

**UNIVERSIDAD DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
Sección de Químicas



TESIS DOCTORAL

# **Espectros infrarrojos de los componentes de ácidos nucleicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Ángel Rodríguez de Bodas**

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5326697211

TB  
101  
30

UNIVERSIDAD DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS — SECCION DE QUIMICAS

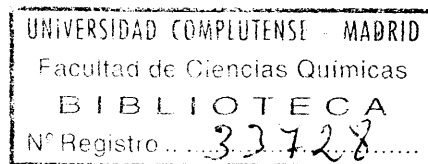
ESPECTROS INFRARROJOS DE LOS  
COMPONENTES DE ACIDOS NUCLEICOS

MEMORIA

presentada para aspirar al grado de Licenciado en Ciencias Químicas

por

ANGEL RODRIGUEZ DE BODAS



625057339  
638650529  
137496690

Madrid, Marzo 1970

## INDICE

	<u>Página</u>
INTRODUCCION .....	1
I.-METODO EXPERIMENTAL .....	3
1.-TECNICA DE COMPRIMIDOS .....	6
1.1.- Detalles del comprimido .....	7
1.2.- Sustancias soporte .....	8
1.3.- Aplicaciones analíticas .....	10
2.-COMPRESIONES DE BROMURO POTASICO.....	14
2.1.- Preparación de BrK .....	14
2.2.- Molienda .....	16
2.3.- Mezcla .....	23
2.4.- Prensado .....	24
2.5.- Separación del comprimido .....	31
3.- VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA TECNICA DE COMPRIMIDOS .....	36
3.1.- Ventajas .....	36
3.2.- Desventajas .....	38
II.- ESPECTROS INFRARROJOS .....	60
1.- REGISTRO DE LOS ESPECTROS .....	61
1.1.- Sustancias.....	61
1.2.- Condiciones de registro.....	62
1.3.- Espectros .....	64
2.- DISCUSION DE LOS ESPECTROS .....	101
2.1.- Azucares .....	101
2.2.- Bases .....	101
2.3.- Nucleósidos .....	112
2.4.- Nucleótidos .....	113
2.5.- Acidos ribonucleicos .....	114
BIBLIOGRAFIA.....	116

**I N T R O D U C C I O N**

La línea de investigación del presente trabajo, se puede describir, en líneas generales, como el estudio de las posibles aplicaciones de la espectroscopía molecular en biología molecular; concretamente, el estudio de la estructura molecular y mecanismo de acción de los ácidos ribonucleicos de transferencia t-RNA. La investigación propuesta consta, por lo tanto, de dos partes fundamentales: a) Estudio estructural, que se inicia en este trabajo; y b) Estudio cinético, que se abordará en trabajos posteriores.

Es evidente que una investigación básica, de carácter químico-físico, relativa al mecanismo íntimo de la síntesis de proteínas, exige el análisis estructural de las moléculas implicadas, a una resolución efectivamente atómica, es decir, a una resolución de 1 a 2 Å. Para macromoléculas, la única técnica que ha dado este tipo de información, ha sido la difracción de rayos X, y ello sólo lo ha sido posible cuando se ha logrado purificar las moléculas e inducir las a formar redes ordenadas, preferiblemente monocristales. Hasta el momento actual no ha sido posible formar monocristales de t-RNA. Por analogía con el estudio de otras macromoléculas, parece probable que esto sea consecuencia de deficiencias en la técnica de preparación, y de la ignorancia de las condiciones óptimas para la cristalización, más que a características especiales de los t-RNA, tales como la falta de una estructura bien definida. Este problema tiene, en nuestro caso, una especial importancia, ya que es difícil reconciliar la precisión que exigen los procesos de reconocimiento molecular de la síntesis de proteínas con una estructura "pobre", poco definida, de los t-RNA. Con esto no quiere decirse que los t-RNA tengan que presentar necesariamente una estructura única, sino que cualquier transición estructural debe ser relativamente neta y debe tener lugar entre estructuras bien definidas. Las consideraciones anteriores sugieren que la estructura o estructuras biológicamente importantes de los t-RNA estarán estabilizadas fundamentalmente por interacciones intramoleculares y con disolventes, y por efectos salinos, más que por interacciones significativas con otras macromoléculas. Por tanto, el estudio de las estructuras secundarias y terciarias de los t-RNA debe proporcionar información biológica importante. Hasta la obtención de una radiografía de difracción de suficiente poder de resolución, seguirá siendo objeto de polémica la estructura molecular de los t-RNA, que actúan interpretando la clave genética.

Como base de este amplio estudio, hemos considerado oportuna la investigación de los componentes de los ácidos nucleicos: bases púricas y pirimidínicas, nucleósidos y nucleótidos. El conocimiento de su estructura molecular nos permitirá examinar con un criterio riguroso dos aspectos fundamentales de la estructura de estos biopolímeros: la formación de puentes de hidrógeno entre bases complementarias, y el fenómeno de "apilamiento" de las mismas, que constituyen conjuntamente la explicación físico-química de la

unión de las dos cadenas que normalmente forman los ácidos nucleicos y de los "tramos" de apareamiento de bases, presentes en los t-RNA. Es evidente, por otra parte, que el conocimiento de la estructura molecular constituye la base necesaria para abordar el problema del mecanismo de acción de los ácidos nucleicos, que estudiaremos en próximos trabajos, limitándonos a los ácidos ribonucleicos de transferencia t-RNA.

Durante los últimos años, se han realizado estudios de importancia significativa sobre la secuencia de los nucleótidos en los t-RNA. Es bien conocido el modelo en forma de "hoja de trébol", universalmente aceptado, según el cual los t-RNA constan fundamentalmente de cuatro brazos: a) Brazo del aminoácido, que capta, retiene y transporta el aminoácido. Está caracterizado por tener la secuencia final C-C-A. b) Brazo del anticodon, que reconoce el correspondiente codon del ácido ribonucleico mensajero, que termina en un lazo o "asa" final de siete nucleótidos. c) Brazo de pseudouridina, que termina en un "asa" de siete nucleótidos. d) Brazo DiHu, de dihidrouridina, que termina en un "asa" de ocho a doce nucleótidos. e) Brazo extra, de longitud variable, que se presenta, por ej., en el serina t-RNA. Hace sólo algunos meses se ha intentado, por primera vez, establecer un esquema de la estructura tridimensional para el t-RNA de fenilalanina, en el que se postulan diversas uniones entre las bases complementarias de los diversos brazos citados. Es obvio que para interpretar el mecanismo de acción de una molécula, es necesario conocer no sólo su estructura secundaria y terciaria, como señalamos anteriormente, sino también su estructura cuaternaria, si es que la tiene. Recientes trabajos indican que los t-RNA actúan biológicamente en forma de tetrámeros, es decir, en agrupaciones de orden superior, de cuatro monómeros de t-RNA.

El objeto de nuestro trabajo es estudiar la estructura tridimensional de diversos t-RNA por espectroscopía infrarroja, Raman y dispersión de luz. Para ello es necesario disponer, en primer lugar, de los t-RNA aislados, con el mayor grado de pureza posible. Aunque algunos trabajos se refieren al aislamiento de algunos t-RNA puros, hasta el momento actual, sólo la firma Sigma de E.E.U.U. y Boehringer de Alemania, ofrecen mezclas de todo el conjunto de ácidos ribonucleicos de transferencia. Nosotros hemos obtenido dicha mezcla de t-RNA, que comprende de 40 a 60 t-RNA, siguiendo el método de Holley, como en el espectro de la fig. 36 reproducimos. Recientemente el equipo de Cramer, de Göttingen, ha descrito la obtención del t-RNA de fenilalanina utilizando un método cromatográfico, de empleo normal en nuestros laboratorios, cuya obtención vamos a iniciar inmediatamente por este procedimiento. Así mismo, obtendremos las aminoacilsintetasas por los proce-

dimientos descritos en la bibliografía, para utilizarlos en la valoración de los t-RNA correspondientes. Teniendo en cuenta que el t-RNA es polifuncional, puesto que toma parte en múltiples reacciones que difieren en su carácter y especificidad: interacción de aminoacilsintetasas, m-RNA, ribosomas y enzimas, que modifican su cadena polinucleotídica, es razonable y, por tanto, resulta de gran interés el estudio estructural propuesto.

La presente memoria resume fundamentalmente el trabajo inicial de espectroscopía molecular que, como base del estudio general expuesto anteriormente, hemos llevado a cabo. El empleo de la espectroscopía infrarroja para este tipo de estudios, fué iniciado hace algunos años, pero su aplicación a los problemas concretos que plantea la estructura secundaria y terciaria de los ácidos nucleicos es relativamente reciente. Podríamos citar, a título de ejemplo, las investigaciones realizadas en Inglaterra sobre la aplicación de la espectroscopía infrarroja al estudio de la estructura del ácido ribonucleico ribosómico y los trabajos llevados a cabo en Japón para estudiar la estructura molecular de los ácidos ribonucleicos de transferencia.

En el capítulo I de la presente memoria se describe, con detalle el método experimental utilizado para la obtención de los espectros infrarrojos, limitado a la técnica de comprimidos de BrK, aunque en trabajos posteriores se obtendrán espectros infrarrojos en disolución acuosa.

En el capítulo II se enumeraron las sustancias cuyos espectros se han obtenido, y se da así mismo una reproducción de todos los espectros infrarrojos registrados, discutiéndose finalmente la asignación de algunas de las bandas de vibración más importantes de las bases púricas y pirimidínicas estudiadas.

## I. METODO EXPERIMENTAL

## 1. TECNICA DE COMPRIMIDOS

Hay muchos compuestos que no se disuelven en los disolventes corrientes para estudios de Ir. Además, a menudo se desea examinar espectros que estén libres de interacciones con disolventes. En estos casos una técnica que resulta satisfactoria es la de comprimidos. El método consiste en lo siguiente:

- Se toma una pequeña cantidad de sustancia problema bien pulverizada.

- Se mezcla en proporción conocida con una determinada cantidad, bastante mayor, de polvo fino y bien seco de haluro alcalino.

- Se pulveriza la mezcla en un mortero de ágata ó en un molino de bolas.

- Se introduce la mezcla en una matriz especial, donde se somete a una presión elevada haciéndose al mismo tiempo vacío.

Se obtiene así una pastilla, en forma de disco, transparente, que se coloca luego en el rayo muestra del espectrómetro. En el rayo de referencia se coloca un comprimido con haluro solamente. Si la compensación no es muy buena

(pues no suelen salir iguales los comprimidos) se puede usar un atenuador en el rayo de referencia.

Parece ser que la muestra forma una disolución sólida en el haluro.

En una variante del método, el haluro alcalino y la muestra se funden y luego se enfrían dando también una pastilla transparente.

La bibliografía general sobre la técnica de comprimidos, puede verse en (1).

#### 1.1.-Detalles del comprimido

Las macropastillas tienen alrededor de 1 cm de diámetro, y las micropastillas de 0,5 a 1 mm. Estas últimas requieren un condensador de rayo en el camino óptico.

Concentraciones de muestra en haluro entre 0,1 a 1% (a lo sumo 3% para algunos compuestos aromáticos) producen normalmente espectros satisfactorios. Con una sustancia de espectro desconocido, una buena concentración de prueba es 0,5 %. Dependiendo de la intensidad del espectro obtenido, la concentración puede ajustarse hacia arriba o hacia abajo, como se requiera. Si es indicado un espectro más intenso, es preferible incrementar el espesor del disco usando mayor cantidad de mezcla de haluro y muestra, que incre-

mentar la concentración de muestra en haluro, puesto que, para concentraciones más altas llega a ser difícil el producir discos claros.

Con una concentración de 0,33 % 1 mg de muestra más 300 mg de haluro, en una matriz de 13 mm de diámetro, se obtiene un comprimido de 1 mm de espesor aproximadamente. Las micropastillas suelen llevar 0,01 mg de muestra.

Debido a la cantidad tan pequeña de muestra que se requiere, la técnica de comprimidos es muy empleada por los investigadores del campo de la Biología y la Medicina.

Algunos otros detalles sobre los comprimidos los trataremos en 2-5.

### 1.2.-Sustancia soporte

La más utilizada es el BrK. El polvo de BrK se puede pensar a cerca de 20 Tm de presión, para producir pastillas transparentes, que tienen una alta transmisión a través de la rama que va desde 4000 hasta  $650 \text{ cm}^{-1}$ . Las bandas del BrK están a  $83 \mu$  y sus pérdidas por reflexión a  $10\mu$  son de 8,4% para dos superficies.

Además del BrK se usan como haluro soporte los siguientes: ClNa, ClK, IK y haluros amónicos. El material

soporte debe reunir las siguientes características:

- 1- Alta transmitancia en todo el rango espectral
- 2- Baja presión de síntesis (lo que supone baja energía reticular)
- 3- Facilmente utilizable en estado puro y no higroscópico
- 4- Alta estabilidad química (no solo en cuanto a los cambios sufridos en el proceso, sino también en cuanto a la tolerancia muestra-haluro)
- 5- Índice de refracción próximo al de la muestra.

substancia	n a $2\mu$	intervalo práctico de transmisión $\mu$	transmisión $\text{cm}^{-1}$
C1Na	1,53	0,2 a 15	50000 a 666,7
BrK	1,55	0,21 a 28	47619 a 357
C1K	1,48	0,38 a 21	26316 a 476
IK	1,63	0,25 a 31	40000 a 323
BrCs	1,67	0,21 a 40	47619 a 250

El BrK parece ser el mejor. El C1Na, C1K, IK y haluros amónicos dan todos buenos espectros, pero se ha visto que dan una transmitancia inferior a la del BrK. Muchos investigadores prefieren el C1K al BrK<sup>1)</sup>.

1)

por su menor reactividad química, su mayor estabilidad al calor y su menor dispersión, aunque su rango de transmitancia es también menor.

El IK, el más blando, funde más fácilmente durante la operación de prensado. El ClK, el más duro, facilita la fina molienda de las partículas de muestra. El BrK es el caso intermedio de ambos. La energía reticular decrece según ClK > BrK > IK.

Pueden también usarse como sustancias soporte

-Teflón, que no absorbe la humedad

-Espuma de poliestireno de baja densidad: el sólido en polvo es prensado simplemente dentro de la espuma soporte.

-Polvo de polietileno submicroscópico; se obtiene una especie de fina lamina.

### 1.3.- Aplicaciones analíticas

La posición de las bandas cambiará de acuerdo a la técnica usada para preparar la muestra. Estas técnicas afectarán a tantos parámetros como los que informan la molécula (conformación, estado cristalino, orientación etc) y el medio en que la molécula está situada (soporte sólido solvatación, asociación con el disolvente, etc). Generalmente la mayor variación en la posición de la banda estará asociada con los grupos o moléculas más polares.

En el estado sólido, espectros infrarrojos idénticos medidos bajo las mismas condiciones, indican normalmente que las muestras son idénticas. Los métodos sólidos reflejan generalmente la configuración de la molécula y de la red cristalina. Pequeñas diferencias en la preparación de la muestra no afectan apenas al espectro, salvo cuando pueden ocurrir cambios del estado cristalino (polimorfismo).

En soluciones el soluto puede presentar bandas de más de una especie (conformerías o tautómeras). En estos casos, los efectos de polaridad del disolvente jugarán un importante papel en el tipo de banda y posición. Debido a estos factores, pequeñas diferencias en la estructura química pueden frecuentemente descuidarse, y muestras no idénticas pueden dar espectros muy similares o aun idénticos. Por lo tanto, para propósitos de identificación, los espectros de sólidos proporcionan las indicaciones estructurales más seguras, pese a sus muchas desventajas, que veremos en el apartado 3.2.

Si se emplea la técnica de comprimidos para análisis cuantitativo, la precisión y exactitud no son en general tan buenas como las técnicas en disolución, cuando éstas son aplicables.

Si todos los discos se hacen con la misma matriz,

tendrán la misma sección, el producto de concentración de la muestra por el espesor del disco es constante e independiente del tiempo de presión o de la técnica, para muestras preparadas con el mismo peso de muestra. Sin embargo, los comprimidos son generalmente frágiles, lo que dificulta la medida de su espesor con exactitud. Hay un método indirecto, sencillo, de evaluar el espesor de la muestra (longitud de camino óptico). Si todos los comprimidos tienen el mismo diámetro, y puede decirse que tienen la misma densidad, el espesor de cada muestra estará en proporción directa con su peso total. Pesando cada pastilla, se obtiene una medida indirecta de su espesor. Así, en lugar de la relación de longitudes de camino, la relación de pesos de los comprimidos puede usarse en un simple cálculo de la ley de Beer. Por lo tanto, en un comprimido de una muestra consistente en una mezcla de diferentes sólidos, puede, dentro de ciertos límites, analizarse cuantitativamente por comparación con espectros de discos preparados con materiales puros y por simple aplicación de la ley de Beer, sin el uso de ningún patrón interno.

Sin embargo este método sólo da resultados aproximados y como en todas las técnicas con materiales cristalinos en polvo, no se tienen las debidas garantías a causa de:

- Dificultad de eliminar la dispersión de luz por las partículas grandes, o de hacer reproducible el tamaño de las mismas.

- Efecto Christiansen, que distorsiona la forma de las bandas en mayor o menor grado, pero siempre en modo no reproducible.
- Dificultad en el recubrimiento uniforme del rayo, con lo que probablemente las medidas de las bandas intensas son inexactas.
- Polimorfismo y amorfismo, que introduce la duda de a que forma, cuando hay varias presentes, corresponde el espectro, y esto aún más con materiales impuros.
- Las bandas son a menudo muy agudas

Por estas razones, el análisis cuantitativo de sustancias polares es mejor hacerlo en solución, aunque se requieran disolventes polares y métodos de compensación de energía.

Sin embargo, esta técnica permite someras estimaciones cuantitativas.

## 2.- COMPRIMIDOS DE BROMURO POTASICO

### 2.1.- Preparación de BrK.

Es una operación previa a la síntesis del comprimido. Su objeto es que este resulte con cualidades óptimas.

El BrK es un cristal cúbico, incoloro, que se rompe fácilmente y es blando, sus caras se arañan con facilidad. Es higroscópico y relativamente barato.

Se puede obtener haluro puro en polvo por precipitación con ClH gaseoso de una disolución acuosa saturada de BrK. El exceso de ClH se elimina por calefacción en una mufla. Se seca en horno a 200° C durante unas horas.

Otro método para obtener BrK puro y libre de  $\text{NO}_3^-$  y de  $\text{H}_2\text{O}$  es por cristalización de una solución acuosa de BrK y posterior secado durante 30 min. a cerca del punto de fusión.

Algunas imperfecciones que se insinúan en la pastilla se deben al polvo. Es necesario usar haluros de alta pureza finamente pulverizados.

El grado "Analar" de pureza es usualmente satisfactorio

Las partículas de haluro no necesitan ser tan pequeñas como las de la muestra (2 $\mu$ ), ya que se unen bajo presión, pero para que se mezclen bien con las de la muestra deben ser partícu-

las pequeñas. El tamaño de partícula debe ser tal que pase a través de un tamiz de 200 mallas ( $200 = 1/m$ ,  $m =$  ancho de un orificio del tamiz). No es necesario hacer el tamizado ya que cada muestra de polvo queda comprobada si produce una buena pastilla. La pulverización puede hacerse a mano en un mortero de vidrio o agata, por precipitación, o, en un molino vibrador (con tubo y bolas de agata). A medida que el tamaño de partícula de haluro disminuye, aumentan las distorsiones espectrales y la absorción de  $H_2O$  y las pastillas aparecen escamosas. Baker prefiere comenzar con un material de 20 mallas ( $L=0,30$  mm) mejor que con uno de 250, sobre la base de que el haluro absorbe algo de la energía de molienda y no permite entrar a la muestra. Otros han señalado que si se parte de un tamaño grande, aunque sea uniforme, se dispersa mucha radiación con las pastillas formadas.

Para secar el polvo, lo mejor es meterlo en un horno a  $120^{\circ}C$  a vacío sobre una bandeja con poco fondo, durante unas 24 horas. Después se puede tener guardado en un frasco tapado, en un desecador. De vez en cuando, a intervalos regulares, deberá secarse el BrK a  $110^{\circ}C$  durante toda la noche para mantener el contenido de humedad tan bajo como sea posible.

Algunos investigadores rusos, calcinan BrK libre de ClK, a  $200^{\circ}C$  durante 12 a 18 horas, moliéndolo cada 4 horas. Luego se deja durante un tiempo ilimitado sobre  $Cl_2Ca$  anhidro.

## 2.2.- Molienda

Una vez preparada la sustancia soporte pasamos a preparar la muestra. Para ello hay que considerar que:

La absorbancia observada para sistemas no homogéneos, tales como un comprimido conteniendo una muestra ocluida dependerá no solamente de la concentración de la muestra en la pastilla y del espesor de la misma, sino también bastante intensamente del tamaño de las partículas de muestra. Se han observado, en experimentos controlados, variaciones por un factor de 2 o más en la absorbancia aparente.

La muestra ha de estar finalmente dividida y con tamaño de partícula tan uniforme como sea posible. Se consigue así:

- a) que la pastilla sea perfectamente transparente y y las pérdidas por dispersión sean mínimas
- b) que la mezcla con el haluro sea uniforme y resulte un mayor y más homogéneo recubrimiento del rayo.

Con todo ello se consiguen bandas de absorción homogéneas, intensas y sin distorsiones.

Muchos investigadores creen que hay un tamaño de partícula óptimo y que otro tamaño mayor o menor dará espectros de calidad inferior (menos resolución y/o más fondo de absorción) Así, Milkey observó la aparición de bandas anormales, distintas de las del agua, en el espectro de BrK puro que había sido some-

tido a una fuerte molienda.

Las partículas de muestra deben reducirse a un tamaño menor de  $2\mu$  si se quiere eliminar la dispersión. Por otra parte, el valor límite del coeficiente de extinción no se alcanza hasta que el diámetro de las partículas sea menor que  $0,1 \mu$ . Cuando no se pueden obtener tamaños tan pequeños hay que contentarse con un procedimiento que dé distribuciones reproducibles del tamaño de partícula.

El tiempo de molienda puede influir significativamente sobre la apariencia del espectro final. Las bandas de absorción (con la misma concentración de muestra) aumentan de intensidad cuando el tiempo de molienda aumenta, llegando normalmente a un máximo constante, ya que se aumenta la homogeneidad y se disminuye el tamaño de partícula. Sin embargo, moliendo más de 5 minutos, pueden obtenerse espectros anormales.

Si no se quiere hacer un exceso de molienda y trabajo sobre la muestra se empleará una sustancia soporte con mayor energía reticular, lo que requerirá mayor presión de síntesis.

Molienda manual. - Es el método que hemos empleado nosotros para pulverizar la muestra.

Se usa un mortero de ágata de 50 a 55 mm de diámetro con su maja también de ágata.

Se deposita, aproximadamente 0,1 gr de muestra en el mortero y se muele con un movimiento de rotación firme y vigoroso.

Algunas muestras higroscópicas o difíciles de moler, se manejan más fácilmente bajo un disolvente volátil (alcohol, acetona,  $Cl_4C$ , etc) aunque la muestra sea insoluble. En estos casos se ha de procurar restringir en lo posible la dispersión de la muestra a un área que sea de  $1/3$  y  $1/2$  de la superficie del mortero hasta que se haya evaporado totalmente el disolvente; y se evitará seguir moliendo después de que la muestra quede seca. Si las muestras son particularmente duras, se repite el proceso de malaxación.

Cuando se dispone de poca cantidad de muestra, o para sólidos polares muy blandos, se suele realizar la molienda de la muestra junto con el haluro. Tiene el inconveniente de que se favorece la absorción de agua por el haluro, y de que como este es unos cientos de veces más abundante que la muestra, esta escapa mejor a la molienda.

Algunos investigadores muelen el BrK con una solución de la muestra en un disolvente volátil (acetona,  $Cl_3CH$ ,  $Cl_4C$ , eter etc) hasta que este se evapora. Se suele obtener una buena distribución de la muestra y en algunos casos se notan incrementos en la resolución y la intensidad del espectro. A veces, sin embargo, se experimenta una cierta contaminación por el disolvente, ó, la

evaporación del disolvente produce partículas gruesas.

Una técnica reciente consiste en añadir unas pocas gotas de benceno ( $C_6H_6$ ) al BrK antes de añadir la muestra. Se pulveriza esto para formar un barrillo y luego se añade la muestra. Se continua moliendo la mezcla y el benceno se evaporará. Esto se hace para mejorar la uniformidad de la muestra.

Molienda mecánica.- El uso de molinos tipo vibrador produce antes y mejor que el método manual, la molienda de la muestra. Los más usados son: el solenoide vibrador de Schiadt, y el Wig-L-Bug, accesorio comercial usado por los dentistas.

Una técnica que parece dar buenos resultados, da una molienda uniforme y es generalmente aplicable, es la molienda de ambos, muestra y haluro en un molino de bolas vibrador mecánico, como el amalgamador Wig-L-Bug. Consiste este en un motor excéntrico que mueve una pequeña capsula cilíndrica que es sacudida vigorosamente varios miles de veces por minuto. En la capsula se ponen 1 mg de muestra y unos 320 mg de BrK y dos bolas de acero onplástico acrílico (de unos 3 mm). La mejor molienda se obtiene cuando la capsula está llena a 1/3. Después de unos 5 minutos (según la dureza de la muestra) la mezcla está lista para ser comprimida. Este método proporciona un contacto mínimo con el aire.

Para polímeros que son difíciles de moler, disolver o fundir, se puede colocar el polímero y una cantidad de BrK, con

una o dos bolas en la capsula metálica del Wig-L-Bug. Se cierra con cinta adhesiva y se sumerge en aire líquido. Cuando cesa el burbujeo, se saca la capsula y se coloca en el vibrador. Como los polímeros duros se hacen quebradizos a bajas T, cuando se alcanza la temperatura ambiente la muestra ya está molida, y mezclada con el haluro.

Técnicas especiales.- Cuando la pulverización de la muestra es difícil, esta se disuelve en un disolvente volátil, que al evaporarse deja la muestra en polvo.

Los materiales duros e insolubles pueden reducirse a fino polvo o virutas, raspando su superficie con una hoja de afeitar o mejor aún con una espátula de diamante.

Una técnica para reducir el tamaño de partícula de la muestra y distribuirla por todo el BrK, consiste en disolver el sólido polar en un disolvente polar volátil (como acetona) y rociarlo sobre el polvo de BrK finamente tamizado. Después de evaporarse el disolvente, ya puede comprimirse la mezcla en polvo. Esta técnica no da siempre buenos resultados a causa de la formación de partículas gruesas de muestra tras la evaporación del disolvente.

#### Liofilización:

También llamada secado por congelación. Produce una buena distribución y tamaños de partícula submicroscópicos (0,03u).

El BrK se disuelve en  $H_2O$ , y la solución se coloca en un pequeño tubo cuya abertura tiene una junta de vidrio poroso. El tubo se sumerge en nitrógeno líquido, y la solución se congela rápidamente extendiéndose sobre las paredes. Se añade al tubo una solución de muestra en un disolvente volátil ( $H_2O$ , dioxano, acético glacial, alcohol, terebutílico, alcohol terc. amílico benceno, etc) que se hiela rápidamente sobre el lecho agua-haluro. El tubo se conecta a un sistema de alto vacío y el agua y el disolvente son bombeados fuera, mientras el tubo se mantiene en el baño de  $N_2$  líquido. La eliminación de  $H_2O$  y disolvente de esta manera, deja el haluro y la muestra en forma finamente dividida y bien mezclados. A continuación se seca sobre  $P_2O_5$  a  $50^{\circ}C$  y 10 mm Hg.

Esta técnica es aconsejable para micromuestras solamente, pues el tiempo requerido para eliminar  $H_2O$  y el disolvente es muy grande (normalmente varias horas). En el caso de micromuestras se puede hacer en 90 minutos.

Comparación de las distintas técnicas.— La molienda manual es el método más cómodo y sencillo, pero es inferior a la molienda mecánica, porque es más difícil de controlar su intensidad y uniformidad y no resulta adecuada para obtener resultados cuantitativos reproducibles.

Los molinos vibradores son más efectivos, pero su ac-

ción de molienda extremadamente fina no es deseable para algunas muestras cristalinas.

En la actualidad parece que el mejor procedimiento (aunque también el más incomodo y largo) para preparación de muestras para determinaciones cuantitativas es el de liofilización. El secado por congelación da mayor homogeneidad que el molino vibrador. Los espectros que se obtienen tienen menos dispersión. las intensidades son mayores (que con las otras técnicas) y se obtienen normalmente una buena concordancia con la ley de Beer.

Hansdorff hizo un estudio sobre el efecto de varios tipos de molienda y mezcla sobre la concordancia con la ley de Beer de la banda del ácido benzoico en BrK a 14,15 u

absorbancia / concentración en %

Concentrac. %	molienda y mezcla en mortero	en amalgamador Wig-L-Bug	molino tipo selenoide vibrador de Schiedt
0,05	1,55	2,67	5,07
0,10	2,67	3,31	5,03
0,20	3,84	3,56	5,08

Kirklaud ha comparado cuatro técnicas de molienda empleando la banda de 3-(p-clorofenil)-1-1 dimetil urea a 9,9 u.

técnica de molienda y mezcla	absorptividad	desviación media
Molienda en mortero accionado por motor durante 30 min, mezcla con BrK por molienda a mano durante 5 min.	1,12	10,2 %
Premolido como antes, mezcla con BrK por molienda en mortero con motor 15 min.	1,27	5,1 %
Como antes, pero 30 min. de mezcla.	1,45	1,8 %
Mezcla de cristales grandes de muestra y molido con BrK en un Wig-L-Bug durante 15 min.	1,57	1,2 %

### 2.3.- Mezcla.

Una vez molida la muestra hasta un tamaño aproximado de unas 5 micras se agrega el BrK (pasado por un tamiz de 200 mallas), y se procede a la mezcla por un método manual o mecánico.

Se ha de evitar el moler durante la mezcla, pues el haluro finamente dividido absorbe la humedad atmosférica. Cuando la mezcla se hace en un Wig-L-Bug el tiempo de vibración será de 20 sg. Si se tiene un tiempo excesivo aparecen en el espectro picos de  $H_2O$  muy altos (por el BrK extremadamente fino que se obtiene).

Para la mezcla manual, se pesa 1 mg de muestra molida y se pone en un mortero de ágata junto con 10 mg de BrK (ya molido y seco). La mezcla se hace con un movimiento suave de rotación y de vaiven. Luego se van añadiendo cantidades de BrK de

15, 30, 60, etc, repitiendo el proceso, hasta que se hayan agregado los 300 mg de haluro.

Si la muestra es estable al calor, conviene secar la mezcla en una estufa durante 1 hora a 110°C.

#### 2.4.- Prensado

Una vez que tenemos la mezcla en polvo de muestra y sustancia soporte, en la concentración debida; procederemos al prensado. Esta operación se realiza en una matriz que se describe a continuación.

Matriz.- Aunque se han empleado muchos tipos de matrices, todas ellas suelen ser esencialmente iguales, con la sola diferencia de la comodidad en la operación de ajuste y de extracción del comprimido.

