

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
Departamento de Estructura Atómico-Molecular y Espectroscopia



TESIS DOCTORAL

**Estudio de espectroscopía UV e IR interacciones moleculares  
de componentes de ácidos nucleicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Fernando Peral Fernández**

DIRECTOR:

**Ernesto Gallego García**

Madrid, 2015

Fernando Peral Fernández

10.362  
55-80



x-53-044058-9

ESTUDIO POR ESPECTROSCOPIA UV E IR INTERACCIONES  
MOLECULARES DE COMPONENTES DE ACIDOS NUCLEICOS

Departamento de Estructura Atómico-Molecular y Espectroscopia  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1980

© Fernando Peral Fernández  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1980  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-10654-1980

FERNANDO PERAL FERNANDEZ

ESTUDIO POR ESPECTROSCOPIA UV E IR  
DE INTERACCIONES MOLECULARES  
DE COMPONENTES DE ACIDOS NUCLEICOS

Director: Dr. Ernesto Gallego García  
Investigador Científico del  
C.S.I.C.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Estructura Atómico-Molecular  
y Espectroscopía

Año 1979

A mi familia

El trabajo que se recoge en esta Memoria ha sido realizado en el Departamento de Estructura Atómico-Molecular y Espectroscopía de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense, entre los años 1974-1979, bajo la dirección del Dr. D. Ernesto Gallego García y la supervisión del Prof. Dr. D. Jesús Morcillo Rubio a quienes deseo expresar mi más sincero agradecimiento.

Hago extensivo mi agradecimiento a los Dres. A. Rodríguez y A. Hernanz, y a D.A. Báscones, por su cooperación durante la realización de este trabajo, así como a D. L. de la Vega, por su cuidadoso mecanografiado del original.

A lo largo de estos años he disfrutado de una beca del Plan de Formación de Personal Investigador y de una ayuda económica de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica. Mi reconocimiento a ambos Organismos.

Mi deuda de gratitud, también, a todas aquellas personas que me han ayudado de alguna forma.

I N D I C E

	<u>Pág</u>
<u>INTRODUCCION</u>	vi
<u>1.- AUTOASOCIACION DE BASES, NUCLEOSIDOS Y NUCLEOTIDOS EN DISOLUCION ACUOSA. ESTUDIO POR ESPECTROSCOPIA UV</u>	1
1.1. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	6
1.1.1. Instrumentación	6
1.1.2. Productos y disoluciones	7
1.1.3. Técnica de medida	9
1.2. ANALISIS NUMERICO DE RESULTADOS Y CALCULO DE PARAMETROS DE AUTOASOCIACION	13
1.3. RESULTADOS EXPERIMENTALES	24
1.3.1. Bases púricas y pirimidínicas	26
1.3.2. Nucleósidos	32
1.3.3. Nucleótidos	39
1.4. INTERPRETACION DE RESULTADOS	46
<u>2.- INFLUENCIA SOBRE LA AUTOASOCIACION DE CAMBIOS INDUCIDOS EN EL MEDIO</u>	77
2.1. INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DEL DISOLVENTE	79
2.1.1. Influencia del etanol	86
2.1.2. Influencia del dimetilsulfóxido	89
2.2. INFLUENCIA DE SALES ESTABILIZADORAS Y DESESTABILIZADORAS DE LA ESTRUCTURA DEL AGUA	107
2.2.1. Influencia de cloruros	115
2.2.2. Influencia de sulfatos	118
2.2.3. Influencia de percloratos	118
2.3. INFLUENCIA DEL pH	138
2.3.1. Bases	150
2.3.2. Nucleósidos	153
2.3.3. Nucleótidos	155

	<u>pág</u>
2.4. INFLUENCIA DE LA UREA	168
2.5. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA	184
3.- <u>DINUCLEOSIDOS-MONOFOSFATO</u>	207
3.1. AUTOASOCIACION	212
3.1.1. Autoasociación de ApA	216
3.1.2. Autoasociación de UpU	219
Interpretación de resultados	223
3.2. HETEROASOCIACION	240
3.2.1. Metodología experimental	242
3.2.2. Interacción UpU.Adenosina	244
3.2.3. Interacción ApA.Uridina	246
3.2.4. Interacción ApA.UpU	249
4.- <u>OLIGONUCLEOTIDOS Y POLINUCLEOTIDOS</u>	254
4.1. OLIGONUCLEOTIDOS	256
4.1.1. Acidos oligoriboadenílicos	257
4.1.2. Acidos oligoribouridílicos	269
4.2. POLINUCLEOTIDOS	276
4.2.1. Acido poliriboadenílico (poli A)	276
4.2.2. Acido poliribouridílico (poli U)	293
5.- <u>ESTUDIO COMPLEMENTARIO POR ESPECTROSCOPIA IR DE AUTOASOCIACION Y HETEROASOCIACION DE UNIDADES MONOMERICAS EN DISOLUCION ACUOSA</u>	302
5.1. AUTOASOCIACION EN D <sub>2</sub> O	306
5.1.1. Metodología experimental	306
5.1.2. Autoasociación de 5'-GMP	311

v

	<u>pág</u>
5.1.3. Autoasociación de 5'-CMP	320
5.1.4. Autoasociación de Adenosina	322
5.2. HETEROASOCIACION EN D <sub>2</sub> O	327
5.2.1. Heteroasociación de 5'-GMP y 5'-CMP	327
6.- <u>RESUMEN Y CONCLUSIONES</u>	333
7.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	344

## INTRODUCCION

El estudio de las asociaciones moleculares constituye, en la actualidad, un área de investigación de importancia fundamental en Biología Molecular.

Como es sabido, la estructura de la mayoría de las biomoléculas simples está ya, en gran parte, resuelta, y la estructura primaria de los biopolímeros resulta cada vez más accesible. El interés de los investigadores se orienta actualmente a la determinación de las posibles conformaciones de estas macromoléculas y al estudio de las interacciones moleculares entre diferentes tipos de biopolímeros o de éstos con moléculas pequeñas.

Dentro de este orden de ideas, el estudio de las propiedades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos puede orientarse según dos líneas de investigación bien definidas. La primera de ellas se refiere a la química estructural y propiedades intrínsecas de estos compuestos; la segunda, que constituye el objeto del presente trabajo, comprende el estudio de sus interacciones moleculares.

En el momento actual, se acepta unánimemente la idea de que el camino más lógico y fructífero para abordar la investigación a nivel fisicoquímico de las propiedades de los ácidos nucleicos, debe par

tir del estudio de sus unidades monoméricas, bases púricas y pirimidínicas, y sus nucleósidos y nucleótidos correspondientes.

El objetivo fundamental del presente trabajo es poner de manifiesto que el estudio de las interacciones moleculares de las unidades monoméricas de ácidos nucleicos, y de otros componentes de progresiva complejidad estructural de estos biopolímeros, proporciona una información valiosa acerca de los principios fundamentales que gobiernan las propiedades estructurales de los ácidos nucleicos.

De acuerdo con esta idea, se ha planificado este trabajo estudiando, en primer lugar, las interacciones moleculares de los componentes más simples de los ácidos nucleicos y a continuación, las de los oligonucleótidos y polinucleótidos.

De este modo, puede llevarse a cabo un estudio comparativo de las interacciones moleculares de componentes de ácidos nucleicos de diferente grado de complejidad, y se pueden establecer correlaciones que constituyen una valiosa ayuda para estimar las contribuciones relativas de los diversos factores que condicionan la estructura y estabilidad de los ácidos nucleicos, las cuales están determinadas por las interacciones base-base, por la conformación del esqueleto ribosa-fosfato y por las interacciones con el medio.

El estudio propuesto se basa, fundamentalmente, en el efecto hipocrómico que presentan las bandas de absorción de los componentes de ácidos nucleicos en UV y en IR. Por tanto, se hace uso de estas dos técnicas de espectroscopía molecular. La espectroscopía UV presenta,

para el estudio cuantitativo de estas interacciones moleculares, algunas ventajas significativas, entre las cuales puede destacarse la posibilidad de estudiar disoluciones en un amplio intervalo de concentraciones, que permite observar el progreso del grado de asociación al aumentar la concentración, debido a la gran intensidad de las bandas de absorción UV y a su sensibilidad a las variaciones de concentración. Por otra parte, la espectroscopía IR aporta una información complementaria acerca de la naturaleza de los mecanismos de interacción, si bien esta técnica es, en el aspecto cuantitativo, más limitada que la UV.

Teniendo en cuenta que el agua es el disolvente natural de los medios biológicos, es obvio que tanto el estado conformacional de las biomoléculas, como sus interacciones, deben ser investigados en disolución acuosa. De acuerdo con ello, todos los componentes de ácidos nucleicos a que se refiere este trabajo, se han estudiado en disolución acuosa, salvo en los casos en que se han empleado otros disolventes (etanol y dimetilsulfóxido) para valorar, precisamente, la influencia del disolvente sobre los procesos de interacción inter- e intramolecular.

El orden expositivo seguido en esta Memoria responde al orden creciente de complejidad de los diversos sistemas de componentes de ácidos nucleicos que hemos estudiado.

En el capítulo 1 se expone el estudio realizado por espectroscopía UV, de la autoasociación de las 16 unidades monoméricas más características de los ácidos nucleicos (5 bases, 6 nucleósidos y 5 nu-

clestidos), en disolución acuosa, y se hace una discusión detallada de los diferentes factores que contribuyen -en cada uno de estos compuestos- a la energía total de interacción.

En el capítulo 2 se estudia la influencia que sobre la auto asociación ejercen la naturaleza del disolvente, los iones presentes en la disolución, el pH, la urea y la temperatura. Las conclusiones ex puestas en cada uno de los apartados de este capítulo, confirman la hipótesis de trabajo de este estudio de que las interacciones moleculares son consecuencia, no sólo de las propiedades intrínsecas de las moléculas implicadas en la interacción, sino también de las condiciones del entorno en que ésta tiene lugar.

El estudio de las unidades monoméricas desarrollado en los capítulos 1 y 2 permiten interpretar el doble efecto hipocrómico -detectado por primera vez en este Laboratorio- en función de la posible asociación por formación de enlace de hidrógeno y por apilamiento. Por otra parte, se ha logrado poner de manifiesto la contribución de las interacciones hidrofóbicas en el proceso de asociación.

De acuerdo con la idea directriz del presente trabajo de que las propiedades de los ácidos nucleicos son función de sus unidades constituyentes, en el capítulo 3 se ha extendido el estudio de las unidades monoméricas a los dinucleósidos-fosfato ApA y UpU, con el doble objetivo de tratar de estimar hasta qué punto los parámetros de asociación de los dímeros pueden predecirse a partir de los parámetros de asociación de los monómeros, y de valorar la contribución que representa la cadena ribosa-fosfato en la ordenación de las bases y en

la iniciación de la estructura helicoidal de los polinucleótidos.

En el capítulo 4, siguiendo el orden creciente de aproximación a la estructura de los ácidos nucleicos, se extiende el estudio del efecto hipocrómico a los ácidos oligoriboadenilicos y oligoribouridilicos, y a los polinucleótidos poli A y poli U. De este modo, se lleva a término la investigación por espectroscopía UV de los sistemas citados.

En el capítulo 5 se describen los resultados iniciales de un estudio experimental, mediante espectroscopía IR, acerca de la autoasociación y heteroasociación de unidades monoméricas en disolución acuosa, que ha permitido confirmar algunas de las principales conclusiones obtenidas por espectroscopía UV. Entre ellas, merece destacarse la confirmación de la existencia del doble efecto hipocrómico (en adenosina), la concordancia del valor de la constante de asociación correspondiente al 2° efecto hipocrómico del 5'-GMP con el obtenido por UV, y la existencia de un único efecto hipocrómico en el 5'-CMP, que representa un resultado singular dentro del estudio por UV de los mononucleótidos.

Para facilitar el manejo de la bibliografía consultada, se ha adoptado el criterio de su numeración independiente por capítulos, si bien, dada la amplitud del cap. 2 y la diversidad de los temas tratados en él, la bibliografía correspondiente a dicho capítulo se distribuye por apartados.

1.- AUTOASOCIACION DE BASES, NUCLEOSIDOS  
Y NUCLEOTIDOS EN DISOLUCION ACUOSA.  
ESTUDIO POR ESPECTROSCOPIA UV.

Es evidente que un estudio sistemático de las propiedades fisicoquímicas de las unidades monoméricas de los ácidos nucleicos, bases púricas y pirimidínicas y sus nucleósidos y nucleótidos correspondientes, debe proporcionar una información valiosa de los principios fundamentales que gobiernan las propiedades de los ácidos nucleicos. Por ser moléculas relativamente sencillas y que pueden obtenerse como tales especies químicas con un elevado grado de pureza, las unidades monoméricas se pueden estudiar con mucha más profundidad y rigor. En efecto, los más destacados investigadores de este área de trabajo consideran que el estudio de los principios básicos de la química de los ácidos nucleicos debe cimentarse, lógicamente, en el de las unidades monoméricas.

Dentro del estudio de las propiedades fisicoquímicas de las unidades monoméricas, pueden establecerse dos áreas bien definidas. La primera comprende la química estructural y las propiedades intrínsecas de estos compuestos; la segunda, que constituye el objeto de nuestro trabajo, comprende los estudios de interacción y asociación de unidades monoméricas entre sí y con polinucleótidos.

La información obtenida en este estudio, permitirá abordar el tratamiento de sistemas más complejos: dinucleótidos, oligonucleótidos y polinucleótidos. Como es sabido, la estructura de los ácidos nucleicos y de los polinucleótidos está determinada por los condicionamientos que impone la conformación del esqueleto ribosa-fosfato y por las interacciones directas entre las bases púricas y pirimidínicas.

Aún no han sido establecidas definitivamente, en modo al-

guno, las causas últimas de la estructura y estabilidad de los ácidos nucleicos en disolución acuosa. Presenta, pues, un interés especial el estudio de la interacción y asociación de las unidades monoméricas en disolución acuosa, ya que sus estados conformacionales y sus mecanismos de acción están condicionados, no solamente por sus propiedades intrínsecas, sino también, y en un grado muy importante, por su interacción con el disolvente. Por otra parte, es obvio que las interacciones de moléculas de importancia biológica, como son estas unidades monoméricas, adquiere su pleno significado en disolución acuosa, ya que el agua es el medio natural de los sistemas biológicos.

En los trabajos preliminares de la interacción de unidades monoméricas de ácidos nucleicos, realizados en nuestro laboratorio (1-3), se puso de manifiesto por primera vez la existencia de un doble efecto hipocrómico en los espectros UV de las disoluciones acuosas de bases, nucleósidos y nucleótidos: un primer efecto a concentraciones inferiores a  $\sim 10^{-3}$  M y un segundo efecto a concentraciones comprendidas entre este valor y  $\sim 10^{-1}$  M.

Este doble efecto hipocrómico podría interpretarse en función de dos mecanismos diferentes de asociación, uno de apareamiento por formación de enlaces de hidrógeno (primer efecto), y otro de apilamiento vertical (segundo efecto), estableciéndose, por otra parte, como supuestos plausibles del fenómeno de asociación, la formación de dímeros (1° efecto hipocrómico) y la formación de polímeros (2° efecto hipocrómico), por un proceso de multiequilibrio.

Hemos llevado a cabo un estudio prácticamente exhaustivo de la bibliografía correspondiente a este área de trabajo, pudiendo

afirmar que, hasta el momento presente, no se ha logrado una evidencia experimental incontrovertible a favor de uno u otro de los citados mecanismos de asociación. Si bien en las revisiones de conjunto publicadas hasta el momento actual (4-7) se establece que, en general, el único mecanismo de asociación que se ha podido poner de manifiesto, en disolución acuosa, es el de apilamiento de las bases en las unidades monoméricas estudiadas, otros trabajos (8,9) presentan evidencia experimental de la formación de enlaces de hidrógeno en la autoasociación de nucleótidos.

En este capítulo nos limitaremos a tratar de interpretar los resultados experimentales obtenidos por nosotros por espectroscopía UV, con el fin de dilucidar, hasta donde sea posible, la existencia de uno u otro de los dos mecanismos fundamentales citados -enlace de hidrógeno y apilamiento- y valorar la contribución relativa de cada uno de ellos.

Para poner de manifiesto las dificultades que encierra este intento de obtener resultados concluyentes, no queremos dejar de subrayar las grandes limitaciones de la espectroscopía UV en el estudio de los enlaces de hidrógeno frente a otras técnicas espectroscópicas, aunque, como es sabido, el enlace de hidrógeno afecta al espectro electrónico de una molécula si el grupo cromóforo de ésta es perturbado por dicho enlace, y por ello los espectros de absorción UV y visibles se han utilizado para estudios cuantitativos de enlaces de hidrógeno (10). En la actualidad, se considera que la espectroscopía de RMN y las de IR y Raman constituyen los métodos más sensibles para el estudio de las interacciones que dan lugar a la formación de hi

drógeno. Especialmente importante, para dilucidar entre los dos citados mecanismos de asociación posibles, es el empleo de la espectroscopía de RMN, ya que el apilamiento da lugar a desplazamientos a alto campo de las señales de los protones de los anillos de las bases, mientras que el enlace de hidrógeno produce desplazamientos a bajo campo.

Sin embargo, la espectroscopía UV presenta, para el estudio cuantitativo de interacciones moleculares, las siguientes ventajas fundamentales: 1°) la posibilidad de estudiar disoluciones acuosas; 2°) la gran intensidad de las bandas de absorción UV, que permite estudiar un intervalo de concentraciones lo suficientemente grande (5 órdenes de magnitud) para poder observar cómo progresa el grado de asociación al aumentar la concentración, lo cual ha permitido poner de manifiesto la existencia del 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico, que tiene lugar en disoluciones muy diluídas, cuyo estudio, incluso por RMN, presenta grandes dificultades; 3°) la gran sensibilidad de la intensidad de las bandas UV a las variaciones de concentración, que permite delimitar de forma precisa la separación entre los 2 efectos hipocrómicos observados y calcular los correspondientes parámetros de asociación.

## 1.1. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 1.1.1. Instrumentación

Los espectros UV se han registrado con un espectrofotómetro Pye-Unicam SP 1800, de doble rayo, con un intervalo espectral de 190 a 700 nm, y una precisión de  $\pm 0,5$  nm. Este instrumento permite el empleo de 4 escalas de absorbancia: 0-0,2; 0-0,5; 0-1 y 0-2, siendo la exactitud fotométrica de  $\pm 1\%$  del valor total de cada una de ellas. La anchura de banda espectral puede variar continuamente de 0,05 a 3,0 nm. Se pueden utilizar 5 velocidades de barrido: 4, 2, 1, 0,5 y 0,2 nm/sg.

La alimentación del espectrofotómetro se ha efectuado a 220 V  $\pm 0,5\%$ , mediante un estabilizador de tensión Philips 7776/06. El registro de los espectros se ha realizado en un registrador X-Y Philips PM 8120, provisto de una unidad de base de tiempos PM 9814.

También se ha usado, simultáneamente, un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo 124, de doble rayo, con un intervalo espectral de 190 a 800 nm y una precisión de  $\pm 0,5$  nm. Este instrumento tiene 2 escalas de absorbancia: 0-1 y 0-2, siendo la exactitud fotométrica de  $\pm 0,5\%$  T (o bien  $\pm 0,005$  A) a 0,5 A, en la escala 0-1. La anchura de banda espectral puede ser de 0,5; 1 ó 2 nm. El espectrofotómetro está acoplado a un registrador Perkin-Elmer 165, que posee una gama de 11 tensiones, comprendidas entre 1 mV y 10V, lo cual permite expandir a voluntad la escala de absorbancia del espectrofotómetro. Este instrumento se utilizó tanto para el registro completo de los espectros, como para medidas puntuales a una longitud de onda determinada.

Los resultados obtenidos en ambos espectrofotómetros fueron concordantes dentro del error experimental correspondiente a las

medidas de absorbancia.

Se han utilizado células de cuarzo fundido de 5 cm, 4 cm, 1 cm y 0,1 cm, procedentes de TSL "Spectrosil", Pilkington Perkin-Elmer y Pye-Unicam. Los espectros correspondientes a las disoluciones más concentradas han requerido la utilización adicional de microcélulas desmontables, de Beckman-RIIC, con ventanas de cuarzo y separadores de teflón de 25  $\mu\text{m}$  de espesor. El empleo de estas células ha permitido estudiar la zona de concentraciones en que se manifiesta el 2° efecto hipocrómico.

#### 1.1.2. Productos y disoluciones

Todos los compuestos utilizados son de procedencia comercial: las bases, de Sigma Chemical Co., con grado de pureza Sigma; los nucleósidos y nucleótidos, de Boehringer Mannheim, salvo la timidina, de Sigma. Se realizaron sendas experiencias de autoasociación con muestras de TMP de Sigma y de Boehringer, sin obtener diferencias significativas.

Es necesario tamponar las disoluciones para que el descenso de la absorptividad molar no pueda deberse a la formación de otras especies iónicas al variar el pH de aquéllas. Los fosfatos utilizados para la preparación del tampón, de pH 6,8, son de Merck, de pureza "para análisis". El agua es bidestilada, exenta de materia orgánica por oxidación con  $\text{MnO}_2/\text{K}$ .

Para que la concentración de las disoluciones sea lo más exacta posible, es necesario controlar la pureza de los compuestos y su contenido en humedad. La pureza de los productos fue comprobada por espectroscopía IR, en comprimidos de BrK, y por cromatografía en capa

fina, utilizando silicagel G, de Merck, como soporte, y  $\text{ClLi}$  0,5 M como disolución de desarrollo. El contenido en agua se determinó por análisis elemental y por el método de Karl Fischer.

Todas las unidades monoméricas estudiadas fueron desecadas a vacío, utilizando  $\text{P}_2\text{O}_5$  o gel de sílice como agentes deshidratantes, con calefacción mediante lámpara de radiación infrarroja a una temperatura no superior a  $50^\circ\text{C}$ .

Para cada experiencia de autoasociación se utilizó una serie de disoluciones en tampón fosfato de la correspondiente unidad monomérica (base, nucleósido o nucleótido), a diferentes concentraciones. Únicamente la guanina hubo de estudiarse en disolución de  $\text{ClH}$  0,1 N debido a su bajísima solubilidad a pH neutro. Se prepararon diversas disoluciones patrón por pesada, en una balanza Mettler H16, con una precisión superior a  $\pm 0,05$  mg, y a partir de ellas, por dilución, las restantes disoluciones, cubriendo todo el intervalo de concentraciones indicado en las tablas correspondientes. Se utilizó material volumétrico contrastado y, en todo caso, se escogieron las relaciones volumétricas más adecuadas para mantener el error estimado en la concentración por debajo del 1%, inferior al error de lectura del espectrofotómetro.

La preparación de estas disoluciones se efectuó, siempre que fue posible, a temperatura ambiente, pero en algunos casos, con el fin de conseguir el límite de solubilidad, se hizo necesario calentar en baño de agua a una temperatura no superior a  $50^\circ\text{C}$ , y agitar mediante un microagitador magnético, modelo MS-7X, de Tri-R Instruments.

La determinación del pH se efectuó con un medidor de pH Metrohm E510, de una exactitud de 0,01 pH y una reproducibilidad de 0,002 pH. Para calibrarlo se emplearon disoluciones tampón Radiometer,

de pH  $6,50 \pm 0,01$  y  $4,00 \pm 0,02$ .

Se comprobó que la existencia de fibras en las disoluciones no afectaba significativamente a las medidas de absorbancia, comparando los valores de absorptividad obtenidos con los correspondientes a disoluciones de las cuales se habían eliminado las fibras mediante el empleo de filtros Millipore de  $0,8 \mu\text{m}$ .

En general, se procuró que las medidas de absorbancia se efectuaran en las disoluciones recién preparadas, pero en caso necesario se conservaron éstas en frigorífico. Se comprobó que con este procedimiento de conservación, la absorbancia permanecía invariable durante un período de tiempo suficientemente prolongado.

### 1.1.3. Técnica de medida

En cada una de las experiencias de autoasociación realizadas, se ha medido la absorptividad molar aparente del compuesto, a la longitud de onda del máximo a  $\sim 260 \text{ nm}$ , en un intervalo de concentraciones desde  $\sim 5 \cdot 10^{-6}$  hasta  $\sim 10^{-1} \text{ M}$ , cuyo límite superior ha estado determinado en cada caso por la solubilidad de las unidades monoméricas y por su absorción, a dicha longitud de onda, en células de cuarzo de  $25 \mu\text{m}$  de espesor, que es el mínimo de que hemos podido disponer. Una de las principales dificultades experimentales de este trabajo ha sido el tener que abarcar 5 órdenes de magnitud de concentración, lo que ha requerido la utilización de células de distinto espesor, desde  $5 \text{ cm}$  hasta  $25 \mu\text{m}$ .

Dentro del intervalo de concentraciones correspondiente a cada una de las series preparadas por dilución, se intercalaron algunas disoluciones de las series adyacentes, con objeto de poder detec-

tar con mayor seguridad los errores debidos a la dilución. Se comprobó también el buen solapamiento de los valores de absortividad molar obtenidos en células de diferente espesor.

Para poder realizar con suficiente precisión el ajuste por mínimos cuadrados incluido en el método de cálculo, es conveniente que el número total de puntos experimentales de cada curva de hipocromicidad, no sea inferior a unos 20. Por otra parte, conviene acumular un número adecuado de puntos experimentales en las proximidades del punto de separación entre el 1° y el 2° efecto hipocrómico, así como en los límites del intervalo global de concentración, con objeto de obtener una buena definición de ambos efectos para la aplicación subsiguiente del método de cálculo de los parámetros de autoasociación. Todo ello da una idea de la laboriosidad de las medidas experimentales.

La naturaleza de las mediciones efectuadas requiere un control cuidadoso de la exactitud y reproducibilidad de la respuesta del espectrofotómetro. Por ello, se procedió periódicamente a contrastar la escala de longitudes de onda mediante las líneas del espectro de emisión del deuterio, y de los espectros de absorción de filtros de holmio y didimio. Para el calibrado de las escalas de absorbancia, se utilizó una serie de disoluciones patrón de cromato potásico, de diferente concentración (11,12). Asimismo, se procedió regularmente a registrar la línea base aire/aire en todo el intervalo de longitudes de onda, para comprobar que las desviaciones no eran superiores a las permitidas en las especificaciones del instrumento y efectuar los reajustes precisos en caso contrario. Se comprobó también la linealidad de las escalas de los espectrofotómetros y registradores.

Al comienzo de cada sesión de trabajo, se procedió a un

ajuste de los valores extremos de las escalas de absorbancia de los espectrofotómetros. Antes de medir los espectros de las disoluciones, se registró la línea de fondo, con tampón en las células de referencia y de muestra, con el doble objeto de comprobar la perfecta limpieza de éstas y de efectuar la corrección de la absorción de fondo, como se describe más abajo.

En el espectrofotómetro Unicam SP 1800, la lectura de medidas puntuales de absorbancia se realizó en el propio instrumento, con la escala más sensible que se pudiese utilizar en cada caso. En el espectrofotómetro Perkin-Elmer 124, se recurrió al empleo del registrador por su gran versatilidad en la expansión de la escala de absorbancias. La concordancia de los resultados obtenidos por ambos métodos se mantuvo dentro del error experimental, aunque en el primer caso se obtuvo una dispersión menor, debido a la mayor precisión del instrumento. Dada la importancia de la precisión de las medidas, que es crítica para los pequeños efectos estudiados, esta concordancia se ha comprobado igualmente utilizando los espectrofotómetros Perkin-Elmer 575, Zeiss PMQ-3 y Zeiss DM4.

En todas las medidas puntuales de absorbancia se corrigió la absorción de fondo, restando del valor de la absorbancia a la longitud de onda del máximo,  $A_m$ , la lectura a 310 nm,  $A_{310}$ , donde no hay absorción en los compuestos estudiados, así como la diferencia de las lecturas de absorbancia obtenidas para el tampón a las mismas longitudes de onda,  $F_m$  y  $F_{310}$ , a partir de la línea de fondo. Es decir:

$$A_{\text{Corregida}} = (A_m - A_{310}) - (F_m - F_{310})$$

La absortividad molar aparente en el máximo,  $\epsilon_m$ , se obtie-

ne a partir del valor corregido de la absorbancia:

$$\epsilon_m = \frac{A_{\text{corregida}}}{bc}$$

siendo b el espesor (en cm) de la célula y c la concentración molar del soluto.

Para cuidar al máximo de no introducir errores accidentales, se atendió especialmente a la limpieza de las células, que se lavaron periódicamente con detergente "Mucasol", de Brand, o con una disolución de  $\text{NO}_3\text{H}$  al 40%, a ebullición. Se comprobó también la escasa influencia de la anchura de banda espectral en el intervalo de 0,5 a 2,0 nm, debido a la gran anchura de las bandas espectrales registradas, utilizándose en todas las experiencias una anchura de 1 nm. Las lecturas de absorbancia se realizaron a temperatura ambiente, comprobándose que oscilaciones de  $\pm 5^\circ\text{C}$  no afectan significativamente a los resultados obtenidos. Para evitar la aparición de burbujas en las disoluciones, se desgasificaron éstas, a vacío, antes de registrar sus espectros.

## 1.2. ANALISIS NUMERICO DE RESULTADOS Y CALCULO DE PARAMETROS DE AUTO-ASOCIACION

Se ha desarrollado en nuestro laboratorio (1-3) un método de cálculo para determinar las constantes de autoasociación de las unidades monoméricas, a partir de la variación de los valores experimentales de la absorptividad molar en función de la concentración.

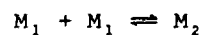
La hipótesis básica en que se fundamenta este método de cálculo es que la desviación de la ley de Lambert-Beer, observada en los espectros UV de las disoluciones de las unidades monoméricas, tiene su origen exclusivamente en la autoasociación de dichos compuestos. Teniendo en cuenta que se han publicado varios trabajos (1,3) en los que se expone con detalle el método, sólo daremos aquí una breve descripción del mismo, que permita seguir el tratamiento de datos experimentales de la presente Memoria.

### Método de cálculo

Se considera que la asociación del soluto se lleva a cabo por un único mecanismo de interacción, bien de apilamiento o bien de enlace de hidrógeno, para el que se establecen dos hipótesis alternativas: la formación de dímeros y la formación de polímeros.

#### a) Formación de dímeros

Designando por  $M_1$  el monómero y por  $M_2$  el dímero, el equilibrio de asociación correspondiente a la formación de dímeros es:



cuya constante viene dada por:

$$K_2 = \frac{c_2}{c_1^2}$$

siendo  $c_1$  y  $c_2$  las concentraciones en el equilibrio del monómero y del dímero, respectivamente. La concentración total, referida al monómero, será:

$$c = 2c_2 + c_1$$

Designando por  $\delta_2$  la disminución en la absorptividad molar de una molécula que se encuentra asociada a otra,  $\epsilon_1$  la absorptividad molar del monómero  $M_1$ ,  $\epsilon$  la absorptividad molar aparente, y  $c$  la concentración molar inicial de soluto, tendremos:

$$\begin{aligned} c &= c_1 + 2K_2 c_1^2 \\ \epsilon &= \epsilon_1 - \delta_2 (1 - c_1/c) \end{aligned}$$

Desarrollando estas expresiones y simplificando, se obtienen por fin las siguientes ecuaciones equivalentes:

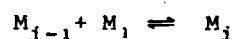
$$\epsilon = (\epsilon_\infty)_d + \left(\frac{\delta_2}{2K_2}\right)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{\epsilon_1 - \epsilon}{c}\right)^{\frac{1}{2}} \quad |1|$$

$$\epsilon = \epsilon_1 - \frac{2K_2}{\delta_2} [(\epsilon - (\epsilon_\infty)_d)^2 \cdot c] \quad |2|$$

siendo  $(\epsilon_\infty)_d$  la absorptividad molar aparente cuando todas las moléculas están dimerizadas, y  $\delta_2 = \epsilon_1 - (\epsilon_\infty)_d$ .

#### b) Formación de polímeros

Designando por  $M_1$  el monómero y por  $M_i$  el polímero de orden  $i$ , el equilibrio genérico de formación de polímero es:



al cual corresponde una constante de asociación:

$$K_i = \frac{c_i}{c \cdot c_{i-1}}$$

siendo  $c_i$  la concentración en el equilibrio del polímero de grado  $i$ . Se supone que la constante de formación del polímero es independiente del grado de asociación, es decir, todas las constantes de los pasos sucesivos de la formación del polímero son iguales y tienen un valor  $K_p$ :

$$K_i = K_p$$

Si se define un parámetro  $\delta_p$ , que representa la disminución de la absorptividad que experimenta una molécula al entrar a formar parte del polímero, y se supone que este parámetro es independiente de la posición de la molécula en la cadena polimérica, salvo en los extremos donde su valor es  $\delta_p/2$ , resulta:

$$c = c_1 (K_p \cdot c_1 - 1)^{-2}$$

$$\epsilon = \epsilon_1 - \delta_p K_p c_1$$

donde  $\epsilon$ ,  $c$ ,  $\epsilon_1$  y  $c_1$  tienen el significado mencionado anteriormente.

Desarrollando estas expresiones y simplificando, se obtienen dos ecuaciones formalmente iguales a |1| y |2|:

$$\epsilon = (\epsilon_\infty)_p + \left(\frac{\delta_p}{K_p}\right)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{\epsilon_1 - \epsilon}{c}\right)^{\frac{1}{2}} \quad |3|$$

$$\epsilon = \epsilon_1 - \frac{K_p}{\delta_p} ([\epsilon - (\epsilon_\infty)_p]^2 \cdot c) \quad |4|$$

siendo  $(\epsilon_\infty)_p$  la absorptividad molar aparente cuando el grado de polimerización tiende a infinito, y  $\delta_p = \epsilon_1 - (\epsilon_\infty)_p$ .

Consideramos de interés resaltar que las ecuaciones que se obtienen para el supuesto de formación de dímero y de polímero, son formalmente análogas, aunque el valor que resulta para la constante de asociación  $K$  es diferente en una y otra aproximación.

### Regresiones lineales

El tratamiento de los datos experimentales a partir de las ecuaciones |1|, |2|, |3| y |4|, puede realizarse mediante una regresión lineal, tomando como variable  $(\epsilon_1 - \epsilon/c)^{\frac{1}{2}}$  en las ecuaciones |1| y |3|, o bien  $(\epsilon - \epsilon_{\infty}^2)c$ , en las ecuaciones |2| y |4|. El valor de la constante de asociación se determina a partir del valor de la pendiente de la recta. Ello requiere el conocimiento previo de  $\epsilon_1$ , en el primer caso, o de  $\epsilon_{\infty}$ , en el segundo, los cuales pueden obtenerse por extrapolación a  $c=0$  ó  $c=\infty$ , respectivamente.

Para optimizar esta extrapolación, que puede tener un error grande y afectar notablemente al valor de K, se adopta como criterio que los valores experimentales de  $\epsilon$  estén comprendidos entre  $\epsilon_1$  y  $\epsilon_{\infty}$ , y que el coeficiente de correlación  $r$  del ajuste sea máximo, y la desviación standard,  $\sigma_e$ , mínima. De acuerdo con ello, se obtiene mediante tanteo el valor de  $\epsilon_1$  ó  $\epsilon_{\infty}$  que da lugar a un ajuste lineal óptimo.

Aunque las ecuaciones propuestas son matemáticamente equivalentes, los valores que de hecho se obtienen para el coeficiente de correlación de los ajustes por mínimos cuadrados de las ecuaciones |1| y |3| a los puntos experimentales, suelen ser bastante mejores que los correspondientes a las ecuaciones |2| y |4|, debido a las condiciones en que se realiza la extrapolación. Por ello, en este trabajo se utilizarán exclusivamente las 2 primeras, optimizando la extrapolación de  $\epsilon_1$ .

### Separación del doble efecto hipocrómico

Cuando una determinada unidad monomérica presenta dos efectos hipocrómicos a intervalos sucesivos de concentración, resulta necesario delimitar cuidadosamente ambos efectos, con el fin de obtener con

la mayor precisión posible los correspondientes parámetros de asociación. En este caso, se interpreta que la asociación tiene lugar según un mecanismo de dimerización, con una constante  $K_2$  (1° efecto), seguido de un multiequilibrio de polimerización, con una constante  $K_p$  (2° efecto):

$$K_2 \neq K_3 = K_4 = \dots = K_p$$

Para seguir con detalle los pasos del método de cálculo utilizado en la separación y posterior tratamiento de ambos efectos, puede verse el desarrollado para la adenosina en tampón fosfato (3).

En resumen, el procedimiento general que debe utilizarse es el siguiente: en primer lugar, se ajustan los puntos experimentales conjuntamente, suponiendo que existe un único efecto hipocrómico. Se representa gráficamente la ecuación lineal correspondiente (ecuación [1]), observando si existe una inflexión que pueda indicar la existencia de 2 intervalos de distinta pendiente, que se deban a 2 efectos hipocrómicos diferentes. En caso afirmativo, se ajustan por separado ambos intervalos, con el mismo valor de  $\epsilon_1$  del ajuste único, pues la absorptividad que corresponde al monómero sin asociar,  $\epsilon_1$ , ha de ser la misma para ambos efectos. Se prueban varios intervalos que difieran entre sí en el punto de separación, y adoptando como norma de separación óptima, que la suma de los cuadrados de las desviaciones de ambos ajustes sea mínima, se escoge el intervalo más adecuado.

En caso de que se presenten 2 efectos hipocrómicos,  $(\epsilon_\infty)_d$  del 1° efecto representa la absorptividad molar que correspondería a la dimerización completa, que no es exactamente la correspondiente al punto de transición de los 2 efectos, porque a esa concentración predomina ya el equilibrio de polimerización (2° efecto), que solapa con el

anterior; es decir, en cierto modo  $(\epsilon_{\infty})_d$  es un valor hipotético, mientras que  $(\epsilon_{\infty})_p$  tiene el significado que indicamos anteriormente.

Para adoptar un criterio cuantitativo de significación en la determinación del doble efecto, se comparan mediante el criterio de Student las distribuciones de coeficientes de regresión lineal:

$$t = (p-\beta) \sqrt{\frac{(n-2) \sum (x_i - \bar{x})^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad |5|$$

en donde  $t$  es la variable de Student para  $(n-2)$  grados de libertad, siendo  $n$  el número de puntos experimentales;  $\beta$  es la pendiente de la recta del ajuste único, y  $p$  es la pendiente de la recta que corresponde al 1° efecto ( $p_1$ ) o bien la pendiente de la recta del 2° efecto ( $p_2$ ).

Si se cumple que  $(p-\beta)$  es significativo, con un nivel de significación del 1 por 100, deben considerarse 2 efectos hipocrómicos distintos; por el contrario, si esta diferencia se encuentra por debajo del nivel correspondiente a un 5 por 100, se considera un efecto único, y se calculan los parámetros de asociación como si se tratase de un simple equilibrio de dimerización.

En el caso de que existan 2 efectos hipocrómicos, se elige a continuación el valor extrapolado de  $\epsilon_1$  para el cual es mínima la suma de los cuadrados de las desviaciones de ambos ajustes, y con dicho valor, que en general será diferente del obtenido en el ajuste único, se calculan las ecuaciones lineales correspondientes, |1| y |3|. La representación gráfica de estas ecuaciones, situando  $\epsilon$  en ordenadas y  $(\epsilon_1 - \epsilon/c)^{\frac{1}{2}}$  en abscisas, dará dos líneas rectas que se ajustarán mejor a los puntos experimentales que la recta correspondiente al ajuste único inicial.

### Cálculo de parámetros de autoasociación

Los parámetros de asociación  $K_2$ ,  $\delta_2$ ,  $K_p$ ,  $\delta_p$ , se calculan a partir de los resultados de los ajustes definitivos para ambos efectos hipocrómicos:

a) 1° efecto

$$K_2 = \frac{\delta_2}{2p_1^2} \quad \delta_2 = \epsilon_1 - (\epsilon_\infty)_d \quad |6|$$

b) 2° efecto

$$K_p = \frac{\delta_p}{p_2^2} \quad \delta_p = \epsilon_1 - (\epsilon_\infty)_p \quad |7|$$

Así mismo, puede calcularse la hipocromicidad de la molécula asociada con respecto a la molécula libre, para cada uno de los 2 efectos:

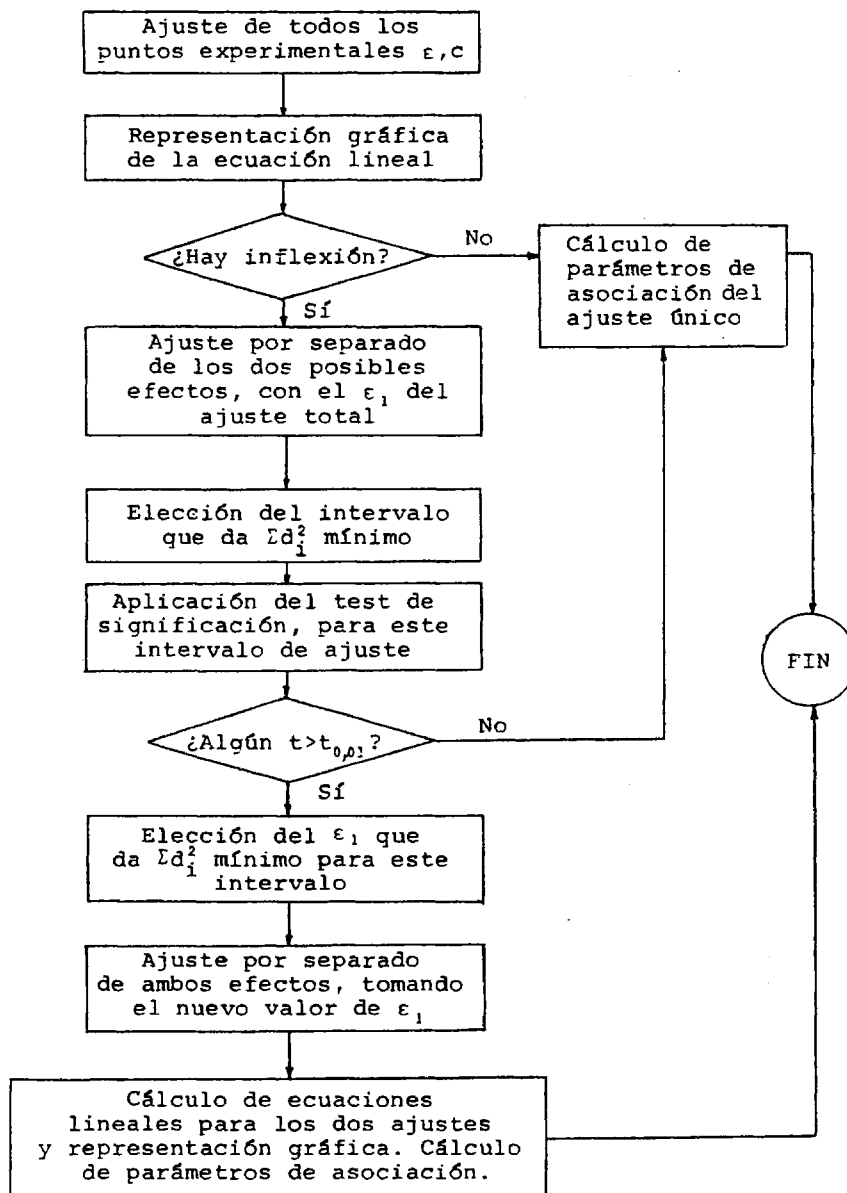
$$h(\%) = \frac{\epsilon_1 - \epsilon_\infty}{\epsilon_1} 100 \quad |8|$$

A continuación se adjunta el organigrama del método descrito, así como el listado del programa "HIPOCROM", en lenguaje BASIC, utilizado en las regresiones lineales. Se trata del programa "LINEAR REGRESSION", de la colección 2200 General Library Statistics/Engineering GLBR 22A Wang Laboratories, 1973, modificado en nuestro laboratorio para el ajuste mediante la optimización de  $\epsilon_1$ . Con este programa, utilizando un ordenador Wang 2200, se efectúa una regresión lineal de los puntos experimentales ( $\epsilon, c$ ) a las ecuaciones |1| ó |3|, según se suponga la formación de dímero o de polímero, respectivamente.

Queremos destacar que el principal problema que presenta el análisis numérico de los datos de este tipo reside en la precisión de los datos experimentales y no en los métodos utilizados para analizarlos. La bondad de nuestro método de cálculo se demuestra por los

ajustes, casi coincidentes con los resultados experimentales, que llega a obtener. Sin embargo, debido al error experimental inevitable en los pasos iniciales del tratamiento de datos, el hecho de que se obtengan tales ajustes coincidentes no implica necesariamente que la solución sea única.

ORGANIGRAMA DEL METODO DE CALCULO



PROGRAMA "HIPOCROM", en lenguaje BASIC, utilizado para el ajuste de los resultados experimentales

```

10 DIM E(40),C(40)
20 INPUT "NUMERO DE PUNTOS",N:FOR I=1TO N:INPUT "E Y C",E(I),C(I)
):NEXT I
30 PRINT "          E          C"
40 FOR I=1TO N:PRINTUSING 50,E(I);C(I):NEXT I
50 %      -#.#####!!!!
60 INPUT "E1",E1
70 PRINT "VALOR DE E1 =",E1
80 S1,S2,S3,S4,S5=0
90 Z1,Z2=0
100 FOR I=1 TO N
110 MO=E1-E(I):MO=MO/C(I):X=SQR(MO):Y=E(I)
120 Z1=Z1+X:Z2=Z2+X!2
130 S1=S1+X
140 S2=S2+Y
150 S3=S3+X!2
160 S4=S4+Y!2
170 S5=S5+X*Y
180 NEXT I
190 B=(N*S5-S2*S1)/(N*S3-S1!2)
200 A=(S2-B*S1)/N
210 PRINT
220 PRINT "0 DEG. COEFF.=";A
230 PRINT "1 DEG. COEFF.=";B
240 PRINT HEX(03)
250 S1=B*(S5-S1*S2/N)
260 S4=S4-S2!2/N
270 S2=S4-S1
280PRINT
290 PRINT
300 PRINT "          REGRESSION TABLE"
310 PRINT
320 PRINT "SOURCE","SUM OF SQ.,""DEG.FREEDOM","MEAN SQ."
330 PRINT "REGRESSION",S1,1,S1
340 PRINT "RESIDUAL",S2,N-2,S2/(N-2)
350 PRINT "TOTAL",S4,N-1
360 PRINT
370 PRINT "F=";S1/S2*(N-2)
380 PRINT
390 PRINT
400 S5=S1/S4
410 PRINT "COEFF. OF DETERMINATION=";S5

```

```

420 PRINT "COEFF. OF CORRELATION=";SQR(S5)
430 PRINT "ERROR STANDARD DE E =";SQR(S2/(N-2))
440 Z3=Z2/N-(Z1/N)!2:Z4=SQR(S2/(N-2)):Z5=(Z2/(Z3*N!2)):Z5=Z4*SQR
440 Z3=Z2/N-(Z1/N)!2:Z4=SQR(S2/(N-2)):Z5=(Z2/(Z3*N!2)):Z5=Z4*SQR
(Z5):Z6=1/(N*Z3):Z6=Z4*SQR(Z6)
450 PRINT "ERROR STANDARD DEL PRIMER COEFICIENTE ="; Z5
460 PRINT "ERROR STANDARD DEL SEGUNDO COEFICIENTE =";Z6
470 PRINT
480 PRINT
490 GOTO 60
500 END

```

#### COMENTARIOS

E = absortividad molar.

C = concentración molar.

N = número de puntos experimentales.

0 DEG. COEFF. = ordenada en el origen de la ecuación lineal

|1| 6 |3|.

1 DEG. COEFF. = pendiente de la ecuación lineal |1| 6 |3|.

### 1.3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Se exponen a continuación los resultados experimentales, así como los valores de los parámetros más significativos del método de cálculo, de acuerdo con el siguiente esquema:

- 1) Los resultados se han agrupado en los siguientes epígrafes:
  - 1.3.1. Bases púricas y pirimidínicas: Adenina, Guanina, Citosina, Uracilo, Timina.
  - 1.3.2. Nucleósidos: Adenosina, Desoxiadenosina, Guanosina, Citidina, Uridina, Timidina.
  - 1.3.3. Nucleótidos: 5'-AMP, 5'-GMP, 5'-CMP, 5'-UMP, 5'-TMP.
- 2) Para no alargar excesivamente la presentación de los resultados, se omiten las tablas detalladas correspondientes a las medidas experimentales de los valores de la absorptividad molar en el máximo,  $\epsilon_m$ , en función de la concentración molar de soluto,  $c$ , para cada uno de los sistemas estudiados.
- 3) Dentro de cada uno de los epígrafes mencionados, se resumen, en una tabla única, los valores de los parámetros más significativos de los ajustes lineales empleados para los diversos sistemas; es decir,  $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_\infty$ , pendiente  $p$  y coeficiente de correlación  $r$  del ajuste de ambos efectos hipocrómicos (tablas 1.1.-1.3.).
- 4) Para cada uno de los compuestos estudiados, se dan dos gráficas que corresponden, respectivamente, a: 1º) la

representación semilogarítmica de la absorptividad molar en el máximo,  $\epsilon_m$ , frente a la concentración molar,  $c$ ; y 2°) la representación de las ecuaciones lineales que permiten el cálculo de los parámetros de autoasociación.

En la primera de dichas gráficas, la escala logarítmica de concentraciones no responde a ninguna ecuación matemática; se utiliza únicamente para facilitar la presentación de resultados experimentales en un intervalo muy amplio de concentraciones. En esta gráfica se incluyen los puntos experimentales y la curva ajustada que proporciona el método de cálculo.

- 5) Por último, se dan las tablas conjuntas correspondientes a los parámetros de autoasociación de las unidades monoméricas estudiadas (tabla 1.4.) y se realiza la interpretación de los resultados obtenidos.

1.3.1. Bases púricas y pirimidínicas

TABLA 1.1.

Resumen de los valores de los parámetros obtenidos con el programa de cálculo "HIPOCROM"

Compuesto	Intervalo de concentraciones	$\epsilon_1$	$\epsilon_\infty$	p	r
Adenina	$5 \cdot 10^{-6}$ - $3,5 \cdot 10^{-3}$ M	14200	12010±80	0,30 ± 0,02	0,977
"	$5 \cdot 10^{-3}$ - $2 \cdot 10^{-2}$ M	"	8500±200	5,1 ± 0,3	0,996
Guanina *	$5 \cdot 10^{-6}$ - $2,5 \cdot 10^{-3}$ M	12170	10800±40	0,34 ± 0,02	0,995
Citosina	$4 \cdot 10^{-6}$ - $8 \cdot 10^{-2}$ M	7230	5790±40	0,21 ± 0,01	0,960
Uracilo	$5 \cdot 10^{-6}$ - $3 \cdot 10^{-2}$ M	9090	7300±20	0,391 ± 0,009	0,994
Timina	$5 \cdot 10^{-6}$ - $3,5 \cdot 10^{-2}$ M	9090	6950±30	0,24 ± 0,01	0,982

\* En disolución 0,1 N de ClH.

