléctrico (pI).

La Figura 4.7a muestra que el ácido glutámico tiene una clara influencia en el comportamiento dieléctrico de la proteína ovoalbúmina (ver Figura 4.5). Esto podría esperarse, pues además de que el ácido glutámico en solución tiene un valor de pH menor que el resto, ocupa el tercer lugar en contribución en la proteína con respecto al resto de los aminoácidos.

A continuación se presenta de forma individual el comportamiento dieléctrico de 4 aminoácidos mostrados en la Figura 4.7.

La alanina y la leucina son aminoácidos que, clasificados por su cadena lateral, pertenecen

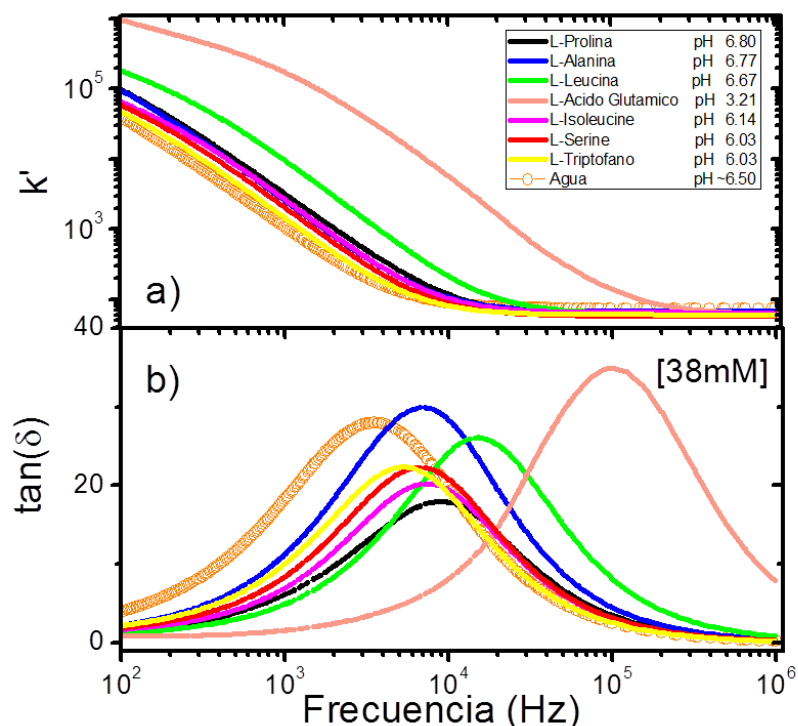


Figura 4.7: Permitividad relativa (a) y factor de disipación (b) en función de la frecuencia de siete aminoácidos de la ovoalbúmina a 38 mM.

al grupo de aminoácidos apolares alifáticos. Aparecen con mayor frecuencia en la estructura primaria de una muestra de 1,150 proteínas. Ambos aminoácidos no tienen ningún donante de hidrógeno o átomos aceptores de hidrógeno en sus cadenas laterales, pero sí en sus grupos carboxil y amino. Los aminoácidos no polares tienden a agrupar sus cadenas laterales, hidrocarbonadas, en el interior de las proteínas y frecuentemente están unidas por interacciones de Van der Waals. En la Figura 4.8 (a) y (c) observamos la permitividad relativa de la alanina (izquierda) y leucina (derecha) en función de la frecuencia. A medida que aumenta la concentración, la permitividad relativa aumenta, en ambos aminoácidos con respecto al agua. Notamos que la permitividad relativa de la alanina es ligeramente mayor que la leucina, para concentraciones comparables. Aunque ambos aminoácidos son clasificados como hidrófobos, la leucina lo es más que la alanina y la permitividad relativa de estos aminoácidos es consecuencia de las interacciones entre sus grupos amino y carboxil con moléculas de agua, ya que sus cadenas laterales al ser hidrocarbonadas, no interactúan con moléculas de agua. Se aprecia que el comportamiento iónico de la alanina se extiende más

que en el caso de la leucina, y también los valores ligeramente más altos a bajas frecuencias muestran una mayor acumulación de carga en los electrodos cuando se trata de la alanina. En la Figura 4.8 (b) y (d) observamos la $\tan(\delta)$ en función de la frecuencia para distintas concentraciones de alanina (izquierda) y leucina (derecha). En el caso de la alanina estas curvas cambian su amplitud y disminuyen el tiempo de respuesta iónico al aumentar la concentración, probablemente se debe a que el transporte de protones se facilita cuando la concentración de la solución es mayor. Mientras que en la leucina, el perfil de la curva prácticamente no cambia, ni tampoco es más rápida la respuesta al campo aplicado cuando hay un aumento en la concentración de la solución.

