

00583  
2



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**SOLUBILIDAD Y EFECTO HIDROFÓBICO. ESTUDIO TERMODINÁMICO DE LA DISOLUCIÓN DE SOLUTOS NO POLARES EN AGUA Y EN DISOLUCIONES ACUOSAS DE ESTABILIZANTES Y DE DESESTABILIZANTES DE PROTEÍNAS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS  
(FISICOQUÍMICA)

PRESENTA

ERNESTO CARRILLO NAVA

MÉXICO, D.F.

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradezco al Dr. Vladimír Dohnal el tiempo, la dedicación que me brindó y la calurosa hospitalidad que pude disfrutar durante mis dos estancias de investigación, en el laboratorio a su cargo en Vysoká škola chemicko-technologická v Praze (VŠCHT).

Quiero agradecer muy especialmente a mi director de tesis, el Dr. Miguel Costas por su invaluable guía y apoyo, tanto en asuntos de orden académico como práctico.

Quiero aprovechar esta oportunidad para agradecer a cada uno de los integrantes del comité tutorial por el tiempo invertido en el seguimiento y en la orientación del desarrollo de este proyecto. Así mismo, a los miembros del jurado por sus valiosas sugerencias y fructíferas discusiones que ayudaron a darle forma final a este trabajo. Varios puntos importantes que no habían sido suficientemente atendidos pudieron ser identificados y corregidos gracias a ellos.

Durante la realización de este trabajo recibí el apoyo económico de: Fundación UNAM, la Dirección General de Estudios de Posgrado, DGAPA y el proyecto de cooperación científica checo-mexicano (Ministerio de Educación de la República Checa – CONACYT), a quienes estoy muy agradecido.

Solubilidad y efecto hidrofóbico. Estudio termodinámico de la disolución de solutos no polares en agua y en disoluciones acuosas de estabilizantes y de desestabilizantes de proteínas.

**Ernesto Carrillo Nava**

Laboratorio de Termofísica  
Departamento de Física y Química Teórica  
Facultad de Química, UNAM  
México, D. F. 04510 México

### Resumen

El llamado *efecto hidrofóbico* juega un papel muy importante en una variedad de fenómenos, tales como la baja solubilidad de los solutos no polares en disoluciones acuosas, el plegamiento y asociación de proteínas, la agregación de moléculas anfífilas en micelas y la formación de membranas biológicas. Para incrementar el conocimiento existente sobre el efecto hidrofóbico, es de interés fundamental la determinación experimental, de alta precisión, de las propiedades termodinámicas de compuestos no polares en agua y en disoluciones acuosas. En este trabajo, se determinaron los coeficientes de actividad a dilución infinita,  $\gamma_1^\infty$ , del benceno y el tolueno en agua y en disoluciones acuosas de los siguientes compuestos: urea, cloruro de guanidina, glicerol, etilenglicol, glucosa, sacarosa y trehalosa (estas últimas cinco, sólo para tolueno). A estas sustancias se les denominó modificadores. Las mediciones se realizaron en el intervalo de temperatura 268 – 323 K. Se emplearon disoluciones acuosas de urea, cloruro de guanidina y glicerol a distintas concentraciones desde 0.5 M a 5.0 M. En el caso de urea y cloruro de guanidina, estas concentraciones cubren el intervalo en el cual estos compuestos desnaturalizan a las proteínas. Mientras que para el caso del glicerol, abarcan el intervalo empleado para estabilizar la estructura terciaria y/o cuaternaria de las proteínas. Se empleó una concentración única en el caso de las disoluciones acuosas de etilenglicol, glucosa, sacarosa (1.5 M) y trehalosa (0.5 M). A temperatura ambiente, los valores de  $\gamma_1^\infty$  para el benceno y el tolueno en agua presentan un máximo. La presencia de los modificadores urea, cloruro de guanidina y glicerol producen un decremento significativo en los valores de los  $\gamma_1^\infty$  *i.e.*, aumentan la solubilidad de benceno y tolueno respecto a la que tienen en agua pura. Este efecto se acentúa al aumentar la concentración del modificador en la disolución acuosa. En el caso de la glucosa a la concentración 1.5 M, su presencia aumenta el valor de  $\gamma_1^\infty$  (solubiliza menos

soluto no polar en comparación al agua pura); mientras que el etilenglicol a la misma concentración, provoca una disminución en  $\gamma_1^\infty$ . Para el glicerol, la sacarosa y la trehalosa, se observan intervalos de temperatura en donde la presencia del modificador incrementa  $\gamma_1^\infty$  del tolueno y otras en las que disminuye  $\gamma_1^\infty$ . Todos los resultados experimentales fueron analizados a dos niveles, a saber: (i) el macroscópico, empleando las herramientas de la termodinámica clásica y (ii) el microscópico, empleando un modelo molecular desarrollado en este trabajo. En el primer nivel se obtuvo una visión general del comportamiento de los sistemas estudiados (contribuciones entálpicas y entrópicas, por ejemplo). Mientras que en el segundo nivel, el modelo molecular describe bien las dependencias con temperatura y concentración de la energía de Gibbs de disolución y de transferencia del soluto (benceno, tolueno y los alcanos más pequeños) del agua pura a la mezcla agua + modificador. Los parámetros del modelo poseen un significado físico claro, lo que permite una discusión sobre las interacciones moleculares relevantes en la solubilidad de los solutos no polares. El modelo indica que las interacciones entre los modificadores y el soluto son desfavorables, pero más favorables que las existentes entre el soluto y el agua. Por esto, los modificadores son capaces de incrementar la solubilidad del soluto no polar en agua. A lo largo del trabajo se establecen las conexiones e implicaciones pertinentes entre los datos obtenidos y su análisis con las situaciones observadas en los fenómenos de estabilización y desestabilización de las proteínas.

## Abstract

The so called *hydrophobic effect* plays an important role in a great variety of phenomena, such as the low solubility of non-polar solutes, the folding of proteins, the aggregation of amphiphilic molecules and the formation of biological membranes. To increase the current knowledge of the hydrophobic effect, the experimental determination with high accuracy of the thermodynamic properties of non-polar compounds in water and aqueous solutions is of great interest. In this work, the activity solutions at infinite dilution,  $\gamma_1^\infty$ , of benzene and toluene in water and in aqueous solutions of urea, guanidine hydrochloride, glycerol, ethylene glycol, glucose, sucrose and trehalose (these last five only in the case of toluene) were measured. These measurements were performed in the temperature range 268 – 323 K. Aqueous solutions of urea, guanidine hydrochloride and glycerol at concentrations from 0.5 to 5.0 M were used. In the case of urea and guanidine hydrochloride, these concentrations cover the range where proteins undergo denaturation, while in the case of glycerol, they cover the range used to stabilize the tertiary and/or quaternary structure of proteins. A single concentration was used in the case of ethylene glycol, glucose, sucrose (1.5 M) and trehalose (0.5 M). At room temperature, a maxima in  $\gamma_1^\infty$  for benzene and toluene is observed. The presence of the modifiers urea, guanidine hydrochloride and glycerol produces a significant decrease in the values of  $\gamma_1^\infty$  *i.e.*, they increase the solubility of benzene and toluene in comparison to pure water. The effect is more pronounced as the concentration of the modifier increases. At all temperatures studied, the presence of ethylene glycol also decreases the  $\gamma_1^\infty$  values. On the other hand, glucose shows the opposite effect *i.e.*, it solubilizes less toluene than pure water. For the modifiers glycerol, sucrose and trehalose, there is a temperature range where the  $\gamma_1^\infty$  values of toluene increases, and other where it decreases. All the experimental results were analyzed at two levels: (i) macroscopic, using classical thermodynamics tools and (ii) microscopic, using a molecular model developed in this work. At the macroscopic level, a general vision of the behaviour of the systems studied was achieved, while at the microscopic level, the molecular model describes the temperature and concentration dependences of the Gibbs energy of solution and transfer of the solute (benzene, toluene and the lower alkanes) from pure water to the water + modifier mixture. The model parameters have a clear physical significance, allowing a discussion of the molecular interactions involved. The interactions between the modifiers and the solute are unfavorable, but less favorable are the solute – water interactions. Therefore, the modifiers are capable of increasing the solubility of non polar compounds in water. Through out this work, the links between the measured data and their analysis with the phenomena of protein denaturation are established.

## Contenido

1. Introducción . . . . .	1
2. Objetivos . . . . .	5
3. El efecto hidrofóbico . . . . .	7
3.1. Caracterización termodinámica . . . . .	8
3.1.1. El coeficiente de actividad a dilución infinita . . . . .	9
3.2. El agua . . . . .	11
3.3. Estudios teóricos sobre el efecto hidrofóbico . . . . .	13
3.3.1. Modelos de mezcla . . . . .	14
3.4. Estructura y solubilidad de las proteínas globulares . . . . .	16
4. Disoluciones acuosas de solutos no polares. Análisis termodinámico clásico . . . . .	20
4.1. Artículo # 1. Infinite dilution activity coefficients for benzene and toluene in water and in aqueous solutions of the protein denaturants urea and guanidine hydrochloride . . . . .	24
4.2. Artículo # 2. Infinte dilution activity coefficients for toluene in aqueous solutions of the protein stabilizers glycerol, ethylene glycol, glucose, sucrose and trehalose . . . . .	48
5. Disoluciones acuosas de solutos no polares. Análisis termodinámico molecular . . . . .	67
5.1. Artículo # 3. Non-polar solutes in water and in aqueous solutions of protein denaturants. Modeling of solution and transfer processes . . . . .	69
5.2. Tolueno en disoluciones acuosas de estabilizantes de proteínas . . . . .	90
5.2.1. Tolueno en disoluciones acuosas de glicerol . . . . .	90
5.2.2. Tolueno en disoluciones acuosas de glicerol, etilenglicol, sacarosa, glucosa y trehalosa . . . . .	91
6. Conclusiones . . . . .	94
6.1. Análisis termodinámico clásico . . . . .	94
6.2. Análisis termodinámico molecular . . . . .	95
6.3. Relación entre los resultados en sistemas modelo y la estabilización - desestabilización de proteínas . . . . .	96
7. Sugerencias para trabajo futuro . . . . .	98
7.1. Coeficientes de actividad a dilución infinita ( $\gamma_1^\infty$ ) . . . . .	98
7.2. Empleo del modelo termodinámico molecular . . . . .	99

## Apéndices:

A. Método de agotamiento con gas inerte . . . . .	100
A.1. Principio y teoría del método de agotamiento con gas inerte . . . . .	100
A.1.1. Cambio en el flujo del gas de arrastre debido a la saturación de la celda . . . . .	102
A.1.2. Remoción del disolvente debido a su volatilidad . . . . .	103
A.1.3. Cantidad de soluto en la fase vapor dentro de la celda . . . . .	103
A.1.4. No idealidad de la fase vapor . . . . .	104
A.2. Procedimiento experimental . . . . .	105
A.2.1. Materiales . . . . .	105
A.2.2. Arreglo experimental . . . . .	105
B. Análisis termodinámico clásico . . . . .	107
B.1. Obtención de la expresión del coeficiente de actividad a dilución infinita del soluto ( $\ln \gamma_1^\infty$ ) . . . . .	107
B.2. Obtención de la expresión del coeficiente de actividad a dilución infinita de transferencia del soluto ( $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$ ) . . . . .	108
C. Elementos del modelo de equilibrio químico para la esfera de hidratación (HSCE) . . . . .	110
C.1. Determinación de los parámetros geométicos del modelo HSCE . . . . .	111
C.2. Determinación de la contribución de interacción a la energía de Gibbs de disolución del soluto ( $\Delta_{sol} G_1^{int}$ ) . . . . .	112



# Capítulo 1

## Introducción

Existe una gran cantidad de información experimental, que relaciona a las interacciones hidrofóbicas con una gran variedad de procesos químicos y bioquímicos de complejidades variadas. Entre estos procesos podemos mencionar la solubilización de solutos no polares en agua,<sup>1</sup> los procesos reversibles de autoensamblaje de moléculas ó iones con grandes cadenas apolares ó grupos aromáticos, como es el caso de tensoactivos y fosfolípidos.<sup>2</sup> En un nivel más complejo, las interacciones entre los residuos no polares sujetos a una cadena polimérica pueden ayudar a promover cambios estructurales uno de cuyos ejemplos, el plegamiento de proteínas, es probablemente el más conocido.<sup>3-6</sup> También, las interacciones hidrofóbicas contribuyen al ensamblaje y mantenimiento de estructuras macromoleculares ordenadas ya sea que se trate de hélices simples, como el ácido poliglutámico o estructuras intermoleculares más complejas como las biomembranas. Además de su importancia en los procesos biológicos, el efecto hidrofóbico juega un papel relevante en varios fenómenos de disolución, tales como la flotación de minerales, la coagulación, complejación y detergencia. De hecho, las disoluciones acuosas de los compuestos hidrofóbicos han sido sujeto de estudio exhaustivo desde que se identificaron las propiedades termodinámicas que presentan tales disoluciones.<sup>7</sup>

Durante los últimos 40 años se ha sido realizado mucho trabajo, tanto experimental como teórico, sobre la termodinámica de las disoluciones acuosas de compuestos hidrofóbicos (no polares) o parcialmente hidrofóbicos.<sup>1</sup> De los resultados obtenidos en estos estudios, se puede concluir que las propiedades de estas disoluciones dependen esencialmente de dos características: (a) el arreglo geométrico o distribución de las moléculas interactuantes en el espacio y (b) la naturaleza y fuerza de las interacciones que se dan entre las moléculas. Estas características, que determinan el comportamiento de la disolución (estructura y fuerzas intermoleculares), son dependientes entre sí: la estructura está influenciada por las fuerzas intermoleculares y la entalpía de la disolución depende de la estructura. Por esta razón, sólo en sistemas y condiciones experimentales particulares es posible calcular, a

---

<sup>1</sup> W. Blokzijl, J. B. F. N. Engberts. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **32**, 1545 (1993).

<sup>2</sup> J. Israelachvili, H. Wennerström. *Biochemistry*, **29**, 7133 (1990).

<sup>3</sup> P. L. Privalov, S. J. Gill. *Adv. Protein Chem.*, **39**, 191 (1988).

<sup>4</sup> K. A. Dill. *Biochemistry*, **29**, 7133 (1990).

<sup>5</sup> *Protein Folding*. T. E. Creighton: Editor. Freeman: New York (1992).

<sup>6</sup> T. E. Creighton. *Proteins. Structure and Molecular Properties*. Freeman: New York (1993).

<sup>7</sup> J. A. V. Butler, W. S. Reid. *J. Chem. Soc.*, **2**, 1171 (1936).

partir de consideraciones estructurales únicamente, la entropía de mezclado. Mientras que para otros sistemas la entalpía de mezclado se puede calcular a partir de relaciones que describen las fuerzas intermoleculares. Los resultados obtenidos de este tipo de estudios, han servido para establecer modelos que representan el comportamiento de las disoluciones, los que sirven como guías para interpretar los resultados experimentales.

Las propiedades únicas del agua como compuesto puro y como disolvente, han hecho difícil el desarrollar un modelo molecular riguroso, para explicar las disoluciones acuosas de solutos no polares a partir de consideraciones mecánico-estadísticas. Una aproximación muy socorrida es la de dividir el proceso de disolución en varias etapas, aquella que involucra la reorganización o reestructuración de las moléculas del agua alrededor del soluto, es una de las más importantes. Frank y Evans fueron los primeros en sugerir que los solutos no polares promueven la estructuración de las moléculas de agua vecinas *i.e.*, el efecto iceberg.<sup>8</sup> El incremento de la capacidad calorífica y el decremento de la entropía, observados durante la disolución de los solutos no polares en agua, fueron explicados como resultado de un incremento en las interacciones del tipo puente de hidrógeno entre las moléculas de agua. Años más tarde, cuando el concepto de interacción hidrofóbica fue introducido,<sup>9</sup> la interacción promovida por la entropía entre las especies no polares fue explicada en términos de la liberación de moléculas de agua estructuradas, como resultado de la sobreposición destructiva de las esferas de hidratación hidrofóbica. Durante varias décadas, las investigaciones subsecuentes estuvieron inspiradas por estas interpretaciones.<sup>10-11</sup> Sin embargo, como resultado del empleo de técnicas experimentales y computacionales modernas, durante la última década surgieron dudas respecto a esas interpretaciones. Las técnicas computacionales han revelado que el agua no sufre un ordenamiento estructural significativo *i.e.*, un incremento en la formación de puentes de hidrógeno, en la esfera de hidratación del soluto no polar.<sup>12-14</sup> Ésta, en realidad mantiene en gran medida su estructura original, acomodando al soluto en su red tridimensional, sin tener que sacrificar un número significativo de puentes de hidrógeno. De manera experimental, con el desarrollo de fuentes de neutrones y de la instrumentación apropiada, con la técnica de difracción de neutrones es posible investigar de manera directa las perturbaciones del agua en las cercanías de grupos químicos no polares, polares y cargados. El estudio sobre la estructura del

---

<sup>8</sup> H. S. Frank, M. W. Evans. *J. Chem. Phys.*, **13**, 507 (1945).

<sup>9</sup> W. Kauzmann. *Adv. Protein Chem.*, **14**, 1 (1959).

<sup>10</sup> A. Pohorille, L. R. Pratt. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 5066 (1990).

<sup>11</sup> L. R. Pratt, A. Pohorille. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 2995 (1992).

<sup>12</sup> W. L. Jorgensen, J. Gao, C. Ravimohan. *J. Phys. Chem.*, **89**, 3470 (1985).

<sup>13</sup> B. Guillot, Y. Guissani, S. Bratos. *J. Chem. Phys.*, **95**, 3643 (1991).

<sup>14</sup> J. T. Slusher, P. T. Cummings. *J. Phys. Chem. B*, **101**, 3818 (1997).

agua en disoluciones acuosas de metanol, etanol, terbutanol y el ión tetrametilamonio mediante difracción de neutrones, reveló que existe una orientación paralela entre los enlaces O-H de las moléculas de agua y la superficie del grupo no polar metilo.<sup>15-18</sup> Los resultados confirman la idea general que la estructura, en las inmediaciones de los solutos no polares, se encuentra defectuosa o desordenada. Sin embargo, la orientación de estas moléculas de agua en la esfera de hidratación, no es significativamente diferente a la estructura que presenta el agua en el seno del líquido.

Actualmente, las propiedades termodinámicas que acompañan la disolución de un soluto no polar en agua son explicadas en términos de las interacciones de dispersión de London *i.e.*, las moléculas no polares tienden a evitar el medio acuoso que las rodea. Estas interacciones pueden ser importantes,<sup>19</sup> y son capaces de provocar una entalpía de disolución favorable y una reducción en los grados de libertad configuracional del agua, provocando una entropía de disolución desfavorable.<sup>20-21</sup> Es importante resaltar que las especies químicas no polares deben introducirse dentro de un líquido, que se caracteriza por su extensa red de puentes de hidrógeno y su extremadamente alta energía de cohesión. Por lo tanto, las interacciones hidrofóbicas no son promovidas por las interacciones favorables entre los solutos no polares, sino que son consecuencia del hecho que las moléculas de agua prefieren interactuar consigo mismas. A pesar de que reconocemos las distintas interacciones involucradas en el efecto hidrofóbico, hasta el momento no conocemos con precisión la manera en que los distintos grupos químicos interactúan con el agua.

En nuestro intento por contribuir a entender mejor, los efectos de los distintos modificadores sobre la estructura espacial de los péptidos y las proteínas, nos concentramos en estudiar pequeños solutos no polares en agua y en medios acuosos. Estas disoluciones son "sistemas modelo" que nos sirven para entender el papel que juegan los modificadores en el efecto hidrofóbico. Hemos elegido esta ruta por las siguientes razones:

- *i)* Aún los péptidos más pequeños están formados por distintos grupos funcionales de diversa naturaleza química, los cuales pueden interactuar con el disolvente y los modificadores en una variedad de maneras. El compartimentalizar ó diferenciar cada uno de estos efectos es difícil y en algunos casos imposible, por lo tanto, se

<sup>15</sup> J. Z. Turner, A. K. Soper, J. L. Finney. *Mol. Phys.*, **70**, 679 (1990).

<sup>16</sup> J. L. Finney, A. K. Soper, J. Z. Turner. *Pure Appl. Chem.*, **65**, 2521 (1993).

<sup>17</sup> J. L. Finney, A. K. Soper. *Chem. Soc. Rev.*, **23**, 1 (1994).

<sup>18</sup> J. Z. Turner, A. K. Soper, J. L. Finney. *J. Chem. Phys.*, **102**, 5438 (1995).

<sup>19</sup> J. H. Hildebrand. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 194 (1979).

<sup>20</sup> B. Lee. *Biopolymers*, **31**, 993 (1991).

<sup>21</sup> K. A. Sharp, B. Madan. *J. Phys. Chem. B*, **101**, 4343 (1997).

hace necesario trabajar con sistemas modelo más sencillos.

- ii) Se encuentran reportados en la literatura, datos experimentales que caracterizan los efectos de los modificadores sobre la solubilidad de solutos no polares en disolución acuosa.<sup>22</sup> Nuestras exploraciones pueden confrontarse directamente con estos resultados, como una manera de verificar la técnica experimental empleada.
- iii) El efecto hidrofóbico depende de la temperatura, característica observada en la solubilidad de solutos no polares en agua. Comportamientos semejantes se han presentado en experimentos de microcalorimetría de desnaturalización de proteínas globulares.<sup>23</sup> Esta analogía con los datos de transferencia soportan al modelo del núcleo hidrofóbico de la proteína: durante la desnaturalización térmica de las proteínas, son grupos no polares los que predominantemente son transferidos desde un núcleo básicamente no polar a un ambiente acuoso.<sup>24-26</sup>
- iv) Adicionalmente, se sabe que los agentes desnaturalizantes tales como la urea y el cloruro de guanidina interaccionan con los grupos no polares así como con los péptidos,<sup>22,27</sup> aunque el mecanismo exacto de acción aún no ha sido identificado plenamente.<sup>28-33</sup>

Estas observaciones sugieren que el estudio de las propiedades de hidratación de moléculas pequeñas no polares, puede proveer información útil para entender mejor el mecanismo de plegamiento – desnaturalización de las proteínas.

---

<sup>22</sup> D. B. Wetlaufer, S. K. Malik, L. Stoller, R. L. Coffin. *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 508 (1964).

<sup>23</sup> K. P. Murphy, P. L. Privalov, S. J. Gill. *Science*, **247**, 559 (1990).

<sup>24</sup> C. Tanford. *Science*, **200**, 1012 (1978).

<sup>25</sup> S. N. Timasheff. *Biochemistry*, **31**, 9857 (1992).

<sup>26</sup> R. L. Baldwin. *Biophys. J.*, **71**, 2056 (1996).

<sup>27</sup> G. I. Makhatadze, P. L. Privalov. *J. Mol. Biol.*, **226**, 491 (1992).

<sup>28</sup> C. Tanford. *Adv. Protein Chem.*, **24**, 1 (1970).

<sup>29</sup> M. Roseman, W. P. Jencks. *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 631 (1975).

<sup>30</sup> B. Lee. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 5154 (1990).

<sup>31</sup> J. A. Schellman. *Biophys. J.*, **73**, 2960 (1997).

<sup>32</sup> R. L. Baldwin, N. Muller. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 7110 (1992).

<sup>33</sup> G. I. Makhatadze, P. L. Privalov. *Adv. Protein Chem.*, **47**, 307 (1995).

## Capítulo 2

### Objetivos

El objetivo principal del trabajo presentado en esta tesis es el de contribuir, con nuestros resultados y su análisis, a entender el papel que juega el efecto hidrofóbico en el proceso de disolución de solutos no polares en medios acuosos. Para estudiar de una manera más completa al efecto hidrofóbico se establecieron tres objetivos generales. El primero, obtener datos experimentales de la dependencia con temperatura de la energía de Gibbs para la disolución de compuestos no polares en agua, y en disoluciones acuosas de diversos compuestos relevantes en el área de la bioquímica; es justamente la dependencia con temperatura la que permite caracterizar termodinámicamente con detalle al efecto hidrofóbico, y con ello contribuir a su mejor comprensión. El segundo objetivo es contribuir al conocimiento del efecto hidrofóbico al nivel molecular, a través del desarrollo y prueba de un modelo que permita racionalizar los datos obtenidos aquí y los ya existentes en la literatura. Como tercer objetivo, se planteó establecer relaciones cualitativas entre los datos experimentales obtenidos y las conclusiones microscópicas alcanzadas con el modelo molecular, con el fenómeno de la desestabilización (o desnaturalización) y estabilización de la estructura terciaria de las proteínas globulares.

La presentación del trabajo está organizado de la siguiente manera:

- En el capítulo 3, como marco de referencia para la introducción del trabajo, se presenta una revisión general del efecto hidrofóbico. Debido a que el efecto hidrofóbico juega un papel importante en muchos fenómenos fisicoquímicos, esta introducción se centra en los aspectos relacionados directamente con este trabajo: la caracterización termodinámica, el agua, los estudios teóricos sobre el efecto hidrofóbico, y el papel que juega el efecto hidrofóbico en el caso del plegamiento de las proteínas.
- En el capítulo 4 se presenta el estudio experimental y análisis termodinámico clásico de la disolución de los solutos no polares benceno y tolueno en agua, y en disoluciones acuosas de compuestos desnaturizantes (urea y cloruro de guanidina) y estabilizantes (glicerol, etilenglicol, sacarosa, glucosa y trehalosa) de proteínas. Forman parte de este capítulo los artículos "*Infinite dilution activity coefficients for benzene and toluene in water and in aqueous solutions of the protein denaturants urea and guanidine hydrochloride*" (J. Chem. Thermodynamics, **32**, 1683–1705 (2000)) e "*Infinite dilution activity coefficients for toluene in aqueous solutions of the protein stabilizers glycerol, ethylene glycol, glucose, sucrose and trehalose*" (en prensa en J. Chem. Thermodynamics).

- En el capítulo 5 se presenta y discute un modelo termodinámico molecular, al que se denomina modelo de equilibrio químico para la esfera de hidratación (HSCE por sus siglas en inglés). Forma parte de este capítulo el artículo “*Non-polar solutes in water and in aqueous solutions of protein denaturants. Modeling of solution and transfer processes*” (Biophys. Chem., 90, 183–202 (2001)). En la segunda parte de este capítulo, se discuten los resultados de emplear dicho modelo con los datos de tolueno en disoluciones acuosas de estabilizantes de proteínas.
- En el capítulo 6 se presentan las conclusiones generales de este trabajo.
- En el capítulo 7 se plantean las propuestas y recomendaciones para el desarrollo posterior de la línea de investigación en la que se ubica este trabajo.
- En los apéndices se encuentran desarrollados en mayor detalle: A) las bases teóricas del método experimental, así como una explicación del arreglo experimental empleado, B) el análisis termodinámico clásico y C) el modelo desarrollado. En estos apéndices se proporciona información que no se acostumbra (o no es permitido) dar en las publicaciones que generó este trabajo.

Es conveniente aclarar que la incorporación de los tres artículos publicados a esta tesis, como parte fundamental del documento, responde a que en opinión del autor los artículos representan la mejor y más clara presentación posible del trabajo realizado en todos sus aspectos (antecedentes, hipótesis, datos, análisis, conclusiones, etc.). Se ha cuidado que la tesis tenga una continuidad necesaria, y que toda la información necesaria para la cabal comprensión y crítica del trabajo sea proporcionada en los apéndices.

## Capítulo 3

### El efecto hidrofóbico

Antes de iniciar una revisión acerca del efecto hidrofóbico o hidrofobicidad, es necesario establecer el lenguaje que se emplea para describir al fenómeno, ya que a pesar de que el concepto *efecto hidrofóbico* es ampliamente usado, su significado exacto es vago. Es conveniente definir al efecto hidrofóbico, en base a los cambios en los potenciales termodinámicos producidos por la transferencia de solutos no polares, ya sea desde su estado líquido o desde una disolución en un disolvente no polar, hacia el agua o una disolución acuosa. Esta transferencia involucra la interrupción de las interacciones entre la molécula no polar y su ambiente, la creación de una cavidad en el medio acuoso, la creación de interacciones soluto-agua y soluto-soluto, y el reordenamiento de las moléculas de agua en la vecindad inmediata del soluto. A partir de esta definición, resulta claro que el efecto hidrofóbico posee información sobre la poca solubilidad de los solutos no polares en agua, y es posible entonces cuantificarlo mediante la determinación de la solubilidad y de estudios de reparto de los compuestos no polares.

La expresión “enlace hidrofóbico” que actualmente se conoce como *interacción hidrofóbica*, fue acuñada por Kauzmann<sup>9</sup> para describir la interacción mediante la cual, especies no polares son inducidas por el disolvente (el agua) a asociarse a través de interacciones no covalentes (fuerzas de London), produciéndose un efecto de ordenamiento local en el ambiente acuoso. El proceso que causa las interacciones hidrofóbicas ha sido nombrado *hidratación hidrofóbica*, y se refiere a la manera en que un soluto no polar afecta en su vecindad inmediata a la estructura local del agua. Es decir, la presencia de un soluto no polar modifica la orientación y la posición espacial de las moléculas de agua vecinas al soluto no polar, respecto a las moléculas de agua que se encuentran más alejadas del soluto.

### 3.1. Caracterización termodinámica

Tradicionalmente el efecto hidrofóbico ha sido estudiado al medir los parámetros termodinámicos de la disolución acuosa de compuestos no polares en estado líquido o gaseoso, y de manera alternativa, a través de los coeficientes de partición de los solutos entre la fase acuosa y la no polar. Recientemente el desarrollo de la tecnología, ha permitido establecer técnicas para la medición de la solubilidad en base al equilibrio líquido-vapor,<sup>34</sup> y los avances logrados durante las últimas dos décadas en la microcalorimetría aumentan los recursos para estudiar al efecto hidrofóbico.<sup>35-37</sup>

Las características termodinámicas que se asocian al proceso de disolución de solutos no polares en agua son:

- Es posible observar un máximo en la energía de Gibbs de disolución (mínimo en solubilidad) alrededor de la temperatura ambiente.
- El proceso se encuentra promovido por la entropía en las cercanías de la temperatura ambiente, pero a altas temperaturas es la entalpía la que promueve la solubilidad.<sup>38</sup>
- La alta capacidad calorífica de disolución, aún a altas temperaturas.

El hecho de que a temperaturas y presiones moderadas los hidrocarburos sean poco solubles en agua se conoce desde hace mucho tiempo.<sup>7</sup> A temperatura ambiente, la solubilidad ha sido relacionada con los efectos entrópicos, lo que distingue a las disoluciones acuosas de mezclas líquidas en las cuales, la solubilidad mutua está determinada por efectos entálpicos.

A la información termodinámica del efecto hidrofóbico, se le ha tratado de relacionar con alguna propiedad del soluto. Correlaciones con el área superficial y el volumen molecular del soluto han dado resultados satisfactorios, pero también se han observado algunas discrepancias.<sup>39</sup> En el caso del incremento en la solubilidad de hidrocarburos en disolventes orgánicos, la entalpía favorece la disolución, y es contrarrestada por el decremento en la entropía. En agua, la entalpía de disolución también se incrementa al aumentar el área superficial, pero el incremento es menos pronunciado. En contraste, la pérdida en la

---

<sup>34</sup> D. J. Raal, A. L. Mühlbauer. *Phase Equilibria. Measurement and Computation*. Taylor & Francis: Washington D. C. (1998).

<sup>35</sup> H. Naghibi, S. F. Dec, S. J. Gill *J. Phys. Chem.*, **90**, 4621 (1986).

<sup>36</sup> H. Naghibi, S. F. Dec, S. J. Gill *J. Phys. Chem.*, **91**, 245 (1987).

<sup>37</sup> G. I. Makhatadze, P. L. Privalov *J. Chem. Thermodyn.*, **20**, 405 (1988).

<sup>38</sup> N. Muller. *Acc. Chem. Res.*, **23**, 23 (1990).

<sup>39</sup> M. H. Abraham. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*, **80**, 153 (1984).



entropía es mayor al incrementar el tamaño del alcano. Por lo tanto, la hidrofobicidad es más pronunciada en el caso de los solutos no polares más grandes.

Recientemente se ha determinado con gran exactitud la dependencia con temperatura de los parámetros termodinámicos de disolución para muchos gases y líquidos no polares.<sup>1</sup> Mediciones en la solubilidad han mostrado que la entropía de disolución es más favorable al incrementar la temperatura. Sin embargo, a altas temperaturas la solubilidad de los solutos no polares en agua sigue siendo baja, debido a que es la contribución entalpíca desfavorable la que determina la solubilidad. La energía de Gibbs resulta ser entonces poco dependiente de la temperatura. En el caso de los líquidos no polares, la dependencia con temperatura de los parámetros termodinámicos de sus disoluciones acuosas presentan muchas semejanzas: la entalpía de disolución a temperatura ambiente es cercana a cero, y en las cercanías de los 383 K la entropía de disolución es cero.

### 3.1.1. El coeficiente de actividad a dilución infinita

Básicamente existen dos formas en las que se puede obtener información sobre las características del proceso de transferencia de un soluto desde su estado puro al agua pura ó a una disolución acuosa:

1. Mediante el estudio de disoluciones en las que el soluto se encuentra a dilución infinita y donde se puede obtener información de las interacciones disolvente-disolvente y las interacciones soluto-disolvente.
2. Mediante el estudio de disoluciones en las cuales el soluto se encuentra en una concentración mucho mayor que la dilución infinita, por lo que además de obtenerse información sobre las interacciones disolvente-disolvente y soluto-disolvente, también se obtiene información sobre las interacciones soluto-soluto.

Las interacciones soluto-disolvente pueden ser estudiadas mediante la determinación de la energía de Gibbs de transferencia del soluto, desde la fase gaseosa al agua (energía de Gibbs de hidratación) y para la transferencia del líquido puro al agua (energía de Gibbs de disolución). En el caso de los solutos no polares, sus disoluciones son consideradas a dilución infinita debido a su poca solubilidad, por lo que la energía de Gibbs de disolución,  $\Delta_{sol}G_1^\infty$ , se puede calcular a partir de la determinación del coeficiente de actividad a dilución infinita del soluto,  $\gamma_1^\infty$ . Los coeficientes de actividad a dilución infinita de los solutos no polares en agua, son de gran importancia ya que por ejemplo, sus valores permiten estimar la solubilidad del soluto no polar en agua y proveen de información importante sobre las interacciones soluto-disolvente. El coeficiente de actividad a dilución infinita también se puede emplear para ajustar los parámetros de distintos modelos de coeficientes de actividad

(Wilson, NRTL, van Laar, etc.) y así, predecir el comportamiento de la mezcla sobre todo el intervalo de concentración. Varios métodos han sido desarrollados para la medición de  $\gamma_1^\infty$ , siendo los principales: ebullición diferencial, métodos cromatográficos y arrastre con gas inerte.<sup>34</sup>

La cantidad termodinámica fundamental para caracterizar la partición de un soluto entre dos fases es el  $\gamma_1$ . Su valor es una medida de la no idealidad de la disolución o de la hidrofobicidad del soluto. En las condiciones de muy baja solubilidad, el coeficiente de partición entre las fases *a* y *w* ( $K_{aw}$ ) de un soluto no polar se determina con la expresión

$$K_{aw} = \lim_{c_1^w \rightarrow 0} \frac{c_1^a}{c_1^w}, \quad (3.1.1)$$

donde  $c_1^a$  y  $c_1^w$  son las concentraciones del soluto en las fases *a* y *w*, respectivamente. En estos casos es conveniente definir entonces, al coeficiente de actividad a dilución infinita  $\gamma_1^\infty$  como

$$\gamma_1^\infty \equiv \lim_{x_1^w \rightarrow 0} \gamma_1. \quad (3.1.2)$$

La constante de la ley de Henry ( $H_{12}$ ) también nos puede proporcionar información sobre el reparto de un soluto entre dos fases

$$H_{12} = \lim_{x_1 \rightarrow 0} \frac{f_1^L}{x_1}, \quad (3.1.3)$$

donde  $f_1^L$  es la fugacidad del soluto y  $x_1$  es la fracción mol del soluto en la disolución acuosa.  $H_{12}$  y  $K_{aw}$  están íntimamente relacionados con el  $\gamma_1^\infty$ . Por ejemplo, en el caso del equilibrio líquido – vapor, bajo la suposición de que la fase vapor se comporta como un gas ideal, se encuentran relacionados con las expresiones

$$H_{12} = \gamma_1^\infty p_1^s \quad (3.1.4)$$

y

$$K_{aw} = \frac{\gamma_1^\infty p_1^s v_2^L}{RT}, \quad (3.1.5)$$

donde  $p_1^s$  y  $v_2^L$  representan la presión de vapor de saturación del soluto puro en estado líquido y el volumen molar del agua pura en estado líquido respectivamente. Además, debido a que las solubilidades mutuas de los compuestos no polares en agua son muy pequeñas, el valor recíproco de  $\gamma_1^\infty$  se aproxima a la fracción mol de soluto no polar solubilizado en agua

$$x_1 = \frac{1}{\gamma_1^\infty}. \quad (3.1.6)$$

La ecuación (3.1.6) permite relacionar a  $\Delta_{sol}G_1^\infty$  con el  $\gamma_1^\infty$  a partir de la expresión que relaciona a la energía de Gibbs de disolución con la solubilidad del soluto *i.e.*,  $\Delta_{sol}G_1^\infty = -RT \ln x_1$ :

$$\Delta_{sol}G_1^\infty = RT \ln \gamma_1^\infty \quad (3.1.7)$$

Otra cantidad relevante para los estudios de solvatación de los solutos no polares y también de la desnaturalización de las proteínas es la energía de Gibbs de transferencia,  $\Delta_{tr}G_1^\infty$ . Los potenciales termodinámicos de transferencia caracterizan los procesos en donde el soluto es transferido del agua hacia la mezcla [agua + modificador] *i.e.*,

$$\Delta_{tr}G_1^\infty = \Delta_{sol}G_1^\infty[\text{agua} + \text{modificador}] - \Delta_{sol}G_1^\infty[\text{agua}] \quad (3.1.8)$$

Otros métodos que se emplean para obtener información de la disolución de los solutos en la que las interacciones soluto-soluto no interfieren son las determinaciones de las propiedades molares parciales a dilución infinita, tales como el volumen molar parcial, la capacidad calorífica y la compresibilidad.

## 3.2. El agua

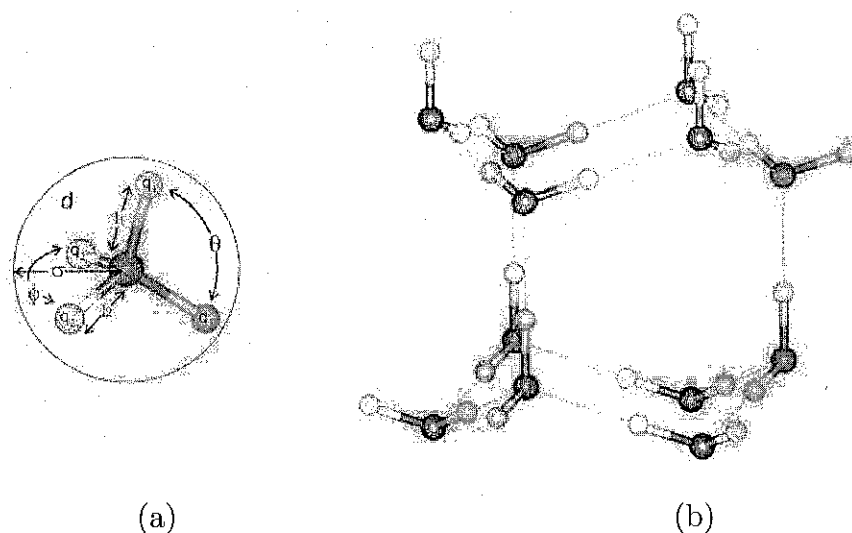
El agua es una sustancia extraordinaria, anómala en casi todas sus propiedades físico-químicas y sin duda la más compleja de todas las sustancias formadas por una sola especie química. Constituye un ambiente altamente polar que afecta las interacciones intra e intermoleculares. Se sabe que el origen de las propiedades únicas que presenta el agua como disolvente se encuentran en su pequeño volumen molar y en su gran capacidad para formar una extensa estructura intermolecular.

El arreglo estructural que posee el agua en el estado líquido, surge de la configuración espacial tetraédrica que poseen las moléculas de agua. El oxígeno se encuentra en el centro del tetraedro, mientras que en los ápices se encuentran los hidrógenos y los dos pares de electrones libres, de manera que cada molécula de agua puede participar en la formación de cuatro puentes de hidrógeno.<sup>40</sup> El agua no es el único compuesto capaz de formar puentes de hidrógeno sin embargo, tiene la característica especial de formar con una gran facilidad agregados intermitentes. Estos agregados, junto con las moléculas monoméricas que se encuentran en los espacios intersticiales, están distribuidos de tal forma que dan origen a la estructura intermolecular del agua y son responsables de las propiedades peculiares que presenta. En comparación con otras moléculas dihidrogenadas, formadas por elementos del mismo grupo de la tabla periódica al que pertenece el oxígeno

<sup>40</sup> F. Franks. *Water - A comprehensive treatise*, F. Franks Ed. Plenum Press, New York (1975) Vol 4.

( $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{H}_2\text{Se}$  y  $\text{H}_2\text{Te}$ ), el agua tiene una alta temperatura de fusión y de ebullición, así como un amplio intervalo de temperatura en el cual se encuentra en estado líquido a presión atmosférica. Otras propiedades termodinámicas que hacen al agua un compuesto especial son su alta capacidad calorífica y sus propiedades volumétricas. Numerosos estudios de las propiedades termodinámicas, cinéticas, espectroscópicas y de transporte reflejan la existencia de estructura en el agua cuando se encuentra en estado líquido.<sup>40</sup> Estudios termodinámicos sugieren que la estructura del agua en estado líquido es semejante a la del hielo I, pero es mucho más dinámica, ya que el arreglo de los puentes de hidrógeno cambia cada picosegundo. Se conocen 9 formas distintas de hielo, cada una caracterizada por su estructura cristalina e identificadas por numerales romanos. El hielo I, es la forma que toma el agua cuando se congela bajo condiciones normales ( $0^\circ\text{C}$  y 1 atm). Las moléculas de agua forman una estructura tetraédrica y están distribuidas en arreglos hexagonales (figura 3.2.1).

En la interfase aire-agua las moléculas de agua se encuentran organizadas de manera



**Figura 3.2.1:** Cada molécula de agua (a), tiene dos átomos de hidrógeno,  $q_1$ , y dos pares de electrones libres,  $q_2$ , en cada átomo de oxígeno. El ángulo  $\Theta$  entre los átomos de hidrógeno es de  $109.47^\circ$  y la distancia del enlace O-H,  $l_1$ , es de 1 Å. En el hielo (b), los hidrógenos actúan como donadores de puentes de hidrógeno a los pares libres de electrones de los átomos de oxígeno, los cuales actúan como aceptores de puentes de hidrógeno. Esto produce una red hexagonal de moléculas de agua unidas a través de los puentes de hidrógeno, donde cada molécula de agua posee cuatro vecinos acomodados en un tetraedro.

semejante al hielo I. Un comportamiento similar se propone en la interacción entre el agua y la superficie de las moléculas o iones disueltos en el agua. En este caso, las moléculas de agua forman una estructura en forma de jaula (tipo clatrato) que rodea al soluto. La fuerte interacción entre los iones o las moléculas polares con el agua es altamente favorable, y mayor que la contribución entrópica desfavorable debida a la estructuración de las moléculas de agua. El balance de estas contribuciones resulta en una interacción favorable, lo que se traduce en que estas especies químicas sean solubles en el agua. En el caso de los hidrocarburos que no poseen carga, tampoco son polares y no interaccionan fuertemente con el agua, la contribución entrópica desfavorable es dominante y por lo tanto no son solubles o muy poco solubles en el agua.

