

ESPECIFICIDADES ION-MACROMOLÉCULA OBSERVADAS CON DIVERSAS SALES Y CLARA DE HUEVO COCIDA

Borja Fernández-d'Arlas

Instituto InaMat (Instituto de Materiales Avanzados), Universidad Pública de Navarra (UPNA). Edif. Jerónimo de Ayanz, Campus Arrosadía, Pamplona (España). Correo electrónico: borja.fernandezdarlas@unavarra.es

Recibido: Enero 2018; Aceptado: Febrero 2018

RESUMEN

En este artículo se presentan los resultados de unos sencillos ensayos de solubilidad de la clara de huevo cocido en medios tanto básico como ácido en presencia de distintas sales tales como haluros sódicos y varios cloruros alcalinos. El efecto de la sal sobre la solubilidad de la clara previamente coagulada se describe en términos de la *Regla de Competitividad de Fajans* o *Regla de Afinidades al Agua Equivalente*, en base a la distinta tendencia de los iones hacia la hidratación. La aplicación de este principio se orienta a explicar la competitividad de interacción entre iones de sales inorgánicas y grupos ionizados de los aminoácidos de las proteínas de la clara, lo cual se hipotetiza que determina la cinética y grado de solubilidad de la proteína coagulada.

Palabras claves: Series de Hofmeister, huevo cocido, aniones, cationes

ABSTRACT

This manuscript presents the qualitative results of boiled egg white solubility in acidic and basic media in the presence of different salts such as sodium halides and alkaline chlorides. The effect of salts on egg white solubility is described in terms of *Fajans Competititivity Principle* or *Matching Water Affinities*, based on ions tendency towards hydration. This principle is brought to explain the competitiveness of the interactions between the salt ions and ionizable groups within the protein macromolecule, what is hypothesized that determines the kinetics and degree of coagulated protein solubility.

Key words: Hofmeister series, Boiled egg white, Anions, Cations

INTRODUCCIÓN

El control de la solubilidad de las proteínas regulada por sales de gran importancia en numerosos procesos de análisis a nivel de laboratorio [1,2], procesos bioquímicos como la formación de las sedas [3,4], la división celular [5] o la catálisis enzimática [6,7] y puede ser interesante a nivel industrial para preparar fibras uretánicas, o de otro tipo de macromoléculas proteicas o biomiméticas, en medio acuoso [8,9].

Aunque se ha racionalizado mucho la pléyade de fenomenologías referentes a la fenomenología ión-macromolécula, sin embargo, el mecanismo de acción solubilizante o precipitante de los distintos iones y sales sobre las macromoléculas sigue sin comprenderse en su plenitud [10,11]. Las interacciones entre iones y distintas regiones macromoleculares sin carga han sido confirmadas con varias macromoléculas modelo y mediante diversas técnicas analíticas tales como espectroscopía de resonancia magnética nuclear [12,13] o espectroscopía infrarroja [13–14] así como mediante simulaciones computacionales como por ejemplo en el análisis de las interacciones entre cationes y los grupos amida ($-\text{CO}-\text{NH}-$) de las proteínas [15].

Las interacciones entre iones provenientes de sales inorgánicas y los grupos funcionales

ionizados de las proteínas también han sido estudiados, como por ejemplo los estudios de López-León *et al.* con látexes cargados positivamente con grupos imidinio (= NHR) NR_2^+ o negativamente con grupos sulfato (RSO_4^-) [16,17], los estudios con poliuretanos modelo cargados positivamente con cuaternios $\text{R}_2\text{N}-(\text{CH}_3)\text{H}^+$ [13,18], los estudios computacionales de Jungwirth *y col.* sobre las interacciones entre funcionalidades amonio (R_3NH^+) de aminoácidos y aniones como el cloruro (Cl^-) o ioduro (I^-) [19], o los estudios experimentales de Cremer *y col.* sobre la interacción entre carboxilatos ($-\text{COO}^-$) y cationes mono y divalentes [20]. Salvo algunas excepciones, la mayoría de estudios, como los anteriormente citados, están generalmente de acuerdo con la noción de que los iones con similar grado de hidratación tienden a interactuar entre ellos. Este principio de actuación, aplicado a la interacción ión–macromolécula, sería similar al dispuesto por Fajans (1921) para las sales de iones monovalentes tales como los haluros alcalinos [21]. En la Figura 1a se muestra un diagrama de tipo volcán [22] en el que se observa como las sales cuyos iones tienen una similar energía libre de solubilización, ΔG_s^0 , tienen una mayor energía libre de solubilización, es decir forman pares iónicos más estables y tienden a ser más insolubles que las sales con iones con ΔG_s^0 muy diferentes.

La implicación del también llamado *Principio de Competitividad de Fajans*, expuesto arriba, se esquematiza en la Figura 2b, en donde se indica cómo los iones de la mezcla de dos sales "competirían" por formar pares iónicos más estables, de acuerdo con el principio de similitud en cuanto a su tendencia a la hidratación (ver datos de las correspondientes sales e iones en la Figura 1a).