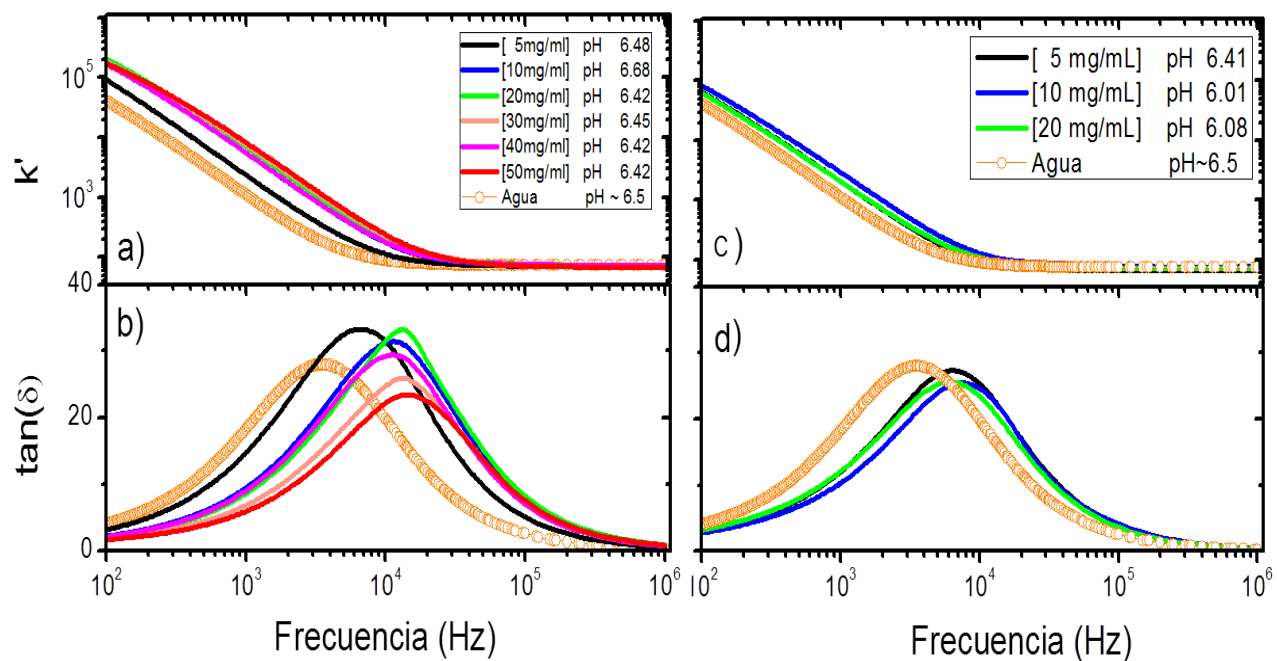


Figura 4.8: Constante dieléctrica (a) y (c) y $\tan(\delta)$ (b) y (d) en función de la frecuencia de los aminoácidos alanina (izquierda) y leucina (derecha), respectivamente a diferentes concentraciones.

El aminoácido serina, clasificado por su cadena lateral, pertenece al grupo R polar sin carga. Esta clase de aminoácidos son más solubles en agua, o más hidrofílicos que los aminoácidos apolares, debido a que contienen grupos funcionales que forman puentes de

hidrógeno con el agua. La polaridad de la serina proviene del grupo hidroxilo (OH) de su cadena lateral, mismo que le permite interactuar por medio de puentes de hidrógeno con moléculas de agua, al igual que sus grupos carboxil y amino. Este aminoácido, entre otros, usualmente se ubica en la superficie de las proteínas. En la Figura 4.9 se observa la permitividad relativa (a) y el factor de disipación (b) en función de la frecuencia para diferentes concentraciones de la serina. La permitividad relativa de este aminoácido aumenta ligeramente al aumentar la concentración y solo hay un ligero aumento en el tiempo de respuesta iónica cuando se aplica el campo externo a la solución.