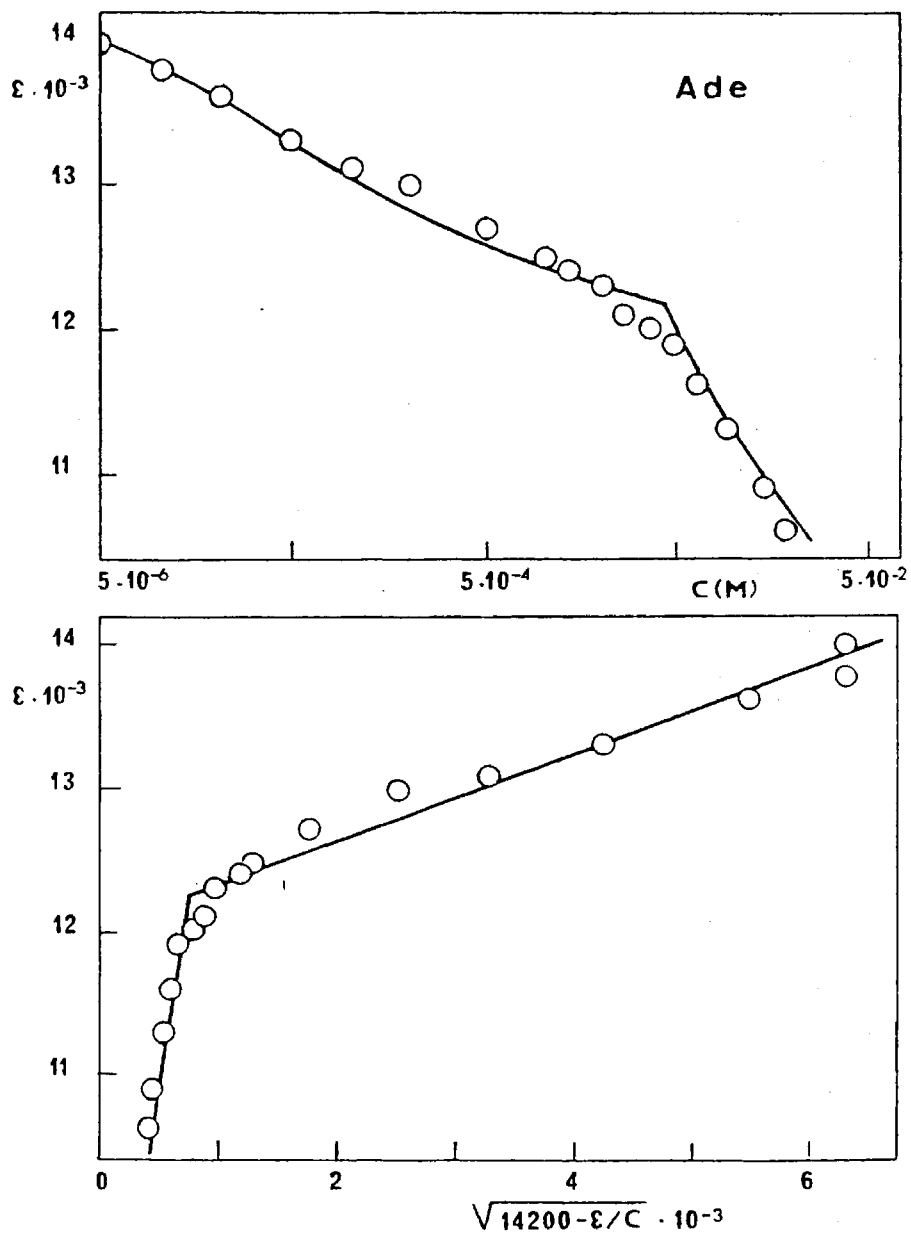


Fig. 1.1.- Hipocromicidad de Adenina (Ade) a 260,5 nm

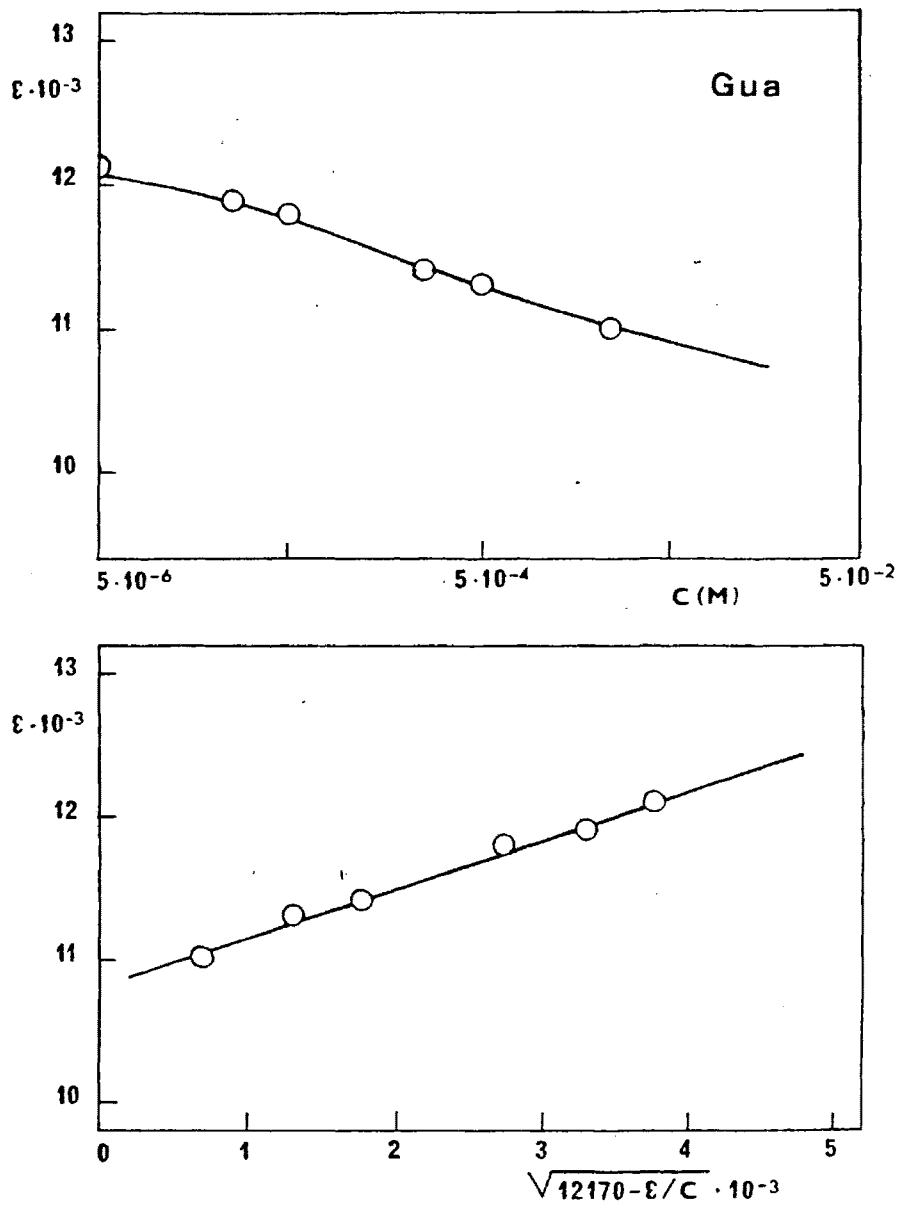


Fig. 1.2.- Hipocromicidad de Guanina (Gua) a 248 nm

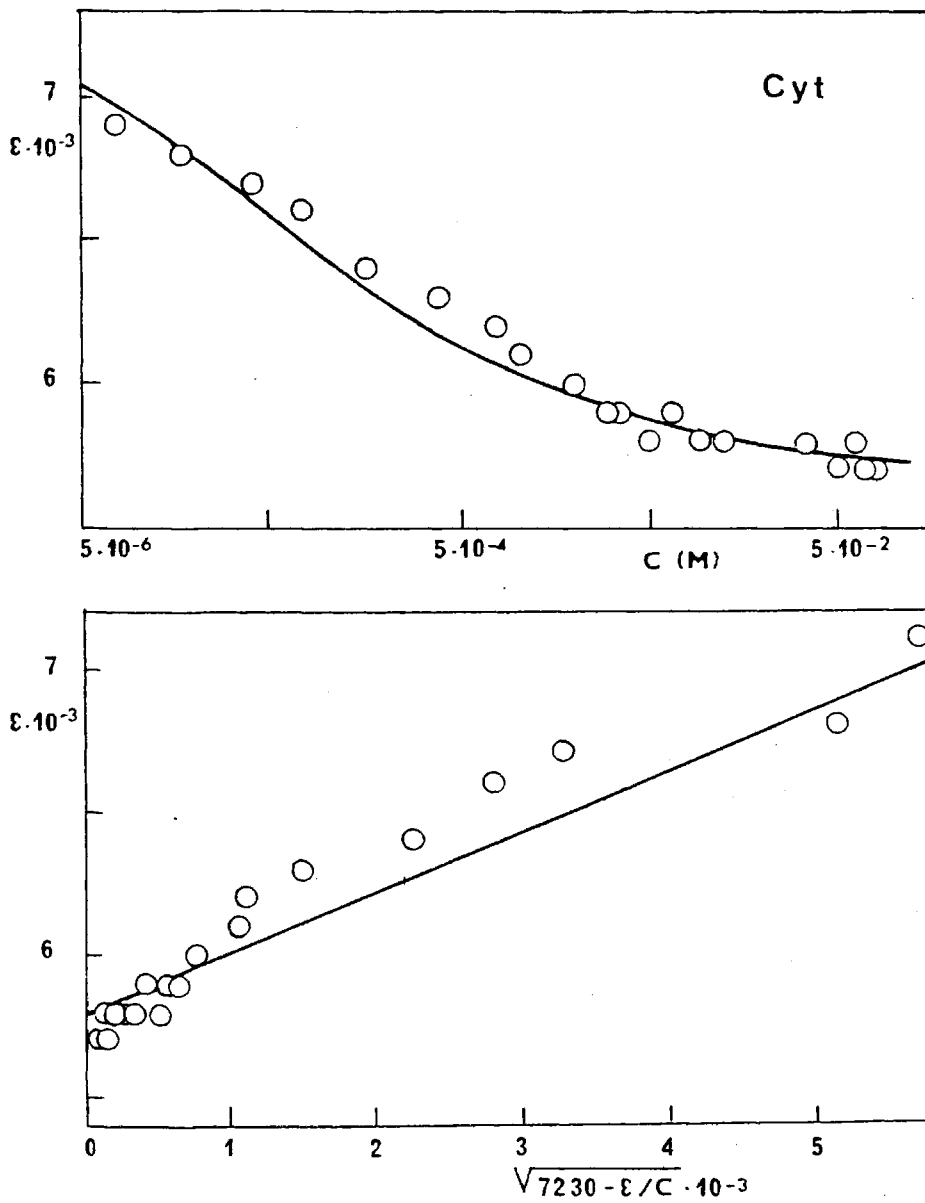


Fig. 1.3.- Hipocromicidad de Citosina (Cyt) a 267 nm

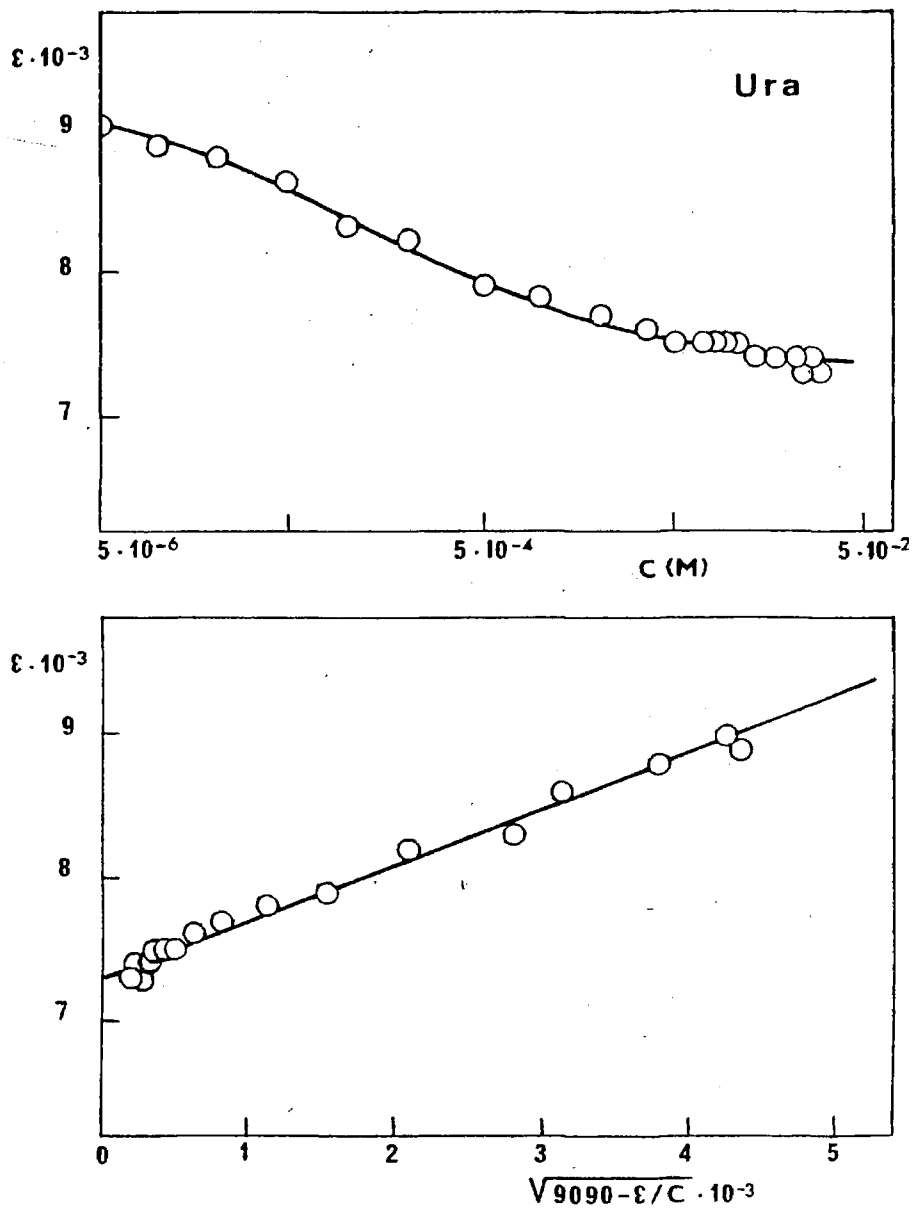


Fig. 1.4.- Hipocromicidad de Uracilo (Ura) a 259,5 nm

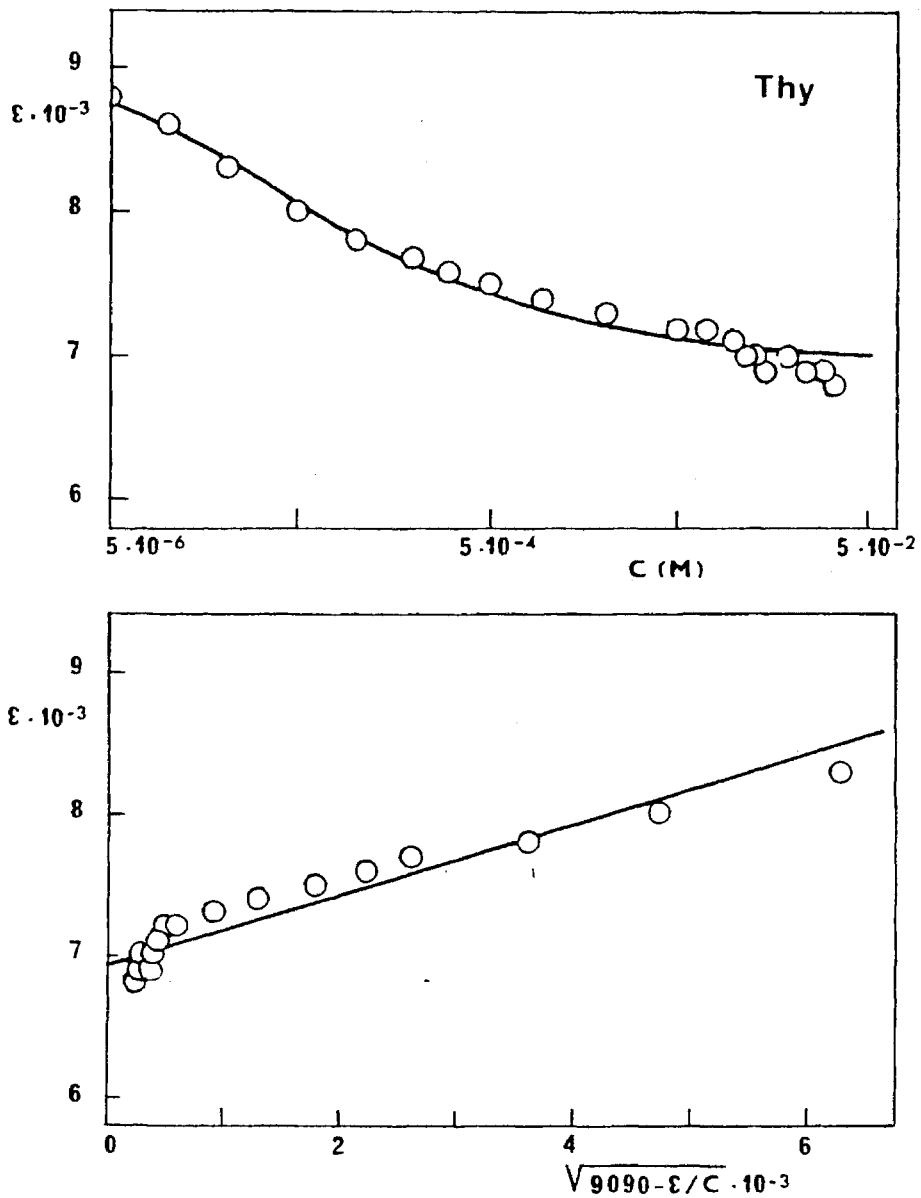


Fig. 1.5.- Hipocromicidad de Timina (Thy) a 264,5 nm

1.3.2. Nucleósidos

TABLA 1.2.

Resumen de los valores de los parámetros obtenidos con el programa de cálculo "HIPOCROM"

Compuesto	Intervalo de concentraciones	$\epsilon_1$	$\epsilon_\infty$	p	r
Adenosina	$5 \cdot 10^{-6}$ - $6 \cdot 10^{-3}$ M	15820	14000±40	0,24 ±0,01	0,985
"	$7 \cdot 10^{-3}$ - $4 \cdot 10^{-2}$ M	"	10400±200	6,8 ±0,4	0,980
d-Adenosina	$5 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-3}$ M	14970	12940±40	0,32 ±0,01	0,995
"	$6 \cdot 10^{-3}$ - $4 \cdot 10^{-2}$ M	"	10600±100	4,2 ±0,3	0,968
Guanosina	$2 \cdot 10^{-6}$ - $1,3 \cdot 10^{-3}$ M	14310	12910±50	0,059±0,008	0,882
"	$1,4 \cdot 10^{-3}$ - $3 \cdot 10^{-3}$ M	"	11100±300	1,2 ±0,3	0,909
Citidina	$10^{-6}$ - $3,5 \cdot 10^{-3}$ M	10410	9020±10	0,025±0,001	0,987
"	$5 \cdot 10^{-3}$ - $7 \cdot 10^{-2}$ M	"	7770±30	2,1 ±0,1	0,991
Uridina	$10^{-6}$ - $1,75 \cdot 10^{-2}$ M	12840	9700±20	0,061±0,002	0,992
"	$2 \cdot 10^{-2}$ - $7 \cdot 10^{-2}$ M	"	8200±200	3,1 ±0,5	0,943
Timidina	$5 \cdot 10^{-6}$ - $3,5 \cdot 10^{-2}$ M	10680	9110±20	0,170±0,005	0,994

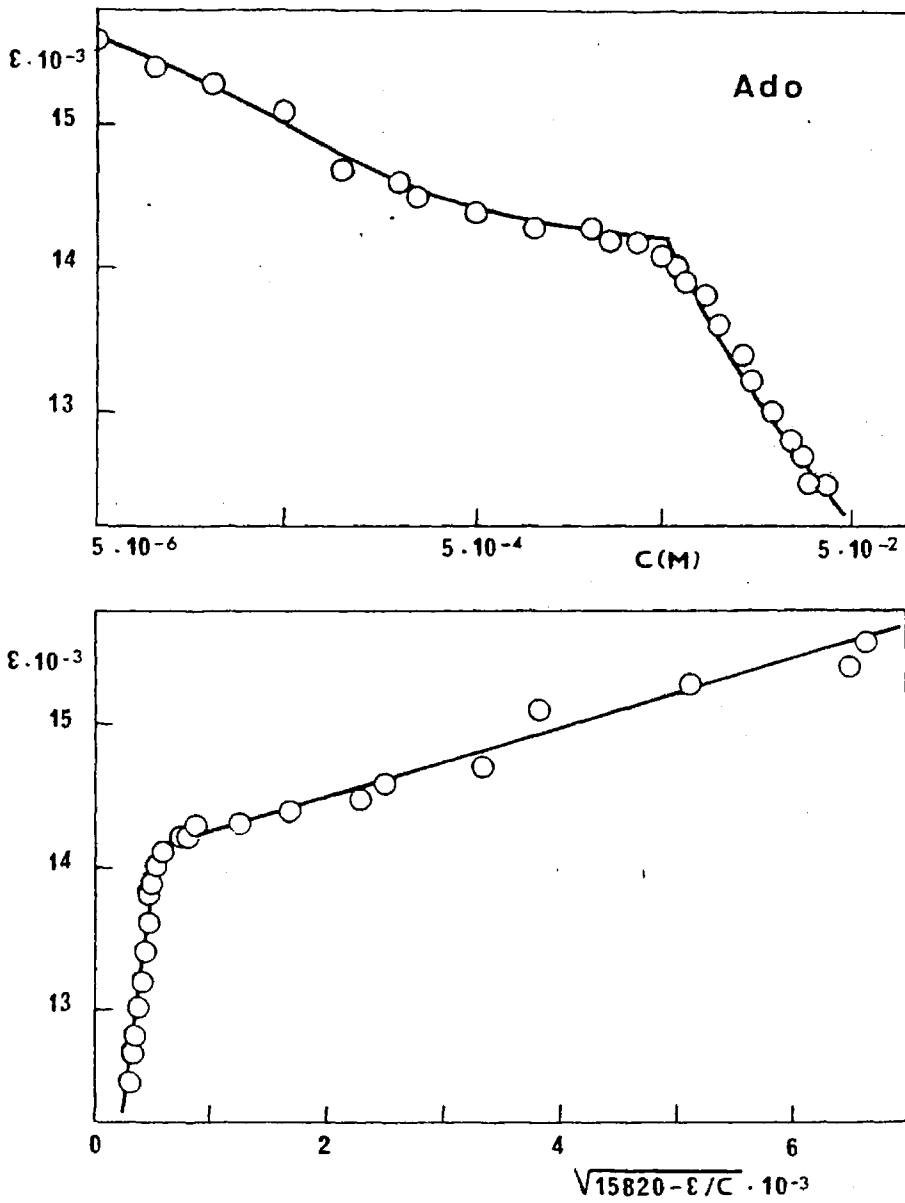


Fig. 1.6.- Hipocromicidad de Adenosina (Ado) a 259 nm

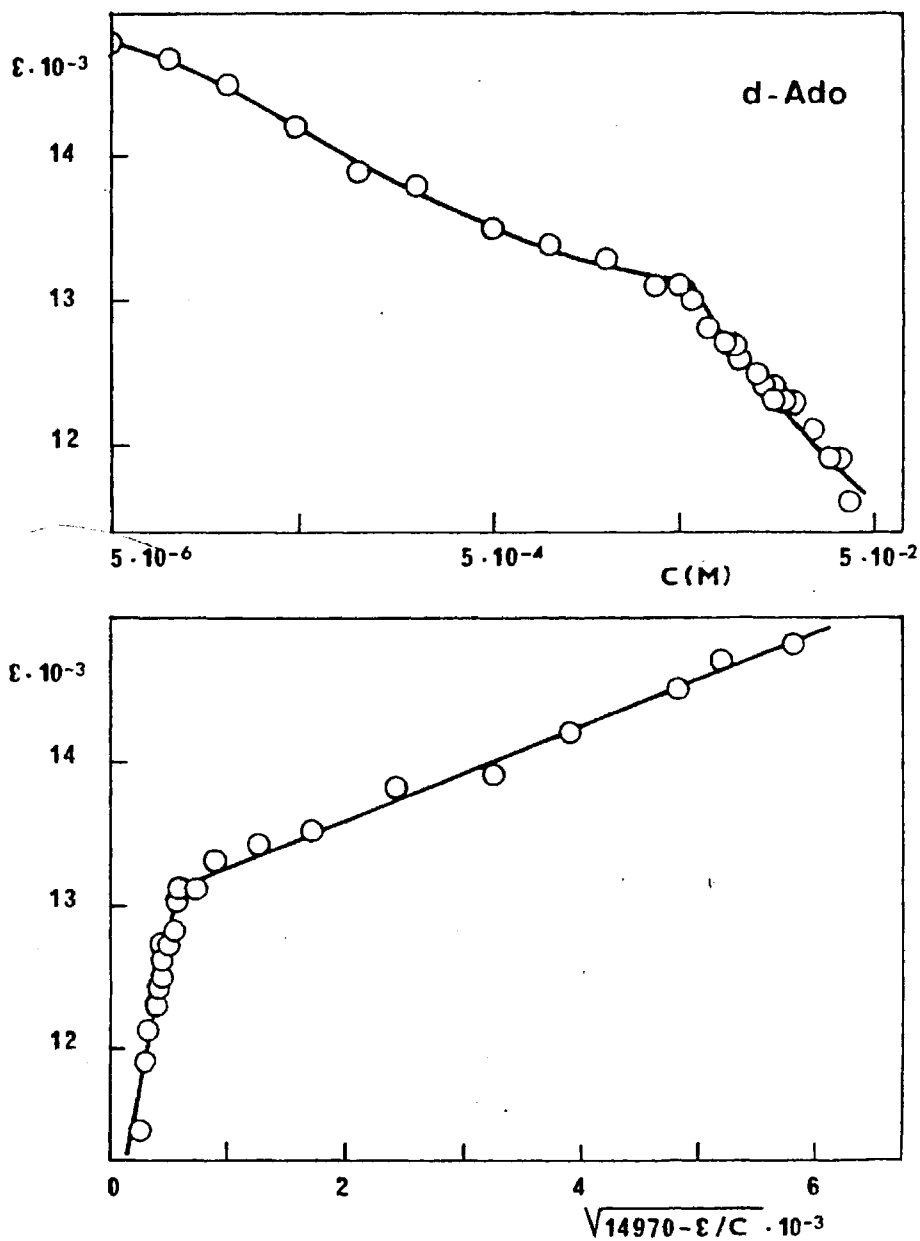


Fig. 1.7.- Hipocromicidad de Desoxiadenosina (d-Ado) a 259 nm

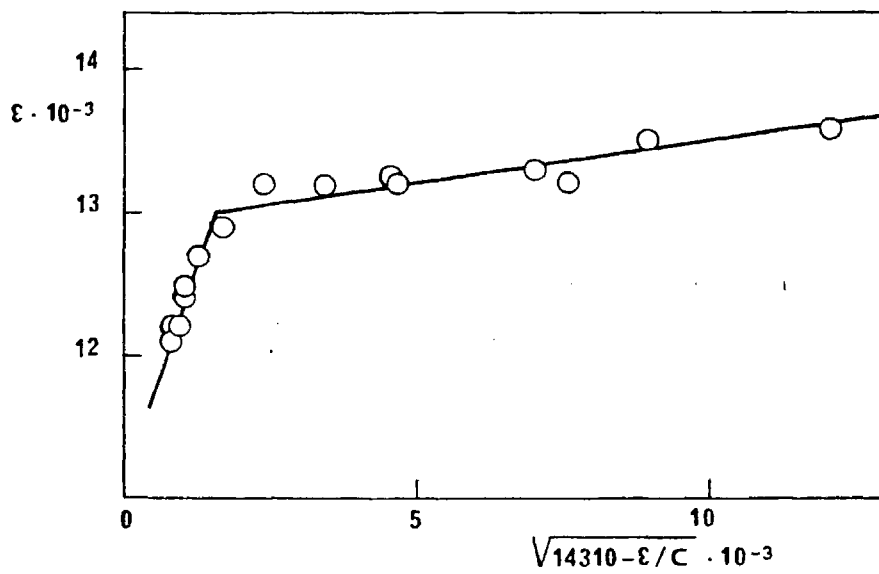
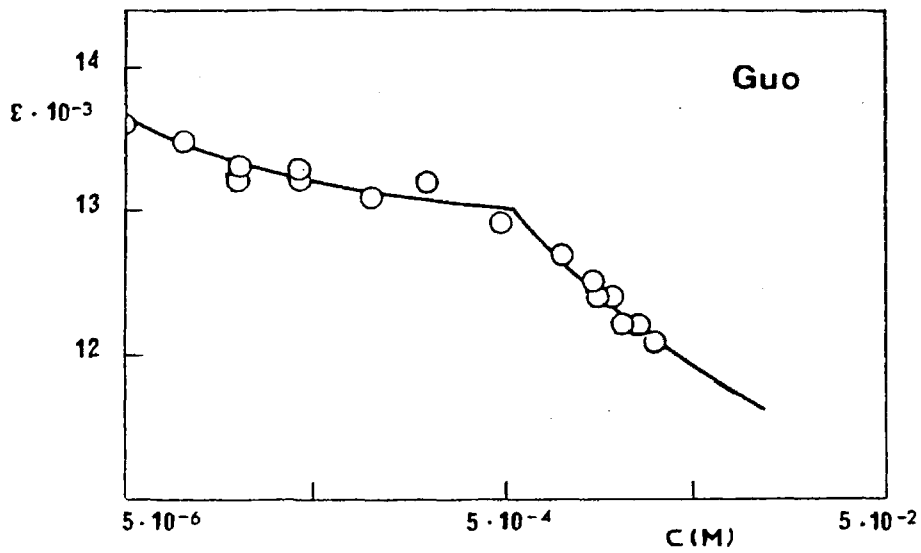


Fig. 1.8.- Hipocromicidad de Guanosina (Guo) a 253 nm

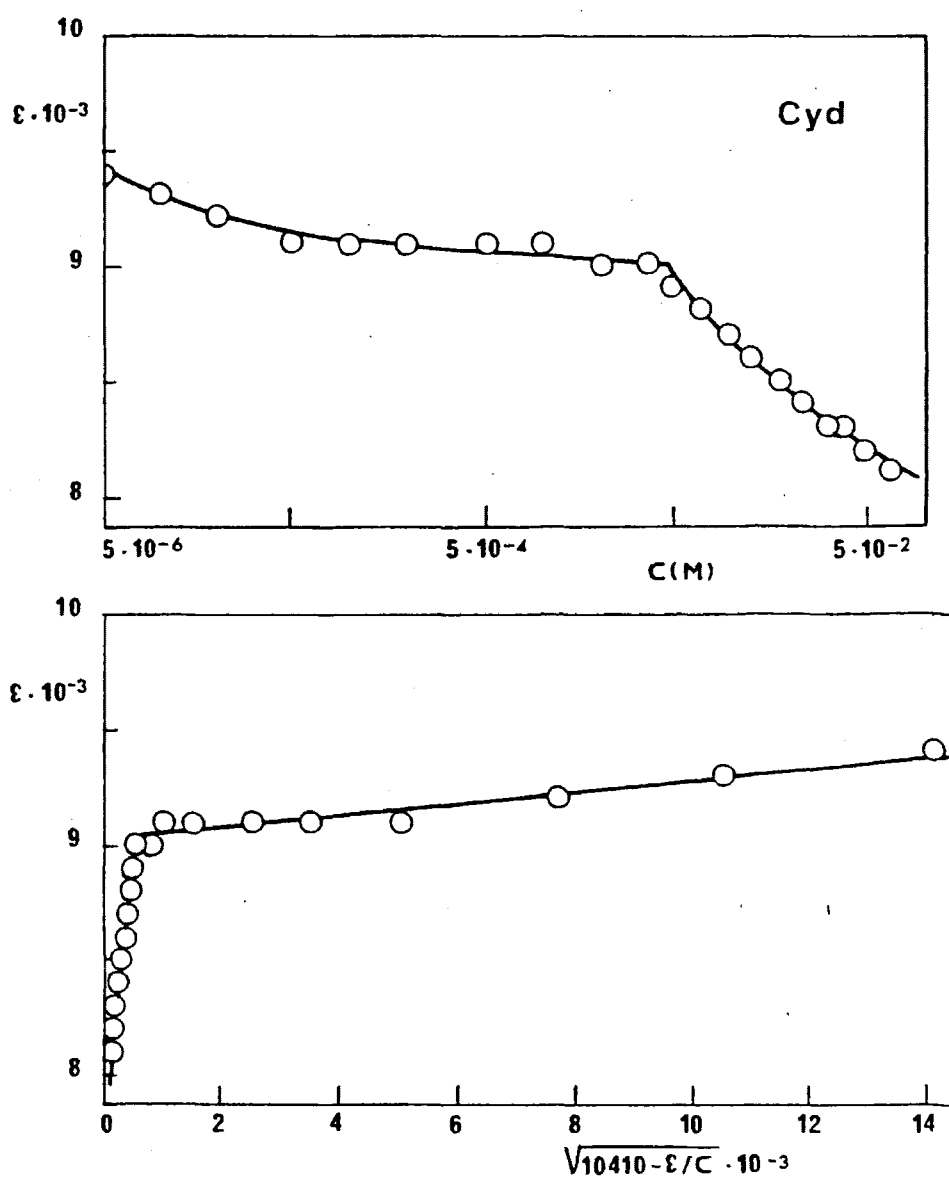


Fig. 1.9.- Hipocromicidad de Citidina (Cyd) a 271 nm

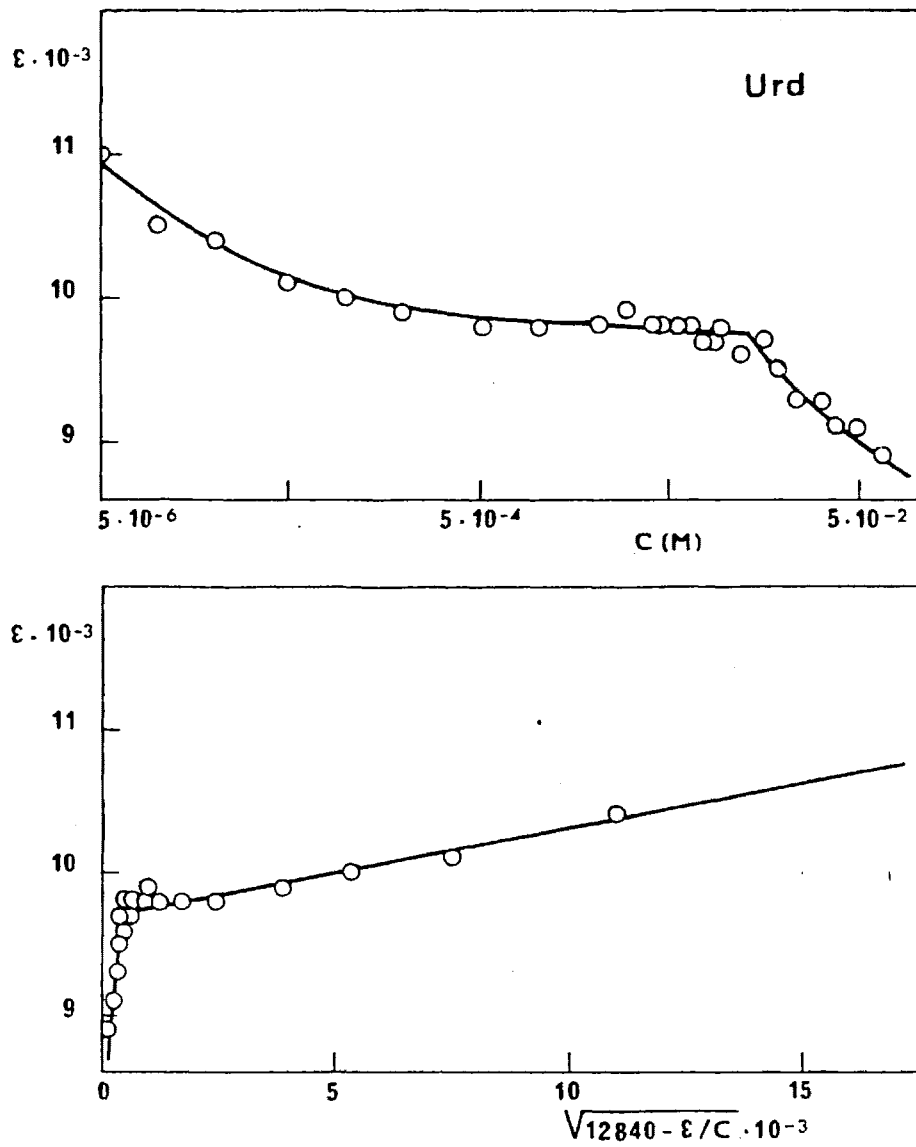


Fig. 1.10.- Hipocromicidad de Uridina (Urd) a 262 nm

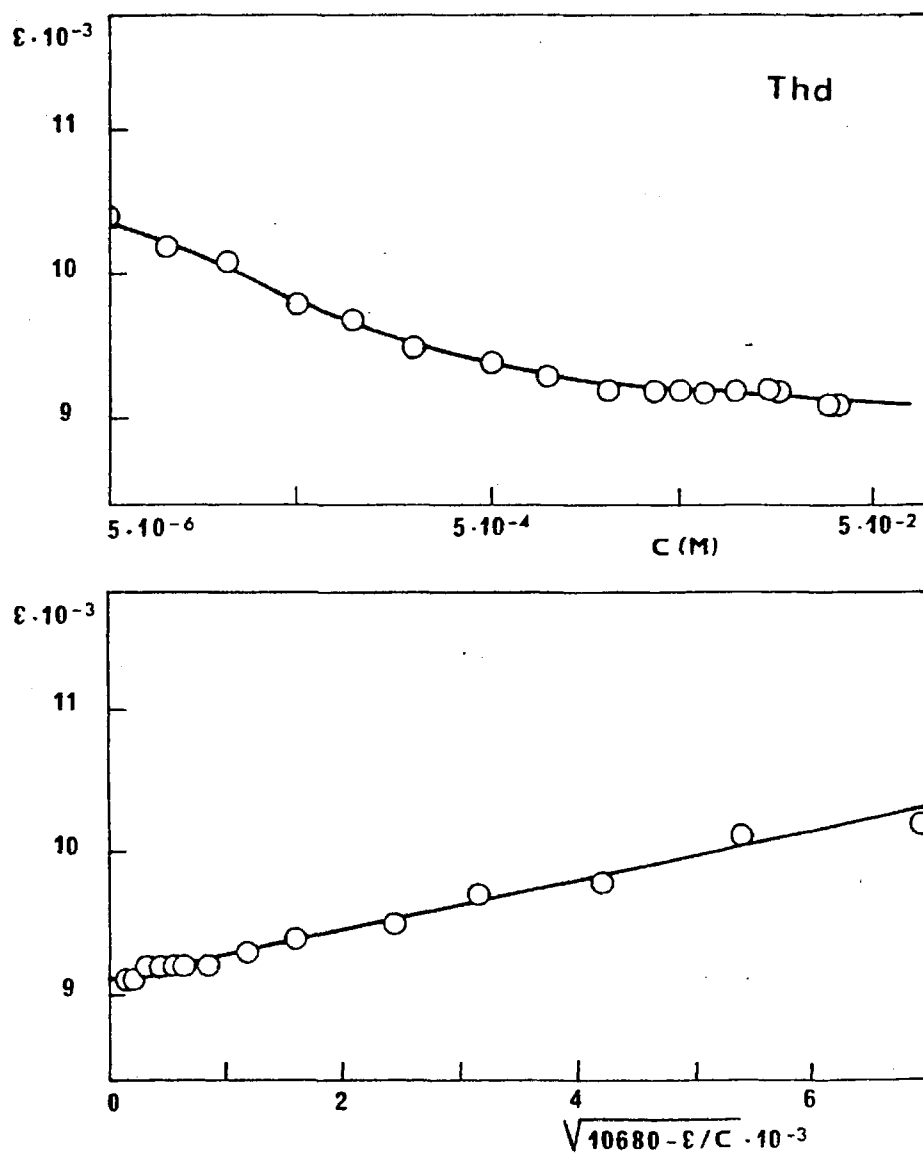


Fig. 1.11.- Hipocromicidad de Timidina (Thd) a 267 nm

1.3.3. Nucleótidos

TABLA 1.3.

Resumen de los valores de los parámetros obtenidos con el programa de cálculo "HIPOCROM"

Compuesto	Intervalo de concentraciones	$\epsilon_1$	$\epsilon_\infty$	p	r
5'-AMP	$10^{-6}$ - $4.10^{-3}$ M	16760	$13640 \pm 80$	$0,18 \pm 0,01$	0,972
"	$5.10^{-3}$ - $5.10^{-2}$ M	"	$11400 \pm 200$	$2,7 \pm 0,4$	0,901
5'-GMP	$2.10^{-6}$ - $3,6.10^{-3}$ M	15610	$13460 \pm 60$	$0,16 \pm 0,01$	0,962
"	$5.10^{-3}$ - $4.10^{-2}$ M	"	$11300 \pm 100$	$3,1 \pm 0,3$	0,950
5'-CMP	$6.10^{-6}$ - $4,5.10^{-2}$ M	9670	$8400 \pm 20$	$0,20 \pm 0,01$	0,965
5'-UMP	$5.10^{-6}$ - $2,5.10^{-3}$ M	12280	$9900 \pm 20$	$0,026 \pm 0,003$	0,933
"	$3,5.10^{-3}$ - $7.10^{-2}$ M	"	$8880 \pm 70$	$1,2 \pm 0,1$	0,934
5'-TMP	$10^{-6}$ - $2.10^{-2}$ M	9370	$7730 \pm 30$	$0,118 \pm 0,004$	0,989
"	$2,5.10^{-2}$ - $10^{-1}$ M	"	$6800 \pm 100$	$3,8 \pm 0,5$	0,945

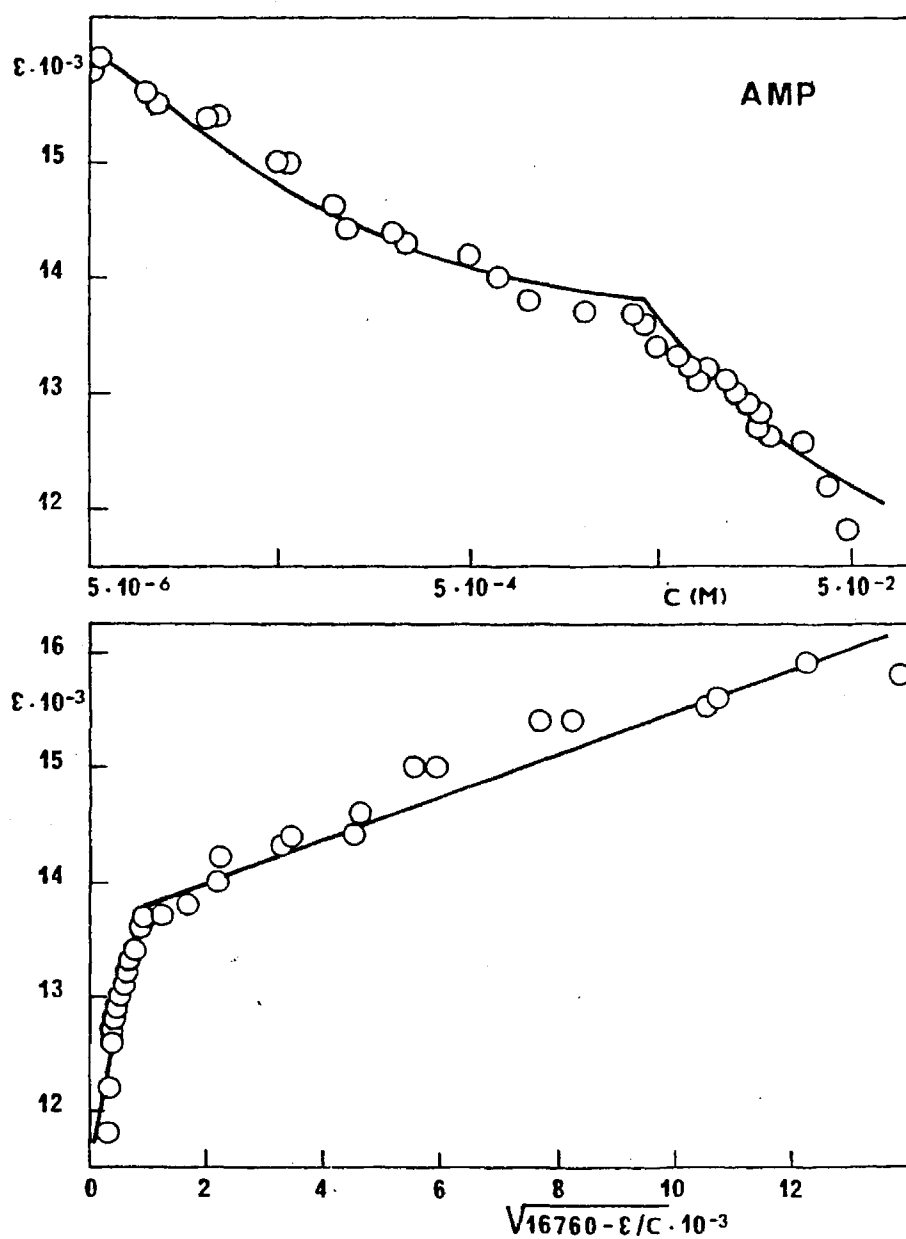


Fig. 1.12.- Hipocromicidad de 5'-AMP a 259 nm

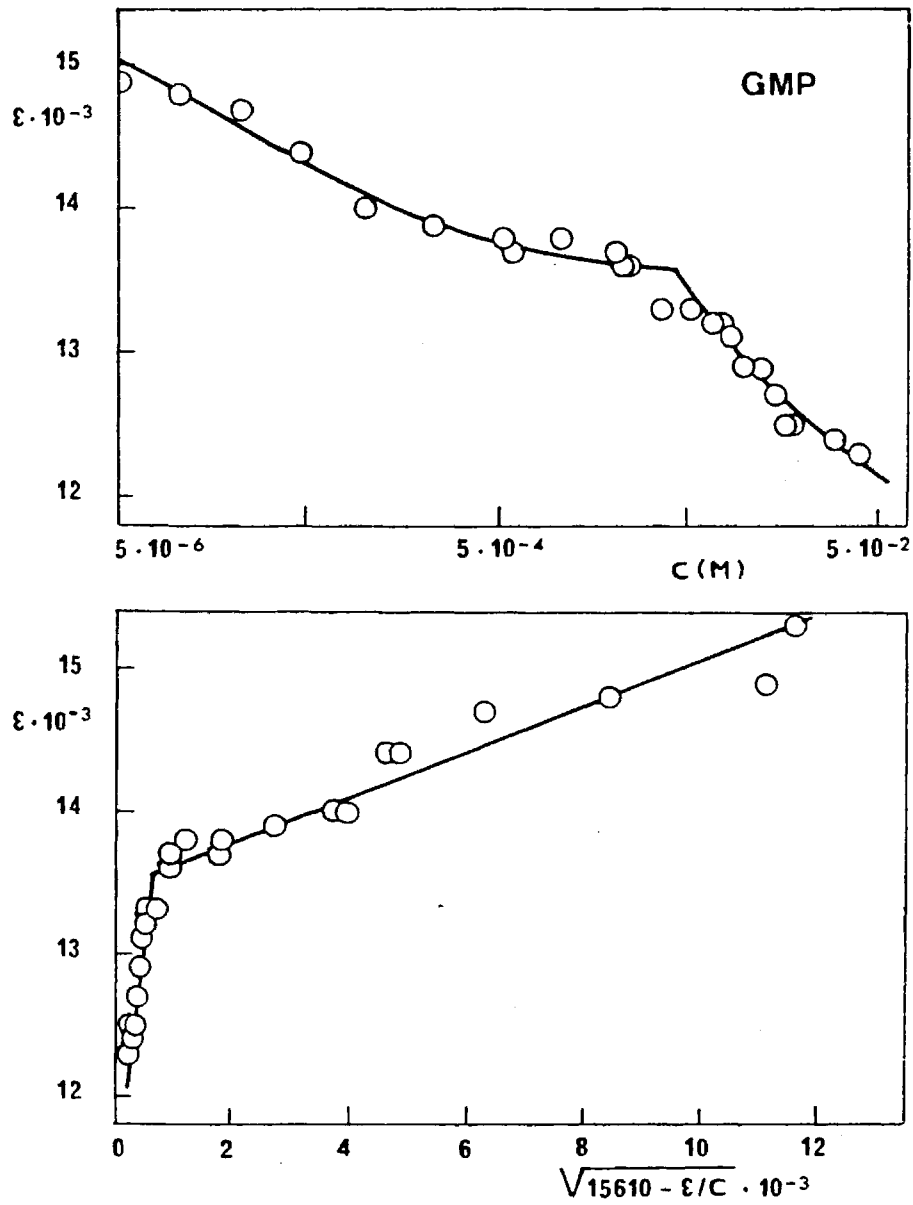


Fig. 1.13.- Hipocromicidad de 5'-GMP a 252 nm

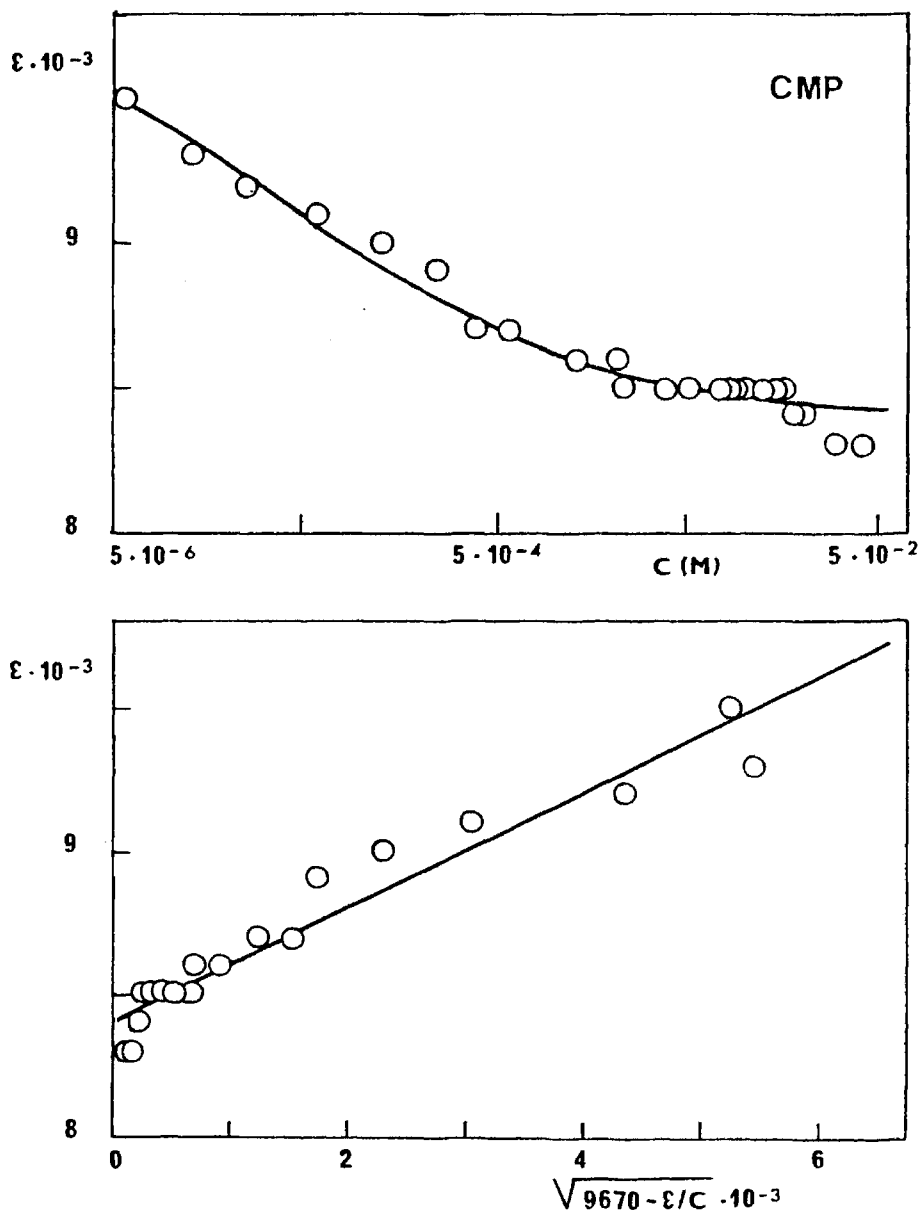


Fig. 1.14.- Hipocromicidad de 5'-CMP a 271 nm

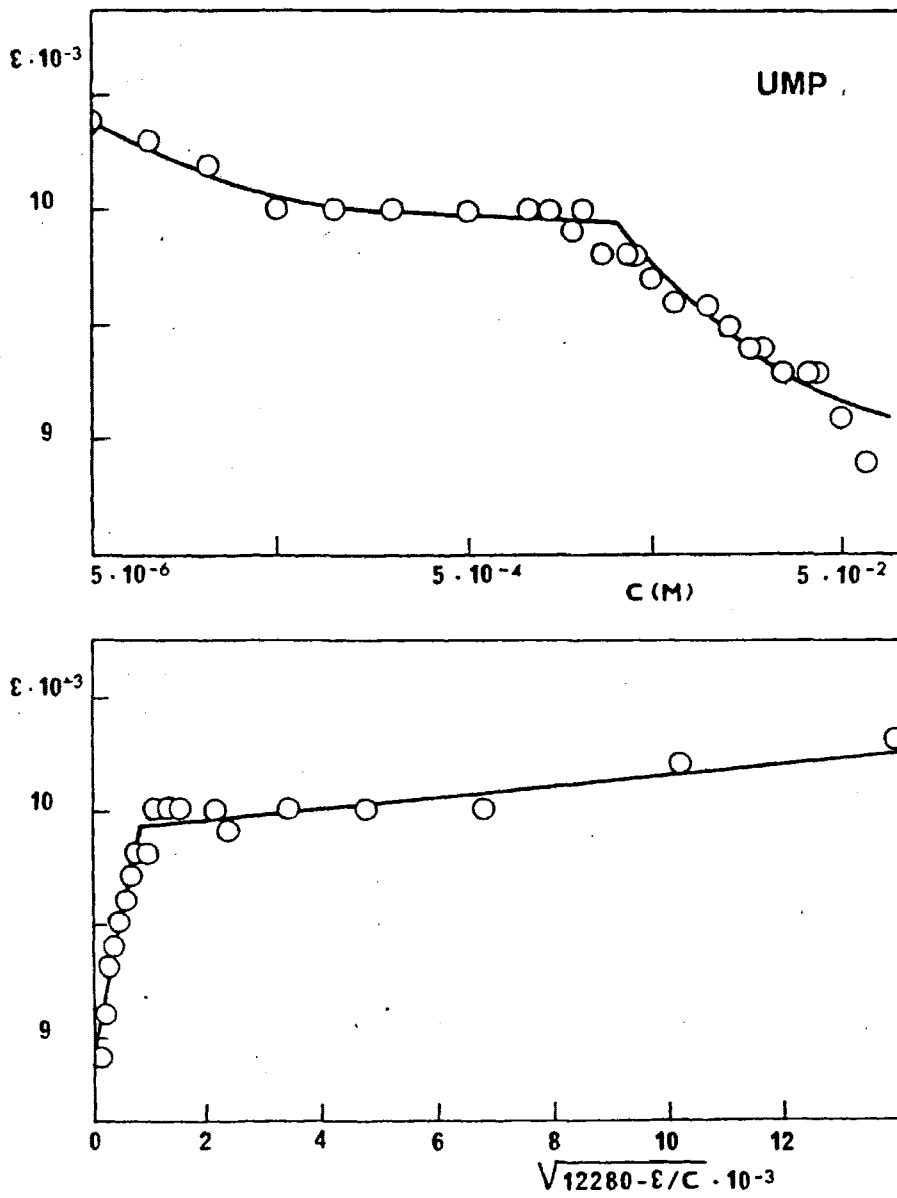


Fig. 1.15.- Hipocromicidad de 5'-UMP a 262 nm

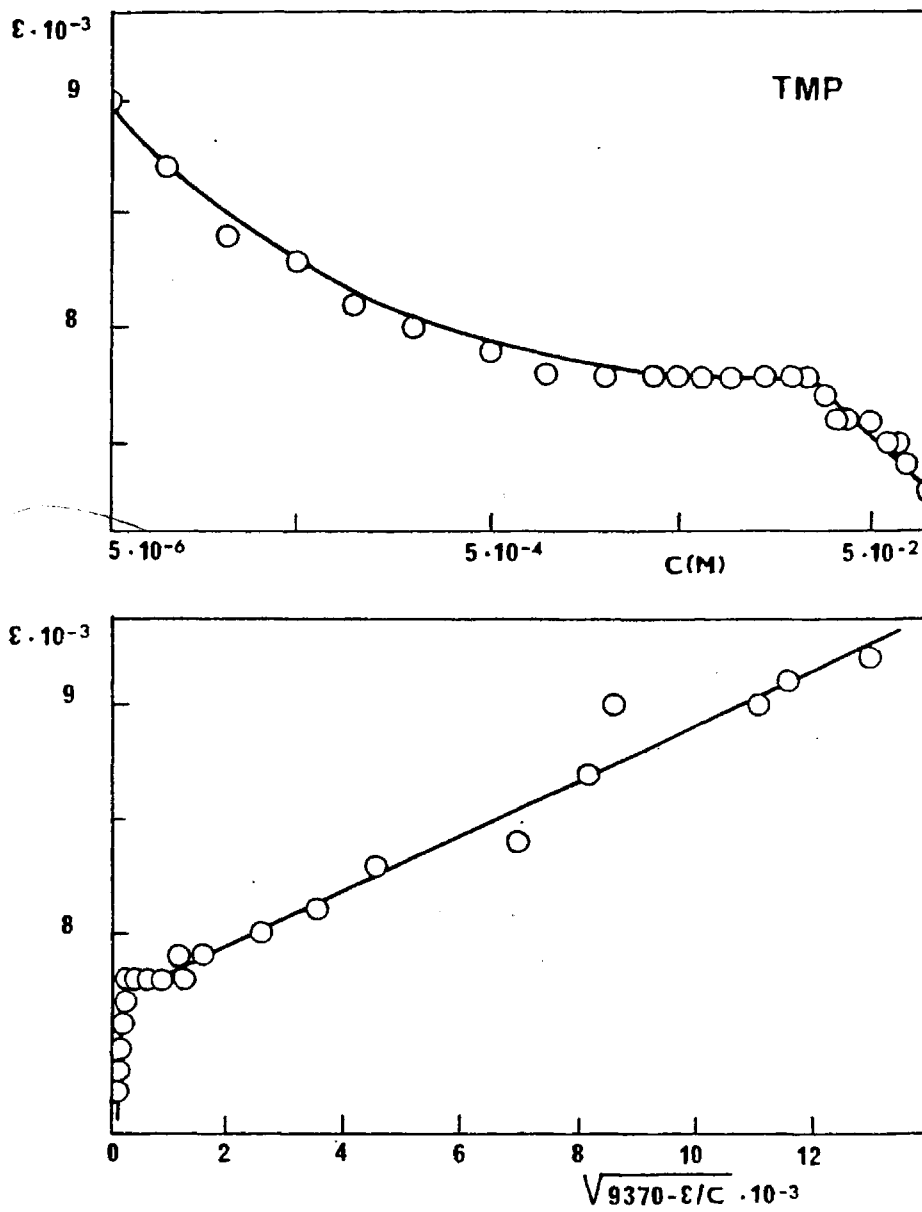


Fig. 1.16.- Hipocromicidad de 5'-TMP a 267 nm

TABLA 1.4.