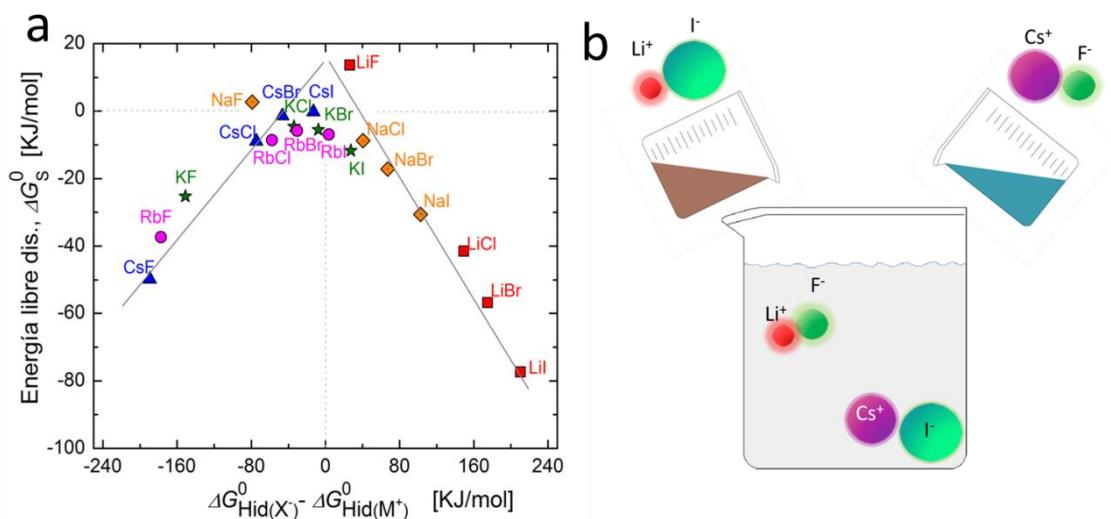


Figura 1. *Principio de Competitividad de Fajans*. a) Energías libres de disolución de distintas sales en función de la diferencia de energías libres de hidratación de sus iones constituyentes (Figura del autor adaptada de Morris [22] y convertida a Julios). b) Implicación del *Principio de Competitividad* en la formación de pares iónicos estables.

En este trabajo se presentan los resultados cualitativos de un experimento sencillo de solubilidad acuosa de la clara de huevo cocida (por ejemplo, desnaturalizada térmicamente) en presencia de distintas sales y a pH por encima y por debajo de su punto isoeléctrico. A diferencia de los experimentos pioneros de *Lewit* y *Hofmeister* [23–26] con la clara de huevo nativa (por ejemplo, sin desnaturalizar, en su forma soluble) este experimento pretende dilucidar el impacto de las sales sobre la clara de huevo cocida. Además, el conocimiento de la composición de la misma (Figura 2 y Tabla 1), de la estructura y carácter ácido–base de sus aminoácidos constituyentes, y del avance tras *Hofmeister*, por *Sørensen* [27], en el concepto de pH, se nos permite hipotetizar sobre interacciones particulares entre los distintos iones y segmentos particulares de las proteínas de la clara. En base a los datos bibliográficos de energías libres de hidratación de iones y distintas especies carboxililatadas ($-COO^-$) y cuaternizadas ($-NR_2H^+$), las observaciones son explicadas en base al *Principio de Competitividad* entre iones y especies ionizadas, presentado arriba.

EXPERIMENTAL

Materiales. Los siguientes reactivos químicos han sido empleados en este trabajo: N-metildietanolamina, MDEA (*Riedel de Haën*) cuaternizado con HCl, LiCl (*Panreac*), KCl (*Panreac*), NH₄Cl (*Panreac*), NaCO₃H₂ (*Probus*), NaH₂PO₄ (*Probus*), NaF (*Panreac*), NaCl (*Panreac*), NaBr (*Panreac*), NaI (*Probus*), NaSCN (*Panreac*), NaClO₄ (*Panreac*). Las sales se usaron tal y como se recibieron, excepto LiCl, que se ha secado 100°C, antes de ser usado para preparar disoluciones.

Huevo cocido y disoluciones. En un vaso de precipitados de 250 mL, se coció un huevo de gallina a 80°C durante 10 minutos y posteriormente se dejó enfriar lentamente en el mismo vaso. Se pesaron 50 ± 3 mg de la clara cocida en viales de 2 mL y se añadieron 1,4 mL de distintas sales con concentración de 0,2 N y se añadieron 0,1 mL de HCl o NaOH 0,1 N. Tras 18 meses se midió el pH de las disoluciones empleando tiras de papel pH y se determinó que para las disoluciones ácidas el pH ≈ 3–5 mientras que para las básicas el pH ≈ 8. Esto demuestra el carácter anfótero de la proteína que tiende a tamponar el pH hacia a su punto isoeléctrico, pI, aumentando o reduciendo el pH del que cabría al preparar las disoluciones (por ejemplo, pH ≈ 2 ó 11, respectivamente).