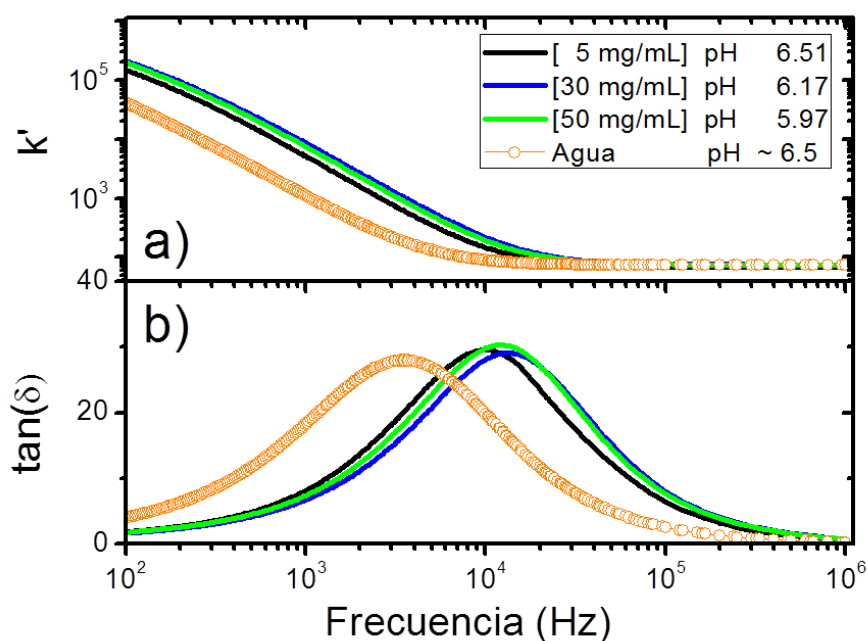


Figura 4.9: Permitividad relativa y (b) $\tan(\delta)$ en función de la frecuencia del aminoácido serina en distintas concentraciones.

Anteriormente nos preguntábamos acerca del particular comportamiento del ácido glutámico, para ello también realizamos una serie de experimentos. La solubilidad en agua de este aminoácido es de 8.6 mg/mL, esto es equivalente a 58 mM. Debido a su baja solubilidad en comparación con los otros aminoácidos, se realizaron experimentos con concentraciones por debajo de 38 mM. Este aminoácido, clasificado por su cadena lateral, pertenece al grupo R cargado negativamente y contiene un segundo grupo carboxil que le permite aceptar átomos de hidrógeno. El ácido glutámico y el ácido aspártico son hidrofílicos, usualmente

se encuentran cerca de la superficie de las proteínas y pueden ser involucrados en enlaces iónicos (a través de atracción electrostática). En la Figura 4.10 se observa la permitividad relativa (a) y la $\tan(\delta)$ (b) en función de la frecuencia para distintas concentraciones del ácido glutámico. Como se esperaría, a medida que disminuimos la concentración, el perfil del ácido glutámico tiene mayor similitud con el del agua, y el pH va en aumento. La alta permitividad relativa de este aminoácido puede deberse a una alta interacción con moléculas de agua, no sólo de los grupos carboxil y amino, sino también de su grupo carboxil ubicado en su cadena lateral; siendo ésta una interacción significativa aún para concentraciones pequeñas. En la Figura 4.10 (b) podemos observar como la curva del factor de disipación se recorre a la derecha en el rango de frecuencias, disminuyendo los tiempos de respuesta en poco más de un orden de magnitud, a medida que aumenta la concentración del aminoácido. Nuevamente, como en otros casos discutidos, esto pudiera deberse a que más moléculas del aminoácido con la misma cantidad de moléculas de agua, facilitan el transporte de iones dando una respuesta más rápida al aumentar la frecuencia del campo eléctrico externo. También puede ser un indicio de que el segundo grupo carboxil de este aminoácido está promoviendo la difusión iónica de protones retrasando cada vez más el mecanismo dipolar.

Nos preguntamos, si el comportamiento de este aminoácido es debido a una alta concentración de protones en el medio, es decir porque presenta un pH bajo; o bien este comportamiento es debido a algún mecanismo de transporte rápido de protones. Para contestar esta pregunta, se realizó un experimento con una solución de HCl a 1 mM con el objetivo de acercar el valor del pH del agua al valor del pH del ácido glutámico. De la misma forma se comparó al ácido aspártico con las soluciones anteriores, ya que estos dos aminoácidos pertenecen al grupo de aminoácidos.

