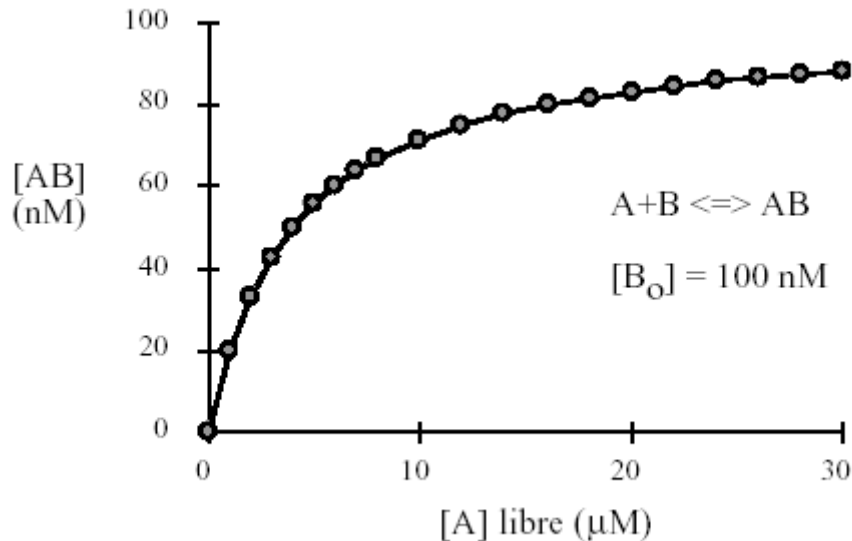


Los experimentos sobre el equilibrio estudian cómo la concentración de los productos de la reacción varía en función de la concentración de los reactivos y/o de las condiciones de la reacción. Para una típica reacción bimolecular en equilibrio, como por ejemplo, $A + B \rightleftharpoons AB$, se podría valorar una cantidad establecida del reactivo [B] con cantidades cada vez mayores del reactivo [A] y determinar, así, la concentración de equilibrio del producto [AB].



La forma de la curva de equilibrio depende del mecanismo de reacción y se puede emplear para elegir entre distintos modelos de equilibrio.

Constantes de equilibrio

Una **constante de equilibrio**, representada por K (mayúscula), es la relación existente entre las concentraciones en equilibrio de reactivos y productos o viceversa.

Para la reacción bimolecular $A + B \rightleftharpoons AB$, podemos definir una **constante de disociación en el equilibrio** (K_d) y otra **de asociación** (K_a), relacionadas entre sí del siguiente modo:

$$K_d = \frac{[A][B]}{[AB]} \quad \leftarrow \quad K_a = \frac{[AB]}{[A][B]} \quad \leftarrow$$

En las reacciones bimoleculares, las unidades de K_d son unidades de concentración (M, mM, μM, etc.) y las de K_a son las de concentración⁻¹ (M⁻¹, mM⁻¹, μM⁻¹, etc.).

Para una reacción unimolecular de plegamiento de proteína $D \Leftrightarrow N$, podemos definir una **constante de desplegamiento en el equilibrio** (K_D) o una de **plegamiento** (K_N), ambas relacionadas entre sí:

$$K_D = \frac{[D]}{[N]} \quad \leftarrow \quad K_N = \frac{[N]}{[D]} \quad \leftarrow$$

Estas constantes de equilibrio, al igual que todas las de las reacciones unimoleculares, carecen de unidades.

Para cualquier expresión de equilibrio, el sentido en el que tiene lugar la reacción (es decir, disociación frente a asociación o plegamiento frente a desplegamiento) va desde las especies moleculares situadas a la derecha de la expresión en la parte inferior, hacia las que se encuentran sobre ellas.

Las constantes de equilibrio de una reacción del tipo: $nA + mB \Leftrightarrow A_n B_m$, son:

$$K_d = \frac{[A]^n[B]^m}{[A_n B_m]} \quad \leftarrow \quad K_a = \frac{[A_n B_m]}{[A]^n[B]^m} \quad \leftarrow$$

El valor de cualquier constante de equilibrio sólo será constante para una determinada temperatura, presión, etc. De este modo, las constantes de equilibrio de una misma reacción a distintas temperaturas (p. ej., a 20 °C y 37 °C) podrían ser muy distintas.

¿Por qué las reacciones alcanzan un equilibrio?

Independientemente del mecanismo, todas las reacciones reversibles alcanzan una distribución en equilibrio de reactivos y productos cuando la velocidad de las reacciones que tienen lugar en ambos sentidos se iguala.

Estudiar la velocidad global a la que varía $[AB]$ en la reacción $A + B \Leftrightarrow AB$.

$$d[AB]/dt = k_{asoc}[A][B] - k_{dis}[AB]$$

Si iniciamos la reacción mezclando A y B libres, la velocidad de asociación ($k_{asoc}[A][B]$) dominará la reacción y la de disociación ($-k_{dis}[AB]$) será menor, ya que habrá muy poca cantidad del complejo AB. Sin embargo, a medida que se forman más complejos, la velocidad de asociación tenderá a disminuir y la de disociación aumentará, debido a que las concentraciones de [A] y [B] irán disminuyendo, mientras aumenta la de [AB]. En algún momento, las velocidades de las reacciones en ambos

sentidos se igualarán y ya no habrá más variaciones en las concentraciones de [AB], [A] o [B].

$$d[AB]/dt = -d[A]/dt = -d[B]/dt = k_{\text{asoc}}[A][B] - k_{\text{dis}}[AB] = 0$$