La muestra, descrita en la fig. 1, es similar a la empleada por la R.I.I.C.

No hay riesgo de corrosión del molde. Sin embargo conviene limpiar perfectamente las partes B, D, E, y F (para B vale una escobilla de tubos de ensayo), especialmente las caras pulidas de E y F. El molde se limpia normalmente frotando con un paño fino y limpio. Si no se va a usar durante mucho tiempo puede darse una capa muy delgada de algún aceite bueno a todas las par-

tes no plateadas, pero antes de volverlo a usar debe lavarse cuidadosamente con un disolvente apropiado. Pero no es necesario engrasar para periodos de dos semanas o menores, basta con enjuagar con agua y después con alcohol (antes de frotar con el paño) las partes que han estado en contacto con el BrK, después se guarda en un buen desecador.

La matriz se deteriora si el cilindro B se distorsiona por descender sobre una superficie dura o si no está perfectamente horizontal en el cilindro B.

La matriz es muy dura, pero bajo altas presiones, pequeñas motas de polvo pueden causar arañazos, que arruinarían la precisión de las piezas.

Hay matrices de varias capacidades y tamaños, incluyendo micrométricas.

Las matrices de plástico son más baratas que las metálicas, pero normalmente no son evacuables y tienen un cierto riesgo de pérdida de muestra.

Para introducir la mezcla en polvo en la matriz operaremos del modo siguiente.

- 1. Manteniendo derecho B, taponar la parte superior con F .
- 2. Coger A invertido y meterle B y F. Apoyarlo boca arriba sobre la mesa.
- 3. Transferir totalmente la mezcla del mortero al interior de

B usando un pincel (de pelo de camello).

- 4. Dar en el molde unos golpes ligeros para que la superficie del polvo sea plana.
- 5. Esto se completa introduciendo lentamente el cilindro D, después se gira unas cuantas vueltas mientras se aprieta suavemente contra el fondo. Esta operación previene pérdidas de mezcla cuando se conecta el vacío.
- 6. Sacar muy suavemente el cilindro D (si se quita bruscamente puede llevarse consigo algo de polvo). La superficie del polvo debe ser perfectamente lisa sin grietas ni irregularidades.
- 7. introducir cuidadosamente dentro de B el pequeño cilindro E (con la superficie pulida hacia abajo), colocar el anillo de goma negra e introducir el cilindro D y la cubierta C.

El conjunto está ya listo para hacer vacío y presión.

Para la técnica de micropastillas se dispone de microsoportes. El microsoporte consiste en un disco circular de papel con una abertura alargada perforada en el centro. En este caso sólo se llena con polvo el orificio del papel de modo que después de aplicar la presión la pastilla aparece como una especie de ventana alargada en el centro del microsoporte. Cuando se usa el microsoporte, puede ser ventajoso llenar la matriz del modo

siguiente: (figura 2).

- a) Meter el cilindrido E, con la cara pulida hacia abajo, dentro del cilindro hueco B y a continuación el cilindro largo D.  
Invertir el conjunto y apoyarlo, según se ve en la figura (2-a) sobre el anillo de plástico transparente.
- b) Colocar sobre E el microsoporte, llenar su abertura con polvo y oprimir uniformemente (figura 2-b)
- c) Introducir en el orificio el tapón F (figura 2-c)
- d) Coger A invertido y deslizarlo sobre B, oprimiendo hacia abajo sobre el cilindro D para que la cara de F toque en el microsoporte, (figura d). Invertir con cuidado el conjunto.
- e) Quitar el anillo de plástico transparente, colocar el anillo de goma negra E y la cubierta C.

El conjunto está ya listo para hacer vacío y presión.

El uso de microsoporte permite obtener pastillas de 0,5 mm de diámetro, que son usadas con microscopio.

Vacío. - Para hacer vacío en la matriz se opera como sigue:

- a) Se coloca la matriz en la prensa hidraulica y se aplica una ligera presión para asegurar el conveniente estancamiento del interior de la matriz por la arandela de goma.
- b) Se conecta la boquilla de A a una línea de vacío que dé una presión menor de 2 cm de Hg. Es suficiente una buena trompa de agua, pero es mejor una bomba rotatoria.
- c) Se hace vacío de 1 a 5 minutos (normalmente 2 minutos). Con polvo muy seco, puede ser suficiente con 15 seg. Un vacío más prolongado ayuda a secar polvos húmedos.

Si queda vapor de agua atrapado en el disco se produce la rotura de este. El vacío elimina a la vez: la poca agua que pueda estar condensada en el BrK, y, el aire que esté entre las partículas.

El vacío es necesario para obtener discos persistentemente claros y reproducibles pues sino la presión sobre el polvo estaría amortiguada y al tratar de escapar el aire cuando se quita la presión originaría pastillas de aspecto fechozo.

Prensado.- Se hace actuar la prensa sobre la matriz sin quitar el vacío. La prensa hidraulica de 30 Tm de la R.I.I.C. se ha diseñado especialmente para cubrir todos los tipos de matrices comerciales.

Se aplica sobre la matriz durante 1 minuto hasta una fuerza de aproximadamente:

1,25	toneladas	para	pastillas	de	5 mm
8	"	"	"	"	13 mm
12	"	"	"	"	15 mm
15	"	"	"	"	16 mm
20	"	"	"	"	20 mm
24	"	"	"	"	22 mm

Se deben usar fuerzas iguales o mayores, nunca menores, aunque muy pocas muestras requirieran mayor presión de la indicada. Se tendrá cuidado de no exceder el límite de sobrepresión para la matriz, estipulado por el constructor. Por otra parte conviene usar la presión más baja que permita, no obstante, la buena formación del comprimido ( para evitar las alteraciones que puede ocasionar la compresión).

Para micropastillas se necesita mucha menos presión. Para los micromoldes de Perkin-Elmer se emplean unos 275 Kg para los de 1,5 mm. La presión para los de 0,5 mm es suministrada por el mismo vacío usado para evacuar la matriz.

El tiempo de presión depende del diámetro de la pastilla, de la sustancia muestra, del tiempo de vacío y del grado de este vacío.

Al cabo de 1 a 2 minutos, se relaja la presión lentamente (conviene tardar por lo menos 1 minuto en la operación), para prevenir roturas de la pastilla, y se retira la matriz de la prensa. A continuación se retira la goma de vacío y se apaga la bomba.

Si al hacer el comprimido, la presión baja, es que C no ajusta bien; apretarlo, apretando más la palvula lateral de la prensa y volver a subir hasta la presión deseada.

Otras técnicas de prensado.- Un método, más simple y barato que el anterior, consiste en usar dos discos, de metal duro, como matriz. Con un taladrador de corchos se corta un orificio de alrededor de 1 cm de diámetro en un trozo de papel de filtro o cartón. El espesor del comprimido puede variarse por el número trozos de papel de filtro. Ver figura 3.

Se coloca esto en uno de los discos (como se muestra en la figura) y se añade la mezcla de BrK y muestra (en polvo). Cuando esto se comprime, se formará una pastilla del tamaño del agujero. El comprimido puede desenchajarse del papel de filtro por una fácil operación manual. De hecho puede montarse directamente, con el papel, dentro de un portamuestras. Aunque este no es un procedimiento cuantitativo, ciertamente es una técnica cualitativa muy rápida.

## 2.5.- Separación del comprimido.

Después de retirar la matriz de la prensa: se invierte A con lo que sale el resto de la matriz.

Se coloca el conjunto en la prensa (con F hacia arriba) y se pone el anillo de plástico sobre B. Figura 4

Se aplica una ligera presión a D hasta que F y la pastilla salgan fuera de B. Se relaja la presión abriendo la valvula lateral y se retira con cuidado el anillo de plástico y F.

Se coge el comprimido con pinzas (nunca con los dedos) para que no tome humedad) y se instala en un portamuestras adecuado .

Es muy difícil obtener buenas pastillas en una atmósfera con una humedad mayor de 70%. Si la pastilla está por debajo de la temperatura ambiente, se humedecerá inmediatamente. El calentarla ayuda también a quitarle al polvo la humedad residual durante el vacío. Puede usarse un horno para secar y almacenar los comprimidos.

Si la pastilla es visualmente transparente, se evidencia una buena preparación. Un buen comprimido deberá tener 80-90% de transmitancia en regiones donde la muestra no absorba. Sin embargo, es difícil preparar un comprimido de alta transparencia con un diámetro mayor de 20 mm, los discos de mayor diámetro son a

a menudo nubosos (con mucha pérdida de luz). Por otra parte, cuando un disco de menos de 13 mm de diámetro se introduce en un espectrómetro cuyo rayo tiene un arco grande serán inevitables algunas pérdidas de radiación, de ese modo se anula la ventaja del gran camino óptico. De todos modos es probablemente mejor el trabajar con comprimidos pequeños.

Los defectos más corrientes son debidos a polvos malos o a usar incorrectamente el molde o matriz. A continuación se indican una serie de defectos <sup>(D)</sup> en los comprimidos, sus causas (C), y sus remedios (R).

- 1º) (D) Dispersa un pequeño porcentaje de la radiación incidente.  
(C) Tamaño medio del gramo demasiado grueso  
(R) Volver a moler la pastilla con más intensidad
- 2º) (D) Tiene unas zonas blancas y otras claras  
(C) Unas pocas gramos gruesos entre polvo fino  
(R) Moler aún más el polvo
- 3º) (D) Marcada dispersión de la luz que atraviesa la pastilla. Pobre visibilidad de objetos distantes.  
(C) Impurezas. Que incluso pueden ser de otro alcali si esta presente como mínimo en un 5%.  
(R) Usar haluros puros. Si es necesario purificar por precipitación de la solución saturada de BrK en ClH concentrado.

- 42) (D) Con manchas irregulares, con aspecto parecido a cuando el polvo es grueso (combinación de 1º y 2º)
- (C) Polvo húmedo o aglomerado
- (E) Secar y desmenuzar el polvo
- 52) (D) Tendencia a descamarse
- (C) Polvo demasiado fino
- (E) Moler nueva substancia menos tiempo que antes.
- 62) (D) Parcialmente opaca
- (C) Presión insuficiente unido posiblemente a mala distribución
- (E) Volverla a someter a presión. Tener más cuidado al introducir y distribuir el polvo.
- 72) (D) Perfectamente clara cuando se la saca del molde, se hace visualmente opaca en un corto tiempo (desde 1 minuto a varias horas), aun cuando esté en atmósfera seca. No se puede usar, pues la absorción y dispersión de radiación será una función del tiempo pasado entre el prensado y el registro del espectro.
- (C) Vacío insuficiente para eliminar el aire atrapado que reaparece lentamente al relajar la presión.
- (E) Comprobar el vacío. Hacerlo durante más tiempo.

Estos defectos se refieren a comprimidos de BrK puro, sin muestra. Con la concentración normal, de 0,1 a 1,0 % de muestra, las pastillas serán a menudo solo translúcidas, dependiendo de la naturaleza de la muestra.

- 88) (D) El espectro indica que el contenido de muestra en el comprimido es excesivo.
- (R)-Empezar con una nueva muestra todo el proceso.
- Nueva molienda del comprimido añadiendo BrK, para hacer un nuevo compuesto con el total o parte de la mezcla.
- Lijar la pastilla con papel nº 320-A y luego con papel especial nº 4/0
- 99) (D) Poca intensidad de las bandas
- (C) Insuficiente concentración de muestra
- (R) Si el tamaño del comprimido es al menos el doble del área del rayo, se puede cortar en dos y registrar con espesor doble, evitando así la preparación de un nuevo comprimido.
- Hacer un nuevo comprimido con mayor espesor, mejor que aumentar la concentración lo que puede producir curbosidades en la pastilla.
- 109) (D) Las bandas fuertes no se observan con absorción completa.

- (C) Las partículas de una dada cantidad de muestra son gruesas, con lo que cubren estadísticamente la superficie del rayo muestra menos que si son finas; y habra huecos por donde pase la radiación libremente.
- (R) Moler de nuevo el comprimido o hacer uno nuevo con molienda más intensa de la muestra
- 112) (D) El espectro muestra distorsiones de bandas
- (C) Molido defectuoso
- (R) Moler una nueva cantidad de muestra y hacer otro comprimido

### 3.-VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA TECNICA DE COMPRIMIDOS

#### 3.1.-Ventajas

En soluciones, el soluto puede exhibir bandas de más de una especie (conformeras o tantemeras). En estos casos los efectos de polaridad del disolvente jugarán un importante papel en el tipo de banda y posición de la misma. Debido a estos factores, pequeñas diferencias en la estructura química pueden frecuentemente descuidarse, y muestras no idénticas pueden dar espectros muy similares o aún idénticos. Por lo tanto, se deduce, que para propósitos de identificación, los espectros de sólidos dan indicaciones estructurales más seguras, pese a sus varias desventajas.

Respecto de otras técnicas en estado sólido, la de comprimidos presenta las siguientes ventajas.

- a) Se obtienen espectros libres de bandas de interferencia y la absorción del fondo es pequeña y no selectiva.
- b) Se dispersa menos luz, por incluirse la muestra en un material de parecido índice de refracción.
- c) Para algunos materiales se puede obtener mayor resolución que la obtenida con determinados espectros en otros me-

dios.

- d) La técnica de comprimidos requiere muy poca cantidad de muestra. De ahí su interés en el campo de la Biología y la Medicina.
- e) La técnica se puede reducir a la escala micro sin que se aumenten las dificultades manuales.
- f) Las pastillas se pueden almacenar durante largos periodos de tiempo.

Respecto de la técnica de suspensiones, la técnica de comprimidos presenta las siguientes ventajas:

- a) El análisis cuantitativo puede hacerse directamente sobre el disco ya que su espesor es fácilmente medible. Aunque la exactitud no es tan alta como en el trabajo en soluciones, es satisfactoria para muchos propósitos.
- b) El BrK, IK y ClK no tienen absorción en la región de 2 a 25 $\mu$  (5000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ).
- c) Un gran número de materiales tales como muchos elastómeros o plásticos pueden pulverizarse junto con haluros alcalinos, pero difícilmente pueden hacerse suspensiones con ellos.
- d) Posibilidad de obtener una identificación de una sustancia totalmente desconocida desde menos de 1 mg a 20  $\mu\text{g}$

de muestra. La suspensión de tan pequeña cantidad de muestra es prácticamente imposible.

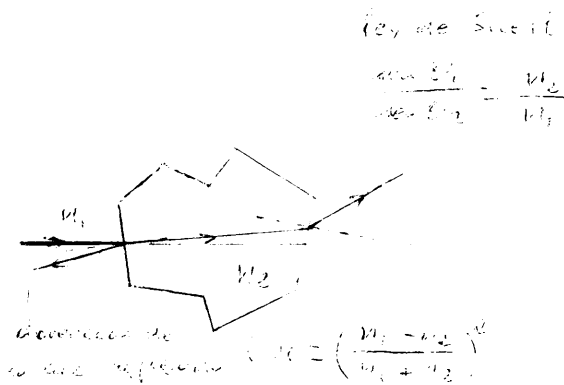
- e) La técnica de comprimidos requiere menos esfuerzo y destreza, y puede seguirse mejor para exámenes de rutina de materiales cuya identidad es esencialmente conocida.

Como normalmente los factores negativos para suspensiones no son los mismos que para pastillas esta justificado el uso de ambas técnicas, pues ambas producen excelentes espectros cuando se emplean de modo apropiado.

### 3.2.-Desventajas

Dispersión de luz.- Con el fin de apreciar algunas de las dificultades encontradas en el trabajo con sólidos cristalinos, es necesario examinar con algo de detalle el mecanismo por el que la luz se transmite por partículas pequeñas de sólido.

La figura es un diagrama de la transmisión y reflexión



de un rayo de luz arbitrario por una pequeña partícula. No solo se perderá algo de luz por reflexión en la superficie exterior de la partícula, sino que el rayo refractado y trans-

mitido por la partícula emergerá, lo más probable, con un ángulo tal que no penetrará en la rendija de entrada del espectrómetro y los pocos rayos que puedan posiblemente atravesar la partícula con un ángulo apropiado serán indudablemente difundidos al pasar a través de otras partículas. Por lo tanto una colección de partículas es esencialmente opaca a la radiación de longitud de onda menor que sus diámetros ya que no se puede formar un frente de ondas coherente por reflexión o refracción si la superficie es menor que la  $\lambda$  de dicho frente.

Del gráfico se comprende que cuando  $n_1 \approx n_2$  las partículas de luz por dispersión (reflexión y refracción) serán muy pequeñas. Por eso se procura que el medio (1) no sea aire, sino algún material que rodee a las partículas y con  $n_1 \approx n_2$ ; pero, sea sólido o líquido, ha de ser bastante transparente a la radiación infrarroja.

Las partículas de sólido se reducen a un tamaño tan bajo (menor de  $3 \mu$ ) como el de las más cortas longitudes de onda de la luz empleada, de modo que las reflexiones y refracciones en las caras de las partículas (y por tanto la luz dispersada) sean mínimas.

No ocurre dispersión en cristales simples o en fibras amorfas, aunque si hay un cambio en el medio se dispersará alguna radiación. Se da bastante dispersión si la muestra tiene

partículas de distinto tamaño

Por otra parte, cuando las partículas son muy pequeñas comparadas con la  $\lambda$  incidente, también hay pérdidas, de la luz transmitida, por dispersión Rayleigh, fenómeno que ocurre en algún punto de la interfase, y que se da casi siempre pues sobre las partículas llegan a incidir  $\lambda$  bastante grandes; por ejem. si las partículas son algo menores de  $3 \mu$  y registramos hasta  $\lambda=30$  o  $40 \mu$ , estas  $\lambda$  son ya bastante grandes para las partículas.

El coeficiente de dispersión  $\epsilon_d$ , análogo al coeficiente de extinción en absorción, viene dado por:

$$\epsilon_d = \frac{(n_1 - n_2)^2}{\lambda^4} 4\pi^2 N,$$

siendo  $N=n^{\circ}$  de partículas por  $\text{cm}^3$ .

Con lo cual si se hacen las partículas muy pequeñas aumenta  $N$  y  $\epsilon_d$ . Para un mismo tamaño de partículas las  $\lambda$  pequeñas darán un  $\epsilon_d$  mayor que las largas. Igual que antes, todo parece ponerse en contra de las  $\lambda$  cortas. Afortunadamente la dispersión Rayleigh es pequeña y se puede obtener buena transmisión con partículas menores de  $2 \mu$ . Como es difícil reducir todas las partículas a tamaños menores de  $2 \mu$  es por lo que el % T es bastante bajo al principio del espectro. Esto disminuye al reducir el n $^{\circ}$  de partículas grandes por molienda más rigurosa.

En ambos fenómenos de pérdida de radiación, esta es proporcional a  $(n_1 - n_2)^2$ , luego interesa hacer  $n_1 \approx n_2$ .

Además, la línea base (o sea un trazo horizontal sin ruido con  $T\% = \text{const}$ ) que surge muy neta en el espectro de un sólido en la zona de 3 a  $6\mu$ , indica partículas de muestra no suficientemente finas. Si la línea base se eleva por encima de  $100\% T$  en las proximidades y antes (lado de mayor  $\nu$ ) de una banda de absorción es que ocurre el efecto Christiansen. Este efecto puede no desaparecer aunque se haga el espectro en Nujol u otra suspensión en lugar de pastilla.

El efecto Christiansen es causado por el rápido cambio en el  $n$  que ocurre en las proximidades de una banda de absorción; y se manifiesta en que la forma de la banda es asimétrica y cambia la  $\nu$  del máximo aparente de absorción respecto al que sale con otros haluros y en suspensión. En efecto, por el cambio de  $n$ ,  $\epsilon_d$  disminuye mucho en las proximidades de una banda de absorción, aumentando  $T\%$ ; pero a continuación  $n$ , aumenta bruscamente y con el  $\epsilon_d$ , disminuyendo  $T\%$ , todo lo cual produce que la  $A$  y la  $\nu$  medidas para esta banda no sean las verdaderas. Ver figura 5.

Parece ser que el fenómeno presenta un comportamiento selectivo para las vibraciones y parece ser diferente para

cristales iónicos y covalentes.

El efecto nunca es completamente eliminado salvo si  $n_1 = n_2$ , pero si se puede reducir grandemente moliendo la muestra hasta que el tamaño de partícula (menor de  $2 \mu$ ) es pequeño comparado con la  $\lambda$  usada. El efecto es más pronunciado a  $\lambda$  cortas, donde el diámetro de partículas es comparable a  $\lambda$  y el factor  $1/\lambda^4$  es grande, no anulando al  $(n_1 - n_2)^2$ .

Tampoco es un fenómeno reproducible, lo que dificulta los análisis cuantitativos.

Se han dado varias ecuaciones que nos relacionan la variación de  $n$  con  $\lambda$

Cauchy: 
$$n = n_0 + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} + \dots$$

Harzmann: 
$$n = n_0 + \frac{C}{\lambda - \lambda_0}$$

Drude: 
$$n_2 = 1 + \frac{N_e^2 \lambda_0^2}{mC^2} \frac{\lambda^2}{\lambda^2 - \lambda_s^2}$$

donde la sumación es sobre el número de bandas de absorción en la región

- $\lambda_s$  es la longitud de onda del máximo de absorción en cada banda
- $N$  es el nº de electrones por cc
- y  $m$ ,  $g$  y  $q$  tienen el significado usual.

En resumen:

Conviene a) que  $n_1 \approx n_2$

- b) reducir el tamaño de partícula hasta unas  $2 \mu$ , no mas para que la dispersión Rayleigh no sea muy grande.
- c) distribución uniforme de las partículas en el material soporte y del tamaño de las mismas, para lo que hay que vigilar la molienda y la mezcla (es muy útil la liofilización). Es más importante obtener reproductibilidad del tamaño y forma que uniformidad de distribución

Si no es posible compensar la dispersión de luz mediante el uso de pantallas, se emplea una baja concentración de muestra y se utiliza expansión de escala.

Bandas espúreas.- Durante las operaciones de molienda y mezcla la muestra puede contaminarse con impurezas, que darán lugar a la aparición de bandas espúreas o falsas. Los contaminantes principales son  $H_2O$  y  $NO_3^-$ . El 1º se puede eliminar presecando la sal muy molida, aunque es difícil y casi siempre se presenta algo de  $H_2O$  como impureza. El  $NO_3^-$  no suele interaccionar con el soluto e incluso puede no observarse empleando compensación.

Mayores fuentes de impurezas son los componentes de los morteros y los metodos de limpieza.

El haluro puede hidratarse, y con él la sustancia, o por el contrario, si la sustancia tiene agua de hidratación puede perderla si la mezcla se prepara en atmósfera muy seca.

Así, aunque el BrK no debe tener ninguna banda en el espectro de 2 a 15  $\mu$ , la mezcla y pulverización a la vez de BrK y agua contenida en sustancias como hidratos inorgánicos produce falsas bandas muy intensas a 2,95, 4,90 y 6,12  $\mu$ . En general, debido a la higroscopicidad del BrK, todas las muestras preparadas presentan picos débiles de absorción a 2,9  $\mu$  ( $3448 \text{ cm}^{-1}$ ) y a 6,1  $\mu$  ( $1639,3 \text{ cm}^{-1}$ ), correspondientes a la tensión y flexión del OH del agua absorbida. Estas bandas oscurecen respectivamente las zonas de tensión de OH y NH y las C=C y C=N. Se necesitaría una sustancia soporte con las propiedades del BrK pero sin su higroscopicidad, y aun no se ha encontrado. De todos modos, el BrK no es tan higroscópico como se supone; 100 gr de BrK en aire saturado de humedad toman a lo más 0,007 grs de  $\text{H}_2\text{O}$ . La principal perturbación experimentada con los comprimidos de BrK no es debido al  $\text{H}_2\text{O}$  incluida en el BrK mismo. Se ha admitido que se puede dejar sobre una mesa de laboratorio BrK durante días sin que tome suficiente humedad para causar un incremento apreciable en  $\text{H}_2\text{O}$  en el espectro de absorción del comprimido. Sin embargo, pulverizando el BrK se produce intensa absorción de  $\text{H}_2\text{O}$  en los

comprimidos resultantes. Se ha visto que las bandas que interfieren son mucho menos intensas si se usa BrK bruto.

En el espectro de polvo de  $\text{PO}_4\text{Na}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  la banda de agua está a  $3,13 \mu$ . Luego las tres falsas bandas, citadas más arriba, son sin duda debidas al  $\text{H}_2\text{O}$ , pero según referidas a bandas de  $\text{BrK-H}_2\text{O}$ . La intensidad de estas bandas crece casi directamente con el tiempo de molienda.

Un comprimido con solo BrK da una pequeña banda de  $\text{H}_2\text{O}$  a  $3,0 \mu$ ; por molienda superior a 1 minuto la banda de  $\text{H}_2\text{O}$  se incrementa al sextuplo y se centra a  $2,95$  en lugar de a  $3,0 \mu$ .

Hemos tratado de ver la posible influencia de los distintos factores, que intervienen en la preparación del comprimido, sobre la banda de  $\text{H}_2\text{O}$  (a  $2,9 \mu$ ) de comprimidos de BrK solamente

(1) Comprimidos con BrK (alta pureza) secado a  $300^\circ\text{C}$  durante una semana y molido. Con  $15'$  de vacío previo y  $8'$  a  $10 \text{ Tm}$ :

Intensidad de la banda 15% de absorbancia

(2) BrK secado a  $400^\circ\text{C}$  dos días;  $15'$  vacío previo,  $8'$  a  $10 \text{ Tm}$   
10,13%

BrK secado a  $400^\circ\text{C}$  dos días; molido con  $\text{Cl}_4\text{C}$ ,  $15'$  vacío,  $8'$  a  $10 \text{ Tm}$  11%

Los comprimidos de (1) y (2) no compensan bien ni aun con atenuador.

Dos comprimidos de (2) compensan perfectamente con y sin atenuador (la compensación se obtiene situando un comprimido en cada rayo del espectrómetro de doble rayo P.E.621)

- (3) BrK secado a 300°C durante una semana, sin moler, 15' vacío, 8' a 10 Tn: banda de 6% muy ancha. La transmisión era muy pequeña pues el comprimido sale muy opaco.
- (4) BrK a medio fundir, molido, 15' vacío, 8' a 10 Tn 13%
- (5) BrK fundido, molido, 15' vacío, 8' a 10 Tn 18%
- (6) Se empleo BrK monocristalino
  - cristal 0% no da banda de H<sub>2</sub>O
  - cristales molidos, 15' vacío, 8' a 10 Tn 12%
  - cristales molidos, 2' vacío, 8' a 10 Tn 16%
  - cristales molidos, 2' vacío, 2' a 10 Tn 9%
  - cristales molidos, 2' vacío, 3' a 8 Tn 8%
  - cristales molidos, 2' vacío, 2' a 8 Tn 7%
  - cristales molidos bajo lampara de infrarrojo, 2' vacío, 2' a 8 Tn: 5%

Conclusión: parece ser que la absorción de agua se produce en la molienda, y que dicho agua procede de la humedad atmosférica. Por eso, cuanto mayor es el tiempo que transcurre desde

que se inicia la molienda hasta que se forma el comprimido más intenso es la banda de  $H_2O$ . La gran influencia del tiempo de molienda sobre la banda de  $H_2O$  ya se vió más arriba. Se intentó evitar la absorción de  $H_2O$  moliendo el BrK bajo  $Cl_4C$  y moliendo en seco, pero bajo una lampara de infrarrojo que calienta el polvo de BrK, pero las mejoras no son considerables. La presión de sinterización no parece influir gran cosa. Si influye el grado de sequedad del BrK.

La contaminación por agua es generalmente mayor para una pastilla en la que el BrK se ha molido con la muestra que para otro comprimido preparado sin muestra.

Se ha hecho un estudio exhaustivo de las bandas espurias de  $BrK-H_2O$  en muestras de BrK y carbón. Un cuidadoso y extenso secado de las muestras, así como la preparación de la mezcla por molienda en atmósfera inerte, no parece evitar el crecimiento de estas bandas con molienda prolongada.

El efecto de la presión en la preparación de comprimidos fué investigada por comparación de espectros de comprimidos de BrK, de carbón y de mezcla de BrK carbón en polvo. No se observaba diferencia. Se hicieron también comprimidos de  $ClK$ -carbón, aparecían algunas bandas espurias, de las cuales la más intensa estaba desplazada a  $2,97 \mu$ .

Se pensó que la producción de bandas de  $\text{BrK-H}_2\text{O}$  es atribuible a la interacción entre el  $\text{BrK}$  y el  $\text{H}_2\text{O}$  incluido en la muestra. El  $\text{H}_2\text{O}$  está presente en el carbón como tal, aun si el carbón se ha secado a  $105^\circ\text{C}$  y bajo vacío. Roberts informó del encuentro de algunas bandas en pastillas de esteroides y las ha atribuido a trazas de agua en la muestra. Durie denunció algunas bandas en la preparación de comprimidos de  $\text{BrK}$  y compuestos aromáticos polinucleares.

En el espectro de un comprimido de 0,5 mm de una parte de carbón, con 2% de humedad, en 200 de  $\text{BrK}$  con molienda extremadamente larga, se puede notar la presencia de bandas a 2,95, 4,90 y 6,12 u, siendo la intensidad de la banda a 2,95 u muy grande. Considerando que el contenido de agua sería de 0,04% en total, el coeficiente de extinción específico que resulta es  $K$  4,0 lit/gr.cm. La presencia de la banda aguda a 2,95 u con muy corta molienda, puede suponerse debida a la orientación de las moléculas de agua sobre la superficie de los cristallitos de  $\text{BrK}$  recientemente fracturados. Así, pues, las bandas de  $\text{BrK-H}_2\text{O}$  son probablemente producidas por trazas de  $\text{H}_2\text{O}$  de la muestra o del  $\text{BrK}$ , que se orientan convenientemente. Se hizo una investigación con rayos X de estas mezclas, y no se encontró ninguna línea que pudiera asignarse a una nueva estructura cristalina.

A causa de la supuesta orientación de las moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ , se hizo un intento lógico para eliminarla por tratamiento

calorífico de los comprimidos. Semejante tratamiento disminuía la intensidad de las bandas pero no las eliminaba. Roberts, sin embargo, encontró en el caso de comprimidos de esteroides que estas bandas se podían eliminar completamente por obtención del espectro en células calientes trabajando a 175° C. Aunque estas bandas se eliminan a estas temperaturas, se ha encontrado que con el enfriamiento de la muestra las bandas reaparecen otra vez, aunque con intensidad reducida.

La eliminación de las bandas de agua del espectro por medio de células térmicas es satisfactoria si bien un poco inconveniente. Se han hecho intentos para preparar comprimidos que no tengan estas bandas. La pulverización del carbón y el BrK separadamente, seguida de la mezcla sin molienda, no dió resultado. Es necesaria la molienda de los dos componentes juntos para la disminución de la dispersión a ciertas longitudes de onda. La técnica de secado por congelación (liofilización) no es por otra parte aplicable a los carbonos puesto que son muy insolubles en cualquier disolvente.