En la Figura 4.11 (a) observamos la permitividad relativa en función de la frecuencia del HCl (color negro), el ácido glutámico (color rojo) y el ácido aspártico (color verde). Podemos observar que los aminoácidos y el HCl tienen valores de pH cercanos; también podemos notar que ambos aminoácidos presentan perfiles muy similares en comparación con el HCl. En la Figura 4.11 (b) observamos la $\tan(\delta)$ en función de la frecuencia del el HCl (color negro), el ácido glutámico (color rojo) y el ácido aspártico (color verde). Observamos que el cambio en

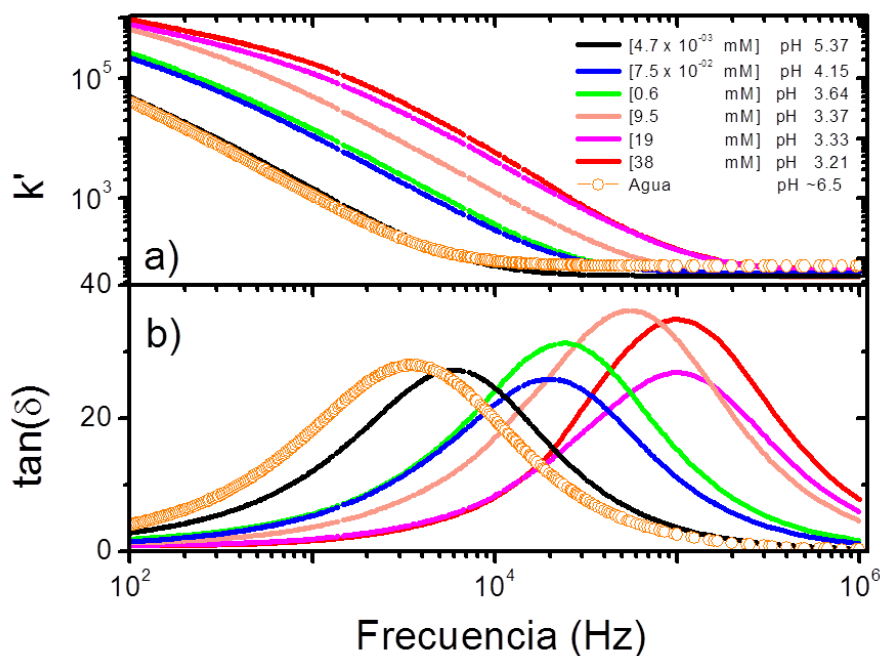


Figura 4.10: Permitividad relativa (a) y $\tan(\delta)$ (b) en función de la frecuencia del ácido glutámico a distintas concentraciones. Se incluye el agua para efectos comparativos.

la curva de la $\tan(\delta)$ del HCl ocurre en regiones de frecuencia cercanas al de los aminoácidos, este cambio corresponde a un cambio en el mecanismo dieléctrico. El tiempo de respuesta de estos aminoácidos (aproximadamente de 1×10^{-5} s) es más rápido comparado con los aminoácidos mostrados anteriormente.

En el capítulo 2.1 se indicaron los mecanismos de transferencia de protones de el compuesto HCl. El comportamiento dieléctrico, tan similar, del HCl y del ácido glutámico sugieren que en éste último hay una transferencia de protones similar al HCl, facilitada por una red de puentes de hidrógeno alrededor del compuesto y como consecuencia de ello ocurre una difusión de protones a través de estos puentes de hidrógeno; es decir, hay un transporte virtual de cargas (mecanismo de Grotthus) entre las moléculas del aminoácido y las moléculas de agua.