Bajo estas condiciones:

$$\frac{[A][B]}{[AB]} = \frac{k_{\text{dis}}}{k_{\text{asoc}}} = \mathbf{K_d}$$

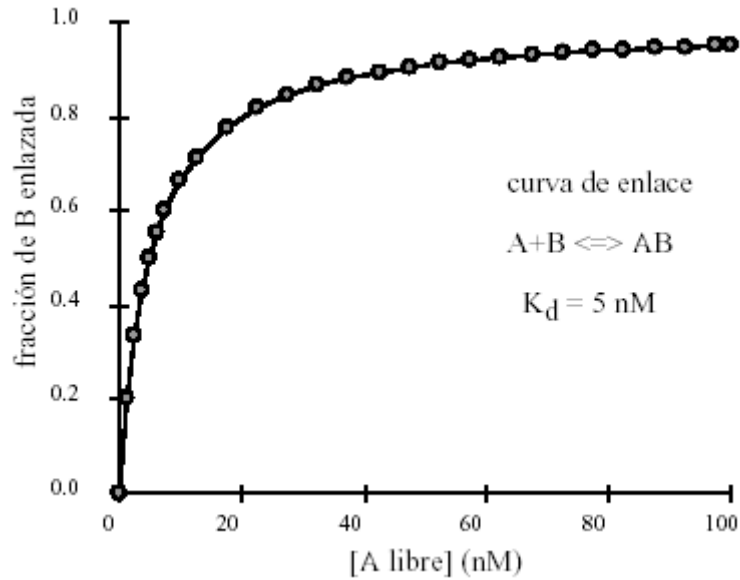
Esta expresión muestra que entre las concentraciones en equilibrio de reactivos y productos habrá una relación constante (K_d) que será igual a la relación existente entre las constantes de velocidad directa e inversa.

K_d recibe el nombre de constante de disociación en equilibrio. Las concentraciones en equilibrio de reactivos y productos podrían estar caracterizadas también por una constante de asociación en equilibrio (K_a), que sería simplemente la recíproca de K_d .

Determinación de K_d o K_a en reacciones bimoleculares

Para estudiar de forma experimental una reacción bimolecular en equilibrio, $A + B \rightleftharpoons AB$, se podría empezar por mezclar A y B libres o bien por diluir el complejo AB y, luego, esperar hasta que las concentraciones de [A], [B] y [AB] permanecieran constantes. La relación existente entre las concentraciones en equilibrio que se ha mostrado anteriormente determina el valor de K_d o K_a . En la práctica, los experimentos en los que se estudia el equilibrio se llevan a cabo con muchas concentraciones iniciales distintas, para comprobar que el modelo de equilibrio es correcto y que los valores que se obtienen para K_d y K_a son siempre los mismos, independientemente de las concentraciones iniciales. Por lo general, se establece un valor fijo para la concentración inicial de uno de los reactivos (p. ej., $[B_0]$) y, luego, en distintos experimentos, se le añaden concentraciones iniciales cada vez mayores del otro reactivo ($[A_0]$). Para cada conjunto de concentraciones, se espera a que la reacción alcance el equilibrio y, entonces, se miden [A], [B] y [AB]. Hay tres formas habituales de representar este tipo de datos acerca del equilibrio:

La primera es una simple curva de enlace en la que la fracción de B enlazada se representa frente a la concentración de [A] libre.



La relación matemática existente entre la fracción de B enlazada y la concentración libre de [A], es clara.

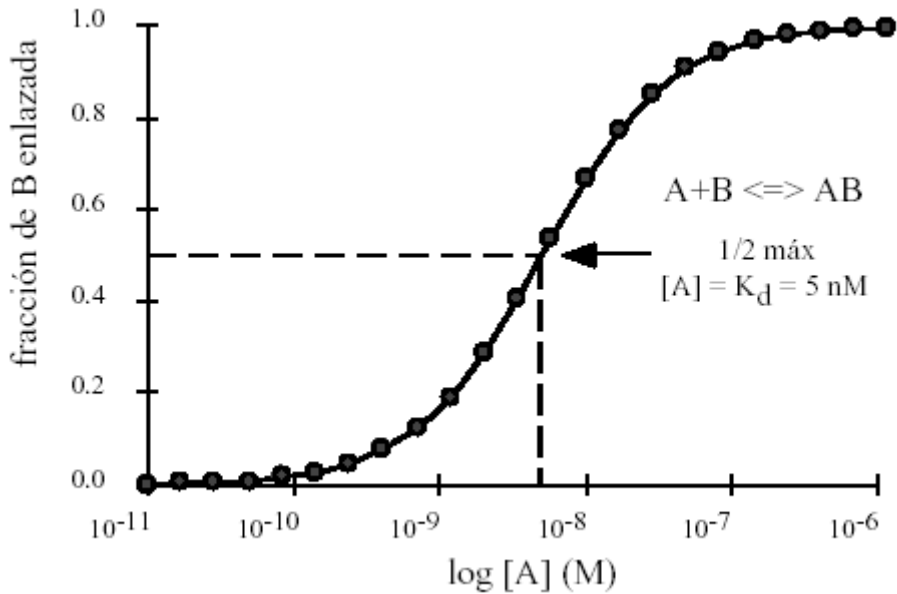
$$\text{Fracción de B enlazada} = \frac{[AB]}{[B]+[AB]} = \frac{1}{\frac{[B]}{[AB]} + 1} = \frac{1}{\frac{K_d}{[A]} + 1} = \frac{[A]}{K_d + [A]}$$

Esta es la ecuación de una hipérbola rectangular; con frecuencia, las curvas de enlace bimoleculares reciben el nombre de curvas de enlace hiperbólicas.

La fracción de B enlazada se representa, a menudo, como Θ_b , de modo que:

$$\Theta_b = \frac{[A]}{K_d + [A]}$$

A partir de esta expresión es fácil deducir que, si $[A] = K_d$, $\Theta_b = 0,5$. Así, la mitad del número máximo de enlaces de B se alcanza cuando la concentración de A libre es igual a K_d . De este modo, resulta sencillo calcular K_d sólo con estudiar la curva de enlace. A continuación se muestran los mismos datos de enlace, pero representados frente a $\log[A]$.