Parámetros de autoasociación en tampón fosfato

Compuesto	1 <sup>er</sup> efecto			2 <sup>o</sup> efecto		
	$K_2$	$\delta_2$	h(%)	$K_p$	$\delta_p$	h(%)
BASES						
Adenina	$12 \cdot 10^3$	2190	15,4	220	5700	40,1
Guanina	$2 \cdot 10^3$	1370	11,3	No detectado		
Citosina	$16 \cdot 10^3$	1440	19,9	"		
Uracilo	$5,8 \cdot 10^3$	1790	19,7	"		
Timina	$19 \cdot 10^3$	2140	23,5	"		
NUCLEOSIDOS						
Adenosina	$16 \cdot 10^3$	1820	11,5	120	5400	34,1
Desoxiadenosina	$9,9 \cdot 10^3$	2030	13,6	250	4400	29,4
Guanosina	$200 \cdot 10^3$	1400	9,8	2000	3200	22,4
Citidina	$1100 \cdot 10^3$	1390	13,3	570	2640	25,4
Uridina	$420 \cdot 10^3$	3140	24,4	500	4640	36,1
Timidina	$27 \cdot 10^3$	1570	14,7	No detectado		
NUCLEOTIDOS						
5'-AMP	$48 \cdot 10^3$	3120	18,6	700	5400	32,0
5'-GMP	$42 \cdot 10^3$	2150	13,8	400	4300	27,6
5'-CMP	$16 \cdot 10^3$	1270	13,1	No detectado		
5'-UMP	$2000 \cdot 10^3$	2380	19,4	2400	3400	27,7
5'-TMP	$59 \cdot 10^3$	1640	17,5	180	2550	27,2

#### 1.4. INTERPRETACION DE RESULTADOS

Para la interpretación de resultados, utilizaremos los valores que se resumen en la tabla 1.4., refiriéndonos especialmente a los valores de las constantes de asociación del 1° y 2° efecto.

Como complemento de estos parámetros de asociación, hemos calculado las distancias entre bases y las energías de interacción correspondientes a cada sistema, a partir de los valores reseñados en las tablas 1.1.-1.4.. Estos tres conjuntos de valores se utilizan a continuación para hacer una discusión conjunta del complejo fenómeno de este tipo de interacciones.

Consideramos necesario subrayar que los valores de las distancias entre bases y las energías de interacción, tienen las limitaciones inherentes a las simplificaciones implícitas en las teorías en que se basan las ecuaciones finales utilizadas para su cálculo.

Damos a continuación, en primer lugar, el fundamento del cálculo de las distancias entre bases y de las energías de interacción, así como los valores obtenidos, que se resumen en las tablas 1.5.-1.9..

##### Distancia entre bases apiladas

El hipocromismo UV que presentan los polinucleótidos respecto de sus monómeros libres, puede explicarse según dos teorías complementarias entre sí (13): la de Tinoco-Rhodes (14-16), que es una aplicación de la teoría del excitón, y la de Bolton-Weiss (17), que interpreta el hipocromismo como un efecto de resonancia. Aplicando las ecuaciones de ambas teorías al hipocromismo que acompaña a la autoasociación de las unidades monoméricas libres en disolución, se ha estimado la distancia a que se encuentran las bases consecutivas en el modelo

de apilamiento propuesto en nuestro laboratorio (2).

1) Cálculos mediante la teoría de Tinoco-Rhodes.

En esta teoría se atribuye el hipocromismo del polímero a la disposición paralela que en él adoptan los momentos de transición. Suponiendo que entre los cromóforos existe solamente interacción dipolo-dipolo, se obtiene una ecuación que relaciona la absorción del polímero con la del monómero (14). Esta ecuación puede particularizarse para nuestro modelo de apilamiento, considerando que los cromóforos son paralelos y, como las bandas de absorción de monómero y polímero tienen aproximadamente, la misma anchura media, la relación entre las fuerzas de oscilador de dichas bandas puede sustituirse por la relación entre las absorktividades molares en los correspondientes máximos. De acuerdo con ello, las ecuaciones que se obtienen son:

a) Supuesto dímero:

$$0,01 h = \frac{4,28 \cdot 10^{-6} \lambda_{0a}^2 \lambda_{0a'}^2 f_{0a'}}{(\lambda_{0a}^2 - \lambda_{0a'}^2) d^3} \quad |9|$$

b) Supuesto polímero:

$$0,01 h = \frac{10,25 \cdot 10^{-6} \lambda_{0a}^2 \lambda_{0a'}^2 f_{0a'}}{(\lambda_{0a}^2 - \lambda_{0a'}^2) d^3} \quad |10|$$

siendo  $h$  la hipocromicidad en tanto por ciento,  $\lambda_{0a}$  y  $\lambda_{0a'}$  las respectivas longitudes de onda, en Å, de los máximos de absorción del monómero en las bandas 0a (que aparece a ~260 nm) y 0a' (que corresponde a la otra transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  de las bases, y aparece a unos 200 nm),  $f_{0a}$  la fuerza de oscilador para el cromóforo monomérico en la banda 0a' y  $d$  la distancia, en Å, entre los cromóforos.

De acuerdo con las hipótesis establecidas para el método

de cálculo de los parámetros de autoasociación, la ecuación [9] puede aplicarse al 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico, y la ecuación [10], al 2<sup>o</sup> efecto hipocrómico. Como valores de  $h$  se toman los correspondientes a la banda a 260 nm, determinados a partir de los resultados de dicho método de cálculo (tabla 1.4.). Se supone que  $f_{0a} \approx f_{0a}$ . Los valores de  $f_{0a}$  se han obtenido de la bibliografía (14) en el caso de los nucleósidos, y para las restantes unidades monoméricas se han calculado a partir de aquéllos, suponiendo que las fuerzas de oscilador son proporcionales a los valores de  $\epsilon_1$ .

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 1.5..

TABLA 1.5.

Distancia entre bases apiladas (Teoría de Tinoco-Rhodes)

Compuesto	Grado de asociación	h(%)	$\lambda_{0a}$ (Å)	$\lambda_{0a}$ (Å)	$f_{0a}$	d(Å)
BASES						
Adenina	Dímero	15,4	2605	2070	0,27	4,4
"	Polímero	40,1	"	"	"	4,3
Guanina	Dímero	11,3	2480	2050	0,34	5,5
Citosina	Dímero	19,9	2670	2090	0,12	3,1
Uracilo	Dímero	19,7	2595	2025	0,18	3,4
Timina	Dímero	23,5	2645	2050	0,18	3,3

TABLA 1.5. (continuación)

Compuesto	Grado de asociación	h(%)	$\lambda_{0a}$ (Å)	$\lambda_{0a'}$ (Å)	$f_{0a'}$	d(Å)
NUCLEOSIDOS						
Adenosina	Dímero	11,5	2590	2060	0,30	5,0
"	Polímero	34,1	"	"	"	4,7
Desoxiadenosina	Dímero	13,6	2590	2060	0,28	4,7
"	Polímero	29,4	"	"	"	4,8
Guanosina	Dímero	9,8	2530	2050	0,40	6,0
"	Polímero	22,4	"	"	"	6,1
Citidina	Dímero	13,3	2710	2120	0,17	4,0
"	Polímero	25,4	"	"	"	4,3
Uridina	Dímero	24,4	2620	2050	0,25	3,7
"	Polímero	36,1	"	"	"	4,2
Timidina	Dímero	14,7	2670	2065	0,21	4,0
NUCLEOTIDOS						
AMP	Dímero	18,6	2590	2060	0,31	4,3
"	Polímero	32,0	"	"	"	4,9
GMP	Dímero	13,8	2520	2050	0,44	5,5
"	Polímero	27,6	"	"	"	5,9
CMP	Dímero	13,1	2710	2120	0,16	3,9
UMP	Dímero	19,4	2620	2050	0,24	3,9
"	Polímero	27,7	"	"	"	4,6
TMP	Dímero	17,5	2670	2065	0,18	3,6
"	Polímero	27,2	"	"	"	4,2

## 2) Cálculos mediante la teoría de Bolton-Weiss.

Este modelo considera que el efecto hipocrómico observado en el polímero, se debe a la interacción entre los momentos de transición correspondientes a los monómeros que lo constituyen. Esta interacción se da, con mayor o menor intensidad, en todas las orientaciones relativas de los momentos de transición. Aplicando las ecuaciones establecidas por estos autores a nuestro modelo de apilamiento (2), se llega a las siguientes expresiones:

a) Supuesto dímero:

$$d = \sqrt[6]{\frac{4,11 \cdot 10^3 \epsilon_{\infty} f^2}{\delta_2}} \quad |11|$$

b) Supuesto polímero:

$$d = \sqrt[6]{\frac{23,75 \cdot 10^3 \epsilon_{\infty} f^2}{\delta_p}} \quad |12|$$

donde  $\underline{d}$  es la separación, en Å, entre bases,  $\underline{f}$  es la fuerza de oscilador de la banda considerada y los demás parámetros,  $\epsilon_{\infty}$ ,  $\delta_2$  y  $\delta_p$ , se determinan mediante nuestro método de cálculo, como se indicó en el lugar correspondiente.

Estas ecuaciones pueden aplicarse, respectivamente, al 1° efecto hipocrómico y al 2° efecto hipocrómico. Los resultados se recogen en la tabla 1.6. Es de destacar que los valores de  $\underline{d}$  obtenidos con este método están más próximos al valor de 3,4 Å, correspondiente a la distancia entre las bases en la doble hélice del DNA, que los calculados según el modelo de Tinoco-Rhodes.

TABLA 1.6.

Distancia entre bases apiladas (Teoría de Bolton-Weiss)

Compuesto	Grado de asociación	$\lambda$ (Å)	f	$\epsilon_{\infty}$	$\delta$	d (Å)
BASES						
Adenina	Dímero	2605	0,27	12010	2190	3,4
"	Polímero	"	"	8500	5700	3,7
Guanina	Dímero	2480	0,34	10800	1370	3,9
Citosina	Dímero	2670	0,12	5790	1440	2,5
Uracilo	Dímero	2595	0,18	7300	1790	2,9
Timina	Dímero	2645	0,18	6950	2140	2,8
NUCLEOSIDOS						
Adenosina	Dímero	2590	0,30	14000	1820	3,8
"	Polímero	"	"	10400	5400	4,0
Desoxiadenosina	Dímero	2590	0,28	12940	2030	3,6
"	Polímero	"	"	10600	4400	4,1
Guanosina	Dímero	2530	0,40	12910	1400	4,3
"	Polímero	"	"	11080	3200	4,9
Citidina	Dímero	2710	0,17	9020	1390	3,0
"	Polímero	"	"	7770	2640	3,6
Uridina	Dímero	2620	0,25	9700	3140	3,0
"	Polímero	"	"	8200	4640	3,7
Timidina	Dímero	2670	0,21	9110	1570	3,2

TABLA 1.6. (continuación)

Compuesto	Grado de asociación	$\lambda$ (Å)	f	$\epsilon_{\infty}$	$\delta$	d (Å)
NUCLEOTIDOS						
AMP	Dímero	2590	0,31	13640	3120	3,5
"	Polímero	"	"	11400	5400	4,1
GMP	Dímero	2520	0,44	13460	2150	4,1
"	Polímero	"	"	11300	4300	4,8
CMP	Dímero	2710	0,16	8400	1270	3,0
UMP	Dímero	2620	0,24	9900	2380	3,1
"	Polímero	"	"	8880	3400	3,9
TMP	Dímero	2670	0,18	7730	1640	2,9
"	Polímero	"	"	6820	2550	3,6

Energía de interacción

La energía libre de interacción para la formación de una estructura polimérica por apilamiento de las unidades monoméricas en disolución acuosa, depende de dos contribuciones principales: la interacción base-base y las interacciones hidrofóbicas.

La expresión  $\Delta G_{\text{exp}} = -RT \ln K$  permite obtener la energía libre global de la interacción a partir de los valores de la constante de asociación  $K$ , determinados según nuestro método de cálculo. Por otra parte, las contribuciones del medio y de los grupos ribosa y fosfato, en su caso, se incluyen en un término de "otras interacciones" ( $\Delta G_{\text{otr.int.}}$ ). En las "contribuciones del medio" se incluyen, fundamentalmente, las interacciones hidrofóbicas. Teniendo en cuenta la contri-

bución que representa la energía de interacción directa entre las bases ( $\Delta G_{\text{base-base}}$ ), puede escribirse (2):

$$\Delta G_{\text{exp}} = \Delta G_{\text{base-base}} + \Delta G_{\text{otr.int.}} \quad |13|$$

Utilizando la aproximación de dipolo para el tratamiento teórico del hipocromismo (18), y teniendo en cuenta las condiciones geométricas que impone el modelo de apilamiento propuesto en nuestro laboratorio, se ha calculado el término  $\Delta G_{\text{base-base}}$  (2). Si las bases no están ionizadas, este término puede descomponerse en otros tres: la interacción dipolo-dipolo ( $\Delta G_{\mu\mu}$ ), la interacción dipolo-dipolo inducido ( $\Delta G_{\mu\alpha}$ ) y la interacción de dispersión de London ( $\Delta G_L$ ):

$$\Delta G_{\text{base-base}} = \Delta G_{\mu\mu} + \Delta G_{\mu\alpha} + \Delta G_L \quad |14|$$

Las ecuaciones finales a que se llega para estos términos, expresados en kcal/mol, se resumen en la siguiente tabla:

TABLA 1.7.

Término	Dímero	Polímero
$\Delta G_{\mu\mu}$	$-\frac{7,23\mu^2}{d^3}$	$-\frac{12,95\mu^2}{d^3}$
$\Delta G_{\mu\alpha}$	$-\frac{8,67\alpha\mu^2}{d^6}$	$-\frac{17,59\alpha\mu^2}{d^6}$
$\Delta G_L$	$-\frac{0,270I\alpha^2}{d^6}$	$-\frac{0,549I\alpha^2}{d^6}$

siendo  $\mu$  el momento dipolar en Debyes,  $\alpha$  la polarizabilidad, en  $\text{\AA}^3$ ,  $I$  la energía de ionización, en kcal/mol, y  $d$  la distancia entre bases, en  $\text{\AA}$ , calculada por nosotros a partir de los parámetros de autoasociación, como se ha indicado anteriormente.

Estas ecuaciones permiten evaluar la contribución de las bases a la energía libre de apilamiento, en los sistemas estudiados por nosotros. Los valores de  $\mu$ ,  $\alpha$  e  $I$ , utilizados como datos en el cálculo de  $\Delta G_{\text{base-base}}$ , se han tomado de la bibliografía y se resumen en la tabla 1.8.

TABLA 1.8.

Valores de  $\mu$ ,  $\alpha$  e  $I$  de bases de ácidos nucleicos

BASE	$\mu$ (D)	$\alpha$ (Å <sup>3</sup> )	$I$ (kcal/mol)
Adenina	2,6 <sup>a</sup>	14 <sup>b</sup>	205 <sup>b</sup>
Guanina	6,6 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	205 <sup>b</sup>
Citosina	7,0 <sup>b</sup>	14 <sup>b</sup>	191 <sup>c</sup>
Uracilo	4,0 <sup>d</sup>	11 <sup>b</sup>	217 <sup>b</sup>
Timina	3,3 <sup>e</sup>	11 <sup>b</sup>	226 <sup>b</sup>

a) Clementi, E. et al, Acta Phys., 27, 493(1969).

b) Ref. (6), págs. 467-468.

c) Fraga, E. y Fraga, S., "Biomoléculas". Ed. Alhambra, Madrid (1976), pág. 52.

d) Mamet, P., et al, Gr. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris C, 264, 2081 (1967).

e) Geller, M., et al, Biochim. Biophys. Acta, 287, 1(1972).

Los valores de  $\bar{d}$  que intervienen en las ecuaciones precedentes se han calculado como media aritmética de los que figuran en las tablas 1.5. y 1.6..

El término  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$  se calcula por diferencia entre el

valor de  $\Delta G_{\text{exp}}$  determinado a partir de la constante de asociación, y la contribución  $\Delta G_{\text{base-base}}$ . Los resultados obtenidos para la energía de interacción en diferentes compuestos se resumen en las tablas 1.9.-1.11. y en las figuras 1.17. y 1.18..

La interpretación de los resultados experimentales se realiza a continuación de acuerdo con el siguiente esquema: 1) Efecto de la ribosa o desoxiribosa; 2) Efecto del grupo fosfato; 3) Influencia del tipo de base; 4) Influencia del grado de asociación. Dentro de cada uno de estos apartados, se estudian por separado las diferentes unidades monoméricas, considerando independientemente el 1° y el 2° efecto hipocrómico.

Esta interpretación se orienta hacia el objetivo fundamental de tratar de esclarecer la naturaleza de las fuerzas intermoleculares que se ponen en juego en la interacción de las unidades monoméricas de los ácidos nucleicos, en disolución acuosa. Por ello, y de acuerdo con las ideas generales expuestas en la introducción de este capítulo, nos referimos concretamente a los mecanismos de asociación por formación de enlace de hidrógeno y por apilamiento, y a la contribución de las interacciones hidrofóbicas.

TABLA 1.9.

Energía libre de apilamiento (kcal/mol)

BASES

Compuesto	Grado de asociación	$\bar{d}$ (Å)	$\Delta G_{\mu\mu}$	$\Delta G_{\mu\alpha}$	$\Delta G_L$	$\Delta G_{\text{base-base}}$	$\Delta G_{\text{exp}}$	$\Delta G_{\text{otr.int.}}$
Adenina	Dímero	3,9	-0,82	-0,23	-3,08	- 4,1	-5,6	- 1,4
"	Polímero	4,0	-1,37	-0,41	-5,39	- 7,2	-3,2	+ 4,0
Guanina	Dímero	4,7	-3,41	-0,55	-0,58	- 4,5	-4,5	0,0
Citosina	Dímero	2,8	-14,3	-8,62	-13,9	-36,9	-5,7	+31,2
Uracilo	Dímero	3,1	-2,64	-1,17	-8,32	-12,1	-5,1	+ 7,0
Timina	Dímero	3,0	-4,28	-2,09	-9,72	-16,1	-5,8	+10,3

TABLA 1.10.

Energía libre de apilamiento (kcal/mol)

NUCLEOSIDOS

Compuesto	Grado de asociación	$\bar{d}$ (Å)	$\Delta G_{\mu\mu}$	$\Delta G_{\mu\alpha}$	$\Delta G_L$	$\Delta G_{\text{base-base}}$	$\Delta G_{\text{exp}}$	$\Delta G_{\text{otr.int.}}$
Adenosina	Dímero	4,4	-0,57	-0,11	-1,50	- 2,2	-5,7	- 3,5
"	Polímero	4,3	-1,10	-0,26	-3,49	- 4,8	-2,8	+ 2,0
Desoxiadenosina	Dímero	4,1	-0,71	-0,17	-2,28	- 3,2	-5,4	- 2,2
"	Polímero	4,4	-1,03	-0,23	-3,04	- 4,3	-3,3	+ 1,0
Guanosina	Dímero	5,1	-2,67	-0,34	-0,57	- 3,6	-7,2	- 3,6
"	Polímero	5,5	-3,81	-0,44	-0,74	- 5,0	-4,5	+ 0,5
Citidina	Dímero	3,5	-7,35	-2,26	-3,64	-13,2	-8,2	+ 5,0
"	Polímero	3,9	-9,51	-2,40	-3,87	-15,8	-3,8	+12,0
Uridina	Dímero	3,3	-2,19	-0,80	-5,72	- 8,7	-7,7	+ 1,0
"	Polímero	3,9	-2,38	-0,60	-4,27	- 7,2	-3,7	+ 3,5
Timidina	Dímero	3,6	-2,48	-0,70	-3,26	- 6,4	-6,0	+ 0,4

TABLA 1.11.

Energía libre de apilamiento (kcal/mol)

NUCLEOTIDOS

Compuesto	Grado de asociación	$\bar{d}$ (Å)	$\Delta G_{\mu\mu}$	$\Delta G_{\mu\alpha}$	$\Delta G_L$	$\Delta G_{\text{base-base}}$	$\Delta G_{\text{exp}}$	$\Delta G_{\text{otr.int.}}$
AMP	Dímero	3,9	-0,82	-0,23	-3,08	- 4,1	-6,4	- 2,2
"	Polímero	4,5	-0,96	-0,20	-2,66	- 3,8	-3,9	- 0,1
GMP	Dímero	4,8	-3,20	-0,49	-0,83	- 4,5	-6,3	- 1,8
"	Polímero	5,3	-4,26	-0,54	-0,93	- 5,7	-3,5	+ 2,2
CMP	Dímero	3,4	-8,01	-2,69	-4,34	-15,0	-5,7	+ 9,3
UMP	Dímero	3,5	-1,84	-0,56	-4,02	- 6,4	-8,6	- 2,2
"	Polímero	4,2	-1,90	-0,38	-2,74	- 5,0	-4,6	+ 0,4
TMP	Dímero	3,2	-3,53	-1,42	-6,60	-11,5	-6,5	+ 5,0
"	Polímero	3,9	-3,49	-0,88	-4,10	- 8,5	-3,1	+ 5,4

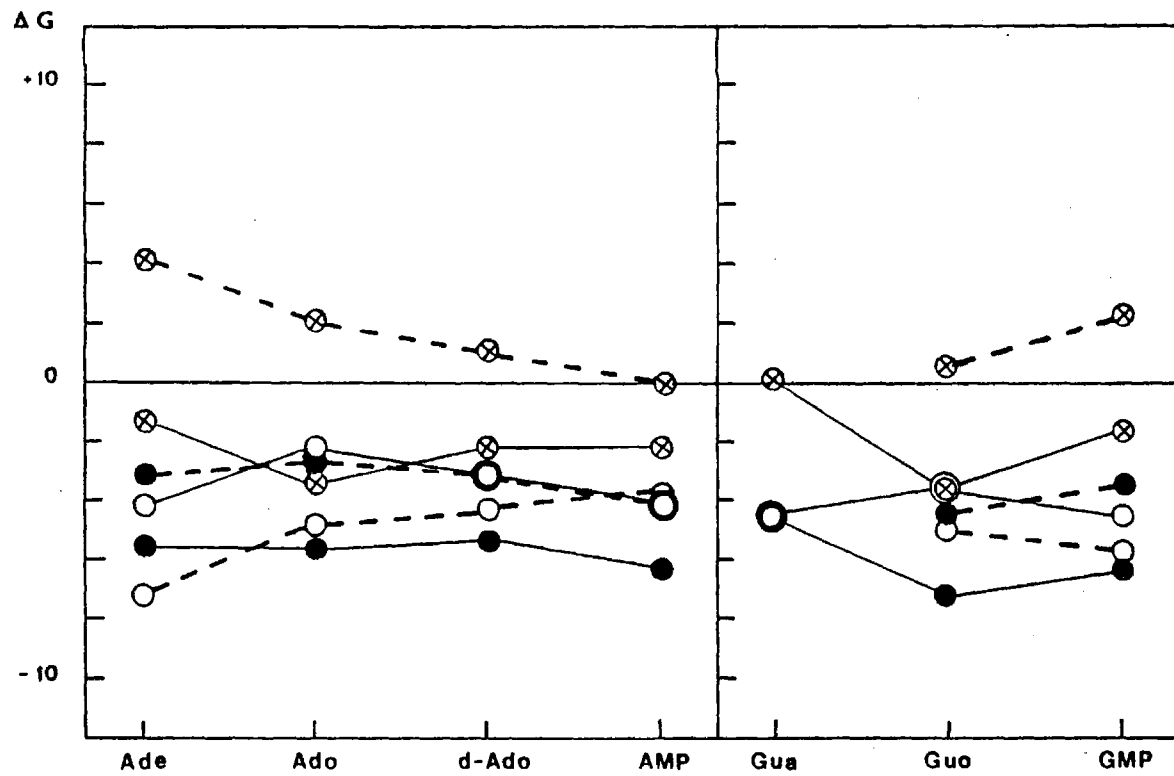


Fig. 1.17.- Energía de interacción (kcal/mol) en unidades monoméricas púricas.  
 ○ ΔG<sub>base-base</sub>; ⊗ ΔG<sub>otr.int.</sub>; ● ΔG<sub>exp.</sub>; — 1<sup>er</sup> efecto; --- 2<sup>o</sup> efecto.

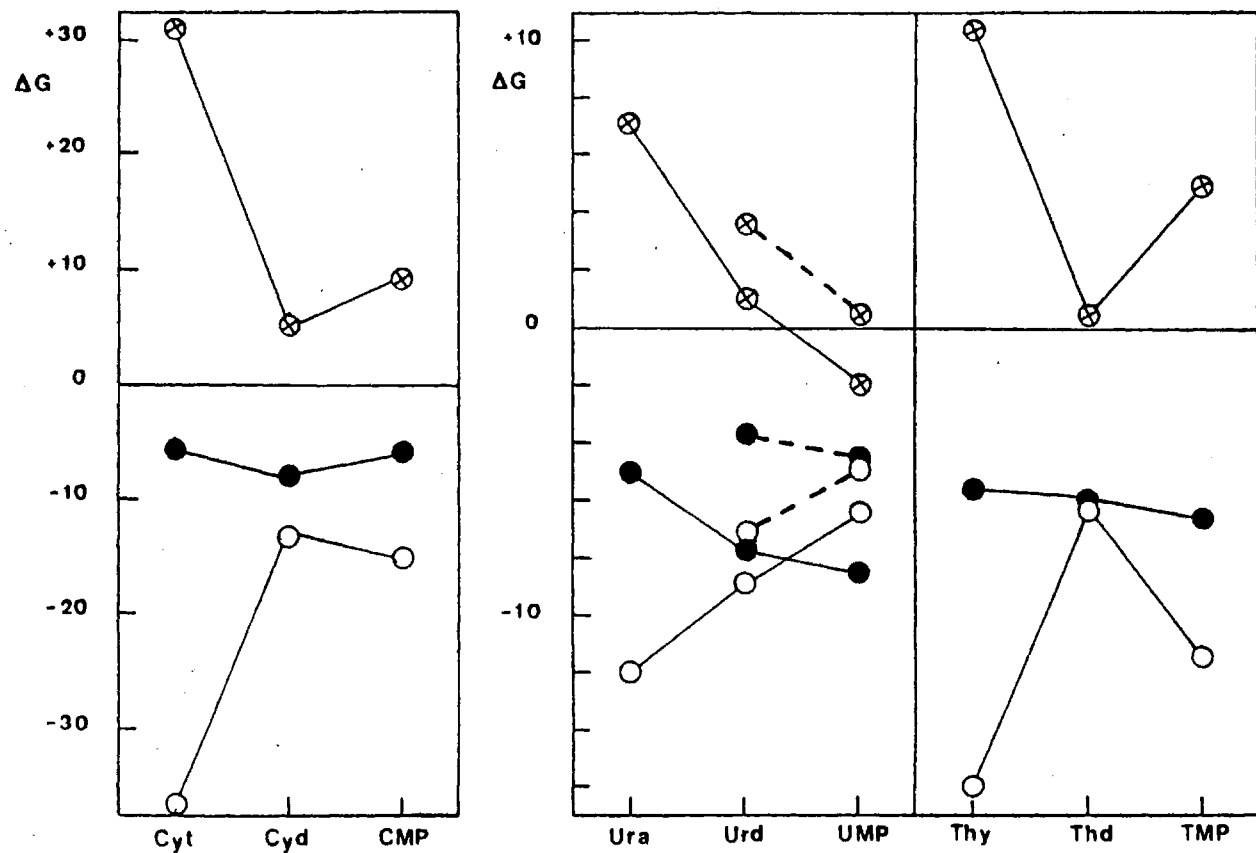


Fig. 1.18.- Energía de interacción (kcal/mol) en unidades monoméricas pirimidínicas.

○  $\Delta G_{\text{base-base}}$ ; ⊗  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$ ; ●  $\Delta G_{\text{exp.}}$ ; — 1<sup>er</sup> efecto; --- 2<sup>o</sup> efecto.

1) Efecto de la ribosa o desoxiribosa

Adenosina y desoxiadenosina

1º efecto.- La distancia entre las bases es mayor en los dímeros de los nucleósidos adenosina (4,4 Å) y desoxiadenosina (4,1 Å) que en los de la base adenina (3,9 Å). Si el mecanismo de asociación es de apilamiento, esto indicaría que la ribosa o desoxiribosa representa un impedimento estérico en la formación del dímero de los nucleósidos, y por tanto, la contribución de la energía de interacción base-base es menor en los nucleósidos (-2,2 en Ado y -3,2 en d-Ado) que en la base (-4,1). Ahora bien, como el cálculo de la distancia se basa en un modelo de apilamiento, si el mecanismo de asociación correspondiente a este 1º efecto es el enlace de hidrógeno, estos valores deben utilizarse con las debidas reservas.

Para interpretar las variaciones de  $\Delta G_{\text{base-base}}$  al pasar de adenina a adenosina y desoxiadenosina, hay que tener en cuenta que el grupo 2'-OH de la ribosa es capaz, en potencia, de formar un enlace de hidrógeno intramolecular con el N<sup>3</sup> de las purinas o el O del C<sup>2</sup> de las pirimidinas (19). Si existe interacción intramolecular entre la ribosa y la base, la tendencia a la asociación podría ser menor en el nucleósido que en la base libre (20), en concordancia con los valores experimentales de  $\Delta G_{\text{base-base}}$ . En la desoxiadenosina, no existe el grupo 2'-OH y por tanto el valor de  $\Delta G_{\text{base-base}}$  debe ser más próximo al de la adenina, como efectivamente ocurre.

Por el contrario, la contribución a la asociación debida al término  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$  es mayor en los nucleósidos (-3,5 en Ado y -2,2 en d-Ado) que en la base (-1,4). Como este término comprende la contribución de la ribosa y de las interacciones hidrofóbicas, y la primera se

opone a la asociación, como acabamos de comentar, se deduce que las interacciones hidrofóbicas, que favorecen la asociación, son más intensas en el caso de los nucleósidos que en las bases, es decir, la introducción de la ribosa o desoxiribosa incrementa las interacciones hidrofóbicas. El valor superior de  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$  en adenosina respecto de desoxiadenosina, indica que, en este 1º efecto, la desoxiribosa favorece menos que la ribosa las interacciones hidrofóbicas.

La variación de los valores de  $\Delta G_{\text{exp}}$ , y por tanto de la constante de asociación  $K_2$ , es mucho menor que la de las otras contribuciones que acabamos de mencionar. Esta puede ser la consecuencia lógica de la variación contrapuesta de  $\Delta G_{\text{base-base}}$  y  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$ .

2º efecto.- La distancia entre las bases es mayor en los polímeros de los nucleósidos adenosina (4,3 Å) y desoxiadenosina (4,4 Å), que en los de la base adenina (4,0 Å), lo cual puede interpretarse de manera análoga a como se ha hecho para el 1º efecto. En consecuencia, la energía de interacción entre bases es mayor en la base (-7,2) que en los nucleósidos (-4,8 en Ado y -4,3 en d-Ado), pero este término tiene un valor más parecido al de la base en adenosina que en desoxiadenosina, al contrario de lo observado en el 1º efecto. Ello revela que, si bien parece existir una interacción intramolecular entre la pentosa y la base, que desfavorece la interacción directa entre las bases, la presencia en la ribosa del grupo 2'-OH no contribuye a este desfavorecimiento:

La contribución a la asociación debida al término  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$  que en el 1º efecto tiene signo negativo, en el 2º efecto tiene signo positivo en todos los casos, y por tanto se opone a la interacción. Ahora bien, su valor absoluto indica que esta oposición es menor en los

nucleósidos (+2,0 en Ado y +1,0 en d-Ado) que en la base (+4,0). Este hecho puede interpretarse en el sentido de que la introducción de la pentosa incrementa las interacciones hidrofóbicas, como ya se había hecho notar para el 1<sup>er</sup> efecto. Sin embargo, el valor de este término se opone más a la asociación en adenosina que en desoxiadenosina, al contrario de lo observado para el 1<sup>er</sup> efecto, lo que indica que, en la formación de polímero, la desoxiribosa (quizá por contener un OH menos), favorece más que la ribosa las interacciones hidrofóbicas.

La variación de los valores de  $\Delta G_{\text{exp}}$  es mucho menor que la de los términos que contribuyen a ella, como cabe esperar de la variación contrapuesta de  $\Delta G_{\text{base-base}}$  y  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$ .

La diferente variación de  $\Delta G_{\text{base-base}}$  y  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$  de adenosina y desoxiadenosina en ambos efectos hipocrómicos, puede constituir un argumento indirecto en favor de la hipótesis de que los factores responsables de la asociación en la formación de dímeros y de polímeros, son diferentes, o en todo caso, si en ambos el mecanismo de asociación fuese el mismo, diferirían en la magnitud de su contribución a la asociación.

Conviene destacar que el efecto sobre la formación de polímero, debido a la presencia de ribosa o desoxiribosa, puede estudiarse únicamente en adenosina y desoxiadenosina, pues la adenina es la única base de las unidades monoméricas estudiadas que presenta el 2<sup>o</sup> efecto hipocrómico.

#### Guanosina

1<sup>er</sup> efecto.- La distancia entre las bases es mayor en el nucleósido guanosina (5,1 Å) que en la base guanina (4,7 Å), y por tanto la contribución debida a  $\Delta G_{\text{base-base}}$  es mayor en la base (-4,5) que en

el nucleósido (-3,6). Por el contrario, la contribución debida a  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$  es mucho mayor en el nucleósido (-3,6) que en la base (0,0), es decir, la introducción de la ribosa incrementa las interacciones hidrofóbicas. La interpretación de estos hechos es análoga a la realizada para la adenosina.

El valor de  $\Delta G_{\text{exp}}$  es superior en el nucleósido, debido a la mencionada contribución de las interacciones hidrofóbicas.

#### Citidina

1° efecto.- En primer lugar, el valor de la constante de asociación  $K_2$  obtenido para este compuesto es demasiado elevado ( $1100 \cdot 10^3$ ), debido a que, por ser muy pequeño el valor de la pendiente, el cálculo de dicha constante está afectado de una notable indeterminación. Por otra parte, el valor de la distancia entre bases en la citosina es extraordinariamente bajo (2,8 Å), lo que puede atribuirse a las aproximaciones introducidas en el cálculo de la fuerza de oscilador; ello hace que el valor de  $\Delta G_{\text{base-base}}$  sea también demasiado alto. La interpretación de los resultados obtenidos para estos compuestos debe hacerse, pues, con las debidas reservas, y por tanto se dedicará más atención al signo de las variaciones de los términos de la energía de interacción al pasar de la base al nucleósido, que a sus valores absolutos.

La distancia entre bases es mayor en el nucleósido (3,5 Å) que en la base (2,8 Å), por lo que  $\Delta G_{\text{base-base}}$  es mayor en la base (-36,9) que en el nucleósido (-13,2), al igual que sucede en adenina y guanina. La contribución debida a  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$  tiene signo positivo, a diferencia de lo observado en el 1° efecto de las unidades monoméricas púricas, y por tanto se opone a la asociación. Esta oposición es menor en el nucleósido (+5,0) que en la base (+31,2), lo que puede interpre-

tarse en el sentido de que la introducción de la ribosa incrementa las interacciones hidrofóbicas. Como resultado de esta contribución, el valor de  $\Delta G_{\text{exp}}$  es superior en el nucleósido, al igual que sucede en la guanosina.

#### Uridina

1\* efecto.- La distancia entre las bases es mayor en el nucleósido (3,3 Å) que en la base (3,1 Å), y por tanto la contribución debida a  $\Delta G_{\text{base-base}}$  es menor en uridina (-8,7) que en uracilo (-12,1). Esta observación puede interpretarse de manera análoga a como se ha hecho para los sistemas anteriores.

La contribución debida a  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$  es positiva en ambos casos, a diferencia de lo observado en los dímeros de las unidades monoméricas púricas, es decir, se opone a la asociación, siendo esta oposición notablemente menor en el nucleósido (+1,0) que en la base (+7,0). Este hecho confirma la hipótesis de que la introducción de la ribosa incrementa las interacciones hidrofóbicas.

El valor de  $\Delta G_{\text{exp}}$  es superior en el nucleósido, debido a la mencionada contribución de las interacciones hidrofóbicas, como sucede igualmente en guanosina y citidina.

#### Timidina

1\* efecto.- La distancia entre bases es mayor en el nucleósido (3,6 Å) que en la base (3,0 Å), lo cual confirma que la desoxirribosa, al igual que la ribosa, puede representar un impedimento estérico en la formación del dímero de los nucleósidos. En consecuencia,  $\Delta G_{\text{base-base}}$  es menor en la timidina (-6,4) que en la timina, donde adquiere un valor notablemente alto (-16,1).

La contribución debida a  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$  es de signo positivo, tanto en la base (+10,3) como en el nucleósido (+0,4), y por tanto se opone a la asociación, siendo esta oposición mucho mayor en la base, lo cual puede interpretarse en el sentido de que la introducción de la desoxiribosa incrementa las interacciones hidrofóbicas.

Los valores de  $\Delta G_{\text{exp}}$  son del mismo orden en la base y en el nucleósido, pese a las grandes diferencias que existen en las contribuciones que acabamos de mencionar. Este hecho resalta la importancia que tiene la partición de  $\Delta G_{\text{exp}}$  en sus diferentes contribuciones, con el fin de obtener una interpretación más profunda del fenómeno de la auto-asociación de las unidades monoméricas.

En resumen, respecto del efecto de la ribosa o desoxiribosa pueden hacerse las siguientes deducciones:

1) En todos los sistemas estudiados, la distancia entre las bases es mayor en los dímeros y polímeros de los nucleósidos, que en los de las bases, es decir, la presencia de la ribosa o desoxiribosa puede representar un impedimento estérico en la asociación.

2) Como consecuencia de lo anterior, la contribución a la asociación de la energía de interacción entre las bases, es mayor en las propias bases púricas y pirimidínicas que entre las bases presentes en los nucleósidos.

3) La contribución a la asociación de la energía debida a "otras interacciones" es de signo negativo (y por tanto, favorece la asociación) en el 1º efecto de las unidades monoméricas púricas, y es de signo positivo (opuesta a la asociación) en el 1º efecto de las unidades monoméricas pirimidínicas, así como en el 2º efecto de las púri-

cas, cuando éste existe. En todos los sistemas estudiados puede observarse que esta contribución, independientemente del signo que tenga, favorece más la asociación en los nucleósidos que en las bases, es decir, la introducción de la ribosa o de la desoxiribosa incrementa las interacciones hidrofóbicas. En el 1º efecto, la desoxiribosa favorece estas interacciones menos que la ribosa, mientras que en el 2º efecto ocurre lo contrario.

4) El valor global de  $\Delta G_{exp}$  resulta en cada caso del balance entre  $\Delta G_{base-base}$  y  $\Delta G_{otr.int.}$ . Como puede predominar una u otra contribución, la constante de asociación de los nucleósidos puede ser mayor que la de las bases, si predominan las interacciones hidrofóbicas:

Adenina, $K_2=12.10^3$	;	Adenosina, $K_2=16.10^3$
Adenina, $K_p=220$	;	d-Adenosina, $K_p=250$
Guanina, $K_2=2.10^3$	;	Guanosina, $K_2=200.10^3$
Citosina, $K_2=16.10^3$	;	Citidina, $K_2=1100.10^3$
Uracilo, $K_2=5,8.10^3$	;	Uridina, $K_2=420.10^3$
Timina, $K_2=19.10^3$	;	Timidina, $K_2=27.10^3$

o bien menor si predomina la energía de las interacciones base-base:

Adenina, $K_2=12.10^3$	;	d-Adenosina, $K_2=9,9.10^3$
Adenina, $K_p=220$	;	Adenosina, $K_p=120$

## 2) Efecto del grupo fosfato

### AMP

1º efecto.- La distancia entre las bases es mayor en el nucleósido (4,4 Å) que en el nucleótido (3,9 Å), y por tanto,  $\Delta G_{base}$  es mayor en el nucleótido (-4,1) que en el nucleósido (-2,2). Este hecho puede interpretarse en el sentido de que la introducción del grupo fos-

fato origina un aumento de la interacción entre las bases.

Por el contrario, la contribución  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$  es mayor en el nucleósido (-3,5) que en el nucleótido (-2,2). Como este término comprende las contribuciones de la ribosa, del grupo fosfato y de las interacciones hidrofóbicas, se deduce fácilmente que las interacciones hidrofóbicas son más intensas en el nucleósido, es decir, en el proceso de formación de dímeros, la introducción del grupo fosfato origina un descenso en este tipo de interacciones.

El valor de  $\Delta G_{\text{exp}}$ , que resulta del balance de ambas contribuciones, es mayor en el nucleótido, debido a la mencionada contribución de la energía de interacción entre las bases.

2° efecto.- La distancia entre las bases es mayor en los polímeros del nucleótido (4,5 Å) que en los del nucleósido (4,3 Å), por lo que la contribución de  $\Delta G_{\text{base-base}}$  es mayor en adenosina (-4,8) que en AMP (-3,8). Este hecho es contrario al observado en la formación de dímeros, y puede constituir un apoyo indirecto en favor de la hipótesis de que los mecanismos responsables de ambos efectos hipocrómicos son diferentes. En todo caso, la introducción del grupo fosfato parece dar lugar a una disminución en la contribución de las bases a la energía libre global de la asociación por formación de polímeros.

Por otra parte, y contrariamente a lo observado en el 1° efecto, la contribución de las interacciones hidrofóbicas es más favorable a la asociación en el nucleótido (-0,1) que en el nucleósido (+2,0). Esta diferencia de comportamiento puede revelar también que los mecanismos de asociación de uno y otro efecto hipocrómico, son diferentes.

El valor global de  $\Delta G_{\text{exp}}$  es mayor en el nucleótido, debido

a esta contribución de las interacciones hidrofóbicas.

#### GMP

1° efecto.- La distancia entre las bases es mayor en el nucleósido (5,1 Å) que en el nucleótido (4,8 Å), y por tanto,  $\Delta G_{\text{base}}$  es mayor en el GMP (-4,5) que en la guanosina (-3,6). Por otra parte,  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$  es mayor en el nucleósido (-3,6) que en el nucleótido (-1,8). La interpretación de estas variaciones es análoga a la del 1° efecto del AMP; la única diferencia estriba en que el valor de  $\Delta G_{\text{exp}}$  es aquí superior en el nucleósido, debido a la importancia del término  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$

2° efecto.- La distancia entre bases es mayor en el nucleósido (5,5 Å) que en el nucleótido (5,3 Å), y por tanto  $\Delta G_{\text{base-base}}$  es mayor en el GMP (-5,7) que en la guanosina (-5,0). Por otra parte,  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$  es más favorable a la asociación en el nucleósido (+0,5) que en el nucleótido (+2,2). A diferencia de lo observado en el AMP, estas variaciones son análogas a las del 1° efecto, hasta el punto de que las diferencias entre los valores de estas magnitudes en el nucleósido y en el nucleótido son del mismo orden en ambos efectos hipocrómicos. Ello puede constituir una evidencia indirecta de que los mecanismos de asociación responsables de uno y otro efecto son idénticos en estos compuestos, o bien de que en el 2° efecto coexisten dos mecanismos diferentes, ya que, si fueran distintos los mecanismos que actúan en ambos efectos hipocrómicos, las variaciones de las contribuciones mencionadas serían también diferentes.

#### CMP

1° efecto.- Conviene recordar las limitaciones de los valores correspondientes a la citidina, de los que se ha hablado al comentar

el efecto de la ribosa.

La distancia entre las bases es mayor en el nucleósido (3,5 Å) que en el nucleótido (3,4 Å), aunque la diferencia es pequeña, por lo que  $\Delta G_{\text{base-base}}$  es mayor en el CMP (-15,0) que en la citidina (-13,2). Por otra parte,  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$  es de signo positivo en ambos casos, es decir, opuesto a la asociación, si bien la oposición es menor en el nucleósido (+5,0) que en el nucleótido (+9,3). El valor de  $\Delta G_{\text{exp}}$  es mayor en el nucleósido, debido a la contribución de las interacciones hidrofóbicas.

La interpretación de estas observaciones es análoga a la efectuada para el 1° efecto de AMP y GMP.

En este compuesto, no existe 2° efecto hipocrómico.

#### UMP

1° efecto.- El valor de la constante de asociación  $K_2$  del UMP es demasiado elevado ( $2000 \cdot 10^3$ ), por las mismas razones que se han indicado para la citidina. Por consiguiente, los valores de las diferentes contribuciones a la energía de interacción pueden estar afectados de una indeterminación notable.

La distancia entre las bases es mayor en el nucleótido (3,5 Å) que en el nucleósido (3,3 Å), a diferencia de lo que ocurre en el 1° efecto de todos los demás sistemas estudiados; es decir, en este caso, la introducción del grupo fosfato origina una disminución de la energía de interacción entre las bases del nucleótido (-6,4) respecto del nucleósido (-8,7). También a diferencia de lo observado en los demás sistemas, las interacciones hidrofóbicas son más intensas en el nucleótido ( $\Delta G_{\text{otr.int.}} = +1,0$  en uridina y -2,2 en UMP). El valor de  $\Delta G_{\text{exp}}$  es mayor

en el nucleótido, debido a la contribución de estas interacciones.

2° efecto.- La distancia entre las bases es mayor en el nucleótido (4,2 Å) que en el nucleósido (3,9 Å), por lo que  $\Delta G_{\text{base}}$  es mayor en la uridina (-7,2) que en el UMP (-5,0). El valor de  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$  es más favorable a la asociación en el nucleótido (+0,4) que en el nucleósido (+3,5). El valor global de  $\Delta G_{\text{exp}}$  es mayor en el nucleótido, debido a esta última contribución.

La variación de todas estas magnitudes es análoga a la del 1° efecto, y también análoga a la del 2° efecto del AMP.

#### TMP

1° efecto.- La distancia entre bases es mayor en el nucleósido (3,6 Å) que en el nucleótido (3,2 Å), por lo que  $\Delta G_{\text{base-base}}$  es mayor en el TMP (-11,5) que en la timidina (-6,4). El valor de  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$  es más favorable a la asociación en el nucleósido (+0,4) que en el nucleótido (+5,0). El valor de  $\Delta G_{\text{exp}}$  es mayor en el nucleótido, debido al término de energía de interacción entre las bases.

La interpretación de estas variaciones es análoga a la del 1° efecto de AMP, GMP y CMP.

En este caso, no existe 2° efecto hipocrómico en la timidina.

En resumen, del estudio del efecto del grupo fosfato pueden hacerse las siguientes deducciones:

1) En el 1° efecto de los sistemas estudiados, la distancia entre las bases es mayor en el nucleósido que en el nucleótido, excepto en el UMP. Por el contrario, en el 2° efecto, la distancia entre las bases es mayor en el nucleótido, salvo en el GMP.

2) La variación de la energía de interacción entre bases al pasar del nucleósido al nucleótido, está relacionada con la variación de la distancia entre bases. Así, en el 1º efecto,  $\Delta G_{\text{base-base}}$  es siempre mayor en el nucleótido que en el nucleósido, excepto en UMP; y en el 2º efecto,  $\Delta G_{\text{base-base}}$  es menor en el nucleótido, excepto en GMP.

3) En el 1º efecto, las interacciones hidrofóbicas, que tienden a favorecer la asociación, son más intensas en el nucleósido que en el nucleótido, excepto en UMP. Por el contrario, en el 2º efecto, las interacciones hidrofóbicas son más intensas en el nucleótido, salvo en GMP.

4) En el sistema adenosina-AMP, las variaciones de las contribuciones  $\Delta G_{\text{base-base}}$  y  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$  del 2º efecto son inversas a las del 1º efecto, lo que puede ser una evidencia indirecta en favor de la hipótesis de que los mecanismos de asociación responsables de uno y otro efecto, son diferentes. Por el contrario, dichas variaciones son análogas en ambos efectos en los sistemas guanosina-GMP y uridina-UMP.

5) El hecho de que UMP y GMP constituyan sendas excepciones al comportamiento general de las unidades monoméricas en el 1º y en el 2º efecto hipocrómico, respectivamente, podría ser un indicio de que en estos casos, el fenómeno de asociación correspondiente es diferente al de los otros compuestos, o de que quizá comprenda la intervención simultánea de varios mecanismos de interacción.

6) El valor global de  $\Delta G_{\text{exp}}$  depende de las contribuciones  $\Delta G_{\text{base-base}}$  y  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$ , y por tanto, de acuerdo con los valores relativos de estos términos, puede ser mayor en el nucleósido o bien en el nucleótido.

### 3) Influencia del tipo de base

Teniendo en cuenta que en los apartados anteriores ya se han revisado detalladamente los valores de las contribuciones a la energía de interacción para cada una de las unidades monoméricas estudiadas, se darán aquí únicamente las conclusiones que pueden obtenerse en el estudio comparativo de las unidades monoméricas púricas y pirimidínicas:

1) La distancia entre las bases es menor en las unidades monoméricas pirimidínicas que en las púricas, tanto en el 1° como en el 2° efecto hipocrómico.

2) Como consecuencia de lo anterior, la energía de interacción directa entre las bases es mayor en las pirimidinas que en las purinas. Si el mecanismo de asociación es el apilamiento de las bases, este hecho puede ser un apoyo indirecto en favor de la hipótesis de que el apilamiento de las unidades monoméricas púricas no comprende la superposición de ambos anillos, hexagonal y pentagonal, pues en ese caso el solapamiento, y por tanto la energía de interacción entre las bases púricas, sería superior al de las bases pirimidínicas, en las cuales sólo hay la posibilidad de que se produzca la superposición del anillo hexagonal, que es el único que existe.

3) En todos los compuestos estudiados, el valor de la energía correspondiente a "otras interacciones" favorece más la asociación en el caso de las unidades monoméricas púricas, que en el caso de las pirimidínicas. Esta contribución tiene siempre signo positivo (y por tanto se opone a la asociación) en las pirimidinas, salvo en el 1° efecto del UMP, mientras que en las purinas sólo tiene signo positivo en el 2° efecto. Estas observaciones pueden interpretarse en el sentido de que las interacciones hidrofóbicas son más intensas en las unidades monomé-

ricas púricas, debido tal vez al mayor tamaño de estos compuestos en relación con las unidades monoméricas pirimidínicas.

4) El valor de la energía global de interacción depende de ambas contribuciones, y por tanto, en unos casos es mayor en las unidades monoméricas púricas y en otros, en las pirimidínicas.

#### 4) Influencia del grado de asociación

Las deducciones que pueden hacerse del estudio comparativo de las distancias entre bases y las energías de interacción para el 1° y el 2° efecto de las unidades monoméricas, son:

1) En todos los casos en que es posible detectar la existencia de doble efecto hipocrómico, se verifica que la distancia entre las bases de los polímeros, es mayor que la de los dímeros, salvo en adenosina, en que tienen prácticamente el mismo valor.

2) En la mayor parte de los sistemas estudiados (adenina, adenosina, desoxiadenosina, guanosina, GMP y citidina), la energía de interacción entre las bases del polímero es mayor que el valor de esta misma contribución en el dímero.

3) En todos los sistemas estudiados, sin excepción, el valor de la contribución de "otras interacciones" favorece menos la asociación en el polímero, que en el dímero.

4) En todos los sistemas estudiados, el valor global de  $\Delta G_{exp}$  es mayor en el dímero que en el polímero, es decir, el valor de  $K_2$  es siempre mayor que el correspondiente valor de  $K_p$ .

5) En las conclusiones expuestas anteriormente acerca de los efectos de la ribosa y del grupo fosfato, se han indicado algunos datos que pueden constituir un apoyo indirecto en favor de la hipótesis

de que los factores responsables de la asociación en la formación de dímeros y de polímeros, son diferentes.

Se exponen a continuación, dentro de un recuadro, las conclusiones de alcance más general obtenidas en el presente capítulo.

Conclusiones generales acerca de la autoasociación de unidades monoméricas en disolución acuosa

- 1) Los espectros UV de las 16 unidades monoméricas más importantes de los ácidos nucleicos, estudiados en este trabajo en disolución acuosa, revelan, en todos los casos, una desviación de la ley de Lambert-Beer, de carácter hipocrómico cuyo origen se atribuye a la autoasociación de estos compuestos.
- 2) Se ha observado la existencia de un doble efecto hipocrómico; un primer efecto en disoluciones diluídas ( $c < 10^{-3}M$ ) y un segundo efecto en disoluciones concentradas ( $c > 10^{-3}M$ ), en los siguientes compuestos: adenina, adenosina, desoxiadenosina, guanosina, citidina, uridina, 5'-AMP, 5'-GMP, 5'-UMP y 5'-TMP.
- 3) Los valores de las constantes de asociación correspondientes al 1º efecto hipocrómico son de 2 a 3 órdenes de magnitud mayores que los correspondientes al 2º efecto, y son comparables a los obtenidos para diversas asociaciones por enlace de hidrógeno en compuestos orgánicos.

- 4) El examen de los términos en que puede dividirse la energía global de interacción, pone de manifiesto que las interacciones hidrofóbicas desempeñan un papel fundamental en la fuerza directriz de la asociación.
- 5) La interpretación de los efectos de la pentosa y del grupo fosfato, así como de la influencia del grado de asociación, revela alguna evidencia experimental que puede constituir un argumento indirecto en favor de la hipótesis de que los mecanismos responsables de la asociación en la formación de dímeros y de polímeros, son diferentes.

A la luz del hallazgo original de la existencia de un doble efecto hipocrómico, realizado en nuestro laboratorio, consideramos que el problema fundamental del estudio de la autoasociación de las unidades monoméricas en disolución acuosa, es asignar a cada uno de los efectos hipocrómicos observados, los dos mecanismos de asociación que, en principio, son posibles, es decir, la formación de enlace de hidrógeno y el apilamiento. Para ello resulta necesario conocer cómo pueden influir en dichos efectos hipocrómicos, diversos cambios inducidos en el medio, cuyo estudio es el objeto del capítulo siguiente de esta Memoria.

2.- INFLUENCIA SOBRE LA AUTOASOCIACION  
DE CAMBIOS INDUCIDOS EN EL MEDIO

Las interacciones moleculares son consecuencia, no sólo de las propiedades intrínsecas de las moléculas implicadas en la interacción, sino también de las condiciones del entorno en el que ésta tiene lugar, es decir, de los factores fisicoquímicos fundamentales del medio: naturaleza del disolvente y de los iones presentes, fuerza iónica, pH, temperatura, etc.

De acuerdo con esta idea directriz, se estudia en este capítulo la influencia que ejercen, sobre la autoasociación de las unidades monoméricas de ácidos nucleicos, la naturaleza del disolvente, los iones presentes en la disolución, el pH, la urea y la temperatura.

Teniendo en cuenta que el agua es el disolvente natural de los medios biológicos, es obvio que las interacciones de moléculas de importancia biológica deben ser investigadas en disoluciones acuosas. Es evidente, asimismo, que si el objetivo de esta investigación es el de profundizar, a nivel fisicoquímico, en la interpretación de los complejos procesos de interacción soluto-soluto y soluto-disolvente, es necesario realizar un estudio complementario de disoluciones en medios no acuosos, cuyas propiedades fisicoquímicas permitan esclarecer la naturaleza de los mecanismos que condicionan esta interacción.

## 2.1. INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DEL DISOLVENTE

Como es sabido, la estabilidad de la estructura ordenada de los ácidos nucleicos y de los polinucleótidos depende, en gran parte, de la naturaleza del disolvente.

El estudio de esta influencia se limitó, en un principio, a los ácidos nucleicos (1,2), pero seguidamente se extendió a los polinucleótidos (3) y últimamente se ha dedicado cierta atención al efecto que produce el disolvente en la asociación de los monómeros (4,5) y oligómeros (6). De este modo, se facilita la comprensión, a nivel fisicoquímico, de los distintos fenómenos que pueden contribuir al efecto total observado.

Se conoce desde hace tiempo el hecho de que los disolventes orgánicos ejercen una acción desnaturalizante sobre la estructura de los ácidos nucleicos y que sus efectos son similares, en algunos aspectos, a los de la temperatura o del pH. Dentro de esta línea, se han desarrollado trabajos que estudian cambios conformacionales en DNA y RNA, inducidos por la naturaleza del disolvente (7,8).