### 3.3. Estudios teóricos sobre el efecto hidrofóbico

Los estudios teóricos sobre el efecto hidrofóbico pueden ser divididos en cuatro categorías principales. Los más destacados son aquellos que, en base a consideraciones termodinámicas, generan modelos capaces de reproducir los parámetros termodinámicos observados en la disolución de solutos no polares en agua. Estos incluyen el modelo del hidrocarburo líquido, modelos de varias etapas para la disolución, modelos compensatorios y modelos de mezclas.<sup>1</sup> Varias aproximaciones seguidas para describir al efecto hidrofóbico, se centran en la expansión virial de las propiedades termodinámicas de las disoluciones acuosas que poseen "partículas" de solutos no polares. Los coeficientes viriales pueden relacionarse con las interacciones entre los solutos no polares en el medio acuoso, por lo que la mayoría de estos estudios se centran en las interacciones hidrofóbicas entre pares de partículas o el seno del líquido. Los coeficientes viriales pueden interpretarse también en términos de la distribución de partículas de soluto en la disolución. El cálculo de estas funciones de distribución puede producir, tanto potenciales de interacción como coeficientes viriales. La exactitud de los métodos aplicados puede ser probada al comparar los resultados con los coeficientes viriales obtenidos de manera experimental. Durante los últimos 20 años se han desarrollado teorías integrales altamente complejas para las funciones de distribución soluto-soluto y soluto-disolvente.

La teoría de escalamiento de partículas es una aproximación muy elegante, pero también muy criticada para el estudio del efecto hidrofóbico. A pesar de que la teoría de escalamiento de partículas es una simplificación rigurosa de la realidad, ha producido resultados sorprendentemente precisos, lo que le ha ganado una atención especial. En los últimos años, la rápida maduración de las teorías sobre los líquidos moleculares y las disoluciones ha hecho que las simulaciones computacionales sean una de las herramientas más impor-

tantes en el estudio del efecto hidrofóbico. Cálculos realizados con las técnicas Monte Carlo y de Dinámica Molecular han provisto a los químicos con información detallada sobre el efecto hidrofóbico a un nivel molecular que no es posible hasta el momento obtener a través de las técnicas experimentales.<sup>1</sup> A pesar de esto, las técnicas Monte Carlo y de Dinámica Molecular poseen dos inconvenientes. El primero se refiere al esfuerzo de cálculo que se traduce en un inmenso tiempo requerido por las computadoras para poder describir los sistemas. Por ello, los sistemas estudiados en general, se ven reducidos a los casos más sencillos, alejados de los sistemas para los cuales existe información experimental de alta calidad. El segundo es el hecho de que no es posible calcular todas las propiedades que se miden o se han medido, ya que para ello es necesario realizar muchas aproximaciones.

### 3.3.1. Modelos de mezcla

Existen varios modelos que pueden describir la termodinámica de disolución de solutos no polares en agua, la mayoría brindan una descripción cualitativa. A pesar de que cada modelo enfatiza distintos aspectos de la hidratación hidrofóbica y de las interacciones hidrofóbicas, la mayoría de ellos se pueden clasificar como modelos de mezcla. En estos modelos, se considera que el agua es una mezcla de dos o más especies caracterizadas por alguna propiedad que las diferencia; tal como el número, la fuerza o la longitud de los puentes de hidrógeno. La introducción de solutos no polares, provoca un desplazamiento en el equilibrio entre las distintas especies de agua. A continuación se presentan algunos modelos de mezcla debido a la estrecha relación que presentan con el trabajo desarrollado. No se pretende presentar una revisión exhaustiva de los distintos modelos publicados hasta el momento, sino presentar sólo aquellos aspectos que están directamente relacionados con este trabajo.

Como se mencionó con anterioridad (capítulo 1), Frank y Evans<sup>8</sup> fueron los primeros en especular sobre el origen molecular del comportamiento termodinámico de las disoluciones acuosas no electrolíticas. Su propuesta sobre la promoción de regiones parecidas a cristales ("icebergs") fue conceptualizada mediante el argumento de que éstas estructuras contienen mayor espacio libre, en donde las moléculas no polares pueden ser acomodadas. Una vez que el concepto de Frank y Evans sobre la promoción de estructura fue aceptado para explicar, de manera cualitativa, las propiedades termodinámicas de las disoluciones acuosas de solutos no polares, se realizaron intentos para mejorar el modelo y proveer una base cuantitativa a los nuevos modelos. En una de estas extensiones al modelo,<sup>40</sup> se consideró que la estructura inducida en el agua era similar a la que presentan los clatratos hidratados. Se asignaron propiedades tanto a la especie agua en forma de monómero,

como a la especie agua clatrato y se intentó cuantificar las propiedades conocidas de la disolución. Este intento tuvo éxito parcial, ya que el modelo explica las propiedades del metano, etano y propano en disolución, sin embargo tiene la desventaja de que es incapaz de explicar las propiedades del butano. La razón de ésto es que la cavidad del clatrato es demasiado pequeña para contener a la molécula de butano. También tiene la desventaja de no contar con evidencia experimental que lo soporte, al no tenerse registrado la existencia de un clatrato de butano. Sin embargo, los autores rebaten las críticas en base a que la información que se posee de los clatratos no es completa, aún así se mantiene la desventaja de que es necesario suponer que los clatratos poseen un radio definido. La propuesta de Némethy y Scheraga<sup>41-42</sup> incorpora al modelo de Frank y Evans la presencia de agregados intermitentes (flickering clusters)<sup>43</sup> de moléculas de agua. Mediante una base mecánico-estadística, explica las propiedades de las disoluciones de hidrocarburos al considerar, que la molécula no polar afecta el equilibrio entre las moléculas de agua libres y los agregados.

En la literatura se encuentran muchos modelos que mantienen la idea general de la "estructuración" del agua cuando se introduce un soluto no polar en ella.<sup>44-46</sup> Por ejemplo, en el modelo presentado por Gill *et al.*,<sup>45</sup> las moléculas de agua ubicadas en la primer capa de la esfera de hidratación del soluto se encuentran distribuidas en dos estados energéticos posibles. La diferencia en energía entre estos niveles energéticos es independiente de la temperatura, además la hidratación hidrofóbica no es cooperativa *i.e.*, la formación de un puente de hidrógeno por una molécula de agua no se facilita cuando se encuentra presente un segundo puente de hidrógeno. Dentro de los modelos de mezcla más recientes vale la pena mencionar el desarrollado por Muller,<sup>38,47-48</sup> el cual claramente encuentra su precursor en el modelo clásico de Némethy y Scheraga,<sup>41,42</sup> y está basado en la suposición de que cada átomo de hidrógeno en una disolución acuosa puede estar participando en un puente de hidrógeno o no. Además, propone una distinción más entre los átomos de hidrógeno pertenecientes a las moléculas de agua que se encuentran en el bulto y aquellos que son perturbados por la presencia del soluto *i.e.*, aquellos que pertenecen a las moléculas de agua que se encuentran en la esfera de solvatación del soluto. La formación y destrucción de los puentes de hidrógeno se considera como un proceso en equilibrio, en base al cual

<sup>41</sup> G. Némethy, H. A. Scheraga. *J. Chem. Phys.*, **36**, 1773 (1962).

<sup>42</sup> G. Némethy, H. A. Scheraga. *J. Chem. Phys.*, **36**, 3401 (1962).

<sup>43</sup> H. S. Frank, W. Y. Wen. *Disc. Faraday Soc.*, **24**, 133 (1957).

<sup>44</sup> A. Ben-Naim. *J. Phys. Chem.*, **69**, 3240 (1965).

<sup>45</sup> S. J. Gill, S. F. Dec, G. Olofsson, I. Wadsö. *J. Chem. Phys.*, **89**, 3758 (1965).

<sup>46</sup> M. Costas, B. Kronberg, R. Silverston. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **90**, 1513 (1994).

<sup>47</sup> N. Muller. *J. Solution Chem.*, **17**, 661 (1988).

<sup>48</sup> N. Muller. *J. Phys. Chem.*, **94**, 3856 (1990).

la entalpía y la capacidad calorífica pueden ser definidos. El modelo es capaz de describir satisfactoriamente la dependencia con temperatura de los parámetros termodinámicos de disolución de los solutos no polares, aunque presenta algunos problemas de consistencia interna.

Los análisis termodinámicos basados en los modelos de mezcla no sirven para interpretar de manera detallada los aspectos moleculares del efecto hidrofóbico. Pero, a pesar de ser modelos muy sencillos, proveen una descripción cuantitativa de la dependencia con temperatura de la termodinámica de disolución de solutos no polares en agua.

### 3.4. Estructura y solubilidad de las proteínas globulares

Durante más 50 años, la estabilidad de la estructura nativa de las proteínas y el plegamiento de las cadenas polipeptídicas, han sido estudiados de manera intensa. Actualmente, se reconoce que las interacciones hidrofóbicas constituyen un factor importante para la estabilidad de la estructura plegada (estado nativo) de las proteínas solubles en agua.<sup>49</sup> Para obtener un mayor conocimiento del proceso de hidratación de las proteínas y las interacciones no covalentes que estabilizan la estructura nativa de las mismas, es necesario estudiar la hidratación de las unidades primarias que las conforman: los  $\alpha$ -aminoácidos. Los 20 tipos de  $\alpha$ -aminoácidos que se encuentran en la estructura de las proteínas, difieren entre sí por el grupo sustituyente  $R$  en el átomo de carbono  $\alpha$  (figura 3.4.1). De acuerdo a las características de estos grupos laterales, los  $\alpha$ -aminoácidos pueden ser clasificados en diferentes categorías: alifáticos, aromáticos, hidrofóbicos, polares o con carga. En general, las proteínas son anfipáticas *i.e.*, poseen aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, pero en promedio la mayoría de los aminoácidos hidrofóbicos se encuentran en el interior de las proteínas globulares y en el exterior de las proteínas membranales, que interaccionan con las membranas celulares constituidas de lípidos,<sup>50</sup> por lo que evitan el contacto con el agua del medio. Los aminoácidos hidrofílicos se encuentran en su mayoría, formando la superficie de las proteínas globulares. Esta partición de los aminoácidos entre los medios acuosos y no acuosos juega un papel muy importante en el proceso de plegamiento de las proteínas, donde es claro que está involucrado el efecto hidrofóbico.

Para cuantificar la contribución de cada residuo de aminoácido en el plegamiento de las proteínas, podemos medir de manera explícita la partición de las moléculas entre el

---

<sup>49</sup> K. A. Sharp. *Curr. Biol.*, **1**, 171 (1991).

<sup>50</sup> W. H. Elliot, D. C Elliot. *Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press, Oxford (1997).



agua y algún disolvente orgánico. Para esta determinación el aminoácido es colocado en un sistema en el que se encuentran una fase acuosa y otra orgánica. La hidrofobicidad del aminoácido está representada por el coeficiente de partición  $K$ , el cual es una medida de la fracción de moléculas en la fase acuosa,  $c_{ac}$ , relativa a la fracción de moléculas en la fase orgánica  $c_o$  en el equilibrio, *i.e.*  $K = \frac{c_{ac}}{c_o}$ . El valor de  $K$  para cada aminoácido refleja su hidrofobicidad, a pesar de que el efecto hidrofóbico fue definido originalmente solo para compuestos no polares. Los coeficientes de partición son útiles para describir el comportamiento relativo de los residuos de aminoácido en las proteínas y su efecto en la estabilización de la estructura de las mismas.

Los aminoácidos hidrofóbicos tienen cadenas laterales alquílicas o aromáticas, las cuales son voluminosas. Cuando las cadenas laterales aromáticas se encuentran en el interior de la proteína globular o en la región hidrofóbica en el caso de proteínas de membrana, al interactuar con otro anillo aromático se orientan de manera perpendicular entre sí.<sup>51</sup> Esta orientación de los anillos aromáticos es similar al arreglo perpendicular de las moléculas de benceno en solución.<sup>52</sup>

Debido a la dificultad experimental que representa el determinar con precisión el coeficiente de partición o solubilidad de los  $\alpha$ -aminoácidos en los medios acuosos, otros compuestos considerados como modelo han sido empleados para estimar la solubilidad de los  $\alpha$ -aminoácidos. Estos resultados son relevantes para el estudio del plegamiento de las proteínas, pues permiten representar la transferencia de un residuo de  $\alpha$ -aminoácido desde el interior de la proteína hacia el agua. Tanford<sup>53-57</sup> determinó los valores de la energía de Gibbs de transferencia de algunos  $\alpha$ -aminoácidos y moléculas modelo desde soluciones acuosas de urea, etilenglicol, cloruro de guanidina, etanol y dioxano al agua, con lo que pudo construir una escala de hidrofobicidad para los  $\alpha$ -aminoácidos. Aunque su estudio no incluyó a los 20 distintos  $\alpha$ -aminoácidos y su escala de hidrofobicidad es específica para el disolvente que empleó, este estudio ha servido para entender mejor el proceso de transferencia de estos solutos.

En general, en base a diversas observaciones experimentales, se acepta que el plegamiento de las proteínas es promovido por las interacciones hidrofóbicas entre los residuos no

<sup>51</sup> K. E. van Holde, W. C. Johnson, P. S. Ho. *Principles of Physical Biochemistry*. Prentice Hall, New Jersey (1998).

<sup>52</sup> W. L. Jorgensen, D. L. Severance. *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 4768 (1990).

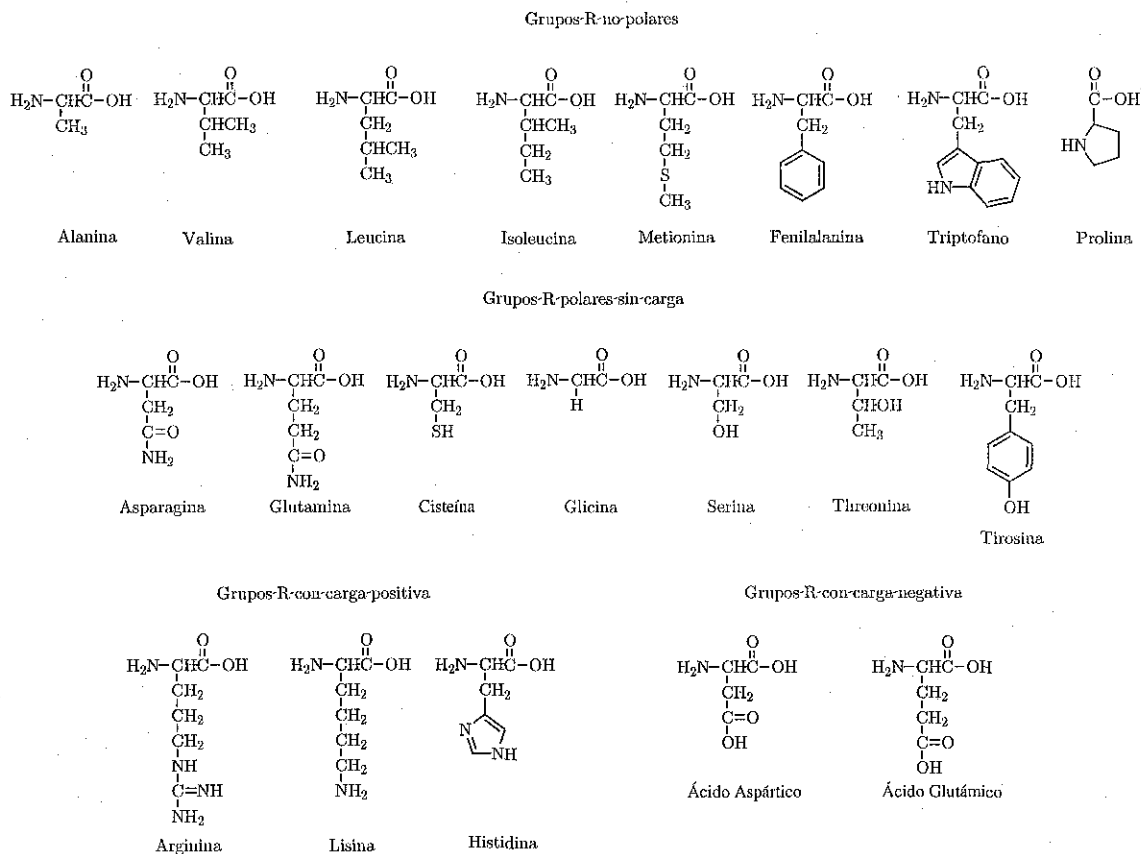
<sup>53</sup> P. L. Whitney, C. Tanford. *J. Biol. Chem.*, 237, PC1735 (1962).

<sup>54</sup> Y. Nozaki, C. Tanford. *J. Biol. Chem.*, 238, 4047 (1963).

<sup>55</sup> Y. Nozaki, C. Tanford. *J. Biol. Chem.*, 240, 3568 (1965).

<sup>56</sup> Y. Nozaki, C. Tanford. *J. Biol. Chem.*, 245, 1648 (1970).

<sup>57</sup> Y. Nozaki, C. Tanford. *J. Biol. Chem.*, 246, 2211 (1971).



**Figura 3.4.1:** La estructura de los  $\alpha$ -aminoácidos. Todos los  $\alpha$ -aminoácidos tienen un átomo de carbono central (el carbono  $\alpha$ ), que está unido a un grupo amino (ó imino en el caso de prolina), un grupo carboxilo, un átomo de hidrógeno y un grupo  $R$ .

polares de la cadena lateral de los  $\alpha$ -aminoácidos. Las interacciones intramoleculares no covalentes son responsables de la estructura tridimensional única que presentan las proteínas cuando se encuentran plegadas (estado nativo). Las interacciones no covalentes que contribuyen a la estabilidad de las proteínas, incluyen los puentes de hidrógeno entre los grupos peptídicos que estabilizan a las estructuras secundarias (hélices  $\alpha$  y hojas  $\beta$ ), los puentes salinos entre los residuos con carga y las fuerzas de dispersión de London entre los residuos no polares. La estabilidad de la proteína plegada sin embargo es solo marginal, ya que el estado nativo de la proteína es solo de 20 a 80  $\text{kJ mol}^{-1}$  más estable que el estado desplegado.<sup>3</sup> En comparación, los puentes de hidrógeno tienen una estabilidad que oscila entre 8 a 40  $\text{kJ mol}^{-1}$ . La pequeña diferencia en energía que separa al estado nativo de las proteínas del desnaturalizado, no es mas que el producto de la compensación entre las grandes contribuciones entrópicas y entálpicas. A pesar de que el comportamiento

de las proteínas del desnaturalizado, no es más que el producto de la compensación entre las grandes contribuciones entrópicas y entálpicas. A pesar de que el comportamiento termodinámico de las proteínas ha sido ampliamente discutido,<sup>33</sup> aún falta información experimental sobre las magnitudes de las contribuciones de las distintas interacciones no covalentes en la estabilidad de las proteínas.

## Capítulo 4

### Disoluciones acuosas de solutos no polares. Análisis termodinámico clásico

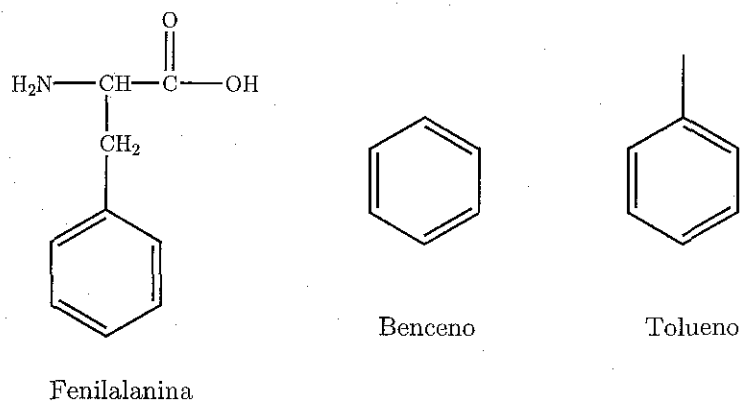
Debido al efecto hidrofóbico los solutos no polares son prácticamente insolubles en agua, por lo tanto, sus disoluciones pueden considerarse efectivamente a disolución infinita. Las propiedades termodinámicas de tales disoluciones no pueden ser determinadas experimentalmente con facilidad. Diversas técnicas termodinámicas son empleadas para estudiar a solutos no polares simples en disolución acuosa; sin embargo, muchas de estas técnicas tienen la desventaja de que, para poder obtener información útil, se requieren concentraciones relativamente altas de los solutos.<sup>58</sup> Debido a la dificultad en la determinación experimental de las propiedades termodinámicas de disolución, la mayoría de los datos reportados hasta el momento presentan poca exactitud. Además, la mayoría de la información que se obtiene está restringida a determinaciones de solubilidad realizadas en intervalos de temperatura y presión pequeños. Las dificultades inherentes en la determinación de la solubilidad se manifiestan en la moderada y poca concordancia entre los datos publicados.<sup>59</sup> La solubilidad se obtiene excepcionalmente a través de la estimación directa (*i.e.* calorimétrica) de la entalpía de disolución ó de los volúmenes molares parciales (*i.e.* volumétrica).<sup>60</sup>

El interés por determinar la solubilidad de compuestos no polares en disoluciones acuosas más complejas se ha incrementado debido a la importancia que tiene esta información en diversas áreas del conocimiento. En particular, el plegamiento y la solubilidad de las proteínas son dos áreas donde la hidratación hidrofóbica y el efecto hidrofóbico juegan un papel muy importante.<sup>1,3</sup> El ampliar nuestro conocimiento en torno a los efectos de la hidratación hidrofóbica en sistemas biológicos nos proveerá de la información necesaria para, en principio, manipular muchas de las propiedades físicas de los péptidos y las proteínas. Con este fin, resulta relevante determinar los  $\gamma_1^\infty$  del benceno y el tolueno, como moléculas modelo de la cadena lateral del  $\alpha$ -aminoácido fenilalanina (figura 4.1), en disoluciones empleadas para realizar estudios sobre la estructura y funcionalidad de las proteínas:

<sup>58</sup> J. P. Novák, J. Matouš, J. Pick. *Liquid - Liquid Equilibria*. Elsevier: Amsterdam (1987).

<sup>59</sup> *Hydrocarbons with Water and Seawater. Part I: Hydrocarbons C5 to C7*. Vol. 37, *Solubility Data Series*. D. G. Shaw: editor. Pergamon: Oxford (1989).

<sup>60</sup> F. Franks, D. S. Reid. *Water - A comprehensive Treatise*, Vol. 2. Franks, F.: editor. Plenum Press: New York (1973).



**Figura 4.1:** Comparación estructural entre la fenilalanina, benceno y tolueno. La cadena lateral del  $\alpha$ -aminoácido es un anillo aromático que se puede modelar con el tolueno.

Las propiedades de los péptidos y las proteínas no sólo están influenciadas por el agua, sino que también dependen de la presencia de otras especies, comunmente llamadas co-solventes o modificadores, en las disoluciones acuosas. De gran interés resultan ser tanto aquellos modificadores que promueven cambios estructurales de la proteína como aquellos que la protegen, debido a las posibilidades experimentales que ofrecen sus disoluciones acuosas para estudiar la estructura y actividad de las proteínas.<sup>5,6</sup> Las disoluciones acuosas de urea y cloruro de guanidina presentan propiedades semejantes, a saber: son capaces de formar mezclas casi ideales con el agua, y poseen una acción modificadora sobre las propiedades inter e intramoleculares relacionadas con la organización en sistemas ordenados, como las micelas y una amplia gama de polímeros solubles en agua, tales como las proteínas globulares (en el caso de las proteínas, esta modificación se le conoce como desnaturalización química) y polímeros sintéticos solubles en agua.<sup>61-62</sup> También se conoce que sus disoluciones acuosas promueven la solubilidad de compuestos no polares (hidrocarburos). Por otro lado, en las áreas biológica y termodinámica, son de gran importancia las características del proceso de hidratación de azúcares y polióles, y sus interacciones con electrolitos y no electrolitos (compuestos no polares) en medios acuosos. Existe información acerca del hecho de que los azúcares y polióles actúan como agentes estabilizantes efectivos de proteínas y enzimas.<sup>63-64</sup> Aún más, es bien conocido que el grado de desnaturalización de ciertas proteínas, inducido por desnaturalizantes como urea y cloruro de

<sup>61</sup> G. Castronuovo, V. I. Guiliano d' Elia, F. Velleca. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **92**, 3087 (1996).

<sup>62</sup> P. Molyneux. *Water - A comprehensive Treatise*, Vol. 4. Franks, F.: editor. Plenum Press: New York (1975).

<sup>63</sup> J. C. Lee, S. N. Timasheff. *J. Biol. Chem.*, **256**, 7193 (1981).

<sup>64</sup> M. N. Gupta. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **14**, 1 (1991).

guanidina, es reducido en la presencia de azúcares.<sup>65-67</sup> A pesar de que el mecanismo de estabilización no es conocido, los estudios con moléculas modelo pequeñas sugieren que este fenómeno está influenciado por los efectos de estos compuestos polihídricos (azúcares y polióles) sobre la estructura del agua.

A pesar de las dificultades experimentales encontradas en la determinación de las propiedades termodinámicas de disolución de los solutos no polares en agua, existe un creciente interés por determinar las mismas. Para lograrlo se hace necesario emplear técnicas especiales mediante las cuales se puedan obtener datos con alto grado de exactitud. A continuación se presentan dos artículos que contribuyen a enriquecer el conocimiento que se tiene acerca de la baja solubilidad (efecto hidrofóbico) de este tipo de solutos mediante la presentación de resultados confiables. En el primer artículo, se presentan los valores experimentales de los coeficientes de actividad a disolución infinita,  $\gamma_1^\infty$ , de benceno y tolueno en agua y en disoluciones acuosas de dos desnaturizantes de proteínas, urea y cloruro de guanidina, obtenidos mediante la técnica de agotamiento con gas inerte. Esta técnica está descrita con detalle, mas allá de lo establecido en los artículos, en el apéndice A. En el segundo artículo, se presentan los valores de  $\gamma_1^\infty$  de tolueno en disoluciones acuosas de cinco agentes estabilizantes de proteínas: glicerol, etilenglicol, sacarosa, glucosa y trehalosa; obtenidos con la misma técnica. Los  $\gamma_1^\infty$  fueron determinados en el intervalo de temperatura 273 a 323 K. En el caso de los modificadores urea, cloruro de guanidina y glicerol se realizaron las mediciones en cuatro concentraciones, de 0.5 a 5.0 mol dm<sup>-3</sup>; y para el glicerol se realizaron mediciones a 268 K para la concentración mas alta. Se emplearon concentraciones únicas en los casos del etilenglicol, glucosa y sacarosa de 1.5 mol dm<sup>-3</sup> y de 0.5 mol dm<sup>-3</sup> para trehalosa. Las condiciones de temperatura y concentración en las que se realizaron las determinaciones de  $\gamma_1^\infty$ , corresponden a aquellas en las que varias proteínas sufren el proceso de desnaturización térmica y química por parte de los agentes desnaturizantes y, aquellas en las que los agentes estabilizantes evitan el proceso de desnaturización. En concordancia con trabajos previos,<sup>68-70</sup> para ambos solutos en agua pura se observa un máximo en  $\gamma_1^\infty$  alrededor de la temperatura ambiente (mínimo en solubilidad,  $\gamma_1^\infty = \frac{1}{x_1}$ ). A partir del análisis termodinámico realizado, podemos concluir que al transitar desde la temperatura de congelamiento hacia la temperatura de

<sup>65</sup> R. B. Simpson, W. Kauzmann. J. Am. Chem. Soc., 75, 5139 (1953).

<sup>66</sup> N. L. Simmons, R. J. Naftalin. Biochim. Biophys. Acta., 419, 493 (1975).

<sup>67</sup> K. Gekko, H. Ito. J. Biochem., 107, 572 (1990).

<sup>68</sup> H. Chen, J. Wagner. J. Chem. Eng. Data, 39, 470 (1994).

<sup>69</sup> H. Chen, J. Wagner. J. Chem. Eng. Data, 39, 475 (1994).

<sup>70</sup> H. Chen, J. Wagner. J. Chem. Eng. Data, 39, 679 (1994).

ebullición, la hidrofobicidad de estos solutos es promovida por la entropía a bajas temperaturas y por la entalpía a temperaturas mayores. En el apéndice B se desarrolla en detalle las ecuaciones que permitieron el análisis termodinámico clásico de los valores de  $\gamma_1^\infty$  determinados de manera experimental. La presencia de los modificadores produce cambios significativos en  $\gamma_1^\infty$  y estos son distintos para cada modificador. En el caso de urea, cloruro de guanidina y glicerol, su presencia decrece los valores de  $\gamma_1^\infty$  y desplaza el máximo hacia temperaturas mas bajas. El efecto es mas pronunciado en el caso del cloruro de guanidina, seguido por urea y finalmente el glicerol. Esto quiere decir que el cloruro de guanidina promueve la solubilidad del tolueno en la disolución acuosa mejor que la urea y que el glicerol. El etilenglicol también disminuye los valores de  $\gamma_1^\infty$  en todo el intervalo de temperatura estudiado, mientras que la glucosa tiene el efecto opuesto *i.e.*, aumenta los valores de  $\gamma_1^\infty$  (solubiliza menos tolueno que el agua pura). A bajas temperaturas, los otros tres modificadores (glucosa, sacarosa y trehalosa) son incapaces de solubilizar más tolueno en comparación al agua pura, pero conforme se incrementa la temperatura, se convierten en promotores de la solubilidad del tolueno en la disolución. Los datos de  $\gamma_1^\infty$  para el soluto en las disoluciones [agua + modificador] también fueron analizados con un esquema termodinámico clásico, lo que permitió un análisis detallado de los potenciales termodinámicos y sus dependencias con la temperatura y la concentración de modificador en la disolución. Como resultado de nuestro análisis termodinámico, encontramos que al igual que en agua pura, a bajas temperaturas la contribución entrópica a la energía de Gibbs de disolución es responsable de la solubilidad de los solutos no polares en el medio acuoso, mientras que a altas temperaturas es la contribución entálpica. En un intervalo de temperatura muy pequeño de sólo 10 K en las inmediaciones de la temperatura ambiente, las contribuciones entrópica y entálpica favorecen la disolución del soluto no polar.

**4.1. Artículo # 1. Infinite dilution activity coefficients for benzene and toluene in water and in aqueous solutions of the protein denaturants urea and guanidine hydrochloride**





## Infinite dilution activity coefficients for benzene and toluene in water and in aqueous solutions of the protein denaturants urea and guanidine hydrochloride

Štěpán Hovorka, Vladimír Dohnal,<sup>a</sup>

*Department of Physical Chemistry, Institute of Chemical Technology, 166 28 Prague 6, Czech Republic*

Ernesto Carrillo-Nava, and Miguel Costas<sup>a</sup>

*Laboratorio de Termofísica, Departamento de Física y Química Teórica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México*

Experimental infinite dilution activity coefficients  $\gamma_1^\infty$  for benzene and toluene in water and in aqueous solutions of two protein denaturants, urea and guanidine hydrochloride, are reported. The quantities were measured in the temperature range (273 to 323) K. Four denaturant concentrations were used from (0.5 to 5.0) mol · dm<sup>-3</sup>, covering the range where proteins undergo chemical denaturation. For both solutes in water, from the freezing temperature of water,  $\gamma_1^\infty$  rises with increasing temperature, passes through a maximum close to room temperature, and then continuously decreases with increasing temperature. Based on the results reported here and selected literature values, recommended correlations of  $\gamma_1^\infty(T)$  for benzene and toluene in water were established. They clearly show that from the freezing temperature to the normal boiling temperature of water, the origin of the hydrophobicity of the non-polar solutes changes from being entropic to enthalpic in nature. The presence of a denaturant (modifier) produces a significant decrease of  $\gamma_1^\infty$  values, their maximum being displaced towards lower temperatures. The effect is more pronounced for guanidine hydrochloride, which acts as a better solubilizing agent than urea. The solute in (water + modifier)  $\gamma_1^\infty$  data were analysed by a classical thermodynamic scheme employing solution and transfer {water to (water + modifier)} quantities. The accuracy of the data allowed the derivation of enthalpies, entropies, and heat capacities and a detailed discussion of the several observed trends. A remarkable feature is that there is only a narrow temperature interval where both the enthalpic and entropic contributions to the Gibbs energy are favourable to solute transfer. At lower and higher temperatures, the enthalpic and entropic components compete, solute transfer being favoured by entropy or by enthalpy, respectively. Extrapolation of this behaviour suggests that the effect of the modifier on the solubility of hydrophobic solutes should eventually invert at both lower and

<sup>a</sup>To whom correspondence should be addressed. (E-mail: dohnalv@vscht.cz and E-mail: costasmi@servidor.unam.mx).

higher temperatures. The data presented here might be used to understand better, through the application of different models, the exposure of non-polar amino acid side chains from the protein interior to the aqueous environment, which characterizes protein denaturation.

© 2000 Academic Press

**KEYWORDS:** infinite dilution activity coefficients; benzene; toluene; inert gas stripping method; aqueous solutions; protein denaturants; urea; guanidine hydrochloride; thermodynamic properties of solution and transfer

## 1. Introduction

The native state of proteins is characterized by a hydrophobic core, mainly formed by the side chains of non-polar amino acids. Native proteins can be unfolded at constant temperature by aqueous solutions of denaturants, the more widely used being urea and guanidine hydrochloride.<sup>(1,2)</sup> Upon unfolding the native protein structure, the non-polar chemical groups are exposed to these aqueous media. Hence, thermodynamic studies involving small and sparingly soluble non-polar substances in water and in (water + denaturant) solutions are relevant to the understanding of protein unfolding and stabilization.<sup>(1)</sup> In this work, we have used benzene and toluene, both of which can be considered to be models for the side chain of the amino acid phenylalanine. The infinite dilution limiting activity coefficients  $\gamma_1^\infty$  presented and discussed here can be used to advance the understanding of the mechanisms involved in protein denaturation through chemical agents, as well as for the evaluation of different models for hydrophobicity.<sup>(3)</sup> In addition, these data are important for several applications within the environmental and waste-water treatment areas, where increasingly stringent emission standards are being enforced. The concept of activity coefficient is fundamental for fluid phase equilibria thermodynamics, but is not of common use in the biochemistry and biothermodynamic fields. However, activity coefficients are directly related to the Gibbs energy that is more often used in those fields. In particular,  $\ln \gamma_1^\infty = \Delta_{\text{sol}} G_{\text{m},1}^\infty / RT$ , where  $\Delta_{\text{sol}} G_{\text{m},1}^\infty$ , the Gibbs energy of solution, refers to the process where the solute is transferred from the pure liquid state to water at infinite dilution. In this work, we will be using both concepts. Another relevant quantity for protein denaturation studies is the transfer Gibbs energy  $\Delta_{\text{tr}} G_{\text{m},1}^\infty$  which is also easily obtained from the measured values of  $\gamma_1^\infty$ . Transfer properties characterize the process where the solute is transferred from water to a (water + denaturant) mixture. Transfer Gibbs energies derived from solubility studies on amino acids and peptides<sup>(4-8)</sup> and also on hydrocarbons representing the side chains of amino acids<sup>(9)</sup> have been used to estimate, through an additivity scheme, the Gibbs energy for the denaturation process.<sup>(10,11)</sup>

The experimental determination of limiting activity coefficients is very useful, since this infinite dilution property possesses the essential information governing the thermodynamic behaviour of the studied systems. If the temperature dependence of the infinite dilution activity coefficients is obtained with good accuracy, other important thermodynamic quantities such as enthalpies, entropies and heat capacities of solution can be obtained.

When dealing with small and barely soluble non-polar solutes in water, there are two general routes that can be followed experimentally to study such systems. One possibility is to measure the (liquid + liquid) equilibrium, which provides the mutual solubilities of the components. If the mutual solubilities are small (solute mole fraction  $x < 0.001$ ), then the reciprocal value of this mole fraction approximates the infinite dilution activity coefficient of the solute, *i.e.*  $\gamma_1^\infty = 1/x$ . If the non-polar solute is sufficiently volatile, a second possibility is to measure the (vapour + liquid) equilibrium partitioning. This is the strategy we have followed in this work by using the Inert Gas Stripping (i.g.s.) method. The technique of i.g.s., which has been proved to be highly reliable for similar systems,<sup>(12)</sup> has distinct advantages over some other methods: broad range applicability; high accuracy; no need to calibrate the gas chromatograph detector; and no need to know exactly the initial solute concentration.

In this work we present experimental infinite dilution activity coefficients for benzene and toluene in water and in (water + urea) or (water + guanidine hydrochloride) solutions, in the temperature range (273 to 323) K. The quantities were measured at four denaturant concentrations (0.5 to 5.0) mol · dm<sup>-3</sup>, covering the range where proteins undergo chemical denaturation.<sup>(13, 14)</sup> The two protein denaturants used here will also be referred to as modifiers, a term that describes the fact that the presence of urea or guanidine hydrochloride modify significantly the aqueous environment where the non-polar solute is placed at infinite dilution. The primary data were analysed using a classical thermodynamic scheme, which allowed the derivation of other thermodynamic quantities and a detailed discussion of several observed trends. For the case of the temperature dependence of limiting activity coefficients of benzene and toluene in pure solvent water, we also carried out a critical evaluation and selection of literature values, which together with the results reported here, allowed us to provide a recommended correlation.

## 2. Experimental

Benzene (p.a.) and toluene (p.a.) obtained from Lachema (Brno, Czech Republic) were fractionally distilled on 1 m long packed columns before use. Urea (p.a.) from Lachema and guanidine hydrochloride (Fluka, stated mass fraction >0.99) were used as purchased. Water was doubly distilled in an all-glass still.

The method of inert gas stripping (i.g.s.) consists of measuring the rate of elution of a volatile solute as an entraining inert gas is passed through a highly dilute solution, the solute content being periodically analysed by gas chromatography. The experimental setup and procedure used in this work are essentially the same as those we have used recently to measure (air, water) partitioning of halocarbons and described in detail elsewhere.<sup>(12)</sup> The apparatus is designed around a computer interfaced Hewlett-Packard gas chromatograph, Model 5890 II, equipped with a flame ionization detector and a pneumatically operated six-port gas sampling valve which is housed in an independently heated zone of the g.c. and kept at  $T = (433 \pm 1)$  K. The equilibrium stripping cell is an all-glass jacketed device comprising the dilution cell that holds the dilute solution under study. For a detailed view of the cell design, we refer to figure 2 of our recent paper on i.g.s.<sup>(12)</sup> The cell is thermostated by an electronic water-circulating bath (Lauda, Model RC6 CP)

to  $\pm 0.02$  K. The temperature of the water bath is measured with a calibrated standard mercury thermometer (Karl Schneider, Wertheim, F.R.G.) to  $\pm 0.01$  K. The constant flow of stripping gas ( $N_2$ ) is supplied by an auxiliary channel of the g.c. and introduced into the dilute solution in the dilution cell through a glass tip of very fine porosity where it is dispersed into small-diameter bubbles. Before entering the cell, the stripping gas is brought to the temperature of the solution by passing through a thermostating coil immersed in the bath. The stripping gas flow rate is digitally controlled by the electronic pressure controller of the channel and measured, before and after each experiment, with a thermostated soap-bubble flowmeter. Typical flow rates used in this work were about  $0.15 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  which implied small relative rates of the solute elution ( $\approx 1.5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ); the flow rates showed very good stability and could be determined to  $\pm 0.3$  per cent. The cell outlet is connected via Teflon glass-to-metal joints and a heated ( $T = 423 \text{ K}$ ) stainless-steel transfer line to the respective port of the gas sampling valve and through it to the atmosphere. The volume of the sampling loop used was  $0.25 \text{ cm}^3$ . Since the modifiers used in this work are non-volatile, and the flame ionization detector does not respond to water, there is, in principle, no need to resolve the vapour mixture to components for analysis. Thus, just a short (0.5 m) stainless steel packed g.c. column filled with Porapak Q (80 to 100) mesh was employed to separate residual impurities, if any. At carrier gas flow rates of  $0.15 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  and oven temperatures of  $463 \text{ K}$ , this provided narrow peaks and sufficiently short times of analyses (12 min). The operation of the g.c., including all zone temperature controls, the timing of the gas sampling valve, and the signal acquisition and integration, was achieved by an interfaced personal computer using HP ChemStation software.

The measurement procedure is started by thoroughly flushing the clean equilibrium cell and the entire manifold with dry nitrogen. The dilution cell (load volume  $170 \text{ cm}^3$ ) is loaded gravimetrically with the solvent, *i.e.* either with the pure water or an aqueous solution of a modifier. The mixed solvents (water + modifier) of selected compositions are pre-prepared in  $250 \text{ cm}^3$  flasks also on a mass basis. The solute is added into the dilution cell volumetrically by a gas-tight syringe, the added amount being always small enough to correspond safely to a homogeneous solution and the Henry's law region. Then, the contents of the dilution cell are vigorously mixed with an efficient magnetic stirrer. After setting and measuring the stripping gas flow rate, the equilibrium cell is connected to the manifold and the stripping gas introduced into the cell. At this moment, the automatic data acquisition controlled by the computer is started. The process of the solute elution is monitored for (3 to 4) h during which 18 samples are taken.

The limiting activity coefficients were determined from the i.g.s. measurements using the second-order approximation approach:<sup>(15)</sup>

$$\gamma_1^\infty = (n_2^0 + n_3^0)RT(p_1^s D)^{-1}(-d \ln A_1/dt) \prod_{i=1}^4 k_i \quad (1)$$

where  $n_2^0$  and  $n_3^0$  are the amounts of substance of water and the modifier, respectively, loaded into the stripping cell,  $D$  is the flow rate of pure stripping gas at temperature  $T$  and pressure  $p$  of the cell,  $p_1^s$  is the pure component vapour pressure, and  $(-d \ln A_1/dt)$  is the slope of the semilogarithmic plot of solute peak area  $A_1$  against time  $t$ . The last term in

equation (1), which is close to unity (for systems studied in this work,  $0.95 < \prod_{i=1}^4 k_i < 1.00$ ), comprises correction factors  $k_i$  that account for the following minor effects:  $k_1$  accounts for change of the stripping gas flow rate due to the saturation in the cell:

$$k_1 = 1 - \{\bar{n}_1/(n_2^0 + n_3^0)\}\gamma_1^{\infty, I} p_1^s/p - (p_2^s/p), \quad (2)$$

with

$$\bar{n}_1 = n_1^0 \{(A_1^f/A_1^0) - 1\} / \ln(A_1^f/A_1^0), \quad (3)$$

where  $n_1^0$  is the initial amount of solute in the cell,  $A_1^f$  and  $A_1^0$  are the g.c. responses to the solute at the end and at the beginning of the i.g.s. experiment, respectively, and  $\gamma_1^{\infty, I}$  is the value of limiting activity coefficient calculated with all  $k_i = 1$ ;  $k_2$  accounts for removal of the solvent water from the dilution cell due to its volatility:

$$k_2 = 1 - (p_2^s Dt) / \{2(n_2^0 + n_3^0)RT\}, \quad (4)$$

amount of the solute in the vapour space:

$$k_3 = 1 + (\gamma_1^{\infty, I} p_1^s V) / \{(n_2^0 + n_3^0)RT\} = \{1 - (-d \ln A_1/dt)(V/D)\}^{-1}, \quad (5)$$

where  $V$  is the volume of the cell vapour space; vapour-phase non-ideality:

$$k_4 = \{1 + B_{gg} p / (RT)\} \exp\{[p(2B_{1g} - B_{gg} - V_1^L) - p_1^s(B_{11} - V_1^L)] / (RT)\}, \quad (6)$$

where  $B_{ij}$  are the second virial coefficients,  $V_{m,i}$  is the molar volume of pure liquid  $i$  and the subscript  $g$  refers to the stripping gas. For the present systems, the individual correction factors  $k_i$ , were in the following ranges:  $0.86 < k_1 < 0.99$ ;  $0.9995 < k_2 < 1$ ;  $1.01 < k_3 < 1.11$ ;  $0.98 < k_4 < 1.01$ .