En cualquier reacción bimolecular, el 10% de B estará enlazado cuando $[A] = K_d/9$ y el 90% de B, cuando $[A] = 9K_d$. Esto quiere decir que el 80% de la reacción de enlace tiene lugar por encima de un rango de concentración de alrededor de 80 en $[A]$, con el centro en torno a K_d .

Los datos del enlace bimolecular se pueden transformar también en una forma lineal para representarlos según la ecuación de Scatchard.

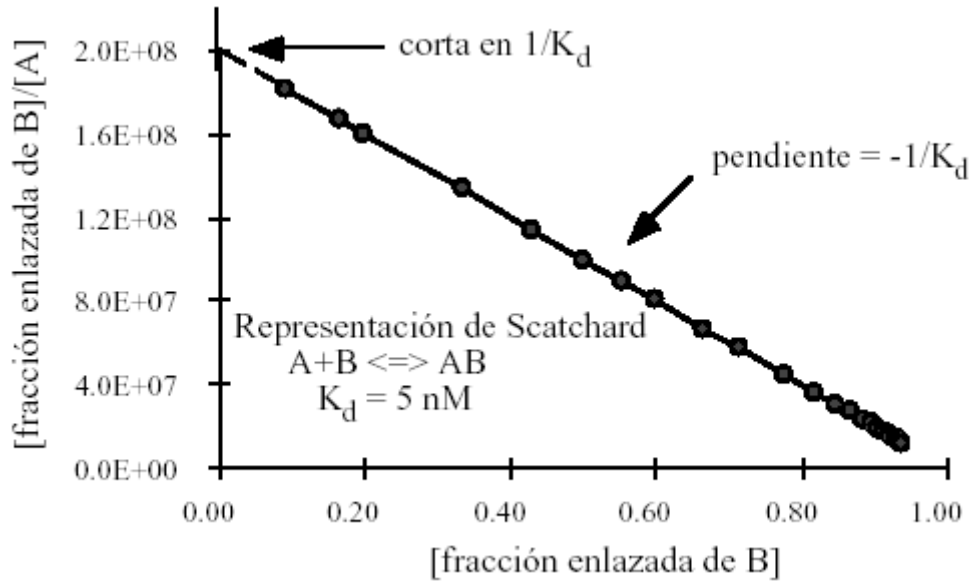
$$\Theta_b = \frac{[A]}{K_d + [A]} \quad \text{se transforma en} \quad \Theta_b K_d + \Theta_b [A] = [A]$$

$$\Theta_b K_d/[A] + \Theta_b = 1$$

$$\Theta_b K_d/[A] = 1 - \Theta_b$$

$$\frac{\Theta_b}{[A]} = -\frac{\Theta_b}{K_d} + \frac{1}{K_d}$$

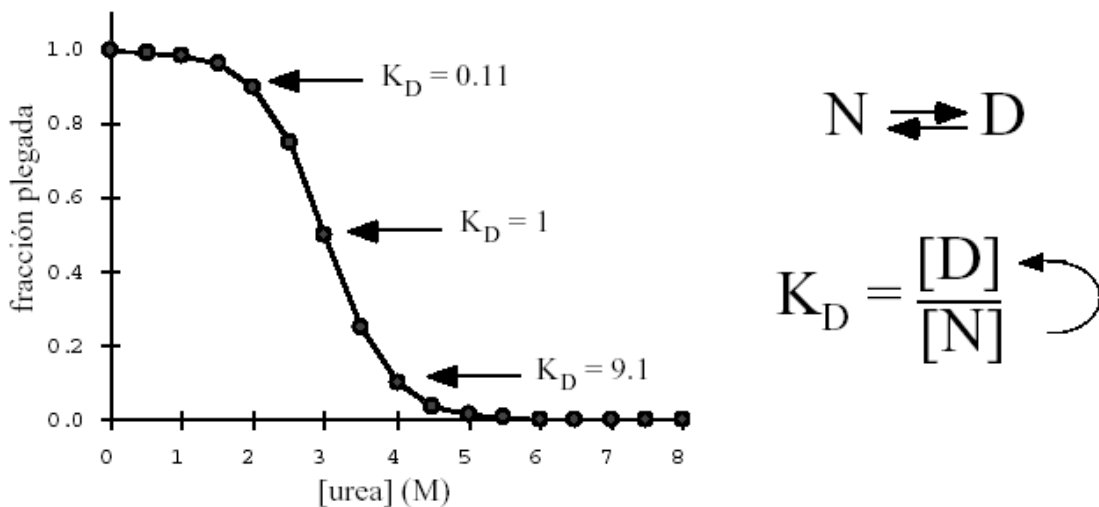
De este modo, representando gráficamente $\Theta_b/[A]$ como función de Θ_b , deberíamos obtener una línea recta con una pendiente de $-1/K_d$. En la gráfica de Scatchard que se muestra a continuación se representan los mismos datos utilizados en anteriores las curvas de enlace.



Las curvas de enlace hiperbólicas y las representaciones lineales de Scatchard sirven para reconocer reacciones bimoleculares sencillas. Más adelante, demostraremos que las reacciones de orden más elevado, como por ejemplo, $2A+B \rightleftharpoons A_2B$ y $3A+B \rightleftharpoons A_3B$, tienen como resultado representaciones de Scatchard cóncavas descendentes y curvas de enlace con formas sigmoideas.