Análisis de disoluciones. Las disoluciones fueron analizadas visualmente y mediante la adquisición de fotografías digitales tomadas con un teléfono móvil *BQ Aquaris*, a lo largo de un periodo de tiempo de varios meses. Antes de tomar las imágenes las disoluciones fueron agitadas para redispersar los agregados y dejadas precipitar durante un tiempo mínimo de 15 minutos. También, tras más de un año de preparación de la disolución las disoluciones han sido analizadas a través de un polaríscopio casero con el objeto de detectar más

fácilmente los coloides estables, dispersores de luz. El polaroscopio ha sido construido a partir de dos películas sacadas de un monitor de plano de ordenador en desuso y dispuestas a cierta distancia una de otra perpendicularmente en el interior de una caja de madera pintada de negro.

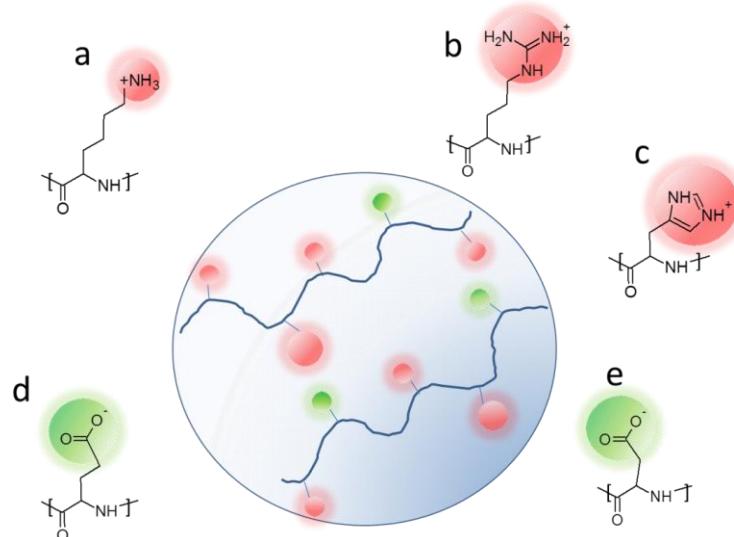


Figura 2. Interacciones iónicas entre cadenas de proteínas y naturaleza de los aminoácidos cargados. Aminoácidos básicos: a) lisina, b) arginina y c) histidina (indicándose en rojo la región del grupo que porta la carga, i.e., amonio, guanidinio e imidazol, respectivamente) y aminoácidos ácidos: d) ácido glutámico y e) ácido aspártico (indicándose en verde la región cargada negativamente, i.e., carboxilato).

Tabla 1. Composición de la clara de huevo, acidez de sus aminoácidos y cálculo del punto isoeléctrico.

	Aminoácidos ácidos		Aminoácidos básicos			$\Sigma q \cdot N^o$ moles
	Ac. Asp	Ac. Glu	Hist	Lis	Arg	
Proporción [§] (g aminoácido/g huevo; %)	10,4	13,2	2,5	6,8	5,5	
Masa molar (g/mol)*	133	147	155	146	174	
pK _a (grupo lateral)*	3,6	4,2	6,0	10,5	12,5	
Nº moles	0,078	0,090	0,016	0,046	0,032	
<i>pH</i>	Carga, <i>q</i>					
3,65	0	0	+	+	+	+0,094
4,25	-	0	+	+	+	+0,016
6,0	-	-	+	+	+	-0,074
10,5	-	-	0	+	+	-0,090
12,5	-	-	0	0	+	-0,136
	-	-	0	0	0	-0,168

[§]USDA; *Datos obtenidos de la ref. [28]; ^δCalculado empleando la proporción de aminoácidos y la ecuación de Hendelsson-Hasselbach ($pH = pK_a + \log([A^-]/[AH])$), para cada aminoácido y el posterior sumatorio de las carga neta total a distintos pH.

RESULTADOS

El efecto específico de los aniones sobre la solubilidad de la clara cocida en medio ácido se pone de manifiesto inmediatamente tras la adición de la sal. Como se observa en la Figura 3a, a los 3 días de mezcla las disoluciones con aniones aniones como el Γ^- , SCN^- y el ClO_4^- , muestran una turbidez intensa como consecuencia de una estabilización de coloides proteicos en la fase acuosa. Al cabo de dos meses el $H_2PO_4^-$ también parece inducir a ligeramente la solubilidad, mientras que con aniones como el F^- y el Br^- la clara parece no solubilizarse en absoluto. Sólo al cabo de año y medio de experimento (Figura 4a) pareciera que el Br^- indujera ligeramente la solubilidad. El impacto de los aniones sobre la solubilidad de la clara seguiría, por tanto, una serie directa de *Hofmeister* tipo:



siendo el fluoruro (F^-) el anión que menos favorece la solubilidad y el perclorato (ClO_4^-) el que más la favorece. Cabe citar que el ordenamiento de esta serie no es obvio ni unívoco y común para todas las proteínas o macromoléculas cargadas positivamente, ya que por ejemplo, los poliuretanos cuaternizados de tipo $R_1R_2(CH_3)NH^+$, presentan un ordenamiento inverso de esta serie aniónica, es decir que la solubilidad de la macromolécula es mayor en presencia del fluoruro que del perclorato (citando únicamente los extremos) [13,18]. También látexes cargados positivamente con grupos imidinio, (= NHR)NR₂⁺, presentan un ordenamiento de los aniones de tipo inverso [16,17].