Vapour pressures were taken from the compilation of Dykyj and Repáš,<sup>(16)</sup>  $p_1^s$  for the subcooled liquid benzene below its normal freezing temperature (278.7 K) being obtained by extrapolation from the liquid region by means of the Antoine equation. Molar volumes of pure liquids were taken from CDATA database.<sup>(17)</sup> Virial coefficients were obtained from Hayden-O'Connell correlation<sup>(18)</sup> with parameters from Prausnitz *et al.*<sup>(19)</sup> and CDATA.<sup>(17)</sup>

### 3. Results and discussion

Experimental limiting activity coefficients  $\gamma_i^\infty$  of benzene and toluene in aqueous solutions of urea and guanidine hydrochloride (subsequently referred to as guanidine) are listed in table 1. The covered ranges of temperature and modifier concentration are, respectively, from  $T = (273 \text{ to } 323)$  K and from  $(0.5 \text{ to } 5)$  mol · dm<sup>-3</sup>, pure solvent water being also included. Most values in table 1 were determined from single measurements; replicates done occasionally to verify the performance of the experimental technique showed the reproducibility to be within 1 per cent. Relative standard deviations, as estimated by the error propagation law from the errors of all input quantities of equation (1), are from (1 to 2) per cent, which we believe is also the total uncertainty of the  $\gamma_i^\infty$  values given in table 1.

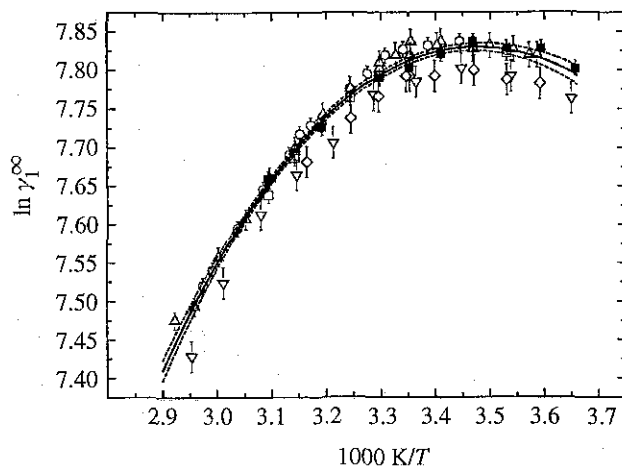


FIGURE 1. Limiting activity coefficients  $\gamma_1^\infty$  of benzene(1) in water(2) as a function of temperature. Experimental values from this work and selected data from the literature (obtained from solubility measurements unless indicated otherwise): ■, table 1 (i.g.s.); □, Tucker *et al.*<sup>(22)</sup> (tensimetry); O, Franks *et al.*,<sup>(23)</sup> Δ, Arnold *et al.*,<sup>(24)</sup> ▽, Alexander,<sup>(25)</sup> ◇, Bohon and Claussen.<sup>(26)</sup> The error bars correspond to the standard errors. —, the recommended fit by equation (7) with parameters in table 2; ---, defines the 95 per cent confidence band of the recommended fit.

#### BENZENE, AND TOLUENE IN WATER

Results of our measurements of  $\gamma_1^\infty$  of both studied solutes in pure solvent water can be compared with measurements reported in the literature. Our comprehensive search of the literature revealed an abundance of relevant data which, however, differ widely in their reliability and accuracy and in their extent, ranging from individual isolated measurements to systematic temperature dependence studies. Most aqueous solubilities reported to 1986 have been critically compiled in the IUPAC Solubility Data Series<sup>(20)</sup> and an up-to-date survey of  $\gamma_1^\infty$  values determined by *ad hoc* (vapour + liquid) equilibrium measurements has been available from our extensive database PLACID.<sup>(21)</sup> The van't Hoff-like plots in figures 1 and 2 display the data obtained in this work along with selected results from the literature. For benzene in water in figure 1, the results of five most accurate systematic studies providing the best selection from the literature and the data from this work are compared. It can be seen that all the data are in very good mutual agreement, and if we disregard the older measurements of Bohon and Claussen<sup>(26)</sup> and of Alexander,<sup>(25)</sup> which are slightly but systematically below the others, the remaining four sets of data agree within a remarkable  $1 \cdot 10^{-2} \cdot \gamma_1^\infty$ . An analogous comparison for toluene in water in figure 2 is not at all clear cut. Since available data are less abundant, markedly less accurate, and in rather poor mutual agreement, the threshold for the selection of the best data for comparison had to be less demanding. We adopted here the policy of selecting literature results from a greater number of sources to average properly the scatter due to systematic errors of the data. As seen from figure 2, the values measured in this work are within this scatter.

TABLE 1. Experimental limiting activity coefficients  $\gamma_1^\infty$  of benzene or toluene in water and in aqueous solutions of urea or guanidine hydrochloride as a function of temperature and solution composition (the modifier mole fraction  $x_3$  and corresponding approximate modifier molar concentration  $c_3$  at  $T = 298.15$  K)

$x_3$	$\frac{c_3}{(\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3})}$	$T/\text{K}$								
		273.15	278.15	283.15	288.15	293.15	298.15	303.15	313.15	323.15
$\gamma_1^\infty$ in {benzene(1) + water(2) + urea(3)}										
0	0	2446 <sup>a</sup>	2510	2511	2531	2492	2449	2415	2265	2120
0.00917	0.5	2430	2436	2447		2367		2269	2116	1901
0.03822	2.0	2127	2106	2111		2024	1964	1884	1724	1590
0.05875	3.0	1977		1920		1838		1704	1575	1413
0.10434	5.0	1671		1603		1512		1393	1263	1137
$\gamma_1^\infty$ in {benzene(1) + water(2) + guanidine hydrochloride(3)}										
0.00929	0.5	2371	2393	2390		2372		2298	2168	2013
0.02934	1.5	2142		2048		2047		1935	1829	1689
0.06420	3.0	1719	1664	1668		1578		1480	1407	1291
0.12250	5.0	1244	1205	1159		1080		1020	938	876
$\gamma_1^\infty$ in {toluene(1) + water(2) + urea(3)}										
0	0	8960 <sup>a</sup>		9255		9151		8722	8020	7231
0.00916	0.5	8502		8690		8453		8006	7240	6274
0.02822	1.5	7816		7695		7536		7038	6344	5492
0.05883	3.0	6851		6691		6244		5902	5204	4535
0.10434	5.0	5417		5256		4904		4560	4055	3495
$\gamma_1^\infty$ in {toluene(1) + water(2) + guanidine hydrochloride(3)}										
0.00928	0.5	8720		8739		8581		8225	7549	6769
0.02945	1.5	7397		7396		7024		6820	6314	5622
0.06440	3.0	5626		5370		5009		4837	4472	4149
0.12230	5.0	3766		3403		3279		3022	2869	2619

<sup>a</sup> At  $T = 273.35$  K.

For both benzene and toluene, starting from the freezing temperature of water, the limiting activity coefficient rises with increasing temperature, passes through a rather flat maximum at a temperature slightly below room temperature, and then continuously decreases with increasing temperature. For each of the two solutes, we fitted this temperature dependence to the following equation originating from the assumption of temperature independent heat capacity of solution:

$$\ln \gamma_1^\infty = A + B/\tau + C \ln \tau, \quad (7)$$

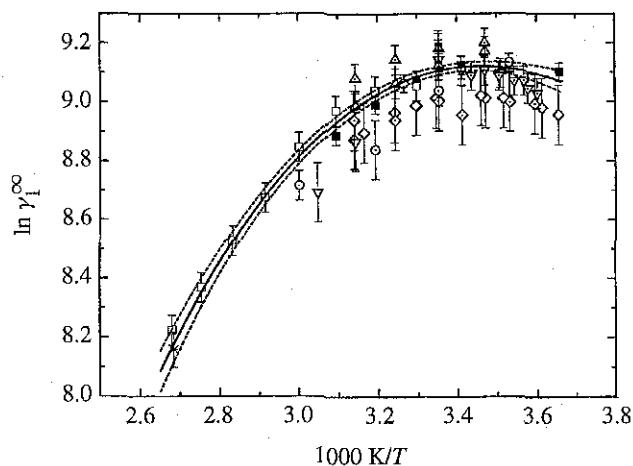


FIGURE 2. Limiting activity coefficients  $\gamma_1^\infty$  of toluene(1) in water(2) as a function of temperature. Experimental values from this work and selected data from literature (obtained from solubility measurements unless indicated otherwise): ■, table 1 (i.g.s.); □, Chen and Wagner;<sup>(27)</sup> ○, Bittrich *et al.*;<sup>(28)</sup> ◇, Dutta *et al.*;<sup>(29)</sup> △, Sanemasa *et al.*;<sup>(30)</sup> △, Sanemasa *et al.*;<sup>(31)</sup> ▽, Brown and Wasik;<sup>(32)</sup> ▽, Bradley *et al.*;<sup>(33)</sup> ◇, Pierotti and Labastre;<sup>(34)</sup> ◇, Bohon and Claussen;<sup>(26)</sup> ×, Anderson and Prausnitz.<sup>(35)</sup> The error bars correspond to the standard errors. —, the recommended fit by equation (7) with parameters in table 2; - - -, defines the 95 per cent confidence band of the recommended fit. Single points (not shown) at  $T = 293.15$  K or  $T = 298.15$  K from references 36 to 43 were also used to obtain the recommended fit.

where  $\tau = T/T_0$  and the scaling temperature  $T_0 = 298.15$  K. Although it is known that  $\Delta_{\text{sol}} C_{p,m,1}^\infty$  decreases with temperature,<sup>(44)</sup> the extent and the accuracy of  $\gamma_1^\infty$  data do not justify more complex fits with a greater number of adjustable parameters. In the least squares fitting, values measured in this work and all selected literature data were treated simultaneously, each point being weighted according to its assigned standard error  $\sigma\{\ln \gamma_{1,i}^\infty(\text{expt})\}$ . The initial values of the standard errors were chosen by considering, as far as possible, the information on measurement accuracy provided in the original literature source, but were readjusted when deemed necessary.

The objective function minimized was:

$$S = \sum_{i=1}^n \{ \ln \gamma_{1,i}^\infty(\text{expt}) - \ln \gamma_{1,i}^\infty(\text{calc}) \}^2 / [\sigma\{\ln \gamma_{1,i}^\infty(\text{expt})\}]^2, \quad (8)$$

where  $n$  is the number of experimental values. If the data are consistent within the assigned values of uncertainties, the weighted standard deviation of fit:

$$s = \{ S_{\text{min}} / (n - p) \}^{1/2}, \quad (9)$$

where  $p$  is the number of fitted parameters, should give  $s \approx 1$ . More exactly, the residual sum of squares  $S_{\text{min}}$  should be within the respective critical values of the  $\chi^2$ -distribution:

$$\chi_{\alpha/2}^2(n - p) < S_{\text{min}} < \chi_{1-\alpha/2}^2(n - p), \quad (10)$$



where  $\alpha$  is a chosen significance level ( $\alpha = 0.05$ ). For benzene, the assigned values of the standard errors mostly correspond to probable random experimental errors. For toluene, higher values of standard errors had to be typically adopted to account for systematic differences between data from different sources, and thus to reach consistency of the data within their uncertainties.

Figures 1 and 2 show the fitted lines with their confidence bands, the corresponding parameters and standard deviations being reported in table 2. The fits are statistically plausible, fulfilling criterion (10). The fitted lines are closely followed by the values measured in this work. Also listed in table 2 are infinite dilution values at  $T = 298.15$  K of the activity coefficient and of derived caloric properties, enthalpy of solution  $\Delta_{\text{sol}}H_{\text{m},1}^{\infty}$  and heat capacity of solution  $\Delta_{\text{sol}}C_{\text{p},\text{m},1}^{\infty}$  calculated by standard thermodynamic procedures from equation (7), namely  $\Delta_{\text{sol}}H_{\text{m},1}^{\infty} = -RT^2\partial(\Delta_{\text{sol}}G_{\text{m},1}^{\infty}/RT)/\partial T$  and  $\Delta_{\text{sol}}C_{\text{p},\text{m},1}^{\infty} = \partial\Delta_{\text{sol}}H_{\text{m},1}^{\infty}/\partial T$ . The values of  $\gamma_1^{\infty}(298.15 \text{ K})$  are in a good agreement with solubility values previously recommended by IUPAC, and the derived  $\Delta_{\text{sol}}H_{\text{m},1}^{\infty}(298.15 \text{ K})$  and temperature independent  $\Delta_{\text{sol}}C_{\text{p},\text{m},1}^{\infty}$  compare favourably with reliable calorimetric measurements. At temperatures other than ambient, the present fits of  $\gamma_1^{\infty}(T)$ , based on updated selection of critically evaluated solubility and (vapour + liquid) equilibrium data and the accurate new measurements reported in this work, improve existing knowledge. This is true particularly for toluene, where the present fit markedly surpasses the accuracy of the IUPAC tentative solubility values.<sup>(20)</sup> As a result, we propose the fits given in table 2 as recommended  $\gamma_1^{\infty}(T)$  dependences for benzene and toluene in water in the range from the freezing temperature to the normal boiling temperature of water.

The recommended  $\gamma_1^{\infty}(T)$  correlations in table 2 can be used to extrapolate to higher temperatures, where solubilities for benzene and toluene in water were measured at elevated pressures.<sup>(35, 48)</sup> As seen in figure 3(a) for benzene, this extrapolation agrees very well with the literature data at super-ambient conditions, the results for toluene being of the same quality. For the comparison shown in figure 3, we introduced the following considerations: since the solubility of benzene remains quite small even at the highest  $T$  and  $p$  in references 35 and 48 ( $x(\text{C}_6\text{H}_6) = 6.07 \cdot 10^{-3}$  at  $T = 476.95 \text{ K}$  and  $p = 3.218 \text{ MPa}$  for benzene in reference 35), the  $\gamma_1^{\infty}$  values were obtained as the inverse mole fraction solubilities; and no pressure correction to the literature values was applied since this correction is negligible.

The good performance of the correlations in table 2 allows the calculation of  $\Delta_{\text{sol}}H_{\text{m},1}^{\infty}$  and  $-T \cdot \Delta_{\text{sol}}S_{\text{m},1}^{\infty} = T \cdot \partial\Delta_{\text{sol}}G_{\text{m},1}^{\infty}/\partial T$  with a reasonable degree of confidence. These solution enthalpies and entropies calculated equation (7), together with the  $\Delta_{\text{sol}}G_{\text{m},1}^{\infty}$ , are displayed in figure 3(b) for benzene over a wide temperature range. Figure 3(b) shows that, for  $280 \leq (T/\text{K}) \leq 390$ ,  $\Delta_{\text{sol}}G_{\text{m},1}^{\infty}$  changes only by approximately 15 per cent, but its enthalpic and entropic contributions change drastically. At low temperatures, the entropic contribution to  $\Delta_{\text{sol}}G_{\text{m},1}^{\infty}$  is dominant, while at high temperatures  $\Delta_{\text{sol}}G_{\text{m},1}^{\infty}$  is dominated by its enthalpic contribution. In other words, at temperatures close to 287 K, where  $\Delta_{\text{sol}}H_{\text{m},1}^{\infty} = 0$ , the low solubility or hydrophobicity of the non-polar benzene solute is purely an entropic effect, as was established many years ago,<sup>(49)</sup> but at temperatures close to 384 K, where  $-T \cdot \Delta_{\text{sol}}S_{\text{m},1}^{\infty} = 0$ , the still low solubility of benzene is purely due

TABLE 2. Recommended temperature dependence of limiting activity coefficients of benzene(1) or toluene(1) in water(2) for the temperature range from 273 K to 373 K. Parameters  $A$ ,  $B$ ,  $C$  of equation (7) obtained by simultaneous weighted regression of the experimental data from this work and from literature, the standard deviation of fit  $s$ , and the total number of points  $n$  involved, together with infinite dilution values of activity coefficient  $\gamma_1^\infty(T_0)$ , enthalpy of solution  $\Delta_{\text{sol}}H_{\text{m},1}^\infty(T_0)$  calculated at  $T_0 = 298.15$  K and heat capacity of solution (temperature independent)  $\Delta_{\text{sol}}C_{p,\text{m},1}^\infty$ . The uncertainties given are estimated standard deviations

	Benzene	Toluene
$A$	33.9030	39.9411
$B$	-26.0907	-30.8358
$C$	-27.0449	-31.7997
$s$	1.14	1.08
$n$	74	67
$\gamma_1^\infty(T_0)$	2470 $\pm$ 5	9003 $\pm$ 63
	(2445 $\pm$ 28) <sup>a</sup>	(9615 $\pm$ 365) <sup>b</sup>
$\Delta_{\text{sol}}H_{\text{m},1}^\infty(T_0)/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1})$	2365 $\pm$ 95	2389 $\pm$ 346
	(2080 $\pm$ 40) <sup>c</sup>	(1730 $\pm$ 40) <sup>c</sup>
	(2210 $\pm$ 10) <sup>c</sup>	
	(2340 $\pm$ 700) <sup>d</sup>	(1800 $\pm$ 800) <sup>d</sup>
$\Delta_{\text{sol}}C_{p,\text{m},1}^\infty/(\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})^e$	225 $\pm$ 8	264 $\pm$ 17
	(238 $\pm$ 16) <sup>f</sup>	(305 $\pm$ 31) <sup>f</sup>
	(225 $\pm$ 5) <sup>g</sup>	(263 $\pm$ 13) <sup>g</sup>

<sup>a</sup> From the IUPAC recommended value of solubility  $x(\text{C}_6\text{H}_6) = (4.09 \pm 0.05) \cdot 10^{-4}$  at  $T = 298.15$  K.<sup>(20)</sup> <sup>b</sup> From the IUPAC recommended value of solubility  $x(\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3) = (1.04 \pm 0.04) \cdot 10^{-4}$  at  $T = 298.15$  K.<sup>(20)</sup> <sup>c</sup> Flow microcalorimetry.<sup>(45,46)</sup> <sup>d</sup> Batch microcalorimetry.<sup>(47)</sup> <sup>e</sup> Temperature independent value according to equation (7). <sup>f</sup> Scanning microcalorimetry<sup>(44)</sup> at  $T = 298.15$  K. <sup>g</sup> Average value reported in reference 45 obtained from  $\Delta_{\text{sol}}H_{\text{m},1}^\infty(T)$  measured by flow microcalorimetry.

to an enthalpic effect. At  $T = 334$  K,  $\Delta_{\text{sol}}H_{\text{m},1}^\infty = -T \cdot \Delta_{\text{sol}}S_{\text{m},1}^\infty$  and both contributions are equally important. The qualitative features seen in figure 3(b) are not a consequence of the assumption of a temperature independent  $\Delta_{\text{sol}}C_{p,\text{m},1}^\infty$ . The predicted high-temperature dependence for  $\Delta_{\text{sol}}H_{\text{m},1}^\infty$  and  $-T \cdot \Delta_{\text{sol}}S_{\text{m},1}^\infty$  in figure 3(b) receives support from values derived from literature data.<sup>(35,48)</sup> For this comparison, the literature data in figure 3(a) were fitted to equation (7) and the corresponding  $\Delta_{\text{sol}}H_{\text{m},1}^\infty$  and  $-T \cdot \Delta_{\text{sol}}S_{\text{m},1}^\infty$  values calculated by standard thermodynamic procedures. The two sets of  $\Delta_{\text{sol}}H_{\text{m},1}^\infty$  and

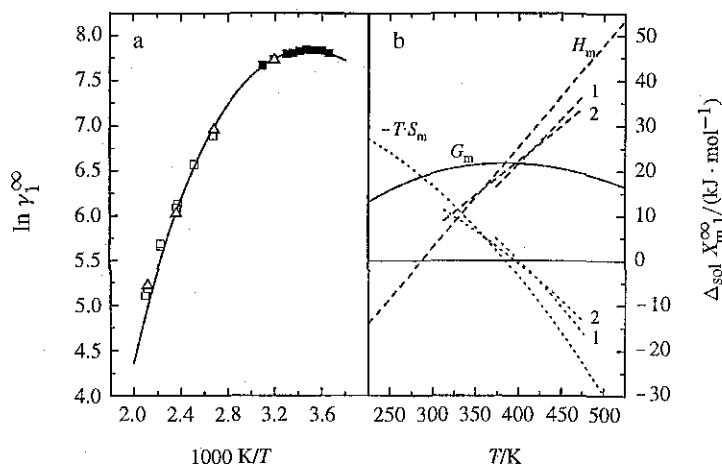


FIGURE 3. Temperature dependence of (a) limiting activity coefficient  $\gamma_1^\infty$  and (b) thermodynamic functions of solution  $\Delta_{\text{sol}} X_{m,1}^\infty$  ( $X = G, H, -T \cdot S$ ) in a broad range of temperatures for benzene(1) in water(2). In (a), the line is the recommended fit by equation (7) with parameters from table 2 and points are experimental data from  $\blacksquare$ , this work (table 1);  $\square$ , Anderson and Prausnitz<sup>(35)</sup>;  $\triangle$ , Tsionopoulos and Wilson<sup>(48)</sup>. In (b), —,  $\Delta_{\text{sol}} G_{m,1}^\infty$ ; - - -,  $\Delta_{\text{sol}} H_{m,1}^\infty$ ; and  $\cdots$ ,  $T \cdot \Delta_{\text{sol}} S_{m,1}^\infty$ . The lines labelled  $G_m$ ,  $H_m$ , and  $-T \cdot S_m$  are from the recommended fit. Lines labelled 1 and 2 are calculated from fits of data [using equation (7)] in references 35 and 48, respectively.

$-T \cdot \Delta_{\text{sol}} S_{m,1}^\infty$  are in reasonable agreement with those derived from the recommended  $\gamma_1^\infty(T)$  fit in table 2, thus confirming the validity of the conclusions reached above.

#### BENZENE AND TOLUENE IN (WATER + MODIFIER) SOLUTIONS

The experimental  $\gamma_1^\infty$  values from table 1 for benzene and toluene in (water + urea) and (water + guanidine) are shown in figures 4 and 5, respectively; for comparison, the data for the same solutes in pure water are also displayed. The concentrations of (water + modifier) used cover the range where proteins undergo chemical denaturation.<sup>(13, 14)</sup> Figures 4 and 5 also show the fits to each set of data using equation (7), the corresponding parameters being reported in table 3. In order to analyse adequately all our data,  $\gamma_1^\infty$  data for both solutes in pure water were also fitted in the same manner as for the solutes in the (water + modifier) cases, the corresponding parameters of equation (7) being reported in table 3. All these individual fittings clearly demonstrate the smoothness of the measured data.

The modifier concentration dependence in figures 4 and 5 shows that, at all temperatures, the presence of urea and guanidine produces a significant decrease of  $\gamma_1^\infty$  values, *i.e.* both modifiers are effective solubilizing agents. The magnitude of this effect is clearly important; for example, at  $T = 293.15$  K, benzene and toluene are, respectively, 2.3 and 2.8 times more soluble in a guanidine solution of  $5.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  than in pure water. While at low modifier concentrations, the decrease of  $\gamma_1^\infty$  is similar for guanidine and urea, at higher modifier concentrations it is bigger for guanidine than for urea indicating that the

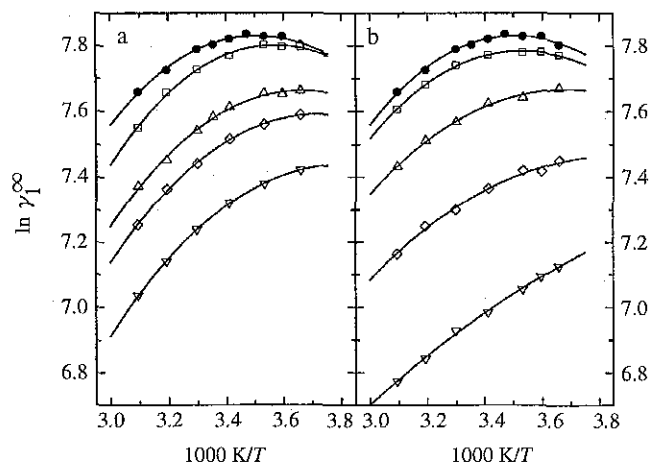


FIGURE 4. Limiting activity coefficients  $\gamma_1^\infty$  of benzene(1) in aqueous solutions of (a) urea and (b) guanidine as a function of temperature at several modifier molar concentrations  $c_3$ :  $\bullet$ ,  $c_3 = 0$  (pure solvent water);  $\square$ ,  $c_3 = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $\Delta$ , (a)  $c_3 = 2.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  and (b)  $c_3 = 1.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $\diamond$ ,  $c_3 = 3.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $\nabla$ ,  $c_3 = 5.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Points are from table 1; —, from equation (7) using parameters in table 3.

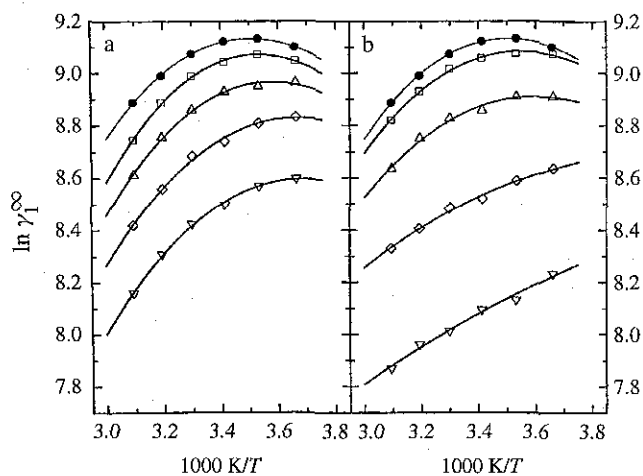


FIGURE 5. Limiting activity coefficients  $\gamma_1^\infty$  of toluene(1) in aqueous solutions of (a) urea and (b) guanidine as a function of temperature at several modifier molar concentrations  $c_3$ :  $\bullet$ , 0 (pure solvent water);  $\square$ ,  $c_3 = 0.5$ ;  $\Delta$ ,  $c_3 = 1.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $\diamond$ ,  $c_3 = 3.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $\nabla$ ,  $c_3 = 5.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Points are from table 1 and lines are from equation (7) using parameters in table 3.

former is a more powerful solubilizing agent. This is consistent with the well-known fact that guanidine is a more powerful protein denaturant agent than urea.<sup>(13,14)</sup>

As seen above, for benzene and toluene in pure water,  $\ln \gamma_1^\infty$  has a maximum (minimum

TABLE 3. Parameters of equation (7) used for smoothing  $\ln \gamma_1^\infty(T)$  dependence for individual constant compositions (modifier mole fraction  $x_3$  and corresponding approximate modifier molar concentration  $c_3$  at  $T = 298.15$  K) of aqueous solutions of urea and guanidine hydrochloride along with the derived temperature  $T_{\max}$  at which  $\ln \gamma_1^\infty$  is maximum and the temperature-independent heat capacity of solution at infinite dilution  $\Delta_{\text{sol}} C_{p,m,1}^\infty$

$x_3$	$\frac{c_3}{(\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3})}$	A	B	C	$s^a$	$\frac{T_{\max}^b}{\text{K}}$	$\frac{\Delta_{\text{sol}} C_{p,m,1}^\infty}{(\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})}$
benzene(1) + water(2) + urea(3)							
0	0	30.4274	-22.6194	-23.6318	0.006	285.4 ± 0.8	196 ± 12
0.00917	0.5	31.8577	-24.1038	-25.6350	0.006	280.3 ± 1.2	213 ± 14
0.03822	2.0	27.8333	-20.2541	-22.1239	0.008	273.0 ± 2.3	184 ± 17
0.05875	3.0	26.2967	-18.8152	-20.8854	0.004	268.6 ± 1.7	174 ± 10
0.10434	5.0	24.5163	-17.2352	-19.6180	0.002	261.9 ± 1.2	163 ± 5
benzene(1) + water(2) + guanidine hydrochloride(3)							
0.00929	0.5	28.0448	-20.2878	-21.3363	0.003	283.5 ± 0.6	177 ± 7
0.02934	1.5	21.9331	-14.3373	-15.7830	0.007	270.8 ± 3.6	131 ± 17
0.06420	3.0	17.6946	-10.3581	-12.0634	0.010	256 ± 10	100 ± 24
0.12250	5.0	9.9714	-3.0172	-5.1189	0.006	175 ± 38	43 ± 14
toluene(1) + water(2) + urea(3)							
0	0	41.1946	-32.0933	-33.5285	0.002	285.4 ± 0.3	279 ± 6
0.00916	0.5	45.8571	-36.8360	-38.7800	0.006	283.2 ± 0.7	322 ± 15
0.02822	1.5	41.3580	-32.4637	-34.6381	0.011	279.4 ± 1.7	288 ± 26
0.05883	3.0	36.0588	-27.3445	-29.8915	0.012	272.7 ± 2.9	249 ± 29
0.10434	5.0	35.5622	-27.0962	-29.7858	0.009	271.2 ± 2.2	248 ± 21
toluene(1) + water(2) + guanidine hydrochloride(3)							
0.00928	0.5	36.3615	-27.3238	-28.9139	0.007	281.8 ± 1.2	240 ± 17
0.02945	1.5	31.6599	-22.8104	-24.4922	0.014	277.7 ± 3.3	204 ± 34
0.06440	3.0	15.7280	-7.2252	-9.0437	0.011	238 ± 21	75 ± 26
0.12230	5.0	9.9739	-1.9229	-3.9790	0.018	144 ± 200	33 ± 43

<sup>a</sup> Standard deviation of fit. <sup>b</sup> Limits correspond to standard deviations obtained using the error propagation law.

in solubility) at approximately the same temperature (285 K). As the concentration of modifier increases, these maxima are displaced towards lower temperatures, as seen in figures 4 and 5 and indicated by  $T_{\max}$  values in table 3 {obtained from equation (7)}; for some modifier concentrations, the corresponding  $T_{\max}$  values appear to be below the freezing temperature of pure water. It is apparent that within the experimental window studied here, the curvature of  $\ln \gamma_1^\infty$  against  $1/T$  changes significantly, and that it is more pronounced for guanidine than for urea. This is quantitatively reflected in the  $\Delta_{\text{sol}} C_{p,m,1}^\infty$

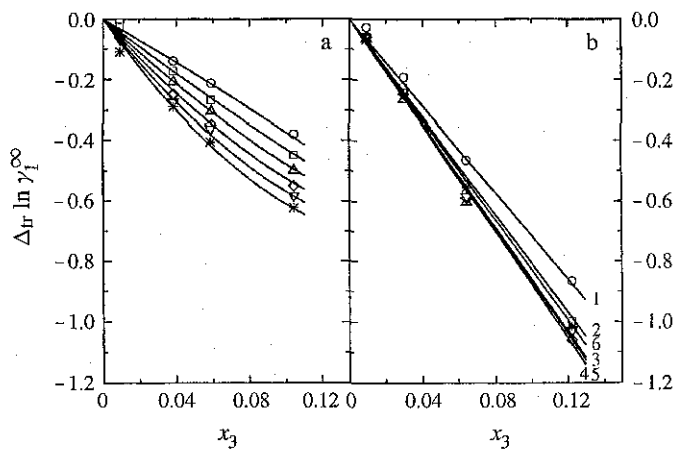


FIGURE 6.  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$ , the difference in  $\ln \gamma_1^\infty$  due to solute(1) transfer from pure solvent water(2) for (a) benzene(1) to {water(2) + urea(3)} and (b) toluene(1) to {water(2) + guanidine(3)} as a function of modifier mole fraction  $x_3$  at several temperatures: O,  $T = 273.15$  K;  $\square$ ,  $T = 283.15$  K;  $\triangle$ ,  $T = 293.15$  K;  $\diamond$ ,  $T = 303.15$  K;  $\nabla$ ,  $T = 313.15$  K;  $*$ ,  $T = 323.15$  K. Points are taken from table 1; —, equation (11) using parameters in table 4. Curves are labelled from low temperature (1) to high temperature (6) to facilitate identification.

values in table 3. These temperature-independent values, derived from equation (7), indicate that the structural changes brought about by the solution process, as measured by changes in the heat capacity, are more important when the solute is placed in a (water + guanidine) than in a (water + urea) environment. Although on the border of experimental uncertainty, for both benzene and toluene  $\Delta_{sol} C_{p,m,1}^\infty$  appears to go through a maximum at low urea concentrations, an effect that is absent in guanidine.

The important differences between urea and guanidine as solubilizing agents for benzene and toluene suggest that it is worthwhile to examine the transfer quantity  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$  that characterizes the process where the solute at infinite dilution is transferred from the water environment to the (water + modifier) mixture. The  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$  values can be obtained from the data in table 1. Figure 6 shows  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$  for benzene in (water + urea) and toluene in (water + guanidine) systems, the behaviour for toluene in (water + urea) and benzene in (water + guanidine) being similar, respectively. All  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$  values in figure 6 are negative, indicating a spontaneous solute transfer. Figure 6(a) shows that, for urea,  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$  changes non-linearly with modifier concentration at constant temperature, the curvature being small at  $T = 273$  K and much larger at  $T = 323$  K. At all urea concentrations,  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$  becomes more negative as the temperature increases. In contrast, as shown in figure 6(b),  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$  at constant temperature changes linearly with the concentration of guanidine, and the change with temperature at constant guanidine concentration is not monotonic. At high modifier concentrations,  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$  values are more negative for guanidine than for urea, expressing again that guanidine is a better solubilizing agent. The temperature and modifier concentration dependences of  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$  can be fitted

simultaneously using the equation

$$\Delta_{\text{tr}} \ln \gamma_1^{\infty} = (a + b/\tau + c \ln \tau)x_3 + (d + e/\tau)x_3^2. \quad (11)$$

This equation can be obtained from the two-suffix Margules equation as a starting point:

$$\ln \gamma_{1(2+3)}^{\infty} = x_2 \ln \gamma_{1(2)}^{\infty} + x_3 \ln \gamma_{1(3)}^{\infty} - a_{23}x_2x_3, \quad (12)$$

where  $\ln \gamma_{1(2+3)}^{\infty}$ ,  $\ln \gamma_{1(2)}^{\infty}$ , and  $\ln \gamma_{1(3)}^{\infty}$  correspond to the limiting activity coefficients of solute(1) in {water(2) + modifier(3)}, in water and in the hypothetical sub-cooled liquid modifier, respectively. In equation (12),  $a_{23}$  is the water-modifier interaction parameter and, since the solute is at infinite dilution,  $x_2 + x_3 = 1$ . To obtain equation (11) from equation (12), the temperature dependences of the quantities involved were considered to be given by the functional form of equation (7), which for  $a_{23}$ , was truncated after the first two terms. In the fitting procedure, the statistical significance of each parameter was tested. This led to two simplified forms of equation (11): those with  $c = 0$  and  $d = e = 0$  that are particular for the urea and guanidine solutions, respectively. The results of the simultaneous fit of the experimental  $\Delta_{\text{tr}} \ln \gamma_1^{\infty}(T, x_3)$  data by equation (11) are good. The fits are displayed in figure 6 for benzene in (water + urea) and for toluene in (water + guanidine); for the other two systems studied here, the results are qualitatively similar. The parameters of equation (11) are reported in table 4. The standard deviations of  $\Delta_{\text{tr}} \ln \gamma_1^{\infty}(T, x_3)$  fits are consistently higher than those for the isoconcentration fits in table 3 indicating that imperfections at the second derivative level are to be expected: as seen in table 4,  $c = 0$  for urea solutions, implying that the solution heat capacity is independent of  $x_3$  which according to the results in table 3 is incorrect. The values in table 4 confirm that the modifier concentration dependence is non-linear for urea and linear for guanidine. The simultaneous temperature and modifier concentration fit allows a comparison to be made of the present data for toluene in urea and guanidine solutions with those obtained by Wetlaufer *et al.*<sup>(9)</sup> from their relative solubility measurements. This comparison is shown in figure 7 where the parameters in table 4 were used to obtain the  $\Delta_{\text{tr}} \ln \gamma_1^{\infty}$  curves corresponding to the urea concentration (extrapolation) and guanidine concentration (interpolation) that Wetlaufer *et al.* used. The literature data are seen to be more scattered, the agreement with our results being reasonably good at low temperatures, excellent at  $T = 303$  K, but not satisfactory at higher temperatures. For urea, both sets of data coincide with the general trend, but for guanidine, Wetlaufer's  $\Delta_{\text{tr}} \ln \gamma_1^{\infty}$  data do not show the minimum found in this work. Based on the excellent performance of our experimental technique, as shown above in regard to the results in pure water, we believe that our results are more reliable than those of reference 9.

In table 4, it is seen that  $d = e = 0$  for (water + guanidine) solutions, so  $a_{23} = 0$ . In this case, the expression in parentheses in the first term of equation (11) can be identified, at constant temperature, with the Setchenow constant  $k_S$ , widely used by researchers in the electrolyte solutions field.<sup>(50)</sup> In this field, it is common practice to use molality instead of mole fraction as the solute concentration variable.<sup>(50)</sup> A fit based on guanidine molality in equation (11) resulted in a slightly poorer correlation, with standard deviations of fit bigger than those given in table 4. Figure 8 shows the variation of  $k_S$  with temperature for both benzene and toluene in aqueous guanidine solutions using the parameters in table 4;

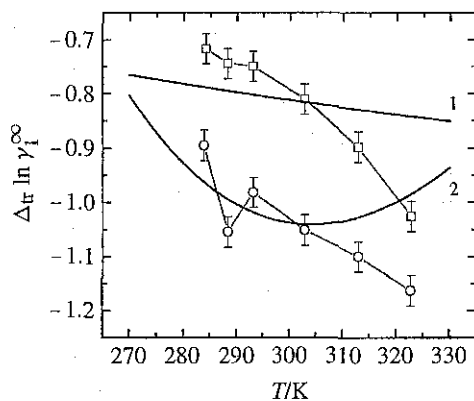


FIGURE 7.  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$ , the difference in  $\ln \gamma_1^\infty$  due to toluene(1) transfer from pure solvent water(2) to {water(2) + urea(3)} ( $\square$ ,  $x_3 = 0.15484$ ) and to {water(2) + guanidine(3)} ( $\circ$ ,  $x_3 = 0.11867$ ) as a function of temperature. Points are experimental results (with their standard deviations) from Wetlaufer *et al.*,<sup>(9)</sup> — for urea (1) and guanidine (2) from equation (11) with parameters from table 4 at the values  $x_3$  used by Wetlaufer *et al.*<sup>(9)</sup>

TABLE 4. Parameters of the classical thermodynamic model equation (11) for  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$  as a function of temperature and composition of aqueous solutions of urea and guanidine hydrochloride (gdn · HCl)

	benzene(1) +		toluene(1) +	
	water(2) + urea(3)	water(2) + gdn · HCl(3)	water(2) + urea(3)	water(2) + gdn · HCl(3)
<i>a</i>	-35.988	-179.340	-38.588	-286.460
<i>b</i>	29.750	172.305	31.005	277.737
<i>c</i>		162.414		272.332
<i>d</i>	169.815		197.665	
<i>e</i>	-157.665		-182.481	
<i>s</i> <sup>a</sup>	0.013	0.016	0.018	0.023

<sup>a</sup> Standard deviation of fit.

it also shows Setchenow constants and their standard deviations from fitting  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$  values at each individual isotherm separately. Both sets of  $k_S$  values are in excellent agreement, indicating that the simultaneous temperature and modifier concentration fits did not diminish the quality of the fitting, as compared with the individual isotherm cases. The salting-in effect seen in figure 8, expressed by the negative sign of  $k_S$ , is stronger for toluene. For both solutes,  $k_S$  values go through a minimum (a maximum salting-in effect) within the studied temperature range; this minimum reflects the non-monotonic behaviour with temperature seen in figure 6(b).

By using equation (7) with the individual constant modifier concentration parameters



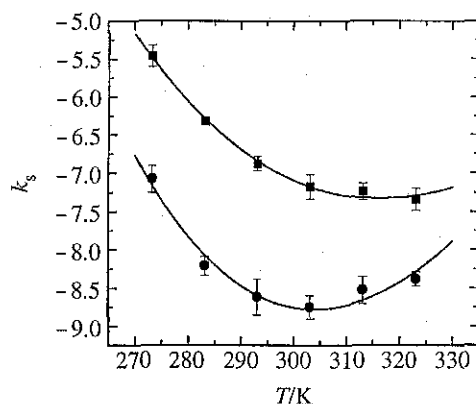


FIGURE 8. Setchenow constant  $k_S$  describing the effect of guanidine hydrochloride on limiting activity coefficient of: ■, benzene; and ●, toluene in aqueous solutions of this modifier as a function of temperature. Points and their error bars are  $k_S$  values with their standard deviations calculated from individual temperature fittings; —, from parameters in table 4 obtained by simultaneous  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty(T, x_3)$  fittings.

in table 3, the enthalpies  $\Delta_{sol} H_{m,1}^\infty$  and entropies  $T \cdot \Delta_{sol} S_{m,1}^\infty$  of solution for toluene in (water + guanidine) were calculated in the temperature range employed here, and are shown in figure 9, together with the Gibbs energies of solution  $\Delta_{sol} G_{m,1}^\infty$ . It can be seen that the effect of modifier on the enthalpic and entropic contributions to  $\Delta_{sol} G_{m,1}^\infty$  is more dramatic than that on  $\Delta_{sol} G_{m,1}^\infty$  itself. A remarkable feature of figure 9 is that, within a narrow temperature range, the different  $\Delta_{sol} H_{m,1}^\infty$  and  $T \cdot \Delta_{sol} S_{m,1}^\infty$  curves intersect. These crossing points have a clear physical significance, namely that the transfer of the solute molecule from one environment to the other is characterized by a null enthalpy change or by a null entropy change. As the different  $\Delta_{sol} H_{m,1}^\infty$  and  $T \cdot \Delta_{sol} S_{m,1}^\infty$  curves in figure 9 appear to cross within a narrow temperature interval, it is possible to put forward the hypothesis that there are two unique temperatures  $T'$  and  $T''$  where the crossings occur, for  $\Delta_{sol} H_{m,1}^\infty$  and  $\Delta_{sol} S_{m,1}^\infty$ , respectively. The difference between temperature  $T'$  at which  $\Delta_{tr} H_{m,1}^\infty = 0$  and the temperature  $T''$  where  $\Delta_{tr} S_{m,1}^\infty = 0$ , both occurring within the experimental temperature range, is only  $\approx 10$  K. Within the experimental temperature range,  $\Delta_{tr} G_{m,1}^\infty < 0$ ; however, this spontaneous solute transfer has a different origin depending on the temperature at which the transfer occurs. The temperatures  $T'$  and  $T''$  define three distinct regions, namely (region I) below  $T'$ ,  $\Delta_{tr} H_{m,1}^\infty > 0$  and  $\Delta_{tr} S_{m,1}^\infty > 0$ , (region II) between  $T'$  and  $T''$ ,  $\Delta_{tr} H_{m,1}^\infty < 0$  and  $\Delta_{tr} S_{m,1}^\infty > 0$  and (region III) above  $T''$ ,  $\Delta_{tr} H_{m,1}^\infty < 0$  and  $\Delta_{tr} S_{m,1}^\infty < 0$ . In region I,  $\Delta_{tr} G_{m,1}^\infty < 0$  is the result of a large entropic contribution favouring the transfer of toluene from water to (water + guanidine) and overcoming the unfavourable enthalpic contribution. In region II, both contributions act in the same direction, that favouring the transfer; it is at  $T'$  and  $T''$  where  $\Delta_{tr} G_{m,1}^\infty / RT$  and  $\Delta_{tr} G_{m,1}^\infty$ , respectively, acquire their maximum negative values. In region III,  $\Delta_{tr} G_{m,1}^\infty < 0$  is due to the enthalpic contribution that overcomes the unfavourable entropic contribution.