Equilibrios unimoleculares

Las reacciones de equilibrio, como la del plegamiento de una proteína, que implican un cambio conformacional en una molécula se estudian, por lo general, determinando las concentraciones del reactivo y el producto en función de algún cambio medioambiental que perturbe el equilibrio. Podría ser, por ejemplo, el pH, la temperatura, la presión, algún desnaturizante químico, etc. En el ejemplo mostrado a continuación, se emplea la urea como desnaturizante para estudiar el desplegamiento de una proteína monomérica.



En este caso, se pueden calcular las constantes de equilibrio (K_D) del desplegamiento de la proteína para cada una de las concentraciones de urea, de 2 a 4,5M aproximadamente, donde hay presentes concentraciones apreciables de la proteína tanto plegada como desplegada. Por ejemplo, a una concentración de urea 3M, las cantidades de proteína nativa y desnaturalizada son iguales y, de ese modo, $K_D = 1$. Sin embargo, para calcular el valor de K_D sin la presencia de urea o a una concentración de urea 8M, necesitaríamos un modelo sobre el modo en el que K_D varía en función de la concentración de ésta. Por lo general, se observa que el $\ln K_D$ varía linealmente con respecto a la concentración de urea, permitiendo el cálculo de K_D en ausencia de ella.

Problemas frecuentes al calcular las constantes de equilibrio

Hay varios errores frecuentes que nos pueden llevar a un cálculo incorrecto de las constantes de equilibrio:

- (1) Utilizar concentraciones de especies que no sean concentraciones de equilibrio. Cualquier experimento de equilibrio tiene un componente cinético. Una vez que se inicia la reacción hay que esperar una cierta cantidad de tiempo antes de medir los productos. Si este tiempo es muy corto, puede que las concentraciones de reactivos y productos estén cambiando todavía. Una buena forma de comprobar si la reacción ha alcanzado o no el equilibrio es ver si la etapa final a la que se ha llegado es la misma independientemente de que se haya iniciado la reacción añadiendo reactivos o productos.
- (2) Emplear concentraciones **totales** en lugar de concentraciones **libres** en la expresión de equilibrio.
- (3) Utilizar un modelo de equilibrio erróneo. El cociente $[A][B]/[AB]$ sólo será constante en equilibrio para el modelo $A + B \rightleftharpoons AB$.

Reacciones que producen cambios en la forma oligomérica

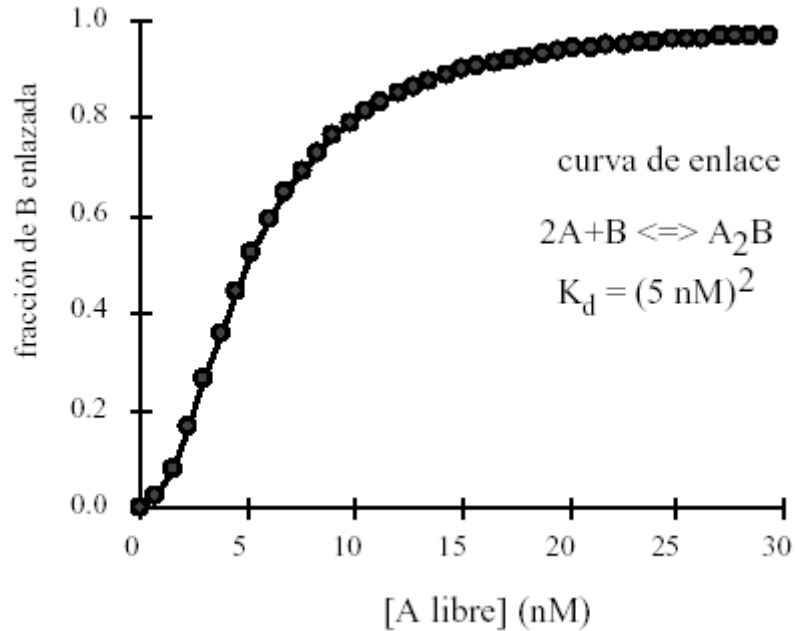
Las proteínas oligoméricas son muy frecuentes en biología. Supongamos una reacción en la que dos moléculas de A libre se combinen con B para formar un complejo A_2B sin intermediarios detectables.



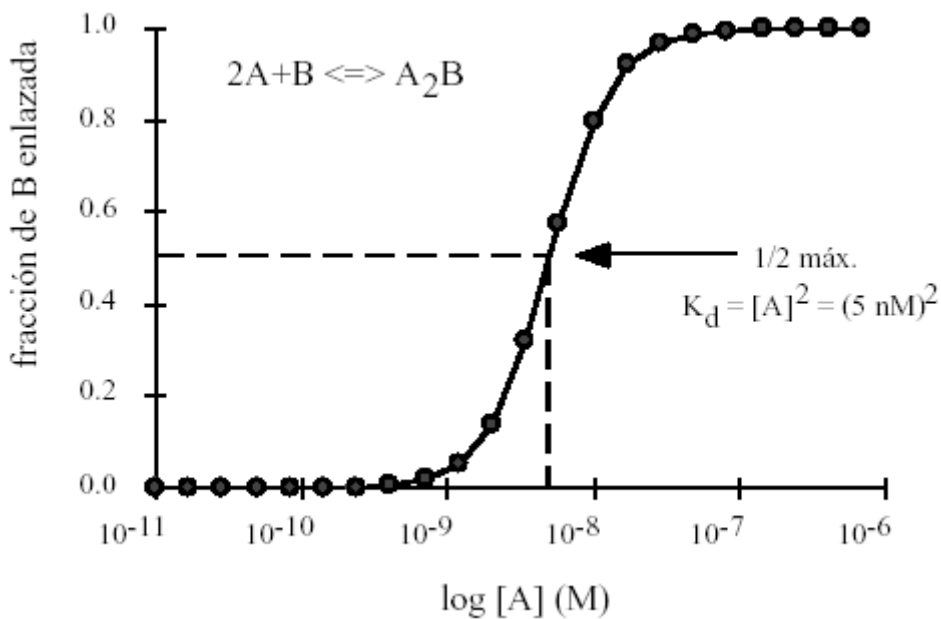
Para calcular K_d , cuyas unidades en esta reacción son M^2 , valoramos una cantidad fija de [B] con cantidades en aumento de [A] y medimos la fracción de B enlazada. La ecuación que relaciona la fracción de [B] enlazado con [A] para este modelo de equilibrio es la siguiente:

$$\text{Fracción de B enlazada} = \frac{[A_2B]}{[B]+[A_2B]} = \frac{1}{\frac{[B]}{[A_2B]} + 1} = \frac{1}{\frac{K_d}{[A]^2} + 1} = \frac{[A]^2}{K_d + [A]^2}$$