Un método interesante es el desarrollado por Durie. Si la molienda de la muestra con BrK se hacía bajo una envoltura líquida,  $\text{Cl}_4\text{C}$ , no aparecían las bandas de agua en el comprimido resultante. Quizás esto indique que el  $\text{H}_2\text{O}$  provenía de la atmósfera. Una experiencia con  $\text{H}_2\text{O}$  añadida al BrK confirma que

que el  $H_2O$  en si misma no era molesta. Lo que se demuestra por la preparación de un comprimido usando la técnica de Durie, con un líquido que contenía 5% de  $H_2O$  y 95% de etanol, el comprimido de BrK y carbón resultante no presentaba bandas falsas de absorción de BrK- $H_2O$ . Luego la mera presencia de agua no es responsable de estas bandas. Ello sugiere que el éxito de la técnica de Durie puede ser debido al hecho de que la envoltura líquida provee un medio de conducción del calor de molienda fuera de la superficie de BrK, e impide la adsorción activada de las moléculas de  $H_2O$  sobre la superficie del BrK. Es igualmente posible, sin embargo, que el proceso de adsorción requiera  $H_2O$  en el estado de vapor. La dificultad de este método cuando se aplica al carbón, está en que una sustancia tal como el  $Cl_4C$  aparentemente no puede eliminarse del carbón completamente a temperaturas inferiores a la descomposición térmica del carbón. De este modo uno se enfrenta con la perspectiva de reemplazar una serie de bandas con otra. Otros líquidos, tales como hidrocarburos, pueden ser mejores. El uso del  $H_2O$  misma como líquido envolvente ofrece algunas esperanzas, aunque los intentos iniciales se frustraran por la necesidad de moler la muestra después de la evaporación del agua a causa de la recristalización del BrK. Si este proceso se realiza en un sistema de biofilización puede dar resultado.

También se ha intentado la molienda a temperatura del nitrógeno líquido con la esperanza de que las propiedades del carbón serían alteradas suficientemente como para que la molienda ocurriera más rápidamente. Desgraciadamente no dió resultado.

En la preparación rutinaria de muestras para medidas espectrales, las bandas de  $\text{BrK-H}_2\text{O}$  se evitan más fácilmente y se ahorra tiempo haciendo una molienda muy rápida, a pesar de la dispersión a cortas longitudes de onda.

Falta de reproducibilidad.- Espectros obtenidos bajo distintas condiciones e en distinta técnica, no son siempre idénticos. En algunos casos los cambios espectrales son muy pequeños: variaciones insignificantes en la frecuencia o en la intensidad relativa de las bandas. En otros casos, los espectros de dos comprimidos de BrK preparados del mismo modo y con la misma muestra eran tan diferentes que parecía se tratara de dos sustancias distintas.

Para comparar los espectros de sustancias conocidas y desconocidas, los espectros deben estar hechos en condiciones comparables y en la misma fase. Espectros de la misma sustancia registrados como suspensión en aceite mineral y como comprimido de BrK, son a veces diferentes. Pero lo importante no es que el espectro en BrK pueda diferir del de Nujol o disolución. La dificultad real está en nuestra falta de control sobre el proce-

so de prensado en el nivel microscópico, que lleva a la falta de reproductibilidad.

Con estas dificultades en mente, es aconsejable tener precaución en la interpretación de los datos espectrales cuando se usa esta técnica, y convendrá observar cuidadosamente el espectro entero para evidenciar cambios en la muestra debidos a la operación de prensado.

La técnica parece ser insatisfactoria en mayor o menor grado para los sólidos siguientes: compuestos inorgánicos, muchos ácidos orgánicos, imidas, algunos carbohidratos, algunas amidas, fenoles, aminas y aminas hidrocioradas.

Las causas de la falta de reproductibilidad son las siguientes.

- A)- distribución no uniforme de las partículas y del tamaño de partícula
  - B)- cambios físicos en la muestra debidos a las muy altas temperaturas y presiones locales desarrolladas durante la formación de la pastilla
  - C)- cambios químicos en la muestra por descomposición o por reacción con el haluro.
- A) El recubrimiento estadístico del area del rayo por partículas de muestra nunca es total y uniforme y habrá pequeñas areas

por donde el rayo pase libremente. Es algo similar a una célula de absorción que tuviese burbujas. Nunca se podrá observar la absorción completa de bandas intensas.

Por otra parte, a medida que disminuye el tamaño de partícula de la sustancia soporte aumentan las distorsiones espectrales, y si es grande, aunque sea uniforme, se dispersa mucha radiación.

#### B) Cambios físicos-Polimorfismo:

Debe presentarse atención a la forma cristalina de la muestra. Un espectro de absorción de infrarrojo depende no solo de la identidad de las moléculas que lo producen, sino que cuando se ha obtenido en el estado cristalino depende también de la exacta naturaleza de la disposición de las moléculas en la red del cristal. Así pues la posible modificación de la forma cristalina durante el proceso de preparación de la muestra originará cambios en el espectro de la sustancia.

Los factores que influyen en los cambios observados en los espectros son los siguientes:

##### a) Energía del cristal (fase de la muestra)

Compuestos con elevada energía reticular tienen el mismo espectro en comprimidos o en suspensión, a menos que ocurran transiciones polimórficas.

Normalmente, compuestos con punto de fusión por encima de 200°C son estables si la molienda no es demasiado vigorosa. Compuestos con PF bajo (89 - 90°C) generalmente muestran ensanchamientos de las bandas y desplazamiento del pico.

b) Energía de molienda de la muestra y de la sustancia soporte. Si una sustancia presenta un ensanchamiento de las bandas y un cambio de posición del pico, una molienda vigorosa dará un espectro casi idéntico al del líquido, mostrando así que la molienda desorienta totalmente al azar la ordenación molecular.

c) Energía reticular de la sustancia soporte  
Cuanto más baja sea esta, más intensa será la molienda que requiere la muestra. Cuanto más alta mayor habrá de ser la presión de sinterización.

Ya que la muestra está inicialmente no disuelta en el Brk, un efecto de disolución parcial puede cambiar la posición e intensidad de la banda.

Además la recristalización de la pastilla puede durar desde unos minutos para compuestos con energía cristalina

elevada hasta meses si el compuesto tiene energía cristalina baja. Luego no es del todo exacto el que los comprimidos se puedan considerar como material de referencia que no cambia. El efecto puede reducirse calentando la pastilla por debajo del punto de fusión del sólido y así permitir la relajación de tensiones y la recristalización. Talk ha demostrado que el envejecimiento de pastillas en una atmósfera húmeda conduce al mismo resultado.

En algunos casos, las anomalías espectrales son debidas al fenómeno de adsorción de una especie monomérica del soluto sobre la superficie de las partículas de haluro .

#### Polimorfismo:

A menudo una especie química simple puede existir en más de una forma cristalina (polimorfismo), y los espectros de las diferentes formas pueden ser bastante diferentes. Es posible pasar de una forma polimórfica a otra o de una forma amorfa a otra, por destrucción de los cristales. Aunque esto se da raramente en la técnica de suspensiones, parece ser más usual en la técnica de comprimidos, pues las operaciones de molienda y prensado son realmente violentas. Además esta alteración no es controlable ni reproducible pues no es posible vigilar un material mientras se muele en un molino o mientras se comprime en una matriz. Si es posible observar que sucede

durante una molienda manual, y así hacer correcciones antes de que el material llegue a degradarse.

Así pues, si el compuesto tiene un estado cristalino más estable durante las condiciones de molienda y presión podrá isomerizarse físicamente al hacer la pastilla. En muchas preparaciones orgánicas resultan estructuras cristalinas que por ser inestables a temperaturas ambiente, pasaran, al volver a las condiciones normales, a formas más estables, con lo que el espectro cambiará con el tiempo. A lo peor, todas estas transformaciones no son completas, y puede resultar una mezcla de dos o más formas cristalinas en la muestra. Con ello el fenómeno es aun menos reproducible.

Desde luego, la posibilidad de diferentes formas cristalinas para el mismo compuesto, es algo que debe considerarse cuando se interpretan espectros de sólidos cristalinos.

Parece ser que el polimorfismo es la regla y no la excepción con materiales sólidos, especialmente con moléculas altamente polares.

La cantidad de formas polimórficas o amorfas parece aumentar con las impurezas del material sólido.

#### C) Transformaciones químicas:

Las altas temperaturas locales que se producen en la molienda seca y las elevadas presiones durante el prensa-

do pueden causar fácilmente alguna descomposición parcial de la muestra. Incluso se puede dar la oxidación del BrK cuando se le mezcla con un fuerte agente oxidante.

Diversos investigadores señalan que la dificultad más seria radica en el intercambio aniónico entre el compuesto (especialmente sales inorgánicas) y el haluro alcalino. Esto origina la aparición de nuevas bandas (al aparecer nuevas especies químicas) y el desplazamiento de otras. El fenómeno se observó al emplear distintos haluros alcalinos con un mismo compuesto. La magnitud del efecto total depende de la cantidad de cambios, y la posición de las nuevas bandas varía con el  $X^-$  (anión). El  $H_2O$  adsorbida sobre la superficie de la muestra y del haluro promueve y acelera el intercambio. Todos los comprimidos presentan este fenómeno en mayor o menor grado, según el agua retenida y la presión requerida para sinterizar. Una posibilidad de eliminar este efecto en algunos casos consisten en hacer vacío al molde (antes de prensar) durante un largo período y manteniendo un bajo contenido en  $H_2O$  y humedad. También se obvia la dificultad con el empleo de ATK. Pero de todos modos no se ha encontrado una solución definitiva al problema.

Un ejemplo de intercambio aniónico entre muestra y BrK es el que nos suministra la molienda de  $C_6H_5COOH$  jun-

to con BrK durante un largo periodo de tiempo.



lo que se comprueba porque el espectro resultante denota la presencia de benzoato potásico.

También puede darse el intercambio del potasio y otros cationes formados sobre superficies catalíticas.

Desventajas frente a las suspensiones.-

- a) La técnica de comprimidos requiere más tiempo y también más accesorios para la preparación della muestra
- b) La preparación de una suspensión puede ajustarse en un punto de la operación; o puede ajustarse la densidad después de haber registrado una porción de espectro. En cambio el resultado final de la preparación de un disco no se conoce hasta que el comprimido se ha secado de la matriz o hasta que se ha registrado el espectro.
- c) Aunque ambas técnicas darán en general espectros muy parecidos, a veces los comprimidos producirán espectros de peor calidad, sobre todo cuando se prepara un material no familiar. Puede obtenerse un buen espectro pero generalmente después de una cierta cantidad de experimentación sobre el vigor y duración de la molienda, mezcla y prensado.

- d) Las regiones de tensión OH y NH y la de C=C y C=N suelen estar oscurecidas por las bandas del agua absorbida.
- e) Los cambios polimorficos son más frecuentes en la preparación de comprimidos.
- f) Los haluros alcalinos son químicamente más reactivos que los agentes de suspensión y pueden reaccionar con la muestra.

Ánodo de goma para tierra estanca

- B - Cámara de vacío
- A - Cilindro matriz
- C - Cubierta
- D - Ánodo
- E - Cara superior de la matriz
- F - Cara inferior de la matriz

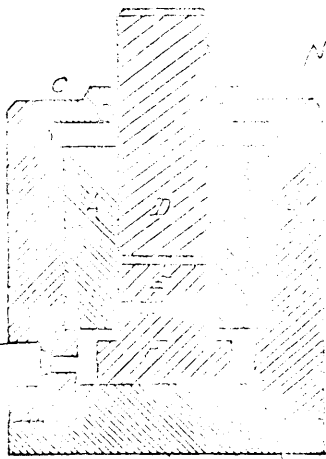
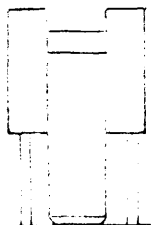
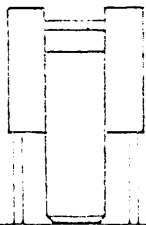


Figura 1

Ánodo de goma para tierra estanca



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 2



Matriz superior  
25, en pulgadas  $\phi$  x 1/2 pulgadas espesor

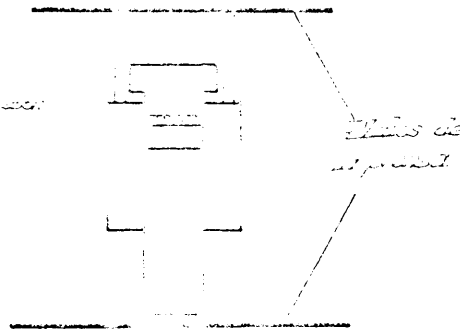


Líquido de filtro, uno o más  
capas espesor



Matriz inferior

Figura 3

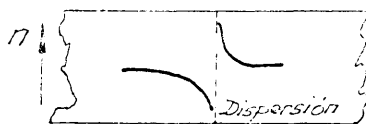


Ánodo de goma para tierra estanca

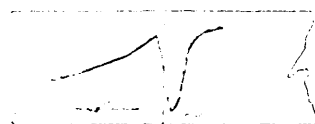
Figura 4



Variación de la conductancia



Variación de  $n$  en la región de  $V_0$



Variación de la conductancia

Figura 5

## 11.- ESPECTROS INFRARROJOS

## 1.- REGISTRO DE LOS ESPECTROS

### 1.1.- Sustancias

#### Azucres

- 1) D-Ribosa
- 2) 2-Desoxi-d-Ribosa

#### Bases

- 3) Uracilo
- 4) Timina
- 5) Citosina
- 6) 5-Metil-citosina-ClH
- 7) Adenina
- 8) Guanina
- 9) Hipoxantina
- 10) Xantina

#### Nucleosidos

- 11) Uridina
- 12) Citidina
- 13) Adenosina
- 14) Guanosina

#### Nucleotidos

- 15) Acido uridina 5'-monofosfórico (disódico) U.M.P
- 16) Uridina 5'-difosfato (trisódico) U.D.P.
- 17) Uridina 5'-trifosfato (trisódico) U.T.P
- 18) Uridina 5'-difosfoglucoasa (sal sódica) UDPG
- 19) Citidina 5'-monofosfórico (disódico) C.M.P

- 20) Citidina 5'-difosfato(trisódico) C.D.P.
- 21) Citidina 5'-trifosfato(disódico) C.T.P.
- 22) Citidina 5'-difosfecolina(menosódico)
- 23) Adenosina 5'-monofosfórico(tipo V): A.M.P.
- 24) Adenosina 5'-monofosfórico(sal sódica)(tipo II): A.M.P.
- 25) Adenosina 5'-difosfato (sal sódica): A.D.P.
- 26) Adenosina 5'-difosfato (sal bária): A.D.P.
- 27) Adenosina 5'-trifosfato (disódico)(4H<sub>2</sub>O): A.T.P.
- 28) Adenosina 5'-trifosfato (disódico)(3H<sub>2</sub>O): A.T.P.
- 29) Adenosina 5'-tetrafosfato(tetrasódico)
- 30) Guanosina 5'-monofosfórico(sal sódica): G.M.P.
- 31) Guanosina 5'-difosfato (trisódico): G.D.P.
- 32) Guanosina 5'-difosfato d-mannosa (disódico)

#### Acidos ribonucleicos

- 34) Acido ribonucleico soluble(rRNA)de levadura de panadería; N<sup>o</sup>Catálogo 15363 RRAC-Boehringer (Mannheim)
- 35) Acido ribonucleico soluble (tRNA), tipo III, de levadura.- SIGMA.  
Preparado por Holley y otros; J.B.C., 236, 200(61).
- 36) Acido ribonucleico soluble (tRNA) de levadura de panadería, Preparado en el laboratorio de Infrarrojo según método de Holley.

#### 1.2.- Condiciones de registro.

La mayoría de los espectros corresponden a una concentración de 1 mg de sustancia en 300 mg, excepto para algunas sustancias en que se han empleado concentraciones mayores para obtener bandas de intensidad satis-

factória. Estas excepciones son:

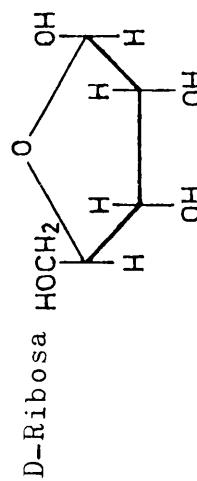
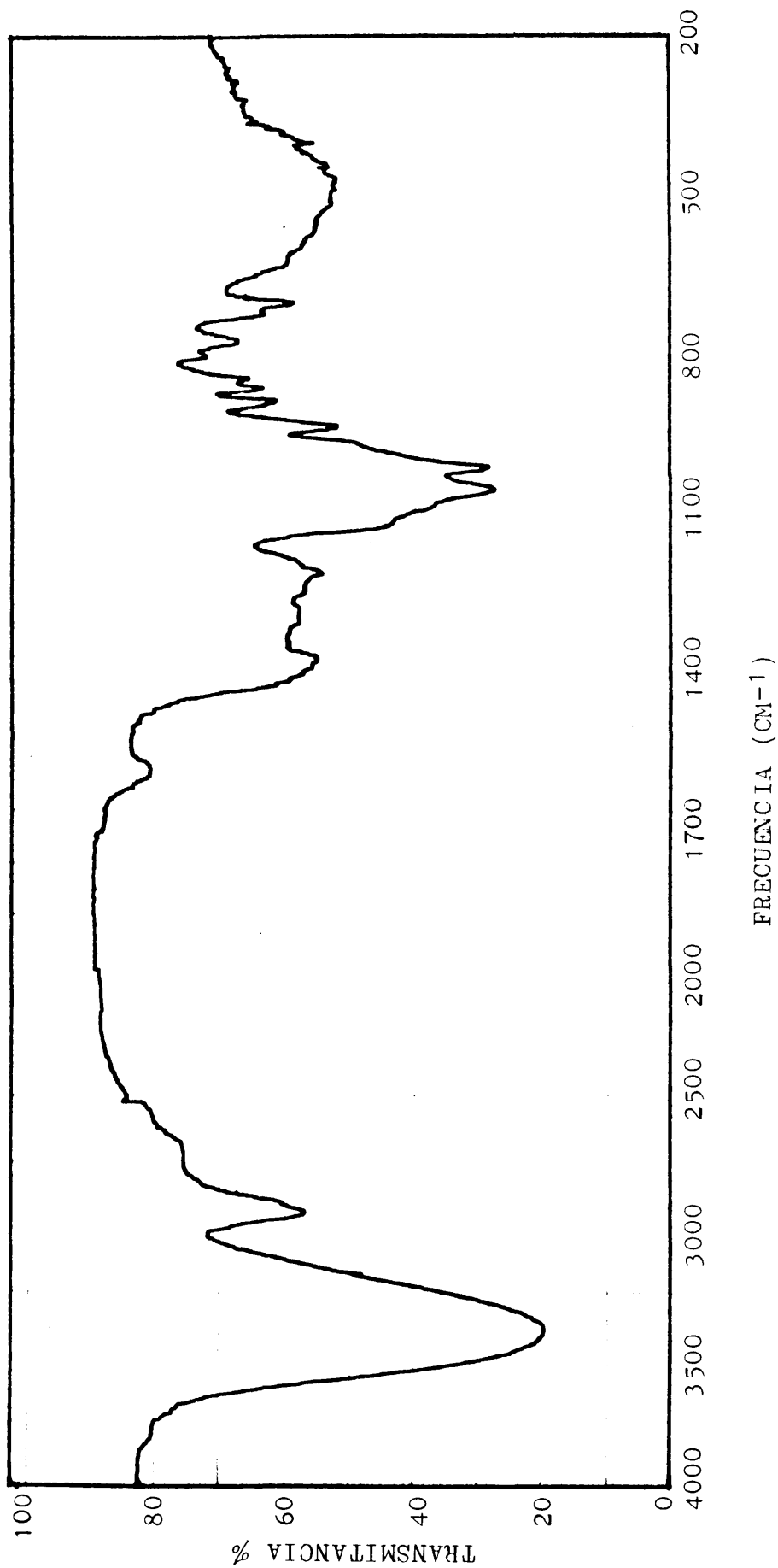
C.D.P.	2,3 mg	en	300 mg.
C.T.P.	2,5 mg	en	300 mg.
C.D.P.colina	2,5 mg	en	300 mg.
U.D.P.G.	2,5 mg	en	300 mg.
A.M.P. (tipo II)	2,5 mg	en	300 mg.
A.D.P. (barico)	2,5 mg	en	300 mg.
A.T.P. (3H <sub>2</sub> O)	2,5 mg	en	300 mg.
A.Tetra P.	2 mg	en	300 mg.
G.M.P.	2 mg	en	300 mg.
G.D.P.	1,5 mg	en	300 mg.
G.T.P.	1,8 mg	en	300 mg.
G.D.P.M.	2 mg	en	300 mg.
E.R.N.A. (Boehringer)	1,8 mg	en	300 mg.

El aparato usado para el registro de los espectros es un "espectrofotómetro Perkin-Elmer 621 " de doble rayo, cuyo rango es 200-400 cm<sup>-1</sup>. Las condiciones de registro son las correspondientes a la obtención de un espectro de "rutina"

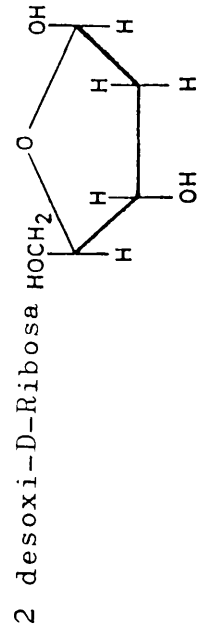
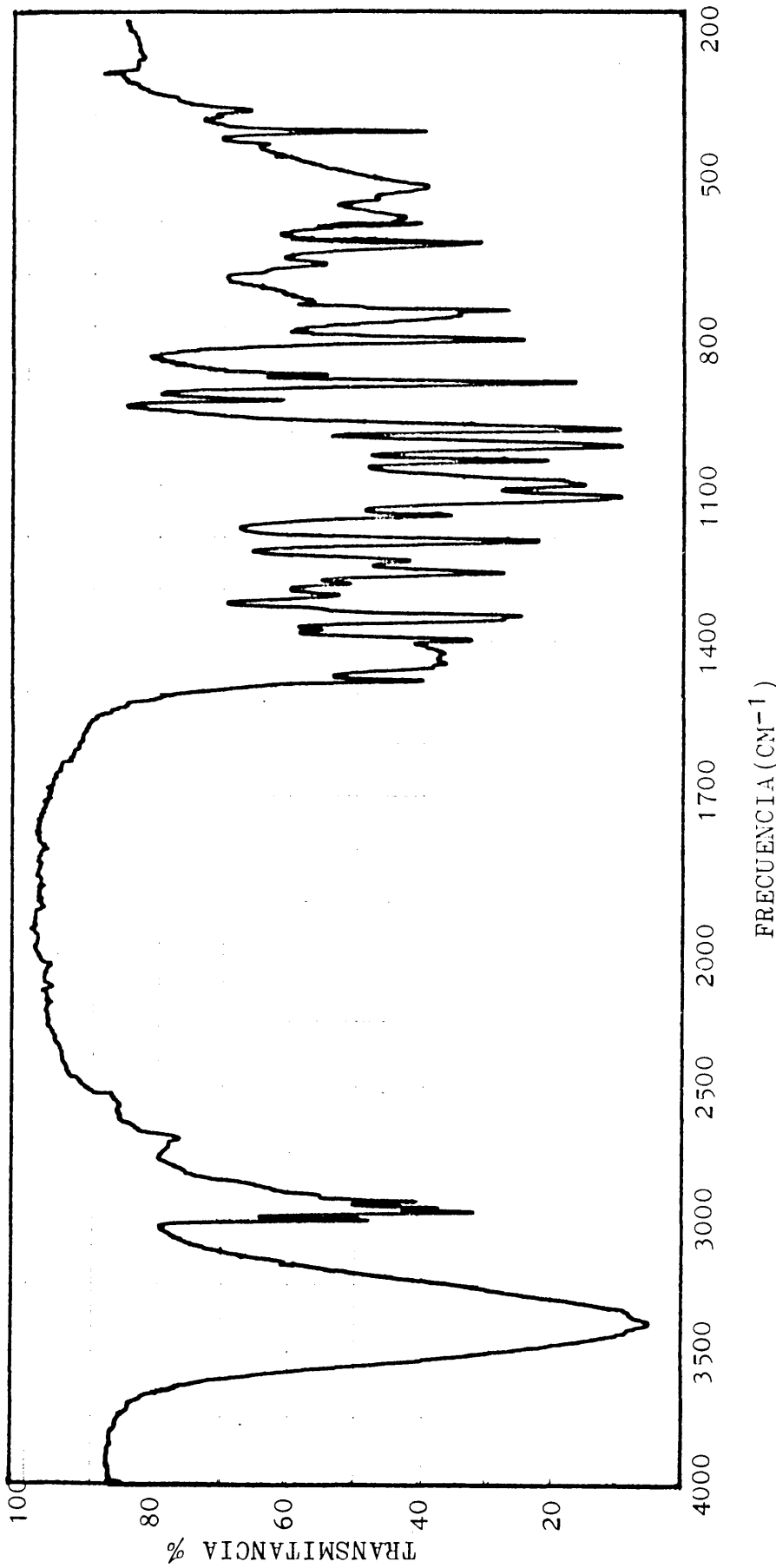
- Papel nº 221-1614
- CHANGE GEAR - ruedas de 45 dientes
  - SCALE CHANGE-LINEAR - en CHANGE
  - POWER - ON
  - SCAN CLUTCH - IN
  - SCAN TIME - 16
  - SUPPRESSION - 6
  - EXPANSION - 1X
  - ATTENUATOR SPEED - 1100
  - AMPLIFIER GAIN - 4
  - SLIT PROGRAM - 1000

- SCAN PROGRAM - IN
- FILTER - AUTO
- SLITS 4 PROGRAM
- MOTORS - ON
- SOURCE INTENSITY - 0,8 Amp
- ENERGY - AGG OFF
- TEST SIGNAL - OFF
- FREQUENCY COUNTER - 4000
- RUM BACK - AUTO
- GAIN, BALANCE, 0% y 100% debidamente ajustados
- En el rayo de referencia se ha puesto un comprimido de BrK solamente. Cuando la compensación no era satisfactoria (mucho absorción de fondo) se intercalaba además, en dicho rayo, un atenuador mecánico.