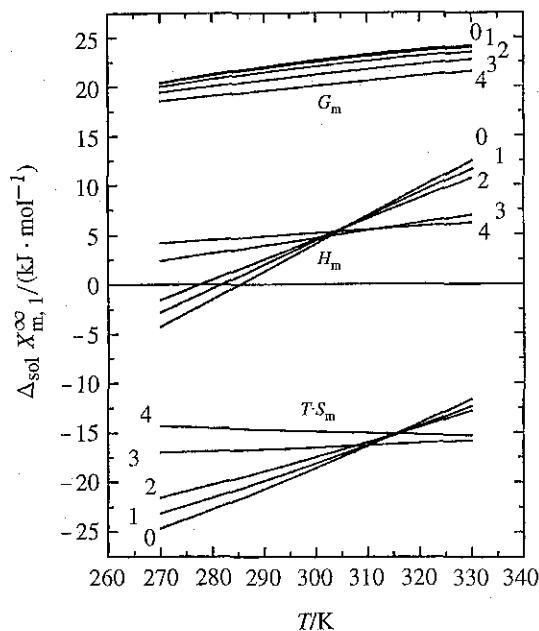


FIGURE 9. Thermodynamic functions of solution at infinite dilution,  $\Delta_{\text{sol}} X_{m,1}^{\infty}$  ( $X = G, H, T \cdot S$ ), for toluene(1) in {water(2) + guanidine(3)} as a function of temperature at several modifier concentrations  $c_3$ : (0),  $c_3 = 0$  (pure solvent water); (1),  $c_3 = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; (2),  $c_3 = 1.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; (3),  $c_3 = 3.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; (4),  $c_3 = 5.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Lines are calculated from equation (7) and parameters in table 3. The crossing points for  $H_m$  and  $T \cdot S_m$  lines define, respectively, temperatures  $T'$  and  $T''$  discussed in the text.  $\Delta_{\text{sol}} H_{m,1}^{\infty} = 0$  at the  $T_{\text{max}}$  values in table 3.

Then, the balance between enthalpic and entropic contributions to the solution properties, discussed in connection with figure 3(b) for pure solvent water, has its reflection in the transfer properties. The features mentioned above are also present in the other three systems studied here. For benzene in (water + guanidine),  $T'$  and  $T''$  are higher than for toluene but still within the experimental range used here; for toluene and benzene in (water + urea),  $T'$  and  $T''$  are already outside this temperature range, their values being higher and less certain due to extrapolation for benzene.

The transfer enthalpies  $\Delta_{\text{tr}} H_{m,1}^{\infty}$  in figure 10, and the transfer entropies  $\Delta_{\text{tr}} S_{m,1}^{\infty}$  in figure 11, both plotted as a function of modifier concentration, also give some insight into the behaviour of the studied systems. The transfer of benzene to (water + urea) is endothermic and entropically favourable at all urea concentrations and temperatures studied; for toluene the behaviour is qualitatively the same. In contrast, for the transfer of toluene to (water + guanidine),  $\Delta_{\text{tr}} H_{m,1}^{\infty}$  and  $\Delta_{\text{tr}} S_{m,1}^{\infty}$  change sign as a function of temperature (the same behaviour is seen for benzene in this modifier) so, at low temperatures, both are positive as with urea, but at high temperatures the transfer is exothermic and entropically unfavourable. Note that figures 10(a) and 11(a) indicate that

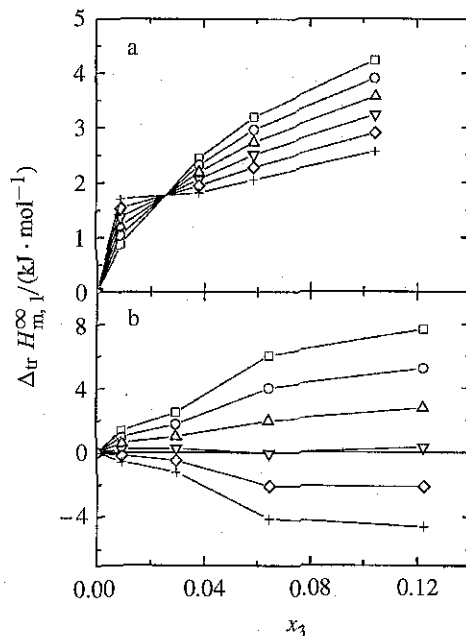


FIGURE 10. Transfer enthalpies at infinite dilution  $\Delta_{tr} H_{m,1}^{\infty}$ , from water(2) for (a) benzene(1) to {water(2)+urea(3)} and (b) toluene(1) to {water(2)+guanidine(3)} as a function of modifier mole fraction  $x_3$  at several temperatures:  $\square$ ,  $T = 273.15$  K;  $\circ$ ,  $T = 283.15$  K;  $\triangle$ ,  $T = 293.15$  K;  $\nabla$ ,  $T = 303.15$  K;  $\diamond$ ,  $T = 313.15$  K;  $+$ ,  $T = 323.15$  K. Points are calculated using equation (7) and parameters in table 3, lines are only to aid visualization.

there exists a concentration of urea where  $\Delta_{tr} C_{p,m,1}^{\infty} = 0$ , *i.e.* a urea concentration where the transfer of benzene (and also of toluene) from water to the (water + urea) solution is not accompanied by a structural change in the solute environment.

Crossing points between different modifier concentration curves also seem to occur between the extrapolated  $\Delta_{sol} G_{m,1}^{\infty}$  values as shown in figure 12(a) for toluene in (water + guanidine). They occur outside the experimental temperature range employed here, both below the freezing temperature and above, or close to the normal boiling temperature of pure water. For the other three systems, the features seen in figure 12(a) are qualitatively the same. According to figure 12(a), there are low- and high-temperature regions where the presence of the modifier no longer solubilizes a larger amount of toluene (and also of benzene) than pure water but, rather, acts in the opposite direction. As indicated by figure 12(b), in terms of the transfer Gibbs energy, the crossings in figure 12(a) imply that  $\Delta_{tr} G_{m,1}^{\infty}$  is positive and hence unfavourable at low  $T$ , negative and hence favourable in a temperature interval that includes the indicated experimental window (E in figure 12), and again positive at high  $T$ . This behaviour is clearly related to that described above regarding regions I and III. At  $T \ll T'$  {sub-region of I labelled LT in figure 12(b)},  $\Delta_{tr} G_{m,1}^{\infty} > 0$  is the result of the unfavourable enthalpic contribution overcoming the favourable entropic

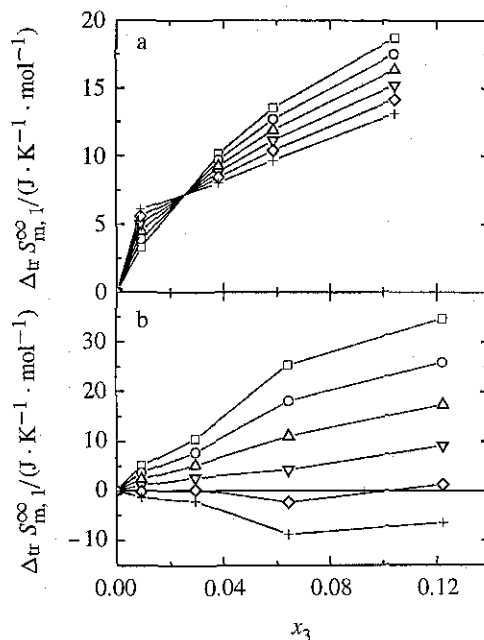


FIGURE 11. Transfer entropies at infinite dilution  $\Delta_{tr}S_{m,1}^{\infty}$  from water(2) for (a) benzene(1) to {water(2)+urea(3)} and (b) toluene(1) to {water(2)+guanidine(3)} as a function of modifier mole fraction  $x_3$  at several temperatures:  $\square$ ,  $T = 273.15$  K;  $\circ$ ,  $T = 283.15$  K;  $\triangle$ ,  $T = 293.15$  K;  $\nabla$ ,  $T = 303.15$  K;  $\diamond$ ,  $T = 313.15$  K;  $+$ ,  $T = 323.15$  K. Points are calculated from equation (7) and parameters in table 3; lines are only to aid visualization.

contribution. At  $T \gg T''$  [subregion of III labelled HT in figure 12(b)],  $\Delta_{tr}G_{m,1}^{\infty} > 0$  emerges from the unfavourable entropic contribution that overbalances the favourable enthalpic contribution.

The low- and high-temperature behaviour of toluene in figure 12 is not simple speculation whose experimental verification is impossible (at low  $T$ ) or is difficult (at high  $T$ ) to verify experimentally since yet another variable, namely solute molecular size, plays a crucial role in the thermodynamics of these systems. Wetlaufer *et al.*,<sup>(9)</sup> using experimentally determined gas solubilities (solvation or hydration Gibbs energies), obtained  $\Delta_{tr}G_{m,1}^{\infty}$  for a series of non-polar compounds in the  $T = (284 \text{ to } 323)$  K interval. He found that  $\Delta_{tr}G_{m,1}^{\infty}$  was positive for methane, positive at low  $T$  and negative at high  $T$  for ethane, and negative for propane, butane, isobutane and neopentane; furthermore, for all these solutes  $\partial\Delta_{tr}G_{m,1}^{\infty}/\partial T$  is negative. Then, the behaviour of these solutes corresponds to that seen in the vicinity of the LT border in figure 12(b) where the  $\Delta_{tr}G_{m,1}^{\infty}$  curves cross the temperature axis. Based on these results in the literature and in figure 12(b), whose qualitative features are assumed to be general, it is possible to state that as the molecular size of the non-polar solute decreases, the curves in figure 12(a) and 12(b) are displaced towards higher  $T$ , moving the LT sub-region ( $\Delta_{tr}G_{m,1}^{\infty} > 0$  and

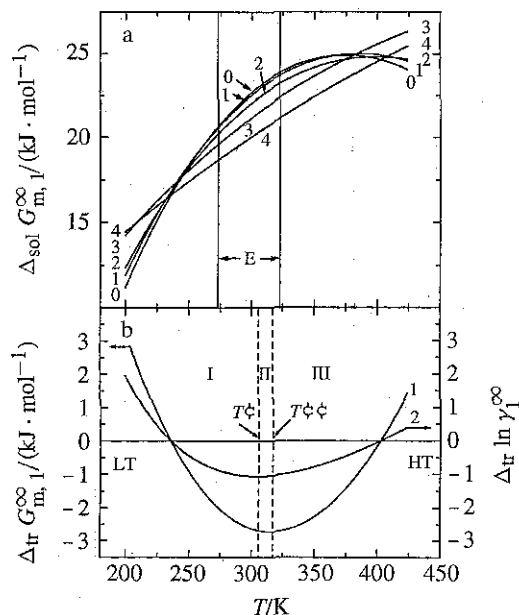


FIGURE 12. Gibbs energies of (a) solution and (b) transfer at infinite dilution for toluene(1) to {water(2) + guanidine(3)} in a broad range of temperatures. —, calculated from equation (7) with parameters from table 3. In (a), they are for experimental guanidine concentrations  $c_3$ : (0),  $c_3 = 0$  (pure solvent water); (1),  $c_3 = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; (2),  $c_3 = 1.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; (3),  $c_3 = 3.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; (4),  $c_3 = 5.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; in (b), they are for  $c_3 = 5.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^3$ , lines (1) and (2) being  $\Delta_{\text{tr}} G_{\text{m},1}^{\infty}$  and  $\Delta_{\text{tr}} G_{\text{m},1}^{\infty} / RT$ , respectively. E indicates the experimental temperature range employed in this work. Regions I, II and III and temperatures  $T'$  and  $T''$  are defined in the text. The low- and high-temperature subregions with  $\Delta_{\text{tr}} G_{\text{m},1}^{\infty} > 0$  are denoted as LT and HT, respectively.

$\partial \Delta_{\text{tr}} G_{\text{m},1}^{\infty} / \partial T < 0$ ) to appear within the experimental temperature window. On the other hand, the high temperature sub-region HT in figure 12(b) is characterized by positive  $\Delta_{\text{tr}} G_{\text{m},1}^{\infty}$  and positive  $\partial \Delta_{\text{tr}} G_{\text{m},1}^{\infty} / \partial T$ . To the best of our knowledge, there is no report in the literature that verifies or contradicts this behaviour. However, since this region would be moved into the experimental window for solutes bigger than toluene, higher members of the alkylbenzene series (or even polyaromatics) could be good candidates to test the predicted ( $\Delta_{\text{tr}} G_{\text{m},1}^{\infty} > 0$  and  $\partial \Delta_{\text{tr}} G_{\text{m},1}^{\infty} / \partial T > 0$ ) behaviour. Another possibility to experimentally verify the existence of the HT subregion would be to measure  $\gamma_1^{\infty}$  of benzene or toluene at temperature above, and close to, the normal boiling temperature of water.

The richness of the information obtained through the accurate measurements presented here is motivation to attempt a description of the data with a molecular model, as will be reported in a forthcoming communication.<sup>(3)</sup> It is also a motivation to study: other non-polar solutes which are model systems for other side chains in amino acids (such as 3-

methylindole for the amino acid tryptophan); other larger and more insoluble non-polar substances (such as ethylbenzene, propylbenzene, and naphthalene); and other modifiers, which instead of driving denaturation, are stabilizers of the native protein state (such as glycerol). Work on this direction is currently underway in our laboratories.

We thank Alejandro Fernandez for his useful comments. V.D. is grateful for a Catedra Patrimonial from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia de Mexico (CONACyT). E.C.-N. thanks the Universidad Nacional Autonoma de Mexico (UNAM) and Fundacion UNAM for financial support. We are grateful for financial support from a Czech-Mexican scientific cooperation project (Ministry of Education of the Czech Republic, grant ME 237, and CONACyT), the PAPIIT program (DGAPA-UNAM, grant IN112198) and CONACyT research project program (grant E 27896).

#### REFERENCES

1. *Protein Folding*. Creighton, T. E.: editor. Freeman: New York. **1992**.
2. *Proteins. Structure and Molecular Properties*. Creighton, T. E.: editor. Freeman: New York. **1993**.
3. Dohnal, V.; Costas, M.; Carillo-Nava, E.; Hovorka, Š. *Biophys. Chem.* **2000** (submitted).
4. Whitney, P. L.; Tanford, C. *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, PC1735-PC1737.
5. Nozaki, Y.; Tanford, C. *J. Biol. Chem.* **1963**, 238, 4074-4081.
6. Nozaki, Y.; Tanford, C. *J. Biol. Chem.* **1965**, 240, 3568-3573.
7. Nozaki, Y.; Tanford, C. *J. Biol. Chem.* **1970**, 245, 1648-1652.
8. Nozaki, Y.; Tanford, C. *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 2211-2217.
9. Wetlaufer, D. B.; Malik, S. K.; Stoller, L.; Coffin, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 508-514.
10. Tanford, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 4240-4247.
11. Tanford, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 2050-2059.
12. Hovorka, Š.; Dohnal, V. *J. Chem. Eng. Data* **1997**, 42, 924-933.
13. Pace, C. N.; Shirley, B. A.; Thomson, J. A. *Protein Structure. A Practical Approach*. Creighton, T. E.: editor. IRL Press: Oxford. **1989**.
14. Pace, C. N. *Crit. Rev. Biochem.* **1975**, 3, 1-43.
15. Vrbka, P.; Dohnal, V. *Z. Phys. Chem. (Munich)* **1999**, 209, 159-170.
16. Dykyj, J.; Repáš, M. *Tlak nasýtené pary organických zlúčenín*. Veda: Bratislava. **1979**.
17. *CDA: Database of Thermodynamic and Transport Properties for Chemistry and Engineering*. Department of Physical Chemistry. Institute of Chemical Technology (distributed by FIZ Chemie GmbH, Berlin): Prague, **1991**.
18. Hayden, J. G.; O'Connell, J. P. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* **1975**, 14, 209-216.
19. Prausnitz, J. M.; Anderson, T. F.; Grens, E. A.; Eckert, C. A.; Hsieh, R.; O'Connell, J. P. *Computer Calculations for Multicomponent Vapor-Liquid and Liquid-Liquid Equilibrium*. Prentice-Hall: Englewood Cliffs, N.J. **1980**.
20. *Hydrocarbons with Water and Seawater. Part I: Hydrocarbons C5 to C7*, Vol. 37, *Solubility Data Series*. Shaw, D. G.: editor. Pergamon: Oxford. **1989**.
21. *PLACID- Prague Limiting Activity Coefficient Inquiry Database*. Department of Physical Chemistry. Institute of Chemical Technology: Prague. **1999**.
22. Tucker, E. E.; Lane, E. H.; Christian, Sh. D. *J. Solution Chem.* **1981**, 10, 1-20.
23. Franks, F.; Gent, M.; Johnson, H. H. *J. Chem. Soc.* **1963**, 2716-2723.
24. Arnold, D. S.; Plank, C. A.; Erickson, E. E.; Pike, F. P. *Chem. Eng. Data Ser.* **1958**, 3, 253-256.
25. Alexander, D. W. *J. Phys. Chem.* **1959**, 63, 1021-1022.
26. Bohon, R. L.; Claussen, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 1571-1578.
27. Chen, H.; Wagner, J. *J. Chem. Eng. Data* **1994**, 39, 475-479.
28. Bittrich, H.-J.; Fahl, A.; Hartwig, F. *Z. Phys. Chem. (Leipzig)* **1983**, 264, 891-895.

29. Dutta-Choudhury, M. K.; Miljevic, N.; Van Hook, W. A. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 1711–1721.
30. Sanemasa, I.; Araki, M.; Deguchi, T.; Nagai, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1982**, *55*, 1054–1062.
31. Sanemasa, I.; Araki, M.; Deguchi, T.; Nagai, H. *Chem. Lett.* **1981**, 225–228.
32. Brown, R. L.; Wasik, S. P. *J. Res. Nat. Bur. Stand. (U.S.)* **1974**, *78A*, 453–460.
33. Bradley, R. S.; Dew, M. J.; Munro, D. C. *High Temp.- High Press.* **1973**, *5*, 169–176.
34. Pierotti, R. A.; Liabastre, A. A. *U.S. Nat. Tech. Inform. Serv., PB Rep.* **1972**, No. 21163.
35. Anderson, F. E.; Prausnitz, J. M. *Fluid Phase Equilib.* **1986**, *32*, 63–76.
36. Morrison, T. J.; Billett, F. *J. Chem. Soc.* **1952**, 3819–3822.
37. Sutton, C.; Calder, J. A. *J. Chem. Eng. Data* **1975**, *20*, 320–322.
38. Price, L. C. *Am. Assoc. Petrol. Geol. Bull.* **1976**, *60*, 213–244.
39. Korenman, I. M.; Arefeva, R. P. *Patent USSR*, No. 553524. CA 87:87654, **1977**.
40. McAuliffe, C. *Nature* **1963**, *200*, 1092–1093.
41. Srivastava, R. *Fluid Phase Equilib.* **1989**, *52*, 201–208.
42. Li, J.; Dallas, A. J.; Eikens, D. I.; Carr, P. W.; Bergmann, D. L.; Hait, M. J.; Eckert, C. A. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3212–3218.
43. Dohnal, V.; Hovorka, Š. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1999**, *38*, 2036–2043.
44. Makhatadze, G. I.; Privalov, P. L. *J. Chem. Thermodynamics* **1988**, *20*, 405–412.
45. Gill, S. J.; Nichols, N. F.; Wadsö, I. *J. Chem. Thermodynamics* **1976**, *8*, 445–452.
46. Hallén, D.; Nilsson, S.-O.; Wadsö, I. *J. Chem. Thermodynamics* **1989**, *21*, 529–537.
47. De Lisi, R.; Goffredi, M.; Liveri, V. T. *J. Chem. Soc. Faraday I* **1980**, *76*, 1660–1662.
48. Tsonopoulos, C.; Wilson, G. M. *AIChE J.* **1983**, *29*, 990–999.
49. Frank, H. S.; Evans, M. W. *J. Phys. Chem.* **1945**, *13*, 507–532.
50. *Activity Coefficients in Electrolyte Solutions*. Pitzer, K. S.: editor. CRC Press: Boca Raton, FL. **1991**.

(Received 10 February 2000; in final form 12 May 2000)

0-821

## 4.2. Artículo # 2. Infinte dilution activity coefficients for toluene in aqueous solutions of the protein stabilizers glycerol, ethylene glycol, glucose, sucrose and trehalose

Al momento en que se imprimió esta tesis el artículo aún no habia sido publicado, por tal motivo se incluye la prueba de galera. Se presentan primero las correcciones a la prueba de galera con el fin de que la lectura de la misma sea clara.

Página 1

- Lugar: Línea abajo de Ernesto Carrillo-Nava
- Corrección: Cambiar Termofísica por Termofísica (*i.e.*, acento en la primer “ i ”)
- Lugar: Autor Vladimír Dohnal
- Corrección: Adicionar el superescrito a (*i.e.*, también autor a quien se le debe dirigir la correspondencia)
- Lugar: Línea abajo de Miguel Costas<sup>a</sup>
- Corrección: Cambiar Termofísica por Termofísica (*i.e.*, acento en la primer “ i ”)
- Lugar: Tercera línea a partir del inicio del Resumen
- Corrección: Cambiar 273 K to 323 K por 273 to 323 K (*i.e.*, borrar la primer K)
- Lugar: Sexta línea a partir del inicio del Resumen
- Corrección: Cambiar (0.5 mol . dm<sup>-3</sup> to 5.0 mol . dm<sup>-3</sup>) por (0.5 to 5.0 mol . dm<sup>-3</sup>)

Página 2

- Lugar: Cuarta línea a partir del inicio de la Introducción
- Corrección: Cambiar 0.5 mol . dm<sup>-3</sup> to 3.0 mol . dm<sup>-3</sup> por 0.5 to 3.0 mol . dm<sup>-3</sup>

Página 3



- Lugar: Séptima línea a partir del inicio de la página
- Corrección: Cambiar 273 K to 323 K por 273 to 323 K
- Lugar: Novena línea a partir del inicio de la página
- Corrección: Cambiar  $(0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ to } 5.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3})$  por  $(0.5 \text{ to } 5.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3})$
- Lugar: Decimocuarta línea a partir del final de la página
- Corrección: Cambiar “...chromatography.” por “...chromatography (GC)”
- Lugar: Novena línea a partir del final de la página
- Corrección: Cambiar *inert* por inert
- Lugar: Tercera línea a partir del final de la página
- Corrección: Cambiar 3 h-4 h por 3 to 4 h
- Lugar: Segunda línea a partir del final de la página
- Corrección: Cambiar “...samples are taken.” por “...samples were taken.”

#### Página 4

- Lugar: Cuarta línea a partir del inicio de la página
- Corrección: Cambiar “...are the pure component vapour pressures, and...” por “... is the pure solute vapour pressure, and...”
- Lugar: Sexta línea a partir del inicio de la página
- Corrección:
  - (a) Cambiar “... in this work,  $0.95 < \dots$ ” por “... in this work,  $0.92 < \dots$ ”
  - (b) Cambiar “...  $< 1.00$ ), which ...” por “...  $< 1.03$ ), which ...”
- Lugar: Onceava línea a partir del inicio de la página
- Corrección: Cambiar  $k_i$  por  $k_1$  (*i.e.*, *i* por 1)
- Lugar: Ecuación (2)
- Corrección: Cambiar  $k_i$  por  $k_1$  (*i.e.*, *i* por 1)

- Lugar: Sexta y séptima línea a partir del final de la página
- Corrección: Cambiar "... following ranges:  $0.92 < k_1 < 1.0$ ;  $0.9996 < k_2 < 1$ ;  $1.01 < k_3 < 1.17$ ;  $0.98 < k_4 < 0.99$ ." por "... following ranges:  $0.87 < k_1 < 0.99$ ;  $0.9994 < k_2 < 1$ ;  $1.01 < k_3 < 1.18$ ;  $0.98 < k_4 < 1.0$ ."
- Lugar: Tercera línea a partir del final de la página
- Corrección: Cambiar 273 K to 323 K por 273 to 323 K

#### Página 5

- Lugar: En la Tabla 1, tercera línea (subtítulo dentro de la tabla)
- Corrección: Cambiar "... for toluene(1) + ..." por "...in toluene(1) + ..."
- Lugar: Decimoquinta línea a partir del final de la página
- Corrección:
  - (a) Cambiar ( $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  to  $5.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) por ( $0.5$  to  $5.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )
  - (b) Cambiar 273 K to 323 K por 273 to 323 K

#### Página 6

- Lugar: Tercer y cuarta línea en el pie de figura
- Corrección: Cambiar "...  $c_3/(\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3})$  1.5 (for trehalose  $c_3 = 0.5$ ).” por "...  $c_3 = 1.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (for trehalose  $c_3 = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ).”
- Lugar: Decimosegunda línea a partir del final de la página
- Corrección: Cambiar vlaues por values
- Lugar: Séptima línea a partir del final de la página
- Corrección: Cambiar vlaues por values
- Lugar: Cuarta línea a partir del final de la página
- Corrección: Cambiar “:. lower temperatures and indicated...” por “:. lower temperatures as indicated...”
- Lugar: Segunda línea a partir del final de la página
- Corrección: Cambiar 283 K to 323 K por 283 to 323 K

## Página 7

- Lugar: Decimacuarta línea a partir del final de la página
- Corrección: Cambiar (0.5 mol . dm<sup>-3</sup> to 5.0 mol . dm<sup>-3</sup> ) por (0.5 to 5.0 mol . dm<sup>-3</sup> )

## Página 8

- Lugar: Primer línea en la leyenda para la Tabla 2
- Corrección: Cambiar “ Parameters of equation (7) ...” por “ Parameters of equation (4)...”
- Lugar: En los títulos de la Tabla 2
- Corrección: Cambiar S (letra mayúscula) por s (letra minúscula)

## Página 9

- Lugar: Cuarta línea en la leyenda para la Figura 3
- Corrección: Cambiar “ ... using parameters in table 2.” por “ ... using parameters given in the text.”
- Lugar: Cuarta línea a partir del inicio de la página (3 líneas abajo de la ecuación (5))
- Corrección: Cambiar “ ... being a = -248.8, b = ...” por “ ... being a = -248.84, b = ...”

## Página 10

- Lugar: Decimonovena línea a partir del inicio de la pagina
- Corrección: Cambiar (0.5 mol . dm<sup>-3</sup> to 5 mol . dm<sup>-3</sup>) por (0.5 to 5.0 mol . dm<sup>-3</sup>)

## Página 12

- Lugar: Quinta línea a partir del fin de la página
- Corrección: Debe decir Štěpán

Página 13

- Lugar: Primer línea en la leyenda de la Figura 6
- Corrección: Cambiar “ ... of transfer at infinite dilution for toluene to [water + modifier] plotted against ...” por “ ... of toluene transfer from pure water to [water + modifier] solutions at infinite dilution plotted against ...”
- Lugar: Segunda y tercera línea en la leyenda de la Figura 6
- Corrección: Cambiar “ ...  $c_3/(\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3})$  1.5 (for trehalose  $c_3 = 0.5$ ).” por “ ... $c_3 = 1.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (for trehalose  $c_3 = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ).”
- Lugar: Primer referencia
- Corrección: De acuerdo con la decisión del editor
- Lugar: Tercer referencia
- Corrección:
  - Cambiar Sola-Penna por Sola-Pena
  - Cambiar Meyer-Fernandes por Meyer-Fernandez

Página 14

- Lugar: Decimosegunda referencia
- Corrección:
  - (a) Cambiar Talk por Tlak
  - (b) Cambiar Zlúenin por Zlúčenin



## Infinite dilution activity coefficients for toluene in aqueous solutions of the protein stabilizers glycerol, ethylene glycol, glucose, sucrose and trehalose

**Ernesto Carrillo-Nava,**

*Laboratorio de Termofísica, Departamento de Física y Química Teórica,  
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México  
D.F. 04510, México*

**Vladimír Dohnal,**

*Department of Physical Chemistry, Institute of Chemical Technology, 166 28  
Prague 6, Czech Republic*

**and Miguel Costas<sup>a</sup>**

*Laboratorio de Termofísica, Departamento de Física y Química Teórica,  
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México  
D.F. 04510, México*

Experimental infinite dilution activity coefficients  $\gamma_1^\infty$  for toluene in aqueous solutions of five protein stabilizers, glycerol, ethylene glycol, glucose, sucrose and trehalose, are reported. The data were measured over the temperature range 273 K to 323 K. The concentrations of these stabilizers were chosen to match as closely as possible those used in the biochemistry field. For glycerol, the data were measured at four concentrations ( $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  to  $5.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ); at the highest glycerol concentration,  $\gamma_1^\infty$  was also determined at  $T = 268 \text{ K}$ . Ethylene glycol, glucose and sucrose were used at a single concentration ( $1.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), while trehalose was employed at  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . As the concentration of glycerol increases, there is a significant decrease of  $\gamma_1^\infty$  values with respect to the pure solvent water case, indicating that this modifier is able to solubilize more toluene than pure water. At all temperatures studied, the presence of ethylene glycol also decreases  $\gamma_1^\infty$  values. On the other hand, glucose shows the opposite effect, *i.e.* it solubilizes less toluene than pure water. The other three modifiers (glycerol, sucrose and trehalose) are unable to solubilize more toluene than pure water at low temperatures, but as the temperature is increased they become solubilizing agents. The modifier concentrations and temperatures, where less of the non-polar toluene can be solubilized, are those often used to store proteins, to prevent them from denaturing. The solute in

<sup>a</sup>To whom correspondence should be addressed (E-mail: [costasmi@servidor.unam.mx](mailto:costasmi@servidor.unam.mx) and E-mail: [dohnalv@vscht.cz](mailto:dohnalv@vscht.cz)).

(water + modifier)  $\gamma_1^\infty$  data were analyzed through a classical thermodynamic scheme employing solution and transfer (water to (water + modifier)) quantities. We compare the solubilization power of the protein denaturants urea and guanidine hydrochloride (*J. Chem. Thermodynamics* **2000**, 32, 1683–1705) with that displayed by the protein stabilizers used here. © 2002 Academic Press

**KEYWORDS:** infinite dilution activity coefficients; toluene; inert gas stripping method; aqueous solutions; protein stabilizers; glycerol; ethylene glycol; sucrose; glucose; trehalose; thermodynamic properties of solution and transfer

## 1. Introduction

For biochemists and biologists, in order to preserve the native state of proteins and hence their activity, it is a common practice to store them at low temperatures in aqueous solutions of glycerol, ethylene glycol, glucose or sucrose.<sup>(1,2)</sup> These substances, referred to as stabilizers, are used at concentrations ranging from  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  to  $3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Another interesting stabilizer is trehalose, a non-reducing disaccharide of glucose, which is produced by living systems under stress conditions. Trehalose is produced as an adaptive response to heat shock in order to maintain the structural integrity of proteins in the interior of cells.<sup>(3–6)</sup> The stabilization of the native protein structure implies that the non-polar chemical groups in their hydrophobic core are prevented from being exposed to the (water + stabilizer) media. Hence, thermodynamic studies involving small and sparingly soluble non-polar substances in water and in (water + stabilizer) solutions are relevant to understand protein stabilization.<sup>(7)</sup> In this work, we have used toluene, which can be considered to be a model for the side chain of the amino acid phenylalanine. The infinite dilution limiting activity coefficients  $\gamma_1^\infty$  presented and discussed here can be used to advance in the understanding of the mechanisms involved in protein stabilization. Also, the behaviour of the protein stabilizers used here can be compared with that shown by two protein denaturants, urea and guanidine hydrochloride, recently reported<sup>(8)</sup> and rationalized using a simple molecular model.<sup>(9)</sup>

The experimental determination of limiting activity coefficients is very useful since this infinite dilution property possesses the essential information governing the thermodynamic behaviour of the systems studied. If the temperature dependence of the infinite dilution activity coefficients is obtained with high accuracy, other important thermodynamic quantities such as enthalpies, entropies and heat capacities of solution can be obtained. Activity coefficients are directly related to the Gibbs energy through  $\ln \gamma_1^\infty = \Delta_{\text{sol}} G_{\text{m},1}^\infty / RT$  where  $\Delta_{\text{sol}} G_{\text{m},1}^\infty$ , the Gibbs energy of solution, refers to the process where the solute is transferred from the pure liquid state to water at infinite dilution. Another relevant quantity for protein stabilization studies is the transfer Gibbs energy  $\Delta_{\text{tr}} G_{\text{m},1}^\infty$  which is also easily obtained from the measured values of  $\gamma_1^\infty$ . Transfer properties characterize the process where the solute is transferred from water to a (water + stabilizer) mixture. When dealing with small and barely soluble non-polar solutes in water (solute mole fraction  $x_1^{\text{sol}}$  less than 0.001), the reciprocal value of this mole fraction approximates the infinite dilution activity coefficient of the solute ( $\gamma_1^\infty = 1/x_1^{\text{sol}}$ ) and  $\gamma_1^\infty$  can be obtained by measuring solubility. On the

other hand, if the non-polar solute is sufficiently volatile,  $\gamma_1^\infty$  can be obtained conveniently through the measurement of the vapour-liquid equilibrium partitioning. This is the strategy we have followed in this work using the inert gas stripping (IGS) method which has been proved to be highly reliable for similar systems.<sup>(8,10)</sup>

In this work we present experimental infinite dilution activity coefficients for toluene in aqueous solutions of glycerol, ethylene glycol, glucose, sucrose and trehalose, over the temperature range 273 K to 323 K. The concentrations of these stabilizers were chosen to match as closely as possible those used in the biochemistry field. For glycerol, the data were measured at four concentrations ( $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  to  $5.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ); at the highest glycerol concentration,  $\gamma_1^\infty$  was also determined at  $T = 268 \text{ K}$ . Ethylene glycol, glucose and sucrose were used at a single concentration ( $1.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Given that trehalose is not soluble in water at  $1.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , we used this stabilizer at  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , the concentration found in yeast cytoplasm during heat shock.<sup>(4)</sup> The protein stabilizers used here will also be referred to as modifiers, a term that describes the fact that their presence modify significantly the aqueous environment where the non-polar solute is placed at infinite dilution. The primary data were analyzed using a classical thermodynamic scheme, which allowed the discussion of the several observed trends.

## 2. Experimental

Toluene (p.a.) from Lachema (Brno, Czech Republic) was fractionally distilled on a 1 m long packed column before use. Glycerol (Fluka, stated purity > mass fraction 0.995), ethylene glycol (Fluka, state purity > mass fraction 0.995), D(+)-glucose (Fluka, stated purity > mass fraction 0.995), sucrose (Lachema, p.a.) and D(+)-trehalose (Sigma, dihydrate) were used as purchased. Water was distilled and deionized using the Milli-Q RG Water Purification System (Millipore, USA).

The IGS method consists of measuring the rate of elution of a volatile solute as an entraining inert gas is passed through a highly dilute solution, the solute content being periodically analyzed by gas chromatography. The experimental setup and procedure used in this work is the same as that we have used recently<sup>(8,10)</sup> to measure infinite dilution activity coefficients  $\gamma_1^\infty$  of benzene and toluene in water and in aqueous solutions of two protein denaturants, urea and guanidine hydrochloride (subsequently referred to as guanidine). Due to the viscosity of the aqueous solutions of the modifiers employed in this work, the constant stripping gas flow rate of the *inert* gas ( $\text{N}_2$ ) introduced into the dilution cell was lowered in comparison to the previous experiments.<sup>(8)</sup> Flow rates used in this work were around  $0.10 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ , which implied small relative rates of the solute elution (*ca.*  $1.5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ). These flow rates showed a very good stability and could be determined to  $\pm 0.3$  per cent. At carrier gas flow rates of  $0.10 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  and oven temperatures of 463 K, a Porapak Q (86–100 mesh) column of 0.5 m length provided narrow peaks with sufficiently short times of analyses (15 min). The process of solute elution was monitored for 3 h–4 h during which up to 16 samples are taken.

The limiting activity coefficients were determined from the IGS measurements using the

second-order approximation approach as<sup>(11)</sup>

$$\gamma_1^\infty = (n_2^0 + n_3^0) RT (P_1^s D)^{-1} (-d \ln A_1 / dt) \prod_{i=1}^4 k_i, \quad (1)$$

where  $n_2^0$  and  $n_3^0$  are the molar amounts of water and the modifier, respectively, loaded into the stripping cell,  $D$  is the flow rate of pure stripping gas at temperature  $T$  and pressure  $P$  of the cell,  $P_i^s$  are the pure component vapour pressures, and  $(-d \ln A_1 / dt)$  is the slope of the semi-logarithmic plot of solute peak area  $A_1$  against time  $t$ . The last term in equation (1), which is close to unity (for systems studied in this work,  $0.95 < \prod_{i=1}^4 k_i < 1.00$ ), comprises correction factors  $k_i$  accounting for the following four effects: (1) change of the stripping gas flow rate due to the saturation in the cell, (2) removal of the solvent water from the dilution cell due to its volatility, (3) amount of the solute in the vapour space and (4) vapour-phase nonideality. Effects (2) to (4) were considered as described in reference 8. For the case of effect (1), the  $k_i$  expression employed in this work takes into account that the partial pressure of the water changes due to the presence of the modifier:

$$k_i = 1 - [\bar{n}_1 / (n_2^0 + n_3^0)] \gamma_1^{\infty, J} P_1^s / P - x_2 P_2^s / P, \quad (2)$$

with  $x_2$  being the mole fraction of water and

$$\bar{n}_1 = n_1^0 (A_1^f / A_1^0 - 1) / \ln(A_1^f / A_1^0), \quad (3)$$

where  $n_1^0$  is the initial amount of solute in the cell,  $A_1^f$  and  $A_1^0$  are the GC responses to the solute at the end and at the beginning of the IGS experiment, respectively, and  $\gamma_1^{\infty, J}$  is the value of the limiting activity coefficient calculated with all  $k_i = 1$ . This correction is a minor improvement over the one employed in our previous work,<sup>(8)</sup> the difference between the two approaches being noticeable only at the highest  $T$  and  $x_3$  used in this work. The partial pressure of water was calculated considering the aqueous solutions of the modifiers as ideal solutions, since it was found that this approximation was feasible and fully acceptable. For our calculations, vapour pressures of toluene were taken from the compilation of Dykyj and Repáš,<sup>(12)</sup> those of water and the molar volumes of pure liquids were taken from the CDATA database,<sup>(13)</sup> and the virial coefficients were obtained from Hayden–O'Connell correlation<sup>(14)</sup> with parameters from Prausnitz *et al.*<sup>(15)</sup> and the CDATA database.<sup>(13)</sup> For the present systems, the individual correction factors  $k_i$ , were in the following ranges:  $0.92 < k_1 < 1.0$ ;  $0.9996 < k_2 < 1$ ;  $1.01 < k_3 < 1.17$ ;  $0.98 < k_4 < 0.99$ .

### 3. Results and discussion

Experimental limiting activity coefficients  $\gamma_1^\infty$  of toluene in aqueous solutions of the five modifiers are listed in table 1. For ethylene glycol, glucose, sucrose and trehalose, experiments were performed in the temperature range 273 K to 323 K and at a modifier concentration of  $1.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (except for trehalose where the concentration was  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). For glycerol,  $\gamma_1^\infty$  was measured at four modifier concentrations



TABLE 1. Experimental limiting activity coefficients  $\gamma_1^\infty$  of toluene in water and in aqueous solutions of glycerol, ethylene glycol, sucrose, glucose and trehalose as a function of temperature and solution composition<sup>a</sup>

$x_3$	$c_3$ mol · dm <sup>-3</sup>	T/K						
		268.15	273.15	283.15	293.15	303.15	313.15	323.15
$\gamma_1^\infty$ for toluene(1) + water(2) + glycerol(3)								
0 <sup>b</sup>	0	—	8960 <sup>c</sup>	9255	9151	8722	8020	7231
0.00919	0.5	—	9063	9051	8857	8415	7780	7061
0.02960	1.5	—	9262	8853	8364	7713	7086	6251
0.06465	3.0	—	8651	8026	7216	6495	5734	5099
0.12360	5.0	8311	7613	6482	5636	4867	4136	3537
$\gamma_1^\infty$ in toluene(1) + water(2) + ethylene glycol(3)								
0.02846	1.5	—	8789	8345	7856	7338	6617	6014
$\gamma_1^\infty$ in toluene(1) + water(2) + sucrose(3)								
0.03852	1.5	—	11145	10102	8870	7778	6610	5619
$\gamma_1^\infty$ in toluene(1) + water(2) + glucose(3)								
0.03154	1.5	—	12203	11248	10220	9425	8129	7398
$\gamma_1^\infty$ in toluene(1) + water(2) + trehalose(3)								
0.01000	0.5	—	9970	9694	9356	8454	7671	6970

<sup>a</sup> Modifier mole fraction  $x_3$  and corresponding approximate modifier molar concentration  $c_3$  at  $T = 298.15$  K. <sup>b</sup> From reference 8. <sup>c</sup> At  $T = 273.35$  K.

(0.5 mol · dm<sup>-3</sup> to 5 mol · dm<sup>-3</sup>) in the temperature range 273 K to 323 K; for the highest glycerol concentration,  $\gamma_1^\infty$  was also determined at 268 K. Table 1 also reports  $\gamma_1^\infty$  for pure solvent water from reference 8. Most values in table 1 were determined from single measurements, replicates done occasionally to verify the performance of the experimental technique showed the reproducibility to be within 1 per cent. Relative standard deviations, as estimated by the error propagation law from the errors of all input quantities of equation (1), are from 1 to 2 per cent, which we believe is also the total uncertainty of the  $\gamma_1^\infty$  values given in table 1.

The temperature dependence of  $\gamma_1^\infty$  was fitted to the following equation, originating from the assumption of temperature-independent heat capacity of solution:

$$\ln \gamma_1^\infty = A + B/\tau + C \ln \tau, \quad (4)$$

where  $\tau \equiv T/T_0$  and the scaling temperature  $T_0 = 298.15$  K. Although it is known that  $\Delta_{\text{sol}} C_{p,m,1}^\infty$  decreases with temperature,<sup>(16)</sup> the extent and the accuracy of  $\gamma_1^\infty$  data do not justify more complex fits with a greater number of adjustable parameters. Figures 1 and 2 show van't Hoff like plots where the data are displayed along with the fitted lines. These individual fittings clearly demonstrate the smoothness of the measured data. The

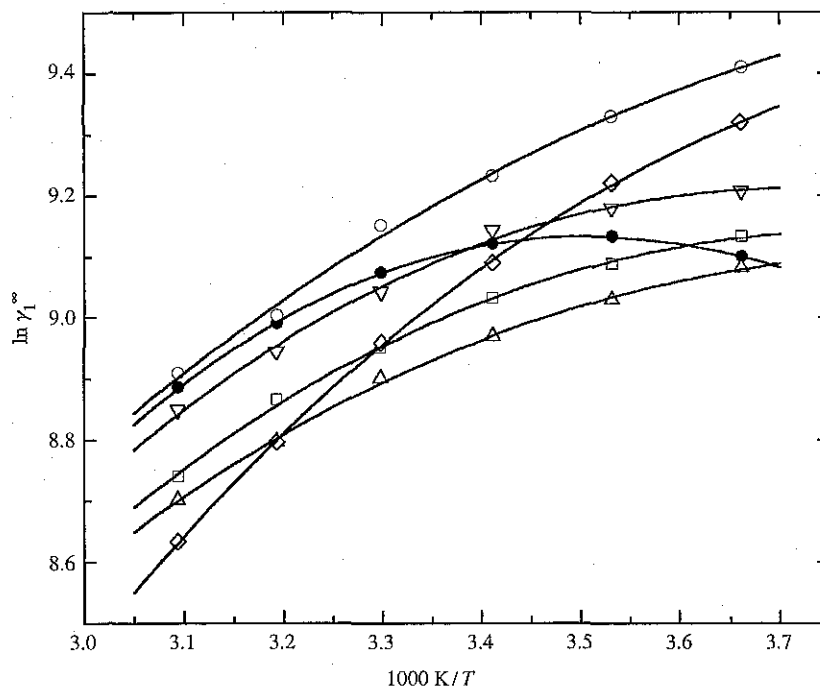


FIGURE 1. Limiting activity coefficients  $\gamma_1^\infty$  of toluene in  $\bullet$ , pure solvent water, and in aqueous solutions of  $\square$ , glycerol;  $\Delta$ , ethylene glycol;  $\circ$ , glucose;  $\diamond$ , sucrose and  $\nabla$ , trehalose plotted as a function of temperature at the modifiers molar concentration  $c_3/(\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3})$  1.5 (for trehalose  $c_3 = 0.5$ ). Points are data from table 1 and lines are from equation (4) using the parameters in table 2.

corresponding parameters and standard deviations are reported in table 2. For comparison the data and the fitting for toluene in pure solvent water<sup>(8)</sup> are also displayed.