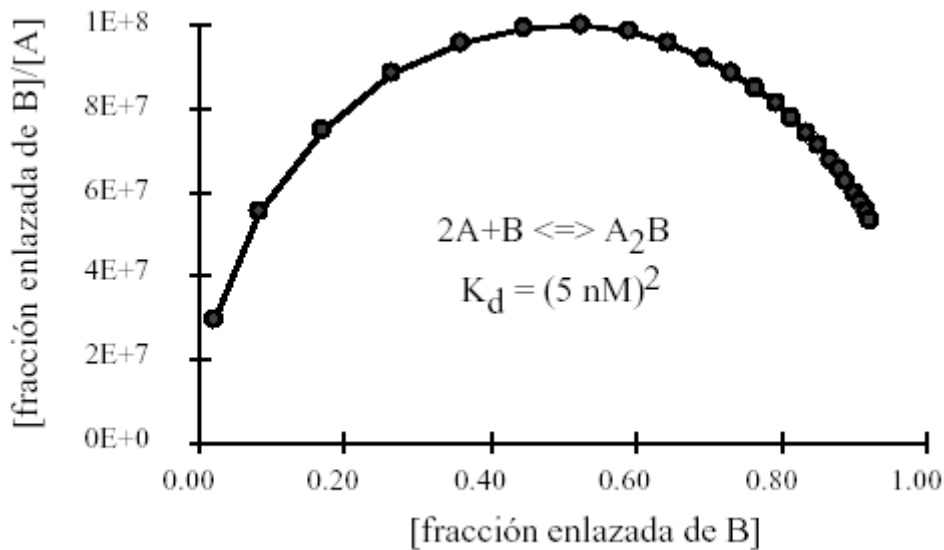
La curva de enlace de este modelo de equilibrio presenta una forma de S o sigmoidea como la que se puede ver a continuación:



Obsérvese también que $K_d = [A]^2$ cuando la mitad de B disponible está enlazada. La representación de estos datos en una escala logarítmica destaca que la curva de enlace tiene una pendiente mucho más pronunciada que en el caso $A + B \rightleftharpoons AB$ simple. Ahora, el 90% de la reacción de enlace tiene lugar en un rango de concentración de [A] de orden 9 con el centro próximo a la mitad del número de enlaces máximos.



La representación de Scatchard para esta reacción es cóncava y descendente, lo que indica que se trata de una reacción con cooperatividad¹ positiva. En este caso, la cooperatividad surge debido a que A se dimeriza en el complejo A₂B enlazado.



En el caso general, cuando se combinan n moléculas de A con una molécula de B para formar un complejo:

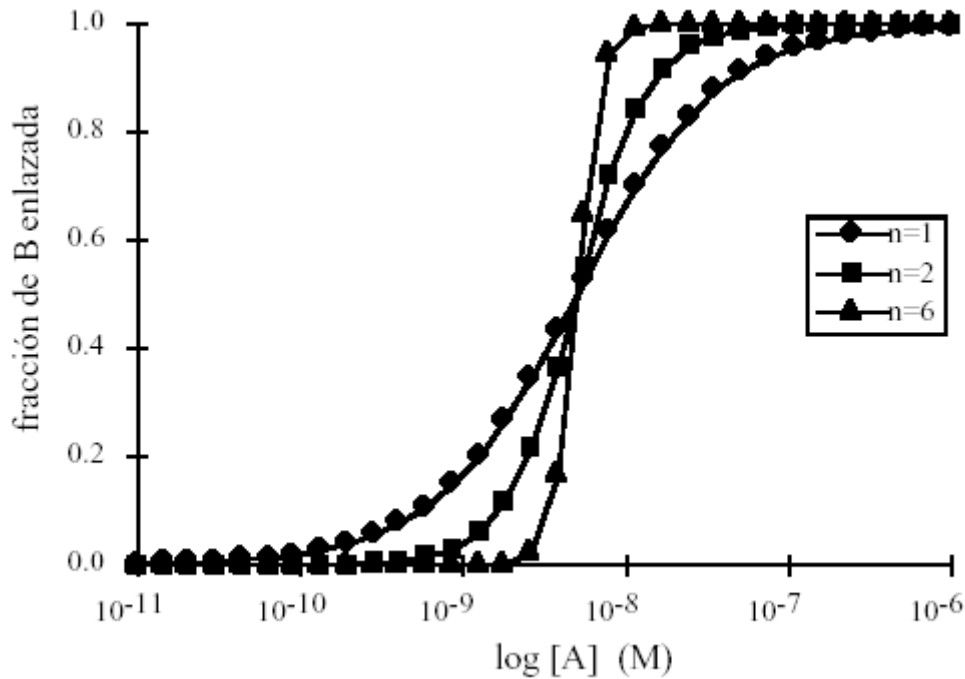


Si los intermediarios no están concentrados:

$$\text{La fracción de B enlazada} = \frac{[A]^n}{K_d + [A]^n}$$

Así, para una reacción totalmente cooperativa, a medida que el número de subunidades (n) aumenta, la pendiente de la representación gráfica de la fracción de B enlazada frente a [A] se vuelve cada vez más pronunciada. La siguiente gráfica muestra la representación de las subunidades n=1, n=2 y n=6.