En relación con la influencia del disolvente sobre la interacción de las unidades monoméricas libres, cabe destacar especialmente los estudios llevados a cabo por espectroscopía IR y RMN, en disolventes apolares o poco polares (cloroformo, dimetilsulfóxido) (9-13).

Aunque existe unanimidad sobre la importancia intrínseca del disolvente en las asociaciones de moléculas de interés biológico, tanto en compuestos modelo o biomoléculas sencillas como en los biopo-

límeros, no se ha logrado aún una explicación satisfactoria acerca de la naturaleza de los diversos efectos que ejercen los disolventes sobre tales interacciones.

Dentro del estudio, a nivel fisicoquímico, de los efectos del disolvente sobre las asociaciones moleculares, merecen destacarse los trabajos de Sinanoglu y Abdunur (14-16). Estos autores han desarrollado un modelo macroscópico semiempírico que es aplicable solamente a disolventes puros; mediante él se ha explicado la estabilidad de la estructura helicoidal del DNA en agua, como debida principalmente a la desfavorable variación de entalpía asociada con la "formación de cavidad". De acuerdo con este modelo, el efecto desestabilizante de los disolventes orgánicos se debe a que en ellos la entalpía de "formación de cavidad" es mucho menor que en agua, es decir, que en ellos se forman cavidades con mayor facilidad, lo cual favorecería la desorganización de la estructura helicoidal.

En este punto, conviene recordar que, según Ts'o, (17-19), la estabilidad de la doble hélice del DNA en disolución acuosa, no se debe exclusivamente al apareamiento de bases complementarias, sino que el apilamiento vertical entre bases, condicionado por una interacción hidrofóbica, contribuye significativamente a la estabilidad de dicha estructura, hasta el punto de que esta contribución puede superar a la de formación de enlace de hidrógeno. Admitiendo esto, el poder desnaturizante de los disolventes orgánicos puede atribuirse a que en ellos resulta desfavorecida la asociación por apilamiento de las bases, al faltar en ellas la interacción hidrofóbica. Así, en dimetilsulfóxido (DMSO), conocido agente desnaturizante (1), tiene lugar el apareamiento de las bases libres por enlace de hidrógeno, pero no se produce el

apilamiento (11,12); por el contrario, en agua, la asociación entre bases sería predominantemente por apilamiento, por las razones que acabamos de indicar, y además, porque la formación de enlace de hidrógeno se encuentra muy desfavorecida debido al efecto competitivo de las moléculas del disolvente. En apoyo a estos razonamientos puede citarse la acción desnaturalizante del etanol sobre la doble cadena de poli A (3).

En esta breve revisión, se han indicado algunos de los factores más importantes relacionados con la naturaleza del disolvente, que pueden influir en los mecanismos de asociación por apilamiento vertical y por formación de enlaces de hidrógeno entre las unidades monoméricas de los ácidos nucleicos. En un estudio riguroso de este problema, debe tenerse en cuenta también, aunque su interpretación en profundidad reviste actualmente grandes dificultades, la relación que existe entre la influencia del disolvente sobre los solutos, y ciertas propiedades físicas características de los disolventes, principalmente el momento dipolar de sus moléculas y la constante dieléctrica, que, como es sabido, influye en las energías de interacción electrostática, de polarización y de dispersión de London.

El efecto que pueden ejercer en la asociación de los solutos, tanto la polaridad del disolvente (21) como su capacidad de formación de enlace de hidrógeno, es en principio más sencillo de interpretar que el de la constante dieléctrica. Así, el agua, que es un disolvente donador y aceptor de protones y que tiene un elevado momento dipolar, no favorecerá la formación de enlace de hidrógeno base-base, ya que la energía de enlace base-agua y agua-agua es del mismo orden que la de formación de enlace de hidrógeno base-base, lo cual da lugar a

una competencia entre estas tres posibilidades. Es conocido que el mecanismo de interacción de las bases cambia de apilamiento a apareamiento por enlace de hidrógeno cuando disminuye la polaridad del disolvente (22).

El etanol puede actuar como aceptor y donador de protones, pero el resto alifático disminuye su polaridad en comparación con el agua, lo que tiende a favorecer la asociación por enlace de hidrógeno entre bases. Además, la adición de etanol a agua reduce la tensión superficial de ésta, lo que puede traducirse en una disminución de la contribución de la energía libre de superficie del agua a las interacciones hidrofóbicas, y por consiguiente en un aumento del poder desnaturante del medio (24).

Por otra parte, tiene especial importancia el conocimiento de la estructura del disolvente, que está relacionada, en algunos casos, con la capacidad de las moléculas del mismo para donar y aceptar protones para formar enlaces de hidrógeno entre sí, o bien para asociarse de acuerdo con otros mecanismos de interacción, por lo que las interacciones que dan lugar a la formación o destrucción de la estructura del disolvente pueden ser responsables indirectamente de algunos de los efectos de éste sobre la asociación de las bases (23).

El dimetilsulfóxido (DMSO) es un disolvente aprótico dipolar, de características intermedias entre el agua y los compuestos apolares. Aunque es un fuerte aceptor de protones (25), su capacidad de formación de enlaces de hidrógeno es inferior a la del agua y superior a

la del  $\text{Cl}_3\text{CH}$ . En consecuencia, la proporción en que las bases se unen mediante enlace de hidrógeno, es mucho menor en DMSO que en  $\text{Cl}_3\text{CH}$ , aunque mayor que en agua (11,26). Por otra parte, en disolución acuosa, las fuertes interacciones del DMSO con el agua destruyen el orden de ésta, por lo que el DMSO se considera como un soluto "destructor de estructura" (27,28).

Dada la complejidad del fenómeno que se está investigando, del cual se ha intentado presentar una breve visión en las páginas anteriores, no se ha pretendido llegar a una interpretación teórica en profundidad de los diversos factores que en él están implicados, sino únicamente realizar una aproximación experimental sistemática, que permita elaborar correlaciones que, por una parte, ayuden a estimar la contribución relativa de los dos mecanismos fundamentales que condicionan la asociación de las unidades monoméricas: la formación de enlaces de hidrógeno y el apilamiento de las bases; y por otra parte, permitan un mejor conocimiento de las consecuencias que tienen dichas contribuciones en la desnaturalización de polinucleótidos por la acción de disolventes orgánicos.

Con este objeto se ha realizado un estudio comparativo de la influencia de etanol y dimetilsulfóxido, sobre la autoasociación de una serie completa de unidades monoméricas: adenina, adenosina y 5'-AMP, para determinar las semejanzas y diferencias que presentan entre sí y respecto a las disoluciones en medio acuoso, reflejadas en los correspondientes valores de los parámetros de asociación.

Las experiencias se han realizado en condiciones análogas a las efectuadas en tampón fosfato. Los disolventes empleados, además

del agua, han sido etanol y DMSO, así como mezclas en diversas proporciones de estos disolventes con agua. Los disolventes utilizados fueron de la casa Merck, de calidad "Uvasol", y se emplearon sin purificación posterior. El DMSO presenta gran absorción a longitudes de onda inferiores a 270 nm. La zona a 260 nm, donde aparece el máximo de la banda correspondiente a las unidades monoméricas, sólo es accesible en células cuyo espesor sea de 1 mm o inferior, por lo cual no pueden emplearse concentraciones menores de  $10^{-4}M$ , lo que restringe la observación del 1er efecto hipocrómico.

Las mezclas de cada uno de los disolventes con agua se han utilizado con un doble propósito: a) comprobar si la presencia de estos disolventes induce cambios significativos en la asociación con relación al medio acuoso, y b) aumentar la solubilidad de las unidades monoméricas respecto de los disolventes puros, con el fin de favorecer la detección del 2° efecto hipocrómico.

Por otra parte, si bien las "condiciones normalizadas" en nuestro laboratorio corresponden a las disoluciones en tampón fosfato, se han preparado también disoluciones de adenosina y de AMP en agua pura, para disponer de una referencia más adecuada en el estudio de la influencia del disolvente.

#### Resultados experimentales

Se exponen a continuación los resultados experimentales, así como los valores de los parámetros más significativos del método de cálculo, de acuerdo con el siguiente esquema:

1) Los resultados se han agrupado en los siguientes epígrafes:

2.1.1. Influencia del etanol.

2.1.2. Influencia del dimetilsulfóxido.

2) Se dan en forma de tabla los valores de los parámetros más significativos del ajuste empleado:  $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_\infty$ , pendiente  $p$  y coeficiente de correlación,  $r$ , del ajuste, para cada uno de los diferentes sistemas estudiados.

3) Dentro de cada apartado, se da un conjunto de gráficas que corresponden a la representación semilogarítmica de la absorptividad molar,  $\epsilon$ , frente a la concentración molar,  $c$ , para las distintas unidades monoméricas estudiadas. Se incluyen los puntos experimentales y la curva teórica ajustada según el método de cálculo. Se omite la representación gráfica de las ecuaciones lineales, en que se basa dicho método, para no alargar la presentación de los resultados experimentales (fig. 2.1.-2.4.).

4) A continuación, se dan las tablas conjuntas correspondientes a los parámetros de autoasociación (tabla 2.3.), y se realiza la discusión de los resultados obtenidos.

2.1.1. Influencia del etanol

TABLA 2.1.

Resumen de los valores de los parámetros obtenidos con el programa de cálculo "HIPOCROM".

Disolvente	Intervalo de concentraciones	$\epsilon_1$	$\epsilon_\infty$	p	r
ADENINA					
Etanol+agua (50% v/v)	$5 \cdot 10^{-6}$ - $2,5 \cdot 10^{-2}$ M	14110	$11200 \pm 200$	$0,39 \pm 0,04$	0,958
Etanol	$5 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-3}$ M	13810	$11470 \pm 80$	$0,32 \pm 0,02$	0,988
ADENOSINA					
Agua bidestilada	$5 \cdot 10^{-6}$ - $4 \cdot 10^{-3}$ M	16470	$13320 \pm 60$	$0,39 \pm 0,02$	0,990
	$5 \cdot 10^{-3}$ - $3 \cdot 10^{-2}$ M	"	$10900 \pm 100$	$3,2 \pm 0,2$	0,993
Etanol+agua (50% v/v)	$4 \cdot 10^{-6}$ - $1,2 \cdot 10^{-2}$ M	15900	$13380 \pm 40$	$0,33 \pm 0,01$	0,992
	$2 \cdot 10^{-2}$ - $4 \cdot 10^{-2}$ M	"	$9900 \pm 800$	$9 \pm 2$	0,938
Etanol	$5 \cdot 10^{-6}$ - $10^{-3}$ M	15890	$13400 \pm 100$	$0,29 \pm 0,02$	0,984
AMP					
Agua bidestilada	$5 \cdot 10^{-6}$ - $2 \cdot 10^{-3}$ M	16270	$12860 \pm 70$	$0,29 \pm 0,01$	0,992
	$3,5 \cdot 10^{-3}$ - $5 \cdot 10^{-2}$ M	"	$11400 \pm 200$	$2,4 \pm 0,3$	0,963
Etanol+agua (50% v/v)	$5 \cdot 10^{-6}$ - $2,5 \cdot 10^{-2}$ M	16000	$12400 \pm 90$	$0,33 \pm 0,02$	0,985

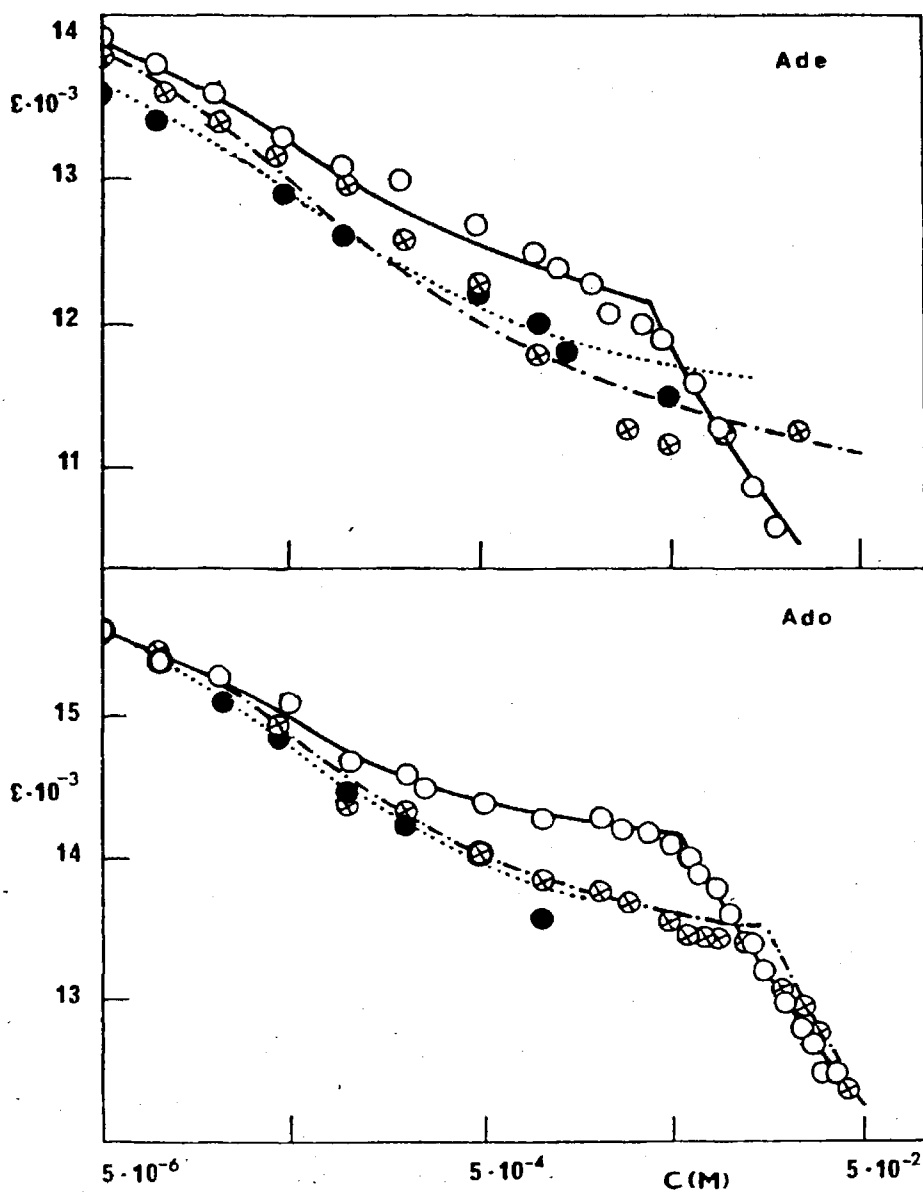


Fig. 2.1.- Absortividad molar de Adenina (Ade) y Adenosina(Ado).

—○— Tampón fosfato; —⊗— Etanol (50%); .....●..... Etanol.

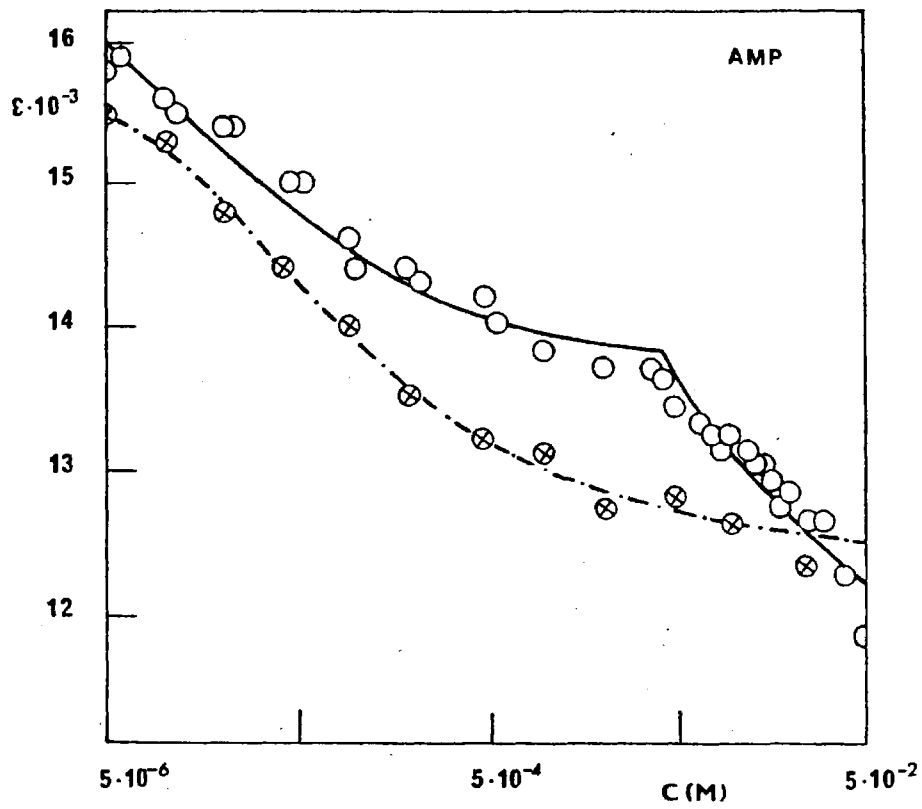


Fig. 2.2.- Absortividad molar de 5'-AMP:  
—○— Tampón fosfato; ---⊗--- Etanol(50%).

2.1.2. Influencia del dimetilsulfóxido

TABLA 2.2.

Resumen de los valores de los parámetros obtenidos con el programa de cálculo "HIPOCROM".

Disolvente	Intervalo de concentraciones	$\epsilon_1$	$\epsilon_\infty$	p	r
ADENINA					
DMSO	$1,4 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-2}$ M	13350	10690±70	1,48±0,07	0,987
ADENOSINA					
DMSO	$2 \cdot 10^{-4}$ - $5 \cdot 10^{-3}$ M	14810	12790±30	0,53±0,02	0,998
	$10^{-2}$ - $4 \cdot 10^{-2}$ M	"	11900±200	3,0 ±0,8	0,909
AMP					
DMSO+agua (50% v/v)	$2,5 \cdot 10^{-4}$ - $1,5 \cdot 10^{-2}$ M	14040	11700±100	1,6 ±0,1	0,974
	$2 \cdot 10^{-2}$ - $5 \cdot 10^{-2}$ M	"	8900±900	8±3	0,939
DMSO+agua (90% v/v)	$2,5 \cdot 10^{-4}$ - $5 \cdot 10^{-3}$ M	14000	11500±100	0,96±0,09	0,980
DMSO	$1,25 \cdot 10^{-4}$ - $1,25 \cdot 10^{-3}$ M	14470	10900±100	1,13±0,06	0,995

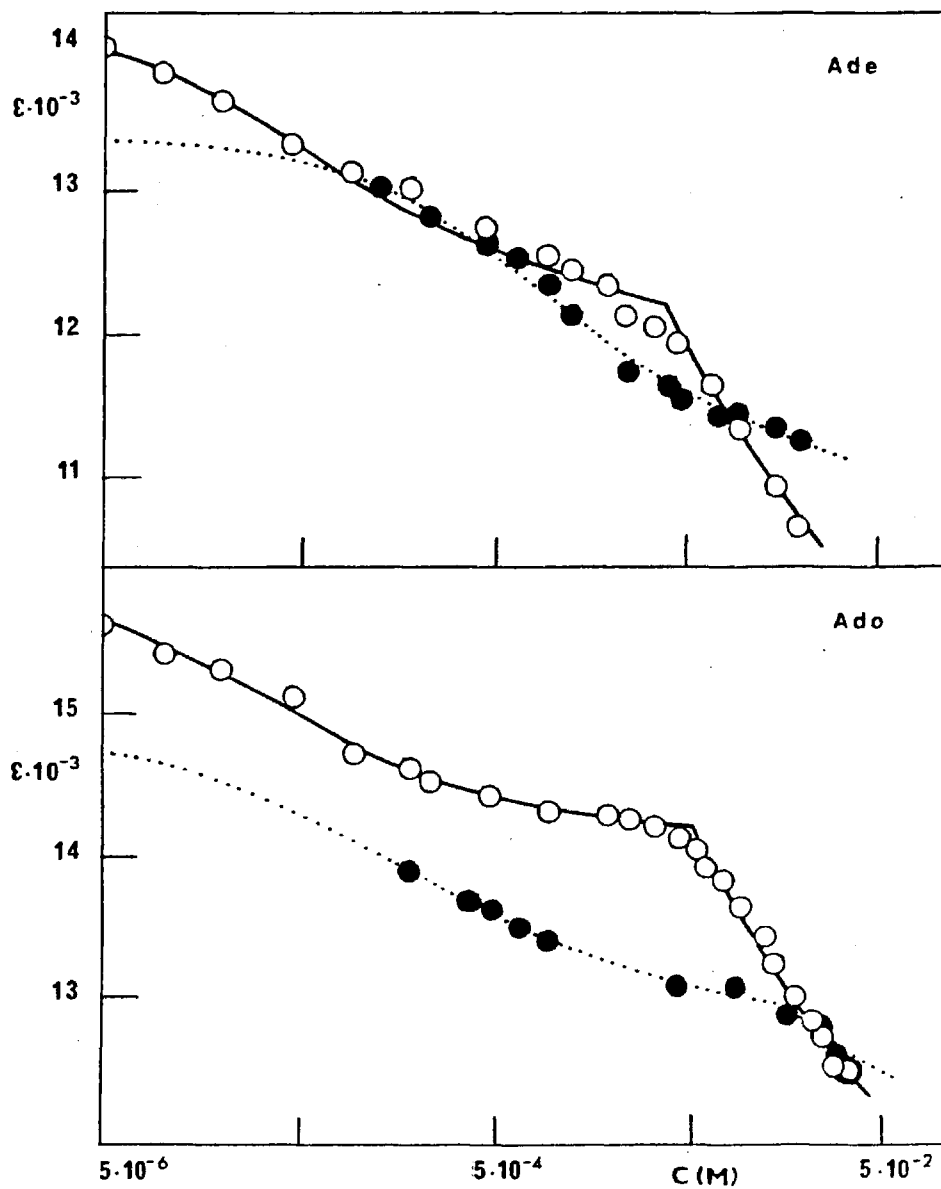


Fig. 2.3.- Absortividad molar de Adenina (Ade) y Adenosina(Ado).

—○— Tampón fosfato; .....●..... DMSO.

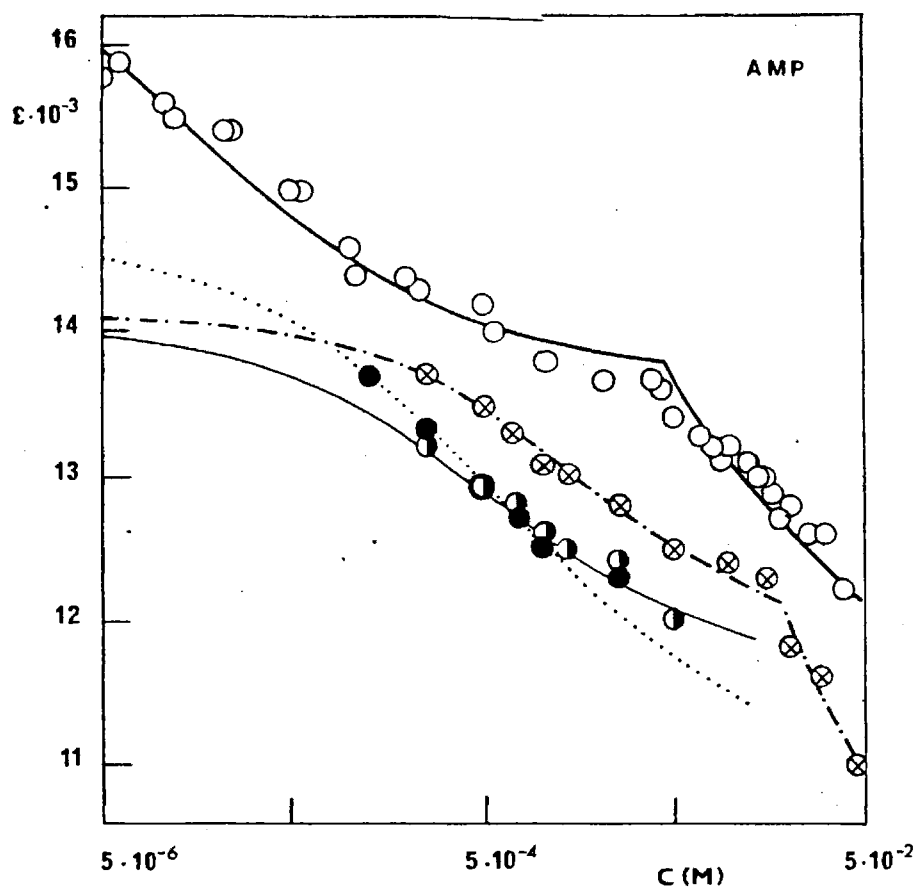


Fig. 2.4.- Absortividad molar de 5'-AMP.

—○— Tampón fosfato; —⊗— DMSO(50%);  
 —●— DMSO(90%); .....●..... DMSO.

TABLA 2.3.

Influencia del disolvente. Parámetros de autoasociación

ADENINA						
Disolvente	1 <sup>er</sup> efecto			2° efecto		
	$K_2$	$\delta_2$	h(%)	$K_p$	$\delta_p$	h(%)
Tampón fosfato	$12 \cdot 10^3$	2190	15,4	220	5700	40,1
Etanol + agua (50% v/v)	$9 \cdot 10^3$	2900	20,5	No detectado		
Etanol	$11 \cdot 10^3$	2340	16,9	"		
DMSO	620	2660	19,9	"		

ADENOSINA						
Disolvente	1 <sup>er</sup> efecto			2° efecto		
	$K_2$	$\delta_2$	h(%)	$K_p$	$\delta_p$	h(%)
Agua bidestilada	$10 \cdot 10^3$	3150	19,1	500	5600	34,0
Tampón fosfato	$16 \cdot 10^3$	1820	11,5	120	5400	34,1
Etanol + agua (50% v/v)	$11,6 \cdot 10^3$	2520	15,8	70	6000	37,7
Etanol	$15 \cdot 10^3$	2500	15,7	No detectado		
DMSO	$3,6 \cdot 10^3$	2000	13,6	320	2960	20

TABLA 2.3. (continuación)

## 5'-AMP

Disolvente	1 <sup>er</sup> efecto			2° efecto		
	K <sub>2</sub>	δ <sub>2</sub>	h(%)	K <sub>p</sub>	δ <sub>p</sub>	h(%)
Agua bidestilada	20.10 <sup>3</sup>	3410	21,0	800	4900	29,9
Tampón fosfato	48.10 <sup>3</sup>	3120	18,6	700	5400	32,0
Etanol + agua (50% v/v)	17.10 <sup>3</sup>	3600	22,5	No detectado		
DMSO + agua (50% v/v)	460	2300	16,4	80	5100	36,3
DMSO + agua (90% v/v)	1,4.10 <sup>3</sup>	2500	17,9	No detectado		
DMSO	1,4.10 <sup>3</sup>	3600	24,7	"		

Interpretación de resultados

Para la interpretación de resultados, utilizaremos los valores que se resumen en la Tabla 2.3., refiriéndonos especialmente a los valores de las constantes de asociación del 1° y 2° efecto. Como complemento de estos parámetros de asociación, hemos calculado también las distancias entre bases y las energías de interacción correspondientes a cada sistema (Tablas 2.4.-2.6. y figuras 2.5.-2.7.). Estos tres conjuntos de valores se utilizan para hacer una discusión conjunta de la influencia del disolvente.

En los sistemas en que se ha empleado DMSO como disolvente, no es posible calcular la distancia entre bases mediante el método de Tinoco-Rhodes, ya que el máximo situado a unos 200 nm ( $\lambda_{0a}$ ) no puede detectarse debido a la alta absorción del DMSO en esa zona espectral. Por el contrario, el método de Bolton-Weiss puede aplicarse a tales sistemas, pues todos los parámetros necesarios para el cálculo de la dis-

tancia pueden determinarse en ellos.

TABLA 2.4.

Influencia del disolvente. Distancia entre bases apiladas  
(Teoría de Tinoco-Rhodes)

ADENINA

Disolvente	Grado de asociación	h(%)	$\lambda_{0a}$ (Å)	$\lambda_{0a}$ (Å)	$f_{0a}$	$d$ (Å)
Tampón fosfato	Dímero	15,4	2605	2070	0,27	4,4
" "	Polímero	40,1	"	"	"	4,3
Etanol (50%)	Dímero	20,5	"	2090	"	4,1
Etanol	Dímero	16,9	2600	"	"	4,4

ADENOSINA

Agua	Dímero	19,1	2590	2060	0,30	4,3
"	Polímero	34,0	"	"	"	4,7
Tampón fosfato	Dímero	11,5	"	"	"	5,0
" "	Polímero	34,1	"	"	"	4,7
Etanol (50%)	Dímero	15,8	2600	2050	"	4,5
"	Polímero	37,7	"	"	"	4,5
Etanol	Dímero	15,7	"	2040	"	4,5

AMP

Agua	Dímero	21,0	2590	2060	0,31	4,2
"	Polímero	29,9	"	"	"	5,0
Tampón fosfato	Dímero	18,6	"	"	"	4,3
" "	Polímero	32,0	"	"	"	4,9
Etanol (50%)	Dímero	22,5	2590	2050	"	4,0

TABLA 2.5.

Influencia del disolvente. Distancia entre bases apiladas  
(Teoría de Bolton-Weiss)

## ADENINA

Disolvente	Grado de asociación	$\lambda$ (Å)	f	$\epsilon_{\infty}$	$\delta$	d (Å)
Tampón fosfato	Dímero	2605	0,27	12010	2190	3,4
" "	Polímero	"	"	8500	5700	3,7
Etanol (50%)	Dímero	"	"	11200	2900	3,2
Etanol	Dímero	2600	"	11470	2340	3,4
DMSO	Dímero	2630	"	10690	2660	3,3

## ADENOSINA

Disolvente	Grado de asociación	$\lambda$ (Å)	f	$\epsilon_{\infty}$	$\delta$	d (Å)
Agua	Dímero	2590	0,30	13320	3150	3,4
"	Polímero	"	"	10900	5600	4,0
Tampón fosfato	Dímero	"	"	14000	1820	3,8
" "	Polímero	"	"	10400	5400	4,0
Etanol (50%)	Dímero	2600	"	13380	2520	3,5
"	Polímero	"	"	9900	6000	3,9
Etanol	Dímero	"	"	13400	2500	3,5
DMSO	Dímero	2620	"	12790	2000	3,6
"	Polímero	"	"	11850	2960	4,5

TABLA 2.5. (continuación)

AMP

Disolvente	Grado de asociación	$\lambda$ (Å)	f	$\epsilon_{\infty}$	$\delta$	d (Å)
Agua	Dímero	2590	0,31	12860	3410	3,4
"	Polímero	"	"	11400	4900	4,2
Tampón fosfato	Dímero	"	"	13640	3120	3,5
" "	Polímero	"	"	11400	5400	4,1
Etanol (50%)	Dímero	"	"	12400	3600	3,3
DMSO (50%)	Dímero	2600	"	11700	2300	3,5
"	Polímero	"	"	8900	5100	4,0
DMSO (90%)	Dímero	2610	"	11500	2500	3,5
DMSO	Dímero	2620	"	10900	3600	3,3

TABLA 2.6.

Influencia del disolvente. Energía libre de apilamiento (kcal/mol)

ADENINA

Disolvente	Grado de asociación	$\bar{d}$ (Å)	$\Delta G_{\mu\mu}$	$\Delta G_{\mu\alpha}$	$\Delta G_L$	$\Delta G_{\text{base-base}}$	$\Delta G_{\text{exp}}$	$\Delta G_{\text{otr.int.}}$
Tampón fosfato	Dímero	3,9	-0,82	-0,23	-3,08	-4,1	-5,6	-1,4
" "	Polímero	4,0	-1,37	-0,41	-5,39	-7,2	-3,2	+4,0
Etanol (50%)	Dímero	3,6	-1,05	-0,38	-4,98	-6,4	-5,4	+1,0
Etanol	Dímero	3,9	-0,82	-0,23	-3,08	-4,1	-5,5	-1,4
DMSO	Dímero	3,3	-1,36	-0,64	-8,40	-10,4	-3,8	+6,6

TABLA 2.6. (continuación)

ADENOSINA

Disolvente	Grado de asociación	$\bar{d}$ (Å)	$\Delta G_{\mu\mu}$	$\Delta G_{\mu\alpha}$	$\Delta G_L$	$\Delta G_{\text{base-base}}$	$\Delta G_{\text{exp}}$	$\Delta G_{\text{otr.int.}}$
Agua	Dímero	3,8	-0,89	-0,27	-3,60	-4,8	-5,5	-0,7
"	Polímero	4,3	-1,10	-0,26	-3,49	-4,8	-3,7	+1,2
Tampón fosfato	Dímero	4,4	-0,57	-0,11	-1,50	-2,2	-5,7	-3,5
" "	Polímero	4,3	-1,10	-0,26	-3,49	-4,8	-2,8	+2,0
Etanol (50%)	Dímero	4,0	-0,76	-0,20	-2,65	-3,6	-5,5	-1,9
"	Polímero	4,2	-1,18	-0,30	-4,02	-5,5	-2,5	+3,0
Etanol	Dímero	4,0	-0,76	-0,20	-2,65	-3,6	-5,7	-2,1
DMSO	Dímero	3,6	-1,05	-0,38	-4,98	-6,4	-4,8	+1,6
"	Polímero	4,5	-0,96	-0,20	-2,66	-3,8	-3,4	+0,4

TABLA 2.6. (continuación)

AMP

Disolvente	Grado de asociación	$\bar{d}(\text{Å})$	$\Delta G_{\mu\mu}$	$\Delta G_{\mu\alpha}$	$\Delta G_L$	$\Delta G_{\text{base-base}}$	$\Delta G_{\text{exp}}$	$\Delta G_{\text{otr.int.}}$
Agua	Dímero	3,8	-0,89	-0,27	-3,60	-4,8	-5,9	-1,1
"	Polímero	4,6	-0,90	-0,18	-2,33	-3,4	-4,0	-0,5
Tampón fosfato	Dímero	3,9	-0,82	-0,23	-3,08	-4,1	-6,4	-2,2
" "	Polímero	4,5	-0,96	-0,20	-2,66	-3,8	-3,9	-0,1
Etanol (50%)	Dímero	3,6	-1,05	-0,38	-4,98	-6,4	-5,8	+0,6
DMSO (50%)	Dímero	3,5	-1,14	-0,45	-5,90	-7,5	-3,6	+3,9
"	Polímero	4,0	-1,37	-0,41	-5,39	-7,2	-2,6	+4,6
DMSO (90%)	Dímero	3,5	-1,14	-0,45	-5,90	-7,5	-4,3	+3,2
DMSO	Dímero	3,3	-1,36	-0,64	-8,40	-10,4	-4,3	+6,1

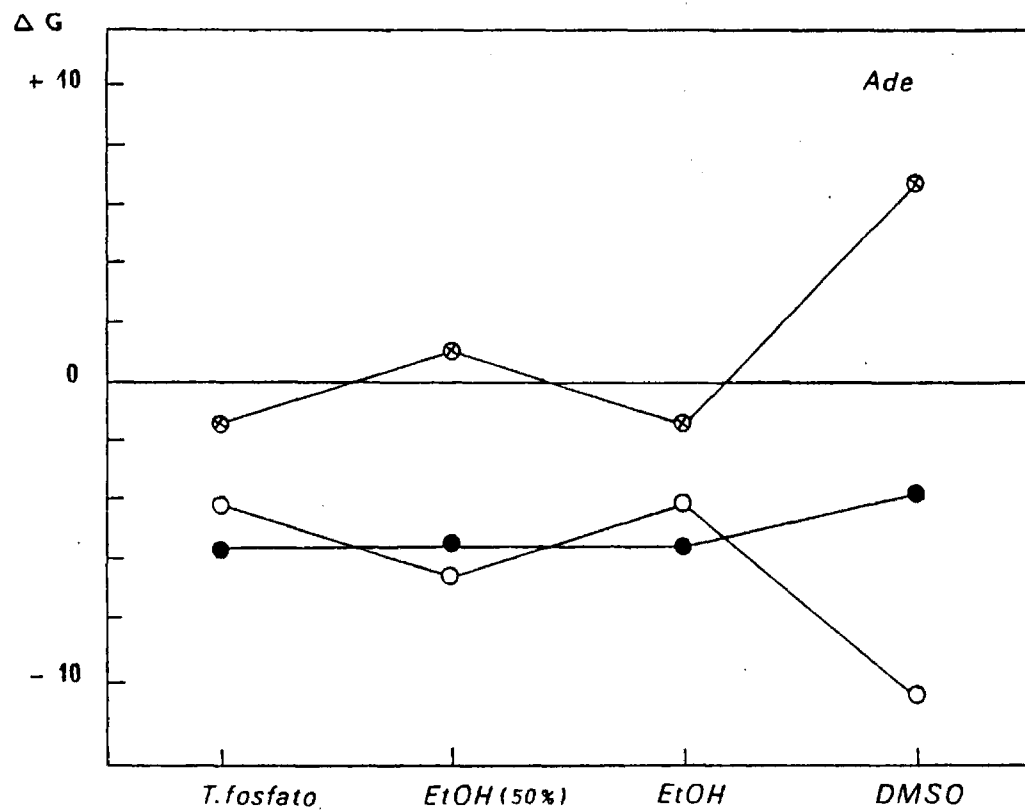


Fig. 2.5.- Influencia del disolvente sobre la energía de interacción en Adenina (Ade). ○  $\Delta G_{\text{base-base}}$ ; ⊗  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$ ; ●  $\Delta G_{\text{exp.}}$ .

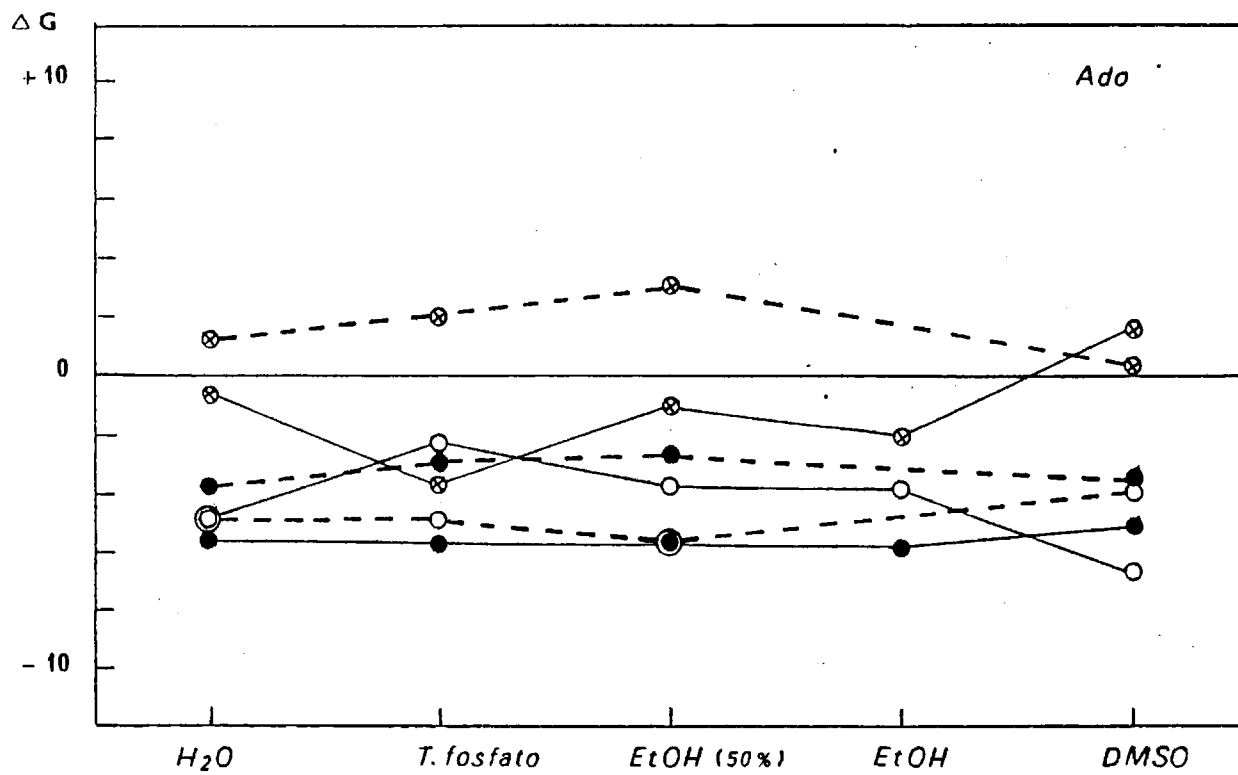


Fig. 2.6.- Influencia del disolvente sobre la energía de interacción en Adenosina (Ado)  
 ○  $\Delta G_{\text{base-base}}$ ; ⊗  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$ ; ●  $\Delta G_{\text{exp.}}$ ; — 1<sup>er</sup> efecto; --- 2<sup>o</sup> efecto.

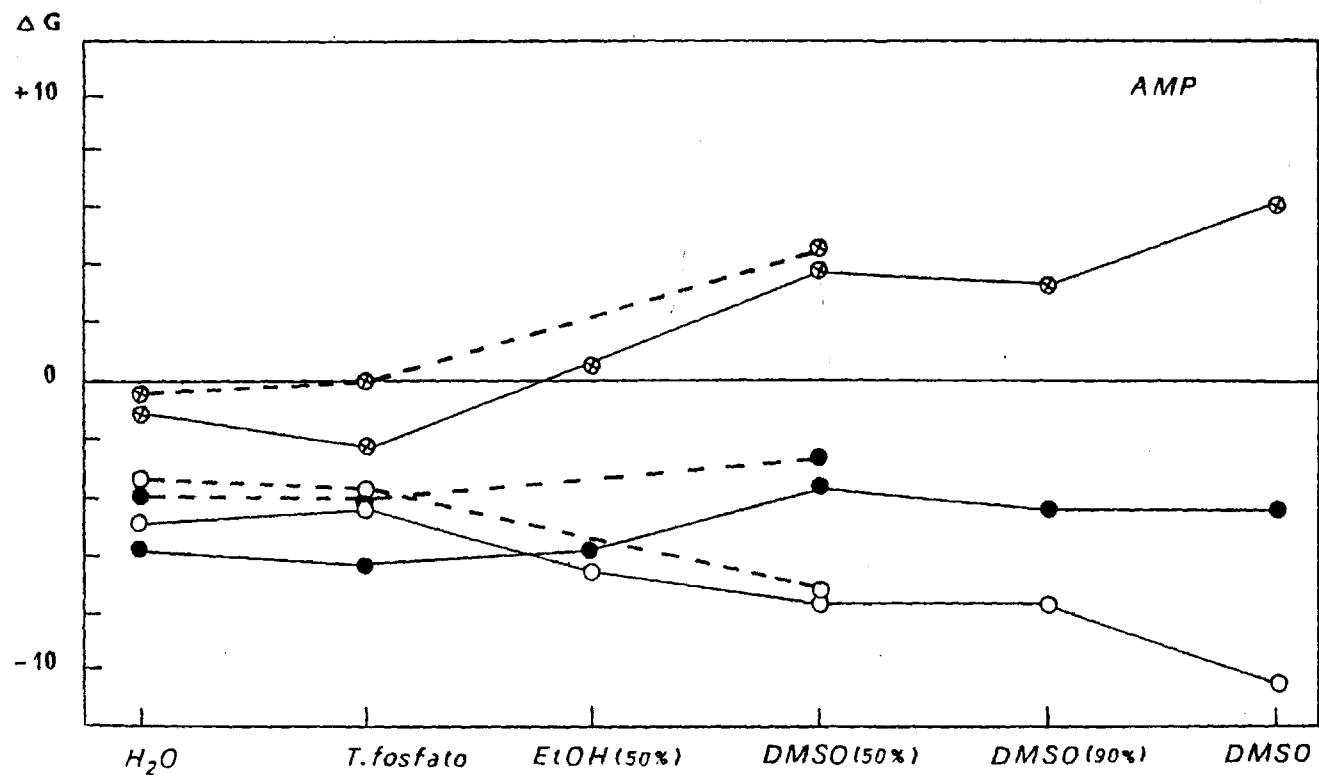


Fig. 2.7.- Influencia del disolvente sobre la energía de interacción en 5'-AMP.

○  $\Delta G_{\text{base-base}}$ ; ⊗  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$ ; ●  $\Delta G_{\text{exp.}}$ ; — 1<sup>er</sup> efecto; --- 2<sup>o</sup> efecto

Consideramos que la exposición de la interpretación de los resultados experimentales resulta mejor esquematizada refiriéndonos a la influencia de cada uno de los disolventes empleados, sobre las tres unidades monoméricas estudiadas, analizando por separado los dos efectos hipocrómicos observados.

El examen de las curvas de autoasociación (fig. 2.1.-2.4.), revela que estas curvas son sensibles a la variación del disolvente, ya que tanto su hábito, como la separación de los dos efectos hipocrómicos se modifica notablemente al pasar de unos disolventes a otros. Las curvas correspondientes a las mezclas de los disolventes con agua, son intermedias entre las curvas obtenidas en medio acuoso y en los correspondientes disolventes puros, lo que pone de manifiesto que la perturbación originada en la asociación por la presencia de un disolvente orgánico, depende de la concentración en que éste se encuentra.

#### Influencia del etanol

La diferencia entre las constantes  $K_2$  en medio acuoso, en etanol y en mezcla etanol+agua al 50%, para las 3 unidades monoméricas, es muy pequeña y varía dentro de los límites de precisión del método. Este hecho no apoya la hipótesis de que el mecanismo de asociación responsable del 1<sup>er</sup> efecto sea la formación de enlaces de hidrógeno, pues en ese caso la asociación estaría más favorecida en etanol que en agua.

Por otra parte, los valores de la distancia entre las bases son muy parecidos en todos estos disolventes.

El examen de los términos en que puede dividirse la energía de interacción global, no muestra tampoco diferencias significativas

que acompañen al cambio de disolvente. Únicamente en AMP se observa un aumento de la interacción entre bases al pasar de medio acuoso a medio hidroalcohólico, junto con un descenso en la contribución de otras interacciones que favorecen la asociación, entre las cuales se encuentran las interacciones hidrofóbicas.

Como la solubilidad de las unidades monoméricas en etanol es inferior a la que tienen en disolución acuosa, la existencia del 2° efecto se ve desfavorecida en etanol con respecto al agua. Sin embargo, en los casos en que ha sido posible abarcar un intervalo de concentraciones comparable al de las disoluciones acuosas (mezclas etanol+agua), o bien no existe el 2° efecto, o bien el valor de  $K_p$  es inferior al correspondiente a medio acuoso. Estos hechos indican que el mecanismo de asociación responsable del 2° efecto está desfavorecido en presencia de etanol.

#### Influencia del dimetil sulfóxido

La limitación más importante en la interpretación de los resultados obtenidos al utilizar DMSO como disolvente, estriba en la imposibilidad práctica de extender las mediciones a concentraciones inferiores a  $10^{-4}M$ , por lo que la extrapolación del valor de  $\epsilon_1$  puede conducir a valores de  $K_2$  demasiado bajos. La disminución de  $K_2$  al pasar de medio acuoso a DMSO parece excluir, en principio, la posibilidad de que el mecanismo de asociación correspondiente al 1<sup>er</sup> efecto se deba a la formación de enlace de hidrógeno; sin embargo, el examen de los valores de la energía de interacción entre bases, para el 1<sup>er</sup> efecto, indica que dicha interacción aumenta notablemente en DMSO, lo que apoya la hipótesis de formación de enlaces de hidrógeno en este efecto. Ahora bien, la

contribución de "otras interacciones" adquiere en DMSO un valor positivo y elevado, lo que puede reflejar la desaparición o, al menos, un notable debilitamiento de las interacciones solvofóbicas que favorecen la asociación. El balance de estos dos factores tiene como resultado un descenso neto en la energía global de interacción, y por tanto una disminución en  $K_2$ .

La desaparición del 2° efecto o la disminución en  $K_p$  en adenosina y AMP, respectivamente, al utilizar DMSO como disolvente, puede interpretarse en el sentido de que, si bien la interacción entre las bases está favorecida con respecto al agua, la contribución de "otras interacciones" se opone a la asociación por no existir las interacciones hidrofóbicas. Sin embargo, en adenosina no se observa una variación significativa al pasar de medio acuoso a DMSO.

Conclusiones generales acerca de la influencia del disolvente

- 1) El mecanismo de asociación responsable del 1<sup>er</sup> efecto es tal que la energía de interacción entre las bases aumenta al pasar de medio acuoso a etanol y, sobre todo, a dimetilsulfóxido. Ello es compatible con la hipótesis de formación de enlaces de hidrógeno. Este fenómeno no es tan notable en etanol como en DMSO, lo que puede indicar que el etanol resulta menos favorable a la formación de enlaces de hidrógeno entre las unidades monoméricas. Sin embargo, la desaparición o debilitamiento de las interacciones

ciones hidrofóbicas en DMSO, contenidas en el término de energía de "otras interacciones", tiene como resultado un descenso global en la fuerza inductora de la asociación, con respecto al agua.

- 2) El mecanismo de asociación responsable del 2° efecto está claramente desfavorecido en los disolventes orgánicos, y en las mezclas de éstos con agua, respecto del medio acuoso, hasta el punto de que dicho efecto puede llegar a desaparecer. Si la interacción correspondiente es de apilamiento, no puede darse en disolventes orgánicos, donde sólo se daría enlace de hidrógeno. La evidente oposición a la asociación que representan las energías correspondientes a "otras interacciones" en DMSO, podría contribuir a explicar que las interacciones hidrofóbicas sean la causa determinante de que se produzca en medio acuoso la asociación por apilamiento.

## 2.2. INFLUENCIA DE SALES ESTABILIZADORAS Y DESESTABILIZADORAS DE LA ESTRUCTURA DEL AGUA

Una vez realizado el estudio relativo a la influencia del disolvente, expuesto en el apartado anterior, se han analizado, principalmente en disoluciones acuosas, los restantes factores fisicoquímicos que pueden tener influencia sobre la autoasociación de las unidades monoméricas.

Consideramos conveniente iniciar el estudio de estos factores analizando la influencia que, sobre las interacciones entre el soluto y el medio, ejercen diversas sales que modifican la estructura del agua; ya que las interacciones moleculares de los solutos dependen, en una parte muy importante, de las interacciones disolvente-disolvente, es decir, de la estructura del disolvente y de la variación de las propiedades de éste en función de las modificaciones que pueda experimentar dicha estructura.

Es evidente que, para poder interpretar la influencia que ejercen diversos iones sobre la estructura del agua, es necesario, en primer lugar, conocer dicha estructura, que como es sabido, es de una gran complejidad, habiéndose dedicado a su estudio fisicoquímico un gran número de trabajos en los últimos años. La dificultad que presenta la descripción de la estructura del agua en estado líquido no se debe exclusivamente a las propiedades singulares de este disolvente, sino al problema general que supone el conocimiento del estado líquido, debido a su extraordinaria complejidad.

### ESTRUCTURA DEL AGUA

Aunque se han propuesto varios modelos para la estructura del agua líquida, no hay ninguno que resulte enteramente satisfactorio, en el sentido de que justifique todos los hechos experimentales conocidos sobre ella, sino que, como es natural, cada uno de ellos explica sólo determinadas características. La evidencia para los modelos de estructura del agua es generalmente indirecta: se calculan una o más de las propiedades físicas del agua, basándose en el modelo propuesto, y se comparan con los datos conocidos experimentalmente. Por tanto, puede deducirse que los modelos propuestos son complementarios, y en conjunto ayudan a interpretar el comportamiento de las disoluciones acuosas en función de la estructura del agua líquida.

Todos los modelos propuestos se pueden clasificar, esquemáticamente (1), en dos grandes grupos:

1) Modelos continuos.- Son aquéllos que consideran al agua líquida formada por una única entidad estructural, que se extiende por todo el volumen espacial del líquido. Son los modelos denominados también "uniformistic" o "random network" (2).

2) Modelos mixtos.- Denominados también "cluster" o "cage", son aquéllos que postulan la existencia de dos o más unidades estructurales diferentes, que coexisten en equilibrio (3).

Entre los primeros, cabe citar los modelos de Pople (4) y Bernal (5). En el modelo de Pople se considera una única entidad estructural tridimensional, en la cual la mayoría de los enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua están "relajados" o "distorsionados", ya que la fuerza necesaria para deformar el enlace  $-O-H...O$  es muy pequeña.

Este tipo de modelos continuos, que fue de amplia aceptación hace algunos años, ha pasado a segundo término, pues los modelos mixtos explican muchas propiedades no sólo del agua pura, sino también de disoluciones acuosas. En este segundo tipo de modelos, la estructura del agua se contempla como una mezcla de una entidad estructural denominada "ice-like", consistente en una malla tridimensional incompleta, formada por moléculas unidas por enlace de hidrógeno (coordinación tetraédrica), y de otros componentes estructurales, como moléculas libres o unidas entre sí por enlace de hidrógeno, pero sin formar ninguna estructura ordenada (2).

Una de las revisiones más recientes y completas sobre la estructura del agua y de las mezclas acuosas, es la de Blandamer, en la que se exponen con detalle las ideas generales que acabamos de indicar (6).

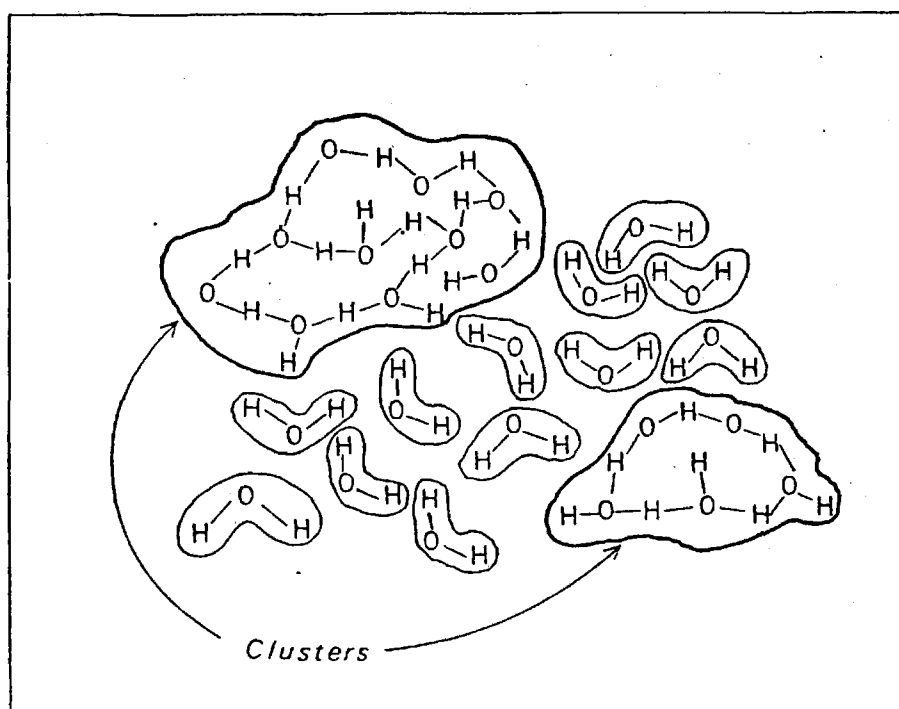
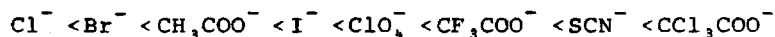


FIG. 2.8.- Modelo de la estructura del agua como una mezcla de "clusters" y moléculas aisladas. Según G. Némethy y H.A. Scheraga, J. Chem. Phys., 36, 3382 (1962).