Figure 1 shows the  $\ln \gamma_1^\infty$  behavior for toluene in the five modifiers at  $1.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (for trehalose,  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). At all temperatures studied, the presence of ethylene glycol decreases  $\ln \gamma_1^\infty$  values with respect to the pure solvent water case, indicating that this modifier is able to solubilize more toluene than pure water. On the other hand, glucose shows the opposite effect, *i.e.* it solubilizes less toluene than pure water. The other three modifiers (glycerol, sucrose and trehalose) are unable to solubilize more toluene than pure water at low temperatures, but as the temperature is increased they become solubilizing agents. The dependences of toluene  $\ln \gamma_1^\infty$  values on temperature and glycerol concentration are shown in figure 2. For pure solvent water  $\ln \gamma_1^\infty$  has a maximum (minimum in solubility) at approximately  $T = 285 \text{ K}$ . As the concentration of glycerol increases, these maxima are displaced towards lower temperatures and indicated by the  $T_{\text{max}}$  values in table 2 obtained from equation (4). For some glycerol concentrations, the  $T_{\text{max}}$  values appear to be below the freezing point of pure water. In the  $283 \text{ K}$  to  $323 \text{ K}$  temperature range and at all glycerol concentrations,  $\ln \gamma_1^\infty$  values are smaller than those

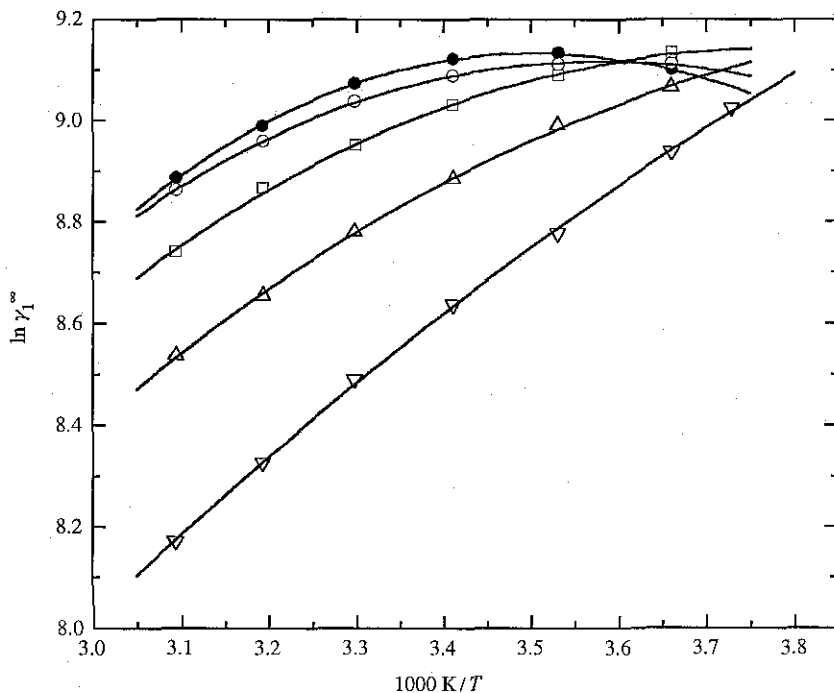


FIGURE 2. Limiting activity coefficients  $\gamma_1^\infty$  of toluene in aqueous solutions of glycerol plotted as a function of temperature at several modifier molar concentrations  $c_3/(\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3})$ : ●, 0 (pure solvent water); ○, 0.5; □, 1.5; △, 3.0; ▽, 5.0. Points are data from table 1 and lines are from equation (4) using the parameters in table 2.

for the pure solvent water case indicating an increase in the solubility of toluene in the (glycerol + water) media. At  $T = 273.15$  K and its immediate vicinity, for the lower concentrations of glycerol ( $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  and  $1.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), there is a decrease in the solubility of toluene. Note that in figures 1 and 2, the modifier concentrations and temperatures where less of the non-polar toluene can be solubilized are those often used to store proteins, to prevent them from denaturing. In figures 1 and 2, it is also apparent that within the experimental window studied here, the curvature of  $\ln \gamma_1^\infty$  against  $1/T$  changes significantly. This is quantitatively reflected in the temperature independent  $\Delta_{\text{sol}} C_{p,m,1}^\infty$  values in table 2, derived from equation (4). Large values of heat capacity of solution of hydrophobic solutes in pure solvent water indicate a big structuring effect. When the aqueous solvent medium is changed by the presence of the modifier, the structuring caused by the hydrophobic solute in the solvent, and hence its heat capacity of solution, diminishes considerably. Table 2 indicates that the structural changes brought about by the solution process are less important at high glycerol concentrations. Note that in reference 8 the structural changes caused by the non-polar solute in aqueous solutions of urea and guanidine were discussed in terms of the departure of  $\Delta_{\text{sol}} C_{p,m,1}^\infty$  values in these solutions

TABLE 2. Parameters of equation (7) smoothing  $\ln \gamma_1^\infty(T)$  dependence for individual constant compositions<sup>a</sup> of aqueous solutions of glycerol, ethylene glycol, sucrose, glucose and trehalose along with the derived temperature at which  $\ln \gamma_1^\infty$  is maximum and temperature-independent heat capacity of solution at infinite dilution

$x_3$	$c_3$ mol · dm <sup>-3</sup>	A	B	C	$S^b$	$T_{\max}^c$ K	$\Delta_{\text{sol}} C_{p,m,1}^{\infty c}$ J · K <sup>-1</sup> · mol <sup>-1</sup>
Toluene(1) + water(2) + glycerol(3)							
0	0	41.1946	-32.0933	-33.5285	0.002	285.4 ± 0.3	279 ± 6
0.00919	0.5	32.71088	-23.64586	-25.22659	0.003	279.5 ± 0.6	210 ± 7
0.02960	1.5	27.2919	-18.29705	-20.67497	0.007	263.9 ± 3.3	172 ± 17
0.06465	3.0	21.12024	-12.28696	-15.52837	0.005	235.9 ± 6.6	129 ± 14
0.12360	5.0	12.88966	-4.33219	-8.9148	0.008	145 ± 33	74 ± 17
Toluene(1) + water(2) + ethylene glycol(3)							
0.02846	1.5	23.44471	-14.51122	-16.82925	0.006	257.1 ± 4.2	140 ± 15
Toluene(1) + water(2) + sucrose(3)							
0.03852	1.5	27.37229	-18.34564	-22.52052	0.004	242.9 ± 3.2	187 ± 11
Toluene(1) + water(2) + glucose(3)							
0.03154	1.5	20.84232	-11.65595	-14.7252	0.015	236 ± 19	122 ± 37
Toluene(1) + water(2) + trehalose(3)							
0.01000	0.5	29.98354	-20.89151	-23.17618	0.013	268.8 ± 4.6	193 ± 31

<sup>a</sup> Modifier mole fraction  $x_3$  and corresponding approximate modifier molar concentration  $c_3$  at  $T = 298.15$  K. <sup>b</sup> Standard deviation of fit. <sup>c</sup> Limits correspond to standard deviations obtained using the error propagation law.

from the respective value in pure solvent water. In this work, we have preferred to discuss the  $\Delta_{\text{sol}} C_{p,m,1}^{\infty}$  values in table 2 in an equivalent manner, namely in terms of their departure from  $\Delta_{\text{sol}} C_{p,m,1}^{\infty} = 0$ , a value that would indicate the absence of structural changes.

In order to inspect further the concentration dependence of  $\ln \gamma_1^\infty$  for toluene in aqueous solutions of glycerol, it is worth considering the transfer quantity  $\Delta_{\text{tr}} \ln \gamma_1^\infty$  that characterizes the process where toluene at infinite dilution is transferred from pure water to a (water + glycerol) mixture. These  $\Delta_{\text{tr}} \ln \gamma_1^\infty$  values, obtained from the data in table 1, are shown in figure 3. The main features in figure 3 (also seen in figure 2), are: (i) most of the  $\Delta_{\text{tr}} \ln \gamma_1^\infty$  values are negative indicating a favourable solute transfer, (ii) only at  $T = 273$  K and low glycerol concentrations, this transfer is positive and hence unfavourable, (iii)  $\Delta_{\text{tr}} \ln \gamma_1^\infty$  change nonlinearly with the modifier concentration at constant temperature, the curvature being large at  $T = 273$  K and small at  $T = 323$  K and (iv) at all glycerol concentrations,  $\Delta_{\text{tr}} \ln \gamma_1^\infty$  becomes more negative as the temperature increases. The temperature and modifier concentration dependences of  $\Delta_{\text{tr}} \ln \gamma_1^\infty$  were

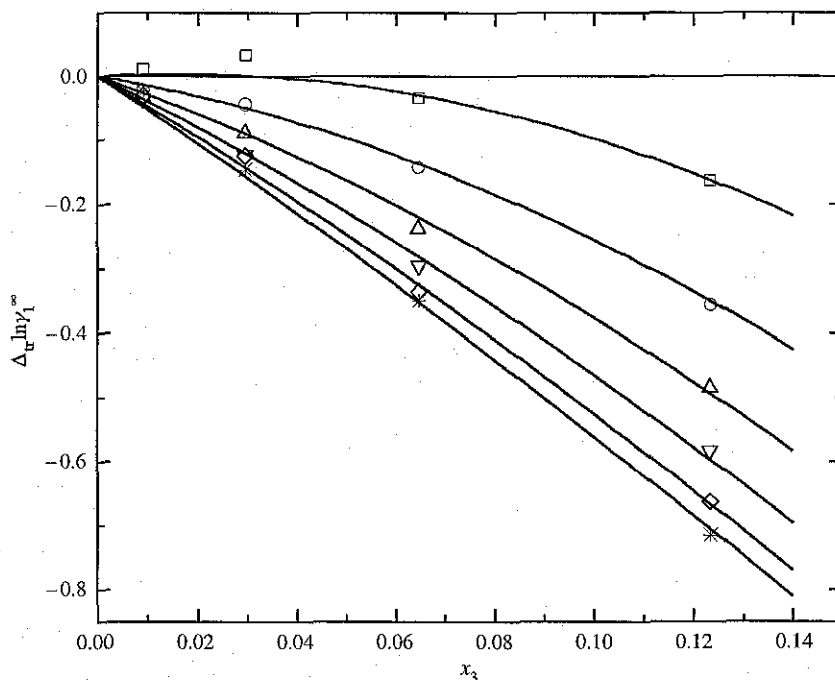


FIGURE 3.  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$ , the difference in  $\gamma_1^\infty$  due to toluene transfer from pure solvent water to [water + glycerol] plotted as a function of modifier mole fraction  $x_3$  at several temperatures:  $\square$ , 273.15 K;  $\circ$ , 283.15 K;  $\triangle$ , 293.15 K;  $\nabla$ , 303.15 K;  $\diamond$ , 313.15 K;  $*$ , 323.15 K. Points are data from table 1 and lines are from equation (5) using parameters in table 2.

fitted simultaneously using the equation<sup>(8)</sup>

$$\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty = (a + b/\tau + c \ln \tau)x_3 + (d + e/\tau)x_3^2. \quad (5)$$

The results of the simultaneous concentration-temperature fit of the experimental  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty(T, x_3)$  data by equation (5) are good. They are displayed in figure 3, the values for the parameters in equation (5) being:  $a = -248.8$ ,  $b = 245.53$ ,  $c = 213.36$ ,  $d = 48.59$  and  $e = -57.83$ . The standard deviation of this fit is larger than those found in the individual isoconcentration fits reported in table 2, indicating that imperfections at the second derivative level are to be expected. The inability to fully fit the positive  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$  values for the  $T = 273$  K isotherm results from the simple quadratic dependence of  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$  with  $x_3$  in equation (5).

With the experimental information gained from this work, it is possible to compare the thermodynamic behaviour of protein denaturants<sup>(8)</sup> (urea and guanidine) and the protein stabilizers used here. It is convenient to perform these comparisons using the quantity

$$SP = 1 - (\ln \gamma_1^\infty(W + M) / \ln \gamma_1^\infty(W)) = -\Delta_{tr} G_1^\infty / \Delta_{sol} G_1^\infty(W), \quad (6)$$

where  $\ln \gamma_1^\infty(W)$  and  $\ln \gamma_1^\infty(W + M)$  are the limiting activity coefficients of a solute

in pure water ( $W$ ) and in aqueous solutions of the modifier ( $M$ ), respectively. As such, SP in equation (6) represents the solubilization power (or effectiveness) of ( $W + M$ ) referred to that of pure solvent water. When  $SP > 0$  ( $W + M$ ) is able to solubilize more solute than water, when  $SP < 0$  ( $W + M$ ) solubilizes less solute than pure water and for  $SP = 0$ , the modifier has no effect on the solubility. Figure 4 shows SP for toluene as a function of temperature for guanidine, urea and the five modifiers studied in this work, all at  $1.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  except trehalose where SP is at  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . The data in figure 4 were obtained from table 1 here and table 1 in reference 8. As already discussed in reference 8, (water + guanidine) and (water + urea) mixtures are powerful solubilization agents for toluene at all temperatures. Ethylene glycol and glycerol aqueous solutions do solubilize more toluene than water but are less effective than urea and guanidine; however, as already pointed out above, (water + glycerol) at  $T = 273 \text{ K}$  accepts less toluene than pure water. Sucrose and trehalose aqueous solutions at high temperatures show a behaviour similar to that of ethylene glycol and glycerol, but as the temperature is decreased they become unable to incorporate more toluene than pure water. On the extreme, at all temperatures (water + glucose) solutions are not capable of solubilizing more toluene than pure water. Note that SP for sucrose and glucose show the strongest temperature dependences. Using equation (6), it is also possible to compare SP for glycerol, urea and guanidine at different concentrations ( $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  to  $5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). This is shown in figure 5 for toluene, with the data obtained from table 1 here and table 1 in reference 8. Figure 5 indicates that in going from glycerol to guanidine SP increases significantly, especially at high  $M$  concentrations. The temperature dependence of SP is stronger for glycerol and diminishes in going first to urea and then to guanidine. As discussed above, glycerol solutions in figure 5 are seen to solubilize less toluene than water at the lowest  $M$  concentrations and temperatures.

The accuracy of the data allows the calculation of the transfer Gibbs energy  $\Delta_{\text{tr}}G_{\text{m},1}^{\infty}$  below and above the experimental temperature interval used here. The  $\Delta_{\text{tr}}G_{\text{m},1}^{\infty}$  characterizes the process in which toluene is transferred from pure water to modifier aqueous solution, and can be calculated using the parameters in table 2, *i.e.* with a temperature-independent  $\Delta_{\text{sol}}C_{p,m,1}^{\infty}$ . The  $\Delta_{\text{tr}}G_{\text{m},1}^{\infty}$  values are shown in figure 6 for urea and guanidine<sup>(8)</sup> and the five modifiers studied here, all at the same concentration ( $1.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) with the exception of trehalose ( $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). It should be noted that the wide temperature range extrapolation in figure 6 has no quantitative accuracy, but it is useful to know the prevailing trends and to compare between modifiers. Also, for temperatures below the solutions freezing points,  $\Delta_{\text{tr}}G_{\text{m},1}^{\infty}$  values are hypothetical. The general pattern seen in figure 6 is that in a wide temperature range,  $\Delta_{\text{tr}}G_{\text{m},1}^{\infty}$  for the several modifiers changes sign at two temperatures and passes through a minimum. At low  $T$ ,  $\Delta_{\text{tr}}G_{\text{m},1}^{\infty}$  is positive and hence unfavourable, negative and hence favourable in a temperature interval that includes the indicated experimental window (E in figure 6), and again positive at high  $T$ . Two exceptions to this behaviour are seen in figure 6. For glucose,  $\Delta_{\text{tr}}G_{\text{m},1}^{\infty}$  values are positive at all temperatures its minimum being in the upper limit of the experimental window E, and for urea  $\Delta_{\text{tr}}G_{\text{m},1}^{\infty}$  is negative in practically all the extended  $T$  interval its curvature being opposite to that exhibited by the other modifiers. In fact, for urea the data in reference 8 show that the

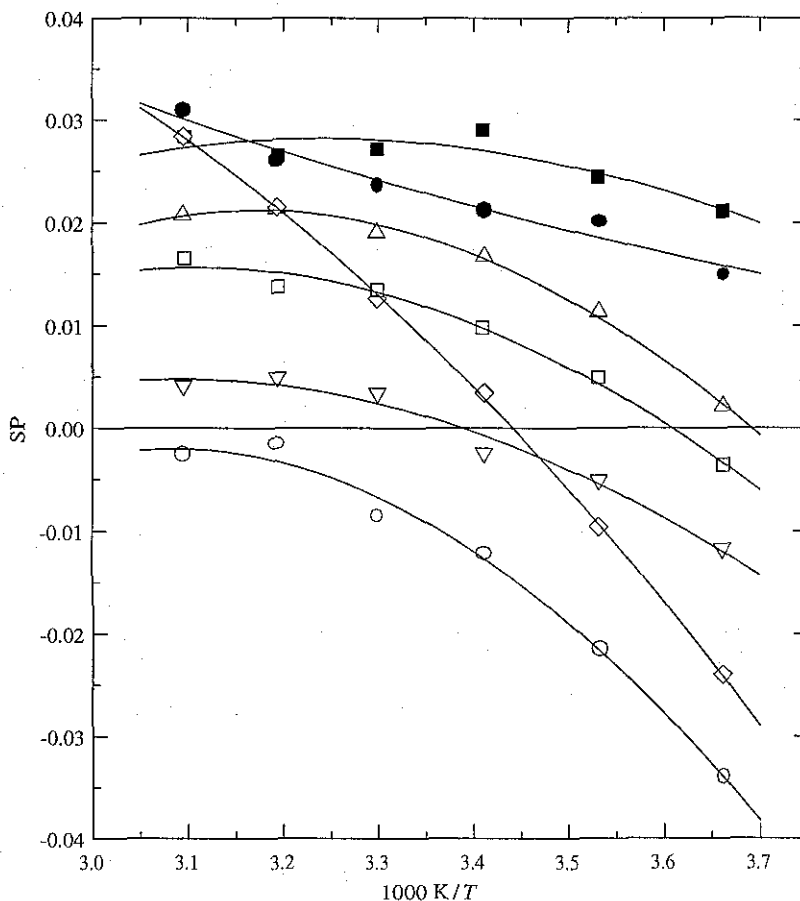


FIGURE 4. Solubilization power, SP, for toluene plotted as a function of temperature in the aqueous solutions of ●, urea; ■, guanidine; □, glycerol; △, ethylene glycol; ○, glucose; ◇, sucrose and ▽, trehalose at the modifiers molar concentration  $c_3/(\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3})$  1.5 (for trehalose  $c_3 = 0.5$ ). Points were obtained from table 1 here and table 1 in reference 8, and lines are from equation (6) using the parameters in table 2 here and from table 3 in reference 8.

curvature of  $\Delta_{\text{tr}}G_{\text{m},1}^{\infty}$  versus  $T$  changes from negative to positive as the concentration of urea increases. According to figure 6, there are low- and high-temperature regions where the presence of a modifier no longer solubilizes a larger amount of toluene than pure water but, rather, acts in the opposite direction. Trehalose is an interesting case since for this modifier  $\Delta_{\text{tr}}G_{\text{m},1}^{\infty}$  is seen to change from being positive to negative and back to positive within the temperature interval where water is in the liquid phase at atmospheric pressure.

Through the calculation of the enthalpic and entropic contributions to the Gibbs energy from the parameters in table 2 (not shown), the behaviour displayed by  $\Delta_{\text{tr}}G_{\text{m},1}^{\infty}$  in figure 6 can be examined in more detail.<sup>(8)</sup> At low  $T$ ,  $\Delta_{\text{tr}}G_{\text{m},1}^{\infty} > 0$  is the result of an

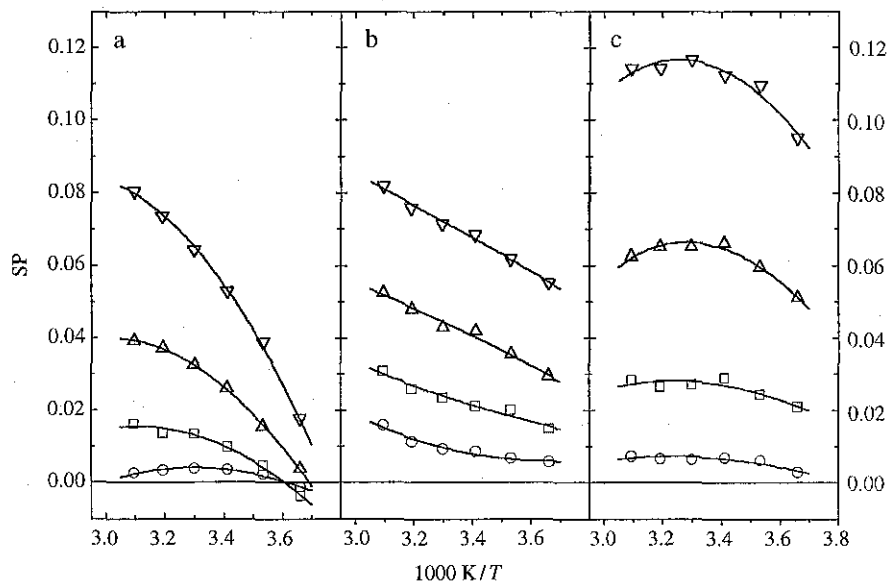


FIGURE 5. Solubilization power, SP, for toluene in the aqueous solutions of (a) glycerol, (b) urea and (c) guanidine plotted as a function of temperature at different modifier molar concentration  $c_3/(\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3})$ .  $\circ$ , 0.5;  $\square$ , 1.5;  $\triangle$ , 3.0;  $\nabla$ , 5.0. Points were obtained from table 1 here and table 1 in reference 8, and lines were calculated from equation (6) using the parameters in table 2 here and from table 3 in reference 8.

unfavourable positive enthalpic contribution overcoming a favourable positive entropic contribution. At high  $T$ ,  $\Delta_{\text{tr}}G_{\text{m},1}^{\infty} > 0$  emerges from an unfavourable negative entropic contribution that overbalances a favourable negative enthalpic contribution. The  $T$  interval where  $\Delta_{\text{tr}}G_{\text{m},1}^{\infty} < 0$  is in fact divided into three distinct regions. In the first, occurring at low  $T$ , the favourable entropic contribution overcomes the unfavourable enthalpic contribution. In the second, occurring in a small temperature range, both enthalpic and entropic contributions act in the same direction, *i.e.* favouring solute transfer. In the third, occurring at high  $T$ , the favourable enthalpic contribution overcomes the unfavourable entropic contribution. A detailed discussion of all the regions present in figure 6 has been presented in reference 8 for the cases of guanidine and urea. A microscopic view underlying the complex thermodynamic behaviour of the five modifiers used in this work can probably be obtained employing a simple molecular model.<sup>(9)</sup> This model already rendered satisfactory results for the cases of urea and guanidine. Work towards this objective is currently under way in our laboratories.

Editor:  
Please check this name

We thank Štěpán Hovorka for his competent advice regarding experimental details of IGS measurements. E.C.-N. is grateful for financial support from a Czech–Mexican scientific cooperation project (Ministry of Education of the Czech Republic, grant ME 237, and CONACyT) and from the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), that made possible his stay at ICT Prague. This work was further partially supported by MSM



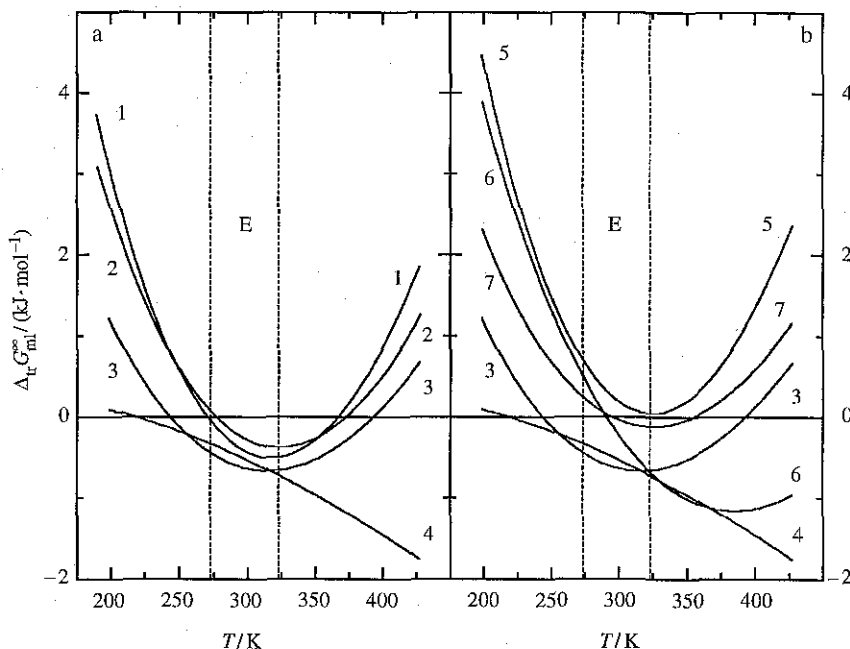


FIGURE 6. Gibbs energies of transfer at infinite dilution for toluene to [water + modifier] plotted against temperatures at the modifiers molar concentration  $c_3/(\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3})$  1.5 (for trehalose  $c_3 = 0.5$ ). The lines were calculated from equation (4), with parameters in table 1 here and in table 3 in reference 8. In (a): 1, ethylene glycol; 2, glycerol; 3, guanidine and 4, urea. In (b): 3, guanidine; 4, urea; 5, glucose; 6, sucrose and 7, trehalose. E indicates the experimental temperature range employed in this work.

2234 00008 grant from Ministry of Education of the Czech Republic and from CONACyT research project program (grant E 27986).

#### REFERENCES

1. Timasheff, S. N. Protein stability and folding protocols. In *Methods in Molecular Biology*. Shirley, B.: editor. Humana Press: Totona, NJ. 1996.
2. Timasheff, S. N.; Arakawa, T. *Protein Structure and Function: A Practical Approach*. Creighton, T. E.: editor. IRL press: Oxford. 1996.
3. Sola-Penna, M.; Meyer-Fernandes, J. R. *Z. Naturforsch* **1994**, 49c, 327–330.
4. Hottiger, T.; de Virgilio, C.; Hall, M. N.; Boller, T.; Wiemken, A. *Eur. J. Biochem.* **1994**, 219, 187–193.
5. Singer, M. A.; Lindquist, S. *Mol. Cell* **1998**, 1, 639–648.
6. Sampedro, J. G.; Cortés, P.; Muñoz-Clares, R. A.; Fernández, A.; Uribe, S. *Biochim. Biophys. Acta Prot. Struct. Mol. Enzym.* **2001**, 1544, 64–73.
7. Creighton, T. E. (editor) *Protein Folding*. Freeman: New York. 1992.
8. Hovorka, Š.; Dohnal, V.; Carrillo-Nava, E.; Costas, M. *J. Chem. Thermodynamics* **2000**, 32, 1683–1705.
9. Dohnal, V.; Costas, M.; Carrillo-Nava, E.; Hovorka, Š. *Biophys. Chem.* **2001**, 90, 183–202.
10. Hovorka, Š.; Dohnal, V. *J. Chem. Eng. Data* **1997**, 42, 924–933.

Author:  
Reference 1 treated as  
'inbook' OK?

Editor:  
Please check the word  
"Zlúenin" in book title  
of reference 12

11. Vrbka, P.; Dohnal, V. Z. *Phys. Chem. (Munich)* **1999**, 209, 159–170.
12. Dykyj, J.; Repáš, M. *Talk Nasýtenej Pary Organických Zlúenin*. Veda: Bratislava. **1979**.
13. CDATA, *Database of Thermodynamic and Transport Properties for Chemistry and Engineering*. Department of Physical Chemistry. Institute of Chemical Technology (distributed by FIZ Chemie GmbH, Berlin): Prague. **1991**.
14. Hayden, J. G.; O'Connell, J. P. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* **1975**, 14, 209–216.
15. Prausnitz, J. M.; Anderson, T. F.; Grens, E. A.; Eckert, C. A.; Hsieh, R.; O'Connell, J. P. *Computer Calculations for Multicomponent Vapor–Liquid and Liquid–Liquid Equilibrium*. Prentice-Hall: Englewood Cliffs, NJ. **1980**.
16. Makhatadze, G. I.; Privalov, P. L. *J. Chem. Thermodynamics* **1988**, 20, 405–412.

(Received 11 April 2001; in final form 21 May 2001)

WE-300

## Capítulo 5

### Disoluciones acuosas de solutos no polares. Análisis termodinámico molecular

El entender a nivel molecular el porqué de la baja solubilidad de compuestos no polares en agua o en medios acuosos, es un prerequisite para el entendimiento de la desnaturalización química y térmica de las proteínas, y es el estímulo que motivó el estudio que se presenta en este capítulo. En general, podemos decir que el grado en que las propiedades conformacionales de las proteínas son afectadas dependen de la naturaleza y concentración de los modificadores empleados. Se ha debatido desde hace tiempo la manera en que estos modificadores cambian las propiedades del agua en solución y si en realidad juegan un papel específico.<sup>71-72</sup>

A partir de la introducción de los conceptos de hidratación hidrofóbica e interacciones hidrofóbicas, varias teorías se han desarrollado para explicar el comportamiento peculiar de las propiedades termodinámicas de las disoluciones acuosas de los solutos no polares. Frank y Evans fueron los primeros en especular sobre el origen molecular del comportamiento termodinámico de las soluciones acuosas de no electrolitos.<sup>8</sup> En su artículo afirman que *“cuando un átomo de un gas raro o una molécula no polar se disuelve en agua a temperatura ambiente, éste modifica la estructura del agua en aquella dirección que promueve una mayor cristalinidad – el agua, digamoslo así, construye un iceberg alrededor del soluto”*. La promoción de las regiones tipo cristal fue racionalizado bajo el argumento de que estas estructuras contienen mayor espacio libre en donde las partículas no polares del soluto pudiesen ser acomodadas. Este modelo alcanzó gran popularidad y se le conoce como el “modelo iceberg”.

Varios de los modelos desarrollados a la fecha pueden explicar la solvatación de solutos no polares en agua, la mayoría tienen un carácter netamente cualitativo. Todos los modelos tienen sus méritos y sus limitaciones. Aun cuando una gran cantidad de ellos han sido desarrollados para explicar el efecto hidrofóbico,<sup>1,9,48,73</sup> atacando el problema desde distintos puntos de vista y empleando distintas herramientas, la mayoría de los modelos pueden considerarse como modelos de mezcla o de dos estados.<sup>1</sup> En el contexto de la termodinámica de solvatación, la información sobre la estructura del agua ayuda a comprender cómo el agua difiere de otros disolventes, como disolvente de solutos no polares.

<sup>71</sup> H. S. Frank, F. Franks. J. Chem. Phys., **48**, 4746 (1968).

<sup>72</sup> M. Roseman, W. P. Jencks. J. Am. Chem. Soc., **97**, 631 (1975).

<sup>73</sup> N. A. M. Besseling, J. Lyklema. J. Phys. Chem. B, **101**, 7604 (1997).

El “soluto” hidrofóbico más sencillo es una cavidad o equivalentemente una partícula, que excluye a los átomos de hidrógeno y oxígeno de un volumen que ocupa una forma y un tamaño molecular. La formación de la cavidad constituye el primer paso en la solvatación de cualquier soluto no polar por el agua, de manera que un procedimiento común para estimar y explicar los valores termodinámicos de hidratación, es el de parametrizar estas propiedades con el área de las moléculas no polares que es accesible a las moléculas de agua. Este procedimiento toma en cuenta a las interacciones predominantes del soluto con las moléculas de agua en la primera esfera de hidratación.

Uno de los objetivos de este trabajo es el explicar las observaciones experimentales de las propiedades termodinámicas del proceso de transferencia de un soluto no polar, desde un medio no polar (estado líquido puro del soluto) a un medio acuoso (agua pura ó [agua + modificador]),<sup>75-76</sup> mediante un modelo molecular. Para lograr este objetivo, necesitamos un modelo que cuantifique la hidratación hidrofóbica y las interacciones hidrofóbicas, al igual que sus dependencias con la temperatura y la concentración del modificador (en caso de que éste se encuentre presente en la disolución). En este capítulo se presenta un artículo (sección 5.1) donde se desarrolla y discute el modelo de equilibrio químico para la esfera de hidratación (Hydration Shell Chemical Equilibria –HSCE–). Este modelo se usó para estudiar el comportamiento termodinámico de solutos no polares en agua y en disoluciones acuosas de agentes desnaturalizantes con resultados alentadores. También se presentan los resultados preliminares del uso del modelo para analizar los datos en sistemas acuosos en donde el modificador es un agente estabilizante de proteínas (sección 5.2). Este análisis no ha sido aún enviado para su publicación.

El modelo HSCE sugiere que la disolución de los solutos no polares en medios acuosos, está acompañada de contribuciones que compiten entre sí, las cuales muestran una casi total compensación. Por un lado tenemos una contribución desfavorable a la disolución debida a las interacciones entre el soluto y el medio acuoso, mientras que por el otro, tenemos la contribución favorable debida a la habilidad de las moléculas de agua que se encuentran alrededor del soluto para cambiar su estructura; en el modelo esta contribución se describe mediante una “reacción química” al equilibrio. En el apéndice C se encuentra descrito la forma en que se calcularon los parámetros geométricos de los modificadores empleados y se presenta también la orientación espacial de interacción propuesta entre los modificadores y el soluto. También se describe en mayor detalle la contribución de interacción al modelo HSCE.

---

<sup>75</sup> Š. Hovorka, V. Dohnal, E. Carrillo-Nava, M. Costas. *J. Chem. Thermodynamics*, **32**, 1683 (2000).

<sup>76</sup> E. Carrillo-Nava, M. Costas, V. Dohnal. *J. Chem. Thermodynamics*, aceptado (2002).

**5.1. Artículo # 3. Non-polar solutes in water and in aqueous solutions of protein denaturants. Modeling of solution and transfer processes**



ELSEVIER

Biophysical Chemistry 90 (2001) 183–202

Biophysical  
Chemistry

www.elsevier.nl/locate/bpc

## Non-polar solutes in water and in aqueous solutions of protein denaturants. Modeling of solution and transfer processes

Vladimír Dohnal<sup>a,\*</sup>, Miguel Costas<sup>b,1</sup>, Ernesto Carrillo-Nava<sup>b</sup>,  
Štěpán Hovorka<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Physical Chemistry, Institute of Chemical Technology, 166 28 Prague 6, Czech Republic

<sup>b</sup>Laboratorio de Termodinámica, Departamento de Física y Química Teórica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico D.F. 04510, México

Received 7 November 2000; received in revised form 16 January 2001; accepted 17 January 2001

### Abstract

A simple molecular model for the thermodynamic behavior of non-polar solutes in water and in aqueous solutions of protein denaturants is presented. Three contributions are considered: (i) combinatorial arising from the mixing process, (ii) interactional characterizing the molecular interactions occurring in the mixture and (iii) a contribution originating from the structural changes occurring in the first shell of water molecules around the solute. The latter is modeled assuming that water molecules in contact with the solute are involved in a chemical equilibrium between two states. The model describes well the temperature and denaturant concentration dependences of the Gibbs energies of solution and transfer for benzene, toluene and alkanes in water and aqueous solutions of urea and guanidine hydrochloride. Model parameters are physically meaningful, allowing a discussion of the molecular interactions involved. A preferential solvation of the solute by the denaturant is found. However, the non-polar solute-denaturant interaction is not specific, i.e. leading to a distinct chemical entity. Urea and guanidine hydrochloride are non-polar solubilizing agents because their interactions with the solute are less unfavorable than those between water and the solute. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Protein unfolding; Aqueous denaturant solvent; Non-polar solute; Hydrophobic hydration model; Preferential solvation; Limiting activity coefficient

\* Corresponding author. Tel.: +44-22-43-10-273; fax: +44-22-43-10-273.

E-mail addresses: dohnalv@vscht.cz (V. Dohnal), costasmi@servidor.unam.mx (M. Costas).

<sup>1</sup>Also corresponding author. Fax: +4202-2431-0273.

## 1. Introduction

Native proteins are routinely unfolded at constant temperature using aqueous solutions of urea or guanidine hydrochloride. Denaturation with these chemicals is one of the primary ways of measuring the conformational stability of proteins [1]. The mechanism involved in protein denaturation is not well established. It is not clear if denaturants act indirectly through effects on the water solvent, or directly by favorable interactions (solvation) of non-polar, polar and ionic groups or by binding, via hydrogen bonding, with the amide units in the polypeptide chain [2–11]. Furthermore, it is also not clear which is the relative importance of each of these effects, i.e. whether one of them is dominant or all of them are significant. The complexity of protein denaturation makes it necessary to dissect this multifaceted phenomenon into simple components, so that some of its aspects can be clearly understood. Within this context, we study in this work the molecular interactions occurring between non-polar substances and denaturants in aqueous media.

Upon denaturation, the non-polar chemical groups in the protein interior are exposed to the aqueous media. Hence, thermodynamic studies involving small and sparingly soluble non-polar substances in water and in (water + denaturant) solutions are of primary importance. Some thermodynamic properties of aqueous solutions of urea and guanidine hydrochloride (hereon, denoted as guanidine) and their ability to solubilize non-polar entities have been studied previously [12–15]. Recently, we have reported experimental infinite dilution activity coefficients  $\gamma_1^\infty$  for two non-polar solutes (benzene and toluene) in water and in (water + urea) or (water + guanidine) solutions in the 273–323 K temperature interval and at four denaturant concentrations (0.5–5.0 mol dm<sup>-3</sup>), covering the range where proteins undergo chemical denaturation [16]. Activity coefficients are directly related to the Gibbs energy through  $\ln\gamma_1^\infty = \Delta_{sol}G_1^\infty/RT$  where  $\Delta_{sol}G_1^\infty$  is the Gibbs energy of solution that refers to the process where the solute is transferred from the pure liquid state to water at infinite dilution. If the

non-polar/water mutual solubilities are small (solute mole fraction,  $x_1^{sol}$ , less than 0.001) then the reciprocal value of this mole fraction approximates the infinite dilution activity coefficient, i.e.  $\gamma_1^\infty = 1/x_1^{sol}$ . Another relevant quantity, which is also easily obtained from the measured values of  $\gamma_1^\infty$ , is the transfer Gibbs energy,  $\Delta_{tr}G_1^\infty$ , which characterizes the process where the solute is transferred from water to a (water + denaturant) mixture. Transfer Gibbs energies have been used to estimate, through an additivity scheme, the Gibbs energy for the denaturation process [17,18].

In Hovorka et al. [16] the data were analyzed using a classical thermodynamic scheme which allowed the derivation of other thermodynamic quantities (enthalpies, entropies and heat capacities) and a detailed discussion, at the macroscopic level, of the several observed trends. In this work, one of our main goals is to study in detail the non-polar solute–denaturant interactions. In particular, we are interested in establishing whether or not the solute–denaturant interactions are strong enough so that this interaction can be classified as specific and hence leading to the formation of a solute–denaturant complex or to a preferential binding. For this purpose, we present a simple molecular model for the thermodynamic behavior of non-polar solutes in water and in (water + denaturant) mixtures. We apply this model to our data for benzene and toluene [16] and to literature thermodynamic data for *n*-alkanes [15,19,20]. The model parameters have clear physical significance and allow a detailed discussion, at the microscopic level, of the experimental results. We also apply to the available data the modified hydration shell hydrogen bond model reported in [21–23], testing its performance, comparing its results with those of the present work and examining the physical considerations upon which this model is based.

## 2. Hydration shell chemical equilibrium model

In this section a simple molecular model is presented for infinite dilution thermodynamic properties of a non-polar liquid solute (1) in a mixed binary solvent composed of water (2) and a

substance called modifier (3). The case of a hydrophobic solute in pure water solvent is then comprised as a special case. The modifier is an additive, such as the protein denaturants studied in this work, modifying the aqueous environment where the non-polar solute is placed at infinite dilution. The model is developed for non-ionic solutions; then applying it when the modifier is guanidine ignores that this denaturant is an electrolyte. The derivation centers on the Gibbs energy of solution  $\Delta_{sol}G_1^\circ$ ; the Gibbs energy of transfer  $\Delta_{tr}G_1^\circ$  and related functions (enthalpy, entropy, heat capacity) being then readily procurable by standard procedures. The model stems from the widely accepted idea that water molecules in direct contact with the solute are, because of their spatial position, in a different condition from those in the bulk. Since 1945 when this idea was first introduced by Frank and Evans [24], a number of conceptual models have been presented to describe and visualize the formation of this structurally altered first hydration shell [25–28]. This idea is combined here with the simplest treatments of molecular thermodynamics, yet resulting in a physically meaningful correlation/interpretation scheme, that hereon will be referred as the hydration shell chemical equilibrium (HSCE) model.

The model considers  $\Delta_{sol}G_1^\circ$  being composed of three contributions

$$\Delta_{sol}G_1^\circ = \Delta G^{comb} + \Delta G^{int} + \Delta G^{alt} \quad (1)$$

which originate, respectively, from combinatorial effects, molecular interactions and the structural alteration of water molecules in the first solvation shell around the solute. The assumption that only the first hydration layer is affected by the solute receives support from computer simulations [29]. The three contributions depend on molecular geometry of the species involved, so we will introduce first the respective molecular geometrical parameters.