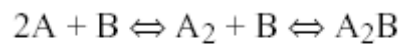
¹ Para una reacción del tipo $2A + B \rightleftharpoons A_2B$, la cooperatividad positiva significa que los intermediarios potenciales de la reacción (p. ej. A₂ ó AB) están muy poco concentrados en relación con las etapas finales en las que se alcanza el equilibrio.



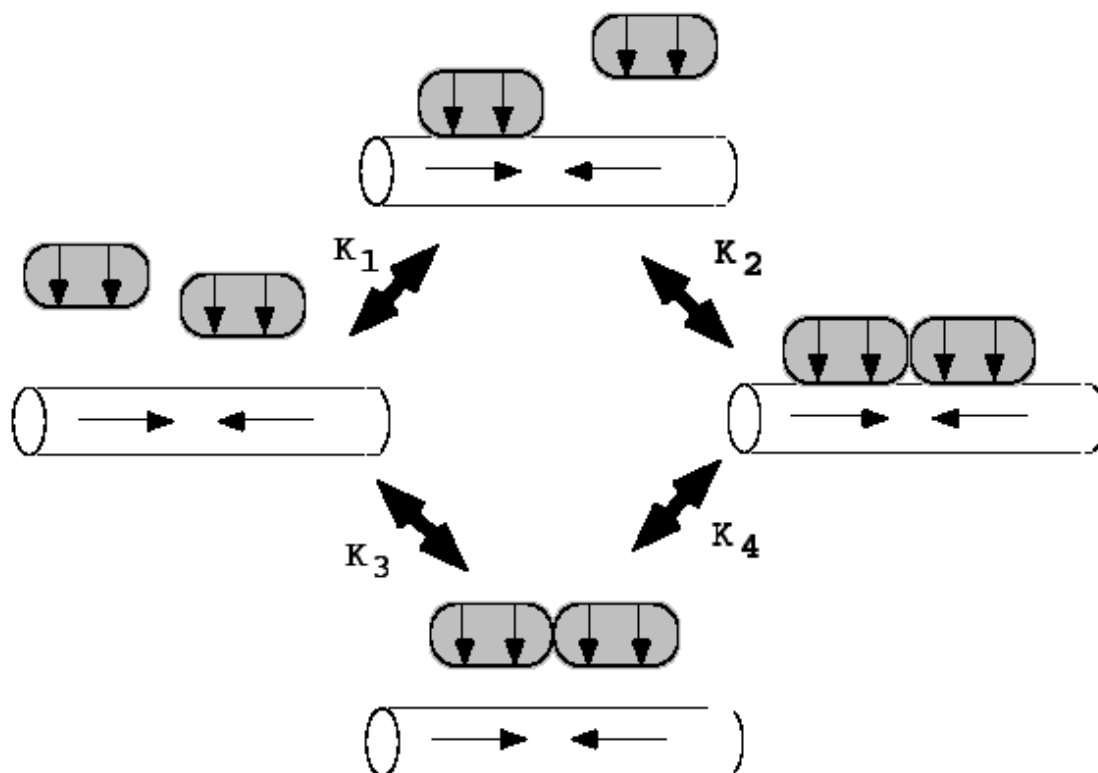
Los enlaces en sistemas cooperativos con grandes cambios en el proceso oligomérico pueden ser extraordinariamente sensibles a pequeños cambios en la concentración del ligando.

Los procesos intermedios en las reacciones de equilibrio

Es raro que los complejos que contienen tres o más moléculas se formen en una sola etapa en la que colisionen todas las moléculas simultáneamente. Por lo general, es mucho más probable que dichas reacciones se desarrollen mediante sucesivas reacciones bimoleculares. En la reacción $2A + B \rightleftharpoons A_2B$, A podría dimerizarse primero y luego unirse a B. Otra opción sería que una sola molécula de A pudiera unirse a B en una etapa, y que la segunda molécula de A se les uniera en otra etapa. Estas reacciones se escribirían del siguiente modo:



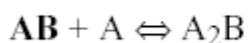
Y, en el siguiente diagrama, se muestran de forma esquemática para una proteína enlazante de ADN:



Cualquiera de los dos caminos de formación consiste en dos equilibrios **combinados**. En cualquier conjunto de procesos combinados, cada etapa afecta a su adyacente únicamente cambiando la concentración de un participante común mediante la acción de masas. Si examinamos el camino superior K_1K_2 , los procesos combinados serán:

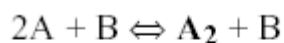


$$K_1 = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

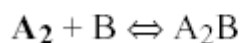


$$K_2 = \frac{[AB][A]}{[A_2B]}$$

AB es la especie más frecuente en los equilibrios K_1 y K_2 . Así, al aumentar las concentraciones de $[A]$ libre o de $[B]$ en la reacción K_1 , se produciría un aumento en la concentración de $[AB]$. Esto, a su vez, tendría como resultado una mayor concentración de A_2B en la reacción K_2 . Como se muestra a continuación, A_2 es la especie molecular más frecuente en las reacciones K_3 y K_4 .



$$K_3 = \frac{[A]^2}{[A_2]}$$



$$K_4 = \frac{[A_2][B]}{[A_2B]}$$

Obsérvese que el producto de las constantes de equilibrio de las etapas K_1 y K_2 es igual al de las constantes de equilibrio de las etapas K_3 y K_4 ; y que ambos productos nos dan la constante de equilibrio de la reacción global.

$$K_1K_2 = K_3K_4 = K_d = [A]^2[B]/[A_2B]$$

Esto se cumple siempre en los equilibrios dobles, porque la concentración de la especie más frecuente desaparece cuando se multiplican las constantes de equilibrio de cada etapa.