En medio básico, sin embargo, estas especificidades aniónicas no son puestas tan de manifiesto, como cabría esperar por la carga neta negativa de la proteína, como en medio ácido. En la Figura 3b puede observarse como a los tres días de mezcla las claras no muestran ningún signo de resuspensión en presencia de ninguno de los aniones. Únicamente a tiempos de mezcla mayores pareciera que también los aniones más voluminosos favorecieran ligeramente la solubilidad. Esta observación podría deberse a una interacción de estos aniones con residuos positivamente cargados (incluso a $pH > pI$) o también a observada interacción de aniones voluminosos con grupos amida [11] y uretano [13], mecanismo a través del cual la forma zwitteriónica de estas especies quedaría estabilizada y su solubilidad favorecida [13]. Finalmente, a tiempos grandes de mezcla (Figura 4b) la clara de huevo tendería a solubilizarse en medio básico debido a la carga neta negativa adquirida debido a la desprotonación de los grupos carboxilato ($-COOH \leftrightarrow -COO^-$) y grupos tipo histidina ($-R_1R_2 = NH^+ \leftrightarrow -R_1R_2 = N$). Interesantemente, únicamente con el F^- la clara parece no solubilizarse en medio básico. Como se explicará en la discusión, este fenómeno puede atribuirse a una competitividad iónica que haría prevalecer los pares iónicos intermoleculares a los formados

entre residuos positivos y el F⁻.

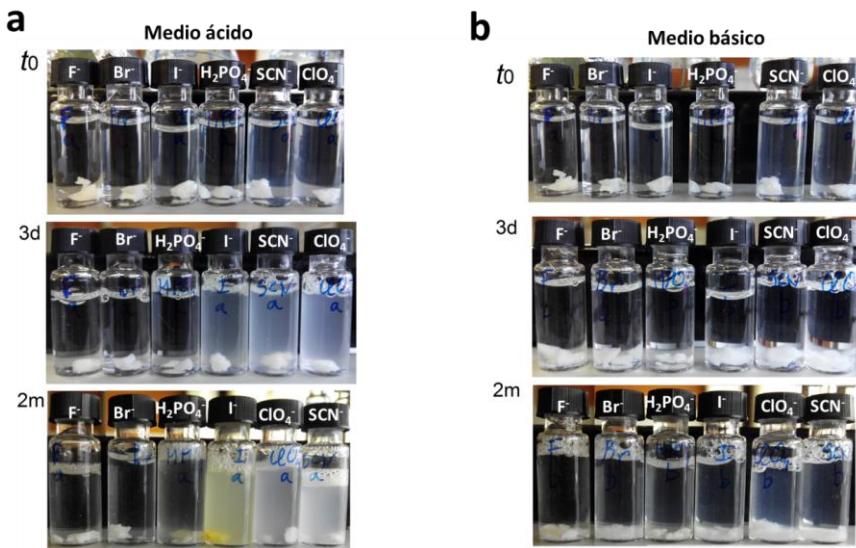


Figura 3. Evolución a lo largo del tiempo de las disoluciones de clara de huevo cocido y distintas sales sódicas en a) medio ácido y b) medio básico.

En el caso de los fenómenos específicos de cationes estudiados con distintos cloruros, son puestos más de manifiesto en medio básico, como cabría de esperar. En la Figura 4c se muestra las mezclas de distintas sales de cloro con clara en medio ácido tras un año y medio, y no se aprecia ninguna inducción a la solubilidad. Por el contrario, en medio básico la sal de Na⁺ parece resuspender por completo la clara, mientras que el Li⁺ y el K⁺ lo hacen parcialmente. El amonio (NH₄⁺) y el catión MDEA⁺ parecen no tener ningún efecto apreciable.