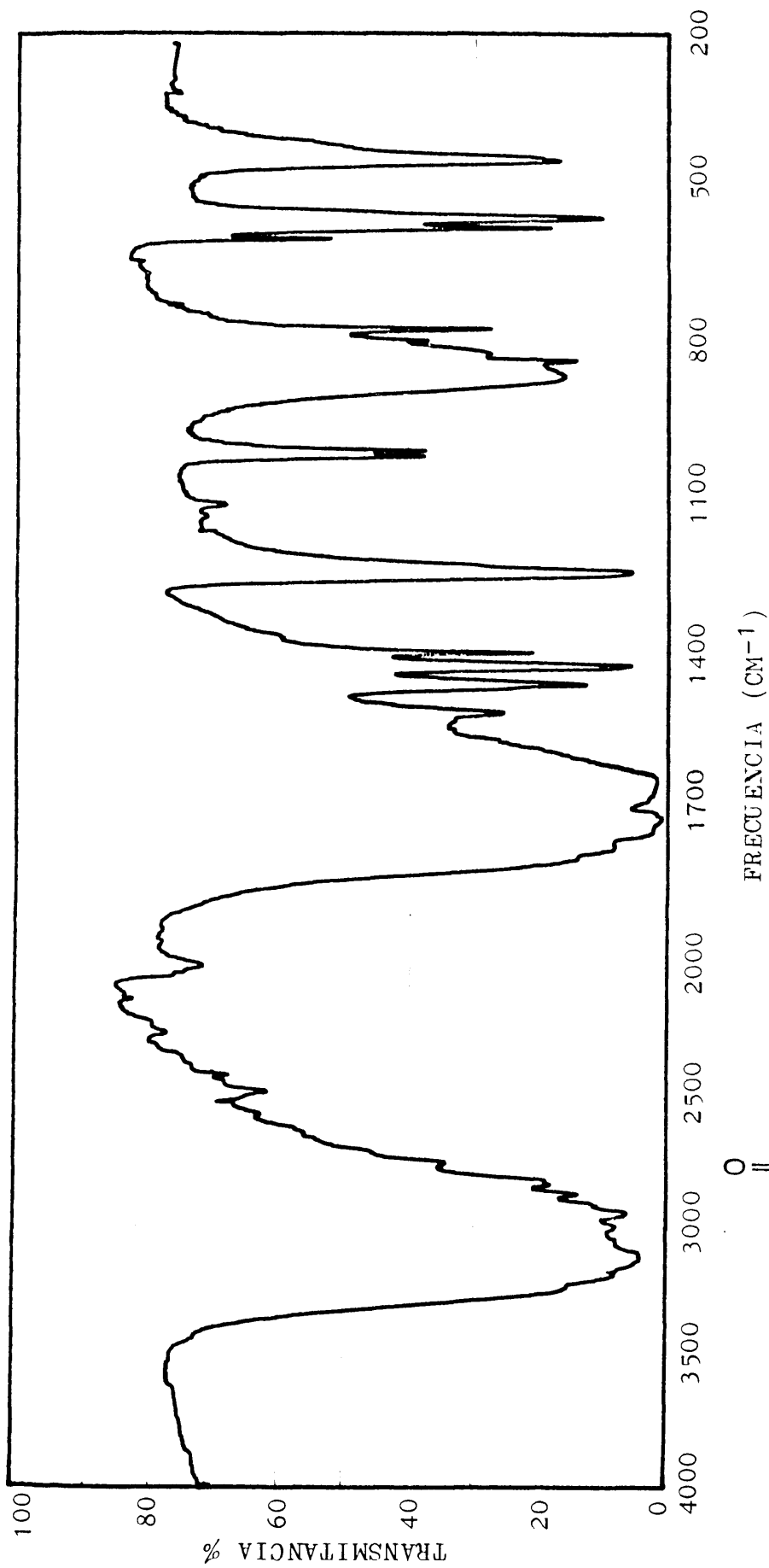
### 1.3.- Espectros



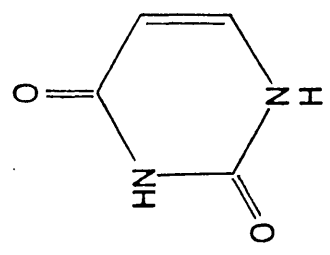
Espectro 1



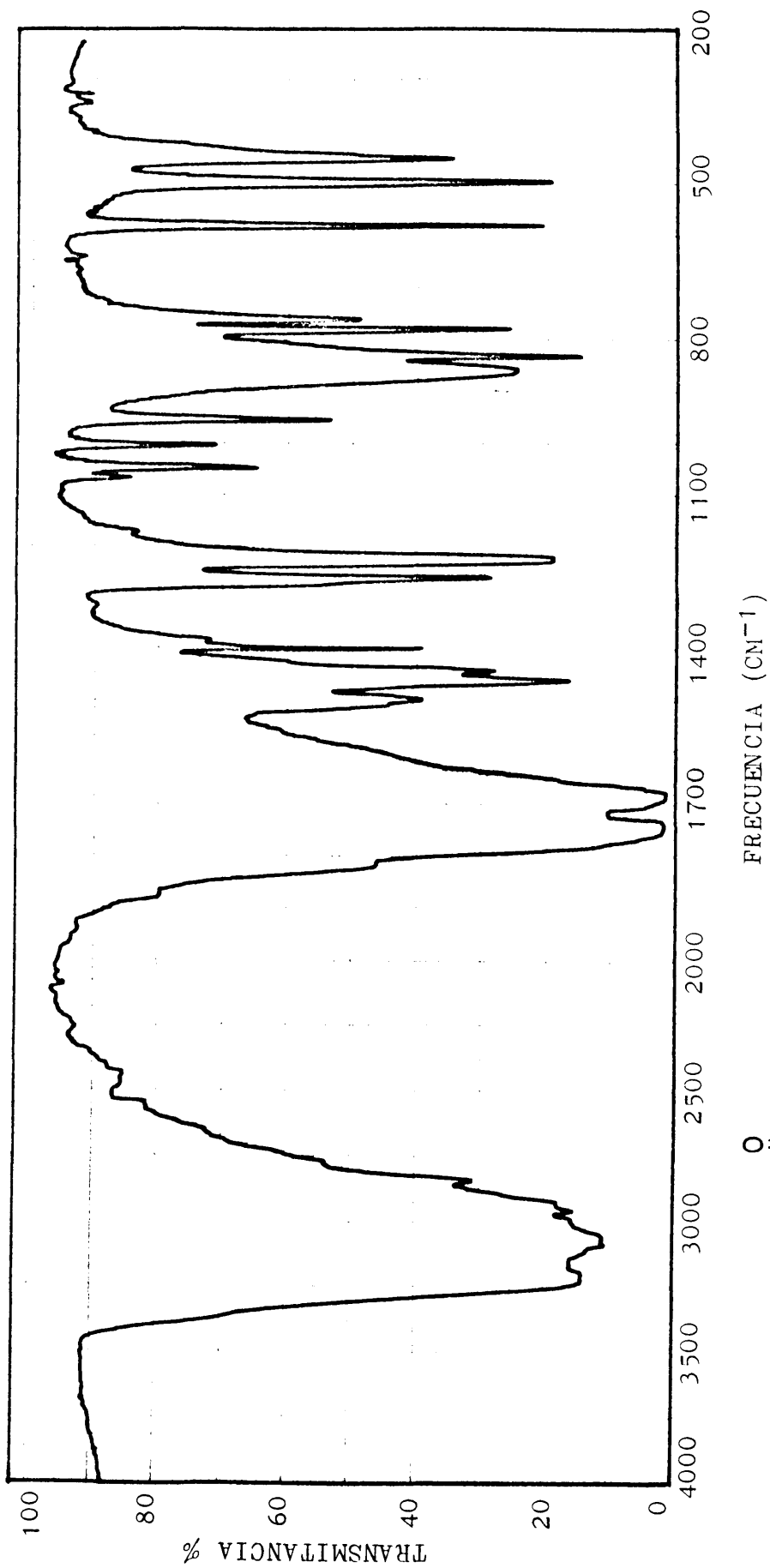
Espectro 2



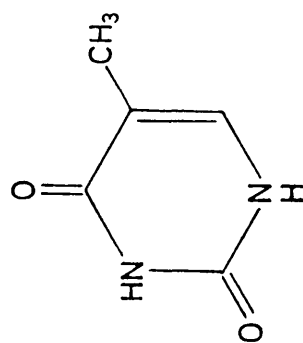
Espectro 3



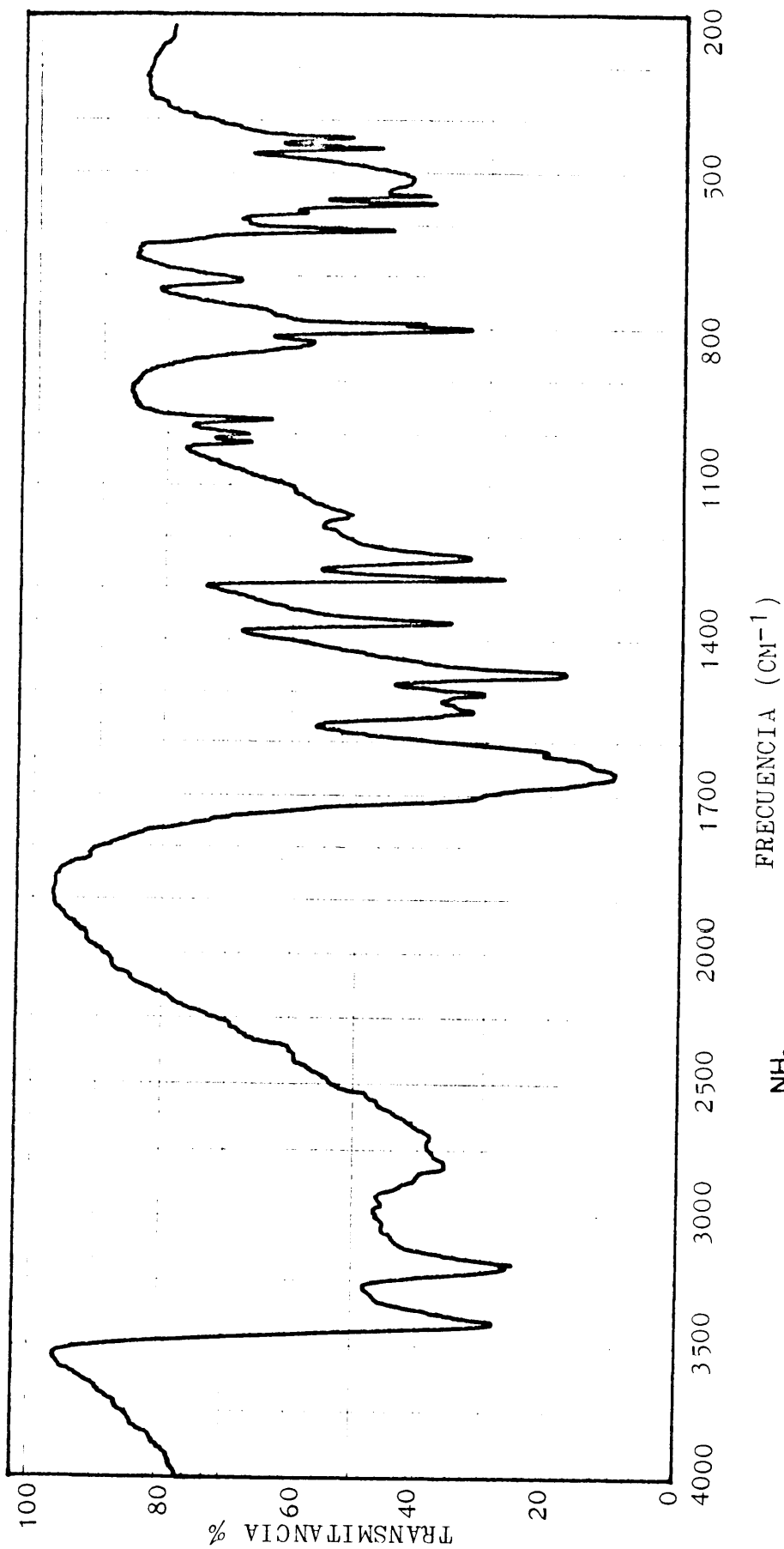
Uracilo



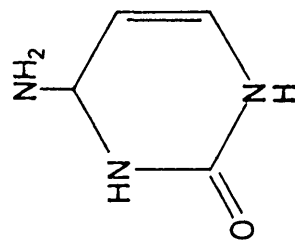
Espectro 4



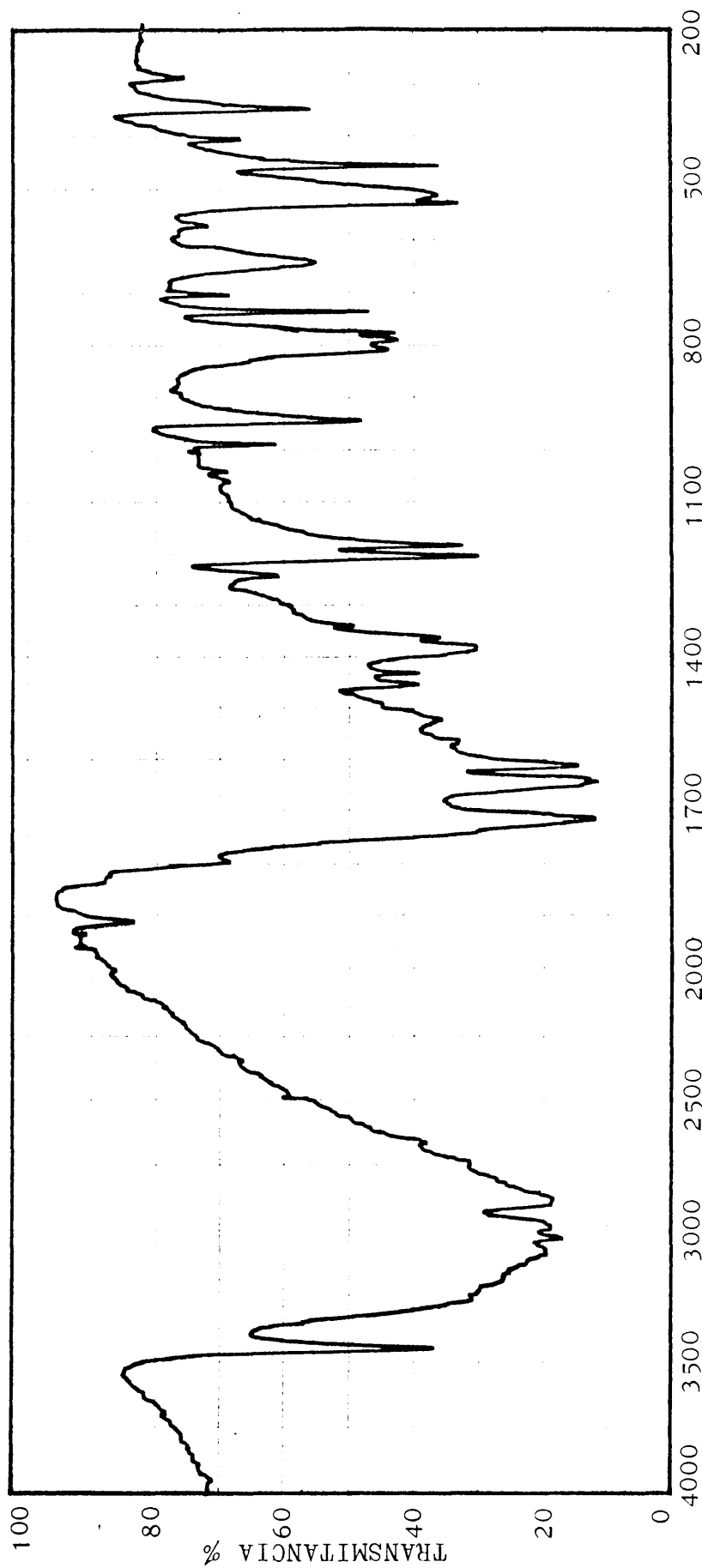
Timina



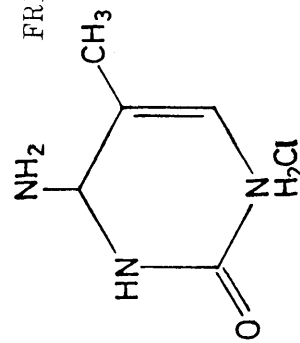
Espectro 5



Citosina

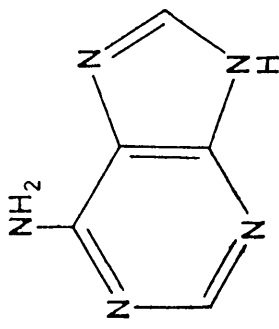
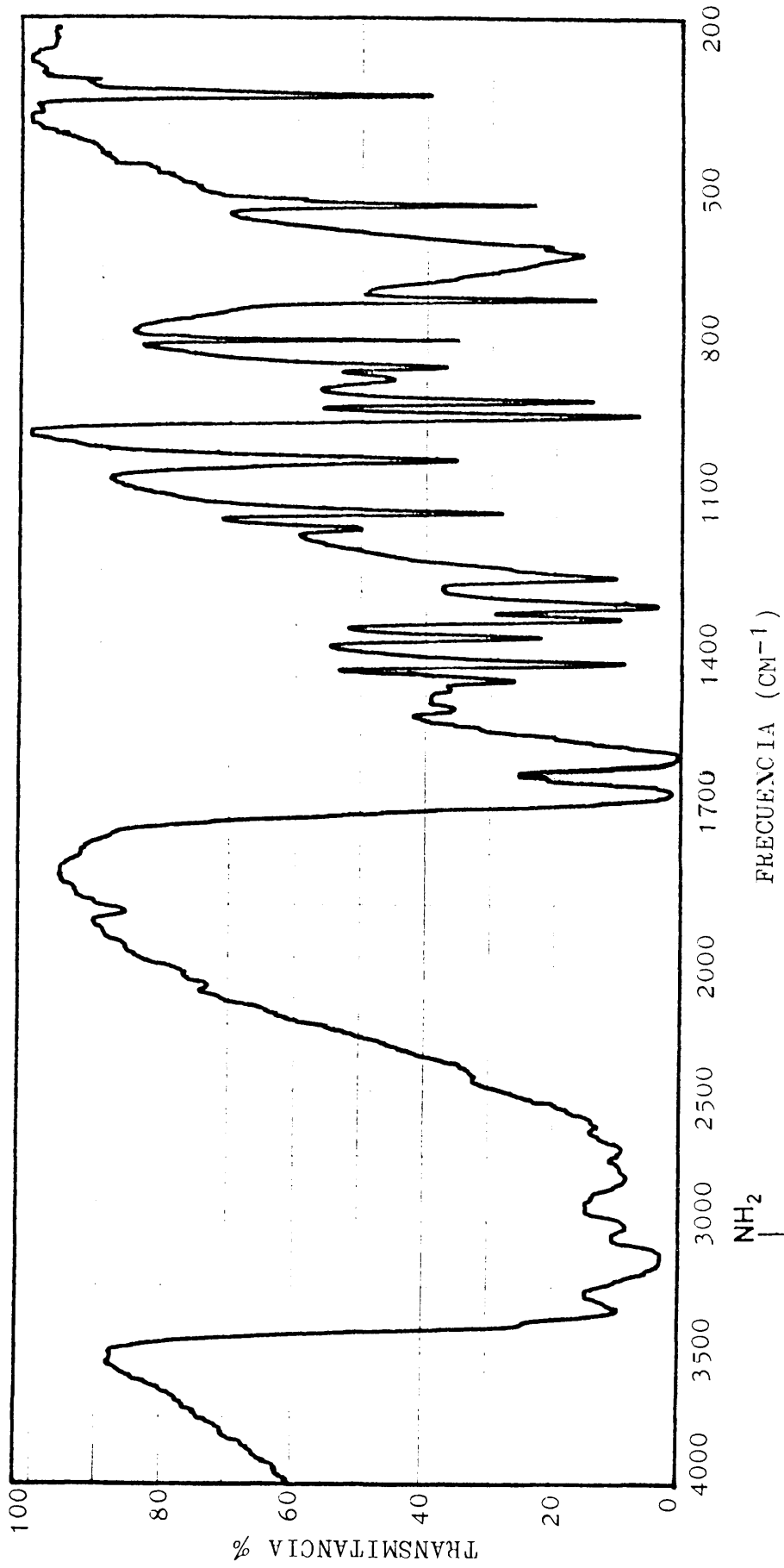


FRECUENCIA (CM<sup>-1</sup>)



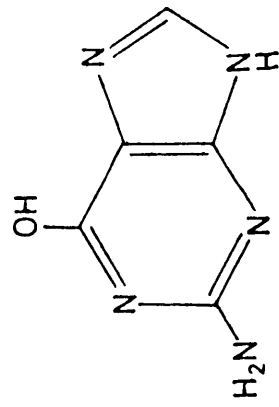
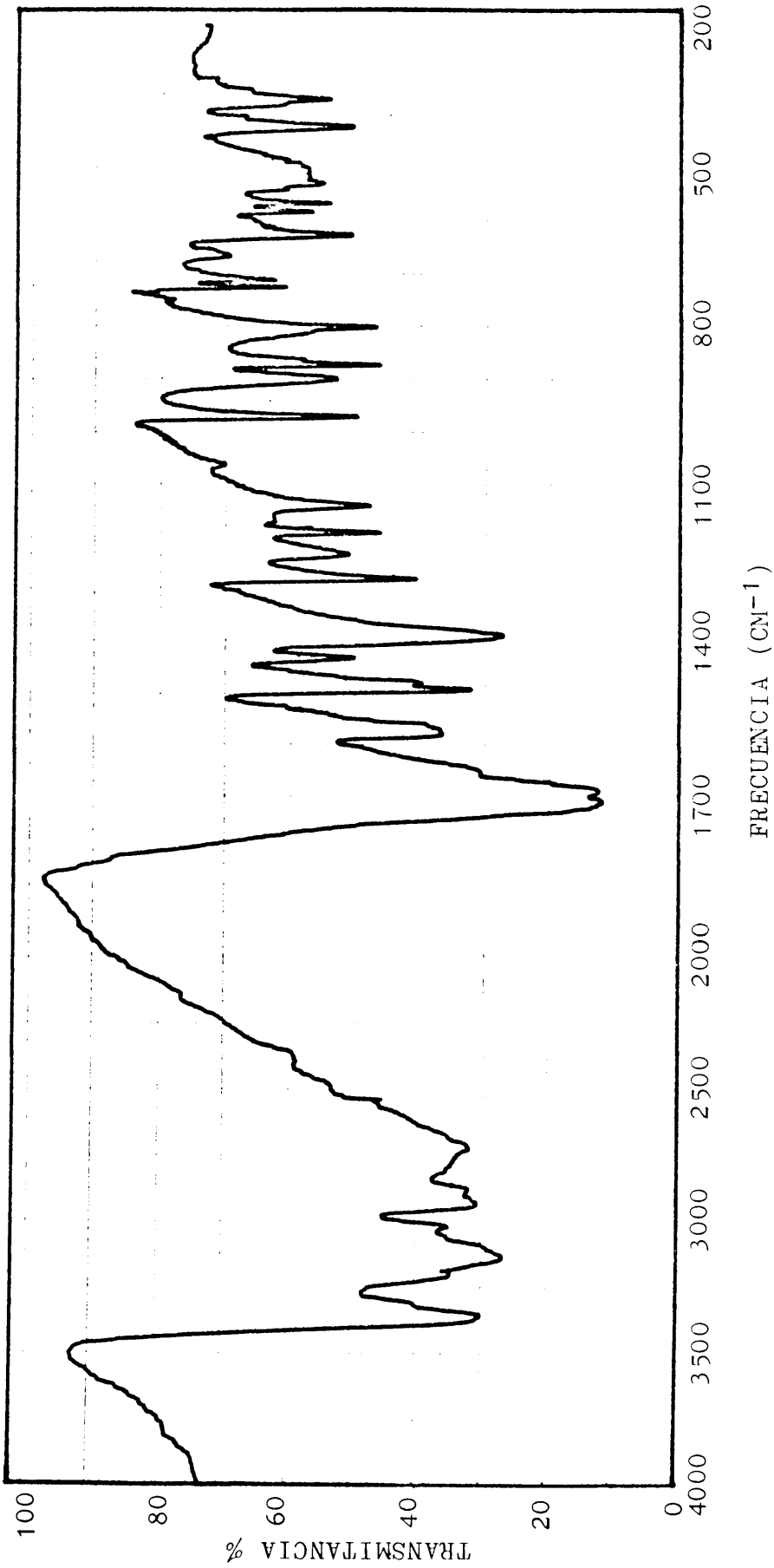
5 metil citosina ClH

Espectro 6



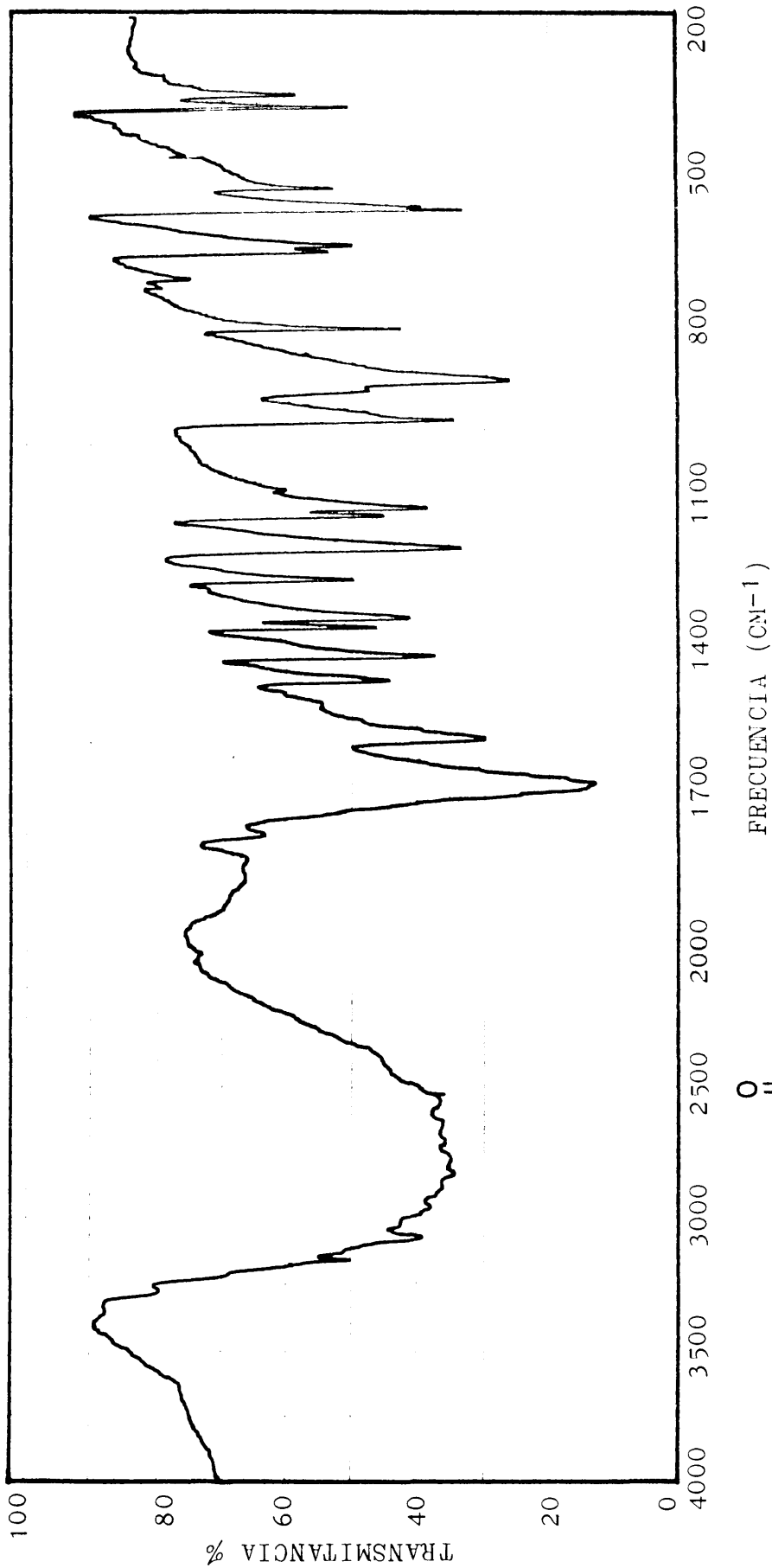
Adenina

Espectro 7

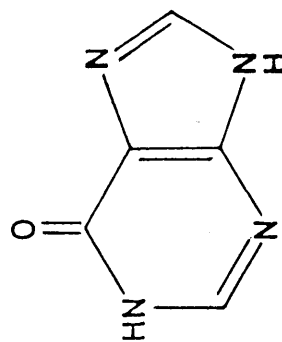


Guanina

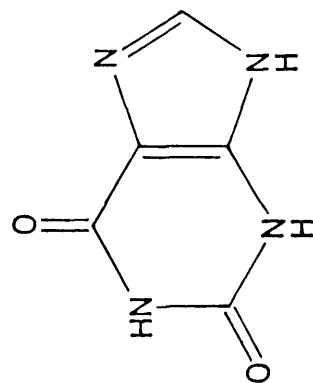
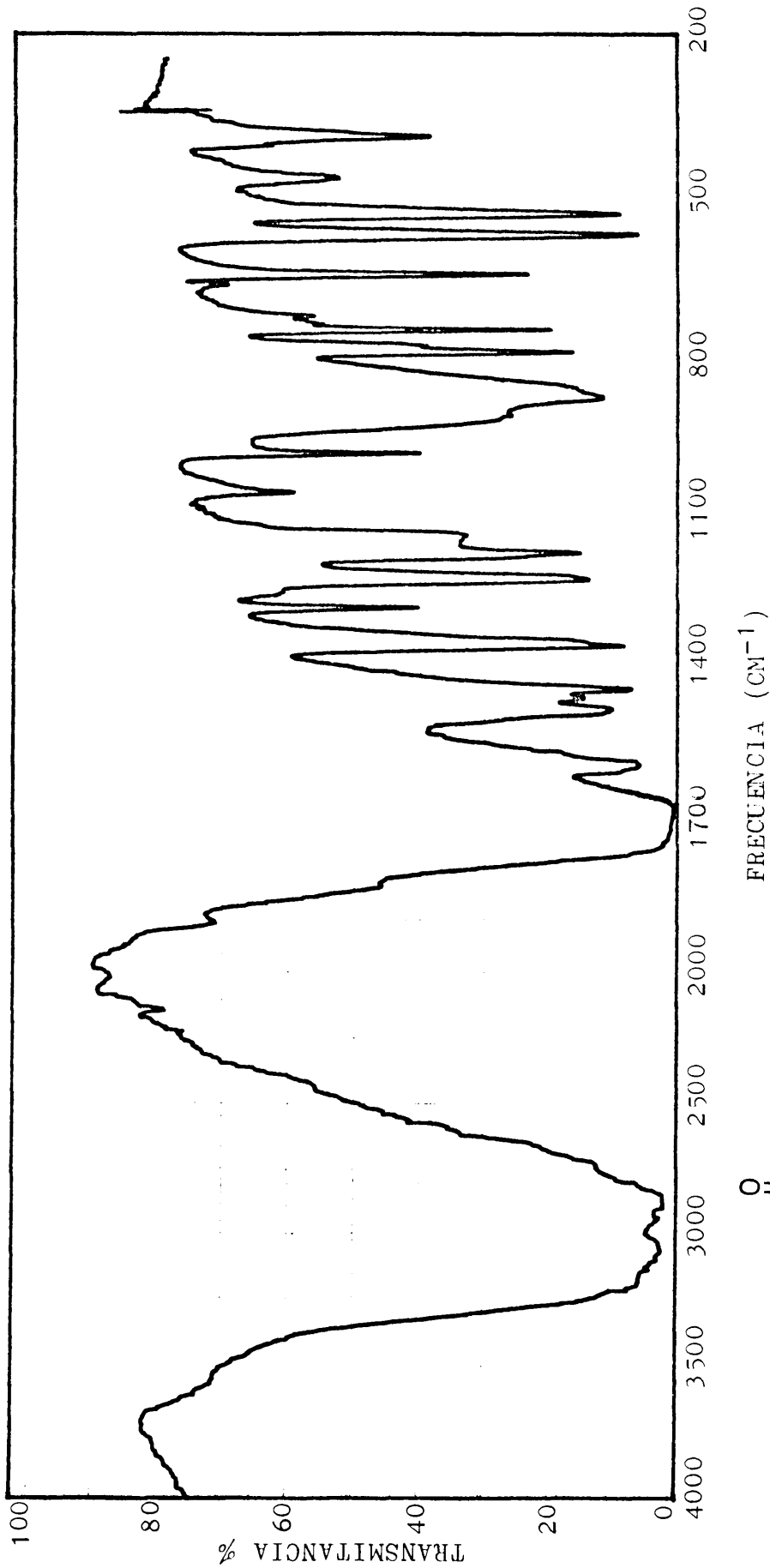
Espectro 8