As in the UNIQUAC/UNIFAC excess Gibbs energy models [30,31], volume and contact area characteristics,  $R_i$  and  $Q_i$ , of each component are used to describe the molecular geometry. They are defined as the molecule van der Waals volume

$V_i^w$  and area  $A_i^w$  [32] relative to those of a standard segment [30].

$$R_i = V_i^w / V_{ref}^w; V_{ref}^w = 1.517 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1} \quad (2)$$

$$Q_i = A_i^w / A_{ref}^w; A_{ref}^w = 250 \cdot 10^3 \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1} \quad (3)$$

For solvent components, however, rather than the total contact area  $A_i^w$  of the molecule, essential is the area  $\bar{A}_i^w$  the molecule occupies on the surface of the solvation shell, and through which the solvent and solute molecules are in contact. We determined this contact area for water and the two protein denaturants studied in this work as indicated in Fig. 1. It is considered here that these solvent molecules interact with a non-polar hydrocarbon solute through their hydrogen atoms facing the hydrocarbon surface, for water the involvement being assumed just for one of its hydrogen atoms. Such a constellation receives support from recent quantum mechanical ab initio gas-phase calculations and molecular simulation studies [33]. As seen from Fig. 1,  $\bar{A}_i^w$  is approximated by the trail area of the hydrogen atoms on a planar contact surface. In our calculations we used a value of 12 nm for the van der Waals radius of the hydrogen atom, and the interatomic distances and angles reported for urea from neutron diffraction studies [34]. Considering that the chemical structure of guanidinium cation is analogous to that of urea, we adopted for this

Table 1  
Geometric parameters of components

Component	$R$	$Q$	$\bar{Q}$
Benzene	3.1878	2.400	–
Toluene	3.9228	2.968	–
Methane	1.1278	1.156	–
Ethane	1.8022	1.696	–
Propane	2.4766	2.236	–
Butane	3.1510	2.776	–
Pentane	3.8254	3.316	–
Hexane	4.4998	3.856	–
Cyclohexane	4.0464	3.240	–
Water	0.9200	1.400	0.109
Urea	2.1408	2.486	0.244
Guanidine hydrochloride	3.1277	3.234	0.244



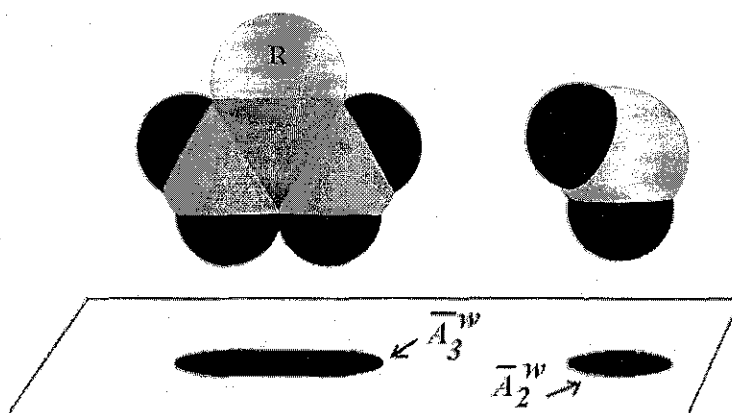


Fig. 1. Diagrammatic representation of the areas  $\bar{A}_i^w$  that urea ( $R = \text{CO}$ ), guanidinium ion ( $R = \text{NH}_2^+$ ) and water occupy on the surface of the solvation shell.

cation the  $\bar{A}_i^w$  value for urea. The values for  $\bar{Q}_i$ , normalized by the area of the standard segment, are given in Table 1, together with the other structural parameters of the components.

To describe  $\Delta G^{\text{comb}}$  and  $\Delta G^{\text{int}}$ , a classical approach based on the rigid lattice theory and Langmuir's concept of surface-proportional molecular interactions is employed. For the combinatorial contribution we use the Flory-Huggins expression:

$$\Delta G^{\text{comb}} = RT \left( 1 + \ln \frac{R_1}{R_2 x_2 + R_3 x_3} - \frac{R_1}{R_2 x_2 + R_3 x_3} \right) \quad (4)$$

where  $x_2$  and  $x_3$  are the mole fractions of water and modifier, respectively. Note that  $\Delta G^{\text{comb}}$  is negative and, since  $R_1 > R_2$  and  $R_3 > R_2$ , in pure solvent water and dilute aqueous modifier solutions, it increases in absolute magnitude with increasing solute size and decreases with increasing modifier concentration.

To construct the interactional term, we will balance pair potential energy ( $\Delta G^{\text{int}} = \Delta U^{\text{int}}$ ) for the following three hypothetical steps involved in the dissolution process ( $\Delta U^{\text{int}} = \Delta U^{\text{I}} + \Delta U^{\text{II}} + \Delta U^{\text{III}}$ ): (I) breaking interactions in the pure liquid solute to obtain free solute molecules, (II) breaking interactions in the mixed solvent to open cavities for the solute molecules and (III) establishing interactions between the solute and the

mixed solvent when the solute molecules are placed into the cavities. Let  $\sigma_{ij}$  stand for the molar  $i$ - $j$  pair interaction energy per standard segment surface ( $\sigma_{ij} < 0$ ); for brevity, hereon this quantity will be called pair interaction energy. The energy required to get one mole of free solute molecules is then simply

$$\Delta U^{\text{I}} = -Q_1 \sigma_{11} / 2 \quad (5)$$

Similarly, in the second step, the energy to open cavities that would accommodate this one mole of solute in the (2 + 3) mixed solvent can be written as:

$$\Delta U^{\text{II}} = -Q_1 \bar{\sigma}_{(2+3)} / 2 \quad (6)$$

where  $\bar{\sigma}_{(2+3)}$  denotes the mean energy of the broken pair interactions. It can be readily shown that  $\bar{\sigma}_{(2+3)}$  is given by the well-known quadratic mixing rule:

$$\bar{\sigma}_{(2+3)} = \xi_2^2 \sigma_{22} + \xi_3^2 \sigma_{33} + 2\xi_2 \xi_3 \sigma_{23} \quad (7)$$

with  $\xi_2$  and  $\xi_3$  being the fractions of the cavity surface occupied by water and modifier, respectively. These surface fractions can be calculated from

$$\xi_2 = \frac{\bar{Q}_2 x_2}{\bar{Q}_2 x_2 + \bar{Q}_3 x_3}; \quad \xi_3 = 1 - \xi_2 \quad (8)$$

where  $\bar{Q}_2$  and  $\bar{Q}_3$  are the portions of the cavity surface taken by one molecule of the respective type. As discussed above, the values of  $\bar{Q}_i$  are regarded as special geometrical parameters of solvent molecules. Considering now the third step, the drop in potential energy upon forming the interactions between the solute and the mixed solvent can be expressed as the product of  $Q_1$  and  $\bar{\sigma}_{(12,13)}$ , the mean pair interaction energy of the solute with the cavity surface, i.e.:

$$\Delta U^{III} = Q_1 \bar{\sigma}_{(12,13)} \quad (9)$$

where  $\bar{\sigma}_{(12,13)}$  is given by:

$$\bar{\sigma}_{(12,13)} = \xi_2 \sigma_{12} + \xi_3 \sigma_{13} \quad (10)$$

Summing up the energy changes for the three steps, the total interaction contribution takes the form:

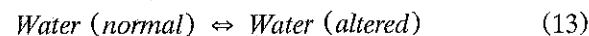
$$\Delta G^{int} = Q_1 [\Delta_{12} + \xi_3 (\Delta_{13} - \Delta_{12} - \Delta_{23}) + \xi_3^2 \Delta_{23}] \quad (11)$$

which is written in terms of the interchange energies  $\Delta_{ij}$  defined as:

$$\Delta_{ij} \equiv \sigma_{ij} - \frac{1}{2} (\sigma_{ii} + \sigma_{jj}) \quad (12)$$

Note that  $\Delta G^{int}$  is proportional to the solute contact area and, since for hydrophobic solutes  $\Delta_{12}$  is anticipated to be clearly dominant ( $\Delta_{12} \gg 0$ ),  $\Delta G^{int}$  must be positive and large.

To express  $\Delta G^{alt}$ , the last term in Eq. (1) emerging from the structural alteration of water molecules due only to the presence of the solute, we adopted the chemical equilibrium approach. It is assumed that this alteration can be formally described by the chemical reaction



without virtually specifying neither a concrete molecular mechanism of this alteration, nor a particular spatial arrangement of water molecules in both initial and final states. We assume that

only water molecules in the first shell around the solute undergo the alteration represented by Eq. (13), all water molecules in the bulk being considered intact. The alteration reaction can be characterized by an equilibrium constant  $K$  whose temperature dependence is given by:

$$\ln K = \ln K_{298} + \frac{\Delta H^0}{R} \left( \frac{1}{298.15} - \frac{1}{T} \right) \quad (14)$$

where  $K_{298}$  is the value of  $K$  at 298.15 K and  $\Delta H^0$  is the temperature independent standard enthalpy change of the alteration. We further assume that the interactions of the normal water and the altered water molecules with their surroundings (solute and modifier) are the same and that the normal water/altered water interchange energy is zero. Under the framework of the rigid lattice theory, it can be then readily shown that the activity coefficients of the altered water species and the normal water species in the solvation shell have the same value, independently of the extent of alteration. Thus, the equilibrium condition for the alteration reaction can be written simply as

$$K = x_2^{alt} / x_2^{norm} \quad (15)$$

where  $x_2^{alt}$  and  $x_2^{norm}$  are the mole fractions of the altered and normal water species in the first solvation shell. Since  $x_2^{alt} + x_2^{norm} = x_2$ ,

$$x_2^{alt} = x_2 \frac{K}{1+K} \quad (16)$$

$$x_2^{norm} = x_2 \frac{1}{1+K} \quad (17)$$

Let further  $n_2$ ,  $n_2^{alt}$  and  $n$  stand, respectively, for the number of moles of water, altered water and the total number of moles in the first solvation shell, each per one mole of the solute. The change of the Gibbs energy accompanying the alteration reaction is then:

$$\Delta G^{alt} = n_2^{alt} \Delta G^0 + n [G^M(x_2^{alt}) - G^M(x_2^{alt} = 0)] \quad (18)$$

where  $\Delta G^\circ = -RT \ln K$  is the standard Gibbs energy of the reaction and

$$G^M(x_2^{alt}) = RT(x_2^{alt} \ln x_2^{alt} + x_2^{norm} \ln x_2^{norm} + x_3 \ln x_3) \quad (19)$$

and

$$G^M(x_2^{alt} = 0) = RT(x_2 \ln x_2 + x_3 \ln x_3) \quad (20)$$

are the molar Gibbs energies of mixing for the equilibrium and the initial mixture, respectively, in the first solvation shell. Taking into account Eqs. (16) and (17),  $\Delta G^{alt}$  can be simplified to:

$$\Delta G^{alt} = -n_2 RT \ln(1 + K) \quad (21)$$

which on expressing  $n_2$  through surface quantities:

$$n_2 = (Q_1/\bar{Q}_2) \xi_2 \quad (22)$$

takes the following final form:

$$\Delta G^{alt} = - (Q_1/\bar{Q}_2) \xi_2 RT \ln(1 + K) \quad (23)$$

Note that  $\Delta G^{alt}$  is proportional to the solute contact area  $Q_1$  and is always negative. According to Eq. (23), water molecules in direct contact with the solute accommodate their own structure or organization to decrease the total free energy of the system.  $\Delta G^{alt}$  is then of opposite sign to that for the interactional contribution, Eq. (11), and hence in the HSCE model the Gibbs energy of solution given by Eq. (1) is the result of the balance between contributions of different signs.

Another model to describe the structural changes occurring to water molecules in the first solvation shell around a hydrophobic solute has been presented [35]. This model considers the fact that the water molecules around the solute undergo a relaxation process described by a two-state model. In the Appendix A, it is shown that the Gibbs energy change for this relaxation process is equivalent to the  $\Delta G^{alt}$  in the HSCE model described above and the relations linking both models are given.

In the development of the  $\Delta G^{int}$  and  $\Delta G^{alt}$

contributions outlined above, we have assumed that the composition of the mixed solvent in the first solvation shell around the solute is the same as in the bulk; in other words we assumed random mixing. However, since the interaction of the solute with the denaturant is expected to be more favorable than that with water, a preferential solvation of the solute by the denaturant seems to be more likely the case. In order to account for this preferential solvation, we employed the local composition concept of Wilson [36] that has served as a basis for a number of successful excess Gibbs energy equations. Accordingly, the local surface fractions of water and the modifier in the first solvation shell are:

$$\xi_2 = \frac{\bar{Q}_2 x_2}{\bar{Q}_2 x_2 + \bar{Q}_3 x_3 \exp[-(\sigma_{13} - \sigma_{12})/RT]};$$

$$\xi_3 = 1 - \xi_2 \quad (24)$$

rather than those given by Eq. (8). A non-zero  $\sigma_{13} - \sigma_{12}$  value induces non-randomness [for  $\sigma_{13} - \sigma_{12} = 0$ , Eq. (24) reduces to Eq. (8)], and its sign indicates the component of the mixed solvent that preferentially solvates the solute. The use of Eq. (24) implies the appearance of an additional parameter, namely  $\sigma_{13} - \sigma_{12}$ . With this in mind, comparison between the results with Eq. (8) and Eq. (24) might serve as a probe of the feasibility of preferential solvation by the modifier. It should be noted here that a meticulous incorporation of the local composition idea into the HSCE model scheme would require the consideration of an additional interactional contribution emerging from the change in the number of 2–3 pair contacts in the solvation shell, with respect to the bulk. This lengthy interactional term is omitted here, as the version of the model incorporating it has been found not to offer any improvement.

The HSCE model described above consists of Eqs. (1), (4), (11) and (23). If Eq. (24) is used, the model involves six adjustable parameters that must be evaluated from experimental data. Four of these parameters ( $\Delta_{12}$ ,  $\Delta_{13}$ ,  $\Delta_{23}$  and  $\sigma_{13} - \sigma_{12}$ ) characterize pair interactions and the remaining

two ( $K_{298}$ ,  $\Delta H^0$ ) describe the structural alteration of water in the first solvation shell. If Eq. (8) is employed, the total number of parameters is five. The model equation for  $\Delta_{sol}G_1^\infty$  of a hydrophobic solute in pure water solvent is a special case ( $x_3 = 0$ ), and contains three parameters namely  $\Delta_{12}$ ,  $K_{298}$ ,  $\Delta H^0$ ; these three parameters can be evaluated from the (solute + water) binary mixture data.

The model equation for the transfer Gibbs energy is obtained from:

$$\Delta_{tr}G_1^\infty = \Delta_{sol}G_1^\infty(x_3) - \Delta_{sol}G_1^\infty(x_3 = 0) \quad (25)$$

and the number of parameters to be adjusted to experimental transfer data reduces in this case to five ( $\Delta_{13} - \Delta_{12}$ ,  $\Delta_{23}$ ,  $\sigma_{13} - \sigma_{12}$ ,  $K_{298}$ ,  $\Delta H^0$ ) or four if Eq. (8) is used. The respective equations for enthalpies, entropies, and heat capacities are not explicitly given here as they can be obtained from Gibbs energies by standard thermodynamic procedures.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Evaluation of the HSCE model parameters

In this section the HSCE model parameters are evaluated using experimental data. For the case of benzene and toluene, we used Gibbs energies of solution in pure water and in aqueous solutions of urea and guanidine as a function of temperature and denaturant concentration [16]. We also evaluated the model parameters for the alkanes using literature data [15,19,20]. In order to minimize correlations between model param-

eters we adopted the following policy (i) employ a data base as broad and good quality as possible, (ii) split evaluation of parameters into gradual steps, reducing thus the number of those evaluated simultaneously and (iii) keep the number of parameters to be adjusted as low as possible by fusing some of them by plausible assumptions, e.g. adopt the same  $\sigma_{13} - \sigma_{12}$  value for a solute series in a given cosolvent. Although the correlation between model parameters can never be eliminated completely, we believe that the sound parameter evaluation policy ensures their meaningful molecular-level interpretation given in Section 3.2.

For alkylbenzenes, the parameters  $\ln K_{298}$ ,  $\Delta H^0$  and  $\Delta_{12}$  were obtained through a simultaneous fitting of benzene and toluene pure water solvent data [16], the results being displayed in Table 2. It was found that the data are well fitted with common  $\ln K_{298}$  and  $\Delta H^0$  and individual  $\Delta_{12}$  values. Fig. 2 shows the good quality of the fitting. For the alkane series, we used available pure water solvent data for those alkanes for which direct data for the solution process is available [19,20] and no recalculation from the gaseous to liquid standard state is needed. Due to the low number of experimental points available, we took advantage of the fact that the HSCE model equations for the solution entropy  $\Delta_{sol}S_1^\infty$  and heat capacity  $\Delta_{sol}C_{P1}^\infty$  do not comprise the  $\Delta_{12}$  parameter and fitted  $\ln K_{298}$  and  $\Delta H^0$  to these properties. As indicated in Table 2, common  $\ln K_{298}$  and  $\Delta H^0$  values for the alkane series were found to give a satisfactory fit for the data. Subsequently,  $\Delta_{12}$  was fitted as a unique parameter to solubility  $x_1^{sol}$  data [20], its value being also

Table 2  
The HSCE model parameters fitted to binary non-polar solute (1) + water (2) data

Solute series	$\ln K_{298}$	$\Delta H^0 / \text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$	Solute(1)	$\Delta_{12} / \text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$
Alkylbenzenes <sup>a</sup>	-1.0434	-6214	Benzene	16 190
			Toluene	15 980
Alkanes	-0.8808 <sup>b</sup>	-6694 <sup>b</sup>	nC <sub>5</sub> , nC <sub>6</sub> , cC <sub>6</sub>	17 850 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Fitted to  $\gamma_1^\infty$  from [16],  $s_{rel} = 1.3\%$ .

<sup>b</sup> Fitted to  $\Delta_{sol}S_1^\infty$  from [19,20] and  $\Delta_{sol}C_P^\infty$  from [19],  $s_{rel} = 4.4\%$ .

<sup>c</sup> Fitted to  $x_1^{sol}$  from [20],  $s_{rel} = 25\%$ .

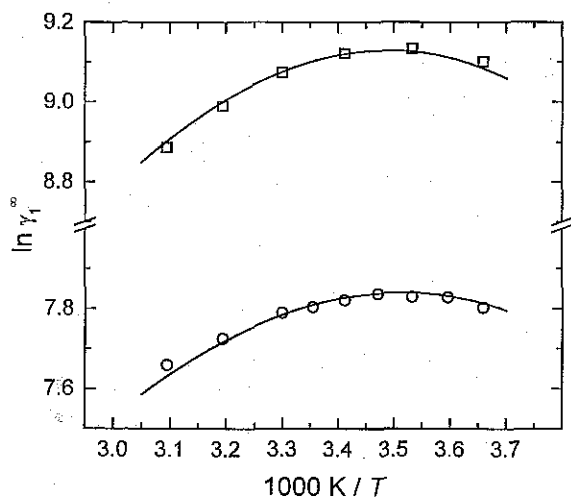


Fig. 2. The HSCE model fit (lines) to the experimental limiting activity coefficients  $\ln \gamma_i^\infty$  of benzene (O) and toluene (□) in water as a function of temperature. This simultaneous fit produced the parameters reported in Table 2. The experimental data are from [16].

reported in Table 2. Although the relative standard deviation of this fit is quite large (see Table 2), it is comparable to the scatter of the reported experimental solubilities for these highly hydrophobic solutes.

The HSCE model parameters describing the solute–denaturant and water–denaturant interactions can be evaluated by employing the solution Gibbs energies or, equivalently, the transfer Gibbs energies. If Eq. (8) is utilized, these parameters are  $\Delta_{13}$  and  $\Delta_{23}$  and, if Eq. (24) is used, there is also the additional  $\sigma_{13} - \sigma_{12}$  parameter. The performances of Eq. (8) and Eq. (24) are shown in Fig. 3 in the case of benzene in aqueous solutions of urea and guanidine, the experimental data being from [16]. For all the systems studied in this work, the standard deviations of the fit are lower (by a factor of 1.5–2) in the case of Eq. (24) than in Eq. (8). The difference between these standard deviations is statistically significant. For Eq. (24) to be considered superior to Eq. (8), it is also a requirement that the parameter  $\sigma_{13} - \sigma_{12}$  is different from zero with statistical significance. This condition is fulfilled for all solutes. It appears

then that consideration of preferential solvation, i.e. Eq. (24), gives a better rendering of the experimental data. The excellent fits achieved with Eq. (24) are illustrated in Fig. 4 with the data [16] for toluene in aqueous solutions of urea and guanidine.

For both alkylbenzenes, the parameters are reported in Table 3. For each denaturant, it was found that the data were well fitted with individual values for  $\Delta_{13}$  and a common  $\sigma_{13} - \sigma_{12}$  value for both solutes. In the case of alkanes in aqueous solutions of urea or guanidine, transfer Gibbs energy data are available only for the lower alkanes, methane to butane [15]. In order to describe this experimental data, it was necessary to introduce a solute size dependence for the  $\Delta_{13} - \Delta_{12}$  parameter. Within the framework of the rigid lattice theory, upon which the HSCE model is based, solute–size dependences for any of its parameters is not justified. Hence, the analytical form of the ( $\Delta_{13} - \Delta_{12}$ ) alkane–size dependence in Table 3 is arbitrary. Note that this dependence is important only for small size alkanes. As shown in Fig. 5, the use of Eq. (24) gave again better results than Eq. (8). In these fittings, the water–denaturant interchange energy parameter  $\Delta_{23}$  was obtained from the alkylbenzenes series data. As with the alkylbenzenes series, a common  $\sigma_{13} - \sigma_{12}$  value for all alkanes, but particular for each denaturant, gave good results. The alkane series parameters are given in Table 3.

### 3.2. A molecular view

In the previous section, we showed that despite of the simplicity of the HSCE model, it fits the experimental data to nearly experimental uncertainty. At the correlation level, the HSCE model is able to represent the data with less parameters than those needed using a classical thermodynamic scheme [16]. At the interpretation level, the HSCE model is a useful tool to explain, from the molecular point of view, the behavior of non-polar solutes in water and in aqueous solutions of modifiers such as the protein denaturants studied here. This stems from the physical significance of the model parameters and their plausible values that we now discuss.

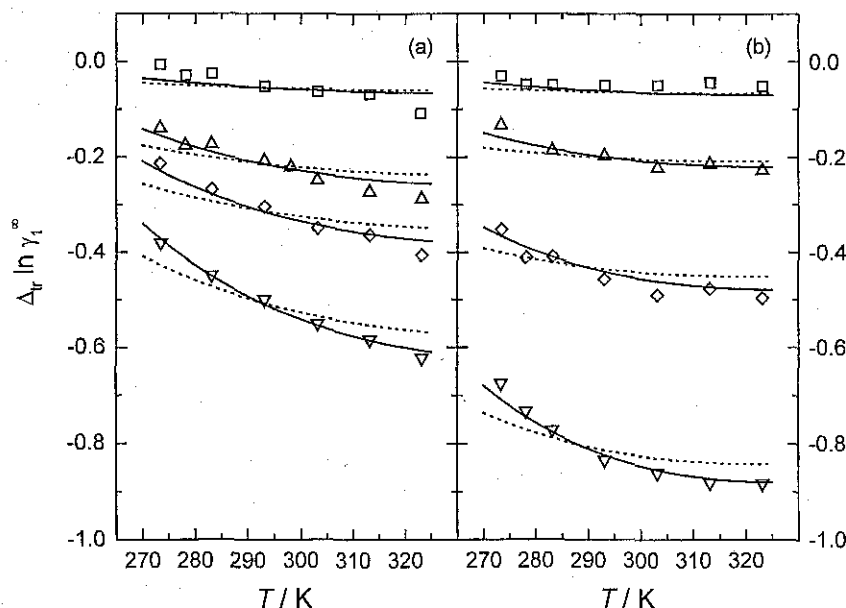


Fig. 3. The HSCE model fits to the experimental transfer limiting activity coefficients  $\Delta_{t,\ln\gamma_1^\infty}$  of benzene in aqueous solutions of (a) urea and (b) guanidine as a function of temperature, at several denaturant molar concentrations ( $\text{mol}/\text{dm}^3$ ):  $\square$ , 0.5;  $\triangle$ , (a) 2.0 and (b) 1.5;  $\diamond$ , 3.0;  $\nabla$ , 5.0.  $\Delta_{t,\ln\gamma_1^\infty}$  refers to solute transfer from pure solvent water to an aqueous solution of denaturant [see Eq. (25)]. Full lines were obtained using Eq. (24) and dotted lines using Eq. (8). These simultaneous fits produced the parameters reported in Table 3 [for the Eq. (24) case]. The experimental data are from [16].

### 3.2.1. Non-polar solutes in pure water solvent

The  $K_{298}$  and  $|\Delta H^0|$  parameters in Table 2 are larger for alkanes than for the alkylbenzenes. Clearly, the alteration of water molecules induced by an alkane is stronger in the sense that more water molecules are altered in the first solvation shell around the solute, and that this alteration process is energetically more efficient than when the solute is an alkylbenzene. For both series of solutes, the  $\Delta_{12}$  parameters in Table 2 take large positive values, expressing the interactional animosity or dislike between non-polar substances and water, a dislike that is less pronounced for alkylbenzenes. This agrees with the finding that alkylbenzenes have been found to form weak hydrogen bonds with water [37–40]. On the other hand, in Table 2  $\Delta_{12}$  is bigger for benzene than for toluene. This is an inconsistency that probably arises from the simplicity of the model.

In the HSCE model, the solution Gibbs energy is the result of the balance between competing contributions as shown in Fig. 6a for the case of

toluene in water. On the one hand there is a large positive interactional contribution  $\Delta G^{int}$  [Eq. (11)] disfavoring solubility. On the other hand, there are two negative contributions to the total solution Gibbs energy, the combinatorial  $\Delta G^{comb}$  [Eq. (4)] which is small and the large  $\Delta G^{alt}$  [Eq. (23)] emerging from the ability of water molecules around the solute to change their structure, both contributions promoting solubility. As indicated in Fig. 6a the interactional contribution is dominant, overcoming the water/alteration and combinatorial contributions, the net result being the well-known experimental positive solution Gibbs energy shown in Fig. 6b. In the framework of the HSCE model, the hydrophobicity of non-polar solutes is then caused by the large positive value for the solute–water interchange energy ( $\Delta_{12}$ ), that in turn is due to the high cohesive energy of water [ $\sigma_{22}$  in Eq. (12)]. Simply, the attraction of the water molecules to each other is much greater than their attraction to the solute molecules and the attraction of the solute molecules to each

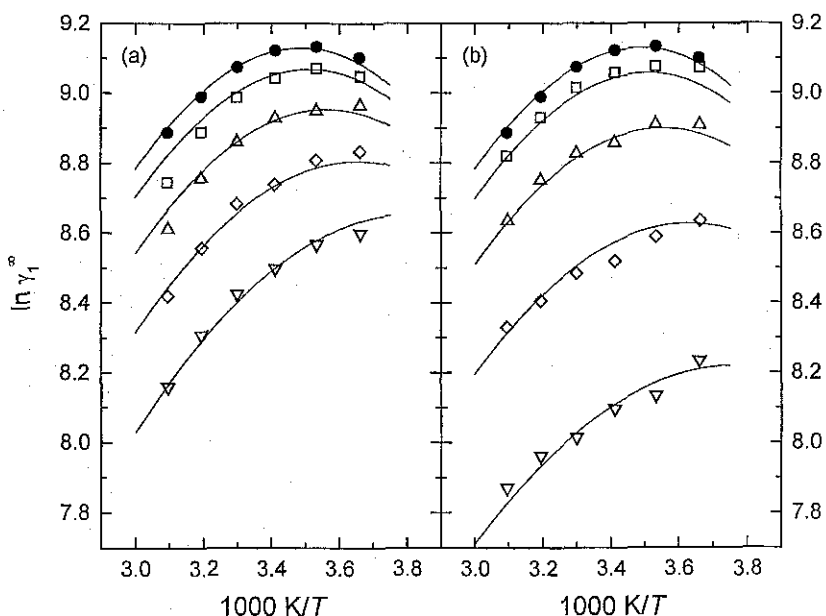


Fig. 4. The HSCE model fits (lines) to the experimental limiting activity coefficients  $\ln \gamma_1^\infty$  of toluene in aqueous solutions of (a) urea and (b) guanidine as a function of temperature, at several modifier molar concentrations ( $\text{mol}/\text{dm}^3$ ):  $\bullet$ , 0 (pure solvent water);  $\square$ , 0.5;  $\triangle$ , 1.5;  $\diamond$ , 3.0;  $\nabla$ , 5.0. Lines were obtained using Eq. (24). These simultaneous fits produced the parameters reported in Table 3. The experimental data are from [16].

other. According to the HSCE model, the temperature dependence of  $\Delta_{sol} G_1^\infty/RT$  and the presence of its maximum (minimum in solubility) in Fig. 6b are due to the structural alteration of the water molecules in the first solvation shell

around the solute. As the temperature decreases, it is the increasing importance of  $\Delta G^{alt}$  that makes possible the dissolution of larger quantities of solute into water, i.e. the existence of the solubility minimum.

Table 3

The HSCE model interaction parameters, in  $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$ , fitted to ternary non-polar solute (1) + water (2) + protein denaturant (3) data, using Eq. (24)

Solute (1)	water (2) + urea (3), $\Delta_{23} = -600$		water (2) + guanidine (3), $\Delta_{23} = -1970$	
	$\Delta_{13}$	$\sigma_{13} - \sigma_{12}$	$\Delta_{13}$	$\sigma_{13} - \sigma_{12}$
Alkylbenzenes <sup>a</sup>		-1480		-1760
Benzene	6270		4480	
Toluene	6012		4163	
Alkanes <sup>b</sup>	$\Delta_{13} - \Delta_{12}^c$	$\sigma_{13} - \sigma_{12}$	$\Delta_{13} - \Delta_{12}^c$	$\sigma_{13} - \sigma_{12}$
	$-11722 + 4719/Q_1$	-1225	$-12878 + 5135/Q_1$	-2614

<sup>a</sup> Fitted to  $\gamma_1^\infty$  from [16], for urea  $s_{rel} = 2.0\%$  and for guanidine  $s_{rel} = 2.3\%$ .

<sup>b</sup> Fitted to  $\gamma_1^\infty$  (in mixed solvent)/ $\gamma_1^\infty$  (in water) from [15], for urea  $s_{rel} = 2.8\%$  and for guanidine  $s_{rel} = 3.6\%$ .

<sup>c</sup> The indicated dependence on solute size was considered in the fitting.

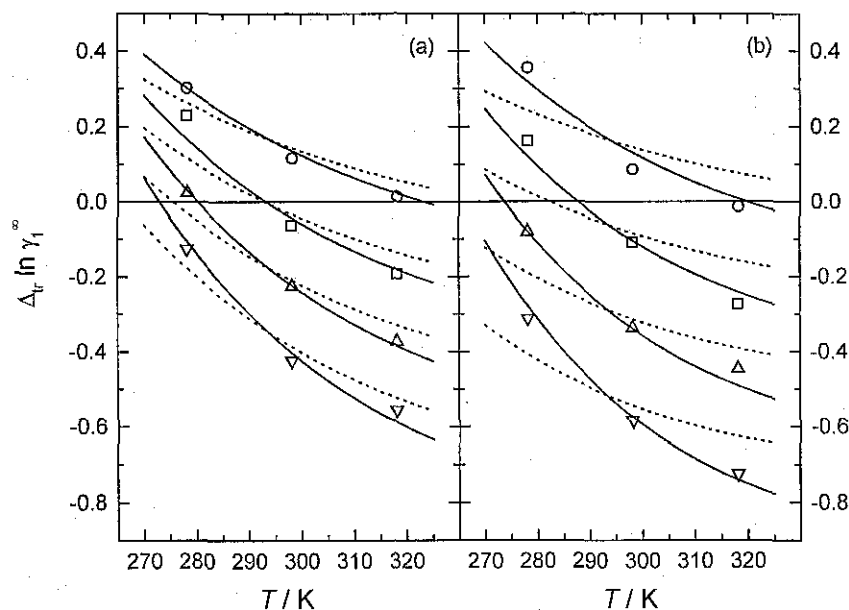


Fig. 5. The HSCE model fits to the experimental transfer limiting activity coefficients  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$  of lower alkanes (methane  $\circ$ , ethane  $\square$ , propane  $\triangle$  and butane  $\nabla$ ) as a function of temperature.  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$  refers to solute transfer from pure solvent water to an aqueous solution of (a) urea (7.0 mol/dm<sup>3</sup>) and (b) guanidine (4.9 mol/dm<sup>3</sup>). Full lines were obtained using Eq. (24) and dotted lines using Eq. (8). These simultaneous fits produced the parameters reported in Table 3 [in the case of Eq. (24)]. The experimental data are from [15].

### 3.2.2. Non-polar solutes in aqueous solutions of protein denaturants

The solute–denaturant interchange energy  $\Delta_{13}$  values are positive for alkylbenzenes (in Table 3) and alkanes (inferred from  $\Delta_{13} - \Delta_{12}$  in Table 3 and  $\Delta_{12}$  in Table 2) indicating a dislike between these molecules. This dislike is, however, much less pronounced than that between the solute and water ( $\Delta_{13} \ll \Delta_{12}$ ), i.e. the non-polar solute prefers to be in contact with the denaturant rather than with water. The  $\Delta_{13}$  values are bigger for urea than for guanidine, this difference being more pronounced for alkylbenzenes than for alkanes. This energetic preference of the solutes by guanidine is manifested, as seen in Figs. 3–5, in a bigger solubilization of the non-polar solutes in this denaturant, as compared to urea. It is also consistent with the experimental observation that less guanidine than urea is needed to unfold a protein. For the case of alkylbenzenes, it is probable that the solute–guanidine interaction takes place not only as depicted in Fig. 1 but also

between the positive charge in the guanidinium cation and the aromatic ring of benzene or toluene. This is an interaction that is not explicitly included in the HSCE model, but is reflected in the  $\Delta_{13}$  values evaluated from the experimental data. The positive  $\Delta_{13}$  values in Table 3 do not imply the existence of a preferential binding or a specific interaction leading to a distinct chemical entity (a solute–denaturant complex). The use of those terms is then not justified to describe the solute–denaturant interaction. This is in agreement with the conclusions reached by Loh et al. [41] from calorimetric data for sparingly soluble solutes in aqueous solutions of urea. According to our results, the non-polar solute–denaturant interaction is better described by the term ‘preferential solvation of the solute by the denaturant’ as discussed below.

For both alkylbenzenes and alkanes, the  $\sigma_{13} - \sigma_{12}$  parameter in Table 3 is negative, clearly indicating a preferential solvation of the solute by the denaturant. This language attempts to describe



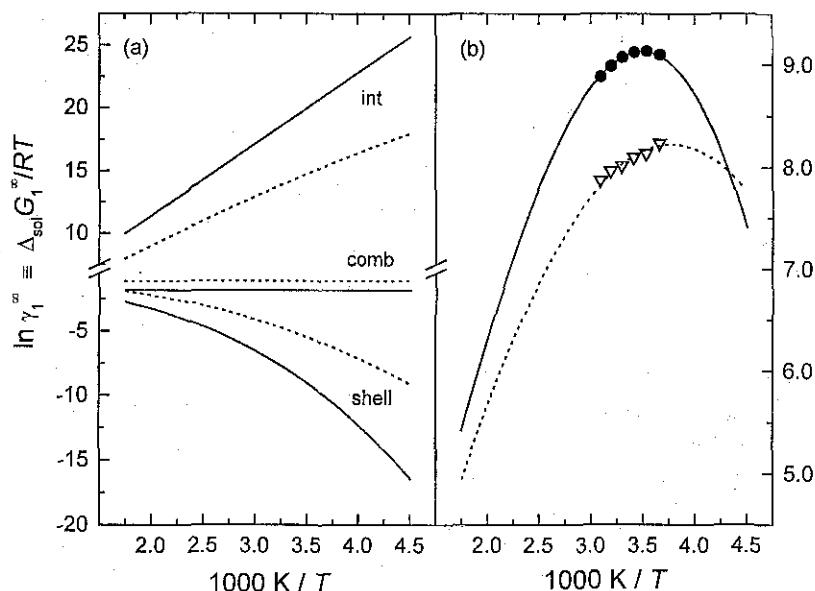


Fig. 6. The temperature dependence of the HSCE model contributions to the limiting activity coefficients  $\ln \gamma_1^\infty$  of toluene in water (●) and in an aqueous solution (5.0 mol/dm<sup>3</sup>) of guanidine (▽). In (a) the combinatorial (comb), interactional (int) and water alteration (shell) contributions were calculated using Eq. (4), Eq. (11) and Eq. (23), respectively, with the parameters in Table 2 and Table 3. Full lines are for the pure solvent water case and dotted lines for the (water + guanidine) mixed solvent case. The experimental data in (b) are from [16].

the following situation: there is a non-random distribution of water and denaturant molecules surrounding the solute, a distribution where denaturant molecules are preferentially in contact with the solute since the solute–denaturant interactions are energetically favored over the solute–water ones  $|\sigma_{13}| > |\sigma_{12}|$ . The  $\sigma_{13} - \sigma_{12}$  parameter is more negative for guanidine than for urea implying a more pronounced preferential solvation in the case of guanidine and in agreement with the  $\Delta_{13}$  values discussed above. From the  $\Delta_{12}$  values in Table 2 and the  $\Delta_{13}$  and  $\sigma_{13} - \sigma_{12}$  values in Table 3 for benzene and toluene, it is possible to calculate  $\sigma_{22} - \sigma_{33}$ , its value being between  $-17$  and  $-20$  kJ/mol. Hence, the cohesion between water molecules is much larger than that between denaturant molecules and it remains to be the dominant cause of the hydrophobic behavior of the non-polar solutes. The presence of the denaturant only partially attenuates the hydrophobic effect.

The water–denaturant interchange energies

$\Delta_{23}$  in Table 3 are negative for both urea and guanidine, indicating a favorable interaction. For binary mixtures (water + denaturant), negative  $\Delta_{23}$  values imply negative deviations from Raoult's law, a fact that contradicts the experimental data for water + urea [12] and water + guanidine [13,14], the latter exhibiting larger positive deviations. However, the  $\Delta_{23}$  values are relatively small so that this imperfection of the model is not significant; in fact, when Eq. (8) is used,  $\Delta_{23}$  for both urea and guanidine are positive. Also, since there is a rather weak sensitivity of  $\Delta_{sol} G_1^\infty / RT$  values to the  $\Delta_{23}$  parameter,  $\Delta_{23}$  values have a larger uncertainty than the other model parameters. The possible sources for the disagreement between the  $\Delta_{23}$  values in Table 3 and the experimental observations for the water–denaturant binary mixtures are: (i) the fact that the binary parameter  $\Delta_{23}$  was obtained here from ternary mixture data, a procedure that does not always yield reliable values; (ii) the simple equation to describe the mean energy of the water–de-

naturant interactions [Eq. (7)] is too crude and even unable to represent correctly the binary mixtures alone; and (iii) the fact that the model ignores the electrolyte nature of guanidine.

In a molecular simulation study [33], a negative Gibbs energy change was found for the process of approaching a benzene molecule and a urea (or guanidine) molecule both at infinite dilution in water. In the HSCE model, this process corresponds to the replacement of 1–2 and 2–3 interactions by 1–3 and 2–2 interactions. Associated with these replacements, there is a Gibbs energy change (per standard segment surface) given by  $\sigma_{13} + \sigma_{22} - \sigma_{12} - \sigma_{23}$ . In Table 3,  $\sigma_{13} - \sigma_{12}$  is negative indicating that benzene interacts more favorably with the denaturant than with water. The difference  $\sigma_{22} - \sigma_{23}$  cannot be explicitly evaluated from the thermodynamic information using the HSCE model. However, from the discussion presented above it is clear that the water–water interaction is stronger than the water–denaturant interaction and hence  $\sigma_{22} - \sigma_{23}$  is also negative.

Therefore, the HSCE model results are in agreement with the molecular simulation calculations.

The presence of a denaturant modifies quantitatively the three contributions to the solution Gibbs energy, as illustrated in Fig. 6a for the case of toluene in an aqueous guanidine solution.  $\Delta G^{int}$  is less positive than for the pure water solvent case, owing to the relatively favorable solute–denaturant interaction. On the other hand,  $\Delta G^{alt}$  becomes less negative due to the presence of the denaturant that reduces the number of water molecules in contact with the solute in other words, less water molecules undergo the alteration described by Eq. (13). The combinatorial contribution is also less negative, but its change respect to the pure water solvent case is quite small. Fig. 6b shows the total  $\Delta_{sol} G_1^{\infty}/RT$  together with the experimental results. As in the pure water solvent case, the HSCE model explains these experimental results and all those in Figs. 3–5 as the result of the balance between the two (combinatorial aside) opposite sign contribu-

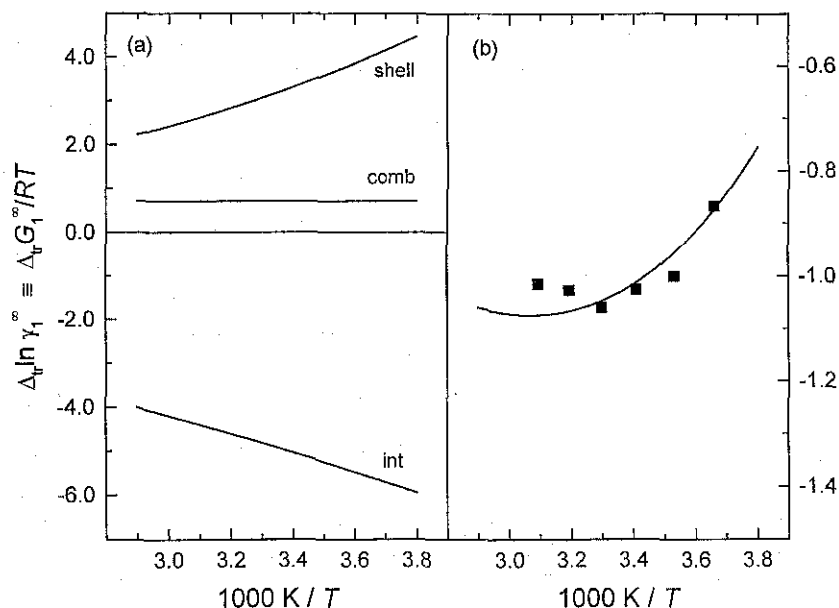


Fig. 7. The temperature dependence of the HSCE model contributions to the transfer limiting activity coefficients  $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^{\infty}$  of toluene in an aqueous solution (5.0 mol/dm<sup>3</sup>) of guanidine (■). In: (a) the combinatorial (comb), interactional (int) and water alteration (shell) contributions were calculated using Eq. (4), Eq. (11) and Eq. (23), respectively, and used in Eq. (25) with the parameters from Table 2 and Table 3. The experimental data in (b) are from [16].

tions. The increased solubility of a non-polar solute in aqueous solutions of denaturants (as compared to that in pure water) is due to the relatively favorable solute–denaturant interaction (as compared with the very unfavorable solute–water interaction). In this sense, the presence of the denaturant decreases the hydrophobic effect. This is more clearly seen with the transfer Gibbs energy  $\Delta_{tr}G_1^\infty$  which characterizes the process where the solute is transferred from water to aqueous denaturant solution. The  $\Delta_{tr}G_1^\infty$  values from Eq. (25) for toluene in an aqueous guanidine solution are plotted against temperature in Fig. 7a. Here, the interactional contribution is negative, i.e. favorable, and the combinatorial and the water-alteration contributions are positive, both unfavorable to the solute transfer. As seen in Fig. 7b the net  $\Delta_{tr}G_1^\infty$  is negative as a result of the interactional contribution overcoming the other two contributions. The results of the HSCE model in Fig. 7 provide a rationalization for the experimental  $\Delta_{tr}G_1^\infty$  values whose relevance for the

understanding of the unfolding process has been long realized [17,18].