Una de las líneas de investigación de las interacciones moleculares, a la que se dedica en la actualidad una atención preferente, es la del estudio de la "variación dirigida" de la estructura y propiedades del disolvente, particularmente la producida por las sales estabilizadoras y desestabilizadoras de la estructura del agua.

Son conocidos desde hace algún tiempo los efectos que produce la presencia de solutos iónicos (así como su dependencia con la naturaleza y la concentración de éstos), en los espectros UV y en las cur

vas de fusión de los ácidos nucleicos y polinucleótidos, y que pueden resumirse en la variación de la absorptividad molar y en la estabilización o desestabilización de la estructura secundaria, reflejada por la variación de la temperatura de fusión  $T_m$ , en presencia de los mismos (7-11). Se ha estudiado especialmente la influencia de los cationes de metales alcalinos y alcalinotérreos, en particular la del ión  $Mg^{2+}$ , por su importancia fisiológica (7,8,12-19). Por otra parte, se ha observado que ciertos aniones tienen poder desnaturizante, y que este poder depende mucho de la naturaleza del anión (10), aumentando en el orden:



Asimismo, se ha dedicado una gran atención, no sólo a la naturaleza de los iones que interaccionan con el ácido nucleico, sino también a su concentración en disolución y fuerza iónica (11,20-22). Se ha observado que el aumento de la concentración, hasta  $\sim 1M$ , de ciertas sales, da lugar a un aumento del  $T_m$  del DNA, y por consiguiente a la estabilización de la doble cadena del mismo. Como una posible interpretación de este hecho, se ha sugerido que el electrolito apantalla las fuerzas de repulsión electrostática entre los grupos fosfato de cada una de las cadenas (23). Sin embargo, estas mismas sales se convierten en poderosos agentes desnaturizantes cuando su concentración sigue aumentando (10,11,21), lo cual podría deberse a la capacidad de los aniones de las sales para destruir los "enlaces hidrofóbicos". Dentro de esta línea de trabajo, se han deducido ecuaciones empíricas que relacionan el  $T_m$  de ácidos nucleicos y polinucleótidos, con el logaritmo de la concentración de la sal (20,24-26).

Una revisión bibliográfica de los trabajos recientes indica

que el estudio de la influencia de solutos iónicos se sigue centrando principalmente en el efecto que producen los mismos en la estabilidad estructural de biopolímeros (DNA, RNA, proteínas, polinucleótidos), siendo comparativamente menos numerosos los trabajos que estudian la influencia que ejercen las sales disueltas, sobre la interacción y asociación de las unidades monoméricas libres o de los oligómeros en disolución acuosa.

Se ha estudiado por diversas técnicas, principalmente espectroscópicas, el efecto de diversas sales en el equilibrio de apilamiento de dinucleótidos (27,28) y en los complejos de adenosina y desoxiadenosina con poli U (29,30). Los cambios debidos a la presencia de iones, son mínimos en el caso de nucleósidos y nucleótidos, pero, por el contrario, resultan bastante significativos en oligómeros y polímeros.

En el trabajo relacionado más directamente con el objeto de la presente Memoria, publicado por Maevskii y Sukhorukov (31), se estudia el efecto de las sales ( $\text{ClO}_4\text{Na}$ ,  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ ,  $\text{ClLi}$ ,  $\text{ClNa}$  y  $\text{ClK}$ ) que estabilizan y desestabilizan la estructura del agua, sobre la autoasociación de adenosina. Los resultados obtenidos por estos autores indican que al aumentar la concentración de  $\text{ClO}_4\text{Na}$  disminuye la constante de asociación mientras que al aumentar la concentración de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ , dicha constante aumenta; en ambos casos, significativamente. Al aumentar la concentración de las otras sales, la constante aumenta en el orden  $\text{ClNa} > \text{ClLi} > \text{ClK}$ , pero de forma menos acusada.

En todos estos estudios se intenta relacionar las variaciones que introduce la presencia de iones en disolución en el equilibrio de asociación de los monómeros, con la naturaleza de la sal presente y

especialmente con su acción "formadora" o "destructora" de la estructura del disolvente (32,33).

Las disoluciones de sales en que los iones produzcan una ordenación en la estructura del disolvente, dificultarán en cierto grado la interacción monómero-agua, y por tanto, favorecerán la asociación entre monómeros, siempre y cuando en esta asociación jueguen un papel importante las interacciones hidrofóbicas.

Otra interpretación considera la posibilidad de que se establezca una interacción directa, de tipo electrostático, entre el catión (e incluso el anión) y la base, nucleósido o nucleótido, con la subsiguiente formación de un complejo ión-monómero, que modificaría la interacción entre los propios monómeros. Generalmente, estos trabajos van encaminados a obtener información sobre el complejo en sí, pero ninguno dedica especial atención, y así lo hacen constar explícitamente (34), a la influencia que ejerza en la asociación intermolecular.

Como se ha indicado anteriormente, pueden distinguirse dos grupos distintos de solutos: los "estabilizadores" y los "desestabilizadores" de la estructura del agua. En el caso de las sales inorgánicas, algunas de ellas, como los percloratos, desestabilizan notablemente la estructura del agua, y otras, como los sulfatos, la estabilizan. Entre estos dos casos extremos se encuentran, por ejemplo, los cloruros, que no influyen notablemente sobre la estructura del agua. Sin embargo, la investigación de los efectos de las sales sobre las propiedades del agua, no es la mejor "aproximación" para tratar de explicar su influencia sobre la estabilidad de la estructura de los ácidos nucleicos, sino que debe estudiarse además su influencia sobre la interacción de las ba

ses en el agua (35).

En este trabajo se intenta estimar la influencia que la presencia de estas sales en disolución, ejerce sobre la autoasociación de las unidades monoméricas, sin abordar un estudio profundo de su acción sobre la estructura del agua o de la formación de complejos ión-monómero. Los correspondientes parámetros de asociación se comparan con los obtenidos en el cap. 1, para disoluciones en tampón fosfato, que corresponden a las "condiciones normalizadas" en este laboratorio y con las obtenidas en el apartado 2.1., en disoluciones en agua bidestilada.

Las experiencias se han realizado en condiciones similares a las efectuadas en tampón fosfato. Con ello, hemos aplicado al estudio de la influencia de sales, la idea fundamental de nuestro trabajo de estudiar un intervalo de concentraciones lo más amplio posible, de 5 órdenes de magnitud, lo cual supone el haber puesto de manifiesto, por primera vez, el 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico e iniciado la interpretación del mecanismo de asociación que lo determina. Se ha estudiado la influencia de diversas sales sobre la autoasociación de adenosina, y de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  en 5'-AMP. Las sales utilizadas ( $\text{ClLi}$ ,  $\text{ClK}$ ,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ,  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  y  $\text{ClO}_4\text{Na}$ ) han sido de Merck, de pureza "para análisis", excepto el  $\text{ClLi}$ , de calidad "Suprapur".

Con el objeto de no introducir variaciones en la fuerza iónica, que es una variable fisicoquímica que también puede influir en la autoasociación de las unidades monoméricas, hemos dedicado especial atención a las disoluciones salinas de concentración 0,1 M, a las que, en el caso de electrolitos 1:1, les corresponde una fuerza iónica de 0,1, idéntica a la de las disoluciones en tampón fosfato. En el caso del  $\text{ClK}$ ,  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  y  $\text{ClO}_4\text{Na}$ , se han estudiado también disoluciones salinas de con-

centración muy superior, para comprobar el efecto de una variación notable en la fuerza iónica, sobre el equilibrio de autoasociación.

La presencia de aniones da lugar a variaciones muy significativas en los valores de los parámetros de asociación, pero el efecto de los cationes es también notable, como revelan los parámetros de asociación correspondientes a las disoluciones de los diversos cloruros.

#### Resultados experimentales

Para la presentación de los resultados experimentales se ha adoptado un esquema análogo al del apartado 2.1., con las siguientes particularidades:

1) Los resultados se han agrupado en los siguientes epígrafes:

2.2.1. Influencia de cloruros.

2.2.2. Influencia de sulfatos.

2.2.3. Influencia de percloratos.

2) Para cada tipo de sal utilizada, se dan las representaciones semilogarítmicas de la absorptividad molar,  $\epsilon$ , frente a la concentración molar, c, para las unidades monoméricas estudiadas (fig. 2.9.-2.11).

2.2.1. Influencia de cloruros

TABLA 2.7.

Resumen de los valores de los parámetros obtenidos con el programa de cálculo "HIPOCROM"

Sal	Intervalo de concentraciones	$\epsilon_1$	$\epsilon_\infty$	P	r
ADENOSINA					
ClLi 0,1M	$10^{-5}$ - $4 \cdot 10^{-3}$ M	15640	12840±90	0,71±0,05	0,969
	$5 \cdot 10^{-3}$ - $2,5 \cdot 10^{-2}$ M	"	11300±200	2,4 ±0,3	0,959
Cl <sub>2</sub> Mg 0,1M	$2 \cdot 10^{-6}$ - $3,2 \cdot 10^{-3}$ M	15740	13500±200	0,46±0,05	0,933
	$8 \cdot 10^{-3}$ - $4 \cdot 10^{-2}$ M	"	10000±100	5,4 ±0,2	0,998
ClK 0,1M	$5 \cdot 10^{-6}$ - $10^{-2}$ M	16200	13610±50	0,39±0,01	0,992
	$1,5 \cdot 10^{-2}$ - $4 \cdot 10^{-2}$ M	"	10400±700	7±2	0,907
ClK 3M	$8 \cdot 10^{-6}$ - $10^{-2}$ M	15920	13490±50	0,60±0,02	0,994
	$1,2 \cdot 10^{-2}$ - $2 \cdot 10^{-2}$ M	"	10100±200	7,5 ±0,4	0,998
AMP					
Cl <sub>2</sub> Mg 0,03M	$6 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-3}$ M	15850	12980±90	0,41±0,02	0,984
	$7 \cdot 10^{-3}$ - $5 \cdot 10^{-2}$ M	"	11300±300	2,6 ±0,7	0,905
Cl <sub>2</sub> Mg 0,1M	$5 \cdot 10^{-6}$ - $3,5 \cdot 10^{-3}$ M	15870	12700±100	0,51±0,03	0,982
	$5 \cdot 10^{-3}$ - $5 \cdot 10^{-2}$ M	"	9800±300	4,7 ±0,5	0,985

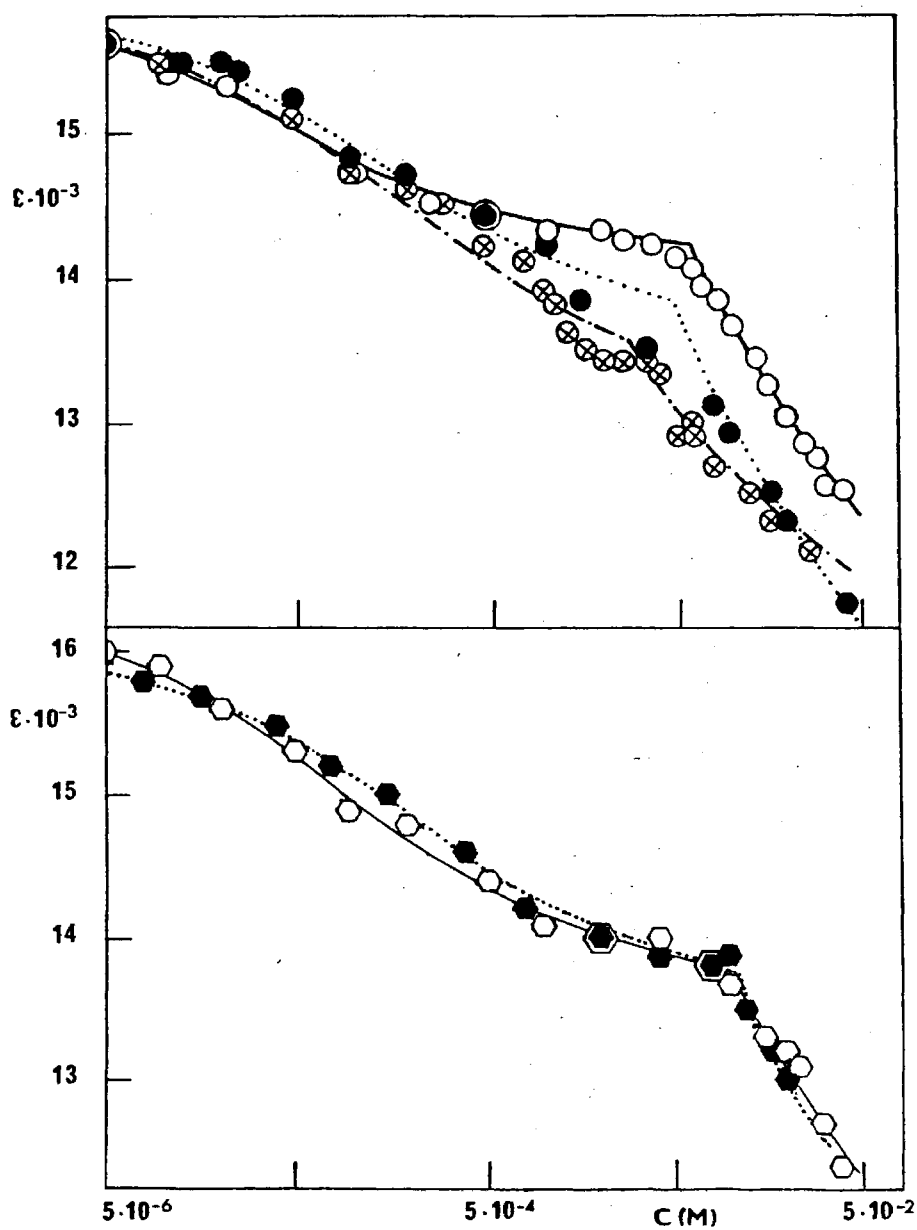


Fig. 2.9.- Absortividad molar de Adenosina.

—○— T. fosfato; —⊗— ClLi 0,1M; .....●..... Cl<sub>2</sub>Mg 0,1M;  
 —◻— ClK 0 1M; .....●..... ClK 3M.

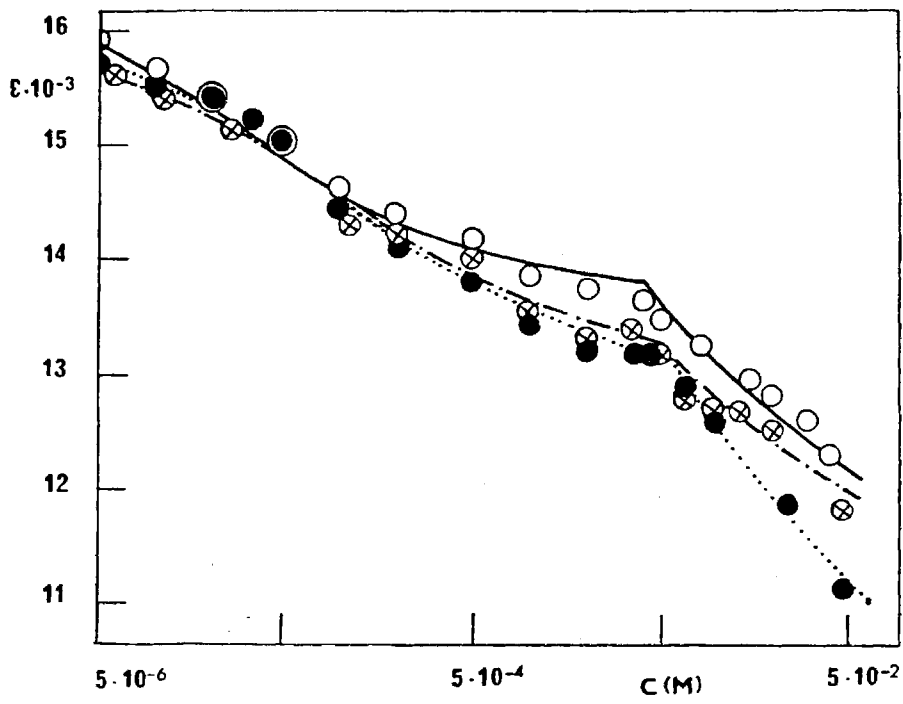


Fig. 2.10.- Absortividad molar de 5'-AMP.

—○— T. fosfato; —⊗—  $Cl_2Mg$  0,03M; —●—  $Cl_2Mg$  0,1M.

2.2.2. Influencia de sulfatos

TABLA 2.8.

Resumen de los valores de los parámetros obtenidos con el programa de cálculo "HIPOCROM"

Sal	Intervalo de concentraciones	$\epsilon_1$	$\epsilon_\infty$	p	r
ADENOSINA					
SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 0,1M	5.10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-2</sup> M	16050	13400±100	0,43±0,03	0,971
	1,4.10 <sup>-2</sup> -4.10 <sup>-2</sup> M	"	7700±500	12±1	0,985
SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 1M	5.10 <sup>-6</sup> -6.10 <sup>-3</sup> M	15870	12700±80	0,80±0,03	0,990
	6,7.10 <sup>-3</sup> -2.10 <sup>-2</sup> M	"	10600±300	3,7 ±0,5	0,951

2.2.3. Influencia de percloratos

TABLA 2.9.

Resumen de los valores de los parámetros obtenidos con el programa de cálculo "HIPOCROM"

Sal	Intervalo de concentraciones	$\epsilon_1$	$\epsilon_\infty$	p	r
ADENOSINA					
ClO <sub>4</sub> Na 0,1M	10 <sup>-5</sup> -1,25.10 <sup>-2</sup> M	15890	13780±70	0,46±0,03	0,980
	2.10 <sup>-2</sup> -5.10 <sup>-2</sup> M	"	6000±1000	19±3	0,968
ClO <sub>4</sub> Na 2M	5.10 <sup>-6</sup> -1,25.10 <sup>-2</sup> M	15620	13900±100	0,31±0,04	0,925
	2.10 <sup>-2</sup> -5.10 <sup>-2</sup> M	"	5000±1000	24±4	0,957

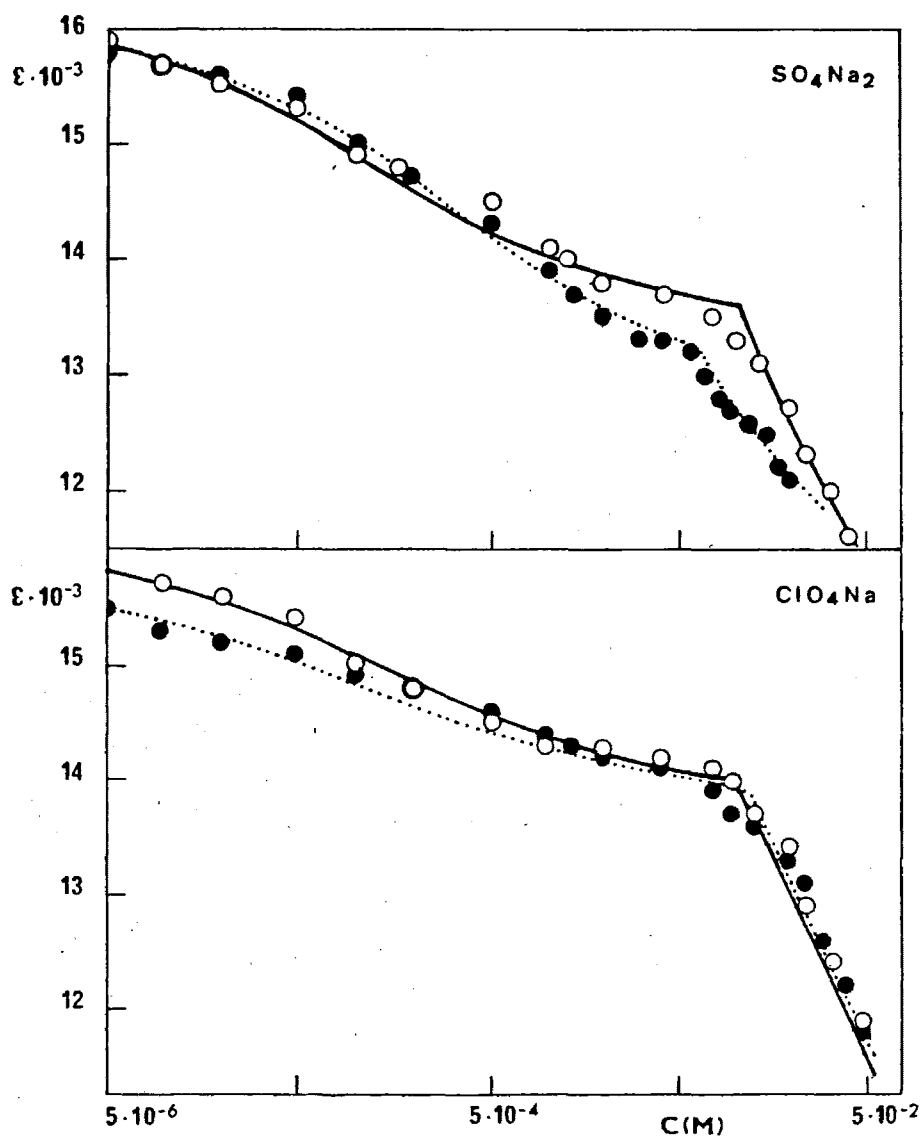


Fig. 2.11.- Absortividad molar de Adenosina en  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  (—○— 0,1M; ···●··· 1M) y  $\text{ClO}_4\text{Na}$  (—○— 0,1M; ···●··· 2M).

TABLA 2.10.

Influencia de sales. Parámetros de autoasociación

ADENOSINA						
SAL	1 <sup>er</sup> efecto			2° efecto		
	$K_2$	$\delta_2$	h(%)	$K_p$	$\delta_p$	h(%)
Agua bidestilada	$10 \cdot 10^3$	3150	19,1	500	5600	34,0
Tampón fosfato	$16 \cdot 10^3$	1820	11,5	120	5400	34,1
ClLi 0,1M	$2,8 \cdot 10^3$	2800	18,0	750	4300	28,0
Cl <sub>2</sub> Mg 0,1M	$5 \cdot 10^3$	2200	14,0	200	5700	36,0
ClK 0,1M	$8,5 \cdot 10^3$	2590	16,0	120	5800	35,8
ClK 3M	$3,4 \cdot 10^3$	2430	15,3	100	5800	36,6
SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 0,1M	$7 \cdot 10^3$	2650	16,5	60	8400	16,5
SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 1M	$2,5 \cdot 10^3$	3170	20,0	400	5300	33,4
ClO <sub>4</sub> Na 0,1M	$5 \cdot 10^3$	2110	13,3	30	10000	62,9
ClO <sub>4</sub> Na 2M	$9 \cdot 10^3$	1700	10,9	19	11000	70,4
AMP						
Agua bidestilada	$20 \cdot 10^3$	3410	21,0	800	4900	29,9
Tampón fosfato	$48 \cdot 10^3$	3120	18,6	700	5400	32,0
Cl <sub>2</sub> Mg 0,03M	$8 \cdot 10^3$	2870	18,0	700	4600	29,0
Cl <sub>2</sub> Mg 0,1M	$6 \cdot 10^3$	3200	20,0	280	6100	38,0

### Interpretación de resultados

Para la interpretación de los resultados obtenidos utilizaremos especialmente los valores de las constantes de asociación que se recogen en la tabla 2.10.. Únicamente haremos uso de las distancias entre bases y las energías de interacción en la adenosina (tablas 2.11., 2.12. y 2.13.). En este caso, la contribución principal al término  $\Delta G_{\text{otr.int.}}$  son las interacciones hidrofóbicas, y por tanto se designará a dicho término como  $\Delta G_h$ .

Las curvas de hipocromicidad correspondientes a los distintos sistemas estudiados, muestran que en todos ellos existe doble efecto hipocrómico, a diferencia de lo observado en el apartado 2.1. para los diversos disolventes. Este hecho revela que la influencia de los distintos medios salinos sobre la autoasociación de las unidades monoméricas, no es tan acusada como la de los disolventes. Aun así, los valores de los parámetros de asociación dependen, en general, de la naturaleza de la sal presente.

Los resultados experimentales muestran que la influencia de las diversas sales sobre la autoasociación de las unidades monoméricas es muy diferente para cada uno de los dos efectos hipocrómicos. Por tanto, consideramos conveniente discutir por separado los resultados relativos a uno y otro efecto hipocrómico.

TABLA 2.11.

Influencia de sales. Distancia entre bases apiladas  
(Teoría de Tinoco-Rhodes)

ADENOSINA ( $f=0,30$ )

SISTEMA	Grado de asociación	h (%)	$\lambda_{0a}$ (Å)	$\lambda_{0a'}$ (Å)	d (Å)
Agua	Dímero	19,1	2590	2060	4,3
"	Polímero	34,0	"	"	4,7
Tampón fosfato	Dímero	11,5	"	"	5,0
" "	Polímero	34,1	"	"	4,7
ClLi 0,1M	Dímero	17,9	"	"	4,4
"	Polímero	27,7	"	"	5,0
Cl <sub>2</sub> Mg 0,1M	Dímero	14,2	"	"	4,7
"	Polímero	36,2	"	"	4,6
ClK 0,1M	Dímero	16,0	"	"	4,5
"	Polímero	35,8	"	"	4,6
ClK 3M	Dímero	15,3	"	"	4,6
"	Polímero	36,6	"	"	4,6
ClO <sub>4</sub> Na 0,1M	Dímero	13,3	"	"	4,8
"	Polímero	62,9	"	"	3,8
ClO <sub>4</sub> Na 2M	Dímero	10,9	"	"	5,1
"	Polímero	70,4	"	"	3,7
SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 0,1M	Dímero	16,5	"	"	4,5
"	Polímero	52,3	"	"	4,1
SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 1M	Dímero	20,0	"	"	4,2
"	Polímero	33,4	"	"	4,7

TABLA 2.12.

Influencia de sales. Distancia entre bases apiladas  
(Teoría de Bolton-Weiss)

ADENOSINA (f=0,30)

SISTEMA	Grado de asociación	$\lambda$ (Å)	$\epsilon_{\infty}$	$\delta$	d (Å)
Agua	Dímero	2590	13320	3150	3,4
"	Polímero	"	10900	5600	4,0
Tampón fosfato	Dímero	"	14000	1820	3,8
" "	Polímero	"	10400	5400	4,0
ClLi 0,1M	Dímero	"	12840	2800	3,4
"	Polímero	"	11300	4300	4,2
Cl <sub>2</sub> Mg 0,1M	Dímero	"	13500	2200	3,6
"	Polímero	"	10000	5700	3,9
ClK 0,1M	Dímero	"	13610	2590	3,5
"	Polímero	"	10400	5800	4,0
ClK 3M	Dímero	"	13490	2430	3,6
"	Polímero	"	10100	5800	3,9
ClO <sub>4</sub> Na 0,1M	Dímero	"	13780	2110	3,7
"	Polímero	"	6000	10000	3,3
ClO <sub>4</sub> Na 2M	Dímero	"	13900	1700	3,8
"	Polímero	"	5000	11000	3,1
SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 0,1M	Dímero	"	13400	2650	3,5
"	Polímero	"	7700	8400	3,5
SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 1M	Dímero	"	12700	3170	3,4
"	Polímero	"	10600	5300	4,0

TABLA 2.13.

Influencia de sales. Energía libre de apilamiento (kcal/mol) en Adenosina

SISTEMA	Grado de asociación	$\bar{d}$ (Å)	$\Delta G_{\mu\mu}$	$\Delta G_{\mu\alpha}$	$\Delta G_L$	$\Delta G_{\text{base-base}}$	$\Delta G_{\text{exp}}$	$\Delta G_h$
Agua	Dímero	3,8	-0,89	-0,27	-3,60	-4,8	-5,5	-0,7
"	Polímero	4,3	-1,10	-0,26	-3,49	-4,8	-3,7	+1,2
Tampón fosfato	Dímero	4,4	-0,57	-0,11	-1,50	-2,2	-5,7	-3,5
" "	Polímero	4,3	-1,10	-0,26	-3,49	-4,8	-2,8	+2,0
ClLi 0,1M	Dímero	3,9	-0,82	-0,23	-3,08	-4,1	-4,7	-0,6
"	Polímero	4,6	-0,90	-0,18	-2,33	-3,4	-3,9	-0,5
Cl <sub>2</sub> Mg 0,1M	Dímero	4,1	-0,71	-0,17	-2,28	-3,2	-5,0	-1,9
"	Polímero	4,2	-1,18	-0,30	-4,02	-5,5	-3,1	+2,4
ClK 0,1M	Dímero	4,0	-0,76	-0,20	-2,65	-3,6	-5,4	-1,7
"	Polímero	4,3	-1,10	-0,26	-3,49	-4,8	-2,8	+2,0
ClK 3M	Dímero	4,1	-0,71	-0,17	-2,28	-3,2	-4,8	-1,7
"	Polímero	4,2	-1,18	-0,30	-4,02	-5,5	-2,7	+2,8

TABLA 2.13. (continuación)

SISTEMA	Grado de asociación	$\bar{d}$ (Å)	$\Delta G_{\mu\mu}$	$\Delta G_{\mu\alpha}$	$\Delta G_L$	$\Delta G_{\text{base-base}}$	$\Delta G_{\text{exp}}$	$\Delta G_h$
ClO <sub>4</sub> Na 0,1M	Dímero	4,2	-0,66	-0,15	-1,98	- 2,8	-5,0	- 2,2
	Polímero	3,5	-2,04	-0,91	-12,00	-14,9	-2,0	+12,9
ClO <sub>4</sub> Na 2M	Dímero	4,4	-0,57	-0,11	-1,50	- 2,2	-5,4	- 3,2
	Polímero	3,4	-2,23	-1,08	-14,28	-17,6	-1,7	+15,8
SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 0,1M	Dímero	4,0	-0,76	-0,20	-2,65	- 3,6	-5,2	- 1,6
	Polímero	3,8	-1,60	-0,55	-7,33	- 9,5	-2,4	+ 7,1
SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 1M	Dímero	3,8	-0,89	-0,27	-3,60	- 4,8	-4,6	+ 0,1
	Polímero	4,3	-1,10	-0,26	-3,49	- 4,8	-3,5	+ 1,3

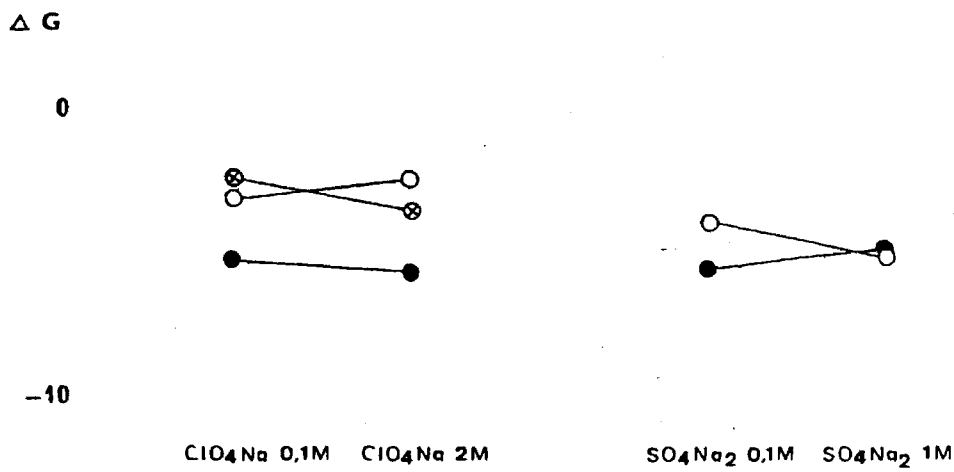
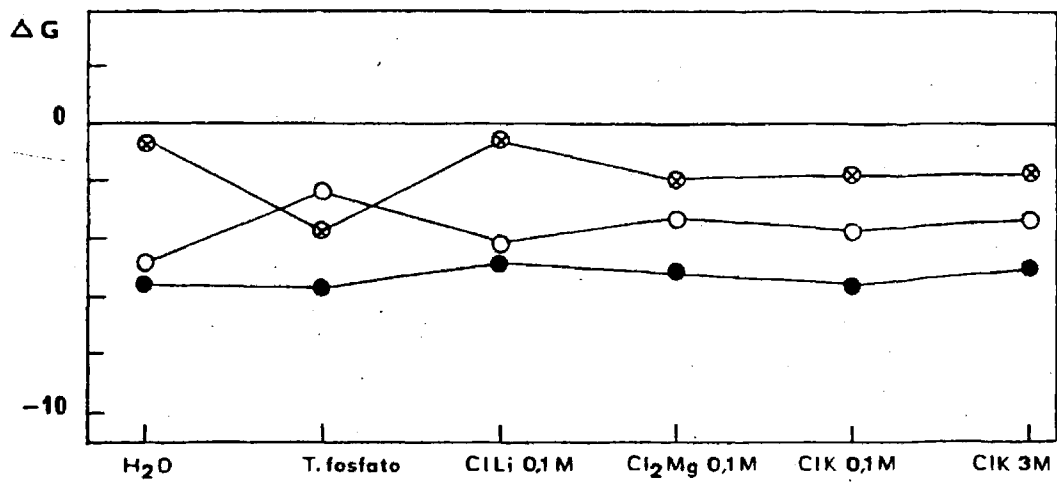


Fig. 2.12.- Influencia de sales sobre la energía de interacción en Adenosina (1<sup>er</sup> efecto hipocrómico). ○  $\Delta G_{base-base}$ ; ⊗  $\Delta G_h$ ; ●  $\Delta G_{exp}$ .

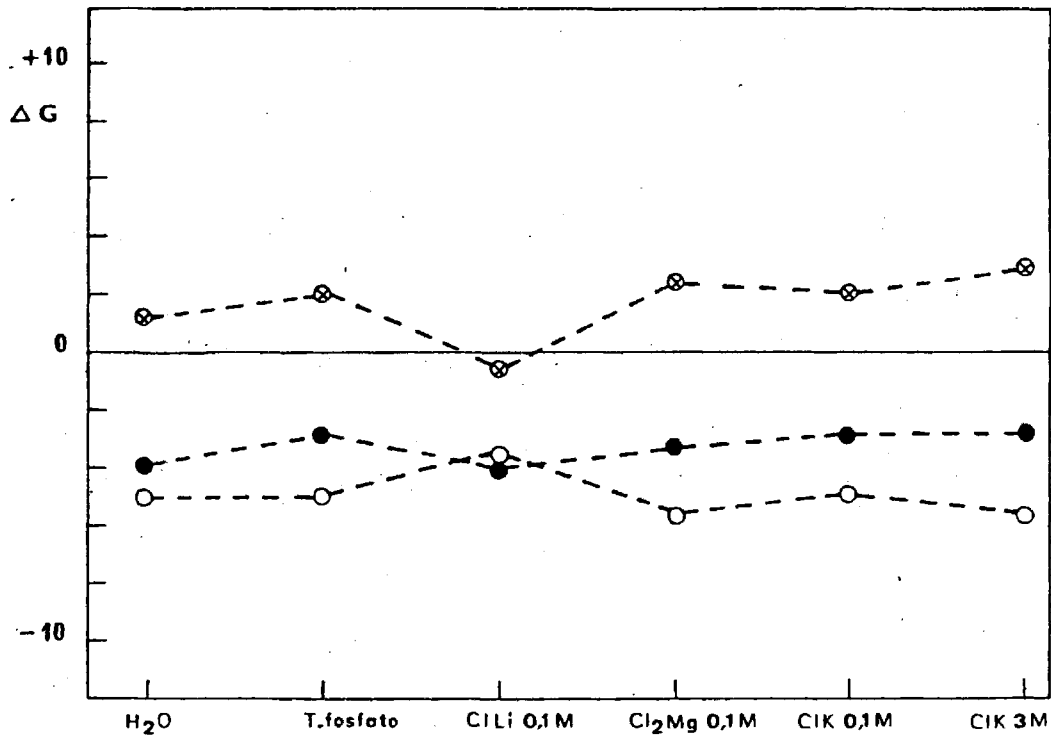


Fig. 2.13.a.- Influencia de sales sobre la energía de interacción en Adenosina (2° efecto hipocrómico).  $\circ \Delta G_{base-base}$ ;  $\otimes \Delta G_h$ ;  $\bullet \Delta G_{exp}$ .

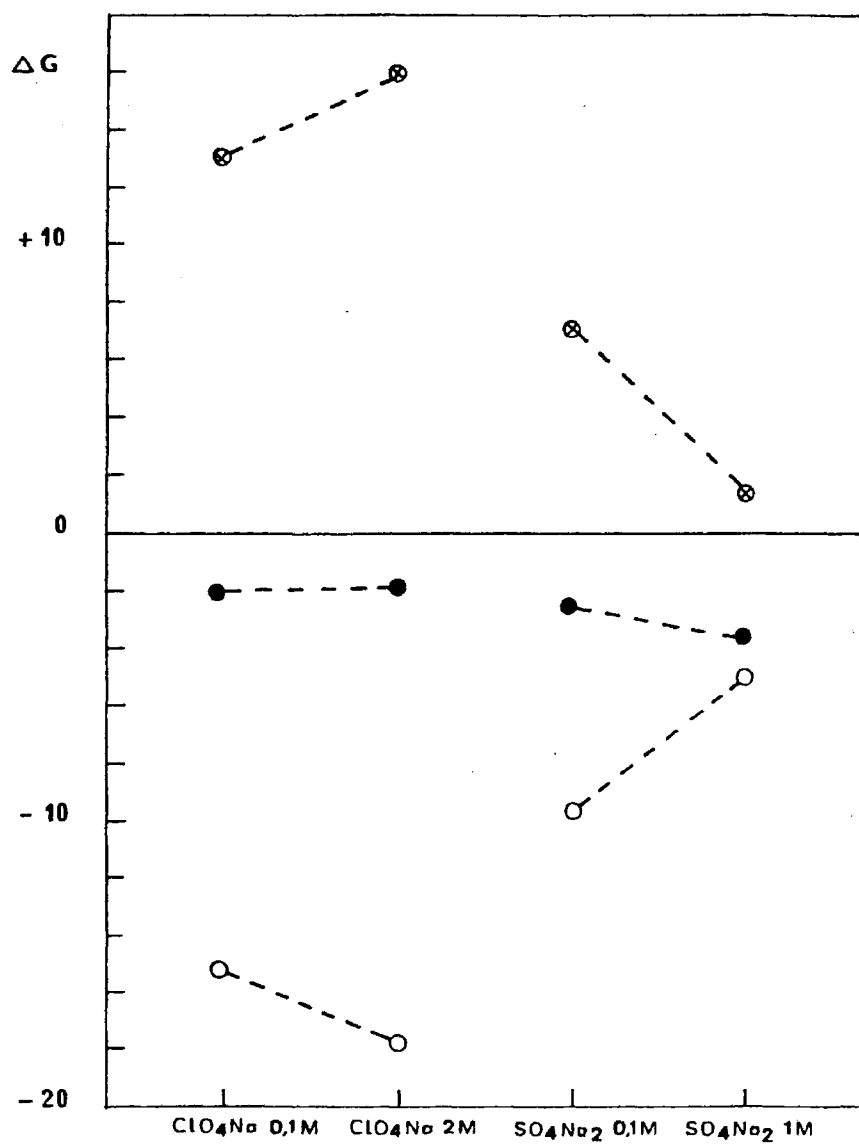


Fig. 2.13 b.- Influencia de sales sobre la energía de interacción en Adenosina (2° efecto hipocrómico).

○  $\Delta G_{\text{base-base}}$ ; ⊗  $\Delta G_{\text{h}}$ ; ●  $\Delta G_{\text{exp}}$ .

### Cloruros

1<sup>er</sup> efecto.- Los valores calculados de  $\Delta G_h$  que se dan en la Tabla 2.13., revelan que, en las disoluciones de cloruros, disminuye el valor absoluto de este término de la energía de interacción, pasando de -3,5 para la disolución en tampón fosfato, a -0,6 en ClLi, y siendo prácticamente constante para Cl<sub>2</sub>Mg y ClK, con un valor de  $\sim -1,7$ .

En relación con estos valores de  $\Delta G_h$ , los valores de  $K_2$  deben ser inferiores en todas las disoluciones de cloruros, respecto a la disolución en tampón fosfato, siendo máxima la disminución para ClLi, como en efecto ocurre (ver tabla 2.10.). Es decir, cuando  $\Delta G_h$  varía en el sentido de desfavorecer la asociación, los valores de las constantes de asociación del 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico disminuyen. Este resultado apoyaría la hipótesis de que el término  $\Delta G_h$ , que representaría fundamentalmente las interacciones hidrofóbicas, influye, si bien ligeramente, en el sentido de que al disminuir su contribución a la energía total de interacción, disminuyen los valores de  $K_2$ .

En el caso del AMP en disoluciones de Cl<sub>2</sub>Mg, se observa un comportamiento idéntico.

2° efecto.- De acuerdo con los valores calculados de  $\Delta G_h$  (tabla 2.13.), al tener signo positivo, este tipo de interacciones se opondrían a la asociación de las unidades monoméricas, cualquiera que fuera su mecanismo de interacción. Únicamente para el ClLi tiene valor negativo este término de la energía de interacción y, por tanto, en esta disolución debe resultar favorecida la interacción. En efecto, el valor de  $K_p$  para la adenosina en presencia de iones  $\text{Li}^+$ , que es de 750,

resulta notablemente superior al de  $K_p$  en tampón fosfato, que es solamente de 120. En las disoluciones de los otros cloruros,  $Cl_2Mg$  y  $ClK$ , cuyos valores de  $\Delta G_h$  son prácticamente iguales a los calculados para la disolución en tampón fosfato, los valores de  $K_p$  son también prácticamente iguales en todas las disoluciones.

Resulta significativa la correlación entre los valores de  $K_p$  y la concentración de sal empleada. En efecto, en el caso de la adenosina, cuya interacción de asociación se ha estudiado en  $ClK$  a dos concentraciones diferentes, 0,1 M y 3 M, se pone de manifiesto que, al aumentar la concentración de la sal, el valor de  $\Delta G_h$  pasa de +2,0 a +2,8; es decir, a concentración elevada de sal, la oposición a la autoasociación es más elevada, debiendo, por lo tanto, influir en el valor de  $K_p$  disminuyéndolo, como en efecto ocurre (tabla 2.10.).

Este comportamiento es idéntico al observado en el caso del AMP en disoluciones de  $Cl_2Mg$ , en los que los valores calculados para el término  $\Delta G_h$  indican que, al aumentar la concentración de la sal, aumenta la oposición a la autoasociación y, en consecuencia, disminuye el valor de  $K_p$  al pasar de la concentración 0,03 M a la 0,1 M.

En la fig. 2.14. se representan los valores de la relación  $K(ClK)/K(\text{tampón})$ , en función de la concentración de sal, que dan una idea gráfica de los órdenes de variación que se acaban de comentar.

En resumen, puede deducirse como conclusión general de las experiencias efectuadas en disoluciones de cloruros de las unidades monoméricas adenosina y AMP, que los valores de las constantes de autoasociación correspondientes tanto al 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico como al 2°, disminuyen cuando el valor de  $\Delta G_h$  no es favorable a la autoasociación.

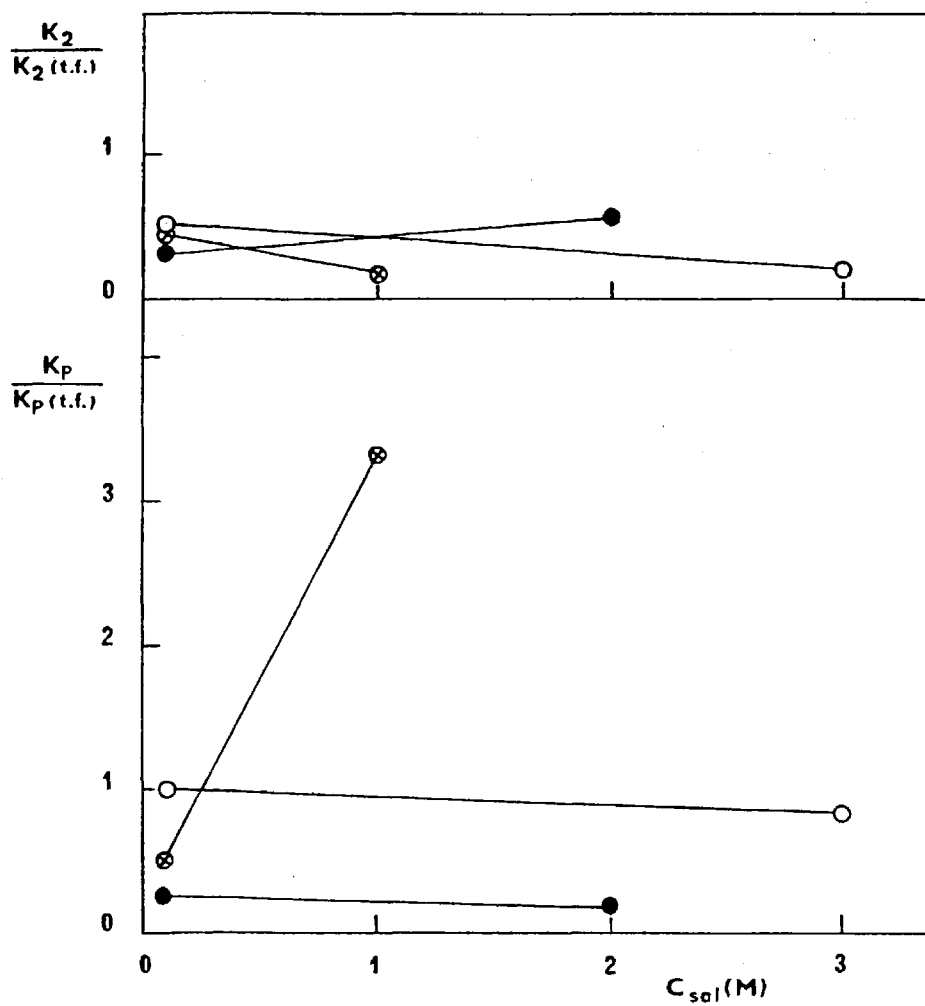


Fig. 2.14.- Influencia de sales sobre las constantes de autoasociación,  $K_2$  y  $K_p$ , de Adenosina.

○ ClK; ⊗  $SO_4Na_2$ ; ●  $ClO_4Na$ ; t.f.=t. fosfato.

### Sulfatos

Como indicamos en la introducción del estudio de la influencia de sales, el  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  estabiliza la estructura del agua, o mejor dicho, se considera que es un "agente formador" de estructura del agua, es decir, aumenta el número y tamaño de los "clusters" que ésta forma normalmente en estado líquido.

De acuerdo con las ideas generales de la fenomenología del efecto hidrofóbico, las unidades monoméricas, que ya en disolución de agua pura tienen tendencia a asociarse, en una disolución acuosa de sulfato sódico tendrán mayor facilidad para adoptar una estructura conformacional apilada entre los "clusters" de  $\text{H}_2\text{O}$ . Estos "clusters", por la acción del efecto hidrofóbico, serían "excluidos" del conjunto estructural formado por las unidades monoméricas, resultando con ello un aumento de la interacción de las unidades monoméricas entre sí y, en definitiva, la resultante global de este proceso sería una mayor tendencia a la asociación, a la formación de unidades estructurales complejas (pilas) más fuertes y, por tanto, en las disoluciones acuosas de sulfato sódico se obtendrían valores mayores para las constantes de asociación.

1er efecto:- La variación de  $\Delta G_h$  al pasar de la disolución en tampón a las disoluciones en sulfato sódico, cuyos valores damos en la tabla 2.13.:  $\Delta G_h(\text{tampón}) = -3,5$ ;  $\Delta G_h(\text{SO}_4\text{Na}_2 \text{ 0,1M}) = -1,6$ ;  $\Delta G_h(\text{SO}_4\text{Na}_2 \text{ 1M}) = +0,1$ ; indican que el  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  desfavorece la interacción a la concentración 0,1M, y se opone a ella a la concentración 1M. En consecuencia, los valores de  $K_2$  deben disminuir en este orden. Los resultados experimentales confirman esta previsión, ya que  $K_2(\text{tampón}) = 16 \cdot 10^3$ ;  $K_2(\text{SO}_4\text{Na}_2 \text{ 0,1M}) = 7 \cdot 10^3$  y  $K_2(\text{SO}_4\text{Na}_2 \text{ 1M}) = 2,5 \cdot 10^3$ .

Este resultado, que es opuesto a la hipótesis inicial, basada en la acción estabilizante del  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ , de que los valores de las constantes de asociación deben ser mayores en disolución de esta sal, debe ser interpretado en el sentido de que el mecanismo de asociación responsable del 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico, no está condicionado por el efecto hidrofóbico, lo cual puede constituir un argumento en favor de la interpretación de que dicho efecto hipocrómico corresponde a la formación de enlaces de hidrógeno o de dimerización por apilamiento, en cuyo caso el efecto hidrofóbico tendría una importancia mucho menor.

2° efecto.- Los valores de  $\Delta G_h$ , dados en la tabla 2.13., son los siguientes:  $\Delta G_h(\text{tampón})=+2,0$ ;  $\Delta G_h(\text{SO}_4\text{Na}_2, 0,1\text{M})=+7,1$ ;  $\Delta G_h(\text{SO}_4\text{Na}_2, 1\text{M})=+1,3$ . La variación de  $\Delta G_h$  con la concentración de sal indica que, al aumentar ésta, se favorece la asociación. En consecuencia, los valores de  $K_p$  deben aumentar en este orden al aumentar la concentración de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ , como puede verse en la tabla 2.10.:  $K_p(\text{tampón})=120$ ;  $K_p(\text{SO}_4\text{Na}_2, 0,1\text{M})=60$ ;  $K_p(\text{SO}_4\text{Na}_2, 1\text{M})=400$ .

Este resultado está de acuerdo con la hipótesis de que el mecanismo de asociación correspondiente al 2° efecto hipocrómico da lugar a un apilamiento vertical de las unidades monoméricas, en cuyo caso estaría favorecido por el aumento de la interacción hidrofóbica, tal como revelan los valores de  $\Delta G_h$  anteriores.

En la fig. 2.14. se representan gráficamente los valores de la relación  $K(\text{SO}_4\text{Na}_2)/K(\text{tampón})$ , que dan una idea gráfica de los órdenes de variación que se acaban de comentar.

En resumen, los resultados experimentales permiten establecer las siguientes conclusiones: 1°) las interacciones hidrofóbicas no

ejercen una influencia apreciable sobre el mecanismo de asociación correspondiente al 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico; 2°) el aumento del valor de la constante de asociación  $K_p$ , correspondiente al 2° efecto hipocrómico, al aumentar la concentración de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ , es compatible con la hipótesis de que las interacciones hidrofóbicas son el factor condicionante del fenómeno de apilamiento.

#### Percloratos

Como ya indicamos, el  $\text{ClO}_4\text{Na}$  "desestabiliza" la estructura del agua, y por tanto, en las disoluciones acuosas de  $\text{ClO}_4\text{Na}$  deben disminuir los valores de las constantes de asociación de las unidades monoméricas, tanto más cuanto mayor sea la concentración de la sal.

1<sup>er</sup> efecto.- La variación de  $\Delta G_h$  al pasar de la disolución en tampón a las disoluciones en  $\text{ClO}_4\text{Na}$ , cuyos valores damos en la tabla 2.13.:  $\Delta G_h(\text{tampón}) = -3,5$ ;  $\Delta G_h(\text{ClO}_4\text{Na } 0,1\text{M}) = -2,2$ ;  $\Delta G_h(\text{ClO}_4\text{Na } 2\text{M}) = -3,2$ ; indica que el  $\text{ClO}_4\text{Na}$  desfavorece ligeramente la interacción a concentración 0,1M, pero a concentración 2M el valor de  $\Delta G_h$  es aproximadamente el mismo del correspondiente al tampón fosfato. En consecuencia, los valores de  $K_2$  deben disminuir ligeramente, siendo menos acusada esta disminución a la concentración 2M. Los resultados experimentales confirman esta previsión, ya que  $K_2(\text{tampón}) = 16 \cdot 10^3$ ;  $K_2(\text{ClO}_4\text{Na } 0,1\text{M}) = 5 \cdot 10^3$  y  $K_2(\text{ClO}_4\text{Na } 2\text{M}) = 9 \cdot 10^3$ .

Este resultado concuerda con la previsión de que, en disoluciones de  $\text{ClO}_4\text{Na}$ , deben disminuir los valores de las constantes de asociación. Sin embargo, al aumentar la concentración de  $\text{ClO}_4\text{Na}$ , la disminución de  $K_2$  debería ser mayor, en contra de lo observado. Esta contradicción puede interpretarse de una manera análoga a como se hizo

para el 1<sup>er</sup> efecto de las disoluciones en sulfato sódico.

2° efecto.- Los valores de  $\Delta G_h$ , dados en la tabla 2.13., son los siguientes:  $\Delta G_h$  (tampón)=+2,0;  $\Delta G_h$  (ClO<sub>4</sub>Na 0,1M)=+12,9;  $\Delta G_h$  (ClO<sub>4</sub>Na 2M)=+15,8. La variación de  $\Delta G_h$  con la concentración de ClO<sub>4</sub>Na indica que, al aumentar ésta, se desfavorece la asociación. Por consiguiente, los valores de  $K_p$  deben disminuir en este orden, como puede verse en la tabla 2.10.:  $K_p$  (tampón)=120;  $K_p$  (ClO<sub>4</sub>Na 0,1M)=30;  $K_p$  (ClO<sub>4</sub>Na 2M)=19.

Este resultado está de acuerdo con la hipótesis de que el mecanismo de asociación correspondiente al 2° efecto hipocrómico da lugar a un apilamiento vertical de las unidades monoméricas, en cuyo caso estaría desfavorecido por la disminución de la interacción hidrofóbica, tal como revelan los valores de  $\Delta G_h$  anteriores.

En la fig. 2.14. se representan gráficamente los valores de la relación  $K(\text{ClO}_4\text{Na})/K(\text{tampón})$ , que dan una idea gráfica de los órdenes de variación que se acaban de comentar.

En resumen, los resultados experimentales permiten establecer las mismas conclusiones que se han comentado para las disoluciones en sulfato sódico, en el sentido de que la influencia del ClO<sub>4</sub>Na sobre el 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico no es significativa, y la que ejerce sobre el 2° efecto hipocrómico es coherente con la hipótesis de que las interacciones hidrofóbicas son el factor condicionante del fenómeno de apilamiento, ya que al disminuir éstas, disminuyen paralelamente los valores de  $K_p$ .

Conclusiones generales acerca de la influencia de sales

- 1) La influencia de cloruros, sulfatos y percloratos sobre la variación de  $K_2$  -en función del efecto de estas sales sobre la estructura del agua- puede considerarse que no es significativa. En todo caso, el efecto hidrofóbico no parece ser un factor determinante en el mecanismo de asociación correspondiente al 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico.
- 2) La influencia de cloruros y percloratos sobre el 2° efecto hipocrómico está de acuerdo con que la disminución de  $K_p$  en ambos casos se debe a una disminución de las interacciones hidrofóbicas, más acusada en el caso de los percloratos, que son los que más desestabilizan la estructura del agua.
- 3) La influencia de los sulfatos sobre el 2° efecto hipocrómico está de acuerdo con que el aumento de  $K_p$  al aumentar la concentración de sal, se debe a un aumento de las interacciones hidrofóbicas. Esta variación de  $K_p$ , mucho más acusada que en cloruros y percloratos, se podría interpretar en el sentido de que la acción estabilizadora de la estructura del agua por los sulfatos es mucho más acusada que la acción desestabilizadora de percloratos y cloruros.
- 4) La diferente influencia de las sales utilizadas sobre

los dos efectos hipocrómicos, puede constituir una evidencia indirecta de que los mecanismos de asociación responsables de cada uno de ellos son diferentes, y de que el 2° efecto se debe, fundamentalmente, al apilamiento de las unidades monoméricas, por lo que debe ser especialmente sensible a las interacciones hidrofóbicas.