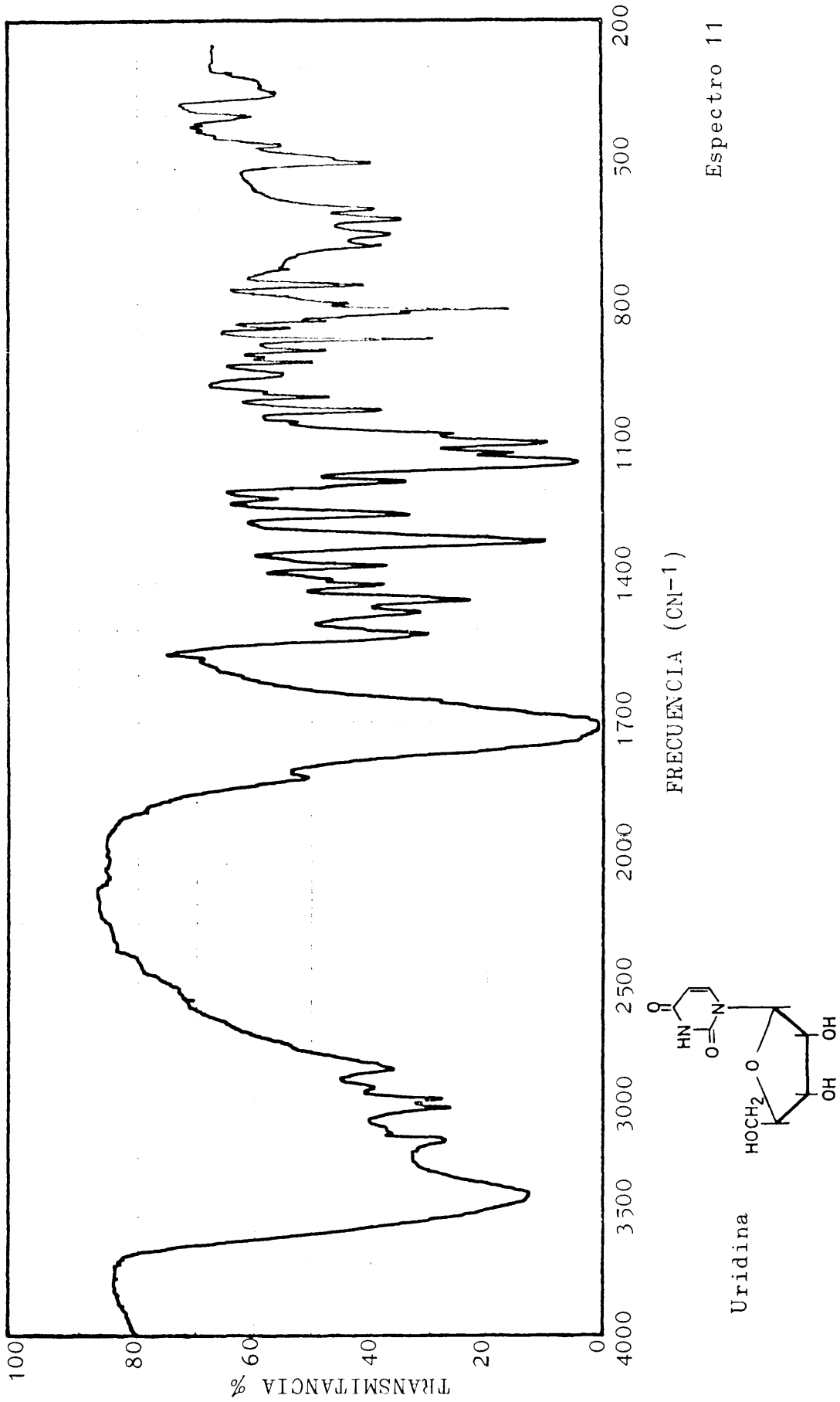
Espectro 9



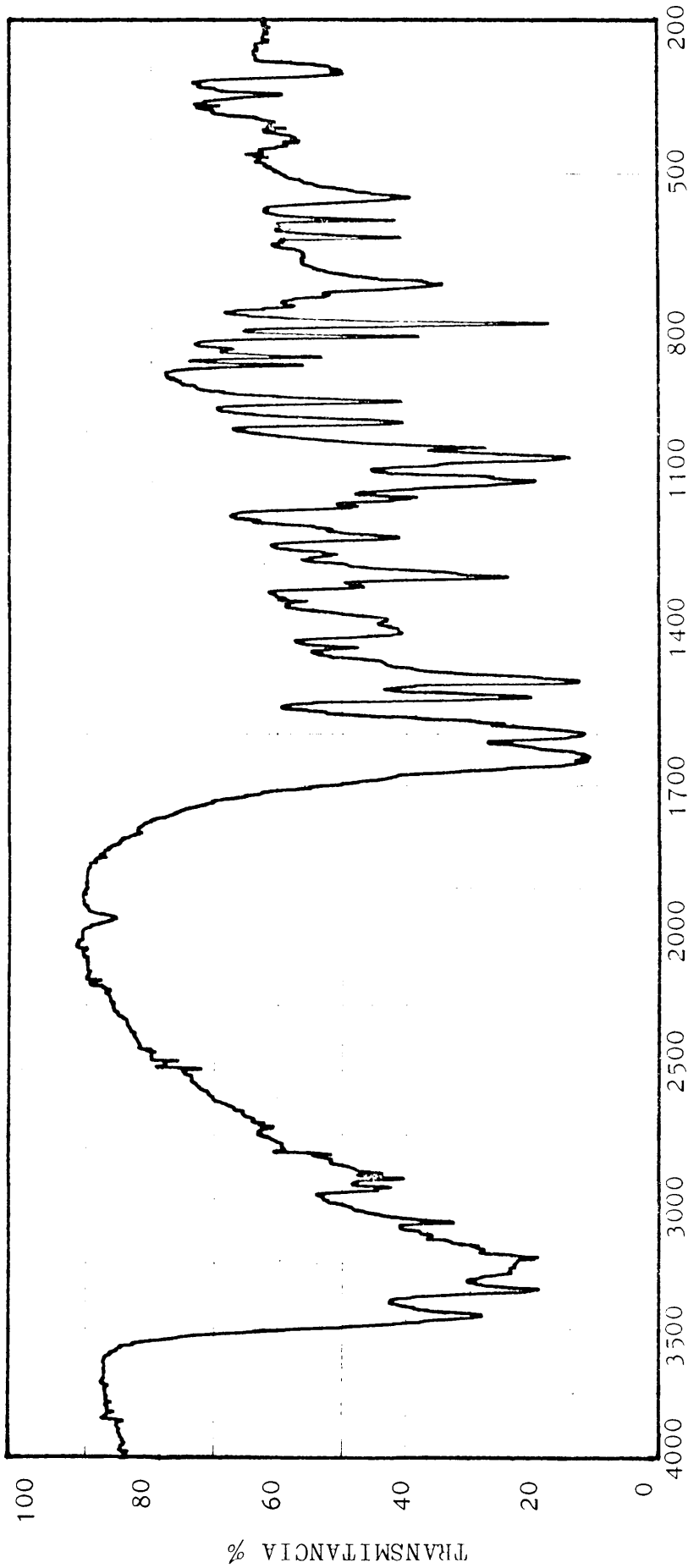
Hipoxantina



Espectro 10

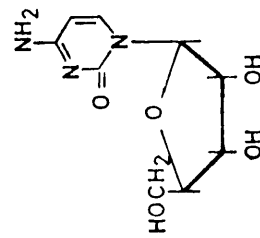


Espectro 11

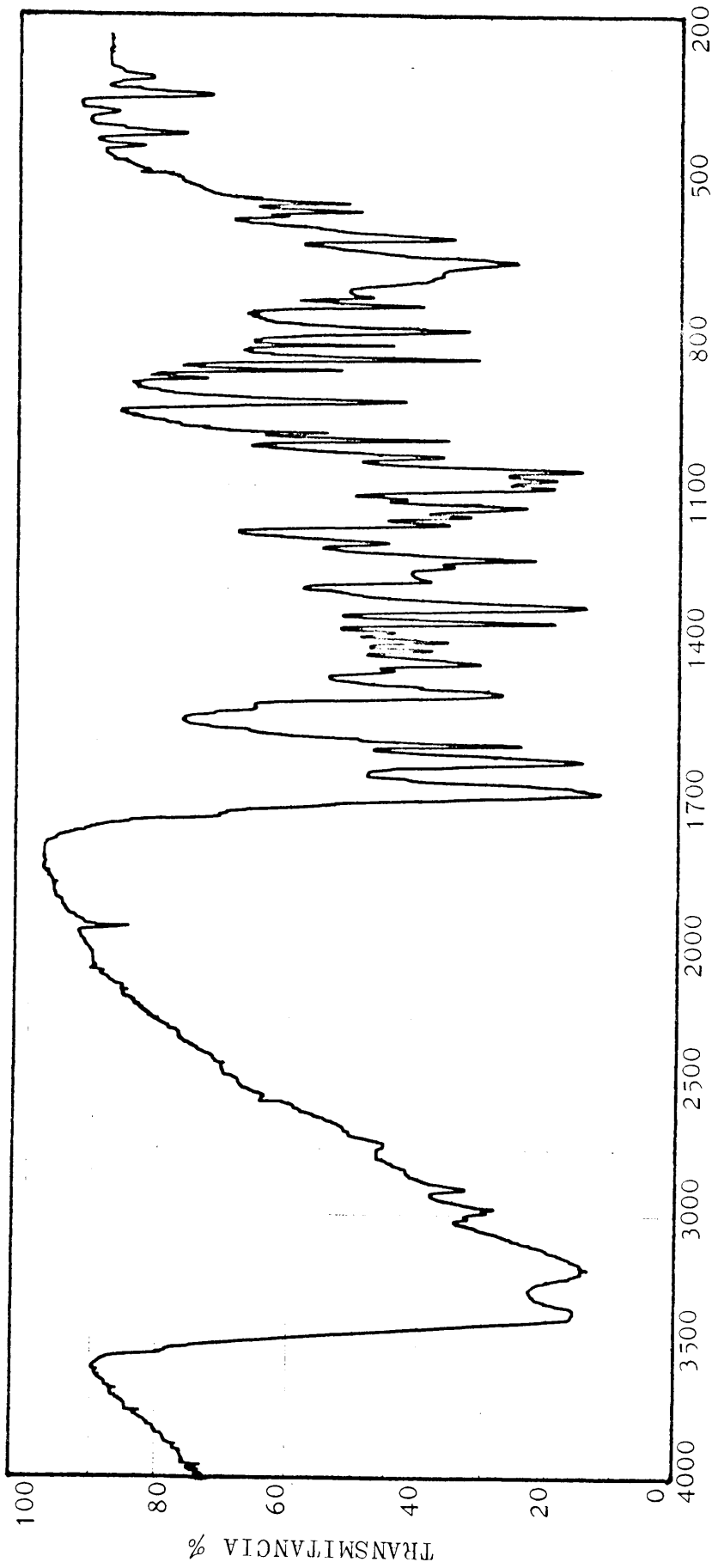


FRECUENCIA (CM<sup>-1</sup>)

Espectro 12

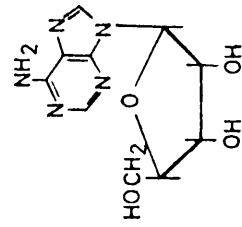


Citidina

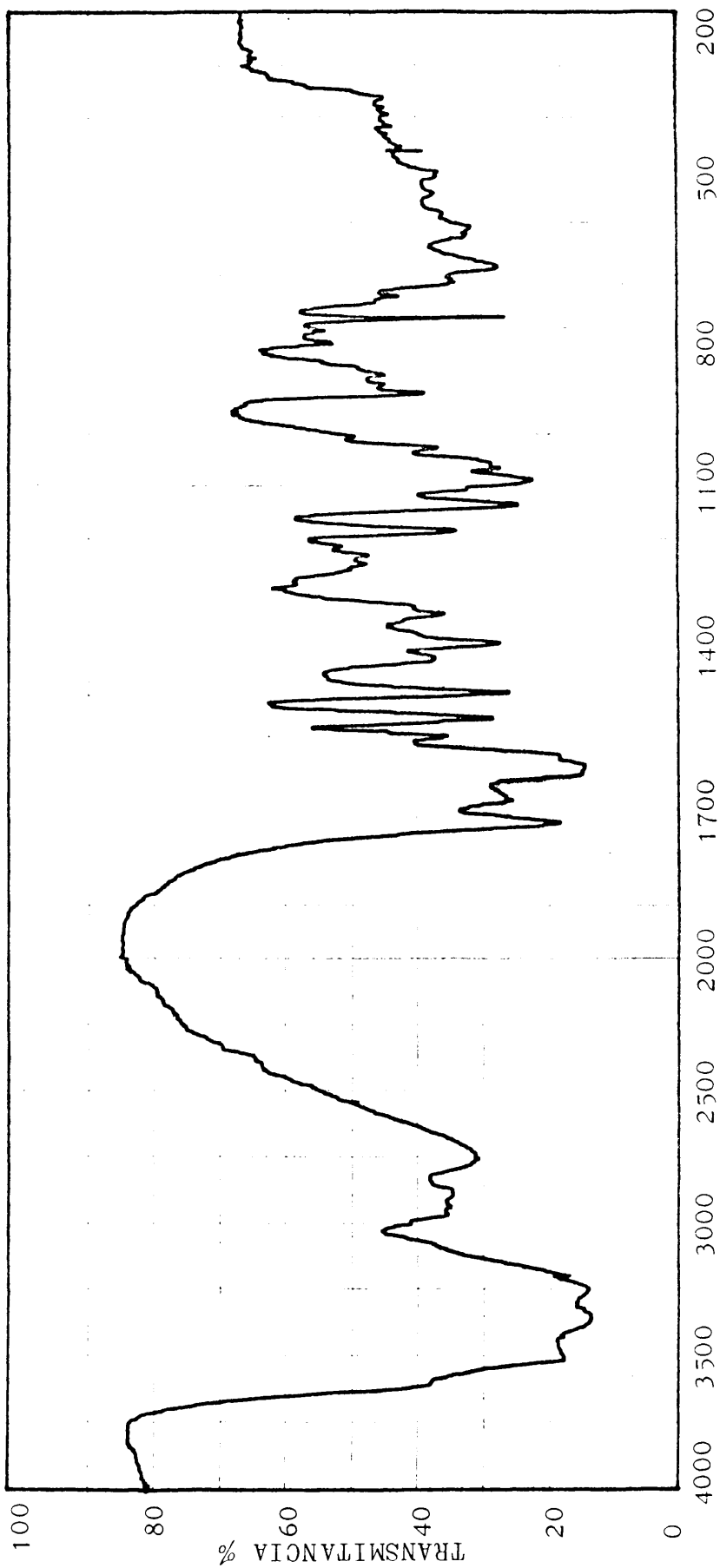


FRECUENCIA (CM<sup>-1</sup>)

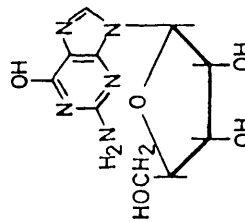
Espectro 13



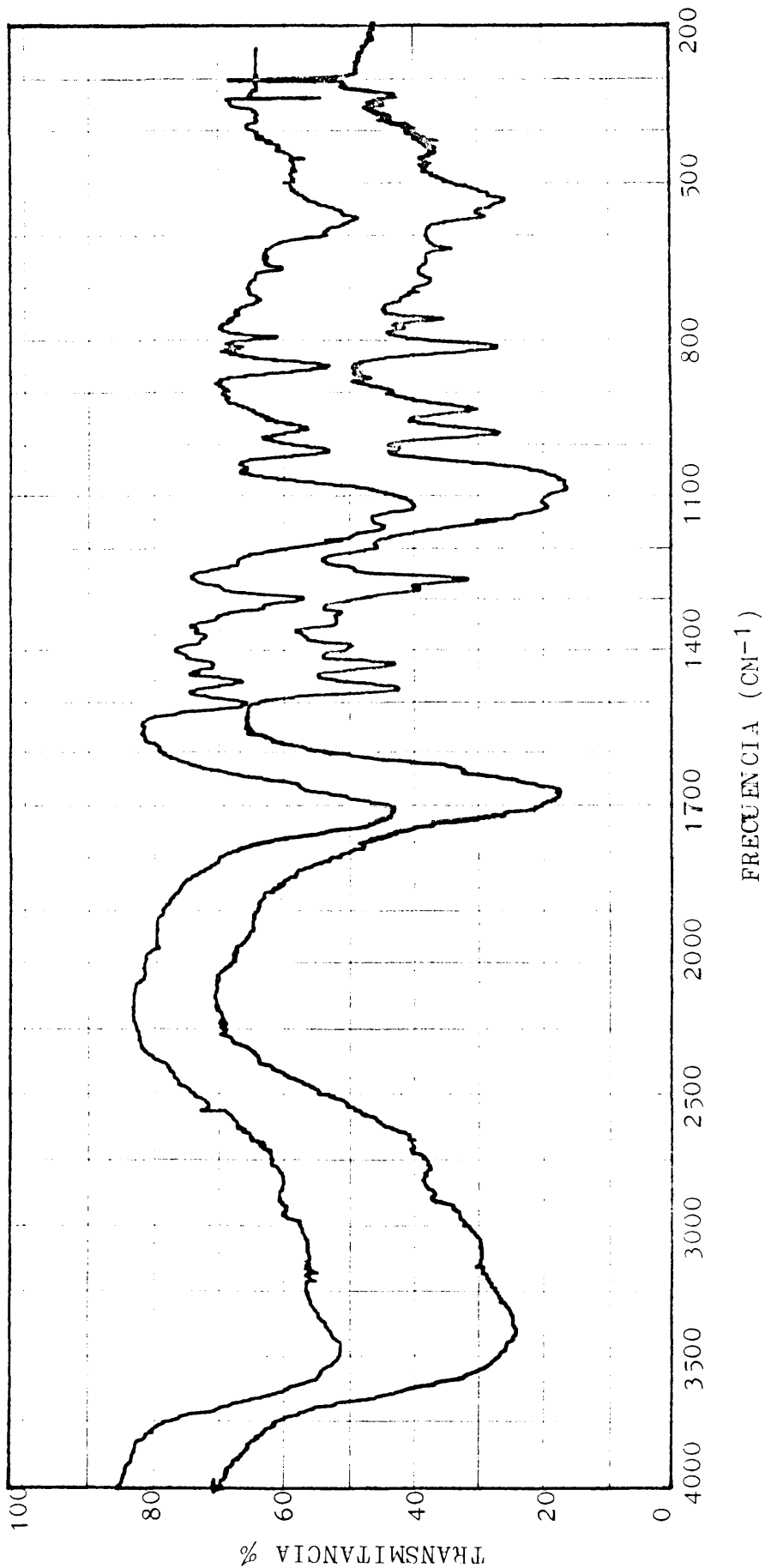
Adenosina



Espectro 14

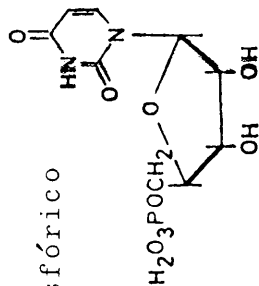


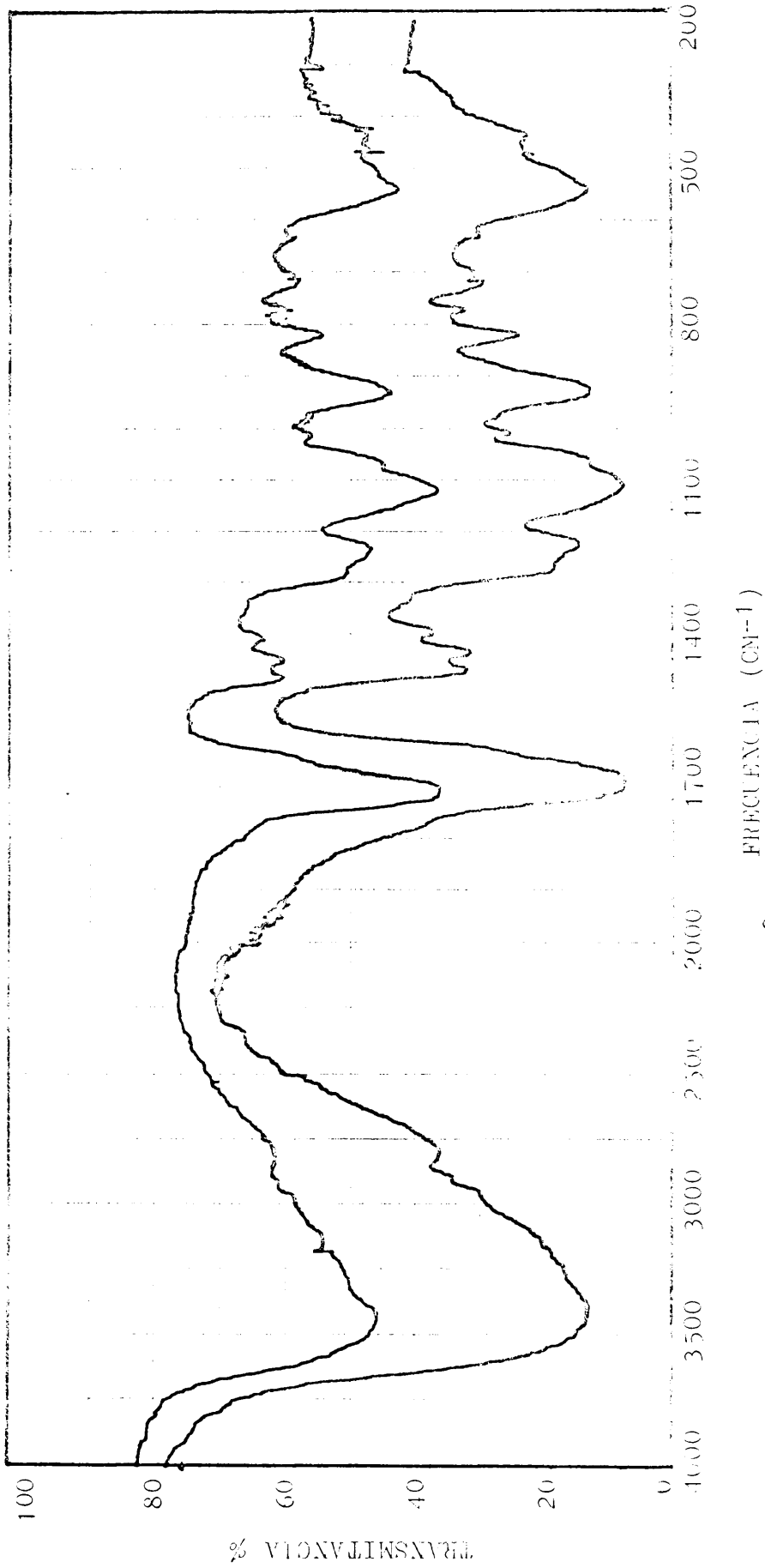
Guanosina



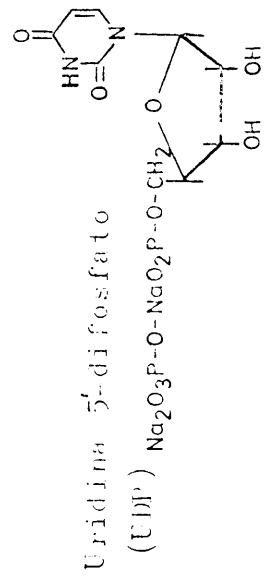
Espectro 15

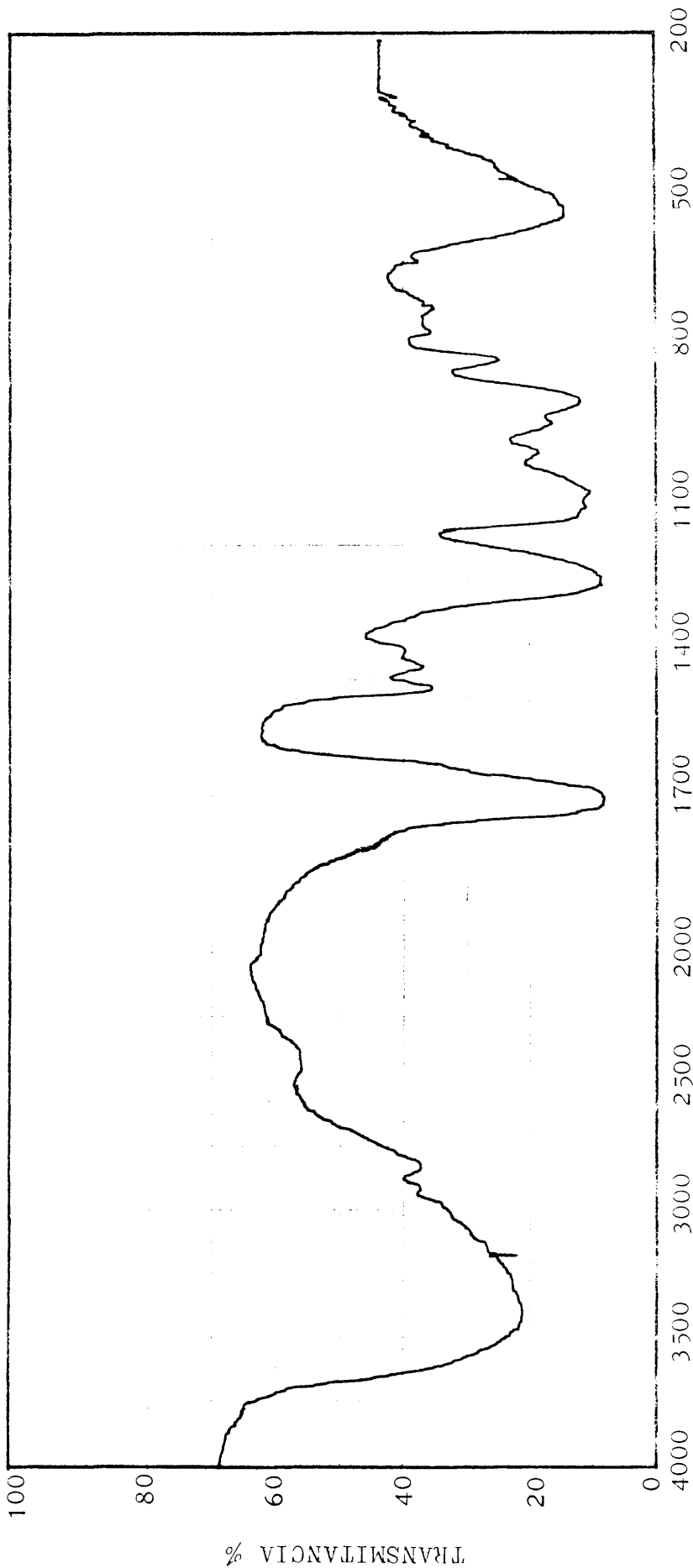
Acido, Uridina-5'-monofosfórico  
UMP





Espectro 16



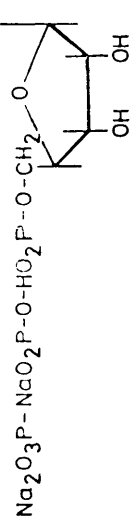


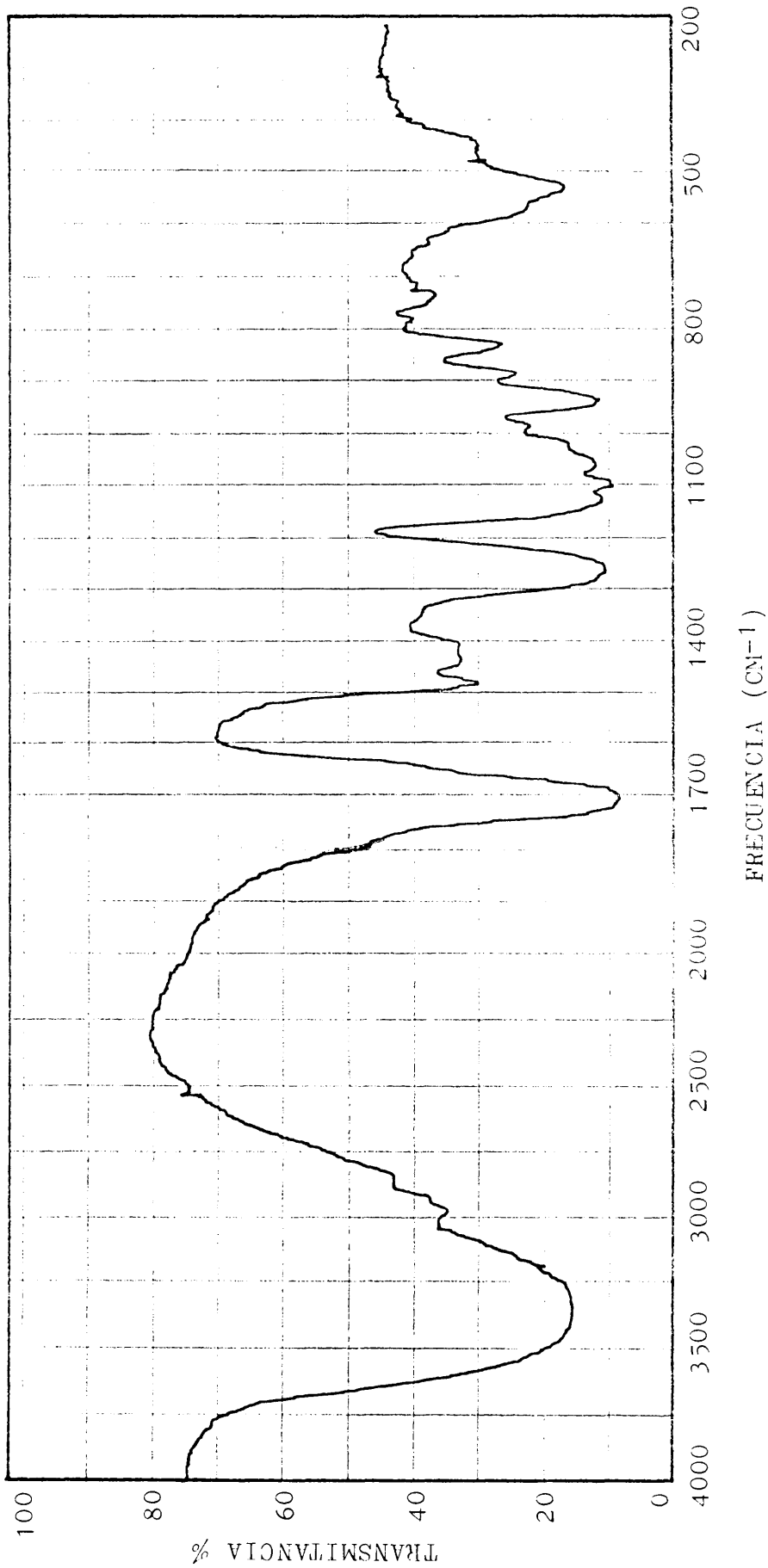
FRECUENCIA (CM<sup>-1</sup>)

Espectro 17

Uridina-5'-trifosfato (trisódico)

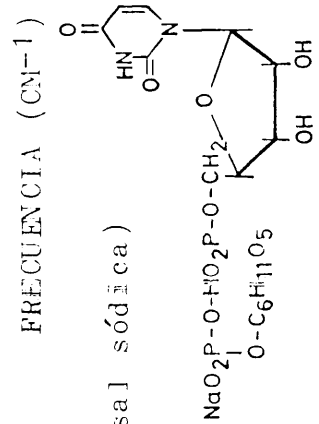
UTP

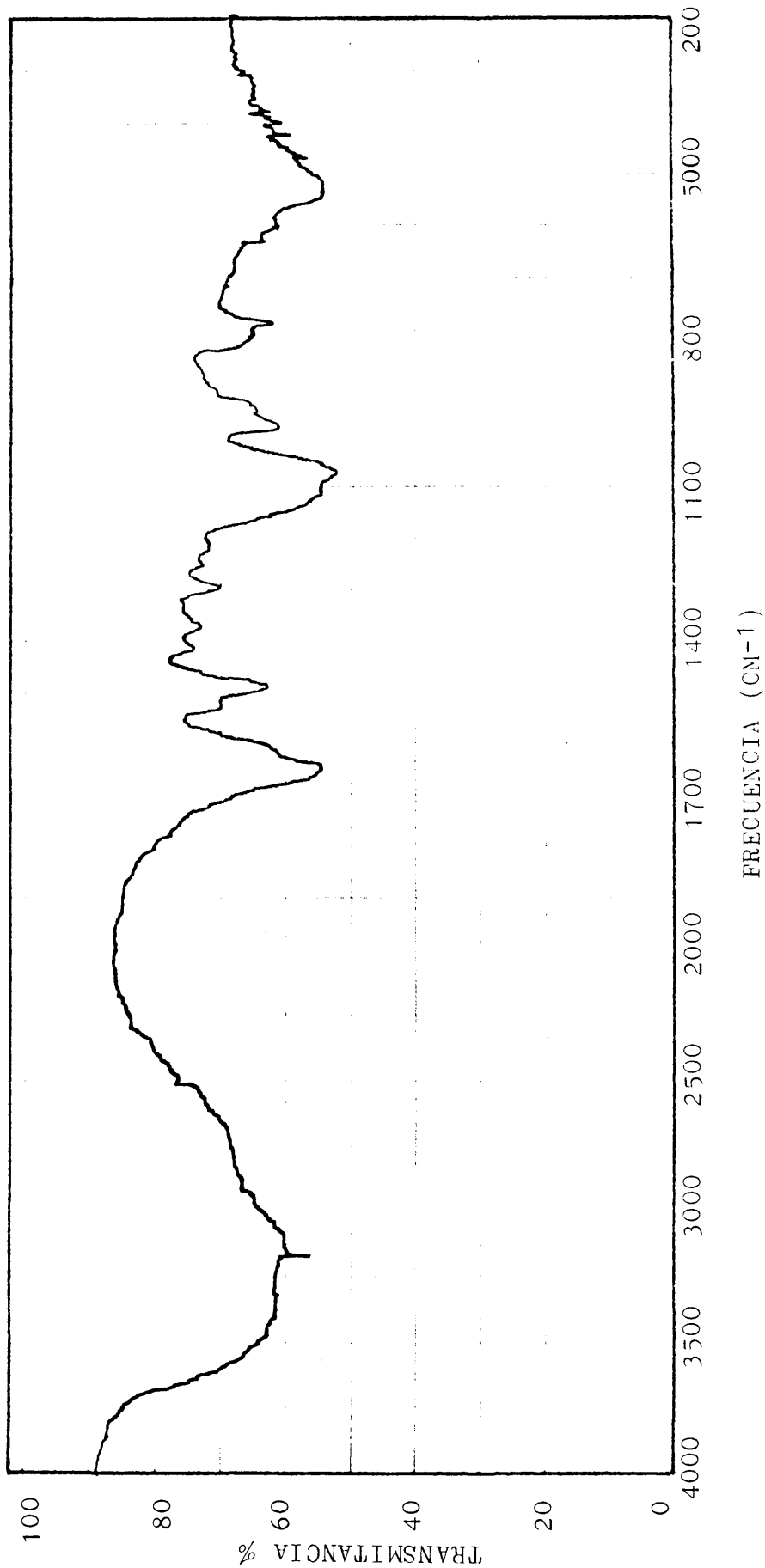




Espectro 18

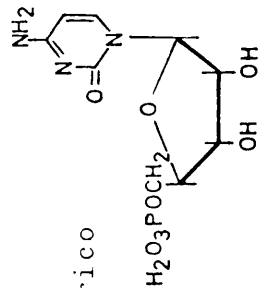
Uridina 5'-difosfoglucosa (sal sódica)  
(UDPG)