The data in Fig. 5 possess a challenge to any model attempting to describe the solubilities of non-polar solutes in aqueous solutions of denaturants. According to Fig. 5, aqueous urea and guanidine solutions decrease the solubility of lower alkanes as compared to that in pure water, and this effect is a function of solute size and temperature. There is a threshold size at a given temperature and a threshold temperature at a given solute size for solubility enhancement. The HSCE model is useful to provide a rationalization of the data in Fig. 5. Using the parameters in Tables 1–3, the three contributions to  $\Delta_{tr}G_1^\infty$  are plotted in Fig. 8a for the lower alkanes in urea at 298.15 K and for ethane in urea as a function of temperature in Fig. 8b. In Fig. 8a, as the alkane size is reduced the  $(\Delta_{13} - \Delta_{12})$  parameter in Table 3 becomes less negative and correspondingly  $\Delta_{tr}G_1^{int}$  is reduced in magnitude; hence, in going from butane to methane the solute–denaturant

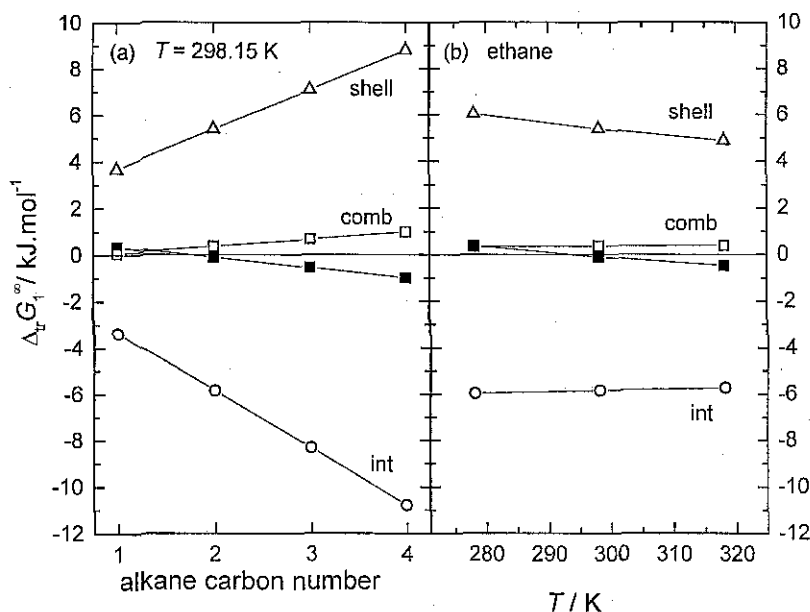


Fig. 8. The HSCE model contributions to the transfer Gibbs energy  $\Delta_{tr}G_1^\infty$  of: (a) the lower alkanes at 298.15 K as a function of alkane carbon number; and (b) ethane as a function of temperature.  $\Delta_{tr}G_1^\infty$  refers to solute transfer from pure solvent water to an aqueous solution of urea ( $7.0 \text{ mol}/\text{dm}^3$ ), the experimental data ( $\blacksquare$ ) being from [15]. The combinatorial (comb), interactional (int) and water alteration (shell) contributions were calculated using Eq. (4), Eq. (11) and Eq. (23), respectively, and used in Eq. (25) with the parameters from Table 2 and Table 3. Lines in (a) are only to aid visualization.

interaction is increasingly closer to the solute–water interaction. On the otherhand, the reduction in solute size decreases the number of water molecules undergoing the water alteration process and hence its contribution to the transfer Gibbs energy,  $\Delta_{tr}G^{alt}$ . At 298.15 K the solubility of methane in an aqueous solution of urea is lower than in pure water due to a large solute–urea dislike combined with a positive water alteration contribution that is dominant. In Fig. 8b, the temperature dependence of  $\Delta_{tr}G^{alt}$  (negative) is more pronounced than that of  $\Delta_{tr}G^{int}$  (positive). Then, at high temperatures  $\Delta_{tr}G^{int}$  dominates enhancing ethane solubility, while at low temperatures  $\Delta_{tr}G^{alt}$  is dominant, diminishing solubility.

### 3.3. Comparison with the modified hydration shell hydrogen bond model

In recent years, Muller has presented a modified hydration shell hydrogen bond (MHSHB) model to account for some thermodynamic properties of aqueous solutions of non-polar solutes [21,22]. This model was extended to deal with the effect on those properties due to the presence of a cosolvent (urea) [23]. Since the

HSCE and MHSHB models were developed to describe the same type of systems, it is important to assess here their similarities and differences. The main similarities are that both models: (i) are capable to describe the data to approximately the same level of quantitative agreement; (ii) consider that the first solvation shell around the solute plays a crucial role in determining the thermodynamic properties of the system; and (iii) require a solute–size dependence for the parameters involved in the interactional contribution, in order to rationalize the lower alkane transfer Gibbs energy data. The most important difference lies, as discussed below, in the nature of the contributions to the Gibbs energy of solution or transfer. In the MHSHB model  $\Delta_{sol}G_1^\infty$  is given by:

$$\Delta_{sol}G_1^\infty = \frac{3}{2}NRT(1 - \xi_3)\ln\frac{K_{hs}(1 + K_b)}{K_b(1 + K_{hs})} + x_3(\alpha N + \beta) + N\delta_{12} \quad (26)$$

where the equilibrium constants  $K_{hs} = \exp(-\Delta H_{hs}^0/RT + \Delta S_{hs}^0/R)$  and  $K_b = \exp(-\Delta H_b^0/RT + \Delta S_b^0/R)$  refer to the equilibrium between intact and broken water hydrogen bonds in the hydration shell and the bulk, respec-

Table 4  
The MHSHB model parameters for alkane and alkylbenzene solutes in water and aqueous modifier solutions<sup>a</sup>

Solute series <sup>b</sup>	$\Delta H_{hs}^0$ J·mol <sup>-1</sup>	$\Delta S_{hs}^0$ J·mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	solute (1)	$\delta_{12}$ J·mol <sup>-1</sup>	modifier (3)	$\alpha^c$ J·mol <sup>-1</sup>	$\beta^c$ J·mol <sup>-1</sup>	$s_{rel}$ %
Alkylbenzenes	10288 <sup>c</sup>	25.32 <sup>c</sup>	benzene	2 <sup>c</sup>	urea	765.8	–	3.5
					guanidine	601.1	–	3.5
			toluene	18 <sup>c</sup>	urea	734.3	–	3.8
					guanidine	548.3	–	3.5
Alkanes	10696 <sup>d</sup>	27.36 <sup>d</sup>	nC <sub>1</sub> –nC <sub>4</sub>	–	urea	809.5 (789)	14754 (14800)	4.2
					guanidine	333.9	24381	7.9
			nC <sub>5</sub> ,nC <sub>6</sub> ,cC <sub>6</sub>	–42 <sup>f</sup>				

<sup>a</sup>Water bulk parameters  $\Delta H_b^0 = 9800$  J·mol<sup>-1</sup>,  $\Delta S_b^0 = 21.6$  J·mol<sup>-1</sup>·K<sup>-1</sup> from [21]. Modifier surface fraction,  $\xi_3$ , calculated as given in [23],  $\xi_3 = 1.85x_3/(x_2 + 1.85x_3)$ .

<sup>b</sup>Number of water molecules ( $N$ ) surrounding each solute are: benzene, 26.7; toluene, 30.4; methane, 16.9; ethane, 21.3; propane, 24.8 and butane, 28.4 from [23].

<sup>c</sup>Obtained in this work. Fitted to  $\gamma_1^\infty$  in pure water solvent from [16],  $s_{rel} = 0.7\%$ .

<sup>d</sup>From [21].

<sup>e</sup>Obtained in this work. For alkylbenzenes fitted to  $\gamma_1^\infty$  from [16] and for alkanes fitted to  $\gamma_1^\infty$  (in mixed solvent)/ $\gamma_1^\infty$  (in water) from [15]. Values in parentheses are those from [23].

<sup>f</sup>Obtained in this work. Fitted to  $x_1^{sol}$  in pure water solvent from [20],  $s_{rel} = 16\%$ .

tively. In Eq. (26),  $N$  is the number of water-molecules surrounding the solute,  $x_3$  is the mole fraction of denaturant and  $\xi_3$  is, as in the HSCE model, the surface fraction of the hydration shell occupied by the denaturant. In the MHSB model,  $\xi_3$  is calculated as indicated in Table 4, assuming a random distribution of water and denaturant molecules around the solute. The logarithmic factor in the first term of Eq. (26) accounts for the changes, due to the presence of the solute, in the population of broken and intact hydrogen bonds. The MHSB model assumes that the denaturant interferes little with water–hydrogen bonding and acts simply by preempting space in the solvation shell around the solute that would otherwise accommodate water molecules. The second and third terms in Eq. (26) are the interactional contributions to the Gibbs energy. The second term, whose solute size dependence is described by two adjustable parameters,  $\alpha$  and  $\beta$ , is due to solute–denaturant and water–denaturant van der Waals forces. In [23] the MHSB model was presented for the

transfer Gibbs energy. In order to calculate the corresponding solution Gibbs energy, it is necessary to consider the third term in Eq. (26). This term accounts for the interaction between the solute and water molecules, characterized by  $\delta_{12}$ , and cancels out when Eq. (26) is used to obtain the transfer Gibbs energy. Table 4 reports the MHSB model parameters for the lower alkanes (methane to butane) and for benzene and toluene in pure solvent water and in aqueous solutions of urea and guanidine. The source of each parameter, either [23] or evaluated in this work, is indicated in Table 4.

Fig. 9 shows the results from the MHSB model for benzene in a pure water solvent and in an aqueous solution of urea. Fig. 9a displays the contributions to the solution Gibbs energy according to Eq. (26), namely those due to water hydrogen bonding (first term) and due to van der Waals forces (second and third terms). Both contributions are positive and hence in the MHSB model the experimental  $\Delta_{sol} G_1^\infty/RT$  values in Fig. 9b are the result of two additive unfavorable

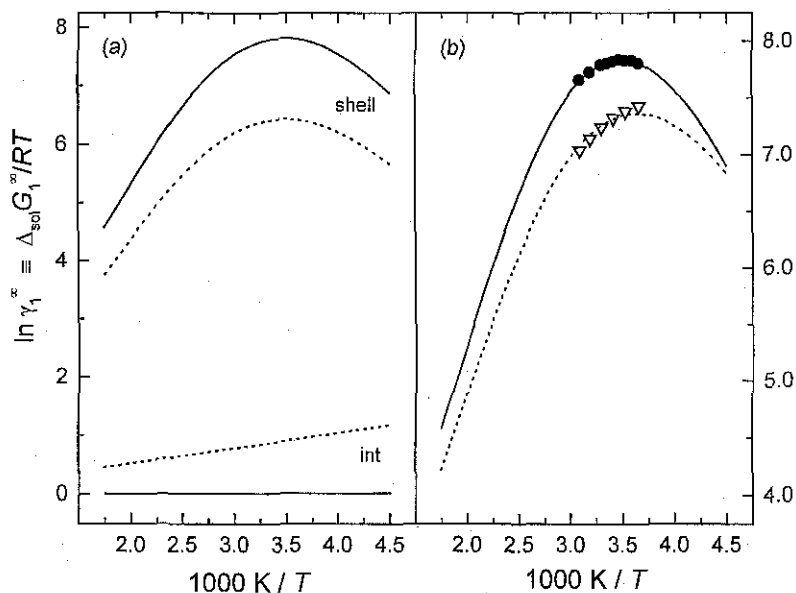


Fig. 9. Temperature dependence of the MHSB model contributions to the limiting activity coefficients  $\ln \gamma_1^\infty$  of benzene in water (●) and in an aqueous solution (5.0 mol/dm<sup>3</sup>) of urea (▽). In (a) the interactional (int) and hydrogen bonding (shell) contributions were calculated using Eq. (26) with the parameters in Table 4. Full lines are for the pure solvent water case and dotted lines for the (water + urea) mixed solvent case. The experimental data in (b) are from [16].

contributions, in contrast with the situation in the HSCE model in Fig. 6 where a favorable contribution and an unfavorable one compete. For pure water solvent, the interactional contribution is very small while the hydrogen bonding contribution is large and accounts for practically all the experimental  $\Delta_{sol}G_1^\infty/RT$  and its temperature dependence. When urea is present, Fig. 9a indicates that the hydrogen bonding contribution becomes less positive owing to the presence of less water molecules in the solvation shell around the solute. However, the interactional contribution becomes more positive. This implies that in the MHSHB model the presence of the denaturant produces a medium that interacts more unfavorably with the solute than the pure water solvent. This is not a physically plausible situation. This drawback of the MHSHB model is not a peculiarity of its application to alkylbenzenes in aqueous solutions of denaturants data, neither a consequence of our fitting of the model parameters. Instead, it reflects a general behavior of the MHSHB model. While for benzene and toluene the solute–water interaction is practically zero,

for alkane solutes the solute–water interaction term in  $\Delta_{sol}G_1^\infty$  is even negative, i.e. favorable (see Table 4). Again, this is difficult to accept as a realistic physical result. It appears that although the MHSHB model is able to describe quantitatively the experimental data, it is not free of inconsistencies and conceptual problems.

### 3.4. Other thermodynamic functions

The high accuracy of the solution Gibbs energy data reported in [16] allowed their extrapolation above the experimental temperature range (273–323 K), and the calculation of solution enthalpies and entropies with a reasonable degree of confidence. This extrapolation and calculations were performed using the correlation functions obtained from the data under the assumption of a temperature independent solution heat capacity [16]. Fig. 10a shows the experimental  $\Delta_{sol}G_1^\infty$ ,  $\Delta_{sol}H_1^\infty$  and  $-T\Delta_{sol}S_1^\infty$  for benzene in pure water solvents and in an aqueous solution of urea, while Fig. 10b displays the results from the HSCE model. The comparison between the two panels

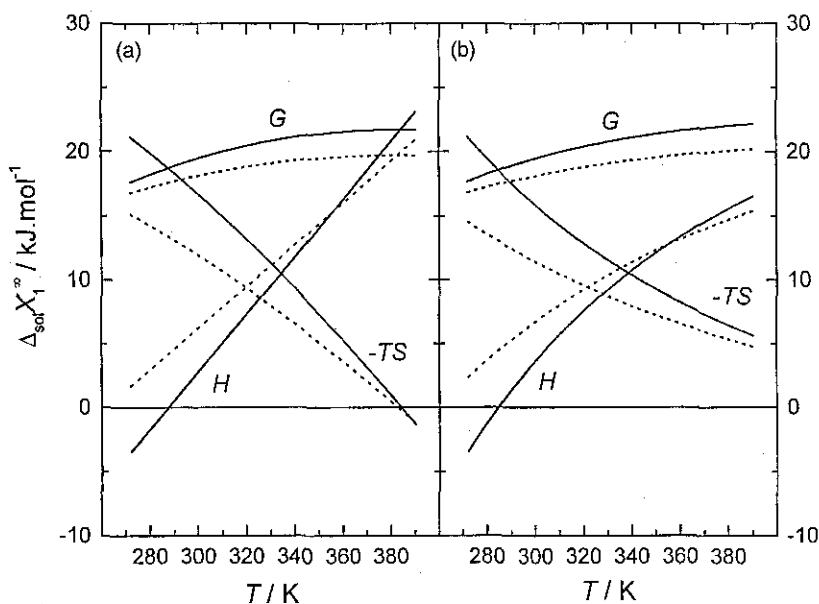


Fig. 10. Thermodynamic functions of solution at infinite dilution,  $\Delta_{sol}X_1^\infty$  ( $X = G, H, -TS$ ), for benzene in pure water (full lines) and in an aqueous solution ( $5.0 \text{ mol/dm}^3$ ) of urea (dotted lines), as a function of temperature. Curves in (a) are experimental from [16] and those in (b) are HSCE model calculations.

in Fig. 10 indicates that the HSCE model is able to reproduce the main features of the experimental results. Fig. 10 shows that within the 273–390 K temperature range,  $\Delta_{sol}G_1^\infty$  changes by approximately 15%, but its enthalpic and entropic contributions change drastically. At low temperatures, the entropic contribution to  $\Delta_{sol}G_1^\infty$  is dominant, while at high temperatures,  $\Delta_{sol}G_1^\infty$  is dominated by its enthalpic contribution. In other words, the low solubility or hydrophobicity of benzene in pure water and in an aqueous solutions of urea, is due to an entropic effect at low temperatures and to an enthalpic effect at high temperatures. In this context, it is important to mention that the calculated solution heat capacities at infinite dilution,  $\Delta_{sol}C_{P1}^\infty$ , for benzene and toluene in pure water solvent show a stronger temperature dependence than experimentally observed [42]. In pure water solvent,  $\Delta_{sol}C_{P1}^\infty = T(\partial\Delta_{sol}S_1^\infty/\partial T) = -T(\partial^2\Delta G^{alt}/\partial T^2)$  is only due to the structural alteration of water molecules in the first solvation shell around the solute. Hence, a possible source for the unsatisfactory  $\Delta_{sol}C_{P1}^\infty$  temperature dependence in the HSCE model is having ignored the change in Gibbs energy involved in the spatial alignment (prior to the establishment of the interaction described by Eq. (11)) of water molecules over the solute surface, as shown in Fig. 1. Nevertheless, in a global balance between achievements and drawbacks, the HSCE model provides a consistent and meaningful scheme to interpret, at the molecular level, the experimental observations for non-polar solutes in water and in aqueous solutions of denaturants.

### Acknowledgements

We thank Alejandro Fernández, Edgar Vázquez, Armando Gómez-Puyou and Marietta Tuena for their useful comments and fruitful discussions. E.C-N. thanks the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and Fundación UNAM for financial support. This work was funded by a Czech–Mexican scientific cooperation project (Ministry of Education of the

Czech Republic, grants ME 237 and MSM 2234 00008, and CONACyT), the PAPIIT program (DGAPA-UNAM, grant IN112198) and CONACyT research project program (grant E 27986).

### Appendix A: Relationship between the HSCE model and the two-state relaxation model

In [35], it was considered that  $N$  water molecules in the first hydration shell around the solute undergo a relaxation process that was described using a two-state model. The Gibbs energy for the relaxation process  $\Delta G^{rlx}$ , i.e. for the process where unrelaxed water molecules (initial state) are transformed into an equilibrium mixture of relaxed and unrelaxed water molecules (final state) is given by:

$$\Delta G^{rlx} = NRT \ln[1 + \exp((\Delta h/R)(1/T - 1/T_m))] \quad (\text{A.1})$$

where  $\Delta h$  is the energy difference between the two energy states and  $T_m$  is the temperature at which both states are equally populated. Eq. (A.1) differs from Eq. (2) in [35] since in obtaining the latter the process (relaxed water to equilibrium mixture) was wrongly considered. The passage of water molecules from the unrelaxed state to the relaxed state is characterized by an equilibrium constant that, using Eq. (1.8) in [35] for the fraction of water molecules at each energy level, is given by:

$$K = \exp((\Delta h/R)(1/T - 1/T_m)) \quad (\text{A.2})$$

Substitution of Eq. (A.2) into Eq. (A.1) yields Eq. (21) in the text. It appears that the structural changes occurring to water molecules in the first solvation shell around the solute are equivalently described by the water alteration reaction, Eq. (13), or by the relaxation process modeled in [35]. The relationship between the parameters in the HSCE model and those in the two-state description are easily found as:

$$\Delta H^0 = -\Delta h \quad (\text{A.3})$$

and

$$\ln K_{298} = (\Delta h/R)(1/298.15 - 1/T_m) \quad (\text{A.4})$$

## References

- [1] C.N. Pace, B.A. Shirley, J.A. Thomson, Measuring the conformational stability of a protein, in: T.E. Creighton (Ed.), *Protein Structure. A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1989.
- [2] J.A. Schellman, A simple model for solvation in mixed solvents. Applications to the stabilization and destabilization of macromolecular structures, *Biophys. Chem.* 37 (1990) 121–140.
- [3] J.A. Schellman, N.C. Gasner, The enthalpy of transfer of unfolded protein into solutions of urea and guanidinium chloride, *Biophys. Chem.* 59 (1996) 259–275.
- [4] T. Arakawa, S.N. Timasheff, Protein stabilization and destabilization by guanidinium salts, *Biochemistry* 23 (1984) 5924–5929.
- [5] S.N. Timasheff, Water as a ligand: preferential binding and exclusion of denaturants in protein unfolding, *Biochemistry* 31 (1992) 9857–9864.
- [6] Y. Kita, T. Arakawa, T.-Y. Lin, S.N. Timasheff, Contribution of surface free energy perturbation to protein–solvent interactions, *Biochemistry* 33 (1994) 15178–15189.
- [7] G.I. Makhatadze, P.L. Privalov, Protein interactions with urea and guanidinium chloride. A calorimetric study, *J. Mol. Biol.* 226 (1992) 491–505.
- [8] D.O.V. Alonso, K.A. Dill, Solvent denaturation and stabilization of globular proteins, *Biochemistry* 30 (1991) 5974–5985.
- [9] Q. Zou, S.M. Habermann-Rottinghaus, K.P. Murphy, Urea effects on protein stability: hydrogen bonding and the hydrophobic effect, *Proteins* 31 (1998) 107–115.
- [10] J.-W. Wu, Z.-X. Wang, New evidence for the denaturant binding model, *Protein Sci.* 8 (1999) 2090–2097.
- [11] J. Hernandez-Cobos, I. Ortega-Blake, M. Bonilla-Marin, M. Moreno-Bello, A refined Monte Carlo study of aqueous urea solutions, *J. Chem. Phys.* 99 (1993) 9122–9134.
- [12] R.H. Stokes, Thermodynamics of aqueous urea solutions, *Austral. J. Chem.* 20 (1967) 2087–2100.
- [13] O.D. Bonner, The osmotic and activity coefficients of some guanidinium salts at 298.15 K, *J. Chem. Thermodyn.* 8 (1976) 1167–1172.
- [14] G.I. Makhatadze, J. Fernandez, E. Freire, T.H. Lilley, P.L. Privalov, Thermodynamics of aqueous guanidinium hydrochloride solutions in the temperature range from 283.15 to 313.15 K, *J. Chem. Eng. Data* 38 (1993) 83–87.
- [15] D.B. Wetlaufer, S.K. Malik, L. Stoller, R.L. Coffin, Non-polar group participation of proteins by urea and guanidinium salts. Model compound studies, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 508–514.
- [16] S. Hovorka, V. Dohnal, M. Costas, E. Carrillo-Nava, Infinite dilution activity coefficients for benzene and toluene in water and in aqueous solutions of the protein denaturants urea and guanidine hydrochloride, *J. Chem. Thermodyn.* 32 (2000) 1683–1705.
- [17] C. Tanford, Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins, *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962) 4240–4247.
- [18] C. Tanford, Isothermal unfolding of globular proteins in aqueous urea solutions, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 2050–2059.
- [19] S.J. Gill, N.F. Nichols, I. Wadsö, Calorimetric determination of enthalpies of solution of slightly soluble liquids. II. Enthalpy of solution of some hydrocarbons in water and their use in establishing the temperature dependence of their solubilities, *J. Chem. Thermodyn.* 8 (1976) 445–452.
- [20] D.G. Shaw, M.-C. Haulait-Pirson, G.T. Hefter et al. Hydrocarbons with water and seawater. Part I: Hydrocarbons C5 to C7. IUPAC Solubility Data Series, vol. 37, Pergamon Press, Oxford, 1989.
- [21] N. Muller, Is there a region of highly structured water around a non-polar solute molecule? *J. Solution Chem.* 17 (1988) 661–672.
- [22] N. Muller, Search for a realistic view of hydrophobic effects, *Acc. Chem. Res.* 23 (1990) 23–28.
- [23] N. Muller, A model for the partial reversal of hydrophobic hydration by addition of a urea-like cosolvent, *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 3856–3859.
- [24] H.S. Frank, M.W. Evans, Free volume and entropy in condensed systems. III. Entropy in binary liquid mixtures, partial molal entropy in dilute solutions, structure and thermodynamics in aqueous electrolytes, *J. Phys. Chem.* 13 (1945) 507–532.
- [25] H.S. Frank, W.-Y. Wen, Structural aspects of ion-solvent interaction in aqueous solution. A suggested picture of water structure, *Discuss. Faraday Soc.* 24 (1957) 133–140.
- [26] G. Nemethy, H.A. Scheraga, Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. II. Model for the thermodynamic properties of aqueous solutions of hydrocarbons, *J. Chem. Phys.* 36 (1962) 3401–3417.
- [27] D.N. Glew, Aqueous solubility and the gas-hydrates. The methane–water system, *J. Phys. Chem.* 66 (1962) 3401–3417.
- [28] A. Hvidt, The solubility of hydrocarbons in water, *Acta Chem. Scand. Ser. A* 37 (1983) 99–103.
- [29] A. Wallquist, Molecular dynamics study of a hydrophobic aggregate in an aqueous solution of methane, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 8921–8927.
- [30] D.S. Abrams, J.M. Prausnitz, Statistical thermodynamics of liquid mixtures: a new expression for the excess Gibbs energy of partly or completely miscible systems, *AIChE J.* 21 (1975) 116–128.
- [31] A. Fredenslund, R.L. Jones, J.M. Prausnitz, Group-contribution estimation of activity coefficients in non-ideal liquid mixtures, *AIChE J.* 21 (1975) 1086–1099.
- [32] A. Bondi, *Physical Properties of Molecular Crystals, Liquids and Glasses*, Wiley, New York, 1968.



- [33] E.M. Duffy, P.J. Kowalczyk, W.L. Jorgensen, Do denaturants interact with aromatic hydrocarbons in water? *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 9271–9275.
- [34] S. Swaminathan, B.M. Craven, R.K. McMullan, The crystal structure and thermal motion of urea at 12, 60 and 123 K from neutron diffraction, *Acta Cryst. B* 40 (1984) 300–306.
- [35] M. Costas, B. Kronberg, R. Silveston, General thermodynamic analysis of the dissolution of non-polar molecules into water, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 90* (1994) 1513–1522.
- [36] G.M. Wilson, A new expression for the excess free energy of mixing, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 127–130.
- [37] S. Susuki, P.G. Green, R.E. Bumgarner, S. Dasgupta, W.A. Goddard III, G.A. Blake, Benzene forms hydrogen bonds with water, *Science* 257 (1992) 942–945.
- [38] J.L. Atwood, F. Hamada, K.D. Robinson, G.W. Orr, R.L. Vincent, X-Ray diffraction evidence for aromatic  $\pi$  hydrogen bonding to water, *Nature* 349 (1991) 683–684.
- [39] M. Levitt, M.W. Perutz, Aromatic rings act as hydrogen bond acceptors, *J. Mol. Biol.* 201 (1988) 751–754.
- [40] M. Costas, B. Kronberg, Thermodynamics of aliphatic and aromatic hydrocarbons in water, *Biophys. Chem.* 74 (1998) 83–87.
- [41] W. Loh, A.E. Beezer, J.C. Mitchel, Thermochemical investigation of possible interactions between urea and some sparingly soluble solutes in aqueous solution, *Thermochim. Acta* 255 (1995) 83–91.
- [42] G.I. Makhatadze, P.L. Privalov, Partial specific heat capacity of benzene and of toluene in aqueous solution determined calorimetrically for a broad temperature range, *J. Chem. Thermodyn.* 20 (1988) 405–412.

## 5.2. Tolueno en disoluciones acuosas de estabilizantes de proteínas

En esta sección se discute el trabajo realizado en el empleo del modelo HSCE a los resultados experimentales de los coeficientes de actividad a dilución infinita del tolueno en disoluciones acuosas de glicerol, etilenglicol, sacarosa, glucosa y trehalosa (sección 4.2).

### 5.2.1. Tolueno en disoluciones acuosas de glicerol

Siguiendo la metodología empleada para el caso de benceno y tolueno en disoluciones acuosas de urea y cloruro de guanidina (sección 5.1), se ajustaron los parámetros  $\Delta_{13}$ ,  $\Delta_{23}$  y  $n_{rp}$  de manera simultánea a las cuatro curvas de solubilidad de tolueno en las distintas concentraciones de glicerol (0.5, 1.5, 3.0 y 5.0 M). El valor del parámetro  $\Delta_{12}$  no fue determinado, pues se tomó el valor obtenido del estudio previo *i.e.*,  $\Delta_{12} = 15980 \text{ J mol}^{-1}$ . El ajuste se realizó en dos etapas, la primera consistió en determinar inicialmente los parámetros  $\Delta_{13}$  y  $\Delta_{23}$ . Una vez establecidos sus valores, se ajustó el parámetro  $n_{rp}$ . Al igual que en el caso de benceno y tolueno en disoluciones acuosas de urea y cloruro de guanidina (sección 5.1), se evaluó de que manera el modelo describe mejor los resultados experimentales *i.e.*, considerando si existe ( $n_{rp} \neq 0$ ) o no ( $n_{rp} = 0$ ) una preferencia del soluto por rodearse de moléculas del modificador o de agua. Los resultados obtenidos de estas exploraciones revelaron que el modelo describe mejor a los resultados experimentales al considerar que sí existe una preferencia del soluto por rodearse preferencialmente por moléculas de glicerol (valores negativos de  $n_{rp}$ ). Este desempeño del modelo también fue observado para el benceno y el tolueno en disoluciones acuosas de urea y cloruro de guanidina, en donde los modificadores también rodean preferencialmente a los solutos. En la tabla 5.2.1 se presentan únicamente los resultados obtenidos para el caso  $n_{rp} \neq 0$ , y donde se propone que el modificador se orienta de manera que la interacción tolueno – glicerol es vía dos átomos de hidrógeno ( $Q_m = 0.305$ , ver apéndice C). Esta orientación describe de mejor manera los resultados experimentales.

Es útil e ilustrativo comparar los parámetros obtenidos para glicerol con los obtenidos para urea y cloruro de guanidina (ver tabla 5.2.1). Obsérvese primero que los valores de  $\Delta_{13}$  siguen el orden esperado: cloruro de guanidina < urea < glicerol *i.e.*, la interacción soluto – modificador es más favorable en el caso de cloruro de guanidina (valor más chico de  $\Delta_{13}$ ). Este orden corresponde al observado experimentalmente en la solubilidad de tolueno en las soluciones acuosas de esos tres modificadores. Los valores de  $n_{rp}$  en la tabla 5.2.1 implican que, a pesar de que las interacciones tolueno – glicerol son las más desfavorables

Parámetro	Glicerol	Urea <sup>a</sup>	Cloruro de guanidina <sup>a</sup>
$Q_m$	0.305	0.244	0.244
$\Delta_{13}$	$6224 \pm 47$	6012	4163
$\Delta_{23}$	$-1713 \pm 74$	-600	-1970
$n_{rp}$	$-3266 \pm 105$	-1480	-1760
$\chi^2$	0.00039	-	-

<sup>a</sup> Valores reportados en Biophys. Chem., 74, 183 – 202 (2001)

**Tabla 5.2.1:** Valores de los parámetros  $\Delta_{13}$ ,  $\Delta_{23}$  y  $n_{rp}$  obtenidos del ajuste simultáneo del modelo HSCE a las curvas de solubilidad de tolueno en soluciones acuosas de glicerol.

(valores de  $\Delta_{13}$  en la tabla 5.2.1), el glicerol es el modificador que rodea al tolueno de manera preferencial, en comparación con la urea y el cloruro de guanidina. Para entender el origen de este comportamiento, partimos de las definiciones de  $n_{rp}$  ( $n_{rp} = \sigma_{13} - \sigma_{12}$ ) y  $\Delta_{13}$  (ecuación 12, sección 5.1) para obtener

$$n_{rp} = \Delta_{13} + \frac{1}{2}\sigma_{33} + \left(\frac{1}{2}\sigma_{11} - \sigma_{12}\right) , \quad (5.2.1)$$

en donde es clara la relación entre  $n_{rp}$  y  $\Delta_{13}$ . Para todos los modificadores (urea, cloruro de guanidina y glicerol) el último término de la ecuación (5.2.1) es constante, ya que sólo refleja las interacciones soluto – soluto ( $\sigma_{11}$ ) y soluto – agua ( $\sigma_{12}$ ). Las interacciones modificador – modificador están contenidas en el parámetro  $\sigma_{33}$ , y en principio el valor de  $\sigma_{33}$  debe ser más negativo (más favorable) para glicerol en comparación con urea y guanidina, debido a que estos compuestos deben de ser líquidos asociados a través de puentes de hidrógeno. Esto quiere decir, que la relación entre  $n_{rp}$  y  $\Delta_{13}$  depende de la energía de cohesión del modificador, de ahí que el glicerol presente un valor mayor que los otros dos modificadores.

### 5.2.2. Tolueno en disoluciones acuosas de glicerol, etilenglicol, sacarosa, glucosa y trehalosa

Para ajustar simultáneamente los tres parámetros  $\Delta_{13}$ ,  $\Delta_{23}$  y  $n_{rp}$ , es necesario contar con varias curvas de solubilidad para distintas concentraciones de modificador. Para los modificadores etilenglicol, sacarosa, glucosa y trehalosa desafortunadamente sólo tenemos una curva de solubilidad, por lo que no podemos describir de manera confiable el efecto hidrófobo con el modelo HSCE. Esto es claro debido a que los parámetros  $\Delta_{13}$  y  $\Delta_{23}$  determinan la dependencia cuadrática de la concentración, de la cual sólo poseemos un punto *i.e.*, sólo poseemos datos experimentales para cada disolución acuosa a una sola

concentración, 1.5 M y 0.5 para el caso de trehalosa. Por esta razón, no es posible obtener valores confiables para los parámetros  $\Delta_{13}$ ,  $\Delta_{23}$  y  $nnp$ . Aún así, estamos interesados en poder explorar el desempeño del modelo con los resultados experimentales que poseemos. Para ello, una estrategia adecuada es reducir el número de variables para realizar los ajustes. El establecer el valor del parámetro  $\Delta_{23}$  para los distintos modificadores fue nuestro objetivo. A partir de nuestro conocimiento del comportamiento de las disoluciones binarias [agua + glicerol] y [agua + etilenglicol], pudimos calcular el valor de  $\Delta_{23}$ . Sabemos que estas disoluciones tienen un comportamiento casi ideal,<sup>76</sup> de manera que podemos suponer que las moléculas de agua que rodean a estos modificadores no se ven afectadas y no sufren una "reacción química" en donde existe un equilibrio entre dos especies de agua. Al igualar la expresión para  $\ln \gamma_1^\infty$  del modelo HSCE con la ecuación propuesta por el modelo NRTL es posible calcular el parámetro  $\Delta_{23}$ . Para los azúcares consideramos que las disoluciones binarias [agua + azúcar] se comportan de manera ideal, esto quiere decir que el valor del parámetro  $\Delta_{23}$  para estos sistemas es cero *i.e.*, la energía de interacción es la misma entre las moléculas de agua y del modificador.

Parámetro <sup>a</sup>	Glicerol 1.5 M	Etilenglicol 1.5 M	Glucosa 1.5 M	Sacarosa 1.5 M	Trehalosa 0.5 M
$\Delta_{23}$	191	1140	0	0	0
$\Delta_{13}$	7410 ± 65	8317 ± 94	7637 ± 52	7259 ± 64	7497 ± 61
$nnp$	-2746 ± 118	-2509 ± 120	-3867 ± 134	-5814 ± 196	-5744 ± 131
$\chi^2$	$9 \times 10^{-5}$	$2.4 \times 10^{-4}$	$2.1 \times 10^{-4}$	$8.3 \times 10^{-4}$	$1.4 \times 10^{-4}$

<sup>a</sup>  $Q_m = 0.305$

Tabla 5.2.2: Valores de los parámetros  $\Delta_{13}$  y  $nnp$  obtenidos del ajuste individual del modelo HSCE a las curvas de solubilidad de tolueno en disoluciones acuosas de glicerol, etilenglicol, sacarosa, glucosa y trehalosa.

En la Tabla 5.2.2 se presentan los resultados del ajuste a los parámetros  $\Delta_{13}$  y  $nnp$ , bajo la suposición adicional que todos los modificadores están orientados de tal forma que interactúan con el soluto a través de dos átomos de hidrógeno, *i.e.*  $Q_m = 0.305$ . Podemos ver que los valores del parámetro  $\Delta_{13}$  son semejantes para los distintos modificadores y que tienen incertidumbres menores al 1.5 %, resultado de fijado un parámetro ( $\Delta_{23}$ ). El parámetro  $nnp$  para los distintos modificadores posee valores numéricos que indican que la solvatación preferencial del tolueno es favorable en el caso de aquellos modificadores que poseen un mayor número de grupos  $-OH$ , *i.e.* los azúcares sobre los polióles. Es

<sup>76</sup> A. Maczyński, Z. Maczyńska. *Thermodynamical Data for Technology. Series A. Verified Vapor-Liquid Equilibrium Data. Vol. 5 Binary One-Liquid Systems of Water and Organic Compounds.* Polish Scientific Publishers, PWN: Warszawa (1981).

importante resaltar que cuando realizamos el ajuste de los parámetros  $\Delta_{13}$  y  $n_{rp}$  a partir del ajuste individual de las curvas de solubilidad de tolueno en disoluciones acuosas de glicerol, etilenglicol, sacarosa, glucosa y trehalosa, los resultados que obtenemos no son los correctos para describir la dependencia de  $\ln \gamma_1^\infty$  con la concentración de modificador. A pesar de ello, pueden dar una idea del desempeño general del modelo aun cuando la información experimental requerida para su evaluación completa es inexistente.

## Capítulo 6

### Conclusiones

Debido a la naturaleza de este trabajo, las conclusiones se encuentran divididas en dos áreas. Un conjunto de conclusiones se refieren al análisis realizado desde la perspectiva de la termodinámica clásica sobre la baja solubilidad de los solutos no polares benceno y tolueno en agua, y en disoluciones acuosas de los modificadores empleados. Un segundo conjunto de conclusiones son el resultado del análisis del mismo fenómeno pero ahora desde una perspectiva a nivel molecular.

#### 6.1. Análisis termodinámico clásico

De la determinación experimental de los  $\gamma_1^\infty$  del benceno y el tolueno en agua y en disoluciones acuosas de los modificadores urea, cloruro de guanidina, glicerol, etilenglicol, sacarosa, glucosa y trehalosa; y del posterior análisis termodinámico de los datos obtenidos podemos concluir:

- Los  $\gamma_1^\infty$  (y por lo tanto la solubilidad) del benceno y el tolueno en agua tienen una dependencia importante con la temperatura. Su valor se incrementa con temperatura cuando viajamos de la temperatura de congelamiento hacia la temperatura de ebullición del agua, presenta un máximo (mínimo en solubilidad) en los alrededores de la temperatura ambiente, para disminuir al seguir aumentando la temperatura.
- La solubilidad de estos solutos se ve afectada por la presencia de un modificador.
  1. Los modificadores urea, cloruro de guanidina y glicerol producen un decremento significativo en los valores de los  $\gamma_1^\infty$  (incremento en la solubilidad). Este efecto es más evidente al aumentar la concentración del modificador en la disolución acuosa. Al comparar cloruro de guanidina, urea y glicerol, el primero provoca el mayor efecto en los valores de los  $\gamma_1^\infty$  y el último el menor efecto.
  2. En el caso del modificador glucosa a una concentración 1.5 M, su presencia aumenta el valor de  $\gamma_1^\infty$  *i.e.*, disminuye la solubilidad del tolueno. Mientras que el etilenglicol a la misma concentración provoca una disminución en  $\gamma_1^\infty$  *i.e.*, un aumento en la solubilidad del soluto.
  3. Para el glicerol y sacarosa a una concentración de 1.5 M y de 0.5 M para el caso de trehalosa, se observan regiones de temperatura en donde la presen-

cia del modificador incrementa  $\gamma_1^\infty$  (disminuye la solubilidad del tolueno) y otras en las que disminuye  $\gamma_1^\infty$  (aumenta la solubilidad).

- Al realizar el análisis termodinámico de los valores de  $\gamma_1^\infty$  en el intervalo de temperatura de la determinación experimental, encontramos que a bajas y altas temperaturas las contribuciones entálpicas y entrópicas a la energía libre de Gibbs de transferencia del soluto no polar compiten entre si. A bajas temperaturas es la contribución entrópica la que gobierna la solubilidad del soluto, mientras que a altas temperaturas es la contribución entálpica la que promueve la solubilidad.

## 6.2. Análisis termodinámico molecular

Los resultados obtenidos al emplear el modelo HSCE para analizar los valores de  $\gamma_1^\infty$  de benceno y tolueno en agua y en disoluciones acuosas de distintos modificadores podemos concluir:

- El modelo HSCE es un modelo molecular sencillo capaz de describir las dependencias con temperatura y concentración de modificador de la energía de Gibbs de disolución y transferencia del benceno, tolueno y algunos alcanos en agua y en disoluciones acuosas de urea, cloruro de guanidina y glicerol.
- El modelo HSCE es un modelo teórico de la categoría de los modelos de mezcla. La caracterización de los dos estados posibles de las moléculas de agua mediante una pseudo reacción química, le permite al modelo describir la dependencia con la temperatura de los parámetros termodinámicos. En particular, el modelar el máximo en  $\gamma_1^\infty$  o el mínimo en solubilidad, es una característica que pocos modelos son capaces de describir.
- El efecto hidrofóbico que presentan los solutos no polares en agua, no es más que la manifestación del hecho de que las moléculas de agua poseen una alta energía de cohesión. Las moléculas de agua excluyen a los solutos no polares de su arreglo espacial, lo cual produce la baja solubilidad de este tipo de moléculas en agua y disoluciones acuosas *i.e.*, las interacciones agua – soluto no polar son muy poco favorables.
- Las interacciones agua – modificador también son poco favorables pero en comparación con las interacciones agua – soluto, éstas son más favorables. La presencia de los modificadores en las disoluciones acuosas favorecen la solubilidad del soluto no polar al reducir el número de interacciones entre el agua y el soluto.

### 6.3. Relación entre los resultados en sistemas modelo y la estabilización – desestabilización de proteínas

El modelar la desnaturalización de las proteínas globulares, como la exposición de grupos no polares del interior de la misma hacia el medio acuoso, nos permite explicar la habilidad de varios disolventes para promover la desnaturalización de las proteínas. Durante los últimos años se han realizado estudios para conocer como los grupos químicos presentes en las proteínas, se involucran en el proceso de la desnaturalización. Estos estudios se han realizado a partir de la determinación de los coeficientes de actividad de compuestos modelo, representativos de los distintos grupos presentes en las proteínas en distintos disolventes por ejemplo, electrolitos sencillos, urea y cloruro de guanidina. Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que los modificadores urea y cloruro de guanidina son capaces de promover la solubilidad de los solutos no polares benceno y tolueno. Este resultado concuerda con la observación experimental que las proteínas globulares se desnaturalizan en disoluciones acuosas de urea y cloruro de guanidina, y que el cloruro de guanidina es mejor desnaturalizante es decir, desnaturaliza a una menor concentración. Podemos pensar que los grupos no polares que forman parte de los  $\alpha$ -aminoácidos, en presencia de un medio menos hidrofóbico que el agua ([agua + modificador]), tenderán a exponer de manera parcial o total segmentos de la proteína *i.e.*, su desnaturalización. No se pretende explicar el comportamiento de una macromolécula, como lo son las proteínas, a partir del comportamiento de moléculas mucho más simples, sin embargo, creemos que este tipo de estudios aportan información muy valiosa que nos permite entender un eslabón más sobre el proceso de desnaturalización de las proteínas.

Las disoluciones acuosas de polióles y los azúcares han sido ampliamente usadas para proteger la actividad de las enzimas y la estructura nativa de las proteínas contra la desnaturalización. A pesar de que el mecanismo de estabilización es complicado, los estudios realizados con compuestos modelo sugieren que este fenómeno es mediado principalmente a través de los efectos de los compuestos polihidroxilados sobre la estructura del agua: las interacciones hidrofóbicas de las proteínas son fortalecidas. Existe evidencia derivada de estudios espectroscópicos y termodinámicos, que muestra que los polióles y los azúcares interaccionan con el agua dependiendo de la estructura molecular que poseen. Por ejemplo, la glucosa se comporta de manera distinta a como lo hace la sacarosa, y el manitol respecto al sorbitol.<sup>77</sup> De manera análoga al fenómeno de *salting out*, donde la solubilidad disminuye con el respectivo incremento del coeficiente de actividad en la presencia de algunos electrolitos, la observación sobre el incremento del coeficiente de actividad a

<sup>77</sup> J. H. Stern, M. E. O'Connor. J. Phys. Chem., 76, 3077 (1972).



respecto al sorbitol.<sup>78</sup> De manera análoga al fenómeno de *salting out*, donde la solubilidad disminuye con el respectivo incremento del coeficiente de actividad en la presencia de algunos electrolitos, la observación sobre el incremento del coeficiente de actividad a dilución infinita (disminución de la solubilidad) a bajas temperaturas del tolueno en las disoluciones acuosas de glicerol, 1.5 M de sacarosa y 0.5 M de trehalosa puede considerarse un fenómeno *sugaring out*.<sup>79</sup> Las condiciones en las que dicho fenómeno se presenta, coinciden con las condiciones empleadas generalmente para proteger la actividad y estructura de las proteínas.