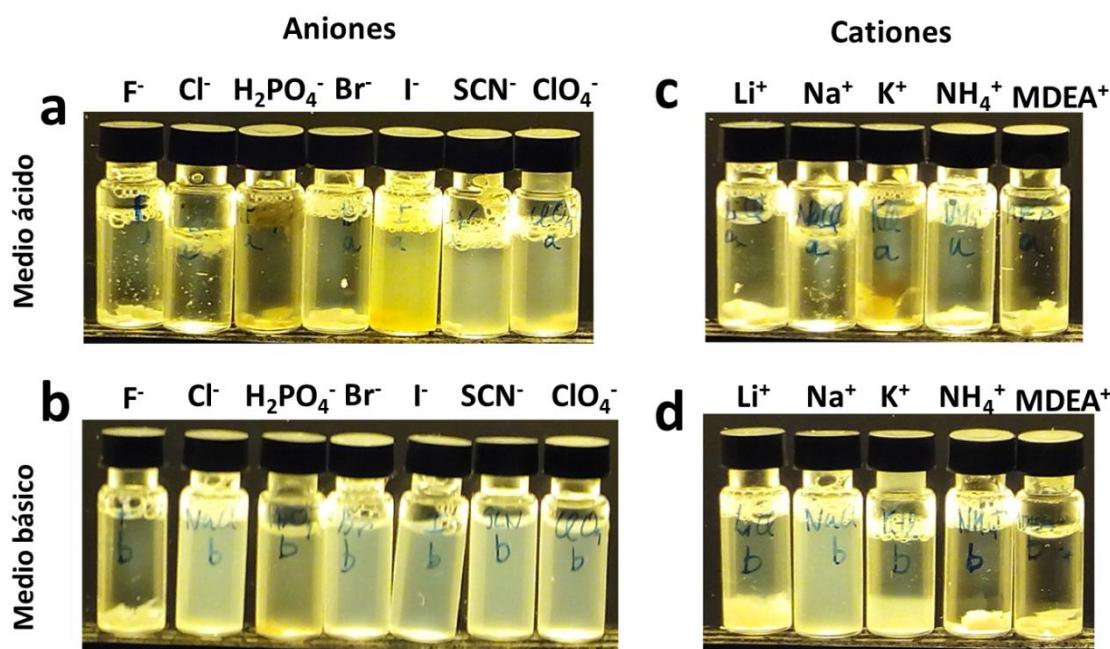


Figura 4. Evolución a lo largo del tiempo de las disoluciones de clara de huevo cocido y distintas sales sódicas en a) medio ácido y b) medio básico.

DISCUSIÓN

La discusión concerniente a la explicación de la solubilidad de la clara observada en los distintos casos debe ser analizada atendiendo a distintos planos fenomenológicos. El grado de solubilidad de la clara en función del pH puede estar regido por la proporción de aminoácidos de la misma. Una mayor proporción de aminoácidos básicos favorecería su solubilidad a pH alcalinos, puesto que en ellos la repulsión intra e inter-macromolecular es mayor.

La especificidad iónica también tiene varios rangos de actuación (Figura 5). En primer lugar el pH condiciona la carga neta de la proteína y ello la atracción o repulsión de ciertos contraíones presentes en disolución. La especificidad, por ello, debe ser más relevante entre los contraíones cargados con carga opuesta a la carga neta total de la proteína, esto es, las especificidades hacia los aniones se ponen más de manifiesto a $\text{pH} < \text{pI}$ mientras que las especificidades hacia los cationes se ponen cuando la carga neta de la proteína es positiva, es decir a $\text{pH} > \text{pI}$.

Como se ha mencionado en el apartado de resultados, la especificidad aniónica a pH ácido sigue una serie directa del tipo $\text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{H}_2\text{PO}_4^- \approx \text{Br}^- < \Gamma^- < \text{SCN}^- < \text{ClO}_4^-$ siendo la clara más soluble en presencia de ClO_4^- que de F^- . Esta serie está de acuerdo con el modelo de Competitividad de *Fajans*, en base a datos termodinámicos de hidratación de distintos iones, recogidos junto con otros datos iónicos relevantes en la Tabla 2. Según se ha resaltado en la introducción, el *Principio de Competitividad de Fajans* implica que aquellos contraíones con semejante energía libre de hidratación, ΔG_{Hid}^0 , tenderán a formar uniones más estables. A $\text{pH} < \text{pI}$ la carga neta de la proteína es positiva y predominan cargas provenientes de la lisina, arginina o histidina. La estructura química de estos grupos cargados puede simplificarse como $\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{NH}^+$ y se podría especular que la energía libre de hidratación de todos los grupos cargados positivamente tendría valores intermedios entre el valor del catión amonio, NH_4^+ , y el tetrametilamonio, $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$. Atribuyéndoles un valor de $\Delta G_{\text{Hid}}^0 \approx -250 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, y aplicando la regla de competitividad diríamos que los aniones que más deberían asociarse con estos grupos serían el $\text{ClO}_4^- (-229 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$, el $\Gamma^- (-280 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$ y el $\text{SCN}^- (-291 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$. Estos son, precisamente los aniones que provocan una mayor solubilización de la clara y la razón puede ser la preferente formación de estos pares iónicos frente a los originalmente presentes entre macromoléculas como los formados entre residuos cargados positivamente y residuos carboxilato (para el acetato $\Delta G_{\text{Hid}}^0 \approx -374 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Este mismo razonamiento explicaría porque en medio básico es el $\text{Na}^+ (\Delta G_{\text{Hid}}^0 \approx -383 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$ el que más pareciera favorecer la solubilidad de la clara, ya que formaría pares iónicos más estables con el carboxilato que éste con otros cationes, inclusive los de la propia proteína.