- 5) Estas conclusiones son compatibles con las establecidas en el estudio de la influencia del disolvente, en relación con la intervención de las interacciones hidrofóbicas en la autoasociación de las unidades monoméricas.

### 2.3. INFLUENCIA DEL pH

Dentro del estudio fisicoquímico de los ácidos nucleicos en disolución acuosa, se ha dedicado una especial atención a la influencia que el pH del medio tiene sobre los equilibrios de ionización, las diversas formas tautoméricas y los distintos estados conformacionales de las unidades monoméricas.

Por el contrario, no ha sido estudiado el efecto que la variación del pH pueda tener sobre la autoasociación de bases, nucleósidos y nucleótidos. Teniendo en cuenta que este estudio puede ser una gran ayuda para poder estimar cuantitativamente la contribución que representan la formación de enlaces de hidrógeno y el apilamiento de las unidades monoméricas a la estructura de los ácidos nucleicos, hemos realizado un estudio experimental acerca de la influencia que el pH del medio ejerce sobre los parámetros de asociación de las unidades monoméricas de ácidos nucleicos, en disolución acuosa.

Tanto en las bases de los ácidos nucleicos, como en sus nucleósidos y nucleótidos respectivos, son varios los lugares posibles de ionización y protonación, a cuya identificación se ha dedicado un gran trabajo en los últimos años (1,2). La importancia de este estudio es obvia, dada la íntima relación de estos "lugares" con las diversas interacciones moleculares posibles. Por otra parte, es conocida la influencia que sobre las interacciones de las bases, dentro de las cadenas polinucleotídicas, ejerce el pH, que es uno de los factores que condicionan la estructura secundaria de las mismas (3,4,5,6).

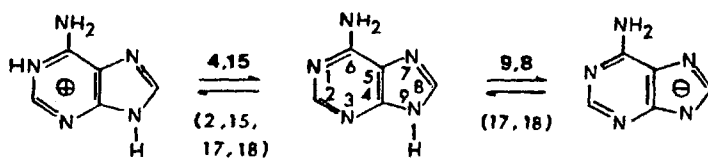
Para poder determinar cuáles son las especies predominantes de las unidades monoméricas, según el pH del medio, es necesario conocer en primer lugar los valores de los pK respectivos. Se han realizado hasta ahora numerosas estimaciones de estos valores (1,2).

El estudio de la tautomería y de la protonación de las unidades monoméricas, se ha efectuado por métodos químicos clásicos, calorimetría, potenciometría, espectroscopía UV, IR y RMN, y difracción de rayos X (1,2,7-14). Estos estudios indican que, tanto en estado cristalino como en disolución, las bases se encuentran preferentemente en las formas ceto y amino. También se ha recurrido a cálculos por O.M.. Pullman (15) llega a la conclusión de que el lugar más básico de la molécula no está determinado necesariamente por la mayor densidad electrónica, sino más bien por las condiciones del estado de transición; ello ha permitido decidir, en casos dudosos, el lugar más probable de protonación.

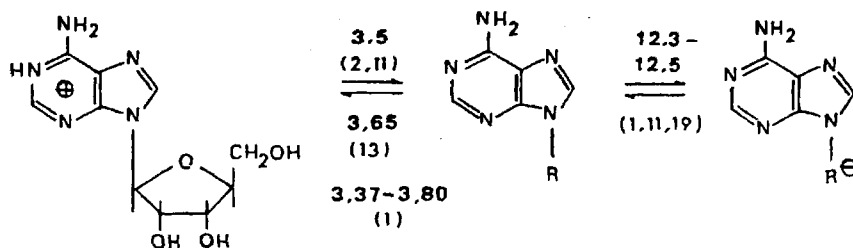
En las fig. 2.15. y 2.16. se recogen los valores más representativos de los pK de adenina y uracilo, y de sus ribonucleósidos y 5'-ribonucleótidos respectivos, teniendo en cuenta las formas tautómeras (en la conformación "anti") y los lugares de protonación que actualmente parecen más probables. Los nucleósidos y nucleótidos, además de los pK correspondientes a la base, poseen otros valores de pK que se atribuyen a la ionización de la ribosa o del grupo fosfato. En las figuras mencionadas se indican, entre paréntesis, las referencias bibliográficas que proponen los diversos valores de pK.

Tanto en dichos valores de pK como, sobre todo, en su asignación a los diversos grupos que pueden intervenir en las sucesivas ionizaciones de la molécula, existen incertidumbres que hasta ahora no se

### Adenina



### Adenosina



### AMP

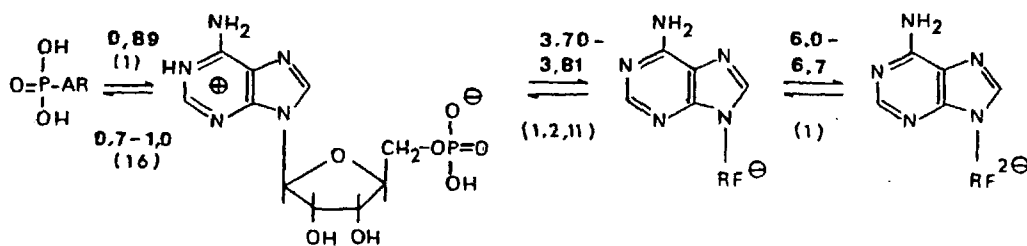


Fig. 2.15.- Sitios y valores de pK de ionización y protonación de Adenina, Adenosina y AMP. A=Adenina; R=Ribosa; F=Fosfato.

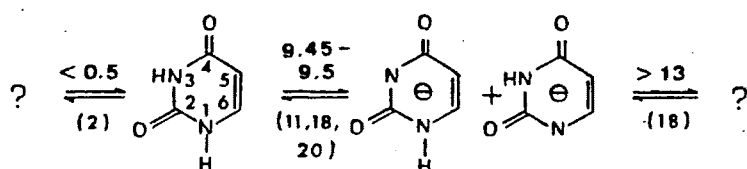
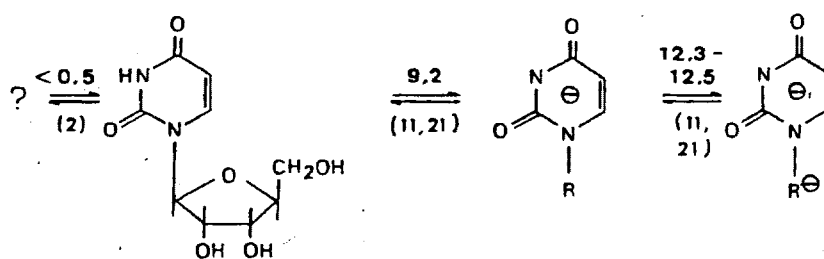
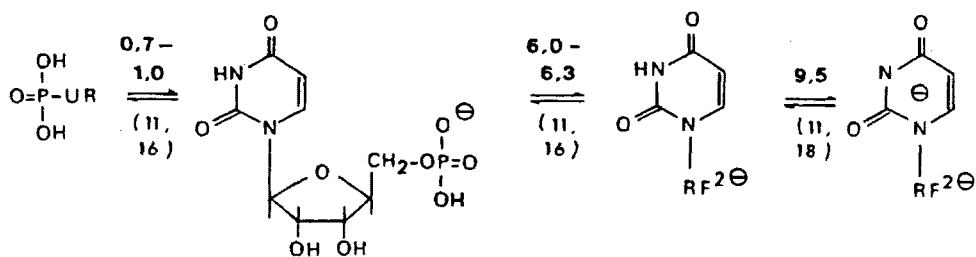
UraciloUridinaUMP

Fig. 2.16.- Sitios y valores de pK de ionización y protonación de Uracilo, Uridina y UMP. U=Uracilo; R=Ribosa; F=Fosfato.

han conseguido aclarar definitivamente. Así por ejemplo, el  $pK=4$  de adenina se ha asignado tanto a la protonación del grupo amino, como a la del  $N^1$  del anillo hexagonal, aunque parece más probable esta última alternativa (15). Ello es especialmente importante en el estudio de la autoasociación, porque el  $N^1$  actúa como aceptor y el  $NH_2$  como dador

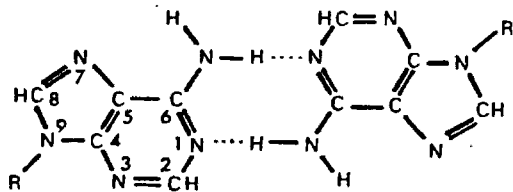


Fig. 2.17.- Posible asociación mediante enlace de hidrógeno, según el modelo de Watson-Crick, en unidades monoméricas de Adenina.

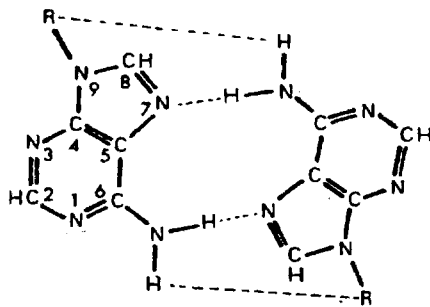


Fig. 2.18.- Posible asociación mediante enlace de hidrógeno, según el modelo de Hoogsteen, de AMP en poli A.

de protones en la formación de enlaces de hidrógeno según el modelo de Watson-Crick (22) (fig. 2.17.), mientras que, en la doble hélice del poli A, la formación de enlace de hidrógeno entre dos restos de adenina, de cada una de las cadenas, tiene lugar entre el N<sup>7</sup> pentagonal, que actúa como aceptor, y el grupo amino, que actúa como dador (23) (fig. 2.18.). Por consiguiente, a un pH suficientemente bajo, la protonación del N<sup>1</sup> impedirá el apareamiento de las bases si ésta se produce de acuerdo con el primer modelo, pero no si se produce de acuerdo con el segundo.

Por otra parte, en el uracilo, se han podido determinar dos valores de pK en medio muy ácido y muy alcalino, respectivamente, pero no se ha establecido definitivamente el lugar de protonación (por ello, en la fig. 2.16. se indica con un signo de interrogación la estructura correspondiente) ni el valor preciso de dichos pK, a los que se asigna aproximadamente valores inferiores a 0,5 o superiores a 13. La posibilidad de tautomería ceto-enólica ha complicado la asignación del pK=9,5, pero al establecerse que el uracilo existe en disolución acuosa principalmente en forma dicetónica, y en medio alcalino como una mezcla equimolecular de dos formas desprotonadas, se llegó a la conclusión de que la ionización del uracilo neutro transcurre simultáneamente en N<sup>1</sup> y N<sup>3</sup> (20). El N<sup>3</sup> actúa como dador en la formación de enlaces de hidrógeno, en el modelo de Watson-Crick, y el grupo C<sup>4</sup>=O, como aceptor.

La presencia de un grupo ribosa, en los nucleósidos, y de un grupo fosfato adicional, en los nucleótidos, es la causa de que la asignación de los pK en estos compuestos sea más difícil aún que la de las correspondientes bases. Resulta de interés señalar que en la bibliografía no aparecen valores de pK de los nucleótidos en medio alcalino,

que pudieran relacionarse con los observados en las bases y nucleósidos respectivos.

Se ha realizado un estudio comparativo, por espectroscopía UV, de la autoasociación de una base púrica, adenina, y una base pirimidínica, uracilo, y de sus respectivos ribonucleósidos: adenosina y uridina, y 5'-ribonucleótidos: AMP y UMP, a pH ácido, neutro y alcalino. Para ello, se ha medido el espectro UV de las disoluciones de todos estos compuestos en un intervalo de concentraciones de  $\sim 5 \cdot 10^{-6}$  a  $\sim 10^{-1}$ M, cuyo límite superior ha estado determinado en cada caso por la solubilidad de los compuestos y por su absorción en células de cuarzo de 25  $\mu$ m de espesor, como se describió en el cap. 1.

Las disoluciones de bases y nucleósidos a pH ácido ( $\approx 1$ ) se han preparado en ClH 0,1N. Los nucleótidos se han estudiado en una disolución ClH 0,01N-ClK 0,09M (24,25), a un pH ligeramente superior ( $\approx 2$ ) con el fin de reducir la posibilidad de hidrólisis de los grupos fosfato. Las disoluciones a pH neutro se han preparado en tampón fosfato de pH 6,8, como se describe en el cap. 2 de esta Memoria, y las disoluciones a pH alcalino, en NaOH 0,1N, de pH  $\approx 13$ . Las disoluciones de ClH y NaOH se han preparado a partir de disoluciones "Titrisol", de Merck; todos los productos restantes han sido también de Merck, de calidad "para análisis". La fuerza iónica de todos los disolventes fue 0,1 y la temperatura a que se realizaron las medidas fue, aproximadamente, de 25°C. Los valores de pH utilizados están, en general, lo suficientemente alejados de los pK de los compuestos estudiados como para favorecer, en cada caso, la existencia en disolución de una especie iónica predominante.

Con el fin de completar los datos obtenidos y, especialmente, de obtener valores que puedan aplicarse al estudio del poli A en doble hélice (cap. 4), se ha realizado una experiencia adicional de autoasociación de AMP a pH 4,6, en tampón acético-acetato, de fuerza iónica  $\sim 0,1$  (25).

Se ha determinado el pH de todas las disoluciones empleadas, comprobándose que su variación al aumentar la concentración de las unidades monoméricas era, en general, muy poco significativa. Las excepciones más importantes corresponden a los 2 nucleótidos en medio ácido, en los cuales fue necesario añadir ClH 0,1N para contrarrestar el aumento del pH de la disolución al aumentar la concentración de los mismos.

Dado que la presencia de una carga sobre el anillo altera la distribución de los niveles electrónicos, el espectro UV de las unidades monoméricas dependerá, en general, del pH de la disolución (9, 10,26). En las fig. 2.19. y 2.20. se muestran los espectros de disoluciones  $10^{-5}M$  de adenina y uracilo, respectivamente, a pH 1,7 y 13. Puede observarse que el pH influye en la posición e intensidad de las bandas. En general, la variación observada es mucho mayor para las bases que para los nucleósidos y nucleótidos. En la tabla 2.14. se resumen los desplazamientos observados en la posición de la longitud de onda en el máximo, al variar el pH y la concentración, para los distintos compuestos estudiados. Consideramos oportuno destacar que, de los diversos cambios inducidos en el medio que se estudian en este capítulo, solamente se observan desplazamientos significativos de  $\lambda_{max}$  al variar el pH de las disoluciones.

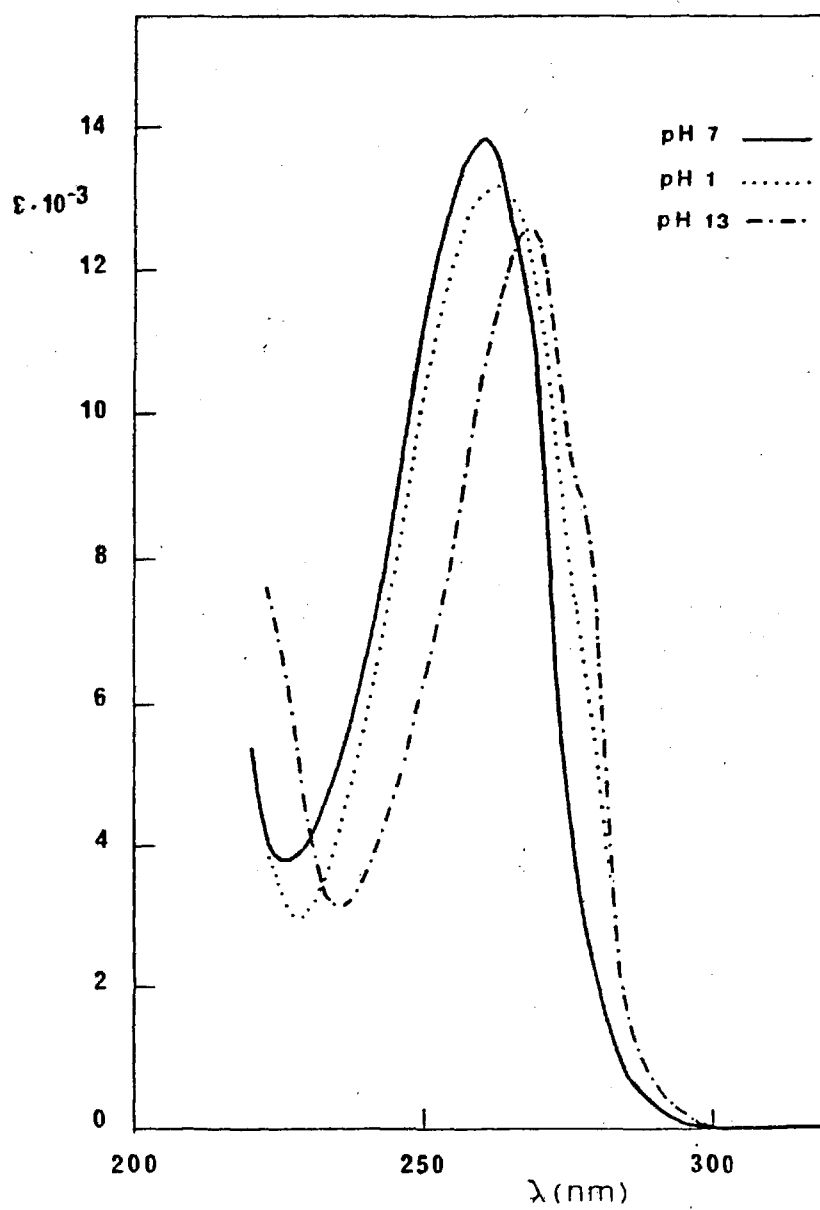


Fig. 2.19.- Espectros UV de Adenina a diferentes pH.

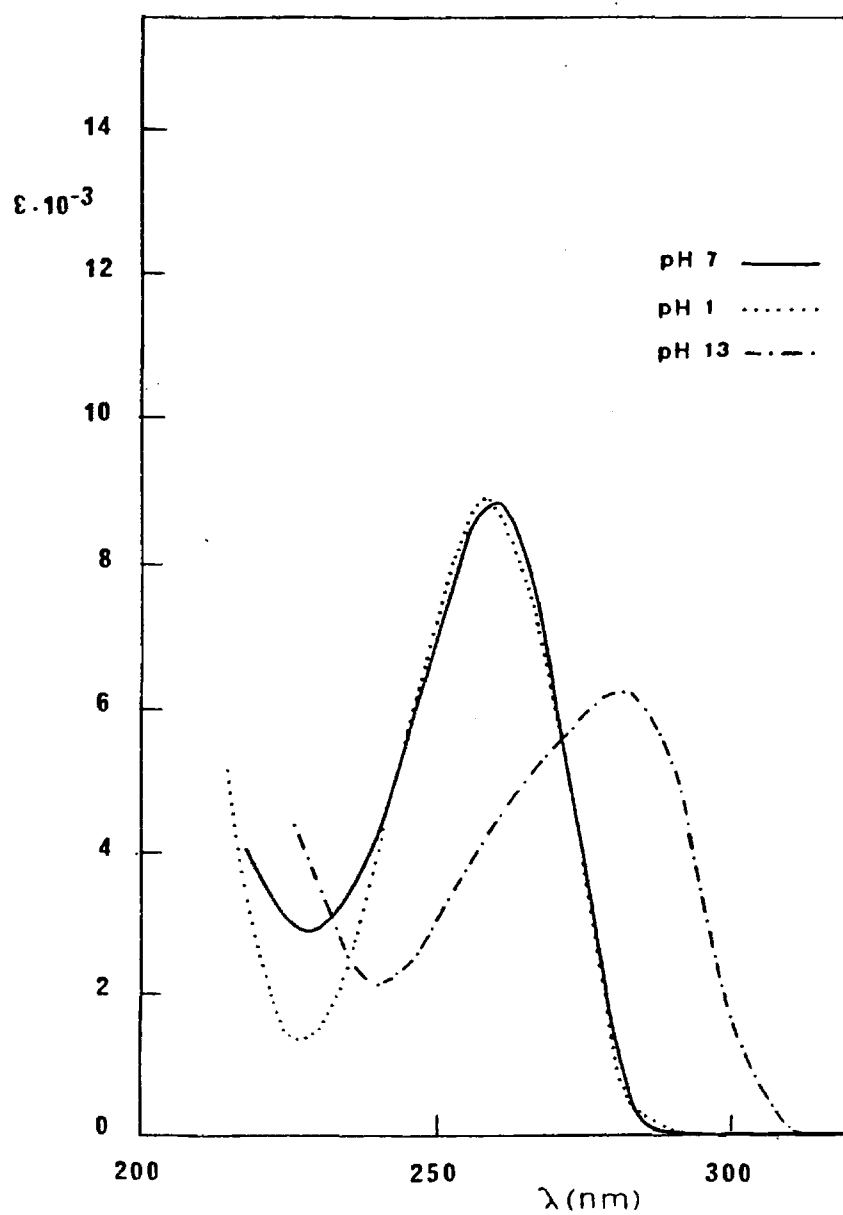


Fig. 2.20.- Espectros UV de Uracilo a diferentes pH.

TABLA 2.14.

Desplazamientos observados de  $\lambda_{\max}$  respecto de pH 7

COMPUESTO	$\lambda_{\max}$ a pH 7 (nm)	$\lambda_{\max}$ a pH 1-2 (nm)	$\lambda_{\max}$ a pH 13 (nm)
Adenina	260,5	262,5 (Bat.)	269 (Bat.)
Adenosina	259	257 (Hips.)	Desplazam. nulo
AMP	259	257-258 a $c < 10^{-2}$ (Hips.) Desplaz. nulo a $c \geq 10^{-2}$	Desplazam. nulo
Uracilo	259,5	256-258 a $c < 10^{-3}$ (Hips.) Desplaz. nulo a $c \geq 10^{-3}$	283 a $c < 9 \cdot 10^{-2}$ (Bat.) Desdobl. a $c > 9 \cdot 10^{-2}$
Uridina	262	Desplazam. nulo	Desplazam. nulo
UMP	262	Desplazam. nulo	Desplazam. nulo a $c \leq 2 \cdot 10^{-3}$ . 263 a $c > 3,5 \cdot 10^{-3}$ (Bat.)

(Bat. = batocrómico; Hips. = hipsocrómico).

### Resultados experimentales

Para la presentación de los resultados experimentales, se ha adoptado un esquema análogo al del apartado 2.1., con las siguientes particularidades:

1) Los resultados experimentales se han agrupado en los siguientes epígrafes:

2.3.1. Bases.

2.3.2. Nucleósidos.

2.3.3. Nucleótidos.

2) Dentro de cada uno de estos epígrafes se dan las gráficas que corresponden a la representación semilogarítmica de la absorptividad molar  $\epsilon$  frente a la concentración molar  $c(M)$ , a los distintos pH, para cada uno de los sistemas estudiados (fig. 2.21.-2.24.).

2.3.1. Influencia del pH sobre la autoasociación de bases

TABLA 2.15.

Resumen de los valores de los parámetros obtenidos con el programa de cálculo "HIPOCROM"

Disolvente	Intervalo de concentraciones	$\epsilon_1$	$\epsilon_\infty$	p	r
ADENINA					
ClH 0,1N	$5 \cdot 10^{-6} - 10^{-3} M$	13200	13200	----	---
	$1,4 \cdot 10^{-3} - 5 \cdot 10^{-2} M$	"	$11380 \pm 80$	$3,2 \pm 0,2$	0,983
NaOH 0,1N	$5 \cdot 10^{-6} - 10^{-3} M$	13110	$11630 \pm 50$	$0,15 \pm 0,01$	0,986
	$1,5 \cdot 10^{-3} - 5 \cdot 10^{-2} M$	"	$9990 \pm 40$	$1,56 \pm 0,06$	0,994
URACILO					
ClH 0,1N	$5 \cdot 10^{-6} - 3 \cdot 10^{-2} M$	9080	$7060 \pm 50$	$0,47 \pm 0,02$	0,983
NaOH 0,1N	$5 \cdot 10^{-6} - 9 \cdot 10^{-2} M$	6240	$5140 \pm 50$	$0,34 \pm 0,04$	0,905

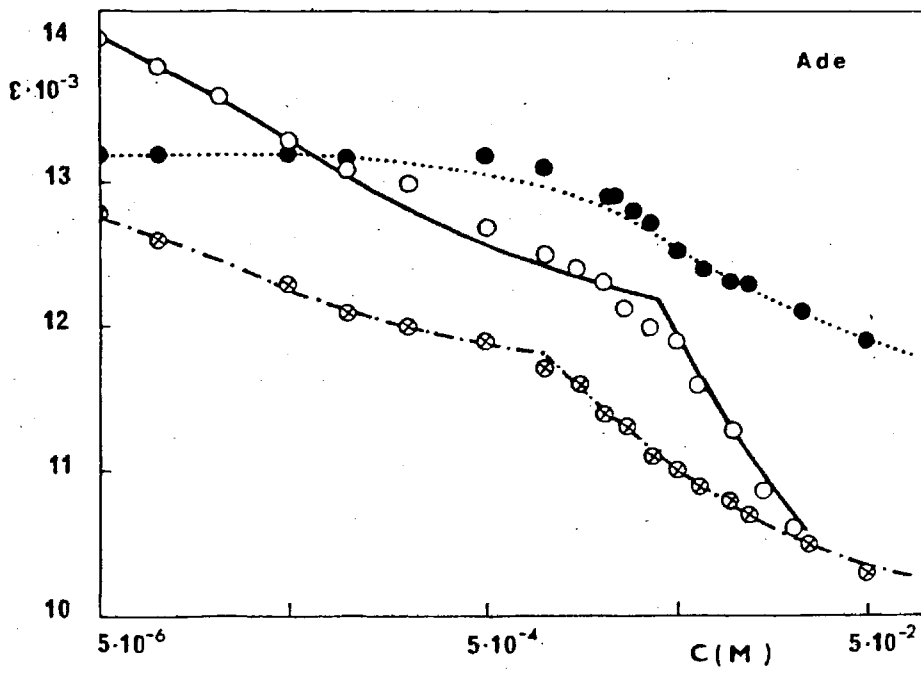


Fig. 2.21.- Absortividad molar de Adenina (Ade)

○ pH 7; ● pH 1; ⊗ pH 13

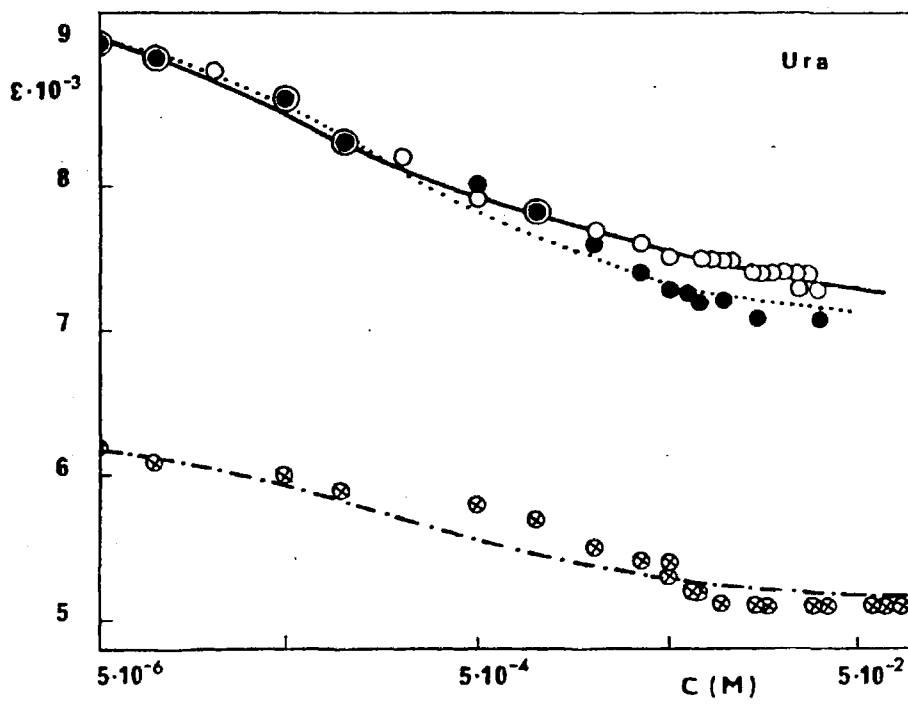


Fig. 2.22. - Absortividad molar de Uracilo (Ura)

○ pH 7; ● pH 1; ⊗ pH 13

2.3.2. Influencia del pH sobre la autoasociación de nucleósidos

TABLA 2.16.

Resumen de los valores de los parámetros obtenidos con el programa de cálculo "HIPOCROM"

Disolvente	Intervalo de concentraciones	$\epsilon_1$	$\epsilon_\infty$	p	r
ADENOSINA					
ClH 0,1N	$5 \cdot 10^{-6}$ - $3,5 \cdot 10^{-3}$ M	15100	15100	---	---
	$5 \cdot 10^{-3}$ - $5 \cdot 10^{-2}$ M	"	$11400 \pm 300$	$6,2 \pm 0,8$	0,968
NaOH 0,1N	$5 \cdot 10^{-6}$ - $2 \cdot 10^{-3}$ M	16400	$14000 \pm 30$	$0,226 \pm 0,005$	0,998
	$3,5 \cdot 10^{-3}$ - $5 \cdot 10^{-2}$ M	"	$11760 \pm 60$	$3,1 \pm 0,1$	0,994
URIDINA					
ClH 0,1N	$5 \cdot 10^{-6}$ - $10^{-3}$ M	11350	$9630 \pm 20$	$0,112 \pm 0,004$	0,997
	$2 \cdot 10^{-3}$ - $7 \cdot 10^{-2}$ M	"	$8800 \pm 8$	$1,14 \pm 0,01$	0,999
NaOH 0,1N	$5 \cdot 10^{-6}$ - $10^{-2}$ M	8430	$6940 \pm 10$	$0,113 \pm 0,003$	0,996
	$1,75 \cdot 10^{-2}$ - $10^{-1}$ M	"	$6310 \pm 50$	$1,6 \pm 0,2$	0,959

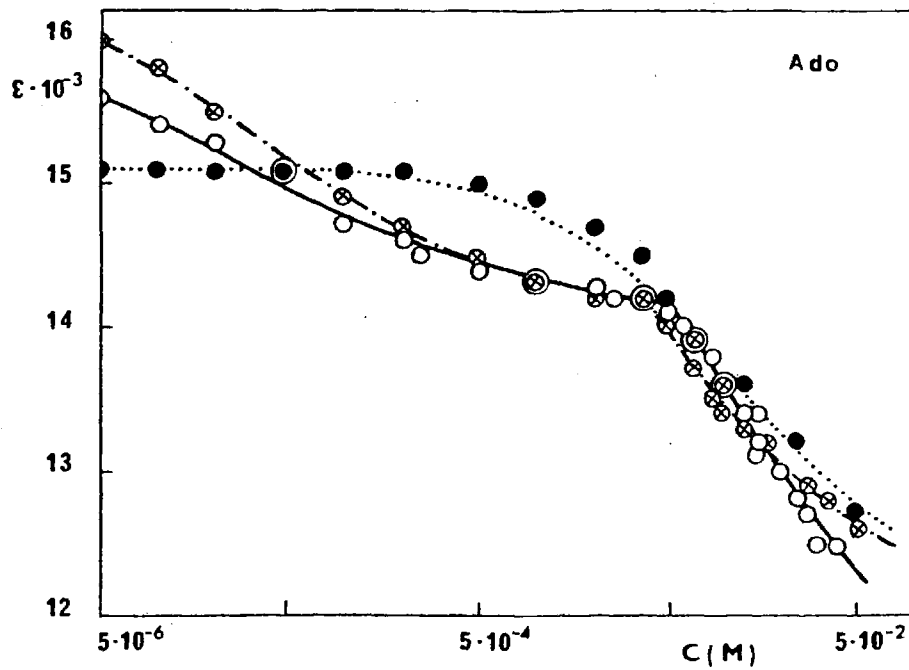
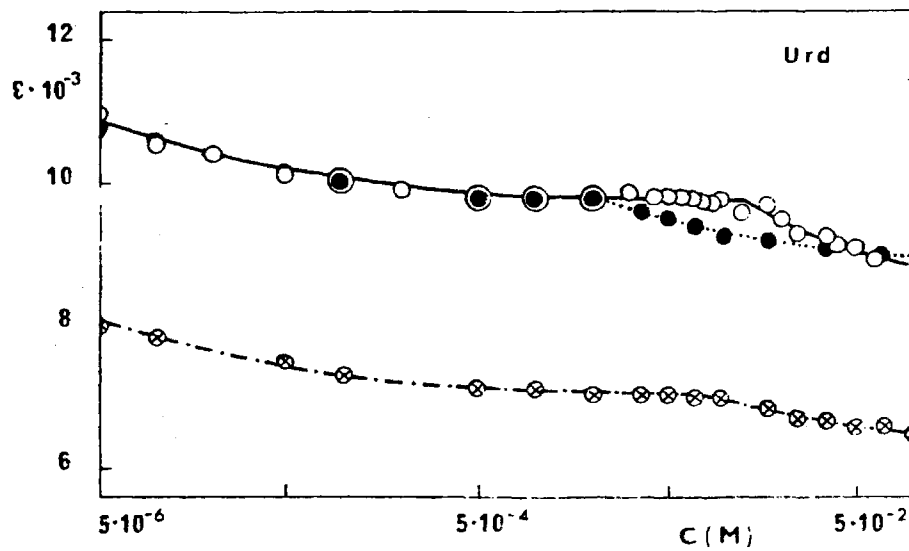


Fig. 2.23.- Absortividad molar de Adenosina (Ado) y Uridina (Urd). ○ pH 7; ● pH 1; ⊗ pH 13.



2.3.3. Influencia del pH sobre la autoasociación de nucleótidos

TABLA 2.17.

Resumen de los valores de los parámetros obtenidos con el programa de cálculo "HIPOCROM"

Disolvente	Intervalo de concentraciones	$\epsilon_1$	$\epsilon_\infty$	p	r
AMP					
ClH 0,01N + ClK 0,09M	$5 \cdot 10^{-6}$ - $2,1 \cdot 10^{-2}$ M	14710	$12260 \pm 90$	$0,47 \pm 0,04$	0,966
	$2,5 \cdot 10^{-2}$ - $6 \cdot 10^{-2}$ M	"	$7100 \pm 600$	$16 \pm 2$	0,975
Tampón acético- acetato (pH 4,6)	$5 \cdot 10^{-6}$ - $2 \cdot 10^{-2}$ M	15010	$11940 \pm 30$	$0,63 \pm 0,01$	0,998
	$3 \cdot 10^{-2}$ - $6 \cdot 10^{-2}$ M	"	$7300 \pm 600$	$13 \pm 2$	0,988
NaOH 0,1N	$5 \cdot 10^{-6}$ - $2,5 \cdot 10^{-2}$ M	16160	$12980 \pm 30$	$0,326 \pm 0,009$	0,995
	$3 \cdot 10^{-2}$ - $6 \cdot 10^{-2}$ M	"	$7100 \pm 400$	$17 \pm 1$	0,992
UMP					
ClH 0,01N + ClK 0,09M	$5 \cdot 10^{-6}$ - $3,5 \cdot 10^{-3}$ M	11260	$8960 \pm 30$	$0,280 \pm 0,008$	0,997
	$5 \cdot 10^{-3}$ - $8 \cdot 10^{-2}$ M	"	$7970 \pm 50$	$1,6 \pm 0,1$	0,986
NaOH 0,1N	$5 \cdot 10^{-6}$ - $2 \cdot 10^{-3}$ M	8120	$6870 \pm 30$	$0,227 \pm 0,009$	0,996
	$3,5 \cdot 10^{-3}$ - $1,2 \cdot 10^{-1}$ M	"	$6050 \pm 10$	$1,45 \pm 0,03$	0,998

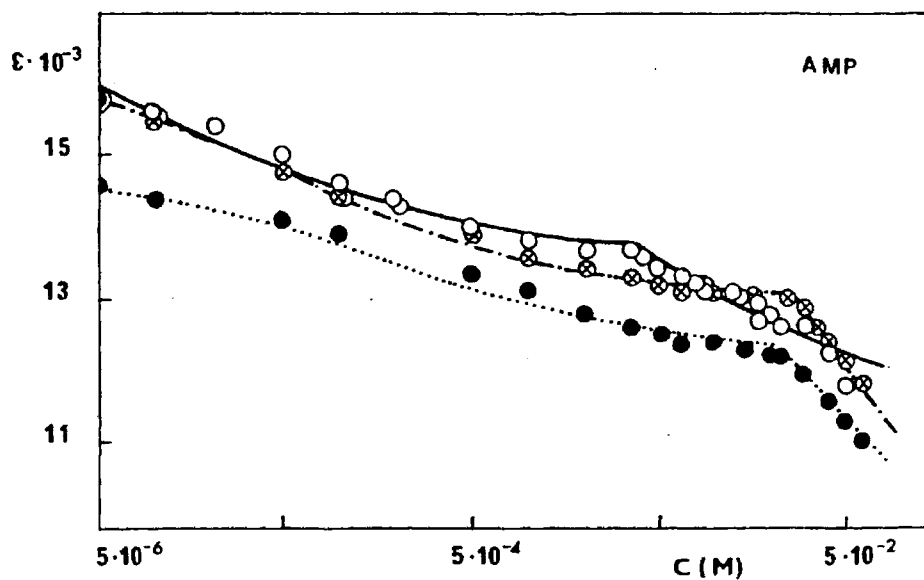


Fig. 2.24.- Absortividad molar de AMP y UMP. —○— pH 7;  
 ---●--- pH 2 ; ---⊗--- pH 13.

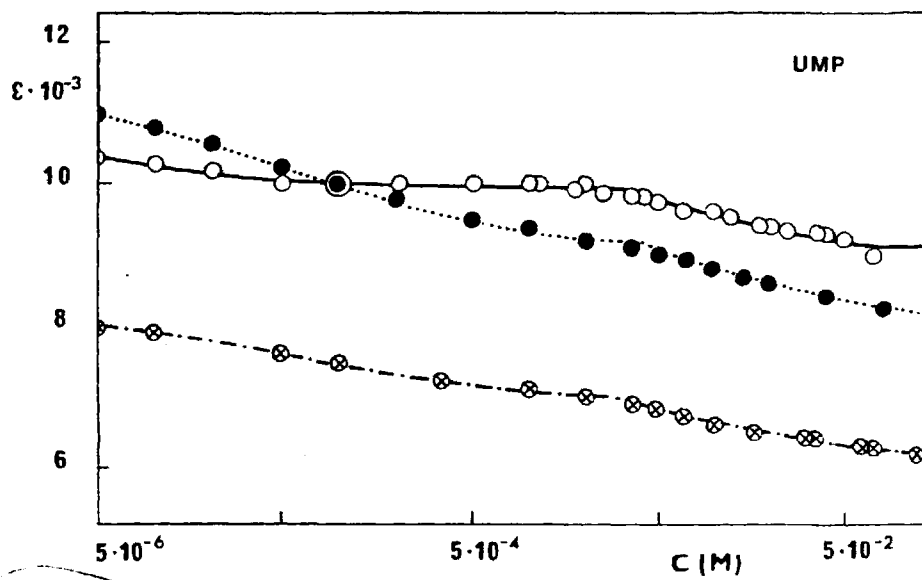


TABLA 2.18.

Influencia del pH. Parámetros de auto-  
asociación de Adenina, Adenosina y AMP

COMPUESTO	1 <sup>er</sup> efecto			2° efecto		
	$K_2$	$\delta_2$	h(%)	$K_p$	$\delta_p$	h(%)
Adenina (pH 1)	Nulo	Nulo	Nulo	180	1820	13,8
" (pH 7)	$12 \cdot 10^3$	2190	15,4	220	5700	40,1
" (pH 13)	$33 \cdot 10^3$	1480	11,3	1300	3120	23,8
Adenosina (pH 1)	Nulo	Nulo	Nulo	100	3700	24,5
" (pH 7)	$16 \cdot 10^3$	1820	11,5	120	5400	34,1
" (pH 13)	$23 \cdot 10^3$	2400	14,6	480	4640	28,3
AMP (pH 2)	$5 \cdot 10^3$	2450	16,6	30	7600	51,7
" (pH 5)	$4 \cdot 10^3$	3070	20,4	50	7700	51,3
" (pH 7)	$48 \cdot 10^3$	3120	18,6	700	5400	32,0
" (pH 13)	$15 \cdot 10^3$	3180	19,7	31	9100	56,1

TABLA 2.19.

Influencia del pH. Parámetros de auto  
asociación de Uracilo, Uridina y UMP.

COMPUESTO	1 <sup>er</sup> efecto			2° efecto		
	$K_2$	$\delta_2$	h(%)	$K_p$	$\delta_p$	h(%)
Uracilo (pH 1)	$4,6 \cdot 10^3$	2020	22,2	No detectado		
" (pH 7)	$5,8 \cdot 10^3$	1790	19,7	"		
" (pH 13)	$5 \cdot 10^3$	1100	17,6	"		
Uridina (pH 1)	$68 \cdot 10^3$	1720	15,1	1960	2550	22,5
" (pH 7)	$420 \cdot 10^3$	3140	24,4	500	4600	36,1
" (pH 13)	$58 \cdot 10^3$	1490	17,7	800	2120	25,1
UMP (pH 2)	$15 \cdot 10^3$	2300	20,4	1300	3290	29,2
" (pH 7)	---	2380	19,4	2400	3400	27,7
" (pH 13)	$12 \cdot 10^3$	1250	15,4	980	2070	25,5

### Interpretación de resultados

Para la interpretación de los resultados obtenidos utilizaremos especialmente los valores de las constantes de autoasociación que se recogen en las tablas 2.18. y 2.19.. En este caso, no se ha hecho uso de los valores calculados de las distancias entre bases ni de las energías de interacción, ya que la ionización de las unidades monoméricas, originada por la variación del pH, puede dar lugar a interacciones entre cargas, y por tanto, no puede mantenerse la hipótesis de que existen únicamente interacciones dipolo-dipolo entre las bases, que es el fundamento del cálculo de los mencionados parámetros.

Los resultados experimentales revelan que la influencia del pH sobre la autoasociación de las unidades monoméricas es diferente en las purinas y en las pirimidinas. Por tanto, consideramos conveniente interpretar por separado los resultados correspondientes a uno y otro tipo de compuestos.

#### Unidades monoméricas púricas

Las curvas de hipocromicidad de adenina a pH ácido, neutro y alcalino (fig. 2.21.), son muy diferentes entre sí, lo cual evidencia que el pH ejerce una influencia notable sobre el equilibrio de autoasociación. Tanto a pH 7 como a pH 13, puede observarse la existencia de 2 efectos hipocrómicos diferentes. Por el contrario, a pH 1 se observa solamente la existencia del 2º efecto, pues a concentraciones inferiores a  $10^{-3}M$  no hay desviación de la ley de Lambert-Beer.

Como a pH 1 la adenina está protonada en N<sup>1</sup> (ver fig. 2.15.) este resultado puede interpretarse en el sentido de que a pH ácido, co-

mo el  $N^1$  no puede actuar como aceptor de protones, no puede tener lugar una posible autoasociación por formación de enlaces de hidrógeno según el modelo de Watson-Crick (fig. 2.17.), y si éste es el mecanismo de autoasociación correspondiente al 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico, evidentemente no puede existir tal efecto a pH 1, lo cual apoya la hipótesis de que el 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico, observable a pH neutro y alcalino, es debido a la formación de enlace de hidrógeno entre las bases correspondientes.

A pH neutro y alcalino, como se observa en la fig. 2.15., los lugares  $N^1$  y  $NH_2$  pueden actuar como aceptor y donador, respectivamente, en la formación de enlaces de hidrógeno, y a ambos pH se presenta un doble efecto hipocrómico.

El 2° efecto hipocrómico se observa en todo el intervalo de pH estudiado. Si el proceso de apilamiento está condicionado por la interacción de las corrientes electrónicas de anillo de las moléculas superpuestas en la pila, no es sorprendente que en la adenina, el valor de  $K_p$  pase de 180 a 220 a pH 1 y 7, respectivamente, a un valor mucho más elevado, de 1300, a pH 13 (tabla 2.18.), ya que a este pH queda cargado negativamente el anillo pentagonal.

En la adenosina, la curva a pH 1 es prácticamente horizontal en la zona de concentraciones correspondiente al 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico (fig. 2.23.). La interpretación de este hecho sería análoga a la expuesta para la adenina. Las curvas a pH 7 y 13 son muy parecidas, lo que puede justificarse por ser idéntico a ambos pH el estado de ionización de la base (fig. 2.15.). En consecuencia, los valores de  $K_2$  ( $16 \cdot 10^3$  y  $23 \cdot 10^3$ , respectivamente) varían menos que en el caso de la adenina.

Respecto al 2° efecto hipocrómico, hay que hacer notar que en la adenosina a pH alcalino, queda con carga negativa el ciclo de la ribosa, lo cual influye en el posible mecanismo de apilamiento en menor grado que la carga negativa en la base, y por tanto el valor de  $K_p$  aumenta solamente en un factor 4 al pasar de pH ácido o neutro a pH alcalino.

En el AMP, el resultado más significativo es que a pH ácido, se observa la presencia de 2 efectos hipocrómicos, a diferencia de lo que ocurre en la base y el nucleósido (fig. 2.24.). Ello podría interpretarse en el sentido de que la autoasociación de AMP por formación de enlace de hidrógeno está especialmente favorecida a este pH respecto de adenina y adenosina, pero según un modelo de apareamiento diferente, que no implica al  $N^1$ , y que podría ser el mismo que se ha propuesto para el poli A a pH ácido (fig. 2.18.), que corresponde al modelo de Hoogsteen de formación de enlaces de hidrógeno entre el  $N^7$  y el  $NH_2$ , con la formación adicional de enlace de hidrógeno entre uno de los OH sin esterificar del grupo fosfato y el grupo  $NH_2$  de la otra base (23). El valor de  $K_2$  para el AMP, que resulta ser del orden de  $5 \cdot 10^3$  a pH 2 y a pH 5, frente al valor nulo de  $K_2$  para adenina y adenosina, que daría justificado de acuerdo con esta interpretación.

Asimismo, este modelo de apareamiento del AMP justificaría que, a pH 7, el valor de  $K_2$  sea de  $48 \cdot 10^3$  en el AMP, notablemente superior al de adenina ( $K_2=12 \cdot 10^3$ ) y adenosina ( $K_2=16 \cdot 10^3$ ), al mismo pH.

Respecto al 2° efecto hipocrómico, hay que destacar que en el AMP, a pH alcalino, el valor de  $K_p$  es 31, muy inferior a los valores de  $K_p$  de adenina y adenosina a este pH, que son 1300 y 480, respectivamente. Por el contrario, a pH 7, el valor de  $K_p$  para el AMP es 700, muy

superior a los de adenina y adenosina, que son 220 y 120, respectivamente.

#### Unidades monoméricas pirimidínicas

La interpretación de los procesos de interacción de las unidades monoméricas pirimidínicas: uracilo, uridina y 5'-UMP, no es tan esclarecedora como la de la serie de unidades monoméricas púricas, que acabamos de exponer.

De acuerdo con la idea directriz de este trabajo, de realizar un estudio sistemático de las propiedades fisicoquímicas de las unidades monoméricas de los ácidos nucleicos, para obtener una información evidentemente valiosa, que permita interpretar los principios básicos que gobiernan las propiedades de los ácidos nucleicos y polinucleótidos, hemos elegido intencionadamente esta serie de unidades monoméricas pirimidínicas con el objeto de investigar si, realmente, se pone ya en ellas de manifiesto un comportamiento anómalo que pueda relacionarse con las singularidades estructurales del ácido poliribouridílico.

El ácido poliribouridílico (poli U) es un polinucleótido que, según todas las referencias bibliográficas consultadas, tiene propiedades singulares que le diferencian notablemente de los otros polinucleótidos. Al parecer, tiene muy poca estructura local, aparte de la que impone el esqueleto azúcar-fosfato. Sus propiedades ópticas se aproximan a las propiedades del monómero, en contra de lo que ocurre en el poli A y en el poli C. Así, por ejemplo, las curvas de DOR del poli U son similares a las de su monómero UMP (27). El poli U tiene, probablemente, una estructura de cadena plegada sobre sí misma, es decir, una "horquilla" de ramas antiparalelas, que desde el punto de vista de su

simetría no son equivalentes, lo cual presenta un problema topológico de difícil interpretación (28).

Como se expone en el capítulo correspondiente a los dinucleósidos-fosfato, ya a nivel de los oligonucleótidos más sencillos, hemos obtenido una evidencia experimental de este comportamiento anómalo de la serie de unidades monoméricas del uracilo. De los experimentos realizados para poner de manifiesto la interacción de los dinucleósidos fosfato con los nucleósidos complementarios, el UpU da lugar a una interacción diferente. Por otra parte, las experiencias realizadas para el estudio de la interacción monómero-polímero, indican que ésta tiene lugar únicamente si el polinucleótido utilizado es el poli U.

Según se expone a continuación, el estudio del uracilo, uridina y UMP confirma la previsión que acabamos de apuntar de que, a nivel de unidades monoméricas, se pone ya de manifiesto la singularidad de los fenómenos de asociación que se reflejan ulteriormente en las estructuras más complejas de sus polinucleótidos correspondientes y, en último término, en las propiedades singulares de estructura y función de los ácidos ribonucleicos.

En el uracilo, las curvas de hipocromicidad a pH 1 y 7, son muy semejantes entre sí, como ya en principio se podía prever debido a la existencia de un estado de ionización único a ambos valores de pH, en tanto que la curva a pH alcalino, si bien está desplazada a valores de absorptividad más bajos, presenta también un hábito muy parecido a los anteriores (fig. 2.22.). Los valores de  $K_2$  son prácticamente iguales a los 3 pH, y por tanto, el mecanismo de autoasociación puede ser el mismo en todo el intervalo de pH estudiado. Como el  $N^3$ , que actúa como dador de protones en la formación de enlaces de hidrógeno según el

modelo de Watson-Crick, está protonado a los tres pH (fig. 2.16.), el mecanismo responsable del 1<sup>er</sup> efecto en el uracilo sería la formación de enlaces de hidrógeno entre el N<sup>3</sup> y el C<sup>4</sup>=O como aceptor.

No se ha detectado el 2° efecto hipocrómico en ningún caso, lo que puede interpretarse en el sentido de que en el uracilo no existe tendencia a la autoasociación por apilamiento en el intervalo de concentraciones accesible. Este hecho confirma lo observado para las bases pirimidínicas a pH neutro y autoriza a concluir, como ya se dijo, que el apilamiento de las bases pirimidínicas está menos favorecido que el de las bases púricas (ver capítulo anterior).

En la uridina, aparece doble efecto hipocrómico en todo el intervalo de pH, en contraste con lo observado en el uracilo. Los valores de  $K_2$  y de  $K_p$  de la uridina son más altos que los de adenosina, lo cual puede indicar una mayor tendencia a la asociación en la uridina, pero debe hacerse notar que, al tener un valor pequeño la pendiente de las curvas de hipocromicidad de este nucleósido, el valor de las constantes de asociación, obtenido según nuestro método de cálculo, puede estar afectado de una indeterminación considerable (comparar las curvas de hipocromicidad de adenosina y uridina de la fig. 2.23.).

Ahora bien, la notable variación del valor de  $K_2$  con el pH ( $68 \cdot 10^3$  a pH 1 y  $420 \cdot 10^3$  a pH 7), no es consistente con el hecho de que el estado de ionización de la uridina es idéntico a ambos pH. Si el mecanismo responsable del 1<sup>er</sup> efecto de la uridina fuera la formación de enlace de hidrógeno entre N<sup>3</sup> y C<sup>4</sup>=O, la tendencia a la asociación debería ser muy parecida a pH ácido y a pH neutro, pues en ambos casos se encuentra protonado el N<sup>3</sup>, y sin embargo, los valores de  $K_2$  son muy diferentes. Por otra parte, la formación de enlace de hidrógeno estaría

impedida a pH 13, pues el N<sup>3</sup> está desprotonado a este pH, pero el valor de K<sub>2</sub> a pH 13 (58.10<sup>3</sup>) es muy parecido al correspondiente a pH ácido.

Consideramos también que la variación de K<sub>p</sub> (1960 a pH 1 y 500 a pH 7) se encuentra en contradicción con la existencia de un único estado de ionización a pH ácido y pH neutro.

Estas anomalías pueden interpretarse en el sentido de que la agregación de la uridina tiene lugar según un mecanismo diferente del de la serie adenina-adenosina-AMP. En todo caso, los valores de K<sub>p</sub> indican que el pH no es un factor condicionante en el mecanismo de apilamiento de esta unidad monomérica pirimidínica.

En el UMP se observa también la existencia de doble efecto hipocrómico, como en el caso de la uridina. Las curvas de hipocromicidad a pH ácido y neutro se diferencian más aún que en la uridina, lo que podría atribuirse a la protonación del grupo fosfato, pero el salto hipocrómico que separa ambos efectos en el UMP se produce aproximadamente en la misma región en todas las curvas (fig. 2.24.).

El valor de K<sub>2</sub> a pH neutro se ha indicado en la tabla 2.19. con un signo--, ya que, debido al hábito de la curva de hipocromicidad, que revela un efecto hipocrómico muy reducido, el cálculo de dicho valor está afectado de una notable indeterminación. Los valores de K<sub>2</sub> correspondientes a pH ácido y alcalino son del mismo orden (15.10<sup>3</sup> y 12.10<sup>3</sup>, respectivamente). Este hecho experimental no es compatible con la hipótesis de que el mecanismo responsable del 1<sup>er</sup> efecto sea la formación de enlace de hidrógeno entre moléculas de UMP, por las razones que acabamos de comentar para la uridina.

La variación con el pH de los valores de K<sub>p</sub> puede considerar

se análoga a la observada en el AMP. Sin embargo, la magnitud de la constante de asociación es mayor en el UMP que en el AMP, lo cual no concuerda con la hipótesis de que el mecanismo de asociación correspondiente al 2° efecto sea el apilamiento de las bases, pues en este caso, el apilamiento del UMP, que es un nucleótido pirimidínico, estaría desfavorecido respecto del AMP, que es purínico, y el valor de  $K_p$  sería inferior en el UMP.

Nuestros resultados parecen indicar que el comportamiento frente a la variación del pH del proceso de asociación del uracilo, es comparable al observado para las unidades monoméricas púricas. Por el contrario, la asociación de uridina y UMP es "anómala", según indican los valores absolutos de  $K_2$  y  $K_p$ , en comparación con el uracilo y el sistema adenina-adenosina-AMP, y la variación de dichas constantes con el pH, que no concuerda con los estados de ionización de la molécula. El origen de la estructura singular del poli U podría situarse ya a nivel de los procesos de asociación correspondientes al nucleósido y al nucleótido.

#### Conclusiones generales acerca de la influencia del pH

- 1) De los valores de los parámetros de autoasociación en adenina, adenosina y AMP a pH ácido, neutro y alcalino, se deduce que el mecanismo de asociación correspondiente al 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico es la formación de enlace de hidrógeno; en adenina y adenosina, según el modelo de Watson-Crick, y en AMP, según el modelo de Hoogsteen, análogo al

propuesto para el poli A a pH ácido.

- 2) El orden de variación de los valores de la constante de asociación correspondiente al 2° efecto hipocrómico, apoya la hipótesis de que el mecanismo de asociación responsable del mismo, es un mecanismo de apilamiento, ya que esta asociación es máxima para la adenina a pH alcalino, donde está favorecida la interacción de las corrientes electrónicas de anillo, que es uno de los principales factores condicionantes del apilamiento.
- 3) Las experiencias realizadas en la serie uracilo-uridina-UMP, ponen de manifiesto el comportamiento anómalo de estas unidades monoméricas respecto de los mecanismos de asociación, en concordancia con la evidencia experimental de las características estructurales singulares de los ácidos oligouridílicos y poliuridílicos.
- 4) Los resultados experimentales obtenidos muestran que los equilibrios de ionización y protonación de las unidades monoméricas, pese a su importancia, no bastan por sí solos para condicionar el mecanismo de asociación de las mismas, ya que dicho mecanismo también es función de otras interacciones más difíciles de cuantificar, como son las interacciones hidrofóbicas.