En reacciones de equilibrios dobles, una pregunta es si las especies intermediarias tendrán una concentración importante en relación con las etapas finales. La respuesta dependerá de los valores relativos de las constantes de equilibrio de cada etapa. Si las dos etapas son bimoleculares, se puede esperar que las especies intermediarias no presenten concentraciones importantes siempre y cuando la primera constante de disociación en equilibrio sea considerablemente mayor que la segunda y viceversa.

Para el caso descrito anteriormente, suponer que la reacción sigue el camino K_1K_2 con $K_1 = 5 \cdot 10^{-7}M$ y $K_2 = 5 \cdot 10^{-11}M$. De este modo, el enlace del segundo A es mucho más fuerte que el del primero. Por intuición, cualquier concentración de [A] donde cabría esperar que se formara [AB] excederá en gran medida la concentración necesaria para el enlace del segundo A. Por ello, no se esperará que el intermediario [AB] presente concentraciones importantes. Esto se puede demostrar también matemáticamente. Cuando $[A] = 5 \cdot 10^{-9}M$:

$$[AB] = [A][B]/K_1 = 0.01 \cdot [B] \quad \text{y} \quad [A_2B] = [A]^2[B]/K_1K_2 = [B]$$

De este modo, la concentración de [AB] será tan sólo un 1% de las concentraciones de $[A_2B]$ o [B] y este intermediario apenas está concentrado en relación con las etapas finales.

Cuando los intermediarios están presentes en cantidades muy pequeñas en comparación con las etapas finales, se pueden ignorar al calcular la constante de equilibrio de la reacción global. En el caso mencionado, esto equivale a realizar las aproximaciones:

$$[B]_{\text{total}} = [B] + [AB] + [A_2B] \approx [B] + [A_2B]$$

$$[A]_{\text{total}} = [A] + [AB] + 2[A_2B] \approx [A] + 2[A_2B]$$

Algo perfectamente justificable cuando $K_1 \gg K_2$.

¿Qué pasaría si $K_1=K_2 = 5 \cdot 10^{-9}M$? Entonces, cuando $[A] = 5 \cdot 10^{-9}M$:

$$[AB] = [A][B]/K_1 = [B] \quad \text{y} \quad [A_2B] = [A]^2[B]/K_1K_2 = [B]$$

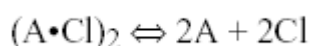
[AB] y $[A_2B]$ presentan ahora la misma concentración y la presencia del intermediario no se puede ignorar en los cálculos del equilibrio. En un caso de este tipo, si tuviésemos un experimento que pudiera distinguir AB de A_2B (quizá uno de filtración por gel o de *footprinting*), se podrían calcular K_1 y K_2 directamente.

Si, por el contrario, los intermediarios se encuentran bastante concentrados y el experimento no puede distinguir entre AB y A₂B, ambas especies tendrían que incluir el cálculo de Θ_b , la fracción de B enlazada.

$$\Theta_b = \frac{[AB]+[A_2B]}{[B]+[AB]+[A_2B]} = \frac{\frac{[A]}{K_1} + \frac{[A]^2}{K_1K_2}}{1 + \frac{[A]}{K_1} + \frac{[A]^2}{K_1K_2}}$$

Equilibrios que incluyen componentes tampón

Es frecuente ensayar el enlace de dos macromoléculas o de un ligando pequeño y una macromolécula en una disolución tampón que contiene componentes que, en principio, podrían participar en la reacción. Suponer, por ejemplo, que dos iones cloruro se enlazan a la interfaz de un dímero y son necesarios para una dimerización estable.



Por intuición, el aumento de la concentración de cloruro incrementaría la formación del complejo. La expresión de equilibrio adecuada para esta reacción es:

$$K_d = [A]^2[Cl]^2/[A \cdot Cl]_2$$

Sin embargo, en estas circunstancias, la constante de equilibrio aparente de la dimerización se escribiría por lo general sin especificación explícita del cloruro:

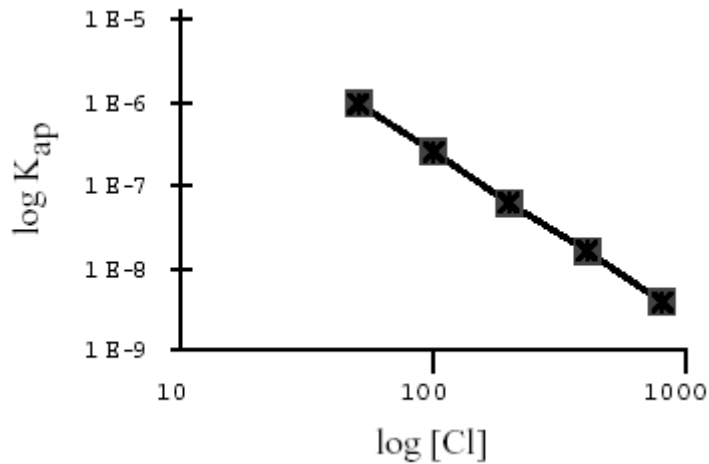
$$K_{ap} = [A]^2/[A_2]$$

Un poco de álgebra nos lleva a:

$$K_{ap} = K_d/[Cl]^2$$

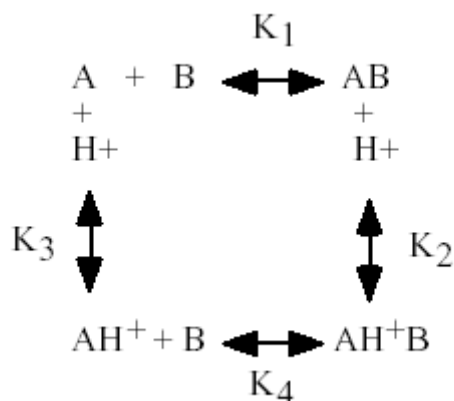
$$\log(K_{ap}) = \ln(K_d) - 2 \cdot \log[Cl]$$

Así, si se hubiera medido K_{ap} en disoluciones tampón con distintas concentraciones de NaCl, cabría esperar que la gráfica de $\log(K_{ap})$ frente a $\log[Cl]$ fuera una recta con una pendiente de -2 . Este tipo de experimentos pueden ser muy útiles para detectar la participación y la estequiometría de componentes tampón en una reacción.