Tabla 2. Propiedades físico-químicas de algunos iones relevantes.

	<i>Ion</i>	B^o $dm^3 \cdot mol^{-1}$	r_c^c nm	r^H nm	ΔH_{hidr}^S $kJ \cdot mol^{-1}$	ΔS_{hidr}^S $J \cdot mol^{-1}$	ΔG_{hidr}^S $kJ \cdot mol^{-1}$
Cationes	Li^+	0,150 [29]	0,078 [30]	0,382 ^ψ	-531	-142	-489
	Na^+	0,085	0,11	0,358 ^ψ	-416	-111	-383
	K^+	-0,007	0,13	0,331 ^ψ	-334	-74	-312
	NH_4^+	-0,007 [29]	0,16 [31]	0,331 ^ψ	-329	-112	-296
	$(CH_3)_4N^+$	0,28	0,28	0,367 ^ψ	-218	-144	-175
	$(CH_3CH_2)_4N^+$	0,318 ^γ [32]	0,34 [33]	0,400 ^ψ			
Aniones	F^-	0,100 [29]	0,12 [34]	0,352 ^ψ	-510	-137	-472
	Cl^-	-0,007 [29]	0,17 [35]	0,332 ^ψ	-367	-75	-345
	Br^-	-0,032 [29]	0,19 [36]	0,330 ^ψ	-336	-59	-318
	I^-	-0,068 [29]	0,20 [37]	0,331 ^ψ	-291	-36	-280
	SCN^-	-0,103 [38]	0,21 [39]		-311	-66	-291
	ClO_4^-	-0,061 [29]	0,23 [40]	0,338 ^ψ	-246	-57	-229
	CH_3COO^-	0,236	0,297		-425	-170	-374
	HCO_3^-	0,13 [41]		0,301 [42] ^H	-384	-137	-343
	$H_2PO_4^-$	0,34 [41]		0,302 [43] ^H	-522	-166	-473

^oParámetro de viscosidad "Jones-Dole". ^cRadio iónico en estado cristalino. ^HRadio iónico hidratado.

^ψNightgale (1959) [44]; [§]Marcus (1997) [41]

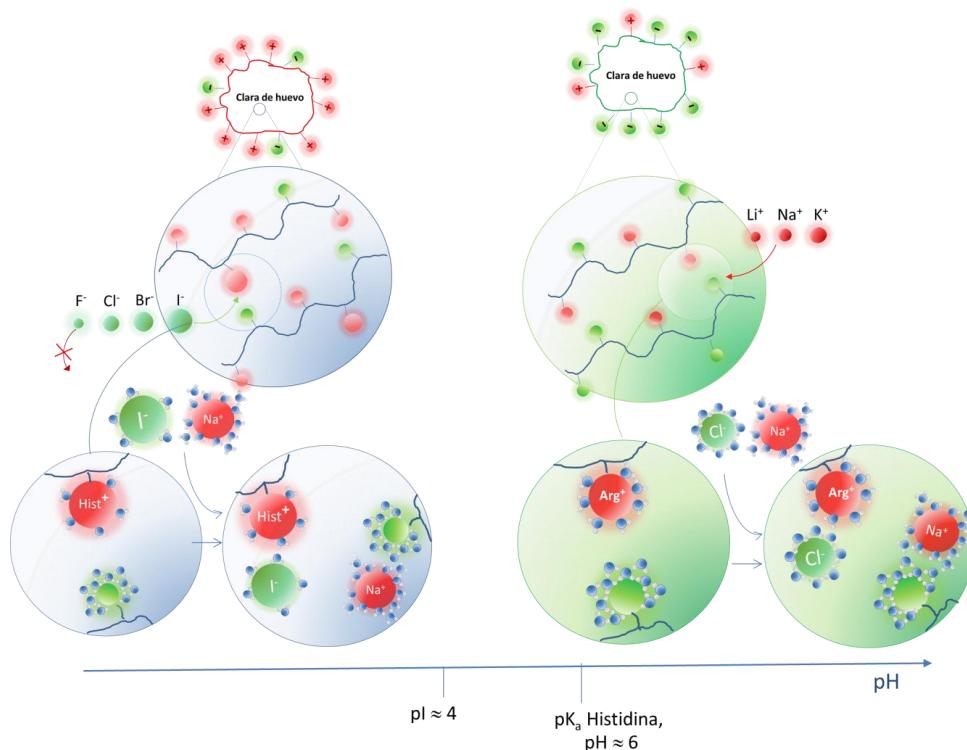


Figura 5. Esquema de la interacción preferente de los distintos iones en función del pH y de la naturaleza del ión. a) A $pH < pI$ la difusión de los aniones a través de la proteína cargada positivamente impone la relevancia de los efectos específicos aniónicos. Los aniones voluminosos, poco hidratados, tienden a interactuar mejor con grupos como la Histidina o la Arginina, y rompen los enlaces iónicos intermoleculares, y b) A $pH > pI$ la especificidad catiónica se pone de relieve y el Na^+ es el catión que más capacidad tiene de interactuar con el carboxilato.