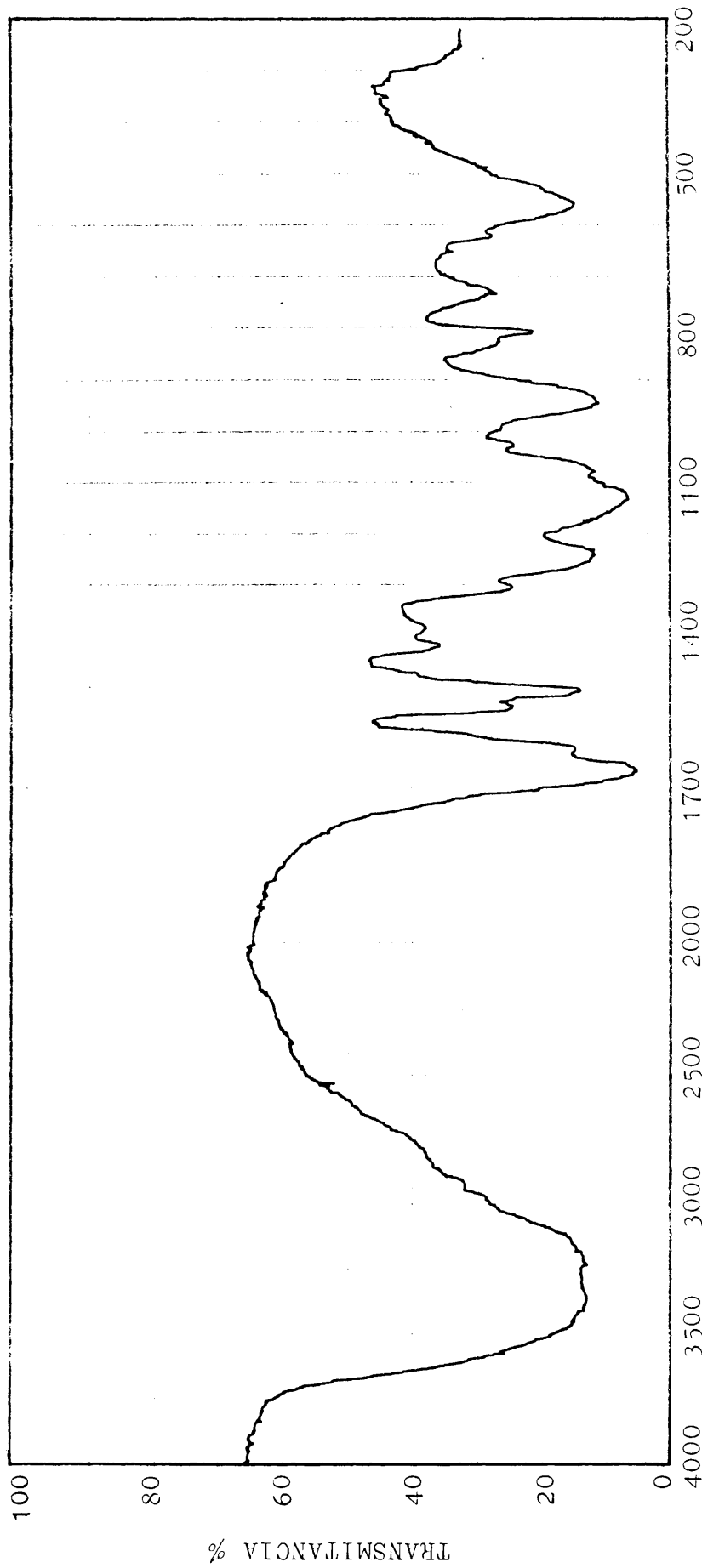


Espectro 19

Acido citidina 5' monofosfórico  
CMP

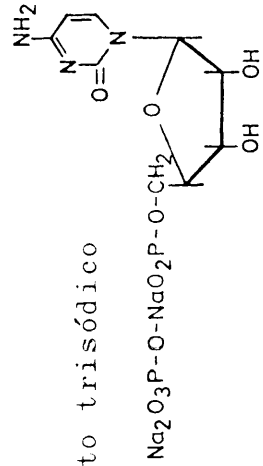


19



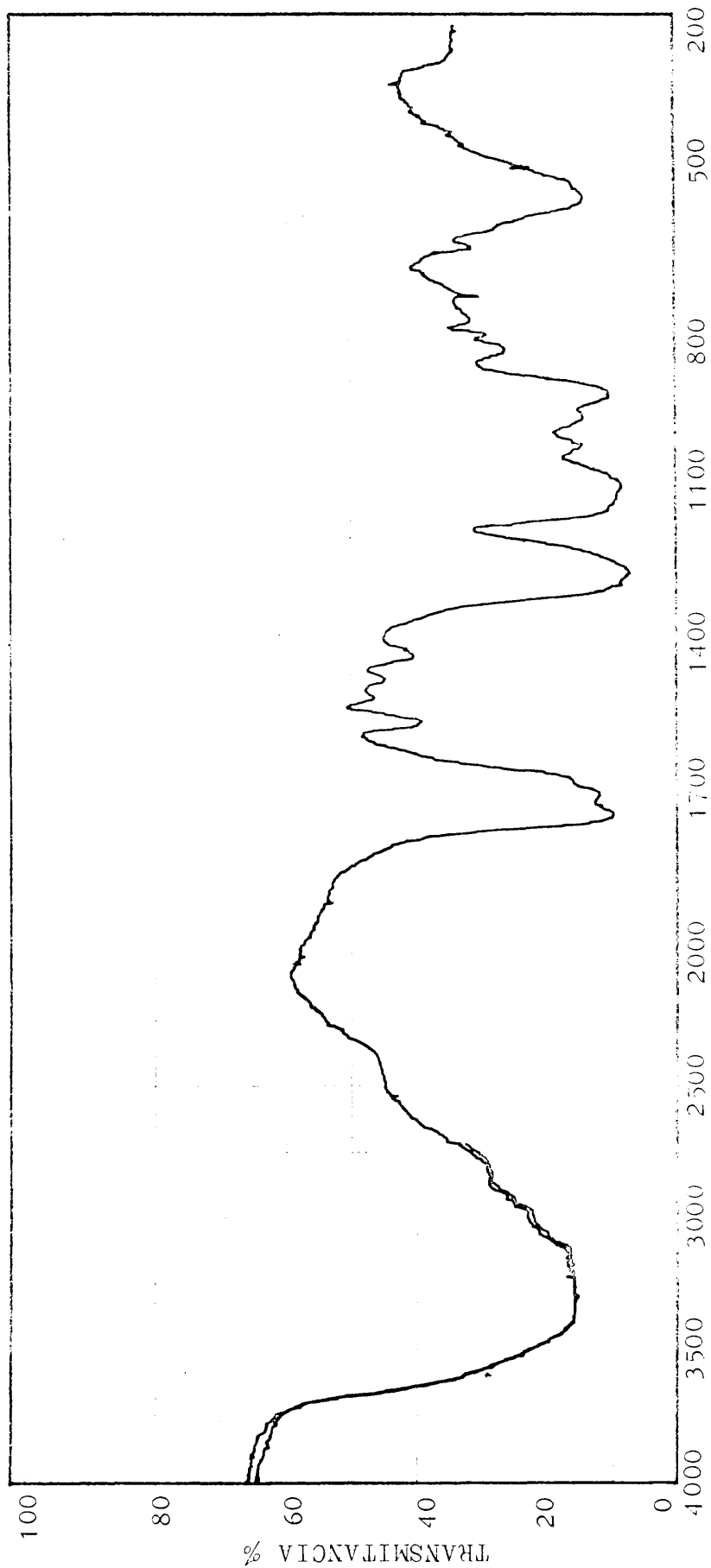
Espectro 20

FRECUENCIA (CM<sup>-1</sup>)



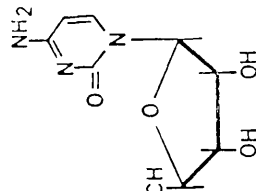
Citidina 5' difosfato trisódico

CIDP

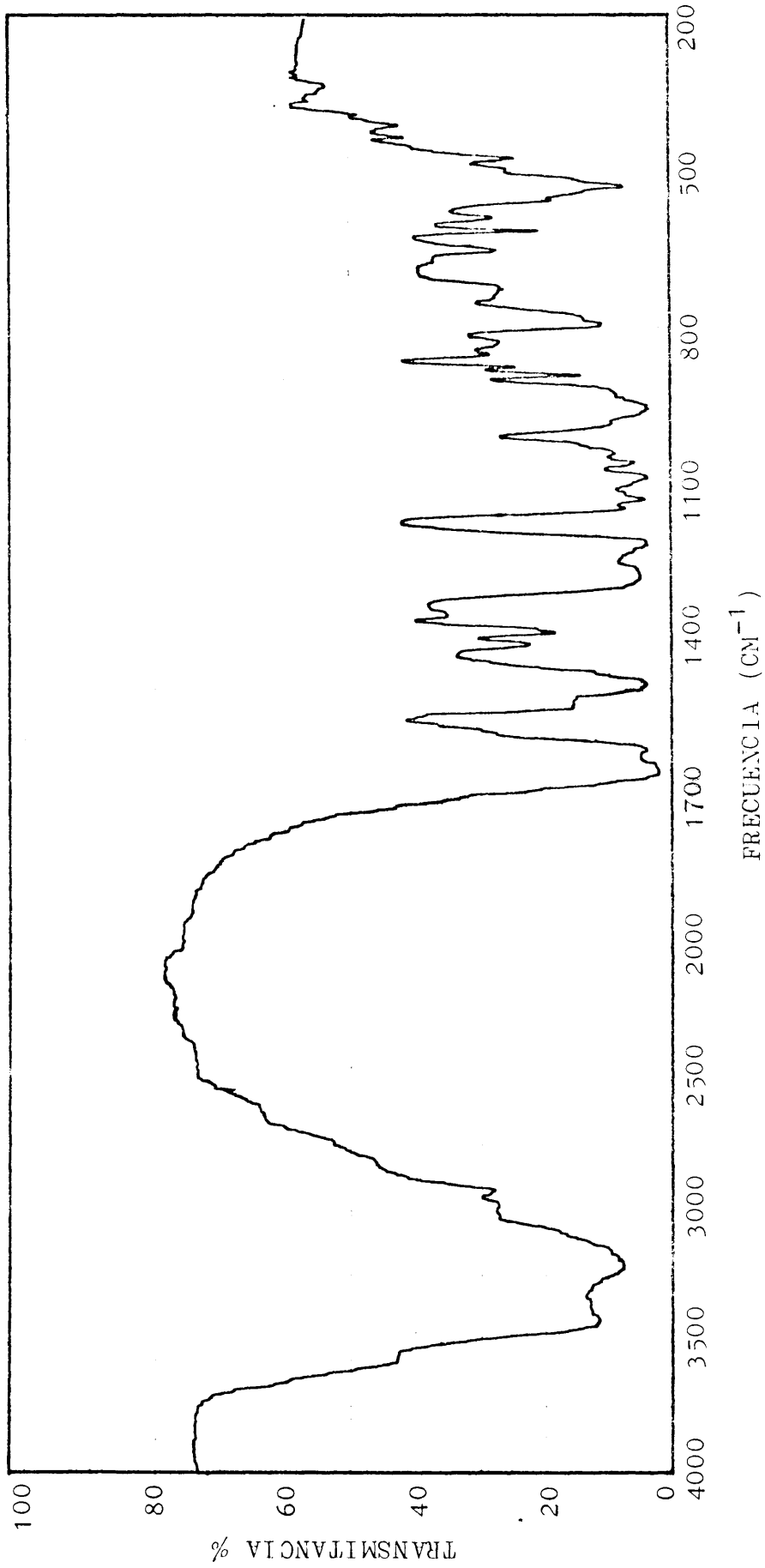


FRECUENCIA (CM<sup>-1</sup>)

Citidina 5'trifosfato disodico  
CTP

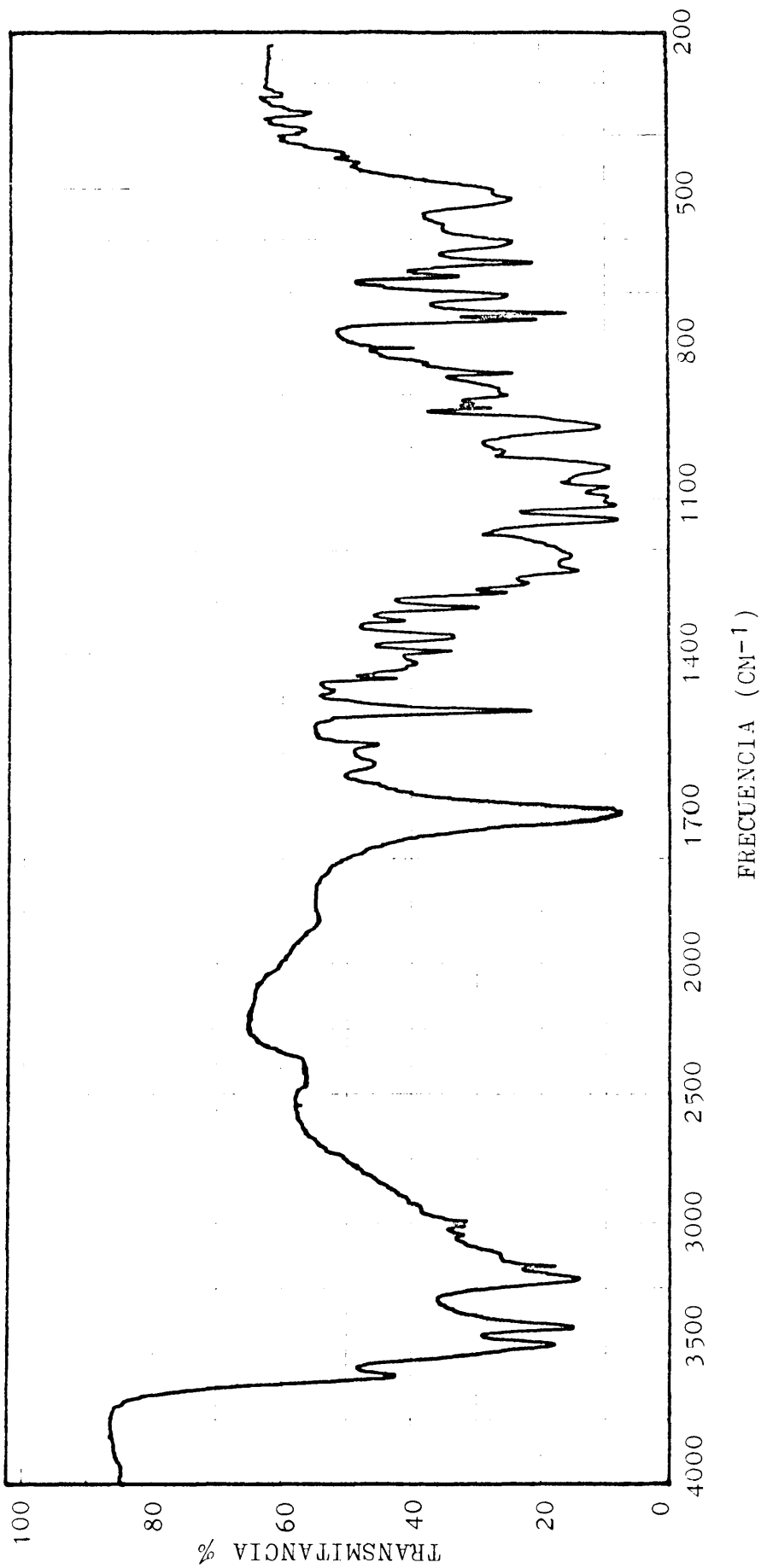


Espectro 21



Espectro 22

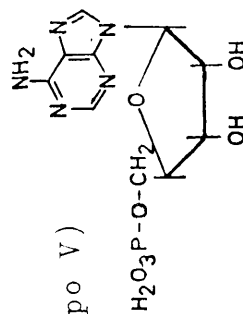
Citidina 5' difosfocolina

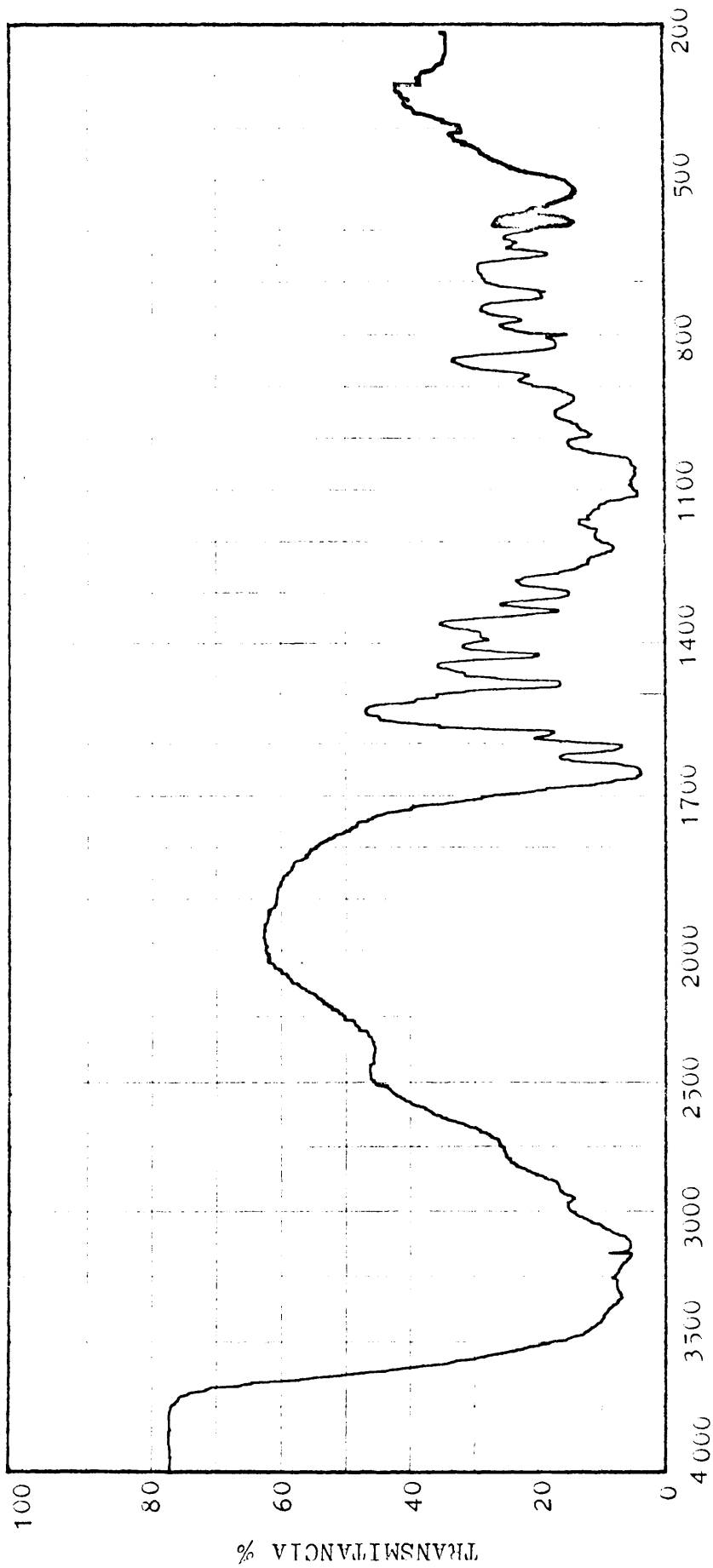


Espectro 23

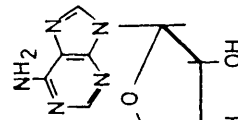
Adenosina 5'-monofosfórico (tipo V)

(AMP)





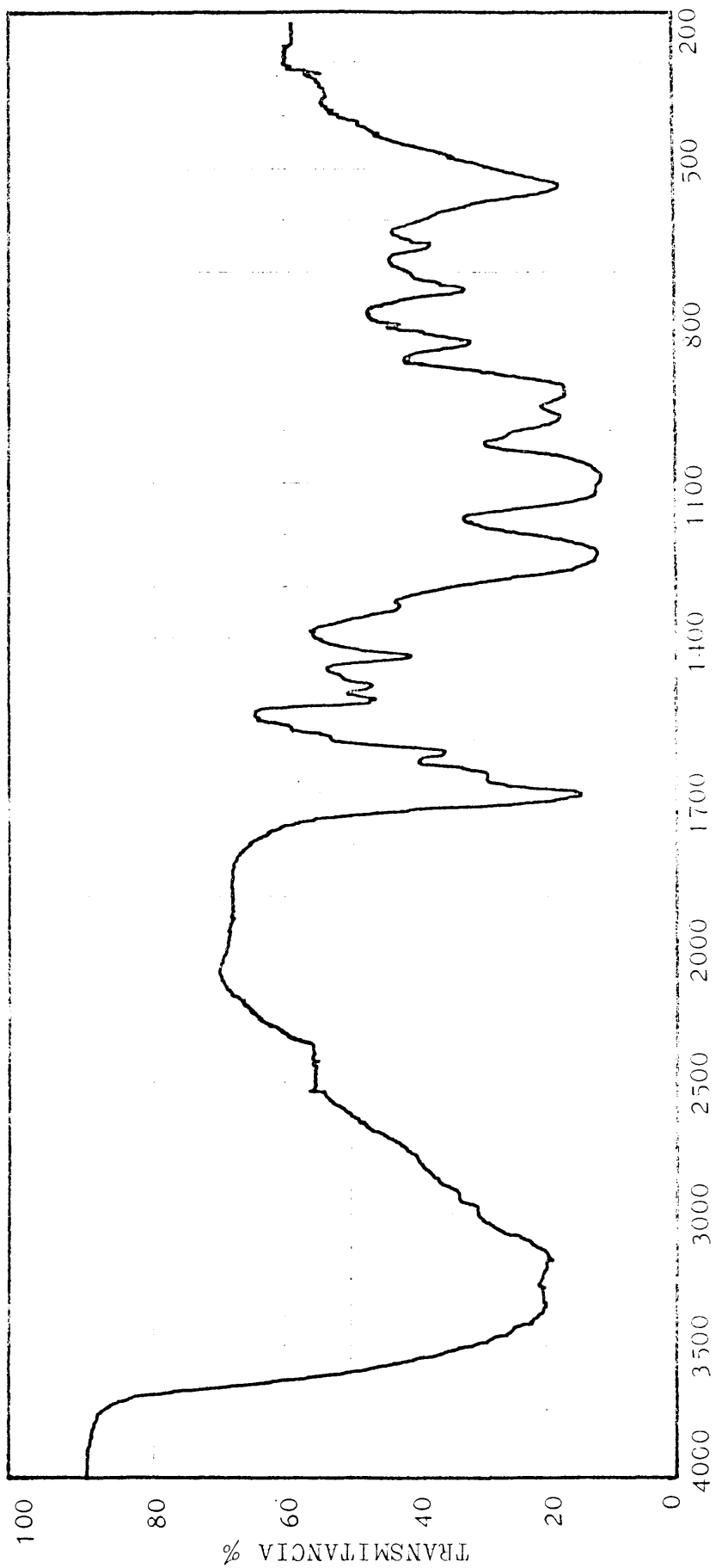
FRECUENCIA (CM<sup>-1</sup>)



Adenosina 5'-monofosfórico (sal sódica)

AMP (Tipo II)

Espectro 24

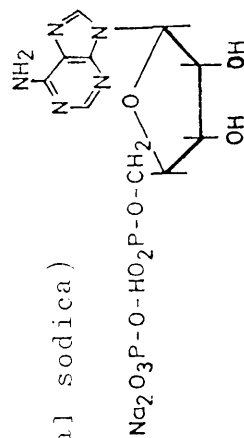


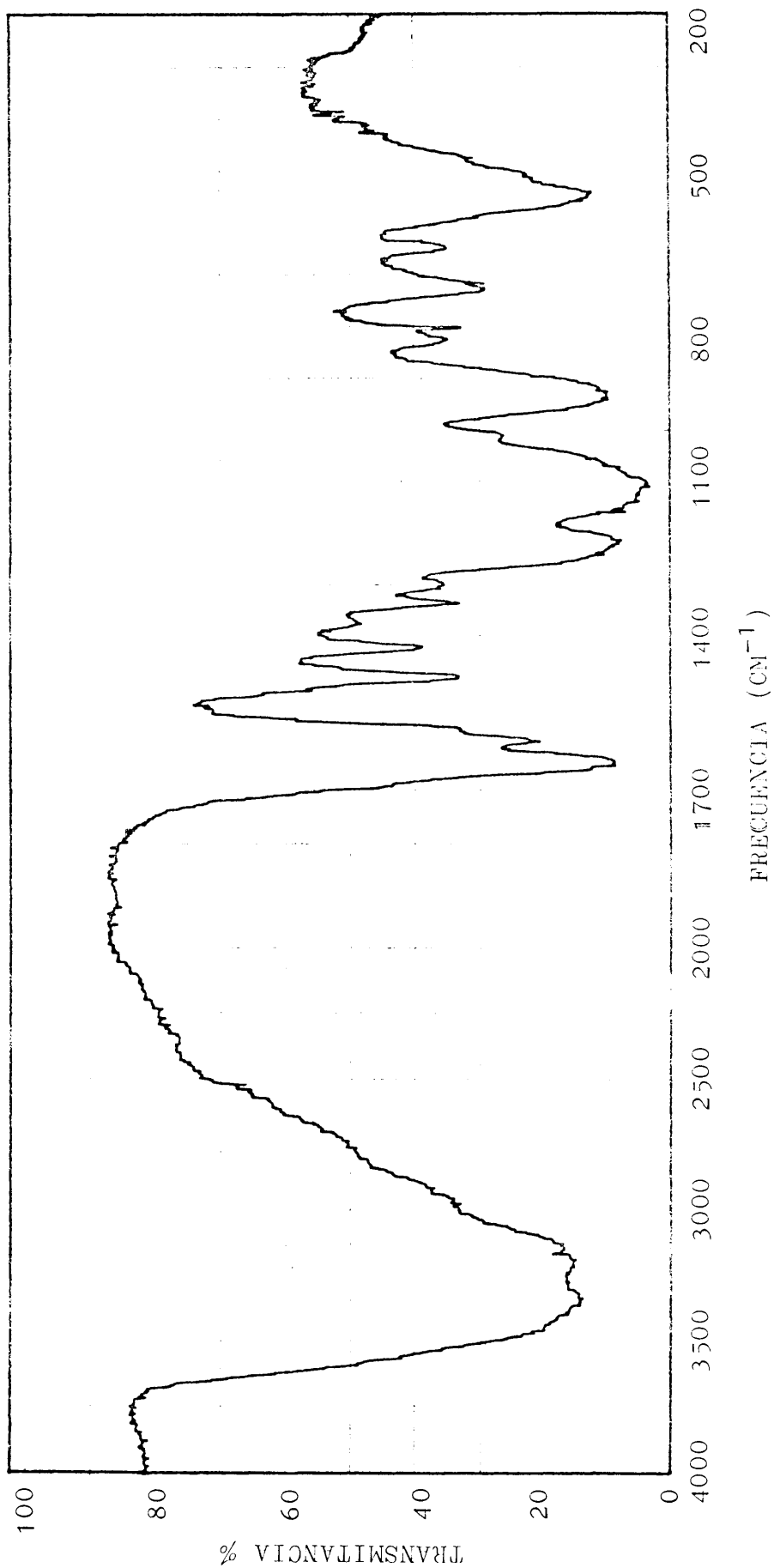
FRECUENCIA (CM<sup>-1</sup>)

Espectro 25

Adenosina 5'- difosfato (sal sodica)