#### 2.4. INFLUENCIA DE LA UREA

El estudio experimental de la influencia que, sobre la autoasociación de las unidades monoméricas, ejercen diversos disolventes y sales, así como el pH del medio, ha permitido precisar la naturaleza de las interacciones que gobiernan el fenómeno de la autoasociación, y ha puesto de manifiesto la notable importancia que, en el conjunto de estas interacciones, tiene el efecto hidrofóbico. De acuerdo con ello, hemos considerado de interés estudiar la influencia que, sobre la autoasociación en disolución acuosa, puede tener un compuesto como la urea, que en principio, puede afectar tanto a los posibles enlaces de hidrógeno entre las bases, como a la propia estructura del agua.

Es bien conocido el hecho de que la urea, a altas concentraciones, se comporta como agente desnaturizante de proteínas en disolución acuosa (1,2). Por el contrario, su acción sobre los ácidos nucleicos parece reducirse solamente a una disminución en el valor de  $T_m$ , es decir, de la temperatura en el punto medio de la transición hélice-cadena estadística (3,4). Como la urea puede tener cierta capacidad competitiva en la formación de enlaces de hidrógeno, debido a su posibilidad de donar y aceptar protones (2), su pequeña acción sobre los ácidos nucleicos podría significar que dichos enlaces no son los principales responsables de la estabilidad de la estructura de los ácidos nucleicos en disolución acuosa (5).

Sin embargo, la acción desnaturizante de la urea sobre las proteínas globulares se ha atribuido, más que a su competitividad en la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos de la macromolécula, a un efecto sobre las interacciones soluto-disolvente, que con-

siste en que, por una parte, la urea disminuye la interacción hidrofóbica entre los grupos no polares y el agua; y por otra, aumenta la afinidad del agua por los grupos polares (6,7). De acuerdo con estas ideas, el pequeño efecto observado en los ácidos nucleicos se explicaría por un aumento de la solubilidad de las bases en disolución acuosa, debido a la adición de urea (8).

La diferente importancia de los efectos que produce la urea en proteínas y en ácidos nucleicos, se justificaría teniendo en cuenta que la urea afecta en mayor grado las interacciones de restos no polares con el agua, en el caso de las proteínas, que las interacciones de las bases con el agua, en el caso de los ácidos nucleicos (4).

El debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas por acción de la urea, puede relacionarse con la capacidad de este compuesto de alterar la estructura del agua, pues desplaza el equilibrio de autoasociación de ésta en el sentido de la formación de estructuras acuosas no unidas por enlace de hidrógeno (9). Una observación experimental que apoya esta interpretación es que la urea a alta concentración disminuye significativamente la tensión superficial del agua, aproximadamente en un 12% (2).

Otra propiedad de la urea que puede ser de interés en relación con la estructura del disolvente es que, como consecuencia de su capacidad de formación de enlaces de hidrógeno consigo misma (10), la urea puede dar lugar a estructuras cristalinas con grandes cavidades (clatratos), de un diámetro aproximado de 5 Å, cuya estabilidad depende de la presencia de otras moléculas alojadas en ellas (11). Por consiguiente, en disoluciones acuosas de alta concentración de urea, podrían

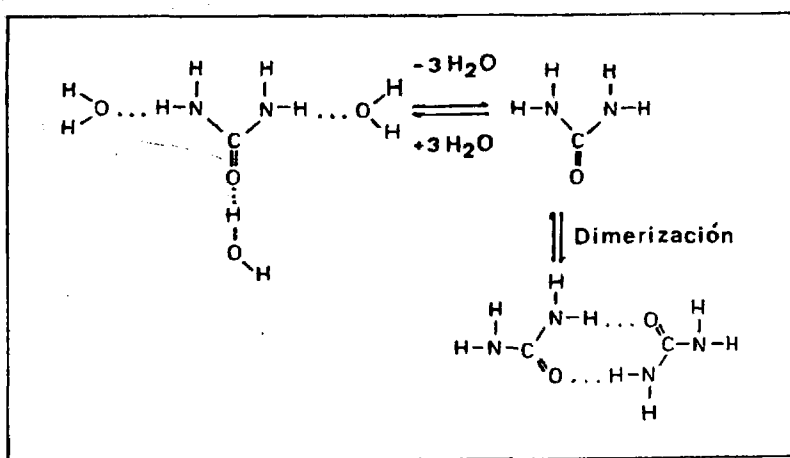


Fig. 2.25.- Equilibrios de asociación de la urea con agua y consigo misma. Según S. Lewin (2).

formarse dichas cavidades y alojar cadenas de otras moléculas.

Con el fin de obtener resultados experimentales que permitieran precisar la contribución relativa de los mecanismos posibles de autoasociación de las unidades monoméricas, se han obtenido, en disolución acuosa 7M de urea, las curvas de hipocromicidad de la serie constituida por adenina, adenosina y AMP. Si la urea, en principio, fuera capaz de debilitar tanto los enlaces de hidrógeno como las interacciones hidrofóbicas, podría esperarse que desfavoreciera la asociación entre unidades monoméricas de los ácidos nucleicos, tanto si el mecanismo responsable de dicha asociación es la formación de enlace de hidrógeno, como si es el apilamiento de las bases, en cuyo caso los valores de las constantes de asociación serían menores que en tampón fosfato. Por el contrario, si la influencia de la urea sobre la autoasociación de estos compuestos es pequeña, este hecho podría justificar que

el efecto que produce la urea en los ácidos nucleicos sea también de poca importancia.

Las experiencias se han efectuado en las mismas condiciones que las realizadas en tampón fosfato. La urea utilizada ha sido de Merck, de calidad "para análisis".

#### Resultados experimentales

Los resultados obtenidos se exponen de acuerdo con el mismo esquema que se ha utilizado en los subcapítulos anteriores, y se comparan con los correspondientes a las disoluciones en tampón fosfato.

TABLA 2.20.

Resumen de los valores de los parámetros obtenidos con el programa de cálculo "HIPOCROM"

Sistema	Intervalo de concentraciones	$\epsilon_1$	$\epsilon_\infty$	p	r
Adenina en urea 7M	$5 \cdot 10^{-6} - 3,75 \cdot 10^{-3} M$	13780	11710±60	0,30±0,02	0,973
	$5 \cdot 10^{-3} - 2 \cdot 10^{-2} M$	"	9600±200	3,2 ±0,4	0,976
Adenosina en urea 7M	$5 \cdot 10^{-6} - 3,5 \cdot 10^{-3} M$	15880	12900±100	0,35±0,03	0,980
	$5 \cdot 10^{-3} - 5 \cdot 10^{-2} M$	"	11100±100	2,5 ±0,2	0,964
AMP en urea 7M	$10^{-5} - 1,5 \cdot 10^{-2} M$	15090	11910±50	0,53±0,02	0,990
	$2 \cdot 10^{-2} - 5 \cdot 10^{-2} M$	"	10100±200	4,9 ±0,6	0,978

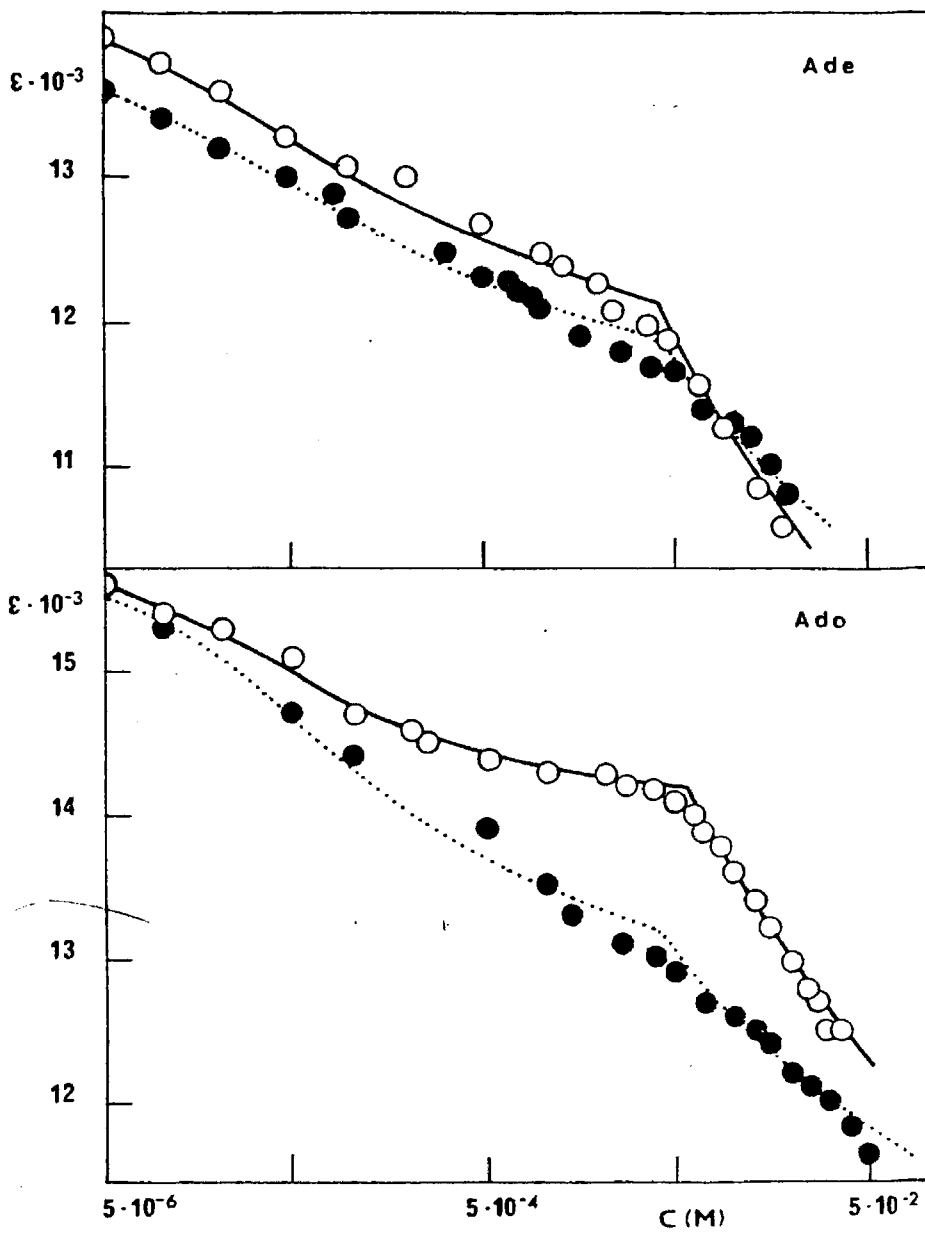


Fig. 2.26.- Absortividad molar de Adenina (Ade) y Adenosina (Ado). —○— Tampón fosfato; ...●... Urea 7M.

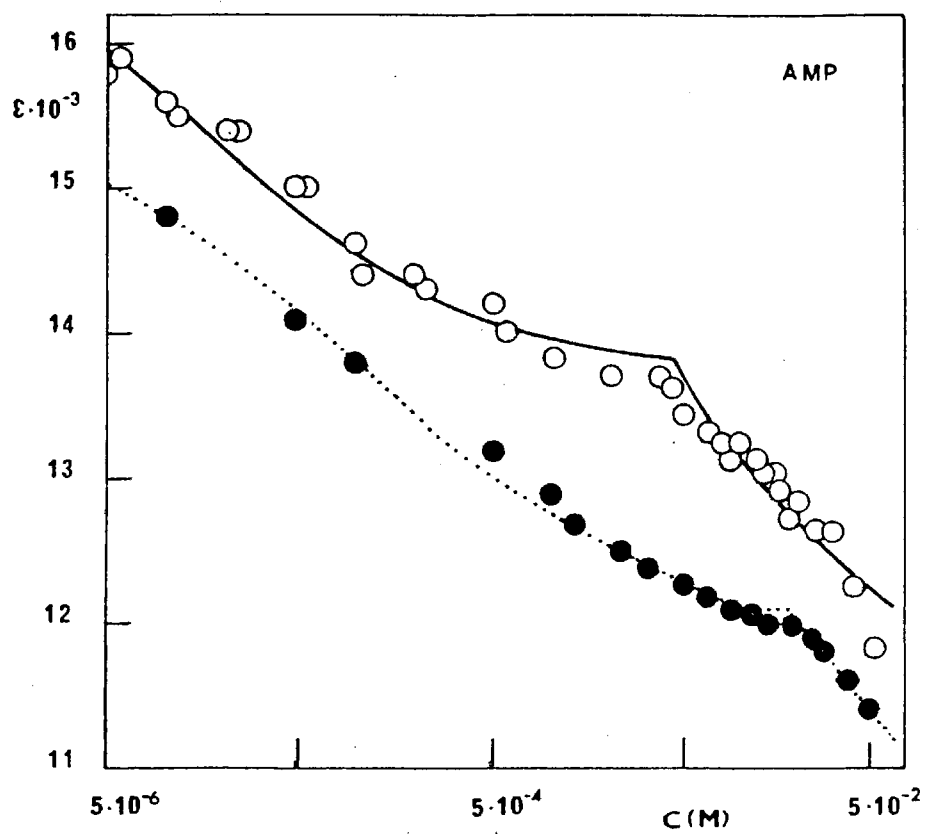


Fig. 2.27.- Absortividad molar de AMP. —○— Tampón fosfato; .....●..... Urea 7M.

TABLA 2.21.

Influencia de la urea. Parámetros de autoasociación de Adenina, Adenosina y AMP

SISTEMA	1 <sup>er</sup> efecto			2° efecto		
	$K_2$	$\delta_2$	h(%)	$K_p$	$\delta_p$	h(%)
Adenina en t. fosf.	$12 \cdot 10^3$	2190	15,4	220	5700	40,1
" " Urea 7M	$12 \cdot 10^3$	2070	15,0	400	4200	30,3
Adenosina en t. fosf.	$16 \cdot 10^3$	1820	11,5	120	5400	34,1
" " Urea 7M	$12 \cdot 10^3$	3000	18,9	800	4800	30,2
AMP en t. fosf.	$48 \cdot 10^3$	3120	18,6	700	5400	32,0
" " Urea 7M	$5,7 \cdot 10^3$	3180	21,1	210	5000	33,1

### Interpretación de resultados

Para la interpretación de resultados, utilizaremos los valores de las constantes de asociación del 1° y 2° efecto, que se resumen en la tabla 2.21.. Como complemento de estos parámetros de asociación, hacemos uso también de las distancias entre bases (tablas 2.22. y 2.23.) y de las energías de interacción (tabla 2.24.).

TABLA 2.22.

Influencia de la urea. Distancia entre bases apiladas  
(Teoría de Tinoco-Rhodes)

SISTEMA	Grado de asociación	h(%)	$\lambda_{0a}$ (Å)	$\lambda_{0a'}$ (Å)	$f_{0a'}$	d(Å)
Adenina (t.fosf.)	Dímero	15,4	2605	2070	0,27	4,4
	Polímero	40,1	"	"	"	4,3
Idem (Urea 7M)	Dímero	15,0	2620	2140	"	4,7
	Polímero	30,3	"	"	"	5,0
Adenosina (t.fosf.)	Dímero	11,5	2590	2060	0,30	5,0
	Polímero	34,1	"	"	"	4,7
Idem (Urea 7M)	Dímero	18,9	2600	2140	"	4,6
	Polímero	30,2	"	"	"	5,2
AMP (t.fosf.)	Dímero	18,6	2590	2060	0,31	4,3
	Polímero	32,0	"	"	"	4,9
Idem (Urea 7M)	Dímero	21,1	2600	2140	"	4,5
	Polímero	33,1	"	"	"	5,1

TABLA 2.23.

Influencia de la urea. Distancia entre bases apiladas  
(Teoría de Bolton-Weiss)

SISTEMA	Grado de asociación	$\lambda$ (Å)	f	$\epsilon_{\infty}$	$\delta$	d (Å)
Adenina (t. fosf.)	Dímero	2605	0,27	12010	2190	3,4
	Polímero	"	"	8500	5700	3,7
Idem (Urea 7M)	Dímero	2620	"	11710	2070	3,4
	Polímero	"	"	9600	4200	4,0
Adenosina (t. fosf.)	Dímero	2590	0,30	14000	1820	3,8
	Polímero	"	"	10400	5400	4,0
Idem (Urea 7M)	Dímero	2600	"	12900	3000	3,4
	Polímero	"	"	11100	4800	4,1
AMP (t. fosf.)	Dímero	2590	0,31	13640	3120	3,5
	Polímero	"	"	11400	5400	4,1
Idem (Urea 7M)	Dímero	2600	"	11910	3180	3,4
	Polímero	"	"	10100	5000	4,1

TABLA 2.24.

Influencia de la urea. Energía libre de apilamiento (kcal/mol)

SISTEMA	Grado de asociación	$\bar{d}$ (Å)	$\Delta G_{\mu\mu}$	$\Delta G_{\mu\alpha}$	$\Delta G_L$	$\Delta G_{\text{base-base}}$	$\Delta G_{\text{exp}}$	$\Delta G_{\text{otr.int.}}$
Adenina (t.fosf.)	Dímero	3,9	-0,82	-0,23	-3,08	-4,1	-5,6	-1,4
	Polímero	4,0	-1,37	-0,41	-5,39	-7,2	-3,2	+4,0
Idem (Urea 7M)	Dímero	4,0	-0,76	-0,20	-2,65	-3,6	-5,6	-2,0
	Polímero	4,5	-0,96	-0,20	-2,66	-3,8	-3,5	+0,3
Adenosina (t.fosf.)	Dímero	4,4	-0,57	-0,11	-1,50	-2,2	-5,7	-3,5
	Polímero	4,3	-1,10	-0,26	-3,49	-4,8	-2,8	+2,0
Idem (Urea 7M)	Dímero	4,0	-0,76	-0,20	-2,65	-3,6	-5,6	-2,0
	Polímero	4,6	-0,90	-0,18	-2,33	-3,4	-4,0	-0,6
AMP (t.fosf.)	Dímero	3,9	-0,82	-0,23	-3,08	-4,1	-6,4	-2,2
	Polímero	4,5	-0,96	-0,20	-2,66	-3,8	-3,9	-0,1
Idem (Urea 7M)	Dímero	4,0	-0,76	-0,20	-2,65	-3,6	-5,1	-1,5
	Polímero	4,6	-0,90	-0,18	-2,33	-3,4	-3,2	+0,2

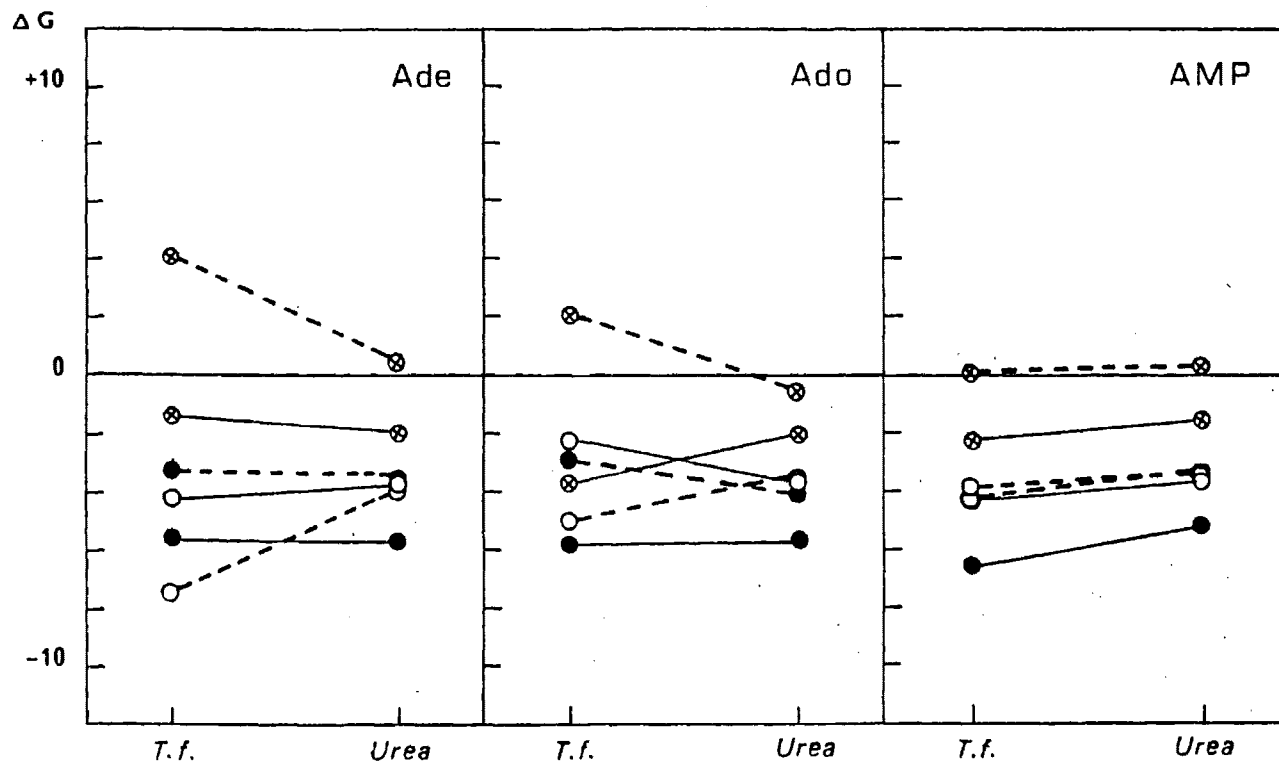


Fig. 2.28.- Influencia de la urea sobre la energía de interacción en Adenina (Ade); Adenosina (Ado) y AMP.  $\circ$   $\Delta G_{\text{base-base}}$ ;  $\otimes$   $\Delta G_{\text{otr.int.}}$ ;  $\bullet$   $\Delta G_{\text{exp.}}$ ; — 1<sup>er</sup> efecto; ---- 2<sup>o</sup> efecto.

Los resultados experimentales muestran que la adición de urea, a concentración 7M, a las disoluciones acuosas de las unidades monoméricas, no origina, en general, una disminución significativa de los valores de las constantes de autoasociación de estos compuestos, en contra de lo que cabría esperar teniendo en cuenta la competitividad de la urea en la formación de enlaces de hidrógeno y su capacidad de disminuir las interacciones hidrofóbicas, factores que dificultarían la asociación de las unidades monoméricas en uno y otro efecto hipocrómico.

1<sup>er</sup> efecto.- Los valores de las constantes de asociación  $K_2$  de adenina y adenosina son del mismo orden en tampón fosfato y en disolución de urea 7M, lo cual indica que la urea no afecta notablemente al mecanismo responsable de la asociación de estos compuestos. Sin embargo, la constante  $K_2$  del AMP disminuye al pasar de tampón fosfato ( $48 \cdot 10^3$ ) a urea 7M ( $6 \cdot 10^3$ ). Esta observación puede apoyar indirectamente la hipótesis de que el mecanismo de asociación del AMP, aunque implique la formación de enlaces de hidrógeno, es diferente del de adenina y adenosina, como se ha comentado al tratar de la influencia del pH.

Es de destacar que la energía de interacción entre las bases, así como la energía de las interacciones hidrofóbicas, tiende a un valor único en urea 7M para las tres unidades monoméricas: base, nucleósido y nucleótido (tabla 2.24.). Ello puede significar que, en disolución de urea 7M, las condiciones del medio son tales que la tendencia a la asociación es prácticamente igual en la base, en el nucleósido y en el nucleótido.

Para la interpretación de este fenómeno, que aquí apuntamos únicamente como hecho experimental, podría ser esclarecedor tener en cuenta que, en una disolución de urea 7M, la fracción molar de agua se

reduce en un 80% (12), con su repercusión correspondiente, fundamentalmente en relación con las interacciones hidrofóbicas.

2° efecto.- Los valores de la constante de asociación  $K_p$  de adenina y adenosina aumentan en urea 7M respecto del tampón fosfato, mientras que la  $K_p$  del AMP disminuye (tabla 2.21.). El signo de estas variaciones depende del balance entre las contribuciones debidas a la energía de interacción entre bases y a "otras interacciones", entre las cuales desempeñan un papel principal las interacciones hidrofóbicas. Como indican los valores recogidos en la tabla 2.24., la energía de interacción entre bases disminuye significativamente en urea 7M, respecto del valor que tiene en tampón fosfato, para las tres-unidades monoméricas, siendo su magnitud en urea 7M del mismo orden en todas ellas, de  $\sim 3,5$  kcal/mol. Sin embargo, la contribución debida fundamentalmente a las interacciones hidrofóbicas, que en tampón fosfato tiene signo positivo en adenina y adenosina y por tanto se opone a la asociación, tiende a anularse en urea 7M. Este hecho revela que la estabilidad de la autoasociación en urea está condicionada únicamente por la interacción entre las bases, las cuales, de algún modo, se encuentran "resguardadas" de las interacciones que puedan perturbar su asociación.

Por otra parte, puede considerarse como significativo el hecho de que las distancias entre las bases tienden a igualarse en disolución 7M de urea, adquiriendo en las 3 unidades monoméricas, un valor de  $4,0 \text{ \AA}$  en el 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico y de  $\sim 4,6 \text{ \AA}$  en el 2° efecto hipocrómico. Ello puede hacer pensar que la capacidad de la urea de formar celdillas (clatratos), le permita, cuando se encuentra a alta concentración, constituir un "molde" en el que se alojen las unidades monoméricas dentro de una estructura geométrica fija; si bien resulta dudoso

hasta qué punto esta predicción, que es aplicable a cadenas lineales de hidrocarburos, puede extenderse a unidades monoméricas de ácidos nucleicos.

En el capítulo de esta Memoria correspondiente a los polinucleótidos se expone un estudio experimental sobre la influencia de la urea en las transiciones térmicas del poli A en las conformaciones de cadena simple y de doble cadena, que revela que el efecto desnaturalizante de la urea es bastante reducido, menor que el producido por los disolventes orgánicos, lo cual está en cierto modo de acuerdo con las conclusiones obtenidas sobre la pequeña influencia de la urea en la autoasociación de las unidades monoméricas.

Por otra parte, teniendo en cuenta que los enlaces hidrofóbicos son menos estables a bajas temperaturas (6) y que, por otra parte, la urea tiene un efecto directo, pero pequeño, en el debilitamiento de los efectos hidrofóbicos, podría ser interesante la realización de estas mismas experiencias a 5°C, ya que, como se expondrá en el apartado siguiente, las constantes de asociación en disolución acuosa son menores a esta temperatura. Este estudio será el objeto de un trabajo ulterior complementario.

#### Conclusiones generales acerca de la influencia de la urea

- 1) La influencia de la urea sobre la asociación de las unidades monoméricas es menos significativa que la de disolventes y la de sales.

- 2) La adición de urea a las disoluciones acuosas de las unidades monoméricas, no impide la manifestación de los dos efectos hipocrómicos.
- 3) Estas dos conclusiones pueden relacionarse con las observaciones experimentales que revelan que el efecto que produce la urea sobre la estructura de los ácidos nucleicos es de poca importancia, y apoyan la idea directriz de este trabajo de que el estudio fisicoquímico de las unidades monoméricas, proporciona una información valiosa acerca de los principios básicos que gobiernan las propiedades de los ácidos nucleicos.
- 4) Los valores de  $K_2$  de adenina y adenosina no experimentan variaciones apreciables, si bien el de AMP disminuye en un factor 9, por lo que pueden apoyar la hipótesis de que la asociación por enlace de hidrógeno en el AMP se verifique según un mecanismo distinto al de adenina y adenosina, como comentamos al tratar de la influencia del pH.
- 5) La interpretación del hecho de que los valores de  $K_p$  de adenina y adenosina aumenten en un factor 2 y 7, respectivamente, mientras que el valor de  $K_p$  del AMP se reduzca aproximadamente a 1/3, no es inmediata, pero lleva a la consideración de que el balance de las energías de interacción base-base e hidrofóbicas, tiene como resultante esta anomalía en el comportamiento del nucleótido respecto de la base y nucleósido correspondientes.

6) No es superfluo comparar la acción de la urea con la del etanol, ya que ambos pueden influir sobre la formación de enlaces de hidrógeno en la autoasociación de las unidades monoméricas. En efecto, la influencia de urea y etanol sobre los valores de  $K_2$  es prácticamente igual; la diferencia fundamental está en que en las disoluciones en etanol está impedido el mecanismo de asociación correspondiente al 2° efecto.

## 2.5. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Para completar el estudio experimental acerca de la influencia que pueden ejercer diversos cambios en el medio, en los mecanismos de autoasociación de las unidades monoméricas en disolución acuosa, hemos analizado la dependencia con la temperatura de las constantes de autoasociación de una serie de unidades monoméricas: adenina, adenosina y 5'-AMP.

En principio, la temperatura puede actuar tanto sobre el disolvente como sobre el soluto. Su variación puede modificar las interacciones entre las moléculas del disolvente, alterando sus propiedades estructurales; en el caso particular del agua, la temperatura afecta al número y a la disposición de los enlaces de hidrógeno entre sus moléculas. Por otra parte, la temperatura puede influir también en las interacciones entre las moléculas del soluto, condicionando la existencia de estados conformacionales de diferente energía. En general, puede predecirse que un aumento de la temperatura dará lugar a un efecto desorganizador en el disolvente y en el soluto.

Ahora bien, en la asociación de las unidades monoméricas en disolución, no pueden considerarse aisladamente el disolvente y el soluto, pues se producen, en grado muy importante, interacciones soluto-disolvente. Desde este punto de vista, la estructura del disolvente puede ser un factor condicionante de las interacciones entre las moléculas del soluto. Por consiguiente, resulta difícil predecir de una manera global la influencia que puede tener la variación de la temperatura en la tendencia a la asociación por parte de las unidades monoméricas, ya que dicha influencia se ejercerá, simultáneamente, sobre el complejo

conjunto de interacciones que hemos mencionado. A cada temperatura, la fuerza inductora de la asociación será consecuencia del balance de todas las interacciones presentes: disolvente-disolvente, soluto-soluto y soluto-disolvente. En otras palabras, la comprensión profunda del efecto de la temperatura sobre la asociación requiere un conocimiento a nivel molecular de los mecanismos implicados en el fenómeno de la asociación.

Aunque en el estudio de la influencia de la temperatura no se consiga alcanzar este grado óptimo de conocimiento acerca de la naturaleza de la asociación, puede obtenerse una información, intrínsecamente valiosa, sobre el signo y la magnitud de los parámetros termodinámicos característicos del fenómeno:  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$ , que por sí mismos pueden contribuir a aclarar cuáles son los factores condicionantes del mismo.

El estudio de la influencia del disolvente y de sales, descrito en este capítulo, ha puesto de manifiesto que las interacciones hidrofóbicas desempeñan un papel fundamental en la estabilización de las estructuras ordenadas de las unidades monoméricas. Por consiguiente, resulta de interés conocer, aunque sea de forma aproximada, los parámetros termodinámicos característicos de este tipo de interacciones, ya que pueden tener una importante contribución a los parámetros globales de la asociación, que son, en definitiva, los que justifican termodinámicamente que este fenómeno se lleve a cabo.

Se han efectuado hasta ahora varios intentos para predecir las magnitudes termodinámicas de la interacción hidrofóbica (1-6). Las conclusiones obtenidas se fundan principalmente en datos indirectos, porque no se ha conseguido desarrollar un método que permita medir di-

rectamente las interacciones hidrofóbicas. Un procedimiento experimental indirecto, ampliamente utilizado, se basa en determinar los parámetros termodinámicos del proceso que consiste en transferir los de ciertos compuestos modelo (generalmente hidrocarburos) desde un disolvente apolar a agua. La hipótesis básica es que en este cambio de disolvente, el compuesto pasa de un entorno apolar a otro polar, y por tanto dicha transferencia supone, en cierto modo, un proceso inverso al que tiene lugar cuando se presenta un efecto hidrofóbico. Las magnitudes termodinámicas de transferencia serán, por consiguiente, comparables en valor absoluto, pero de signo contrario a las de la interacción hidrofóbica.

Kauzmann (2), basándose en estudios de este tipo realizados en cadenas apolares de proteínas, propuso que el efecto hidrofóbico se debe principalmente a la contribución entrópica, de signo positivo ( $\Delta S = +20$  cal/mol grado), siendo comparativamente de menor importancia la contribución entálpica, también de signo positivo ( $\Delta H = +1-2$  kcal/mol). El balance entre ambas contribuciones, dominado por el término entrópico, conduce a un valor negativo de la función de Gibbs a temperatura ambiente ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -3$  a  $-5$  kcal/mol), que justifica termodinámicamente que la interacción hidrofóbica se produzca de forma espontánea. Como indica el signo de la entalpía, esta interacción es endotérmica, y por ello resulta más favorecida a temperatura ambiente que a temperaturas inferiores.

Estas predicciones tienen sólo una validez limitada, porque no consideran la posible existencia de grupos polares. Para poder explicar, en términos de interacciones hidrofóbicas, la asociación de las bases de los ácidos nucleicos en disolución acuosa, ha de suponerse que dichas bases, que de hecho tienen cierto carácter polar, son suficiente

mente no polares.

La teoría que hasta ahora intenta explicar de un modo más general la asociación entre las bases de los ácidos nucleicos, es la de Sinanoglu y Abdülnur (7,8). Según estos autores, la principal fuerza inductora del apilamiento de las bases, es la creación de cavidades capaces de alojarlas en el seno del disolvente, estabilizadas por la energía superficial de éste. Este modelo conduciría a una entropía negativa, y como la energía superficial disminuye al aumentar la temperatura, la entalpía será también negativa. El factor condicionante del apilamiento será el término entálpico, lo cual se encuentra en contradicción con el punto de vista clásico de que las interacciones hidrofóbicas son de naturaleza entrópica.

Esta interpretación parece estar de acuerdo con numerosas determinaciones experimentales de los parámetros termodinámicos de transferencia (9,10), de autoasociación o de interacción de apilamiento intramolecular, en disolución acuosa, de unidades monoméricas (11-15), oligonucleótidos (16-18) y polinucleótidos (16,17,19), efectuadas a partir de medidas de solubilidad, calorimetría, osmometría y espectroscopia IR, DC y DOR. Para dar cuenta de los resultados obtenidos, en los que los valores de  $\Delta H$  y  $\Delta S$  no concuerdan con los que cabría esperar para una interacción hidrofóbica, se ha argumentado que la interacción global de las bases con el agua no puede ser hidrofóbica (9), o bien que existe una contribución "oculta" dentro de las magnitudes anteriores, cuyo valor estaría de acuerdo con lo esperado para una interacción hidrofóbica (20).

En todo caso, parece existir general acuerdo en que, por ahora, no se conoce aún qué es lo que determina el carácter hidrofóbico

de una molécula dada, ni cuáles son exactamente las condiciones de formación de cavidades en el seno del disolvente. Por consiguiente, no se pueden realizar predicciones cualitativas, ni mucho menos cuantitativas sobre las interacciones hidrofóbicas. Lo que parece ser más razonable es que el equilibrio de asociación de las bases resulta de un balance de todas las fuerzas presentes, y que una teoría que pretenda describir este fenómeno debe tener en cuenta tanto las interacciones intrínsecas entre las bases, como la influencia que sobre ellas pueda ejercer el disolvente.

Con objeto de comprobar de forma directa los efectos que la variación de la temperatura pueda tener sobre los mecanismos de asociación responsables de los dos efectos hipocrómicos de las unidades monoméricas, se han comparado los valores de las constantes de asociación,  $K_2$  y  $K_p$  de adenina, adenosina y 5'-AMP en tampón fosfato, a varias temperaturas. Para ello, se han obtenido las curvas de hipocromicidad de estos compuestos en el intervalo de 5° a 75°C. En todos los casos, las experiencias realizadas en el intervalo de temperatura de 25 a 75°C, han puesto de manifiesto que el valor de las absortividades correspondientes al 1<sup>er</sup> efecto da lugar a curvas de hipocromicidad prácticamente paralelas y muy próximas entre sí, por lo que los parámetros de autoasociación, en este intervalo, resultan ser independientes de la temperatura. Para el 2° efecto, no se han podido obtener medidas a temperaturas superiores a la del ambiente, debido a que las células de 25  $\mu\text{m}$ , necesarias para este intervalo de concentraciones, no pueden ser termostatzadas adecuadamente en dicho intervalo de temperatura. A la vista de estos resultados, decidimos explorar la influencia de la temperatura en un intervalo de temperaturas inferiores a la del ambiente, realizando para

ello las correspondientes experiencias para cada una de las unidades monoméricas, a la temperatura de 5°C. Si bien la variación de la absorptividad molar con la temperatura es pequeña, las curvas de hipocromicidad son lo suficientemente diferentes como para permitir la comparación de los parámetros de asociación calculados a partir de ellas.

Los espectros UV se registraron en el espectrofotómetro PE 124, equipado con un portacélulas termostatizable, diseñado por nosotros. El control de temperatura se efectuó, con una precisión aproximada de  $\pm 0,2^\circ\text{C}$ , mediante un criostato "Lauda" TK-30 D, conteniendo un baño constituido por una mezcla al 50% de glicerina y agua. Las células utilizadas fueron las descritas en el capítulo anterior, taponadas herméticamente. Para comprobar que la temperatura dentro del portacélulas era la correcta, se utilizó un teletermómetro YSI 42SC, introduciendo una sonda termométrica en una célula, idéntica a las utilizadas para el registro de los espectros y llena de agua bidestilada, contenida en el portacélulas, ya que la temperatura en todo el conjunto del portacélulas es homogénea. El empañamiento de las células que se produce al disminuir la temperatura hasta  $5^\circ\text{C}$ , se evitó mediante el paso de una corriente de nitrógeno en el portacélulas. Los valores de absorbancia fueron corregidos teniendo en cuenta la contracción de volumen del disolvente al disminuir la temperatura.

La variación con la temperatura de las constantes de asociación, permite determinar las magnitudes termodinámicas del proceso,  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$ . La expresión:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad \{15\}$$

proporciona la variación de la función de Gibbs,  $\Delta G^\circ$ , correspondiente a

la asociación, a partir de los valores de  $K_2$  y de  $K_p$  a cada temperatura.

El valor de la entalpía  $\Delta H^\circ$ , si se supone que ésta es independiente de la temperatura, puede obtenerse según la ecuación de van't Hoff:

$$\log K = - \frac{\Delta H^\circ}{2,303R} \left(\frac{1}{T}\right) + \frac{\Delta S^\circ}{2,303R} \quad |16|$$

de donde:

$$\Delta H^\circ = -2,303R \frac{T_1 \cdot T_2}{T_1 - T_2} \log \frac{K(T_2)}{K(T_1)} \quad |17|$$

siendo  $K(T_1)$  y  $K(T_2)$  los valores de la constante de autoasociación a las temperaturas  $T_1$  y  $T_2$ , respectivamente.

Por último, la expresión:

$$\Delta S^\circ = (\Delta H^\circ - \Delta G^\circ)/T \quad |18|$$

permite calcular la variación de entropía  $\Delta S^\circ$  correspondiente a la asociación.

Evidentemente, para obtener con mayor precisión el valor de  $\Delta H^\circ$  y para comprobar que, efectivamente, es independiente de la temperatura, sería conveniente representar gráficamente un número suficiente de valores de  $\log K$  frente a  $1/T$ , de acuerdo con la ecuación |16|. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, las limitaciones experimentales y las impuestas por la pequeña variación del efecto hipocrómico con la temperatura, dificultan la determinación de  $K$  a otras temperaturas.

#### Resultados experimentales

Los resultados experimentales obtenidos se resumen según un esquema análogo al utilizado en los apartados anteriores de este capítulo.

lo, con las siguientes particularidades:

- 1) Los resultados obtenidos a 5°C se comparan con los correspondientes a 25°C.
- 2) Se dan las representaciones semilogarítmicas de la absorptividad molar,  $\epsilon$ , frente a la concentración molar,  $c$ , para cada una de las unidades monoméricas estudiadas.
- 3) Se dan también las tablas conjuntas de los parámetros de autoasociación ( $K$ ,  $\delta$ ,  $h$ ) y los parámetros termodinámicos ( $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$ ), correspondientes a ambos efectos hipocrómicos.
- 4) Seguidamente, se incluyen las tablas con los valores de distancias entre bases y energías libres de apilamiento, y se expone la interpretación de los resultados obtenidos.

TABLA 2.25.

Resumen de los valores de los parámetros obtenidos con el programa de cálculo "HIPOCROM"

Sistema	Intervalo de concentraciones	$\epsilon_1$	$\epsilon_\infty$	$p$	$r$
denina a 5°C	$5 \cdot 10^{-6} - 2 \cdot 10^{-3} M$	13660	$12500 \pm 200$	$0,31 \pm 0,07$	0,902
	$3,5 \cdot 10^{-3} - 2 \cdot 10^{-2} M$	"	$7100 \pm 500$	$8 \pm 1$	0,969
denosina a 5°C	$5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-3} M$	15680	$13850 \pm 90$	$0,42 \pm 0,04$	0,968
	$7 \cdot 10^{-3} - 3 \cdot 10^{-2} M$	"	$8600 \pm 500$	$10 \pm 1$	0,972
P a 5°C	$5 \cdot 10^{-6} - 7 \cdot 10^{-3} M$	15810	$13110 \pm 90$	$0,55 \pm 0,03$	0,985
	$10^{-2} - 4 \cdot 10^{-2} M$	"	$10300 \pm 300$	$5,5 \pm 0,7$	0,982

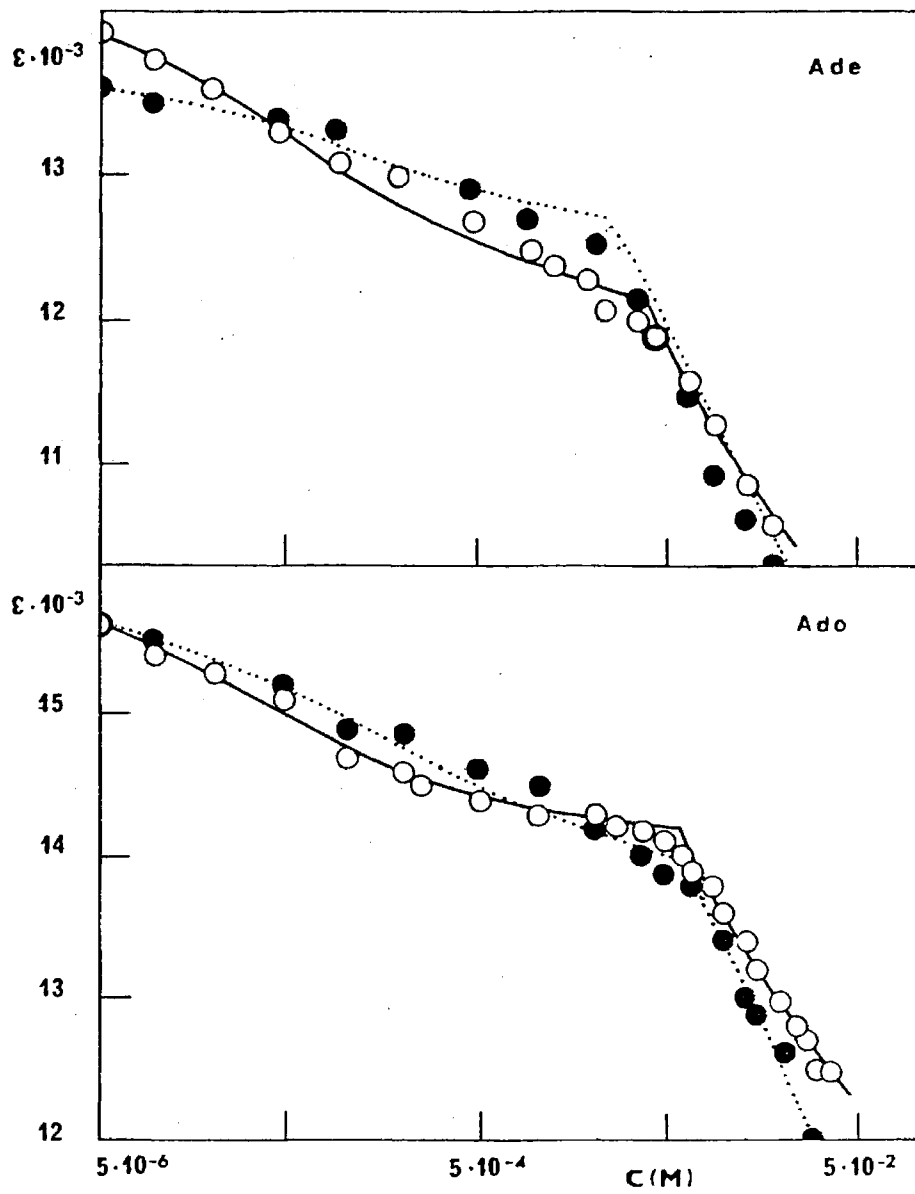


Fig. 2.29.- Absortividad molar de Adenina (Ade) y Adenosina (Ado) en tampón fosfato. ● 5°C; ○ 25°C.

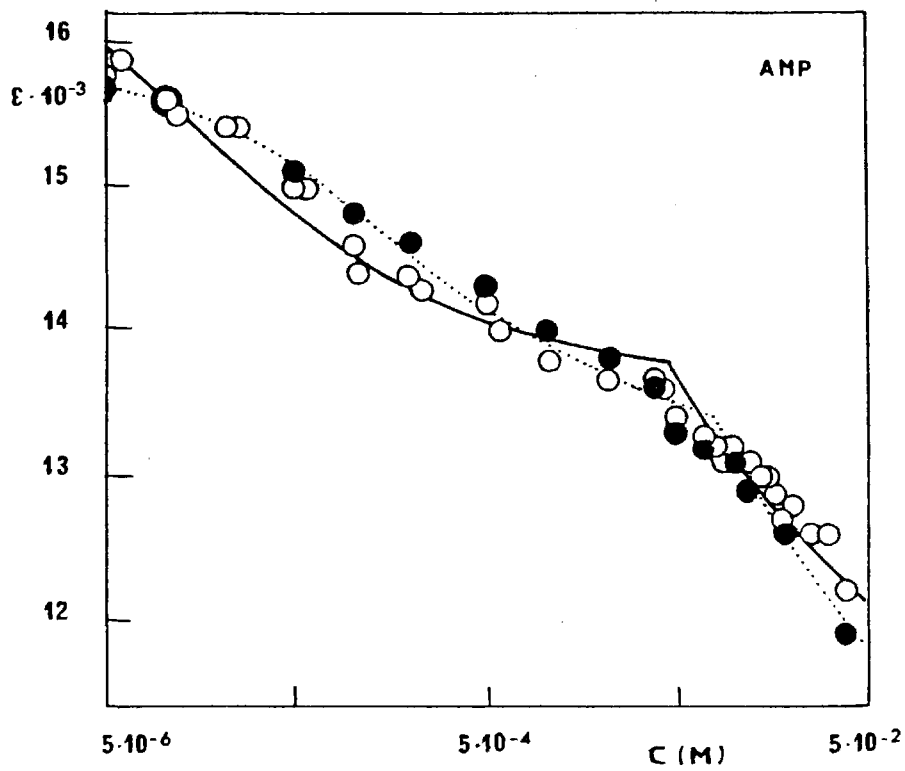


Fig. 2.30.- Absortividad molar de AMP en tampón fosfato.

● 5°C; ○ 25°C.

TABLA 2.26.

Influencia de la temperatura. Parámetros de autoasociación de Adenina, Adenosina y AMP en tampón fosfato

Compuesto	1 <sup>er</sup> efecto			2° efecto		
	$K_2$	$\delta_2$	h(%)	$K_p$	$\delta_p$	h(%)
Adenina a 25°C	$12 \cdot 10^3$	2190	15,4	220	5700	40,1
" a 5°C	$6 \cdot 10^3$	1200	8,8	100	6600	48,3
Adenosina a 25°C	$16 \cdot 10^3$	1820	11,5	120	5400	34,1
" a 5°C	$5 \cdot 10^3$	1830	11,7	70	7100	45,3
AMP a 25°C	$48 \cdot 10^3$	3120	18,6	700	5400	32,0
" a 5°C	$4,5 \cdot 10^3$	2700	17,1	180	5500	34,8

TABLA 2.27.

Parámetros termodinámicos de autoasociación de Adenina, Adenosina y AMP en tampón fosfato

Compuesto	1 <sup>er</sup> efecto			2° efecto		
	$\Delta G^\circ$ (kcal/mol)	$\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$\Delta S^\circ$ (cal/mol K)	$\Delta G^\circ$ (kcal/mol)	$\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$\Delta S^\circ$ (cal/mol K)
Adenina a 25°C	-5,6	+ 5,7	+38	-3,2	+ 6,5	+33
" a 5°C	-4,8			-2,6		
Adenosina a 25°C	-5,7	+ 9,6	+51	-2,8	+ 4,4	+24
" a 5°C	-4,7			-2,3		
AMP a 25°C	-6,4	+19,5	+87	-3,9	+11,2	+51
" a 5°C	-4,6			-2,9		

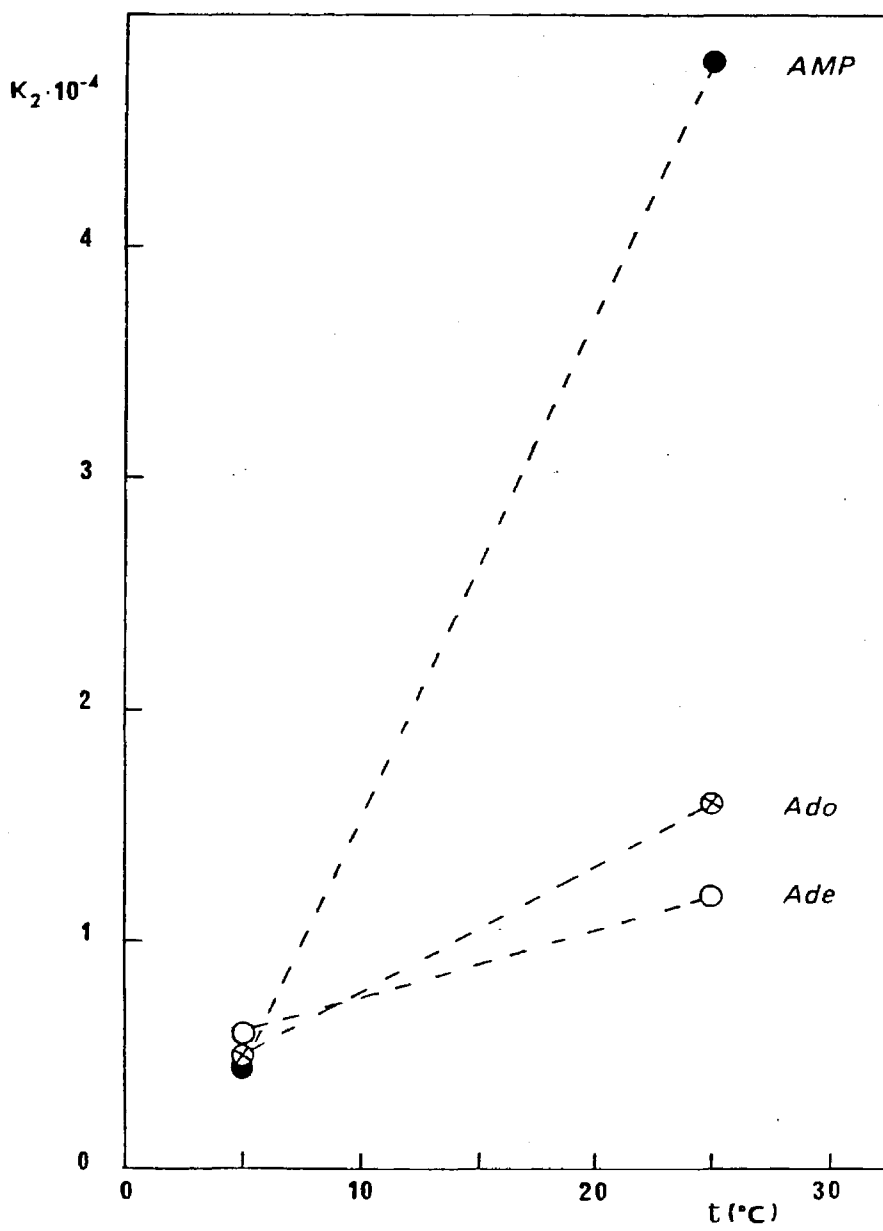


Fig. 2.31.- Influencia de la temperatura sobre la constante de asociación  $K_2$  en Adenina (Ade), Adenosina (Ado) y AMP.

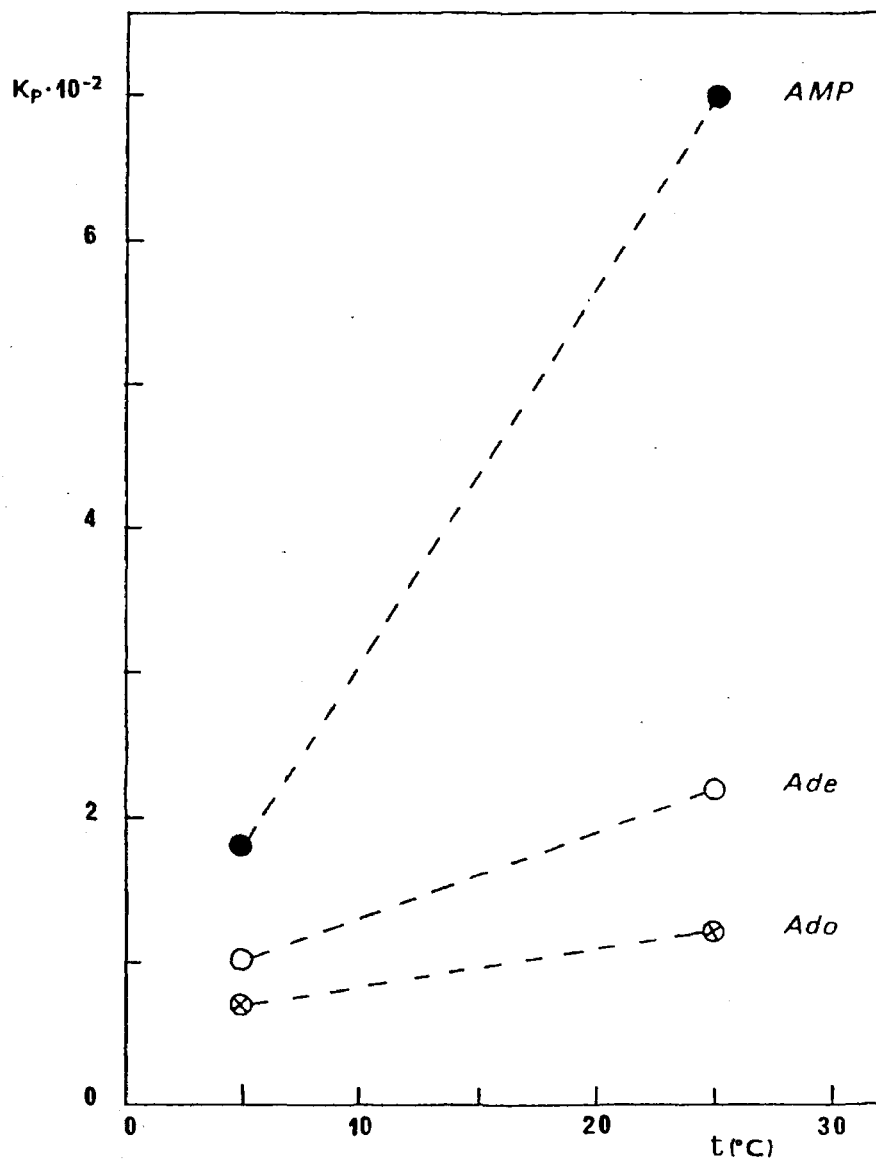


Fig. 2.32.- Influencia de la temperatura sobre la constante de asociación  $K_p$  en Adenina(Ade), Adenosina(Ado) y AMP.