---

<sup>78</sup> J. H. Stern, M. E. O'Connor. J. Phys. Chem., 76, 3077 (1972).

<sup>79</sup> T. S. Lakshmi, P. K. Nandi. J. Phys. Chem., 80, 249 (1976).

## Capítulo 7

### Sugerencias para trabajo futuro

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, al igual que de las dificultades que se presentaron durante el desarrollo del mismo, es posible identificar ideas que resultan interesantes y relevantes en el estudio de la baja solubilidad de solutos no polares en agua y disoluciones acuosas de modificadores. Se presentan a continuación las propuestas divididas en dos áreas. La primera se refiere a generar resultados experimentales de buena calidad del coeficiente de actividad a dilución infinita,  $\gamma_i^\infty$ , y el segundo grupo se refiere al empleo del modelo HSCE.

#### 7.1. Coeficientes de actividad a dilución infinita ( $\gamma_1^\infty$ )

- Con el fin de tener completa la serie de estudios que se iniciaron con este trabajo, es claro que los experimentos que resultan más atractivos son la determinación de  $\gamma_1^\infty$  para tolueno en disoluciones acuosas de etilenglicol, sucrosa, glucosa y trehalosa a las concentraciones de 0.5 y 1.0 M.
- Manteniendo el soluto como benceno o tolueno, determinar el  $\gamma_1^\infty$  del soluto en disoluciones acuosas de otros modificadores de interés en el área de estudio de las proteínas. Por ejemplo, se sabe que algunos electrolitos pueden incrementar o disminuir el valor de  $\gamma_1^\infty$  entre los que destacan los aniones  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  y los cationes  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Dado que el benceno y el tolueno fueron empleados como solutos modelo con características estructurales particulares semejantes al  $\alpha$ -aminoácido fenilalanina, resulta de gran interés el emplear otros solutos que tengan características estructurales semejantes a los grupos sustituyentes de otros  $\alpha$ -aminoácidos. El determinar el  $\gamma_1^\infty$  de tales solutos en las disoluciones acuosas de modificadores con actividad tanto desnaturalizante (urea y cloruro de guanidina) como estabilizante (glicerol, etilenglicol, sucrosa, glucosa y trehalosa) de proteínas es muy relevante en el área bioquímica.

## 7.2. Empleo del modelo termodinámico molecular

- Dado que ya se determinaron los  $\gamma_1^\infty$  de tolueno en disoluciones acuosas de etilenglicol, glucosa, sacarosa y trehalosa a una sola concentración, el empleo del modelo HSCE con los datos experimentales complementarios sugeridos en la sección 7.1 es claro.
- Emplear el modelo HSCE para analizar datos de otros sistemas. La búsqueda de datos precisos de la solubilidad de solutos no polares en disoluciones acuosas con un modificador, a distintas concentraciones y temperaturas resulta ser un factor decisivo para poder implementar el modelo.
- En su forma actual, el modelo HSCE no considera que alguna de las interacciones presentes entre las especies químicas sea de tipo iónica. En particular, el realizar modificaciones sobre la versión actual del modelo para considerar que el modificador es un electrolito, resulta ser atractiva debido al interés que existe en conocer mejor el efecto de la disolución (*salting in* y *salting out*) que producen en general los modificadores de naturaleza iónica sobre solutos no polares.
- La exploración sobre el desempeño del modelo HSCE sobre sistemas más complejos, en donde el “soluto” represente el interior de una proteína. En la literatura están reportados datos experimentales de la capacidad calorífica de proteínas en intervalos amplios de temperatura, incluyendo aquellas superiores a la temperatura de desnaturalización de la proteína, los cuales pueden ser empleados para evaluar el desempeño del modelo en sistemas mucho más complejos.

## Apéndice A

### Método de agotamiento con gas inerte

#### A.1. Principio y teoría del método de agotamiento con gas inerte

La técnica de agotamiento con gas inerte introducida por Burnett<sup>79</sup> y mejorada por Leroi *et al.*<sup>80</sup>, se ha convertido en un método bien establecido para determinar la partición líquido – vapor o el coeficiente de actividad de un soluto en soluciones muy diluídas.<sup>81</sup> El método consiste en medir la velocidad de elución de un soluto conforme un gas inerte fluye a través de una solución muy diluída del soluto. Las ventajas principales que posee este método frente a otros son: (i) la posibilidad de emplearlo en un amplio intervalo de volatilidades ( $10 \text{ kPa} < H_{12} < 10^5 \text{ kPa}$ ) del soluto, (ii) su precisión (1 – 2 %), (iii) no es necesario calibrar el detector del cromatógrafo de gases y (iv) no es necesario conocer exactamente la concentración inicial del soluto.

Considerese inicialmente una disolución ternaria soluto(1) – disolvente(2) – modificador(3) en donde el disolvente y el modificador forman al disolvente mixto y el soluto se encuentra muy diluído ( $x_1 < 10^{-3}$ ). La disolución está bajo condiciones isotérmicas, en equilibrio con la fase vapor y en agitación constante dentro de una celda de agotamiento. El gas inerte empleado para remover a los componentes volátiles de la disolución es introducido en la celda y dispersado en pequeñas burbujas a un flujo constante. El gas que sale de la celda se asume en equilibrio con la disolución líquida de la celda, y es periódicamente analizado mediante cromatografía de gases para determinar la velocidad de elución del soluto. La temperatura  $T$ , la presión total  $p$ , la velocidad de flujo del gas inerte  $D$ , la cantidad total del disolvente mixto en la celda  $n_2^o + n_3^o$  y la respuesta del detector al soluto (área bajo la curva)  $A_1$  como función del tiempo  $t$ , son medidos. Cuando la presión parcial del soluto es pequeña en comparación a la presión total y las correcciones a la no idealidad de la fase vapor son despreciados, la velocidad de elución del soluto de un disolvente mixto no volátil está dada por

$$-\frac{dn_1}{dt} = \frac{y_1 p D}{RT}, \quad (\text{A.1.1})$$

<sup>79</sup> M. G. Burnett. *Anal. Chem.*, **35**, 508 (1963).

<sup>80</sup> J. -C. Leroi, J. -C. Masson, H. Renon, J. -F. Fabries, H. Sanier. *Ind. Eng. Chem., Proc. Des. Dev.*, **16**, 139 (1977).

<sup>81</sup> Š. Hovorka, V. Dohnal. *J. Chem. Eng. Data*, **42**, 924 (1997).

donde  $y_1$  es la fracción mol del soluto en la fase vapor. Cuando el soluto se encuentra muy diluído ( $x_1 < 10^{-3}$ ), el coeficiente de actividad del soluto es efectivamente igual a su valor límite a dilución infinita,  $\gamma_1^\infty$ . Al expresar la condición de equilibrio líquido – vapor para el soluto como

$$y_1 p = \gamma_1^\infty x_1 p_1^s, \quad (\text{A.1.2})$$

se toma en cuenta la alta dilución del soluto en la solución y se desprecia el espacio ocupado por el vapor dentro de la celda

$$x_1 = \frac{n_1}{n_1 + n_2^\circ + n_3^\circ} \approx \frac{n_1}{n_2^\circ + n_3^\circ}, \quad (\text{A.1.3})$$

la velocidad de elución del soluto de un disolvente no volátil ( $n_2^\circ + n_3^\circ = \text{constante}$ ) sigue el patrón de una cinética de primer orden, *i.e.*

$$-\frac{d \ln n_1}{dt} = \frac{\gamma_1^\infty p_1^s D}{(n_2^\circ + n_3^\circ) RT}. \quad (\text{A.1.4})$$

Las muestras colectadas de volumen constante, son analizadas con el cromatógrafo de gases. Si la respuesta del detector es lineal, y el área bajo la curva de la respuesta producida por el soluto  $A_1$  es proporcional a  $n_1$ , la pendiente  $-\frac{d \ln A_1}{dt}$  es constante y el coeficiente de actividad límite puede determinarse como

$$\gamma_1^\infty = \frac{(n_2^\circ + n_3^\circ) RT}{p_1^s D} \left( -\frac{d \ln A_1}{dt} \right). \quad (\text{A.1.5})$$

En general, la primer aproximación dada por la ecuación (A.1.5) es suficientemente exacta, sin embargo, cuando se requiere de una mayor exactitud o cuando las suposiciones bajo las cuales es válida la ecuación (A.1.5) son violadas de manera apreciable (e.g. para solutos moderadamente volátiles, constante de la ley de Henry  $H_{12} = \gamma_1^\infty p_1^s > 10^{-3} \text{kPa}$ ), las aproximaciones iniciales se deben corregir. Para visualizar los efectos individuales de las suposiciones hechas, se han derivado aproximaciones más complejas a partir del método de perturbación.<sup>82</sup> Estas correcciones individuales a cada una de las suposiciones iniciales, se presentan en la forma de factores de corrección  $k_i$  con los cuales se calcula una segunda aproximación al coeficiente de actividad límite,  $\gamma_1^{\infty, II}$ , como

$$\gamma_1^{\infty, II} = \gamma_1^{\infty, I} \prod_i^4 k_i, \quad (\text{A.1.6})$$

donde  $\gamma_1^{\infty, I}$  es calculada empleando la ecuación (A.1.5). Si las correcciones individuales son relativamente pequeñas, en conjunto se vuelven despreciables y la ecuación (A.1.6)

<sup>82</sup> P. Vrbka, V. Dohnal. Z. Phys. Chem.(Munich), 209, 924 (1999).

produce valores muy parecidos a los obtenidos con la ecuación (A.1.5). Para los distintos efectos despreciados en la primer aproximación los factores de corrección  $k_i$  se desarrollan a continuación:

### A.1.1. Cambio en el flujo del gas de arrastre debido a la saturación de la celda

Debido a la saturación de la celda, el flujo del gas inerte que deja la celda,  $D'$ , es mayor que el del gas que entra a la disolución,  $D$ . Como demostró Leroi<sup>80</sup>, un balance de materia en la celda define a  $D'$  como

$$D' = \frac{D}{\left(1 - \left(\frac{\bar{n}_1}{n_2^o + n_3^o}\right) \gamma_1^{\infty, I} \frac{p_1^s}{p} - \frac{p_2^s}{p}\right)} \quad (A.1.7)$$

Por lo que el factor de corrección debido al cambio en el flujo del gas está dado por

$$k_1 = \frac{D}{D'} = 1 - \left(\frac{\bar{n}_1}{n_2^o + n_3^o}\right) \gamma_1^{\infty, I} \frac{p_1^s}{p} - \frac{p_2^s}{p} \quad (A.1.8)$$

donde  $\bar{n}_1$  es el número de moles promedio de soluto durante la medición, *i.e.*

$$\bar{n}_1 = \frac{1}{t} \int_0^t n_1 dt \quad (A.1.9)$$

Sustituyendo la proporcionalidad entre  $A_1$  y  $n_1$  en la ecuación (A.1.4), se obtiene a partir de la ecuación (A.1.9)

$$\bar{n}_1 = \frac{(n_1^f - n_1^o)}{\ln(n_1^f - n_1^o)} = \frac{n_1^o \left(\frac{A_1^f}{A_1^o} - 1\right)}{\ln \frac{A_1^f}{A_1^o}} \quad (A.1.10)$$

donde  $n_1^f$ ,  $n_1^o$ ,  $A_1^f$  y  $A_1^o$  son los moles finales e iniciales de soluto y las respuestas finales e iniciales del cromatógrafo, respectivamente. El factor de corrección  $k_1$  es siempre menor que la unidad. Su importancia crece al incrementarse las volatilidades del soluto ( $H_{12}$ ) y del disolvente ( $p_2^s$ ).

### A.1.2. Remoción del disolvente debido a su volatilidad

El factor de corrección para este caso es

$$k_2 = \frac{\bar{n}_2}{n_2^0} \quad (\text{A.1.11})$$

donde  $n_2^0$  es el número de moles iniciales del disolvente en la celda y  $\bar{n}_2$  es el valor promedio de  $n_2$  durante la medición

$$\bar{n}_2 = \frac{1}{t} \int_0^t n_2 dt. \quad (\text{A.1.12})$$

En analogía con las ecuaciones (A.1.1) y (A.1.2), la velocidad de remoción del disolvente es

$$-\frac{dn_2}{dt} = \frac{p_2^s D}{RT} \quad (\text{A.1.13})$$

y por lo tanto

$$n_2 = n_2^0 - \frac{p_2^s D}{RT} t. \quad (\text{A.1.14})$$

Sustituyendo este resultado en la ecuación (A.1.11) y empleando la ecuación (A.1.12)

$$k_2 = 1 - \frac{p_2^s D t}{2n_2^0 RT} \quad (\text{A.1.15})$$

El factor de corrección  $k_2$  es menor a la unidad y su importancia crece con la volatilidad del disolvente ( $p_2^s$ ) y el decremento del volumen de la celda.

### A.1.3. Cantidad de soluto en la fase vapor dentro de la celda

Dado que una cierta cantidad del soluto se encuentra en la fase vapor,  $n_1^g$ , dentro de la celda,  $V$ , la composición de la fase líquida difiere de aquella dada por la ecuación (A.1.3) y en el caso de alta dilución se tiene

$$x_1 = \frac{n_1 - n_1^g}{(n_2^0 + n_3^0)} \quad (\text{A.1.16})$$

Si se asume un mezclado total en la fase vapor,  $n_1^g$  puede expresarse como

$$n_1^g = \frac{y_1 p V}{RT} = \frac{\gamma_1^\infty x_1 p_1^s V}{RT} \quad (\text{A.1.17})$$

que al substituirse en la ecuación (A.1.16) produce

$$x_1 = \frac{n_1}{(n_2^0 + n_3^0) + \frac{\gamma_1^\infty p_1^s V}{RT}} \quad (\text{A.1.18})$$

Combinando las ecuaciones (A.1.1), (A.1.2) y (A.1.18), en lugar de la ecuación (A.1.4) se obtiene

$$-\frac{d \ln n_1}{dt} = \frac{\gamma_1^\infty p_1^s D}{(n_2^\circ + n_3^\circ) RT + \gamma_1^\infty p_1^s V}, \quad (\text{A.1.19})$$

a partir de la cual y tomando en cuenta la proporcionalidad entre  $A_1$  y  $n_1$ ,

$$\gamma_1^\infty = \frac{(n_2^\circ + n_3^\circ) RT}{p_1^s D \left[ 1 - \left( -\frac{d \ln A}{dt} \right) \frac{V}{D} \right]} \left( -\frac{d \ln A_1}{dt} \right). \quad (\text{A.1.20})$$

La comparación entre la ecuación (A.1.20) y ecuación (A.1.5) produce el factor de corrección respectivo

$$k_3 = \left[ 1 - \left( -\frac{d \ln A}{dt} \right) \frac{V}{D} \right]^{-1} = \left[ 1 + \frac{(\gamma_1^{\infty, I} p_1^s V)}{(n_2^\circ + n_3^\circ) RT} \right]^{-1}. \quad (\text{A.1.21})$$

Como se ve a partir de la relación ecuación (A.1.21),  $k_3 > 1$  y además crece con la solubilidad del soluto ( $H_{12}$ ) y también con el crecimiento de la proporción entre el volumen de la fase vapor y la cantidad de disolvente en la celda.

#### A.1.4. No idealidad de la fase vapor

Si la no idealidad de la fase vapor es representada con la ecuación virial de estado, las ecuaciones (A.1.1) y (A.1.2) cambian a

$$-\frac{dn_1}{dt} = \frac{(y_1 P D)}{RT + \beta_{33} P} \quad (\text{A.1.22})$$

y

$$\epsilon_1^\infty y_1 P = \gamma_1^\infty x_1 P_1^s. \quad (\text{A.1.23})$$

Donde

$$\epsilon_1^\infty = \exp \frac{[P(2B_{13} - B_{33} - \nu_1^L) - P_1^s(B_{11} - \nu_1^L)]}{RT} \quad (\text{A.1.24})$$

en esta ecuación  $\nu_1^L$  es el volumen molar del soluto líquido polar y  $B_{ij}$  son los segundos coeficientes viriales, siendo el componente 3 el gas de arrastre. A partir de las ecuaciones (A.1.22) y (A.1.23), y considerando de nuevo la proporcionalidad entre  $A_1$  y  $n_1$ , obtenemos el coeficiente de actividad límite

$$\gamma_1^\infty = \frac{\epsilon_1^\infty n_2 (RT + B_{33} P)}{P_1^s D} \left( -\frac{d \ln A_1}{dt} \right). \quad (\text{A.1.25})$$

Comparación entre la ecuación (A.1.25) y ecuación (A.1.5) produce el factor de corrección

$$k_4 = \left[ 1 + \frac{B_{33} P}{RT} \right] \epsilon_1^\infty. \quad (\text{A.1.26})$$

La corrección a la no idealidad de la fase vapor depende del sistema y las condiciones de trabajo.



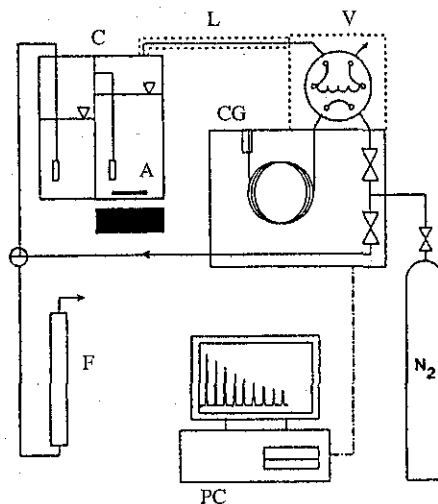
## A.2. Procedimiento experimental

### A.2.1. Materiales

Benceno (p.a.) y tolueno (p.a.) obtenidos de Lachema (Brno, República Checa) fueron destilados fraccionadamente en una columna empacada de 1 m de largo antes de su uso. El agua empleada fue doblemente destilada. Los modificadores urea (p.a.) de Lachema, cloruro de guanidina (Fluka, pureza declarada por el fabricante > 99 por ciento), glicerol anhidro (p.a.) (Fluka, pureza  $\geq 99.5$  por ciento), D(+)-trehalosa dihidratada (Sigma), D(+)-glucosa anhidra (Fluka,  $\geq 99.5$  por ciento) y D(+)-sacarosa (Lachema, p.a.  $\geq 99.8$  por ciento) fueron empleados sin purificar aun mas.

### A.2.2. Arreglo experimental

El arreglo experimental está diseñado alrededor de un cromatógrafo de gases (Hewlett-Packard, modelo 5890 II) el cual posee un detector de ionización de flama y una válvula neumática de seis puertos para el muestreo de gases (ver figura A.2.1). La válvula se encuentra en una zona del cromatógrafo que es calentada de manera independiente y mantenida a  $433 \pm 1$  K. La celda de agotamiento está construida en vidrio y posee una chaqueta, de manera que la disolución puede ser mantenida a distintas temperaturas en equilibrio térmico. Para ello se empleo un baño circulador (Lauda, modelo RC6 CP) con precisión de  $\pm 0.02$  K. La temperatura de este baño se midió con termómetros de mercurio (Karl Schneider, Wertheim, Alemania) con una incertidumbre de  $\pm 0.01$  K. El flujo constante del gas de arrastre se alimenta a la celda desde uno de los canales duales del cromatógrafo. El procedimiento experimental de medición se inició al cargar de manera gravimétrica a la celda con el disolvente, el cuál se agitó vigorosamente con un agitador magnético. El soluto se adicionó empleando una jeringa de vidrio de  $100 \mu\text{L}$ . Antes de entrar a la celda, el gas de arrastre es secado empleando una columna de silica gel. El gas entra a la celda por un tubo de vidrio poroso de manera que forma pequeñas burbujas. El flujo del gas de arrastre se controló de manera digital con un regulador electrónico, y se midió antes y después de cada experimento de agotamiento con un flujómetro de jabón térmicamente estabilizado. Las velocidades típicas del flujo del gas de arrastre empleadas en este trabajo fueron de 8 a  $12 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$ , las velocidades de los flujos tuvieron buena estabilidad y pudieron ser determinadas con una incertidumbre del  $\pm 0.3$  por ciento. El gas saturado sale de la celda por un tubo de vidrio, el cual está conectado con juntas de Teflon y metal, y es transferido a una tubería de acero inoxidable hacia el puerto de muestreo de



**Figura A.2.1:** Diagrama esquemático del arreglo experimental empleado para el método de arrastre con un gas inerte: CG, cromatógrafo de gases; V, válvula de neumática de muestreo de gases termoestabilizada; PC, computadora personal; C, celda de disolución; A, agitador magnético; N<sub>2</sub>, fuente del gas de arrastre; F, flujómetro de agua jabonosa térmicamente estabilizado y L línea de alimentación calentada.

la válvula de seis puertos en el cromatógrafo. Esta tubería se calentó (423 K) con una resistencia a fin de evitar que el gas saturado se condense. El volumen del rizo empleado para retener las muestras fue de 0.25 cm<sup>3</sup>. Los modificadores empleados no son volátiles y el detector de ionización de flama no responde al agua, por lo tanto, en principio no hay necesidad de resolver la mezcla de la fase vapor en cada uno de sus componentes. Por ello, se empleó una columna para cromatografía de acero inoxidable y de 0.5 m de longitud. La columna se empacó con Porapak Q (tamaño de malla 80 - 100), lo cual sirvió para separar a las posibles impurezas. Con una velocidad de flujo del gas de arrastre de 0.15 cm<sup>3</sup>s<sup>-1</sup> y con la temperatura del horno de 463 K, las señales registradas fueron picos angostos y el tiempo de análisis fue típicamente de 12 minutos. El control de las temperaturas de las distintas zonas, la automatización de la válvula de seis puertos, la adquisición de las señales y la integración de las mismas se llevaron a cabo empleando una computadora personal y empleando el software HP ChemStation. El procedimiento de medición se inicia cuando se hace pasar nitrógeno seco al arreglo experimental y a la celda. La celda posee un volumen de 170 cm<sup>3</sup>. La cantidad de disolvente agregado es medido gravimetricamente. Los disolventes mixtos (agua + modificador) fueron preparados en un matraz volumétrico de 250 cm<sup>3</sup>, también de manera gravimétrica. El soluto es adicionado dentro de la celda con una jeringa, siendo el volumen siempre lo suficientemente pequeño (50 μL) para estar en condiciones de solución homogénea y en la región de la ley de Henry.

## Apéndice B

### Análisis termodinámico clásico

Para poder determinar el efecto de la temperatura sobre la solubilidad (hidrofobicidad) de los solutos no polares, es importante establecer una ecuación termodinámica que describa la dependencia del coeficiente de actividad a dilución infinita,  $\gamma_1^\infty$ , del soluto(1) con la temperatura. Para lograr este objetivo, partimos de la suposición de que la capacidad calorífica de disolución,  $\Delta_{sol}C_{p,1}^\infty$ , es constante en el intervalo de temperatura donde realizamos nuestro estudio. A pesar de que se sabe que  $\Delta_{sol}C_{p,1}^\infty$  disminuye conforme aumenta la temperatura,<sup>83</sup> la suposición que hacemos se basa en el hecho de que el número de datos experimentales que poseemos no es suficiente para establecer con precisión la dependencia de la capacidad calorífica con la temperatura. El introducir mas parámetros para ajustar nuestros datos experimentales no se justifica y al contrario, demerita el análisis de los mismos.

#### B.1. Obtención de la expresión del coeficiente de actividad a dilución infinita del soluto ( $\ln \gamma_1^\infty$ )

Partiendo de la definición de la capacidad calorífica molar a presión constante para el proceso de disolución del soluto(1)

$$\Delta_{sol}C_{p,1}^\infty = T \left( \frac{d\Delta_{sol}S_1^\infty}{dT} \right)_{p,N}, \quad (B.1.1)$$

para obtener a la  $\Delta_{sol}S_1^\infty$  mediante la integración de la ecuación (B.1.1) produce la expresión

$$\Delta_{sol}S_1^\infty = \Delta_{sol}C_{p,1}^\infty \ln T + \beta, \quad (B.1.2)$$

donde  $\beta$  es la constante de integración. De manera análoga, para obtener  $\Delta_{sol}H_1^\infty$  partimos de la expresión

$$\Delta_{sol}C_{p,1}^\infty = \frac{d\Delta_{sol}H_1^\infty}{dT}, \quad (B.1.3)$$

para obtener mediante su integración a la ecuación

$$\Delta_{sol}H_1^\infty = \Delta_{sol}C_{p,1}^\infty T + \alpha, \quad (B.1.4)$$

<sup>83</sup> G. I. Makhatadze, P. L. Privalov. J. Chem. Thermodynamics, 20, 405 (1988).

donde  $\alpha$  es la respectiva constante de integración. Establecida la relación entre el  $\gamma_1^\infty$  y la energía libre de Gibbs de solución como

$$\ln \gamma_1^\infty = \frac{\Delta_{sol} G_1^\infty}{RT} , \quad (B.1.5)$$

se pueden relacionar directamente al  $\ln \gamma_1^\infty$  con los potenciales termodinámicos  $\Delta_{sol} H_1^\infty$  y  $\Delta_{sol} S_1^\infty$ , *i.e.*

$$\ln \gamma_1^\infty = \frac{\Delta_{sol} H_1^\infty}{RT} - \frac{\Delta_{sol} S_1^\infty}{R} . \quad (B.1.6)$$

Al sustituir las expresiones para la entropía de disolución (ecuación (B.1.2)) y la entalpía de disolución (ecuación (B.1.4)) obtenidas bajo la consideración de que la capacidad calorífica es independiente de la temperatura, la ecuación (B.1.6) se puede escribir explícitamente como

$$\ln \gamma_1^\infty = \frac{\Delta_{sol} C_{p,1}^\infty - \beta}{R} + \frac{\alpha}{RT} - \frac{\Delta_{sol} C_{p,1}^\infty}{R} \ln T . \quad (B.1.7)$$

Esta última ecuación describe la dependencia del coeficiente de actividad de un soluto a dilución infinita con la temperatura. Para realizar el ajuste de los datos experimentales, generalmente se normaliza la temperatura ( $\tau = \frac{T}{298.15}$ ), con el objetivo de que los valores numéricos que toman los parámetros sean más fáciles de manejar. La ecuación (B.1.7) toma la forma final

$$\ln \gamma_1^\infty = A + \frac{B}{\tau} - C \ln \tau , \quad (B.1.8)$$

empleada en este trabajo para realizar los ajustes a nuestros datos experimentales.

## B.2. Obtención de la expresión del coeficiente de actividad a dilución infinita de transferencia del soluto ( $\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty$ )

A partir de la ecuación de Margules para un sistema ternario

$$\ln \gamma_{1(2+3)}^\infty = x_2 \ln \gamma_{1(2)}^\infty + x_3 \ln \gamma_{1(3)}^\infty - a_{23} x_2 x_3 . \quad (B.2.1)$$

donde 1 se refiere al soluto, 2 al agua, 3 al modificador y donde además se considera que la fracción mol del soluto ( $x_1$ ) es despreciable frente a las fracciones mol del agua ( $x_2$ ) y del modificador ( $x_3$ ) *i.e.*,  $x_2 + x_3 = 1$ . Entonces la ecuación (B.2.1) se puede escribir como

$$\ln \gamma_{1(2+3)}^\infty = (1 - x_3) \ln \gamma_{1(2)}^\infty + x_3 \ln \gamma_{1(3)}^\infty - a_{23} (1 - x_3) x_3 \quad (B.2.2)$$

$$= \ln \gamma_{1(2)}^\infty - x_3 \ln \gamma_{1(2)}^\infty + x_3 \ln \gamma_{1(3)}^\infty - a_{23} x_3 + a_{23} x_3^2 \quad (B.2.3)$$

$$= \ln \gamma_{1(2)}^\infty + x_3(\ln \gamma_{1(3)}^\infty - \ln \gamma_{1(2)}^\infty - a_{23}) + a_{23}x_3^2 \quad (B.2.4)$$

para simplificar la presentación de esta última ecuación se define a  $\eta$  como

$$\eta = \ln \gamma_{1(3)}^\infty - \ln \gamma_{1(2)}^\infty - a_{23} \quad (B.2.5)$$

y a

$$\epsilon = a_{23} \quad (B.2.6)$$

entonces

$$\ln \gamma_{1(2+3)}^\infty = \ln \gamma_{1(2)}^\infty + \eta x_3 + \epsilon x_3^2 \quad (B.2.7)$$

$$\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty = \ln \gamma_{1(2+3)}^\infty - \ln \gamma_{1(2)}^\infty \quad (B.2.8)$$

$$= \ln_{1(2)}^\infty + \eta x_3 + \epsilon x_3^2 - \ln \gamma_{1(2)}^\infty \quad (B.2.9)$$

$$= \eta x_3 + \epsilon x_3^2 \quad (B.2.10)$$

$$= (\ln \gamma_{1(3)}^\infty - \ln \gamma_{1(2)}^\infty - a_{23})x_3 + \epsilon x_3^2 \quad (B.2.11)$$

Si  $\ln \gamma_1^\infty$  tiene la forma  $\ln \gamma_1^\infty = A + \frac{B}{\tau} + C \ln \tau$ , entonces

$$\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty = \left( a' + \frac{b'}{\tau} + c' \ln \tau \right) x_3 - a_{23}(x_3 - x_3^2) \quad (B.2.12)$$

Se propone una dependencia de  $a_{23}$  con temperatura de la forma  $a_{23} = d + \frac{e}{\tau}$ , de manera que entonces se tiene finalmente la expresión

$$\Delta_{tr} \ln \gamma_1^\infty = \left( a + \frac{b}{\tau} + c \ln \tau \right) x_3 + \left( d + \frac{e}{\tau} \right) x_3^2 . \quad (B.2.13)$$

## Apéndice C

### Elementos del modelo de equilibrio químico para la esfera de hidratación (HSCE)

En este apéndice, se presentan elementos de un modelo molecular sencillo para las propiedades termodinámicas a dilución infinita de un soluto(1) no polar en un disolvente mixto compuesto por agua(2) y una sustancia llamada modificador(3). El modificador es capaz precisamente de modificar el ambiente acuoso en donde se encuentra el soluto no polar a dilución infinita. En el modelo se incluye, como un caso particular, la situación en la cual el soluto no polar se encuentra en agua pura como disolvente. Este modelo está desarrollado para soluciones no iónicas, por lo que se ignora el carácter iónico del cloruro de guanidina. El modelo surge de la propuesta ampliamente aceptada, de que las moléculas de agua que se encuentran en contacto directo con el soluto, son distintas a las que se encuentran en el bulto de la disolución debido a su posición espacial.<sup>8</sup> Se han realizado diversos intentos por mejorar la visualización de como se estructuran las moléculas que se encuentran en contacto con el soluto no polar, y proveer una base cuantitativa para las propiedades termodinámicas de las disoluciones acuosas de solutos no polares. En un intento más por cuantificar las propiedades conocidas de la disolución de un soluto no polar a dilución infinita, se ha combinado la idea de Frank y Evans con un tratamiento muy simple de termodinámica molecular que, sin embargo, produce un modelo cuyas correlaciones e interpretaciones tienen sentido físico.

Nos referiremos a este como el modelo de equilibrio químico para la esfera de hidratación (Hydration Shell Chemical Equilibrium, HSCE). La derivación de este modelo se centra en la energía de Gibbs de disolución,  $\Delta_{sol}G_1^\infty$ . A partir de la derivación para  $\Delta_{sol}G_1^\infty$ , la energía de Gibbs de transferencia,  $\Delta_{tr}G_1^\infty$ , y los demás potenciales termodinámicos (entropía, entalpía y capacidad calorífica de disolución) pueden obtenerse con los procedimientos clásicos de la termodinámica. Considérese que la  $\Delta_{sol}G_1^\infty$  está compuesta por las contribuciones: (i) combinatorial,  $\Delta_{sol}G_1^{comb}$ , que surge del proceso de mezclado, (ii) de interacción,  $\Delta_{sol}G_1^{int}$ , debido a las interacciones moleculares y (iii) estructural,  $\Delta_{sol}G_1^{alt}$ , como resultado de la alteración estructural de las moléculas de agua que se encuentran en la primera esfera de solvatación. La consideración de que solo la primer esfera de hidratación se encuentra afectada por el soluto está basada en los resultados obtenidos mediante simulación.<sup>84</sup>

<sup>84</sup> A. Wallquist. J. Phys. Chem. 95, 8921 (1991).

## C.1. Determinación de los parámetros geométricos del modelo HSCE

Como en el caso de los modelos UNIQUAC/UNIFAC de la energía libre de Gibbs de exceso,<sup>85-86</sup> los parámetros geométricos volumen,  $R_i$ , y área de contacto  $Q_i$  de cada componente son empleados para describir la geometría molecular. Estos parámetros se definen como el volumen,  $V_i^W$ , y área de van der Waals,  $A_i^W$ ,<sup>87-88</sup> normalizados respecto al volumen ( $V_{ref}^W = 1.517 \times 10^{-3} \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1}$ ) y área ( $A_{ref}^W = 250 \times 10^3 \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}$ ) de un segmento  $-CH_2-$ .<sup>85</sup> Sin embargo, para las especies químicas que forman al disolvente, en lugar de emplearse el área de contacto  $A_i^W$  de la molécula, se considera que solamente juega un papel importante el área que ocupa la molécula en la superficie de la esfera de solvatación,  $\bar{A}_i^W$ , que es el área efectiva mediante la cual las moléculas del soluto y el disolvente se encuentran en contacto. Las áreas de contacto del agua y los modificadores (agentes desnaturizantes y estabilizantes), fueron determinados considerando que interaccionan con el anillo aromático del soluto no polar, a través de sus átomos de hidrógeno que se encuentran orientados como se muestra en la figura C.1.1. Esta orientación está fundamentada en estudios *ab initio* de mecánica cuántica.<sup>89</sup> Las áreas de proyección  $\bar{A}_i^W$ , fueron calculadas como la "sombra" proyectada por los modificadores sobre una área de contacto plana. Se emplearon el valor de 0.12 nm para el radio de van der Waals de hidrógeno, y las distancias interatómicas y ángulos reportados para la urea a partir de estudios de difracción de neutrones.<sup>90</sup> Considerando que la estructura química del catión guanidinio es análoga a la de la urea, el valor de  $\bar{A}_i^W$  obtenido para urea fue adoptado para este catión. Para glicerol,<sup>91</sup> etilenglicol,<sup>92</sup> glucosa,<sup>93</sup> sacarosa<sup>94</sup> y trehalosa<sup>95</sup> se emplearon las distancias interatómicas y ángulos obtenidos de estudios cristalográficos. Para el caso de estos últimos cinco modificadores, la interacción que se propone es a través de únicamente un átomo de hidrógeno. Esto debido a que, también de datos de cristalografía, se sabe que la longitud del anillo aromático es de 2.78 nm,<sup>96</sup> por lo que el tamaño del anillo sólo

<sup>85</sup> D. S. Abrams, J. M. Prausnitz. *AIChEJ* **21**, 116 (1975).

<sup>86</sup> A. Fredenslund, R. L. Jones, J. M. Prausnitz. *AIChEJ* **21**, 1086 (1975).

<sup>87</sup> A. Bondi. *Physical Properties of Molecular Crystals, Liquids and Glasses* (Wiley, New York, 1968).

<sup>88</sup> H. Kuramochi, H. Noritomi, D. Hoshino, K. Nagahama. *Fluid Phase Equilibria* **130**, 117 (1997).

<sup>89</sup> E. M. Duffy, P. J. Kowalczyk, W. L. Jorgensen. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 9271 (1993).

<sup>90</sup> S. Swaminathan, B. M. Craven, R. K. McMullan. *Acta Crystallogr.* **B40**, 300 (1984).

<sup>91</sup> H. van Koningsveld. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bays (Rec. J. R. Neth. Chem. Soc.)* **87**, 243 (1968).

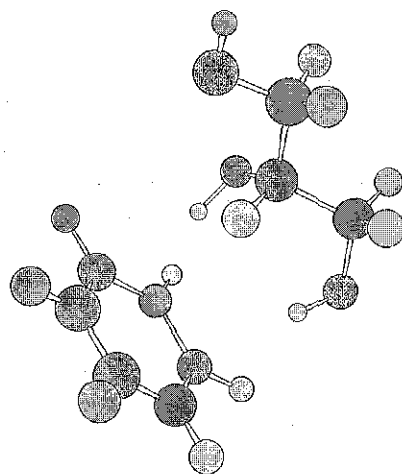
<sup>92</sup> R. Boesse, H. -C. Weiss. *Acta Crystallogr., Sect. C (Cr. Str. Comm.)* **54**, 9800024 (1998).

<sup>93</sup> A. Mostad. *Acta Chem. Scand.* **48**, 276 (1994).

<sup>94</sup> R. C. Hynes, Y. Le Page. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 352 (1991).

<sup>95</sup> G. A. Jeffrey, R. Nanni. *Carbohydr. Res.* **137**, 21 (1985).

<sup>96</sup> G. J. Piermarini, A. D. Mighell, C. E. Weir, S. Block. *Science* **165**, 1250 (1969).



**Figura C.1.1:** Diagrama esquemático de la orientación del glicerol sobre el anillo aromático. El área  $\bar{A}_i^W$  que proyectan los poliéoles y los azúcares sobre la superficie de la esfera de solvatación del soluto fue calculado suponiendo que los modificadores se orientan dirigiendo dos átomos de hidrógeno de dos grupos hidroxilo contiguos.

Compuesto	$R$	$Q$	$\bar{Q}$	
Etilenglicol	3.3448	2.976	0.109	0.305
Glicerol	4.7897	4.152	0.109	0.305
Glucosa	8.1528	8.102	0.109	—
Sacarosa	14.5496	14.128	0.109	—
Trehalosa	14.769	14.044	0.109	—

**Tabla C.1.1:** Parámetros geométricos de los modificadores.

permite este tipo de interacción. Todas las áreas de proyección fueron normalizadas con respecto al área de referencia  $A_{ref}^W$  y se denotan con el símbolo  $\bar{Q}_i$ .

## C.2. Determinación de la contribución de interacción a la energía de Gibbs de disolución del soluto ( $\Delta_{sol}G_1^{int}$ )

La contribución  $\Delta_{sol}G_1^{int}$ , se construye a partir de balancear la energía potencial de pares ( $\Delta_{sol}G_1^{int} = \Delta_{sol}U_1^{int}$ ) para los pasos hipotéticos involucrados en el proceso de disolución *i.e.*,  $\Delta U^{int} = \Delta U^I + \Delta U^{II} + \Delta U^{III}$ . Donde  $\Delta U^I$  es la energía involucrada en el rompimiento de interacciones en el seno del líquido puro del soluto, para liberar una mol de moléculas del soluto,  $\Delta U^{II}$  es la energía requerida para romper las interacciones en el disolvente



mixto, necesarias para abrir cavidades para las moléculas del soluto y  $\Delta U^{III}$  representa a la energía necesaria para establecer las interacciones entre el soluto y el disolvente mixto, una vez que las moléculas del soluto ocupan las cavidades. Con  $\sigma_{ij}$  representamos a la energía molar de interacción entre las especies  $i-j$  la cual está definida como negativa *i.e.*,  $\sigma_{ij} < 0$ . Entonces la energía requerida para obtener un mol de moléculas de soluto libre es

$$\Delta U^I = -\frac{Q_1 \sigma_{ii}}{2} \quad (C.2.1)$$

Para calcular la energía requerida para crear las cavidades necesarias para insertar una mol de moléculas del soluto, en el disolvente [agua+modificador], primero tenemos que calcular la energía necesaria para romper las interacciones entre los pares agua(2) y modificador(3),  $\sigma_{2+3}$ . Considérese que existe en la mezcla [agua+modificador] una superficie hipotética de doble capa. Esta doble capa, al contrario que la concentración del bulbo de la solución, posee la composición local existente en la primera esfera de hidratación del soluto no polar, y contiene  $N_2$  moléculas de agua y  $N_3$  moléculas del modificador. El área de la doble capa se calcula entonces como

$$A_1^W = \bar{A}_2^W N_2 + \bar{A}_3^W N_3 \quad (C.2.2)$$

observese que esta área la del soluto  $A_1^W$ . La energía promedio de los pares de interacción rotos para formar la cavidad en la doble capa está dada por

$$\sigma_{2+3} = \frac{\bar{A}_2^W N_2}{2} (\xi_2 \sigma_{22} + \xi_3 \sigma_{23}) + \frac{\bar{A}_3^W N_3}{2} (\xi_3 \sigma_{33} + \xi_2 \sigma_{23}) \quad (C.2.3)$$

en donde  $\xi_2$  y  $\xi_3$  son las fracciones de área de la cavidad ocupadas por el agua y el soluto respectivamente. Estas fracciones de área pueden calcularse como

$$\xi_2 = \frac{\bar{Q}_2 x_2}{\bar{Q}_2 x_2 + \bar{Q}_3 x_3} \quad (C.2.4)$$

y  $\xi_3 = 1 - \xi_2$ . Recordemos que  $\bar{Q}_2$  y  $\bar{Q}_3$  son las porciones de la cavidad que ocupan una molécula de agua y de modificador, respectivamente. Simplificando la ecuación (C.2.3) e introduciendo a la ecuación (C.2.2) obtenemos la expresión

$$\bar{\sigma}_{2+3} = \xi_2^2 \sigma_{22} + \xi_3^2 \sigma_{33} + 2\xi_2 \xi_3 \sigma_{23} \quad (C.2.5)$$

De manera similar, para el proceso de rompimiento de las interacciones entre las moléculas de soluto, tenemos finalmente que para el disolvente mixto la energía necesaria para crear las cavidades está dada por

$$\Delta U^{II} = -\frac{Q_1 \bar{\sigma}_{23}}{2} \quad (C.2.6)$$

Finalmente, para calcular el tercer paso del proceso hipotético de disolución, podemos calcular la creación de los contactos entre el soluto(1) y el disolvente [agua+modificador] con la consecuente pérdida de energía potencial, como el producto entre el área normalizada del soluto  $Q_1$  y la energía promedio de interacción del soluto con la superficie de la cavidad  $\bar{\sigma}_{12,13}$ . Esta energía la podemos calcular como  $\bar{\sigma}_{12,13} = \xi_2\sigma_{12} + \xi_3\sigma_{13}$ , y entonces :

$$\Delta U^{III} = -\frac{Q_1\bar{\sigma}_{12,13}}{2} . \quad (C.2.7)$$

Al sumar los cambios en energía de los tres pasos hipotéticos en la disolución del soluto, la contribución que considera las interacciones moleculares al modelo HSCE toma la forma

$$\Delta_{sol}G_{m,1}^{int} = Q_1(\Delta_{12} + \xi_3(\Delta_{13} - \Delta_{12} - \Delta_{23}) + \xi_3^2\Delta_{23}) , \quad (C.2.8)$$

donde se ha escrito esta expresión en terminos de la energía de intercambio  $\Delta_{ij}$  definida como

$$\Delta_{ij} \equiv \sigma_{ij} - \frac{1}{2}(\sigma_{ii} + \sigma_{jj}) . \quad (C.2.9)$$