CONCLUSIONES

Un sencillo experimento de solubilidad de la clara de huevo en medio ácido ($\text{pH} < \text{pI}$) y medio básico ($\text{pH} > \text{pI}$) en presencia de distintas sales pone de manifiesto la fenomenología ión–macromolécula. Atendiendo a la composición de la clara de huevo y a datos termodinámicos de hidratación iónica, los resultados de solubilidad observados pueden relacionarse con el *Principio de Competitividad de Fajans* o también conocido como *Regla de Afinidades al Agua Equivalentes*.

Agradecimientos. El autor agradece el apoyo y comentarios constructivos del Profesor Alejandro Müller Sánchez de la Facultad de Química (UPV/EHU) de San Sebastián. También agradece el trabajo realizado por el estudiante Tomás Soria Biurrum en la experimentación con queratina cuyos resultados esperamos publicar en breve y se relacionarán con los presentes, y han ayudado a tomar una perspectiva global de la fenomenología. El autor quisiera agradecer el programa de Captación de Talento de la UPNA, financiado por Obra Social la Caixa y Fundación Caja Navarra.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Mayolo-Deloisa K, Martínez LM, Rito-Palomares M "Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas", *Rev. Mex. Ing. Quím.*, **11**(3), 415 (2012)
- [2] Voet D, Voet JG, Pratt CW "Fundamentos de Bioquímica". Sección 5–2 Purificación de proteínas, p. 101, Ed. Panamericana, Buenos Aires, 2009
- [3] Vollrath F, Porter D, Holland C "There are many more lessons still to be learned from spider silks", *Soft Mat.*, **7**, 9595 (2011)
- [4] Knight DP, Vollrath F "Changes in element composition along the spinning duct in a *Nephila* spider", *Naturwissenschaften*, **88**, 179 (2001)
- [5] Lorenzo-Andreu A "Acción de varias sales alcalinas sobre la división celular de *Allium cepa*", *An. Estac. Exp. Aula Dei*, **2**(2), 174 (1951)
- [6] Roughton FJ, Booth VH "The manometric determination of the activity of carbonic anhydrase under varied conditions", *Biochem J.*, **40**(2), 309 (1946).
- [7] Ramos CHI, Baldwin RL "Sulfate anion stabilization of native ribonuclease A both by anion binding and by the Hofmeister effect", *Protein Sci.*, **11**(7), 1771 (2002)
- [8] Nebot VJ, Ojeda-Flores JJ, Smets J, Fernández-Prieto, Escuder B, Miravet JF "Rational Design of Heat–Set and Specific–Ion–Responsive Supramolecular Hydrogels Based on the Hofmeister Effect", *Chem. Eur. J.*, **20**, 14465 (2014)
- [9] Fernández-d'Arlas B, Pérez-Camargo R, Müller AJ en "Copolímeros con alta densidad de uretano". Congreso: Avances en Materiales Poliméricos. XIV Reunión del grupo especializado de polímeros (GEP) de la RSEQ y RSEF. Burgos, España, 2016
- [10] Fernández-d'Arlas B "Series liotrópicas en la Química Macromolecular", *An. Quím.*, **112**(2), 79 (2016)
- [11] Okur HI, Hladíková J, Rembert KB, Cho Y, Heyda J, Dzubiella J, Cremer PS, Jungwirth P "Beyond the Hofmeister Series: Ion–Specific Effects on Proteins and Their Biological Functions", *J. Phys. Chem. B*, **121**, 1997 (2017)
- [12] Rembert KB, Paterová J, Heyda J, Hiltý C, Jungwirth P, Cremer PS "Molecular Mechanisms of Ion–Specific Effects on Proteins" *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 10039 (2012)
- [13] Fernández-d'Arlas B, Huertos MA, Müller AJ "Ion–macromolecule interactions studied with model polyurethanes" *J. Coll. Interf. Sci.*, **509**, 102 (2018)
- [14] Zhao J, Wang J "Uncovering the Sensitivity of Amide-II Vibration to Peptide–Ion Interactions" *J. Phys. Chem. B*, **120**, 9590 (2016)
- [15] Pluharova E, Baer MD, Mundy CJ, Schmidt B, Jungwirth "Aqueous Cation–Amide Binding: Free Energies and IR Spectral Signatures by Ab Initio Molecular Dynamics" *J. Phys. Chem. Lett.*, **5**, 2235 (2014)
- [16] López-León T "Efectos Hofmeister en Sistemas Coloidales" Tesis Doctoral, Universidad de Granada, España, 2004