ADP

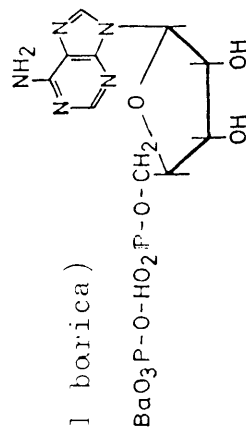


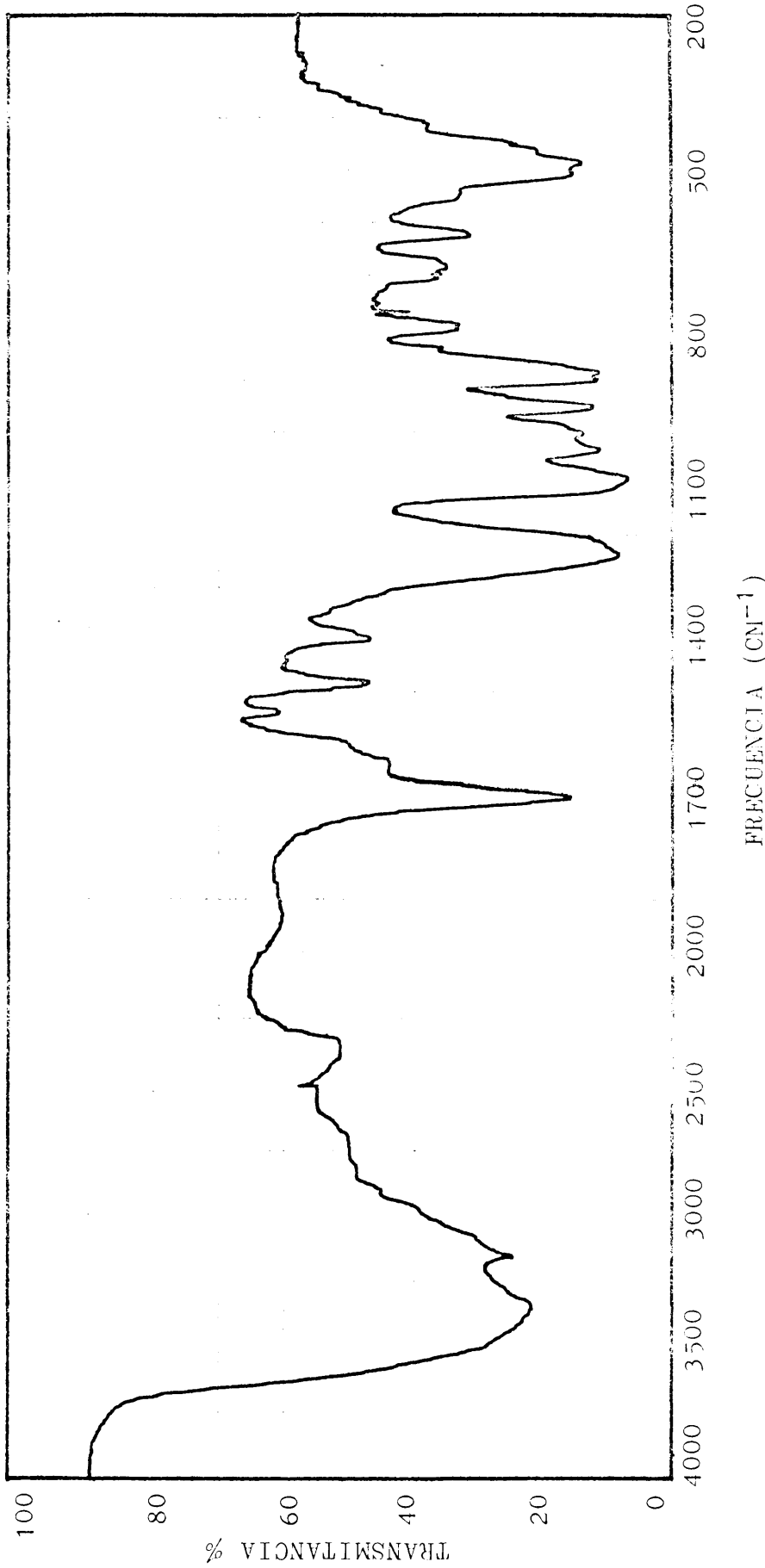


Espectro 26

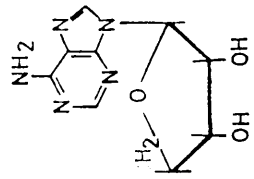
Adenosina 5'difosfato (sal borica)

ADP



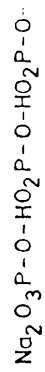


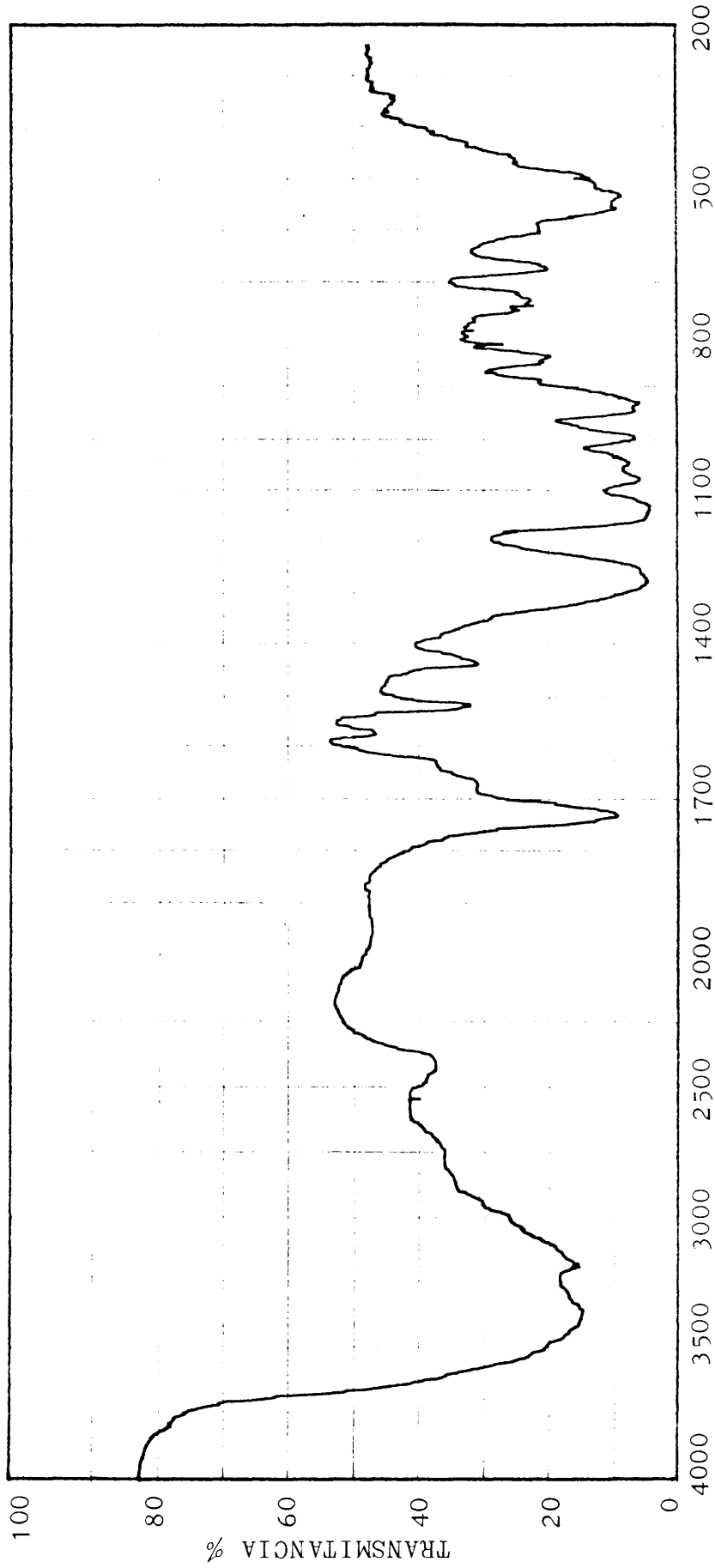
Espectro 27



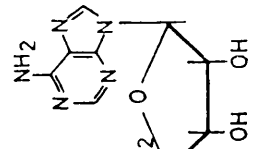
Adenosina 5' trifosfato disodico (4H<sub>2</sub>O)

ATP





Espectro 28

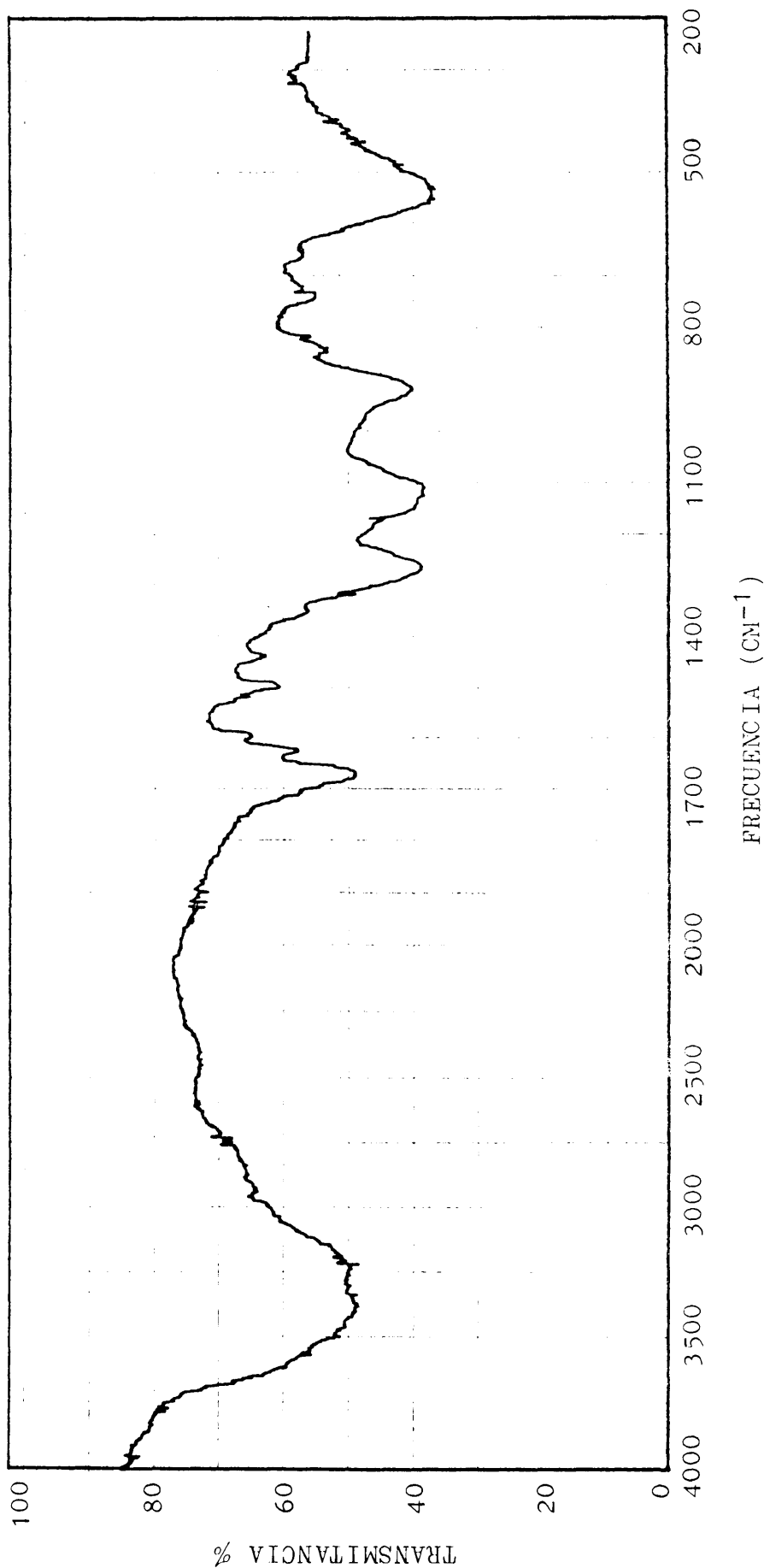


Adenosina 5' trifosfato disodico (3H<sub>2</sub>O)

ATP

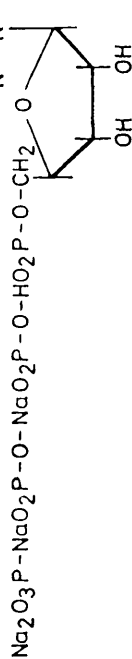
Na<sub>2</sub>O<sub>3</sub>P-O-HO<sub>2</sub>P-O-HO<sub>2</sub>F · -CH<sub>2</sub>-O

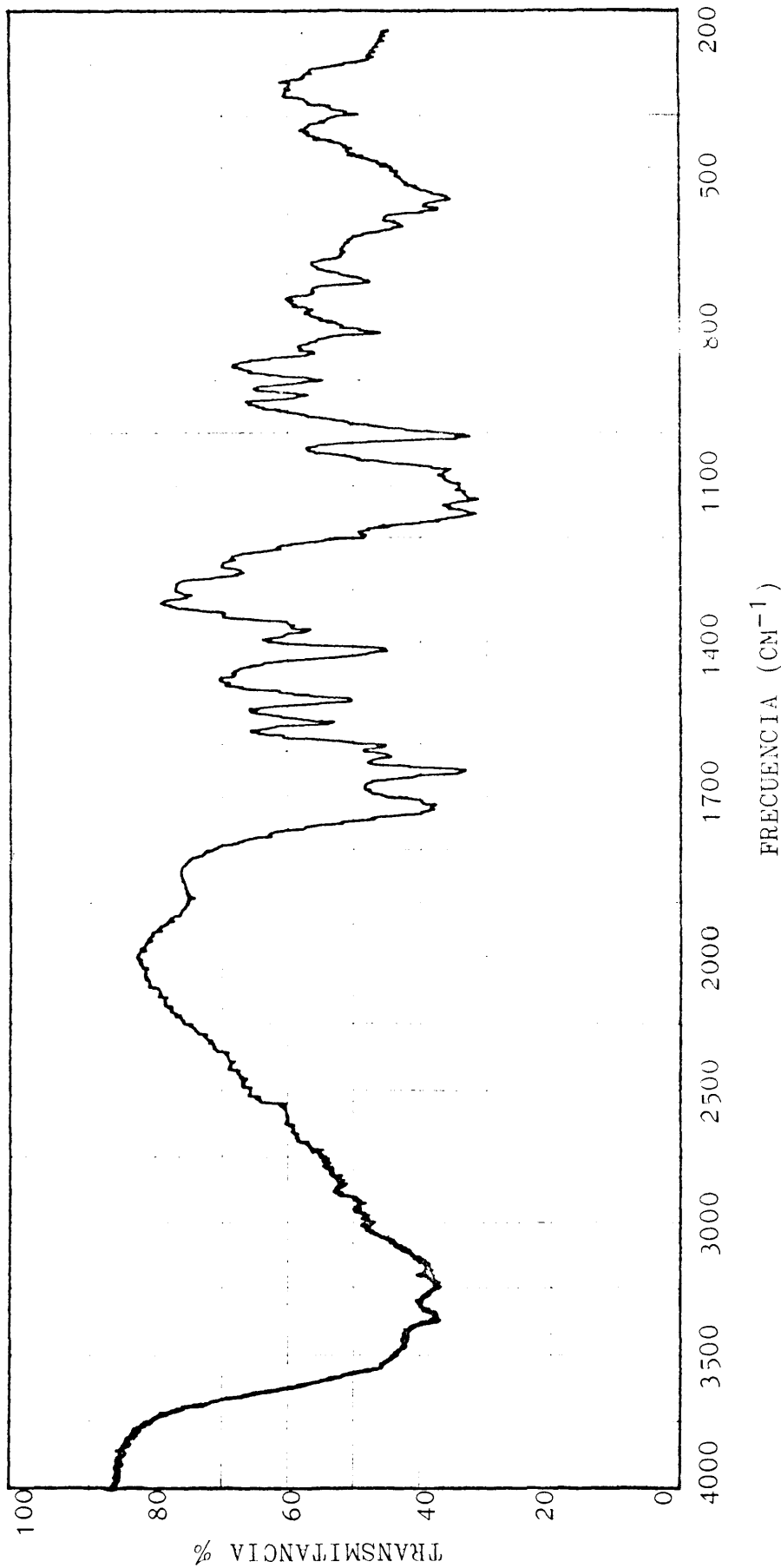
*Adenosina 5'*



Espectro 29

Adenosina 5'tetrafosfato tetrasodico



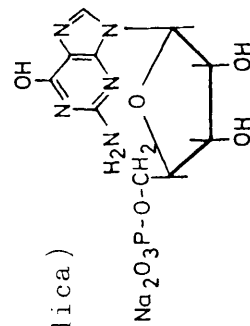


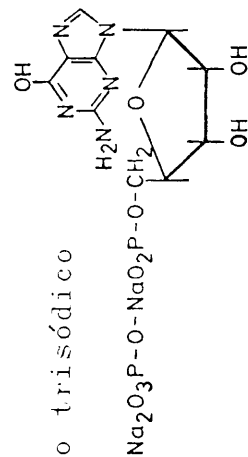
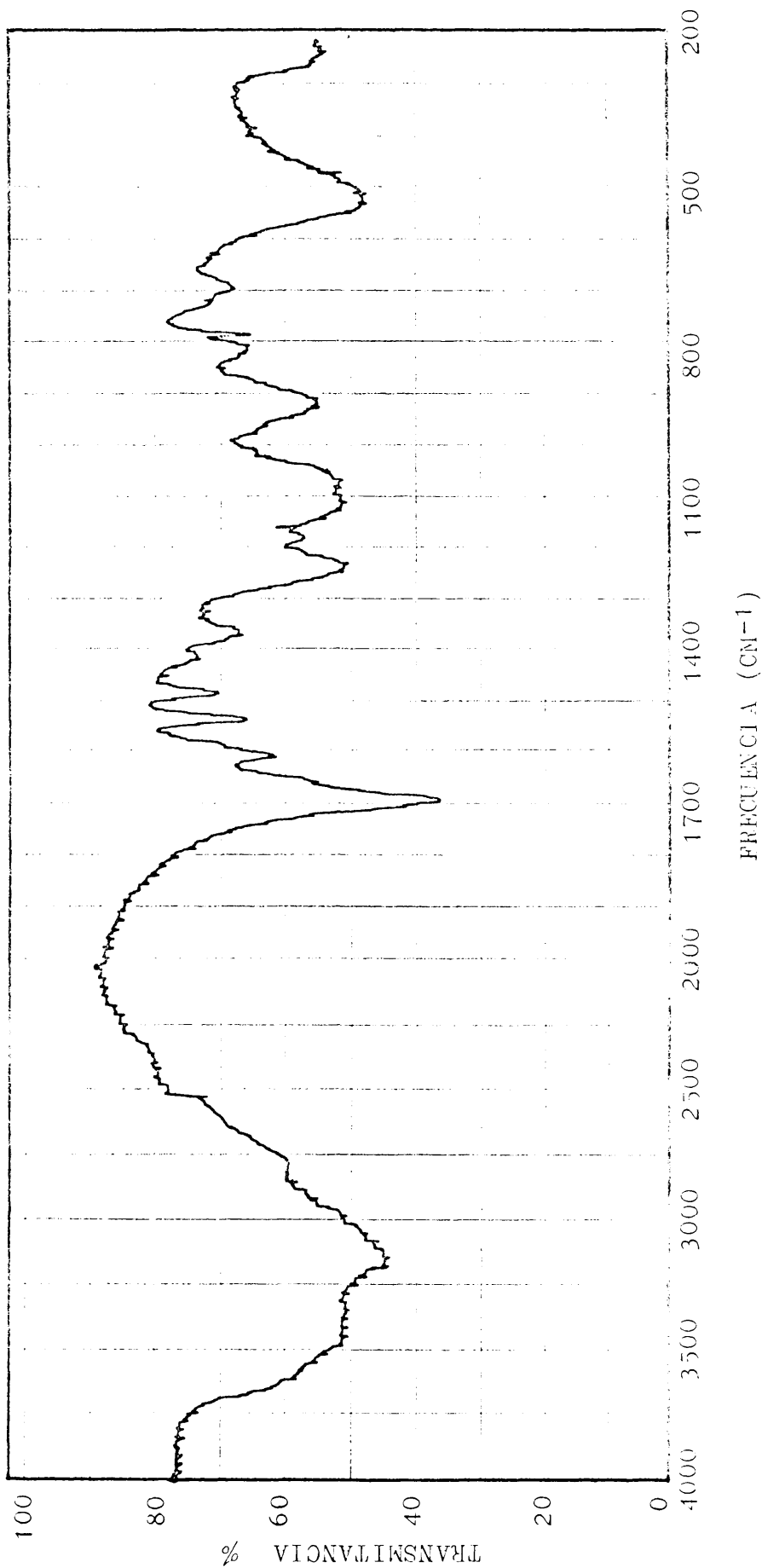
Espectro 30

Guanosina 5' monofosfórico (sal sódica)

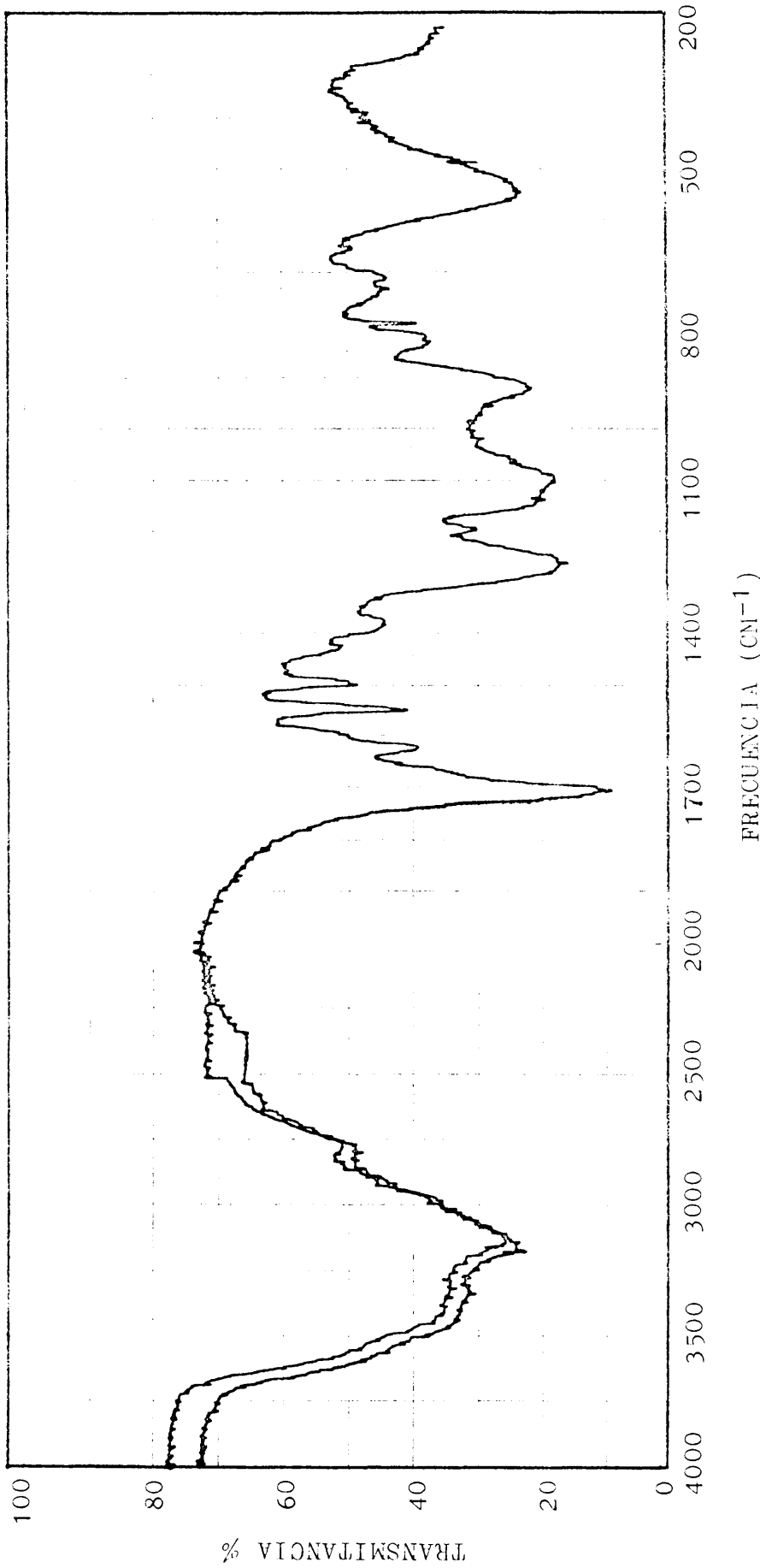
GNP

FRECUENCIA (CM<sup>-1</sup>)

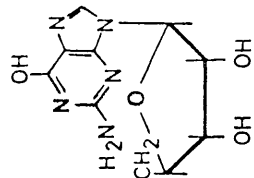




Espectro 31



FRECUENCIA (CM<sup>-1</sup>)

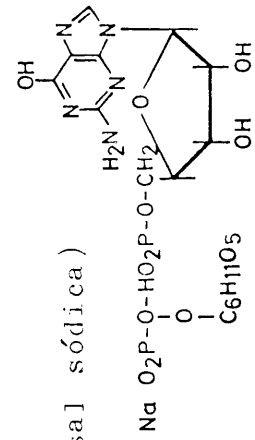
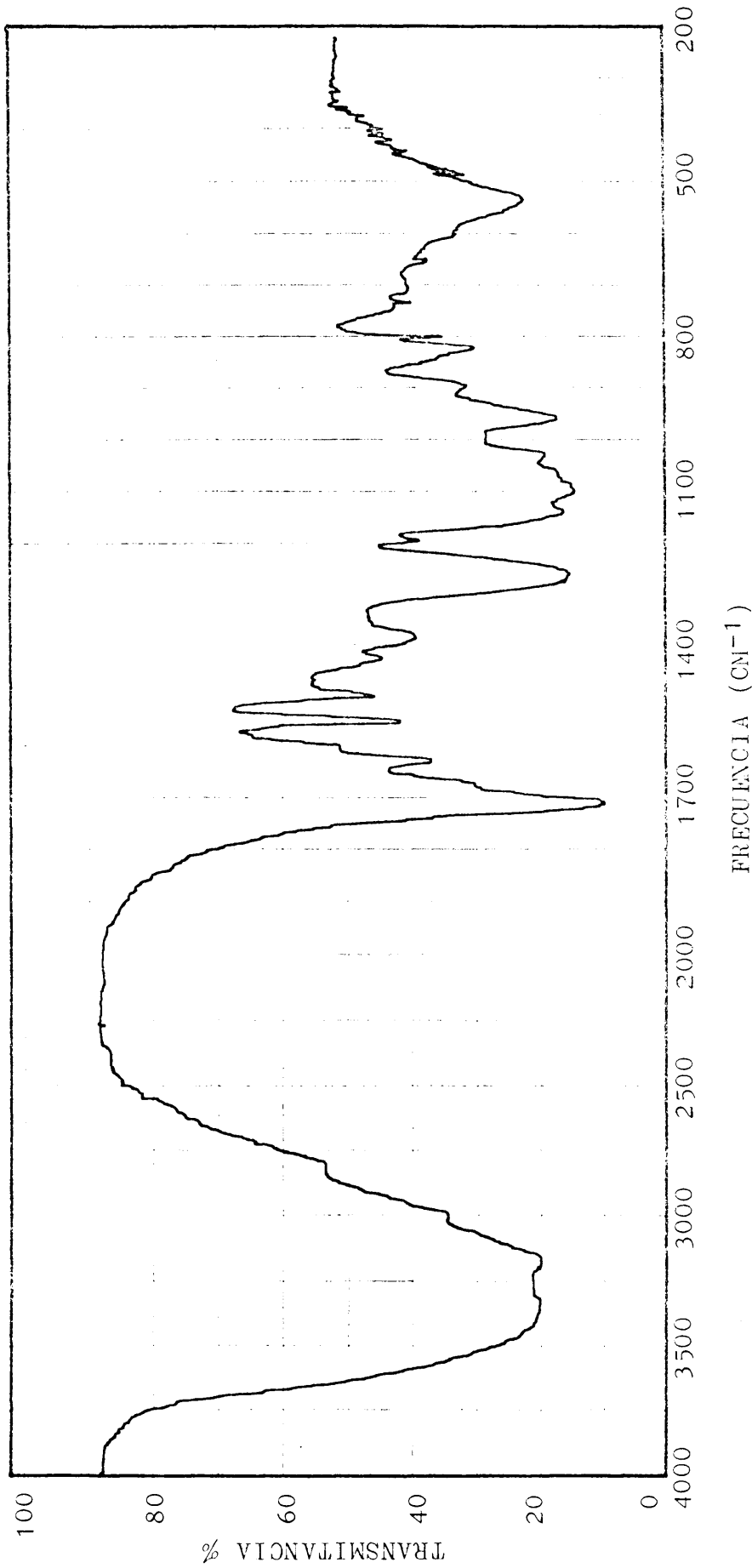


Guanosina 5'-trifosfato sódico

GTP

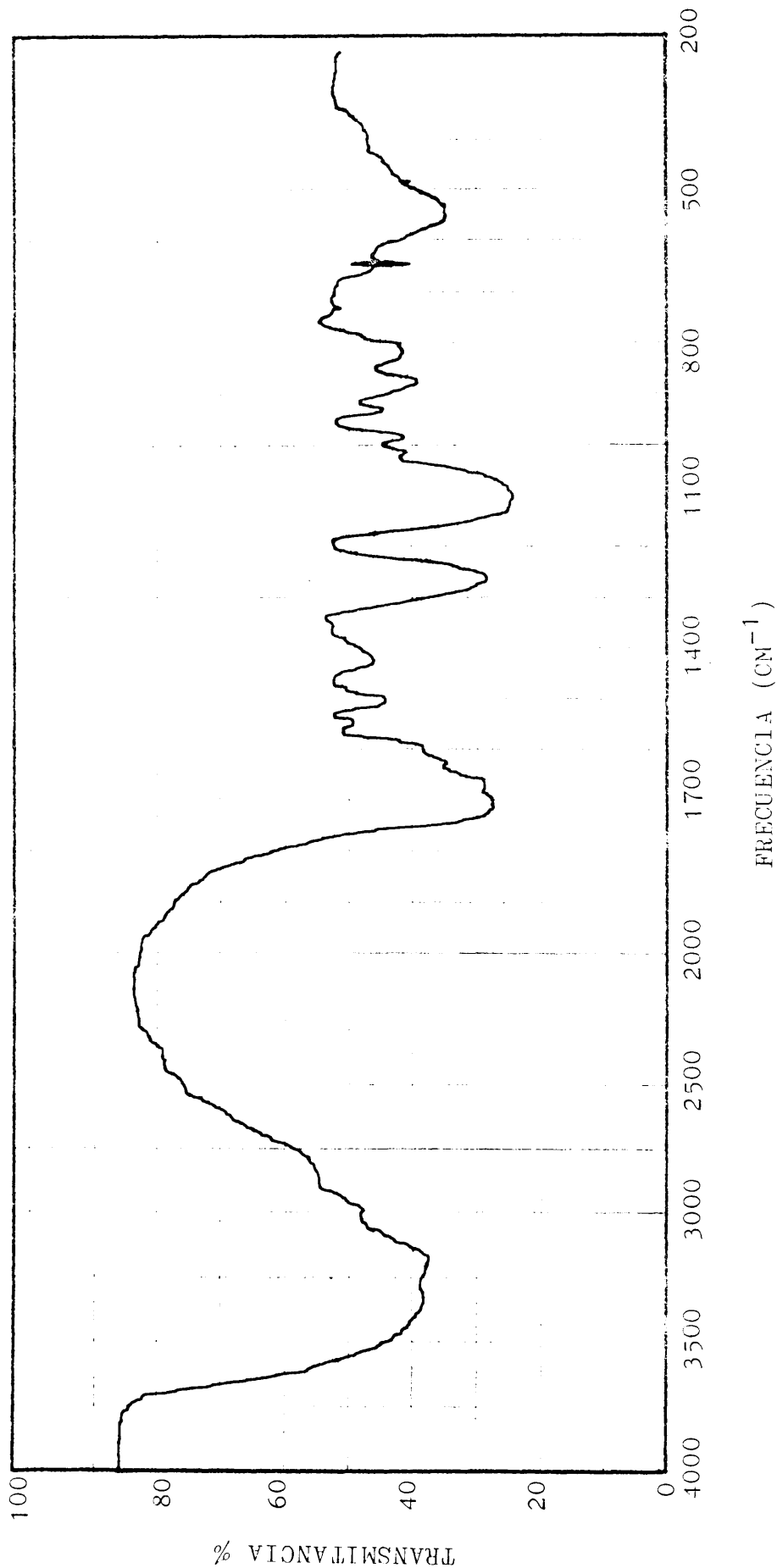
NaHO<sub>3</sub>P-O-HO<sub>2</sub>P-O-HO<sub>2</sub>P-O-O-CH<sub>2</sub>