Obsérvese, sin embargo, que debido a que el ion cloruro y el ion sodio aumentan a la vez que incrementamos la concentración de NaCl, el experimento mostrado anteriormente no indica que sea el cloruro y no el sodio el componente tampón que participa en la reacción. Se podrían realizar experimentos de control para estudiar la dimerización en disoluciones tampón con distintas concentraciones de KCl, KF, NaF, Na₂SO₄, Na₂PO₄, etc.; con el fin de comprobar si el importante es el anión o el catión y si la reacción es específica para un anión o catión determinado.

Las proteínas contienen diversos grupos ionizables y es frecuente que participen protones e iones hidrógeno en las reacciones de plegamiento, de cambio conformacional y de enlace. Así, es habitual que la constante K_{ap} de una reacción varíe en función de la concentración de [H⁺]. El pH es igual a $-\log[H^+]$; de este modo, la representación gráfica de K_{ap} frente al pH nos debería mostrar si es necesario uno o más protones para la reacción. No obstante, en algunas ocasiones, puede que un protón enlazado no sea completamente necesario para una reacción, pero que su presencia modifique la constante de equilibrio. Este conjunto de reacciones se podría escribir del siguiente modo:



Supongamos que probamos a enlazar A con B a un pH bajo en el que todas las especies están protonadas y nos encontramos con que $[AH^+][B]/[AH^+B] = 10^{-9}$ M. Esto nos da una estimación de K₄. A continuación, repetimos el experimento a un pH elevado en el

que las especies no están protonadas y obtenemos $[A][B]/[AB] = 10^{-7}$ M. Como se puede observar, la protonación de A hace que el enlace con A sea 100 veces más fuerte. Puesto que $K_1 K_2 = K_3 K_4$, sabemos que $K_3 = 100 \cdot K_2$ (esto indica simplemente que el protón se enlaza con más fuerza al complejo AB que a A libre).

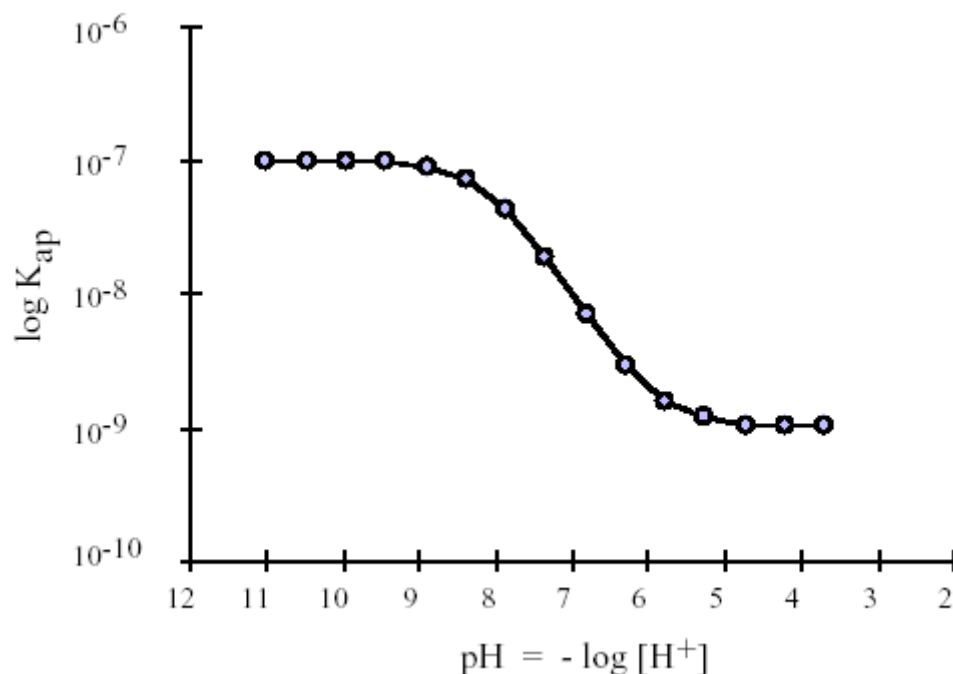
A continuación, medimos K_{ap} a distintos pHs. Puesto que en nuestro experimento de enlace no distinguimos las especies protonadas de las no protonadas:

$$K_{ap} = \frac{[A + AH^+][B]}{[AB + AH^+B]}$$

Para obtener K_{ap} como función de $[H^+]$, sustituimos $[A][H^+]/K_3$ por AH^+ y $[AB][H^+]/K_2$ por AH^+B . Tras realizar un ajuste y algunas sustituciones más, obtenemos:

$$K_{ap} = \frac{1 + [H^+]/K_3}{1 + [H^+]/K_2} K_1$$

Los datos de la gráfica que se puede ver a continuación se obtuvieron utilizando $K_3 = 10^{-6}$ M ($pK_a = 6$), valor que cabría esperar para una cadena lateral de histidina.



Si éstos fueran datos experimentales, podríamos ajustarlos para obtener el valor pK_a del enlace del protón a la proteína libre ($pK_a = -\log (K_3) = 6$) y al complejo ($pK_a = -\log (K_2) = 8$).