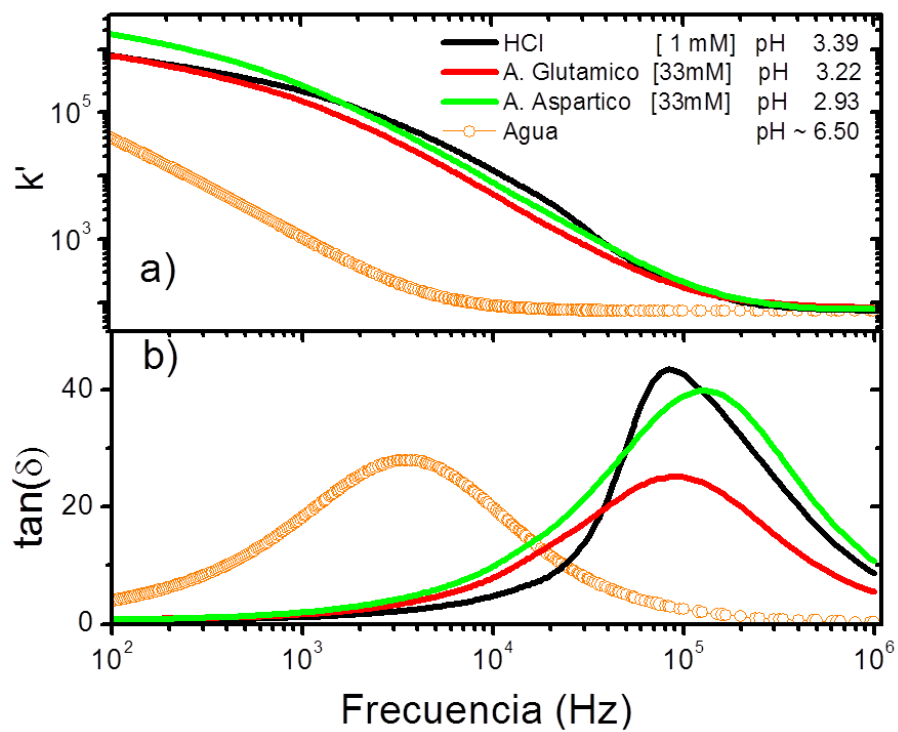


Figura 4.11: Permitividad relativa (a) y $\tan(\delta)$ (b) en función de la frecuencia del ácido glutámico, ácido aspártico y HCl. Se incluye el agua para efectos comparativos.

5

Conclusiones

En este trabajo se estudiaron las propiedades dieléctricas de soluciones acuosas de ovoalbúmina y 7 de sus aminoácidos que la componen, usando espectroscopía dieléctrica en el rango de frecuencias de $10^2 - 10^6 Hz$. De los resultados obtenidos y discutidos en el capítulo anterior, las conclusiones son las siguientes:

- La respuesta dieléctrica de un aminoácido depende de la concentración de éste en la solución acuosa y de las propiedades de sus cadenas laterales. Una mayor concentración aumenta la región de respuesta iónica, y por ende, la acumulación de carga (polarización de electrodos).
- El aumento en la respuesta iónica sugiere que en una concentración alta en aminoácidos, se facilita el transporte de cargas entre las moléculas de agua y el aminoácido, por medio de alambres.
- La amplia respuesta iónica y la alta respuesta dieléctrica a bajas frecuencias de la solución de ácido aspártico y glutámico, puede deberse no solamente a que existe un aumento en la cantidad de protones (bajo pH) respecto al resto de los aminoácidos, sino que además, este aumento hace más eficaz el transporte de cargas por medio de alambres.
- La permitividad relativa de la ovoalbúmina desnaturalizada a frecuencias bajas, es un orden de magnitud más grande que en el caso de la proteína nativa. Esto es debido

a que los aminoácidos han quedado expuestos a moléculas de agua incrementando la interacción entre moléculas por medio de puentes de hidrógeno. A frecuencias más altas el proceso iónico de la ovoalbúmina desnaturalizada decrece abruptamente, debido a que existen más vías donde los protones se pueden transferir por medio de alambres.

- La respuesta dieléctrica de la proteína ovoalbúmina está determinada en gran medida por el comportamiento del ácido glutámico.
- La permitividad relativa de la proteína lisozima, a diferencia de la ovoalbúmina, decrece gradualmente. Los picos de relajación iónica indican que los tiempos de relajación en la lisozima son más lentos a comparación que los de la proteína ovoalbúmina.

A pesar de que casi en su totalidad, los estudios de proteínas y aminoácidos con espectroscopía dieléctrica son realizados en altas frecuencias (arriba de 1 MHz), la investigación en frecuencias más bajas muestra que es posible obtener información sobre las interacciones entre dichas moléculas y el agua, como la información sobre los mecanismos dieléctricos que sólo ocurren en este rango de frecuencias. Por supuesto, quedan muchos detalles que se deben explorar, los cuales se pueden ir abordando con apoyo de otros equipos y técnicas experimentales, y de simulación molecular.