Espectro 32



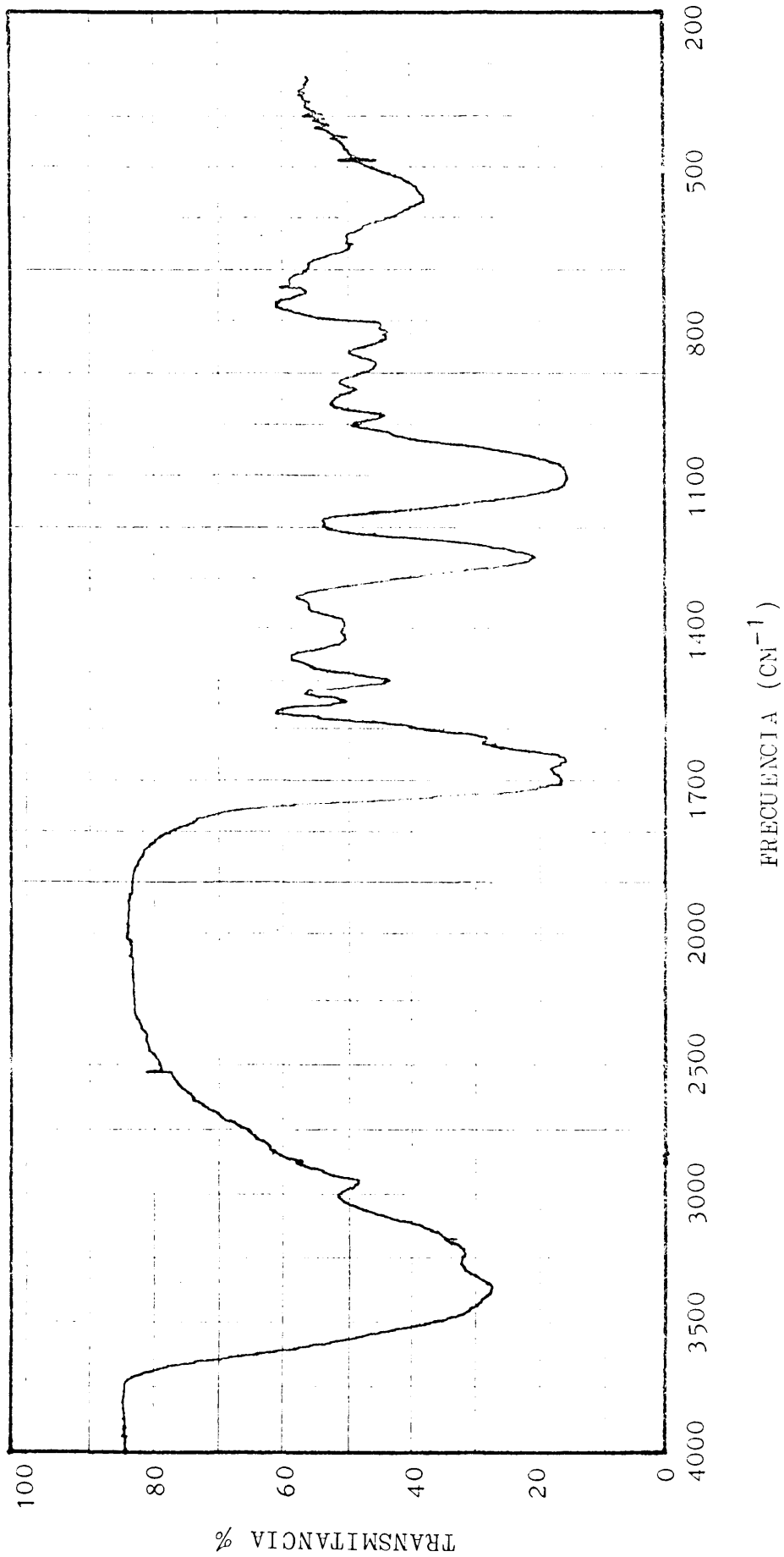
Guanosina 5'-difosfato D-mannosa (sal sódica)

Espectro 33

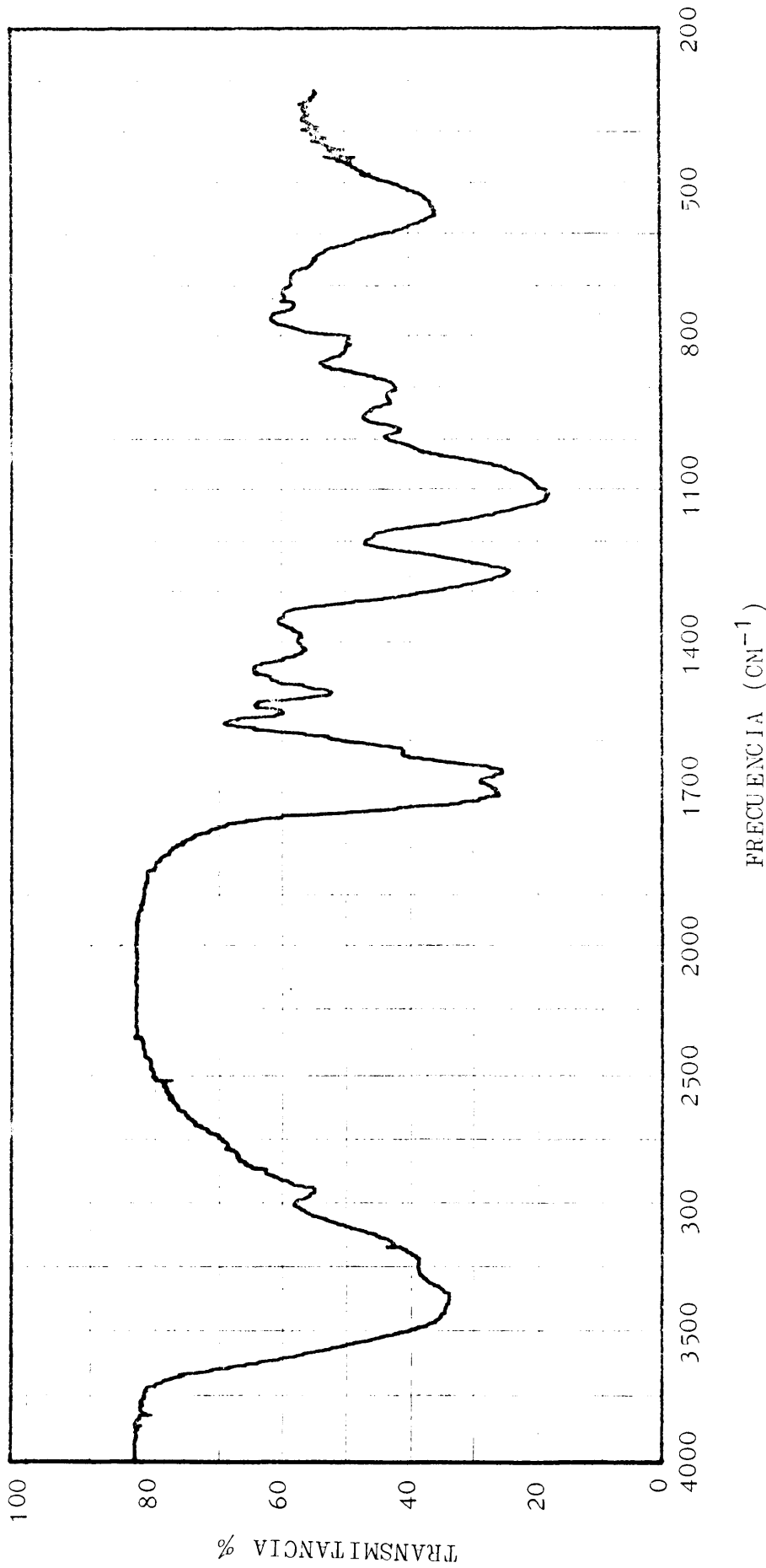


Espectro 34

Acido ribonucleico soluble (tRNA) de levadura de panadería  
Boehringer



Acido ribonucleico soluble (tRNA), tipo III, de levadura  
SIGMA  
Espectro 35



Acido ribonucleico soluble (tRNA), de levadura de panadería  
Preparado en el laboratorio de Infrarrojo.

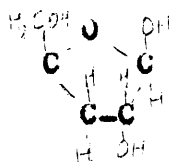
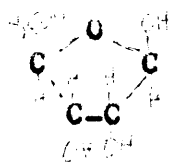
Espectro 36

## 2.- DISCUSION DE LOS ESPECTROS

En este capítulo se ha hecho uso de la Bibliografía (2)

### 2.1.- Azúcares

Lo más importante es que no presentan la banda correspondiente a la vibración de tensión del C=O hacia 1720, luego ambos están en forma hemiacetalica y por tanto cíclica



Ambos dan una banda ancha a  $3360\text{ cm}^{-1}(f)$  que corresponde a vibración de tensión O-H con asociación intermolecular.

Los dos azúcares dan una banda fuerte a  $1035\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la flexión del O-H de un alcohol primario.

La Ribosa da una banda a  $1076\text{ cm}^{-1}(f)$  y la Desoxi-Ribosa da otro a  $1083\text{ cm}^{-1}(f)$  más aguda, ambas atribuibles a la flexión de OH secundario. Esta parece ser la única banda que puede servir para diferenciar ribosidos de desoxi-ribosidos.

Espectros de referencia: nuestro espectro de D-Ribosa en BrK no coincide con el de  $\beta$ -D-Ribosa en nujol del DMS (de la Collection of the University of Birmingham"), ni con el de D-Ribosa en polvo del "J.Org.Chem., 26, 2463 (1961).

### 2.2.- Bases

A) Bases pirimidinicas: uracilo, timina y citoxina

Los espectros de estos compuestos son altamente característicos, ya que la mayoría de sus bandas son agudas. Pueden por ello emplearse para análisis e identificación de estas bases que respecto a otras propiedades físicas (punto de fusión, solubilidad, absorción UV ) apenas presentan diferencias. No obstante las correlaciones estructurales precisas son oscuras,

En las amino e hidroxipirimidinas (como son estas bases), las principales regiones de interés, con miras a las posibles tautomerías ceto-enólica y amino-imino son las de 6 u (región de  $1700\text{ cm}^{-1}$ ) y 3 u (región de los  $3200\text{ cm}^{-1}$ ). Desgraciadamente en ambas regiones hay mucha ambigüedad en la asignación de bandas. En la región de  $1700$  cabe esperar bandas debidas a vibraciones de flexión de enlaces N-H.

" de tensión de enlaces: C=O, C=C, C=N

" del ciclo.

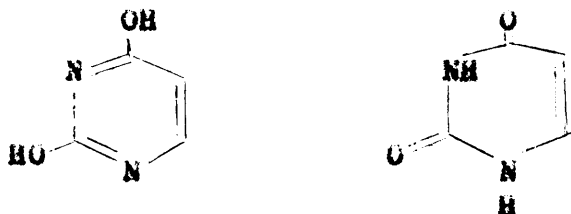
Las variaciones de frecuencia de estas bandas, según el diferente carácter polar de los enlaces y según las posibles interacciones como formación de puentes de hidrógeno, son tales que resulta imposible el hacer muchas asignaciones definitivas. Además, la intensidad de las vibraciones del ciclo es desconocida, tanto que para derivados simples del benceno, por ejemplo, las variaciones de un compuesto a otro son impredecibles. En la región de  $3300\text{ cm}^{-1}$  cabe esperar bandas debidas a:

vibraciones de tensión de enlace N-H  
" " " de enlace O-H  
" " " de enlace C-H

Por todas estas razones sería absurdo el ser dogmático en la asignación de frecuencias.

Uracilo:

Hay dos formas tautoméricas posibles:



Espectro de referencia: Nuestro espectro en BrK coincide con el de uracilo en IR del DMS de la "Collection of the Institute for Chemical and Applied Spectroscopy, Dortmund". Este espectro de referencia presenta más resolución en la región de  $1700\text{ cm}^{-1}$  por ser menor la concentración empleada.

Asignación de bandas:

- banda a  $1630\text{ (}\mu\text{m f)}$  - tensión  $\text{C}=\text{C}$
- banda a  $1730\text{ (}\mu\text{m f)}$  - tensión  $\text{C}=\text{O}$
- banda a  $1660\text{ (}\mu\text{m f)}$  - vibración del grupo -  $\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}$
- banda a  $1700\text{ (}\mu\text{m f)}$  - vibración del grupo -  $\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}$

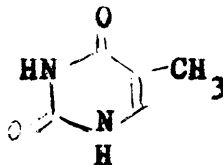
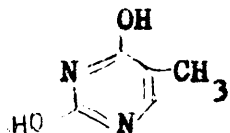
Estas dos últimas bandas  $1660$  y  $1700$  son características del grupo  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-$  en un anillo de 6 con un doble enlace  $\text{C}=\text{C}$

- banda a 1500 (f) - vibración de flexión del enlace N-H en el plano
- banda a 3100 (m f) - tensión N-H del grupo -CO-NH-CO- aunque probablemente el otro NH también contribuye
- bandas anchas a 800(f) y 850(f) - dos vibraciones de flexión N-H, fuera del plano, de los dos NH del ciclo
- banda a 1225(f) - vibraciones C-N
- banda a 2800 (f) - tensión C-H parece ser que la de 1445 corresponde a flexión C-H
- bandas a 1410 (f) y 1445(f) - vibraciones del anillo, pero emparejadas parcialmente con alguna vibración NH
- bandas a 755 y 815 - vibraciones C-H fuera del plano características de estructura de tetrahidro 2, 6- dioxipirimidina.

Todo parece pues indicar que el uracilo en estado sólido se encuentra en forma dicetónica.

Timina:

Hay dos formas tautoméricas posibles



Espectro de referencia: Nuestro espectro en BrK coincide con el de timina en BrK del DMS de la "Collection of the Max-Planck -Institut für Biochemie, München".

**Asignación de bandas:**

Bandas a 1720 (mf) y 1660 (mf) - son las características del grupo -NH-CO-NH-CO - en un ciclo de 6 con un doble enlace

banda a 1480 (m) - vibración de flexión del enlace N-H en el plano

banda a 3060 (mf) - tensión NH del grupo -CO-NH-CO-

banda ancha a 835 (f) - vibración de flexión N-H fuera del Plano

banda a 1240 (f) y 1205(f) vibraciones C-N

bandas a 1440 (f) y 1420 (f)- vibraciones del anillo, parece ser que la de 1440 corresponde a flexión C-H

banda a 810 (f) y 755(f)- vibraciones C-H fuera del plano características de estructura de tetrahidro 2,6 dioxipirimidina

banda a 2800 (f) - vibración de tensión C-H (del ciclo)

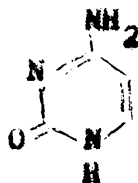
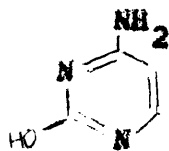
banda a 1375 (f) - vibración C-CH<sub>3</sub>

Esta última banda es la única que no aparece en el uracilo. Todo parece indicar que la timina en estado sólido se encuentra en la forma dicetónica

Todo parece indicar que la timina en estado sólido está en forma dicetónica.

Citosina:

Hay dos formas tautoméricas posibles



Espectro de referencia: Nuestro espectro en BrK coincide con el de citosina en PPK del DMS del "J.Chem. Soc (1952), 168-87".

Hay dos criterios en la asignación de frecuencias:

1.-Blout, que estudia el espectro en película sublimada, llega a la conclusión de que el átomo de oxígeno de la citosina en estado sólido está completamente asociado con hidrógeno, ya por enclización o ya por formación de enlace de hidrógeno intermolecular. Así se explicaría el que la citosina presente: una sola banda en la región de 1700  $\text{cm}^{-1}$  (no dos como uracilo y timina) y tres bandas en la región de 3200 (tensiones N-H, OH y C-H

banda a 3370(f) - tensión N-H de  $\text{NH}_2$  de amina aromática

banda a 3150(f) - tensión OH (con asociación intermolecular)

estas dos bandas están desplazadas hacia las menores frecuencias por efecto de los puentes de hidrógeno intermoleculares.

banda a 3780(f) - tensión C-H

banda a 1650(mf) - tensión C=C y C=N

banda a 1230(f) - tensión C=O

2.- C.L. Angell, que estudia el espectro en suspensión en nujol, considera que la citosina está en la forma aminocetónica y hace la siguiente asignación de bandas

banda a 1650 (mf) - resulta de la superposición de las vibraciones de deformación del  $-\text{NH}_2$  con la vibración de tensión del C=O conjugado (O=C=N=C)

banda a 1605(f) - vibración del ciclo (modos de tensión (C=N) característica de la pirimidona como conjunto, por eso no está presente en uracilo y timina.

- banda a 1530(f) - vibración de flexión del N-H en el plano
- banda ancha a 310 (s) - vibración de flexión N-H fuera del plano
- bandas a 3155(f) y 3370(f) - vibraciones del grupo -NH<sub>2</sub> en aminas primarias aromáticas.
- banda a 1270(f) - tensión C-N de amina aromática primaria
- banda a 2780 (f) - tensión C-H
- banda a 1455 (f) - flexión C-H en el plano
- banda a 785 (f)-flexión C-H fuera del plano

5-Metilcitosina



Tiene todas las bandas de citosina. Presenta la particularidad de que la banda de 1650 cm<sup>-1</sup> se ha desdoblado en 3.

- banda a 1720 (f) - tensión C=O
- banda a 1650 (f) - flexión NH<sub>2</sub>
- banda a 1620 (f) - tensión C=C y C=N de compuestos conjugados cíclicos.

Conclusiones generales sobre las bases pirimidínicas:

- 1.- En el estado sólido, la información espectral parece confirmar la hipótesis de que las bases están en forma cetónica y amínic (para el caso de la citosina).
  - 2.- Los efectos electrónicos de diferentes grupos sustituyentes pueden influir en la tautomería y también, el grado de interacción mediante puentes de hidrógeno.
  - 3.- Son comunes y características las bandas
- banda ~ 800 cm<sup>-1</sup> de flexión C-H fuera del plano

banda  $\sim 1445 \text{ cm}^{-1}$  de flexión C-H en el plano

banda  $\sim 2800 \text{ cm}^{-1}$  de tensión C-H

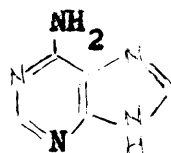
banda  $\sim 1500 \text{ cm}^{-1}$  de flexión N-H en el plano

La banda a  $1605$  de la citosina (característica de ciclo de pirimidona) no se da en las otras dos bases que no tienen C=N.

### B) Bases puricas

Los espectros de este grupo de purinas (adenina, guanina, hipoxantina y xantina) se caracterizan por el hecho de que los de adenina y guanina presentan una gran semejanza, así como los de hipoxantina y xantina, pero solo unas pocas bandas son comunes a los cuatro compuestos.

#### Adenina:



Espectro de referencia: Nuestro espectro en BrK coincide, salvo algunos matices de la banda ancha a  $3000 \text{ cm}^{-1}$ , con el de adenina en BrK del DMS de la "Collection of the Max-Planck-Institut für Biochemie, München".

#### Asignación de bandas:

banda a  $3300 \text{ (mf)}$  y  $3100 \text{ (mf)}$  - vibraciones de tensión N-H del grupo  $-\text{NH}_2$  de amina aromática primaria.

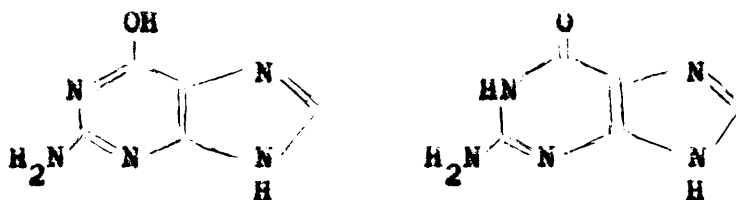
banda a  $1660 \text{ (mf)}$  - vibración de flexión del  $\text{NH}_2$

banda a  $1590 \text{ (mf)}$  - vibración de tensión C=C y C=N en compuestos conjugados cíclicos.

banda ancha a 870 (m) - flexión N(9)-H fuera del plano  
banda a 1500 (m) - flexión N-H en el plano  
banda a 1250 (f) - vibración C-N  
bandas a 2970(mf) y 2680 (mf) - tensión C-H  
banda a 1445(f) - flexión C-H en el plano  
banda a 795 (m) - flexión C-H fuera del plano  
bandas a 1365(f) y 1465(m) - vibraciones características del sistema cíclico.

Guanina:

Hay dos formas tautoméricas posibles:



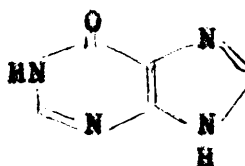
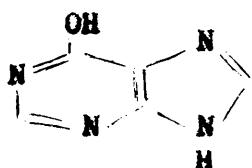
Asignación de bandas:

bandas a 3320(f) y 3100(f) - tensión N-H del grupo -NH<sub>2</sub> de amina aromática primaria  
banda a 1684(mf) - vibración de tensión C=O  
banda a 1660(mf) - flexión NH<sub>2</sub>  
banda a 1625(f) - tensión C=C y C=N en compuestos conjugados cíclicos  
banda a 1550(m) - flexión NH en el plano  
banda ancha a 870 (m) - flexión NH fuera del plano  
banda a 1255(m) - vibraciones C-H  
bandas a 2680(f) y 2900(f) - tensión C-H  
banda a 1455 (f) - flexión C-H en el plano  
banda a 770 (m) - flexión C(9)-H fuera del plano  
bandas a 1470(f) y 1365 (f) - vibraciones del sistema cíclico

Todo parece indicar que la guanina en estado sólido se encuentra en la forma ceto-aminica

Hipoxantina

Hay dos formas tautoméricas posibles:



Espectro de referencia: Nuestro espectro en BrK coincide (salvo una banda a 3450, que aquí no sale, y que puede ser debida a que la sustancia del espectro de referencia tenía humedad) con el de hipoxantina en BrK del DMS del "Medical Research Council Laboratories, Holly Hill, London!"

Asignación de bandas:

Resulta difícil el asignar bandas en la región de 2800 donde aparecen superpuestas en una zona amplia

Comparando con guanina se pueden asignar las siguientes bandas importantes:

- banda a 1660 (mf) - vibraciones de tensión C=O
- banda a 1570 (f) - vibraciones de tensión C=C y C=N
- banda a 1500 (m) - flexión NH en el plano
- banda ancha a 885 (f) - flexión N<sub>(9)</sub>-H fuera del plano
- banda a 785(m)-flexión C<sub>(8)</sub>-H fuera del plano
- banda a 1460(m y 1360 (m) - vibraciones del ciclo.

Así pues la hipoxantina en estado sólido está en la forma cetónica.

Xantina

Hay dos formas tautoméricas posibles



Espectro de referencia: Coincide con el de xantina en IR del DMS de la "Collection of the E. Merck AG, Darmstadt". Al igual que en el caso de la hipoxantina, nuestro espectro no presenta la banda a  $3450 \text{ cm}^{-1}$  que tiene el de referencia. Este último presenta más resolución en las regiones de  $2800 \text{ cm}^{-1}$  por haber empleado menor concentración.

Asignación de bandas:

Como es muy similar al de hipoxantina presentan las mismas bandas de flexión NH, CH, etc

La banda a  $1560 \text{ (f)}$  - corresponde a vibraciones de tensión

C=C y C=N

y las bandas a  $1700 \text{ (mf)}$  y  $1660 \text{ (f)}$  son las características del grupo -NH-CO-NH-CO- en un ciclo de 6 eslabones con un C=C.

Así pues la xantina en estado sólido está en forma dicetónica.

### Conclusiones generales sobre las bases púricas

Presentan las bandas características del ciclo de pirimidina.

Las cuatro bases dan dos bandas intensas hacia 1660 y 2560  $\text{cm}^{-1}$ .

La única banda que encontramos característica del ciclo de purina es la correspondiente a la vibración de flexión, fuera del plano, del enlace  $\text{N}_{(9)}\text{-H}$ .

### 2.3.- Nucleosidos

La adición del grupo ribosa al núcleo de pirimidina o purina trae consigo la aparición de un cierto número de bandas intensas en la región de 900-1200  $\text{cm}^{-1}$ .

La presencia del grupo azúcar apenas si influye en la estructura de la base. Así:

- la citidina conserva las bandas a 3155 y 3370  $\text{cm}^{-1}$  características del grupo  $\text{-NH}_2$  de la citosina
- la adenosina presenta la banda 1600  $\text{cm}^{-1}$  característica de núcleo de purina de la adenina; y también se conservan las bandas a 1660, 3100 y 3300  $\text{cm}^{-1}$  características del grupo  $\text{-NH}_2$ .
- La banda a 1550  $\text{cm}^{-1}$  de la flexión  $\text{N}_{(1)}\text{-H}$  en el plano, se conserva en la guanosina al igual que la banda a 770  $\text{cm}^{-1}$  de la flexión  $\text{C}_{(8)}\text{-H}$  fuera del plan.

Algunos de los cambios que introduce el grupo azucar, en el espectro de la base son los siguientes:

- la banda de citosina ancha a  $810\text{ cm}^{-1}$  al pasar a citidina desaparece en tanto que la de  $1330$  se intensifica. La explicación está en la sustitución del H del  $N_{(3)}$  por el resto de ribosa.
- la banda a  $1445\text{ cm}^{-1}$  característica del ciclo de uracilo se desplaza a  $1470\text{ cm}^{-1}$  en la uridina.
- las bandas a  $1685$  y  $1660\text{ cm}^{-1}$  de guanina se desplazan a  $1725$  y  $1635\text{ cm}^{-1}$  en la guanosina, lo que puede explicarse por diferencias en los enlaces de hidrógeno intermoleculares.

#### 2.4.- Nucleótidos

En el paso de nucleosido a nucleótido se evidencian importantes cambios en el espectro. Se ha comprobado en la bibliografía que esos cambios en los ácidos citidílicos y adenilícos son los mismos que las que presente el clorhidrato de la base o del nucleosido. Puesto que los clorhidratos añaden un proton al átomo  $N_{(1)}$ , esto mismo debe ocurrir en los ácidos citidílicos y adenilícos. Así pues, estos ácidos existen en forma de zwitterion en el estado sólido, y uno de los protones del grupo fosfato habrá pasado al  $N_{(1)}$ .

En el ácido uridílico se observan muy pocos cambios respecto a la uridina. Esto era de prever pues aquí la formación de zwitterion es menos probable.

Cabría pensar, no obstante, que en los ácidos citidílicos y uridílicos, el protón pasa al grupo  $\text{NH}_2$ . Sin embargo la banda del  $-\text{NH}_2$  a  $1660 \text{ cm}^{-1}$  en la adenósina se traslada a la región de  $1690-1710 \text{ cm}^{-1}$  en el ácido adenílico. Y este desplazamiento no corresponde a un  $-\text{NH}_3^+$  sino a un grupo  $-\text{NH}_2$  con una carga positiva próxima.

En casi todos los nucleótidos de adenina, se conserva la banda a  $1300 \text{ cm}^{-1}$  (también presente en la adenosina) ; pero aparecen cambios importantes en la región de  $1300-1500 \text{ cm}^{-1}$  lo que parece indicar alteraciones importantes en la distribución electrónica dentro del núcleo de adenina.

Es probable que la asignación de banda siguiente sea cierta

banda en  $1300 - 1200 \text{ cm}^{-1}$  asociada con el grupo  $\text{E}=\text{O}$

banda en  $1150 - 900 \text{ cm}^{-1}$  asociada con el grupo  $\text{P}-\text{O}-\text{C}$

## 2.5.- Ácidos nucleicos

Los espectros registrados de tres tRNA de distintas fuentes son prácticamente coincidentes.

Parece ser que los ácidos nucleicos en estado sólido están en forma de zwitterion.

La banda hacia  $1087 \text{ cm}^{-1}$  puede ser debida al ani-

llo de azúcar y las de 1070 y 1052  $\text{cm}^{-1}$  a los grupos fosfatos.

Tsuboi ha demostrado que, en espectros de la sal sódica de ácidos nucleicos, la banda en la región de 1220-1240  $\text{cm}^{-1}$  puede asignarse al grupo  $\text{PO}_2^-$

---

NOTA:

En las asignaciones de bandas hechas en este capítulo de conclusiones se ha observado que las bandas de nuestro espectro en BrK están algo desviadas hacia menores frecuencias que las de los espectros realizados en otro medio u otra fase, especialmente se aprecia esto en la región de 1700  $\text{cm}^{-1}$

BIBLIOGRAFIA (1)

- David N.Kendall: Applied Infrared Spectroscopy-Reinhold Publishing Corporation-New York-London-1966
- Herman A.Szymansky: Theory and Practical of infrared Spectroscopy -Plenum Press-New York- 1964
- Robert G.White: Handbook of Industrial Infrared Analysis - Plenum Press- New York - 1964
- J.R.W.J.Potts: Chemical Infrared Spectroscopy (Vol 1, Techniques) John Wiley Sons, Inc -New York-London-
- Robert T.Conley: Infrared Spectroscopy-Allyn and Bacon, INC-Boston 1966
- Clifton E.Meloon: Elementary Infrared Spectroscopy -The Macmillan Co- New York Collier-Macmillan Limited-London 1963
- P.Robert Bauman: Absorbtion Spectroscopy -John Wiley and Sons Inc. -New York 1962
- Ed.R.G.J.Miller: Laboratory Methods in Infrared Spectroscopy Heyden Son Limited-London 1965
- A.E.Martin: Infrared Instrumentation and Techniques-Elsevier Publishing Company-Amsterdam-London-1966
- Michael L.Hair: Infrared Spectroscopy in Surface Chemistry Marcel Dekker, Inc. New York-1967
- Dieter O.Hummel: Infrared Spectra of Polymers-Interscience Publishers division of John Wiley Sons New York, London 1966
- L.H.Little: Infrared Spectra of Adsorbed Species. Academic Press -London-New York-1966
- Freeman F.Bentley: Infrared Spectra and Characteristic Frequencies Lee D.Suithson and Adele L.Rozek -700-300  $\text{cm}^{-1}$ -Interscience Publishers -John Wiley Sons- New York-London -1968.

BIBLIOGRAFIA (2)

J.MORCILLO y R.MADROÑERO: Aplicaciones prácticas de la espectroscopía infrarroja, Facultad de Ciencias, Universidad de Madrid (1962).

C.L.AUGELL: J.Chem.Soc. (1961), 505 (vol 1).

E.R.BLOUT and M.FIELDS: J.Am.Chem.Soc 72, 480 (1950) (vol 1)

L.N.SCHORT and H.W.THOMPSON: J.Chem.Soc. (1952), 168 (vol 1)

M.M.STIMSON and M.J.O'Donnell: J.Am.Chem.Soc. 74, 1806 (1952)  
(vol 2).

Catálogo de espectros Ir: D.M.S.