- [17] López-León T, Jódar-Reyes AB, Ortega-Vinuesa JL, Bastos-González D "Hofmeister effects on the colloidal stability of an IgG-coated polystyrene latex" *J.Coll. Interf. Sci.*, **284** 139 (2005)
- [18] Fernández-d'Arlas B, Müller AJ "Serie inversa de Hofmeister en la interacción de un poliuretano cationmérico y diversos aniones monovalentes" *Rev. Iberoam. Polímeros*, **18**(1), 9 (2017)
- [19] Masom PE, Heyda J, Fischer HE, Jungwirth P "Specific Interactions of Ammonium Functionalities in Amino Acids with Aqueous Fluoride and Iodide" *J. Phys. Chem. B*, **114**, 13853 (2010)
- [20] Kherb J, Flores SC, Cremer PS "Role of Carboxylate Side Chains in the Cation Hofmeister Series" *J. Phys. Chem. B.*, **116**, 7389 (2012)
- [21] Fajans K "Löslichkeit und Ionisation vom Standpunkte der Atomstruktur" *Naturwiss.*, **9**, 729 (1921)
- [22] Morris DFC "Ionic Radii and Enthalpies of Hydration of Ions" *Struct. Bond*, **6**, 157–159 (1968).
- [23] Lewith S "Zur Lehre von del Wirkung der Salze. Ersrte Mittheilung. Das Verhalten der Eiweisskörper des Blutserums gegen Salze". *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.*, **24**, 1 (1887)
- [24] Hofmeister F "Zur Lehre von del Wirkung der Salze. Zweite Mittheilung. Ueber Regelmässigkeiten in der eiweissfällenden Wirkung der Saltze und ihre Beziehung zum physiologischen Verhalten derselben", *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.*, **24**, 247 (1887)
- [25] Hofmeister F "Zur Lehre von del Wirkung der Salze. Dritte Mittheilung. Ueber die wasserentziehende Wirkung der Salze" *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.*, **25**, 1 (1888).
- [26] Hofmeister F "Zur Lehre von del Wirkung der Salze. Sechste Mittheilung. Die Beteiligung gelöster Stoffe and Quellungsvorgängen", *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.*, **28**, 210 (1891).
- [27] Sørensen SPL "Études enzymatiques. II. Sur la mesure et l'importance de la concentration des ions hydrogène dans les réactions enzymatiques". *Compt. rend. du Lab. de Carlsberg*, **8**, 1 (1909)
- [28] McMurry J "Química Orgánica". 5^a Ed. Intern. Thomsom Editores, México, 2001.
- [29] Robinson RA, Stokes RH "Electrolyte Solutions", Butterworths Scientific Pub., Londres, 1959
- [30] Shackelford, J.F.; Alexander, W "CRC Materials Science and Engineering Handbook", 3rd ed., CRC Press, Boca Ratón, Florida, 2001
- [31] Kiriukhin MY, Collins KD "Dynamic hydration numbers for biologically important ions", *Biophys. Chem.*, **99**, 155 (2002)
- [32] Franco C, Costa JM "Aplicación tratamiento del estado de transición a la viscosidad de disoluciones de Et4NBr en mezclas de acetonitrilo-agua. XVIII Reunión Real Sociedad Española de Física y Química", Comunicación 17.3. Burgos, 29 Sep.–3 Oct., 1980.
- [33] Marcus, Y "Thermodynamics of ion hydration and its interpretation in terms of a common model" *Pure & Appl. Chem.*, **59**, 1093 (1987)
- [34] Rayner-Canham G, Overton T "Descriptive Inorganic Chemistry", 4^a ed., W.H. Freeman Publishing Co., Nueva York, 2006
- [35] David F, Vokhmin V, Ionova G "Water characteristics depend on the ionic environment" *J. Mol. Liq.*, **90**, 45 (2001)
- [36] Tansel B "Significance of thermodynamic and physical characteristics on permeation of ions during membrane separation: Hydrated radius, hydration free energy and viscous effects", *Separat. Purif. Technol.*, **86**, 119 (2012)
- [37] Harris DC "Quantitative Chemical Analysis", 6^a ed., WH Freeman Publishing Co., Nueva York, 2003
- [38] Robinson Jr. JB, Strottman JM, Stellwagen E "Prediction of neutral salt elution profiles for affinity chromatography" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2287 (1981).
- [39] Mason PE, Neilson GW, Dempsey CE, Barnes AC, Cruickshank JM "The hydration structure of guanidinium and thiocyanate ions: Implications for protein stability in aqueous solution" *PNAS*, **100**, 4557 (2003)
- [40] House JE "Inorganic Chemistry", Academic Press, Burlington, Massachusetts, EE.UU, 2008
- [41] Marcus Y "Ion Properties" Marcel Dekker (edit.), Nueva York, EE.UU, 1997
- [42] Georgievich G "Electrolites: Supramolecular interacctions and non equilibrium phenomena in concentrated solutions". CRS Press, Boca Ratón, Florida, 2014
- [43] Kiriukhin MY, Collins KD "Dynamic hydration numbers for biologically important ions" *Biophys. Chem.*, **99**, 155 (2002)
- [44] Nightingale ER "Phenomenological Theory of Ion Solvation. Effective Radii of Hydrated Ions" *J. Phys. Chem.*, **63**(9), 1381 (1959)