Bibliografía

- [1] HALLE, B., «Protein hydration dynamics in solution a critical survey», *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences*, vol. 359, pág. 1207-1224, 2004.
- [2] RUPLEY, J. A. y CARERI, G., «Protein hydration and function.», *Advances in Protein Chemistry*, vol. 41, pág. 37, 1991.
- [3] BALL, P., «Water as an active constituent in cell biology», *Chemical reviews*, Vol. 108, pág. 74-108, 2008.
- [4] PETHIG, R., «Dielectric properties of biological materials: Biophysical and medical applications», *Electrical Insulation, IEEE Transactions*, no.5, pág. 453-474, 1984.
- [5] FRAUENFELDER, H., CHEN, G., BERENDZEN, J., FENIMORE, P. W. , JANSSON, H., MCMAHON, B. H., STROE, I. R., SWENSON, J. y YOUNG, R. D., «A unified model of protein dynamics», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 106, pág. 5129-5134, 2009.
- [6] BAGCHI, B., «Water dynamics in the hydration layer around proteins and micelles», *Chemical Reviews*, Vol. 105, pág. 3197-3219, 2005.
- [7] CHEN, J., BROOKS, I. y CHARLES, L. «Implicit modeling of nonpolar solvation for simulating protein folding and conformational transitions», *Physical Chemistry Chemical Physics*, Vol. 10, págs. 471-481, 2008.
- [8] BIZZARRI, A. R. y CANNISTRARO, S. «Molecular dynamics of water at the protein-solvent interface», *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 106, págs. 6617-66331, 2002.

- [9] CARERI, G., GIANSANTI, A. y GRATTON, E. «Lysozyme film hydration events: an IR and gravimetric study», *Biopolymers*, Vol. 18, págs. 1187-1203, 1979.
- [10] SVERGUN, D.I., RICHARD, S. y ZACCAI, G. «Protein hydration in solution: experimental observation by x-ray and neutron scattering», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 95, págs. 2267-2272, 1998.
- [11] WOLF, M., GULICH, R. y LOIDL, A. «Relaxation dynamics of a protein solution investigated by dielectric spectroscopy», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, Vol. 1824, págs. 723-730, 2012.
- [12] YOKOYAMA, K., KAMEI, T., MINAMI, H. y SUZUKI, M. «Hydration study of globular proteins by microwave dielectric spectroscopy», *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 105, págs. 12622-12627, 2001.
- [13] RODRÍGUEZ-ARTECHE, I., CERVENY, S., ALEGRÍA, A. y COLMENERO, J. «Dielectric spectroscopy in the GHz region on fully hydrated zwitterionic amino acids», *Physical Chemistry Chemical Physics*, Vol. 14, págs. 11352-11362, 2012.
- [14] SUHERMAN, P., TAYLOR, P. y SMITH, G. «Low frequency dielectric study on hydrated ovalbumin», *Journal of non-crystalline solids*, Vol. 305, págs. 317-321, 2002.
- [15] «IUPAC Compendium of Chemical Terminology», págs 1398.
- [16] FRANKS, F., «Water A Comprehensive Treatise: Aqueous Solutions of Amphiphiles and Macromolecules», *Springer Science and Business Media*, Vol. 4, 2013.
- [17] LODISH y HARVEY, «Molecular cell biology», *MacMillan*, 2008.
- [18] CRICK, F. ET. AL, «Central dogma of molecular biology», *Nature*, Vol.227, págs. 561-563, 1970.
- [19] MARÉCHAL, Y., «The hydrogen bond and the water molecule: The physics and chemistry of water, aqueous and bio-media», *Elsevier*, 2006.

- [20] AULT, B. S. PIMENTEL, G. C., «Infrared spectra of the ammonia-hydrochloric acid complex in solid nitrogen», *The Journal of Physical Chemistry*, Vol.77, págs. 1649-1653, 1973.
- [21] HOWARD, N.W. y LEGON, A.C., «Nature, geometry, and binding strength of the ammonia-hydrogen chloride dimer determined from the rotational spectrum of ammonium chloride vapor», *The Journal of Chemical Physics*, Vol.88, págs. 4694-4701, 1988.
- [22] ANDREWS, L., WANG, X. y MIELKE, Z., «Infrared spectrum of the H₃N-HCl complex in solid Ne, Ne/Ar, Ar, and Kr. Matrix effects on a strong hydrogen-bonded complex», *The Journal of Physical Chemistry A*, Vol.105, págs. 6054-6064, 2001.
- [23] BUCKINGHAM, A. D. , DEL BENE, J. E. y MCDOWELL, S., «The hydrogen bond», *Chemical Physics Letters*, Vol.463, págs. 1-10, 2008.
- [24] CAZAR, R. A., JAMKA, A. J. y TAO, F., «Ab initio investigation of proton transfer in ammonia-hydrogen chloride and the effect of water molecules in the gas phase», *The Journal of Physical Chemistry A*, Vol.102, págs. 5117-5123, 1998.
- [25] BICZYNSKO, M. y LATAJKA, Z., «The influence of water molecules on the proton position in H₃N-HX (X= F, Cl, Br) complexes», *Chemical Physics Letters*, Vol.313, págs. 366-373, 1999.
- [26] ZHUANG, W. y DELLAGO, C., «Dissociation of hydrogen chloride and proton transfer in liquid glycerol An ab initio molecular dynamics study», *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol.108, págs. 19647-19656, 2004.
- [27] XU, S., NILLES, J. M., BOWEN JR. y KIT H., «Zwitterion formation in hydrated amino acid, dipole bound anions: How many water molecules are required?», *The Journal of Chemical Physics*, Vol.119, págs. 10696-10701, 2003.

- [28] RAMAEKERS, R., PAJAK, J., LAMBIE, B. y MAES, G., «Neutral and zwitterionic glycine. H (2) O complexes: A theoretical and matrix-isolation Fourier transform infrared study.», *The Journal of Chemical Physics*, Vol.120, págs. 4182-4193, 2004.
- [29] FERNÁNDEZ-RAMOS, A., SMEDARCHINA, Z., SIEBRAND, W. y ZGIERSKI, M. Z., «A direct-dynamics study of the zwitterion-to-neutral interconversion of glycine in aqueous solution», *The Journal of Chemical Physics*, Vol.113, págs. 9714-9721, 2000.
- [30] ANDO, K. y HYNES, J. T., «Molecular mechanism of HCl acid ionization in water: Ab initio potential energy surfaces and Monte Carlo simulations», *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol.101, págs. 10464-10478, 1997.
- [31] EVANS, M. W., «Three principles of group theoretical statistical mechanics», *Physics Letters A*, Vol. 134, págs. 409-412, 2005.
- [32] BLYTHE, A. R. y BLOOR, D., «Electrical properties of polymers», *Cambridge University Press*, 2005.
- [33] CALUS, S., KITYK, A. V., EICH, M. y HUBER, P., «Inhomogeneous relaxation dynamics and phase behaviour of a liquid crystal confined in a nanoporous solid», *Soft matter*, Vol. 11, págs. 3176-3187, 2015.
- [34] VON HIPPEL, A. R. y MORGAN, S. O., «Dielectrics and waves», *Journal of the Electrochemical Society*, Vol. 102, págs. 68c-68c7, 1955.
- [35] VOLKOV, A. A. y PROKHOROV, A. S., «Broadband dielectric spectroscopy of solids», *Radiophysics and Quantum Electronics*, Vol. 46, págs. 657-665, 2003.
- [36] SILLARS, R. W., «The properties of a dielectric containing semiconducting particles of various shapes», *Wireless Section, Proceedings of the Institution of Electrical Engineers*, Vol. 12, págs. 139-155, 1937.
- [37] JANSSON, H., BERGMAN, R. y SWENSON, J., «Hidden slow dynamics in water», *Physical Review Letters*, Vol. 104, págs. 17802, 2010.

- [38] ANGULO-SHERMAN, A. y MERCADO-URIBE, H., «Dielectric spectroscopy of water at low frequencies: The existence of an isopermitive point», *Chemical Physics Letters*, Vol. 503, págs. 327-330, 2010.
- [39] LEVITT, M. y SHARON, R., «Accurate simulation of protein dynamics in solution», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 85, págs. 7557-7561, 1988.
- [40] GÓMEZ-GALVÁN, F., LARA-CENICEROS, T. y MERCADO-URIBE, H. «Device for simultaneous measurements of the optical and dielectric properties of hydrogels», *Measurement Science and Technology*, Vol. 23, págs. 025602, 2012.