TABLA 2.28.

Influencia de la temperatura. Distancia entre bases apiladas para Adenina, Adenosina y AMP en tampón fosfato.  
(Teoría de Tinoco-Rhodes)

COMPUESTO	Grado de asociación	h(%)	$\lambda_{0a}^{\circ}$ (Å)	$\lambda_{0a}'$ (Å)	$f_{0a}'$	d(Å)
Adenina (25°C)	Dímero	15,4	2610	2070	0,27	4,4
"	Polímero	40,1	"	"	"	4,3
" (5°C)	Dímero	8,8	"	"	"	5,3
"	Polímero	48,3	"	"	"	4,0
Adenosina (25°C)	Dímero	11,5	2590	2060	0,30	5,0
"	Polímero	34,1	"	"	"	4,7
" (5°C)	Dímero	11,7	"	"	"	5,0
"	Polímero	45,3	"	"	"	4,3
AMP (25°C)	Dímero	18,6	2590	2060	0,31	4,3
"	Polímero	32,0	"	"	"	4,9
" (5°C)	Dímero	17,1	"	"	"	4,5
"	Polímero	34,8	"	"	"	4,7

TABLA 2.29.

Influencia de la temperatura. Distancia entre bases apiladas para Adenina, Adenosina y AMP en tampón fosfato.  
(Teoría de Bolton-Weiss)

COMPUESTO	Grado de asociación	$\lambda$ (Å)	f	$\epsilon_{\infty}$	$\delta$	d (Å)
Adenina (25°C)	Dímero	2610	0,27	12010	2190	3,4
"	Polímero	"	"	8500	5700	3,7
" (5°C)	Dímero	"	"	12500	1200	3,8
"	Polímero	"	"	7100	6600	3,5
Adenosina (25°C)	Dímero	2590	0,30	14000	1820	3,8
"	Polímero	"	"	10400	5400	4,0
" (5°C)	Dímero	"	"	13850	1830	3,7
"	Polímero	"	"	8600	7100	3,7
AMP (25°C)	Dímero	2590	0,31	13640	3120	3,5
"	Polímero	"	"	11400	5360	4,1
" (5°C)	Dímero	"	"	13110	2700	3,5
"	Polímero	"	"	10300	5500	4,0

TABLA 2.30.

Influencia de la temperatura. Energía libre de apilamiento (kcal/mol) para Adenina, Adenosina y AMP en tampón fosfato

COMPUESTO	Grado de asociación	$\bar{d}$ (Å)	$\Delta G_{\mu\mu}$	$\Delta G_{\mu\alpha}$	$\Delta G_L$	$\Delta G_{\text{base-base}}$	$\Delta G_{\text{exp}}$	$\Delta G_h$
Adenina (25°C)	Dímero	3,9	-0,82	-0,23	-3,08	-4,1	-5,6	-1,4
"	Polímero	4,0	-1,37	-0,41	-5,39	-7,2	-3,2	+4,0
" (5°C)	Dímero	4,5	-0,54	-0,10	-1,31	-1,9	-4,8	-2,9
"	Polímero	3,7	-1,73	-0,65	-8,60	-11,0	-2,6	+8,4
Adenosina (25°C)	Dímero	4,4	-0,57	-0,11	-1,50	-2,2	-5,7	-3,5
"	Polímero	4,3	-1,10	-0,26	-3,49	-4,8	-2,8	+2,0
" (5°C)	Dímero	4,3	-0,61	-0,13	-1,72	-2,5	-4,7	-2,2
"	Polímero	4,0	-1,37	-0,41	-5,39	-7,2	-2,3	+4,9
AMP (25°C)	Dímero	3,9	-0,82	-0,23	-3,08	-4,1	-6,4	-2,2
"	Polímero	4,5	-0,96	-0,20	-2,66	-3,8	-3,9	-0,1
" (5°C)	Dímero	4,0	-0,76	-0,20	-2,65	-3,6	-4,6	-1,0
"	Polímero	4,3	-1,10	-0,26	-3,49	-4,8	-2,9	+1,9

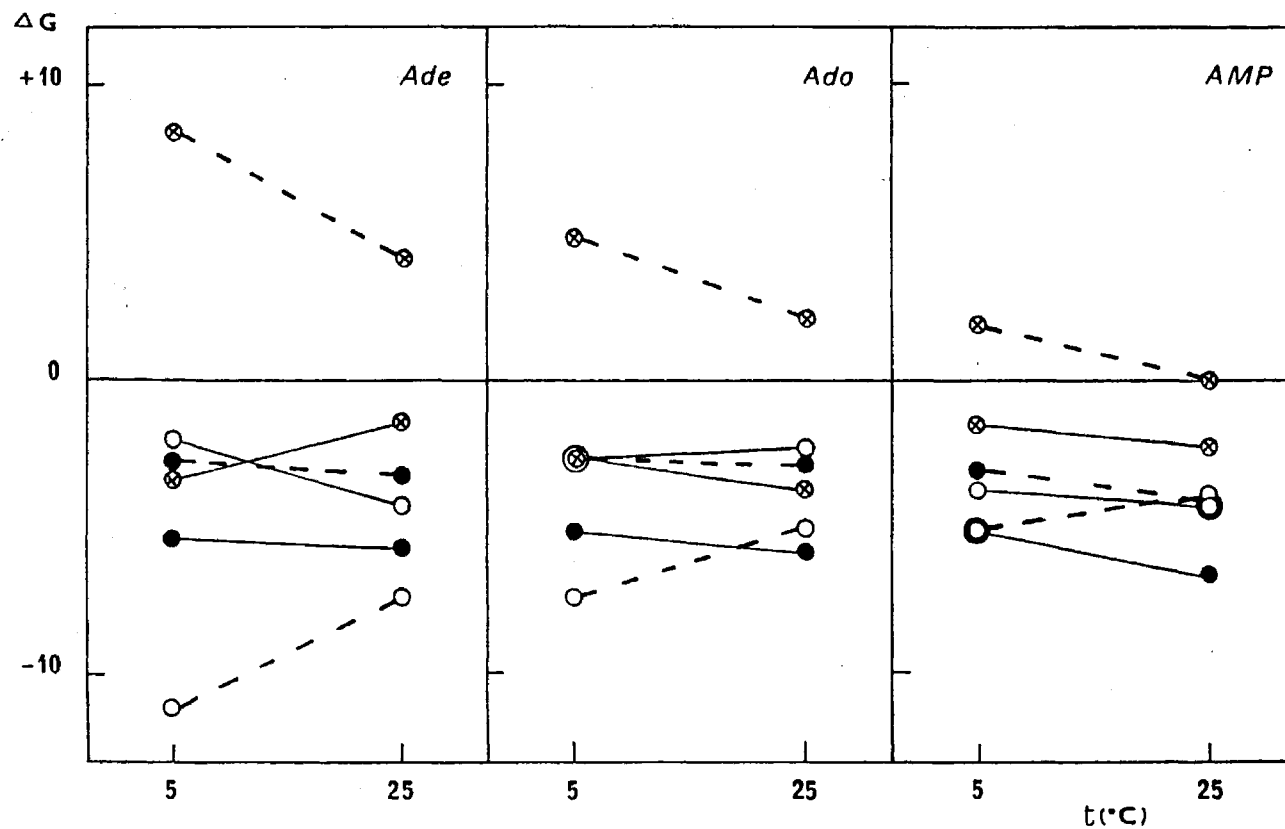


Fig. 2.33.- Influencia de la temperatura sobre la energía de interacción en Adenina (Ade), Adenosina (Ado) y AMP.  $\circ$   $\Delta G_{\text{base-base}}$ ;  $\otimes$   $\Delta G_{\text{otr.int.}}$ ;  $\bullet$   $\Delta G_{\text{exp.}}$ .  
 — 1<sup>er</sup> efecto; ---- 2<sup>o</sup> efecto.

### Interpretación de resultados

Los resultados obtenidos para adenina, adenosina y AMP a 5° y 25°C, revelan que las constantes de asociación  $K_2$  y  $K_p$  aumentan al aumentar la temperatura (tabla 2.26. y fig. 2.31. y 2.32.), siendo máxima esta variación en el AMP. Este resultado se podría interpretar en el sentido de que el fenómeno de autoasociación de las unidades monoméricas se encuentra condicionado, fundamentalmente, por las interacciones hidrofóbicas, ya que éstas son más intensas al aumentar la temperatura y por tanto, las constantes de asociación serían mayores a temperaturas más elevadas.

En esta interpretación de resultados no nos referiremos a la influencia de la temperatura sobre los diversos equilibrios conformacionales "sin"- "anti" y "endo"- "exo" de estas unidades monoméricas, que serán comentados en el capítulo siguiente, al tratar de la determinación de los parámetros termodinámicos de los dinucleósidos-fosfato, pero sí consideramos oportuno señalar en este momento que la influencia de la temperatura sobre tales equilibrios puede afectar, naturalmente, al fenómeno de asociación intermolecular.

Los valores de las distancias entre bases (tablas 2.28. y 2.29.) y de las energías de interacción (tabla 2.30. y fig. 2.33.) de las unidades monoméricas, calculados a partir de los parámetros de asociación que figuran en la tabla 2.26., son útiles para la interpretación de la dependencia de las constantes de asociación con la temperatura.

En el 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico, la distancia entre bases para la adenina es notablemente mayor a 5° (4,5 Å) que a 25°C (3,9 Å), por

lo que la energía de interacción entre las bases (-1,9 a 5°C y -4,1 a 25°C) y la constante de asociación ( $6 \cdot 10^3$  a 5°C y  $12 \cdot 10^3$  a 25°C) son menores a 5°C. Sin embargo, conviene tener en cuenta que, si el mecanismo de asociación correspondiente al 1<sup>er</sup> efecto es la formación de enlace de hidrógeno, los valores de las distancias entre bases, calculados a partir de la hipótesis de que dicho mecanismo es el apilamiento, deben interpretarse con las debidas reservas.

Para adenosina y AMP, la distancia entre bases es aproximadamente igual a 5° y a 25°C (4,4 Å en adenosina y 3,9 Å en AMP), pero la energía libre de las interacciones hidrofóbicas ( $\Delta G_h$ ) resulta menos favorable a la asociación al disminuir la temperatura ( $\Delta G_h = -3,5$  a 25° y  $-2,2$  a 5°C para adenosina;  $-2,2$  a 25° y  $-1,0$  a 5° en AMP), por lo que la constante de asociación también es menor a 5°C. En este sentido, la adenina presenta un comportamiento singular, ya que  $\Delta G_h$  es más favorable a la asociación a 5°C (-2,9) que a 25°C (-1,4), es decir, en este caso, la contribución de las fuerzas hidrofóbicas tendría menor importancia que la energía de interacción base-base.

En el 2° efecto hipocrómico, la distancia entre bases para las tres unidades monoméricas, disminuye al disminuir la temperatura, y por tanto la energía de interacción entre bases es mayor a 5° que a 25° C. Sin embargo, las constantes de asociación son mayores a 25° que a 5° C. Para aclarar esta aparente contradicción, conviene recordar que la energía libre de asociación representa la contribución de dos factores principales: la energía de interacción entre bases y el conjunto de otras energías de interacción, entre las cuales se encuentran, fundamentalmente, las interacciones hidrofóbicas. Al disminuir la temperatura, aumenta la interacción entre las bases facilitando la asociación, con l

cual disminuye la distancia entre ellas, como acabamos de decir. Por otra parte, al disminuir la temperatura, las energías de las interacciones hidrofóbicas, si bien son positivas en todos los casos, aumentan en valor absoluto, es decir, tienden a oponerse a la asociación. El resultado global, que es el balance de estos dos factores, es que la asociación de las unidades monoméricas resulta desfavorecida a temperaturas bajas, y por tanto la constante es más pequeña.

La importancia de las interacciones hidrofóbicas en el proceso de la autoasociación se refleja igualmente en los parámetros termodinámicos recogidos en la tabla 2.27.. Puede observarse que, en todos los casos,  $\Delta H^\circ > 0$ . Por consiguiente, para que se satisfaga la condición de espontaneidad  $\Delta G^\circ < 0$ , el término  $\Delta S^\circ$  ha de ser positivo y suficientemente elevado, como en efecto ocurre. Ello indica que, en el intervalo de temperaturas estudiado, la reacción está favorecida única y exclusivamente porque el aumento de entropía es suficientemente grande. Consideramos digno de ser destacado que el signo de estas magnitudes termodinámicas concuerda con los conceptos clásicos de la interacción hidrofóbica (2).

Ahora bien, la asociación de las unidades monoméricas, consideradas aisladamente del disolvente, debe dar lugar a una disminución de la entropía, sea cual sea el mecanismo responsable, porque conduce a una estructura ordenada. Por tanto, el aumento global de entropía observado debe proceder de una desordenación del disolvente.

La interpretación de este resultado conduciría a un posible modelo del fenómeno de la asociación en disolución acuosa. El agua líquida tiene una estructura constituida por moléculas de  $H_2O$  unidas entre sí mediante enlaces de hidrógeno (1). Si se introduce en ella un compuesto del tipo de las unidades monoméricas de los ácidos nucleicos, como la su

perficie de las bases es hidrofóbica, las moléculas de agua tenderán a alejarse de las otras moléculas, favoreciéndose por tanto de forma indirecta la autoasociación de la unidad monomérica.

Desde un punto de vista estructural, el proceso de asociación de estos compuestos equivaldría a crear "cavidades" del tamaño adecuado en el seno del disolvente. Estas cavidades exigen la ruptura de enlaces de hidrógeno entre moléculas de  $H_2O$ , lo que tiene como resultado un valor positivo de  $\Delta H^\circ$ , que sumado al  $\Delta H^\circ$  correspondiente a la asociación de las unidades monoméricas, daría un valor global positivo para la entalpía del proceso.

Esta interpretación puede contribuir a aclarar la aparente paradoja de que las unidades monoméricas tiendan a formar espontáneamente una estructura ordenada, es decir, un sistema con menos entropía que el correspondiente a estos mismos compuestos sin asociar, lo cual, en principio, estaría en contradicción con el 2° Principio de la Termodinámica. Ahora bien, este Principio establece que los procesos tienden a alcanzar un estado de equilibrio en el que la entropía del sistema (en nuestro caso, las unidades monoméricas), sumada a la entropía del entorno (el agua), sea máxima. Para que pueda producirse la asociación, la variación total de entropía debe ser positiva, como hemos dicho anteriormente, pero esto solamente es posible si la contribución entrópica debida a la ruptura de los enlaces de hidrógeno entre moléculas de agua y la formación de cavidades, que es positiva, supera en valor absoluto a la contribución debida a la asociación del soluto, que es negativa.

El hecho experimental de que esta asociación se encuentre dificultada a temperaturas próximas a  $0^\circ C$  respecto de  $25^\circ C$ , puede indicar que la ruptura de enlaces de hidrógeno y la creación de cavidades en

na estructura próxima a la del hielo es más difícil que en agua líquida.

La importancia de las interacciones hidrofóbicas en la fuerza inductora de la asociación, puesta de manifiesto en los signos de los parámetros termodinámicos obtenidos, podría ser más notable a temperaturas inferiores a la del ambiente que a temperaturas superiores, pues al aumentar suficientemente la temperatura, el debilitamiento de las interacciones entre las bases o bien la disminución de la energía superficial del agua, podrían llegar a superar al efecto hidrofóbico descrito. En este caso, la tendencia a la asociación disminuiría, en concordancia con los datos relativos a la desnaturalización de ácidos nucleicos y polinucleótidos por efecto de la temperatura.

Es obvia la trascendencia que representa la conclusión obtenida respecto a la importancia de las interacciones hidrofóbicas en el fenómeno de autoasociación de las unidades monoméricas. Con objeto de obtener información complementaria respecto a este problema, se ha realizado un estudio previo para determinar las constantes de asociación de estas mismas unidades monoméricas en disolución de etanol, en cuyo disolvente las interacciones solvofóbicas serían nulas o tendrían un carácter diferente al correspondiente a las disoluciones en que se emplea el agua como disolvente. Los primeros resultados experimentales obtenidos parecen indicar que la variación de  $K_2$  respecto a la temperatura es inversa a la observada en disoluciones acuosas.

Conclusiones generales acerca de la influencia de la temperatura

- 1) Las constantes de autoasociación  $K_2$  y  $K_p$  disminuyen al dis-

minuir la temperatura, en el intervalo de 25° a 5°C.

- 2) La disminución de las constantes de asociación al disminuir la temperatura va acompañada de un descenso paralelo de las interacciones hidrofóbicas tal que la asociación resultaría menos favorecida a 5° que a 25°C. Este resultado autoriza a concluir que las interacciones hidrofóbicas son el factor condicionante de la autoasociación de las unidades monoméricas en medio acuoso (únicamente en el caso de la adenina, en su 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico, la variación de las fuerzas hidrofóbicas parece tener menos importancia que la de la energía de interacción base-base).
- 3) Las magnitudes termodinámicas de la autoasociación son  $\Delta G^\circ < 0$ ,  $\Delta H^\circ > 0$  y  $\Delta S^\circ > 0$ .
- 4) Los valores de los parámetros termodinámicos  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$  revelan que el factor condicionante de la asociación de adenina, adenosina y 5'-AMP, en medio acuoso, es el término entrópico tanto en el 1° como en el 2° efecto hipocrómico.
- 5) Los signos de los parámetros termodinámicos obtenidos, está de acuerdo con los que era previsible obtener si las interacciones hidrofóbicas fueran el factor condicionante de la asociación y permiten concluir, por tanto, que la fuerza directriz de la asociación de las unidades monoméricas parece ser la reordenación de las moléculas del disolvente. Desde este punto de vista, la estructura del disolvente desempeña un papel principal en la estabilidad del sistema.

3.- DINUCLEOSIDOS-MONOFOSFATO

Como se ha expuesto en los capítulos 1 y 2 de la presente Memoria, el estudio de la interacción directa entre las bases, puesta de manifiesto en las disoluciones acuosas de las unidades monoméricas libres, puede constituir una importante contribución al conocimiento de la estructura y estabilidad de los ácidos nucleicos. Ahora bien, en los ácidos nucleicos, las unidades monoméricas nucleotídicas se encuentran formando una cadena covalente, unidas entre sí a través de enlaces fosfodiéster 3'-5'. La existencia de este tipo de enlaces da lugar a una diferencia significativa entre las propiedades de los monómeros, por un lado, y las de los dímeros, oligómeros y polímeros por otro. Consideramos, por tanto, que puede ser de gran interés comprobar si existe alguna contribución a la asociación que se deba a la existencia del esqueleto covalente ribosa-fosfato entre las bases, del tipo del existente en los ácidos nucleicos, y para ello es preciso determinar parámetros de autoasociación en sistemas de mayor complejidad que las propias unidades monoméricas libres. En este sentido, hemos realizado un estudio de diversos dinucleósidos-monofosfato, oligonucleótidos y polinucleótidos, cuyos resultados exponemos en este capítulo y en el siguiente.

Los dinucleósidos-monofosfato son compuestos de fórmula general  $XpY$ , siendo X e Y nucleósidos, que pueden ser iguales (ApA, UpU, etc.) o distintos (ApU, CpG, etc.); la pentosa puede ser ribosa o desoxiribosa.

Los dinucleósidos-monofosfato son las más pequeñas unidades estructurales que contienen el enlace fosfodiéster 3'-5', y por consiguiente, constituyen los oligonucleótidos más sencillos que pueden uti

izarse como modelos para el estudio de los ácidos nucleicos y polinucleótidos (1). De hecho, los dinucleósidos-fosfato contienen, en potencia, toda la información necesaria para predecir las propiedades y estructura de un ácido nucleico, si estas propiedades dependiesen solamente de la interacción entre las unidades adyacentes de la cadena (2).

Estos compuestos han sido objeto de numerosos estudios, principalmente por técnicas espectroscópicas: UV, DOR y DC (1-5), y RMN (4,6-8), cuyos resultados indican, en general, la existencia de interacción entre ambas bases en disolución acuosa. La interpretación de los datos obtenidos se ve dificultada, sin embargo, por la posibilidad de que coexistan interacciones intra- e intermoleculares entre las bases. Es razonable pensar que las primeras predominen a concentraciones bajas de estos compuestos (6), y las segundas a concentraciones altas, pero la separación de unas y otras constituye una labor de gran complejidad.

Los espectros UV pueden indicar solamente la magnitud de la interacción, mientras que los espectros de DC y RMN proporcionan una información algo más detallada sobre la conformación del dímero. Por consiguiente, las diferentes técnicas utilizadas en el estudio de los dinucleósidos-fosfato se complementan entre sí, no sólo para tratar de establecer un modelo conformacional de estos compuestos, sino también para interpretar sus posibles mecanismos de interacción intermolecular. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que en disolución existe equilibrio entre diversos estados conformacionales, lo cual complica notablemente tanto la descripción de éstos, como la de sus interacciones (9).

Se admite actualmente que las unidades nucleosídicas de los

dinucleósidos-fosfato adoptan la conformación "anti" y que las hélices de los dímeros son dextrógiras (7), apilándose las bases paralelamente entre sí. La magnitud del apilamiento intramolecular depende mucho del tipo de bases, siendo menor, en general, en aquellos dímeros que contienen uracilo (2). Como posibles causas de estas diferencias en el apilamiento, se ha sugerido el hecho de que las fuerzas electrostáticas entre las bases son diferentes, o lo que es probablemente más importante, que las bases deben tener distintos efectos sobre la estructura del agua que las rodea (2,4). En todo caso, el modelo conformacional de los dinucleósidos-fosfato sugiere que estos compuestos representan el paso inicial en la formación de una cadena helicoidal de ácido nucleico (10).

Teniendo en cuenta la idea directriz del presente trabajo de que las propiedades de los ácidos nucleicos son función de sus unidades constituyentes, trataremos de estimar hasta qué punto la asociación de las bases en el dímero puede predecirse a partir de la asociación de los monómeros libres. Con este objeto, hemos extendido la aplicación de nuestro método de estudio de asociaciones intermoleculares, descrito en el cap. 1 para las unidades monoméricas, a la investigación de las interacciones de los dinucleósidos-fosfato.

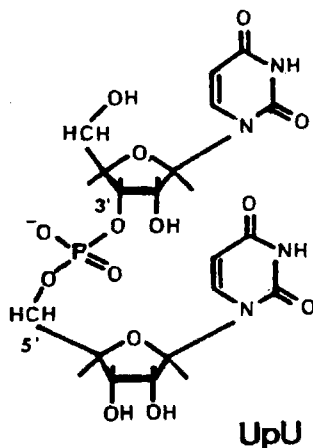
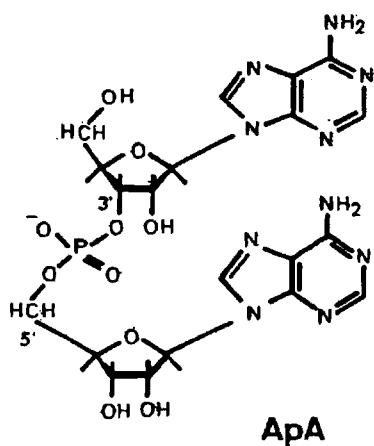
Se presentan a continuación los resultados del estudio experimental, mediante espectroscopía UV, de la autoasociación en disolución acuosa de dos dinucleósidos-fosfato, uno púrico (ApA) y otro pirimidínico (UpU), y se comparan con los datos relativos a la autoasociación de sus componentes libres, es decir, de los nucleósidos y nucleótidos correspondientes.

Estos compuestos se han elegido intencionadamente con objeto de comprobar si presentan diferencias de comportamiento, análogas a

las ya indicadas en el estudio de las unidades monoméricas (cap. 1 y 2), y establecer una correlación con las propiedades estructurales de los polinucleótidos respectivos.

Seguidamente, se exponen los resultados obtenidos en el estudio de la heteroasociación de estos compuestos, entre sí y con el nucleósido complementario respectivo, con el fin de determinar si a este nivel de complejidad estructural se ponen ya de manifiesto las interacciones específicas entre bases complementarias, que son de importancia fundamental en la estructura y función de los ácidos nucleicos.

Dentro de cada uno de estos apartados, se examina la influencia que sobre las interacciones de dinucleósidos-fosfato ejercen la concentración de los compuestos y la temperatura, que son los dos factores que pueden afectar de modo más significativo a las interacciones implicadas.



### 3.1. AUTOASOCIACION

Los parámetros de autoasociación de ApA y de UpU se han determinado de forma análoga a los de las unidades monoméricas, es decir, a partir de la variación de la absorptividad molar en el máximo con la concentración de cada compuesto (tablas 3.1. y 3.3.).

Los productos utilizados son las sales monoamónicas de adenilil-(3'-5')-adenosina (ApA) y de uridilil-(3'-5')-uridina (UpU), de "Boehringer", desecados a vacío, con gel de sílice, hasta peso constante. Las disoluciones se han preparado en tampón fosfato.

Se ha medido también la variación con la temperatura de la absorptividad molar en el máximo de una disolución patrón de cada uno de los compuestos estudiados. Los espectros UV a temperatura inferior a la del ambiente se han obtenido con ayuda de un criostato, según el método experimental descrito en el apartado 2.5.. Las medidas a temperatura superior a la del ambiente se han realizado en el espectrofotómetro SP 1800, acoplado a un controlador de programa de temperatura Unicam SP 876, regulado a una velocidad de calentamiento de 1°C/min.. Este sistema permite obtener directamente, en un registrador XY, la variación de la absorbancia con la temperatura, a una longitud de onda determinada. Los resultados obtenidos por ambos procedimientos concordaron perfectamente y fueron corregidos, en todo caso, teniendo en cuenta la variación de volumen del disolvente con la temperatura. Tanto en la tabla 3.2. como en la 3.4., correspondientes a ApA y UpU respectivamente, se dan, en función de la temperatura, los valores de absorptividad molar del dímero y sus respectivas hipocromicidades respecto del valor de  $\epsilon_1$  de cada uno de estos dinucleósidos-fosfato.

Teniendo en cuenta que un dinucleósido-fosfato se puede considerar formado por la unión, mediante un enlace fosfodiéster 3'-5', de un nucleósido y un nucleótido, se comparan los parámetros de autoasociación experimentales de ApA y de UpU, con los obtenidos aplicando también nuestro método de cálculo a la curva resultante de sumar las respectivas curvas de hipocromicidad de adenosina y AMP, por una parte, y de uridina y UMP, por otra (v. fig. 1.6., 1.12., 1.10. y 1.15.). De esta forma, pretendemos comprobar si la asociación de los dinucleósidos-fosfato se puede predecir solamente a partir de sus componentes, o bien si existe alguna contribución adicional debida a la presencia del esqueleto ribosa-fosfato (tabla 3.5.).

La estimación de la hipocromicidad de los dinucleósidos-fosfato se ha realizado según tres procedimientos diferentes, basados en la ecuación:

$$h_x = \frac{\epsilon_{ref} - \epsilon_x}{\epsilon_{ref}} 100 \quad |19|$$

en donde  $h_x$  es la hipocromicidad correspondiente a la concentración  $x$  del dinucleósido-fosfato,  $\epsilon_x$  es la absorptividad molar a dicha concentración y  $\epsilon_{ref}$  es la absorptividad que se toma como referencia, resultando

para cada uno de los procedimientos utilizados, en el caso del ApA, las siguientes expresiones:

$$1^\circ) \quad h_x = \frac{\epsilon_1(\text{ApA}) - \epsilon_x}{\epsilon_1(\text{ApA})} 100 \quad |20|$$

$$2^\circ) \quad h'_x = \frac{[\epsilon_1(\text{Ado}) + \epsilon_1(\text{AMP})] - \epsilon_x}{[\epsilon_1(\text{Ado}) + \epsilon_1(\text{AMP})]} 100 \quad |21|$$

3°)

$$h''_x = \frac{\epsilon_x(A+pA) - \epsilon_x}{\epsilon_x(A+pA)} 100 \quad |22|$$

Los valores de hipocromicidad  $h(\%)$ , que figuran en la tabla 3.5., se han calculado según el 1<sup>er</sup> procedimiento, y corresponden a la hipocromicidad de la molécula asociada con respecto a la molécula libre como se estableció en el desarrollo del método de cálculo (ec. |8|). En la misma tabla figuran los valores de  $h(\%)$  del sistema nucleósido+nuclido, calculados respecto del valor que resulta al sumar los  $\epsilon_1$  de dichas unidades monoméricas.

Los valores de hipocromicidad  $h'(\%)$  y  $h''(\%)$  de la tabla 3.6., se han calculado según los procedimientos 2° y 3°, respectivamente. Se ha determinado, por tanto, la hipocromicidad correspondiente a diversos grados de asociación de los dinucleósidos-fosfato: a dilución infinita, en el punto de separación de los efectos hipocrómicos y a concentración infinita, tomando como referencia el valor suma de los  $\epsilon_1$  del nucleósido y nucleótido respectivos ( $\epsilon_{ref} = 32580$  para ApA y  $\epsilon_{ref} = 25120$  para UpU), para obtener los valores de  $h'_x$ . Estos valores dan una idea de como progresa la asociación al aumentar la concentración del dinucleósido-fosfato, en relación al estado de mínima agregación posible, que es el que corresponde a las unidades monoméricas no asociadas: nucleósido y nucleótido.

Análogamente, los valores de  $h''_x$  se han obtenido tomando como referencia los valores de absorptividad molar de la mezcla nucleósido+nuclido, a las mismas concentraciones que para  $h'_x$ .

### Resultados experimentales

Los resultados obtenidos se exponen a continuación, de acuerdo con el siguiente esquema:

1) Se agrupan los resultados en los siguientes epígrafes:

3.1.1. Autoasociación de ApA.

3.1.2. Autoasociación de UpU.

2) Dentro de cada epígrafe, se resumen en una tabla los valores de la absorptividad molar en el máximo, en función de la concentración molar de soluto, así como los valores de los parámetros más significativos de los ajustes lineales utilizados (tablas 3.1. y 3.3.).

3) Para cada uno de los compuestos estudiados, se representan en una misma gráfica la curva de hipocromicidad experimental del dinucleósido-fosfato y la curva calculada a partir de los ajustes obtenidos en el cap. 1 para los nucleósidos y nucleótidos correspondientes (fig. 3.1. y 3.2.).

4) A continuación, se expone la variación de la absorptividad molar en el máximo con la temperatura, para cada compuesto (tablas 3.2. y 3.4.).

5) Por último, se dan las tablas conjuntas de los parámetros de autoasociación correspondientes a los diferentes sistemas estudiados (ApA, A+pA, UpU, U+pU), así como la hipocromicidad de diferentes estados de asociación (tablas 3.5. y 3.6.).

3.1.1. Autoasociación de ApA

TABLA 3.1.

ApA en tampón fosfato ( $\lambda_{\text{max}}=258 \text{ nm}$ ).

1 <sup>er</sup> efecto		2° efecto	
c(mol/l)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$ (l/mol.cm)	c(mol/l)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$ (l/mol.cm)
$4,60 \cdot 10^{-6}$	25,8	$3,50 \cdot 10^{-3}$	22,2
$9,00 \cdot 10^{-6}$	25,3	$4,80 \cdot 10^{-3}$	21,8
$9,60 \cdot 10^{-6}$	25,3	$5,00 \cdot 10^{-3}$	21,4
$1,80 \cdot 10^{-5}$	25,0	$7,40 \cdot 10^{-3}$	21,1
$4,50 \cdot 10^{-5}$	24,0	$7,80 \cdot 10^{-3}$	20,8
$4,80 \cdot 10^{-5}$	24,2	$9,70 \cdot 10^{-3}$	20,7
$9,00 \cdot 10^{-5}$	23,8	$1,00 \cdot 10^{-2}$	20,7
$9,60 \cdot 10^{-5}$	23,7	$1,50 \cdot 10^{-2}$	19,4
$1,80 \cdot 10^{-4}$	23,3	$2,00 \cdot 10^{-2}$	19,9
$4,50 \cdot 10^{-4}$	23,1	$3,00 \cdot 10^{-2}$	18,7
$4,80 \cdot 10^{-4}$	23,1		
$5,00 \cdot 10^{-4}$	22,9		
$9,00 \cdot 10^{-4}$	22,7		
$9,60 \cdot 10^{-4}$	22,6		
$1,00 \cdot 10^{-3}$	22,7		
$2,00 \cdot 10^{-3}$	22,7		
$2,50 \cdot 10^{-3}$	22,4		
$2,90 \cdot 10^{-3}$	22,3		

Resumen de los valores obtenidos con el programa de cálculo "HIPOCROM".

	1 <sup>er</sup> efecto	2° efecto
$\epsilon_1$	26630	26630
$\epsilon_\infty$	$22180 \pm 60$	$16400 \pm 500$
p	$0,269 \pm 0,009$	$5,2 \pm 0,6$
r	0,992	0,947

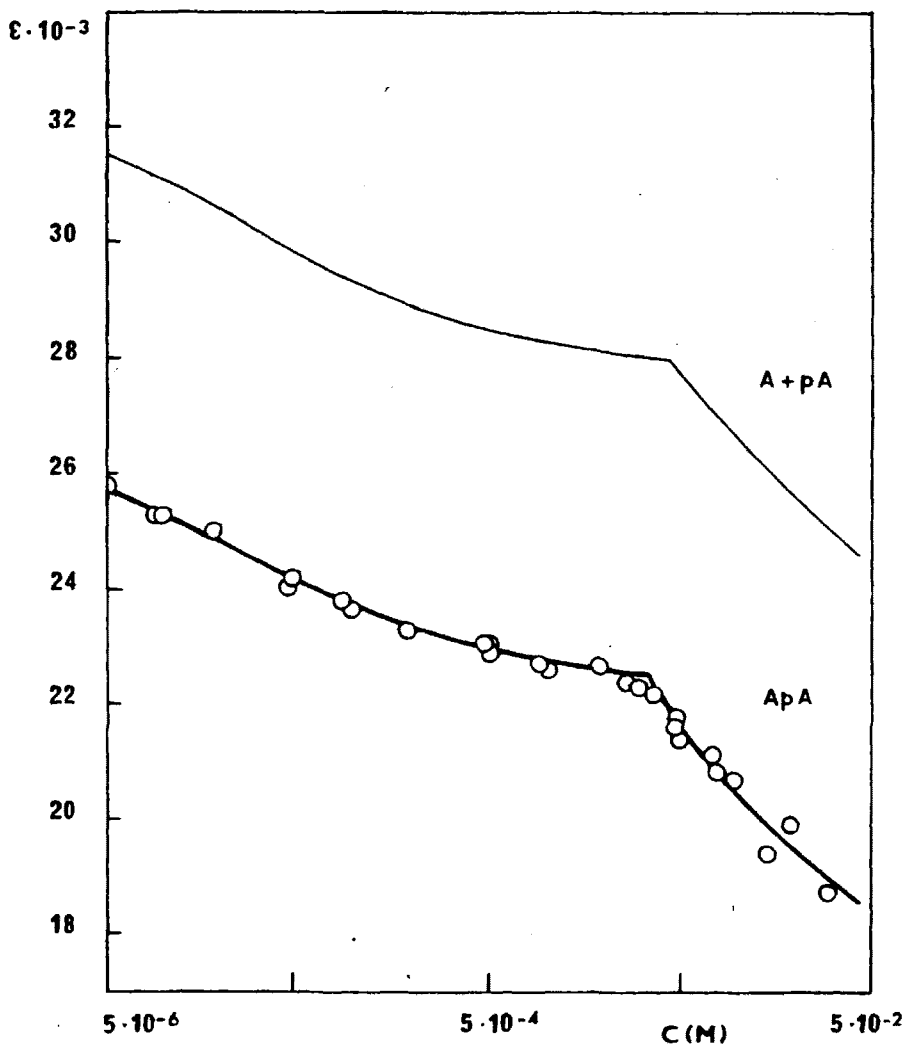


Fig. 3.1.- Absortividad molar de Adenilil-(3'-5')-Adenosina a 258 nm. ApA: experimental; A+pA: calculada a partir de las unidades monoméricas.

TABLA 3.2.

Variación con la temperatura de la hipocromicidad de ApA  
( $c=1,08 \cdot 10^{-4} M$ )

t (°C)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	h (%)
5	23,88	10,3
15	24,18	9,2
25	25,00	6,1
30	25,44	4,5
35	25,60	3,9
40	25,64	3,7
45	25,86	2,9
50	25,92	2,7
55	26,16	1,8
60	26,22	1,5
65	26,38	0,9
70	26,46	0,6
75	26,62	0,0
80	26,62	0,0
85	26,70	-0,3
90	26,80	-0,6

3.1.2. Autoasociación de UpU

TABLA 3.3.

UpU en tampón fosfato ( $\lambda_{\max}=262$  nm).

1 <sup>er</sup> efecto		2° efecto	
c (mol/l)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$ (l/mol.cm)	c (mol/l)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$ (l/mol.cm)
$4,30 \cdot 10^{-6}$	18,7	$1,00 \cdot 10^{-3}$	16,8
$8,60 \cdot 10^{-6}$	18,5	$1,40 \cdot 10^{-3}$	16,7
$9,60 \cdot 10^{-6}$	18,4	$2,10 \cdot 10^{-3}$	16,6
$1,90 \cdot 10^{-5}$	18,3	$2,60 \cdot 10^{-3}$	16,4
$4,80 \cdot 10^{-5}$	17,9	$4,70 \cdot 10^{-3}$	16,4
$8,60 \cdot 10^{-5}$	17,6	$5,10 \cdot 10^{-3}$	16,4
$9,60 \cdot 10^{-5}$	17,6	$7,10 \cdot 10^{-3}$	16,3
$1,90 \cdot 10^{-4}$	17,5	$1,90 \cdot 10^{-2}$	16,3
$3,50 \cdot 10^{-4}$	17,5	$2,60 \cdot 10^{-2}$	16,2
$4,80 \cdot 10^{-4}$	17,3		
$5,10 \cdot 10^{-4}$	17,3		
$6,40 \cdot 10^{-4}$	17,1		

Resumen de los valores obtenidos con el programa de cálculo "HIPOCROM".

	1 <sup>er</sup> efecto	2° efecto
$\epsilon_1$	19110	19110
$\epsilon_\infty$	$16940 \pm 60$	$16040 \pm 50$
p	$0,18 \pm 0,01$	$0,48 \pm 0,05$
r	0,982	0,956

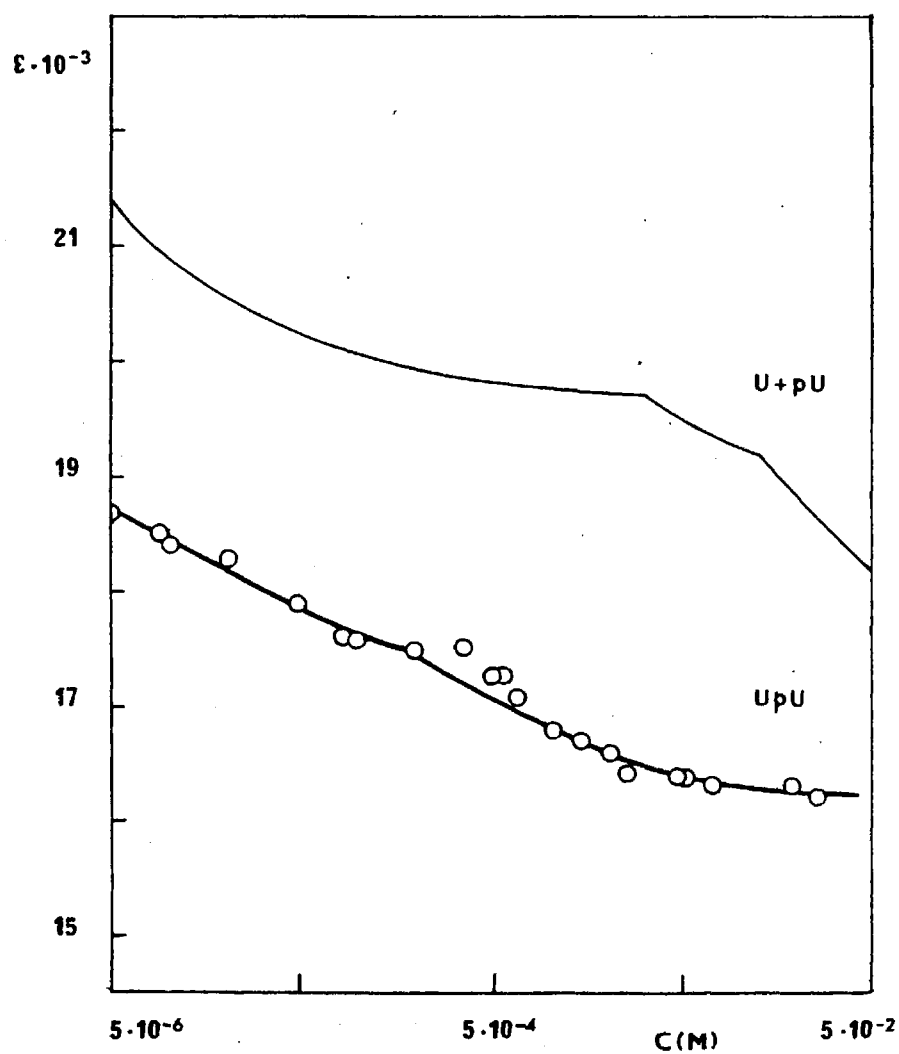


Fig. 3.2.- Absortividad molar de Uridilil-(3'-5')-Uridina a 262 nm. UpU: experimental; U+pU: calculada a partir de las unidades monoméricas.

TABLA 3.4.

Variación con la temperatura de la hipocromicidad de UpU  
( $c = 8,6 \cdot 10^{-5} M$ )

t (°C)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	h (%)
5	17,48	8,5
15	17,60	7,9
20	17,62	7,8
25	17,64	7,7
30	17,76	7,1
35	17,80	6,9
40	17,94	6,1
45	17,98	5,9
50	18,12	5,2
55	18,16	5,0
60	18,22	4,7
65	18,26	4,4
70	18,20	4,8
75	18,14	5,1
80	18,42	3,6
85	18,48	3,3
90	18,44	3,5

TABLA 3.5.

Parámetros de autoasociación de dinucleósidos-fosfato

Sistema	1 <sup>er</sup> efecto			2° efecto		
	$K_2$	$\delta_2$	h(%)	$K_p$	$\delta_p$	h(%)
ApA (exp.)	$31 \cdot 10^3$	4450	16,7	400	10200	38,3
A+pA (calc.)	$32,9 \cdot 10^3$	4870	14,9	340	10230	31,4
UpU (exp.)	$33 \cdot 10^3$	2170	11,4	$13 \cdot 10^3$	3070	15,1
U+pU (calc.)	$740 \cdot 10^3$	5500	21,9	$10,6 \cdot 10^3$	6470	25,8

TABLA 3.6.

Hipocromicidad de dinucleósidos-fosfato, respecto del valor de  $\epsilon_{ref}$  calculado para las unidades monoméricas correspondientes.

Sistema	Concentración	$\epsilon$	$\epsilon_{ref}$	h' (%)	$\epsilon_{ref}$	h'' (%)
ApA	c=0	26630	32580	18,3	32580	18,3
	$c=3 \cdot 10^{-3}M$	22180	"	31,9	27710	20,0
	$c=\infty$	16400	"	49,7	22350	26,6
UpU	c=0	19110	25120	23,9	25120	23,9
	$c=6,4 \cdot 10^{-4}M$	16940	"	32,6	19800	14,4
	$c=\infty$	16040	"	36,1	17070	6,0

## Interpretación de resultados

### 1) ApA

#### Curva de hipocromicidad

La curva de hipocromicidad experimental del ApA es de hábito muy parecido al de la curva que se obtiene sumando las respectivas curvas de hipocromicidad de Adenosina y de AMP (A+pA), si bien se encuentra desplazada hacia valores más bajos de la absortividad molar, y por tanto presenta un efecto hipocrómico adicional (fig. 3.1.).

El hecho más destacable de la curva de hipocromicidad del ApA es que, análogamente a las unidades monoméricas, este dinucleósido-fosfato presenta un doble efecto hipocrómico. Para hacer compatible la existencia de este doble efecto con nuestra hipótesis inicial de que el 1<sup>er</sup> efecto puede ser atribuido a la formación de dímeros, bastaría admitir, como hipótesis plausible, que en las disoluciones diluídas de los dinucleósidos-fosfato hay un primer paso de agregación a estructuras dimericas, siendo cada una de las unidades de este dímero un dinucleósido fosfato; es decir, cada molécula de este compuesto, aunque estructuralmente es dimérica, se comporta como especie química de manera análoga a las que hemos designado como "unidades monoméricas". Si ello es así, podrían admitirse las dos alternativas de mecanismos de asociación señaladas para el 1<sup>er</sup> efecto en dichas unidades monoméricas, y que son la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares o la formación de dímeros por apilamiento de 2 moléculas de dinucleósido-fosfato.

Conviene destacar que la concentración a que tiene lugar la separación de los 2 efectos hipocrómicos es aproximadamente la misma en

el ApA y en el sistema A+pA.

#### Parámetros de asociación e hipocromicidad

Los valores de los parámetros de asociación para una y otra curva concuerdan, dentro de los límites del error experimental (tabla 3.5.). Esta concordancia de resultados podría interpretarse en el sentido de que la autoasociación del ApA puede predecirse a partir de los datos obtenidos previamente para las unidades monoméricas correspondientes, a excepción del efecto hipocrómico adicional citado anteriormente. Hay que subrayar, no obstante, que esta conclusión representa una primera aproximación a la interpretación de los complejos mecanismos implicados en el fenómeno conjunto de la asociación, ya que tal concordancia de los valores de los parámetros de asociación puede ser la resultante de los valores correspondientes, no sólo a la asociación de los dinucleósidos-fosfato, sino también a las constantes de los equilibrios conformacionales de estos compuestos, que en todo caso, parecen tener mayor importancia en los dinucleósidos-fosfato que en las unidades monoméricas, como exponemos más adelante.

El cálculo de la hipocromicidad  $h'$  (%) del ApA a diferentes concentraciones (tabla 3.6.) revela que, a dilución infinita del dinucleósido-fosfato, la hipocromicidad respecto de las unidades monoméricas no asociadas es del 18,3%; por consiguiente, la presencia de la cadena ribosa-fosfato induce por sí sola una ordenación de las bases. El valor de  $h'$  aumenta gradualmente hasta un valor máximo del 49,7%, a concentración infinita, que es notablemente superior al de adenosina (34,1%) y de AMP (32,0%), consideradas aisladamente (tabla 1.4.).

El valor de  $h''(\%)$  a dilución infinita es, naturalmente, el mismo obtenido para  $h'$  de 18,3%. A la concentración correspondiente a la separación entre el 1° y el 2° efecto hipocrómico, es del 20,0%; por tanto, en el 1<sup>er</sup> efecto se mantiene prácticamente constante la hipocromicidad del dinucleósido-fosfato respecto de la mezcla de nucleósido y nucleótido. Sin embargo, en el 2° efecto, la hipocromicidad así calculada aumenta hasta un 26,6%, lo cual indicaría que el enlace fosfodiéster 3'-5' representa una contribución especialmente significativa en el mecanismo de apilamiento; de acuerdo con ello, este tipo de enlace sería, estructuralmente, el factor condicionante fundamental para la formación de "cadenas" (polinucleótidos y ácidos nucleicos). Esta conclusión apoya la idea general, expuesta por algunos autores (11), de que el apilamiento de las bases es una consecuencia de la conformación relativamente rígida del esqueleto de las cadenas polinucleótidas.

En resumen, la diferencia fundamental de comportamiento entre las unidades monoméricas y los dinucleósidos-fosfato estaría en la mayor ordenación de la forma polimérica (2° efecto hipocrómico), de acuerdo con los comentarios expuestos sobre la variación de la hipocromicidad con la concentración.

#### Influencia de la temperatura

No es posible llevar a cabo una interpretación adecuada de los resultados obtenidos acerca de la influencia de la temperatura sobre las propiedades de los dinucleósidos-fosfato en disolución, sin tener presente la idea fundamental de que dicha influencia puede afectar simultáneamente, como mínimo, a dos procesos fisicoquímicos diferentes:

1°) A los equilibrios de asociación intermolecular entre las diversas moléculas de dinucleósido-fosfato presentes en la disolución.

2°) A los equilibrios entre los diversos estados conformacionales posibles de dichas moléculas. Dentro de éstos, afectaría fundamentalmente a los equilibrios entre las conformaciones apiladas y no-apiladas de las bases de una misma molécula de dinucleósido-fosfato (que se designan como equilibrios de apilamiento intramolecular, para distinguirlos de los procesos de apilamiento intermolecular que tienen lugar en el fenómeno de asociación), y en menor grado, en todo caso, a los equilibrios de las conformaciones "sin" y "anti" de los nucleósidos y a los de las conformaciones "endo" y "exo" de los anillos de ribosa.

Hay que tener presente que los equilibrios conformacionales citados no son independientes entre sí. Los estudios realizados por RMN permiten concluir que la interacción intramolecular de apilamiento de bases condiciona, preferentemente, las conformaciones "anti" y "3'-endo" (6).

De acuerdo con estas ideas, la mayor dificultad que presentan los estudios de los dinucleósidos-fosfato en disolución, es, precisamente, la separación cuantitativa de los equilibrios de asociación y de los equilibrios conformacionales.

El modo más directo de investigar los equilibrios conformacionales y, en consecuencia, la interacción intramolecular, es estudiar la influencia de la temperatura sobre alguna propiedad molecular sensible a la conformación. En este sentido, se han realizado numerosos estudios por RMN de los desplazamientos químicos de los protones de las ba-

ses y de la ribosa, así como de las constantes de acoplamiento, a diversas temperaturas (4,6,7,12-14). Teniendo en cuenta la complejidad del problema que se plantea al intentar separar los efectos debidos a la interacción intra- e intermolecular, se ha adoptado, como solución más razonable, la de trabajar con una concentración de dinucleósido-fosfato tan baja como sea posible, con el fin de minimizar los efectos debidos a la interacción intermolecular, que son tanto más notables cuanto mayor es la concentración del compuesto. En efecto, puesto que el proceso de asociación intermolecular depende también de la temperatura, éste podría llegar a enmascarar completamente la interacción intramolecular si la concentración del compuesto fuera apreciable. Ahora bien, debido a la limitada sensibilidad de la espectroscopía de RMN en el estudio de disoluciones muy diluidas, las concentraciones más pequeñas con las que se suele trabajar son del orden de  $5 \cdot 10^{-3}$ - $10^{-2}$ M, pero a estas concentraciones ya existe un grado apreciable de asociación, como revelan nuestros datos de UV (fig. 3.1. y 3.2.), por lo que los efectos debidos a la asociación pueden predominar sobre los que se deben a la interacción intramolecular.

Se comprende, por tanto, lo difícil que resulta estudiar independientemente, por métodos experimentales directos, los diferentes equilibrios mencionados. Por ello, los últimos trabajos realizados en este campo están orientados a determinar los parámetros termodinámicos de interacción intra- e intermolecular, mediante cálculos numéricos iterativos, basados en la hipótesis de que determinadas señales de los protones pueden asignarse específicamente a los procesos de asociación intermolecular, o bien a los de apilamiento intramolecular (15).

No entra dentro de los propósitos del presente trabajo efectuar un estudio de los equilibrios conformacionales de los dinucleósidos-fosfato, que constituiría por sí mismo otro área de investigación, pero queremos destacar la oportunidad que ofrece la espectroscopía UV de estudiar disoluciones mucho más diluidas de las que permite investigar la espectroscopía de RMN, en las cuales se minimiza muy notablemente el grado de asociación. Por consiguiente, hemos estudiado la dependencia con la temperatura de la absorptividad molar de diversas disoluciones muy diluidas de ApA.

El estudio de la absorción UV de las disoluciones de ApA en función de la temperatura, permitiría evaluar, en principio, las magnitudes termodinámicas de la asociación intermolecular y de la interacción intramolecular. Para obtener las primeras, sería necesario calcular a diversas temperaturas las constantes de asociación, determinadas a partir de las curvas de hipocromicidad en todo el intervalo de concentraciones accesible, y aplicar la ecuación de van't Hoff (ec. |16|), como se ha realizado en el estudio de adenina, adenosina y 5'-AMP, cuyos resultados se exponen en el cap. 2.5.. Sin embargo, este procedimiento no ha podido llevarse a cabo por requerir una cantidad de producto de la que no hemos dispuesto en el momento de la realización de este trabajo, y dado su interés, será objeto de una experiencia complementaria posterior.

Ahora bien, a partir de los datos de que disponemos, en el momento actual, de las "curvas de fusión" (absortividad molar frente a temperatura) de las mencionadas disoluciones diluidas de ApA, puede hacerse una estimación de la influencia de la temperatura sobre el grado de asociación. Según se deduce de la curva de fusión de una disolución

$10^{-4}M$  de ApA (tabla 3.2.), la hipocromicidad calculada respecto del valor de  $\epsilon_1$  (a dilución infinita y que corresponde, por tanto, al dinucleósido-fosfato no asociado), es del 10,3% a 5°C, y se anula a partir de 75°C, es decir, si la hipocromicidad fuese solamente una medida del grado de asociación, la elevación de temperatura produciría un efecto desorganizador sobre la estructura del ApA, alcanzándose a 75°C un estado equivalente al del dinucleósido-fosfato libre.

A partir de la citada curva de fusión pueden estimarse también unas constantes aparentes de apilamiento intramolecular, según un método que se basa en el llamado "modelo de 2 estados" (9,16,17), y es análogo al utilizado por otros autores en el estudio de los equilibrios conformacionales de los dinucleósidos-fosfato (3-5, 18-22).

El modelo de 2 estados es el más simple que se ha utilizado para explicar el equilibrio conformacional de apilamiento intramolecular de los dinucleósidos-fosfato. Este modelo supone que las moléculas de dinucleósido-fosfato pueden tener solamente una de dos conformaciones posibles, bien la conformación "apilada", en la cual las dos bases se disponen paralelamente entre sí, solapándose sus anillos correspondientes, ó bien la conformación "no apilada". La variación de la absorción UV con la temperatura representaría una medida de la fracción de moléculas "apiladas"; en este sentido, el modelo de 2 estados se ha empleado para el cálculo, a partir de espectros UV, de las magnitudes termodinámicas de apilamiento intramolecular de dinucleósidos-fosfato, oligo- y polinucleótidos (4,19,20,22). Las constantes aparentes de apilamiento intramolecular, según este modelo, se definen por la expresión:

$$K(T) = \frac{1-f(T)}{f(T)} \quad |23|$$

siendo  $f(T)$  la fracción de moléculas no apiladas a cada temperatura, que se calcula a partir de los espectros UV mediante la fórmula:

$$f(T) = \frac{\epsilon(T) - \epsilon_{\min}}{\epsilon_{\max} - \epsilon_{\min}} \quad |24|$$

siendo  $\epsilon(T)$  la absorptividad molar aparente a cada temperatura  $T$ , y  $\epsilon_{\min}$  y  $\epsilon_{\max}$  las absorptividades molares correspondientes a las moléculas de conformación "apilada" y "no apilada", respectivamente.

La dificultad experimental más importante que presenta este método, es la determinación de los valores de  $\epsilon_{\min}$  y  $\epsilon_{\max}$ , que, en general, no son accesibles a una medición directa. En consecuencia, se suele recurrir a la extrapolación de estos valores en las "curvas de fusión"; es decir, se toma como  $\epsilon_{\min}$  el valor de  $\epsilon$  correspondiente al límite inferior del intervalo de temperatura, y como  $\epsilon_{\max}$ , el valor correspondiente al límite superior, a los cuales se puede suponer que son mayoritarias las conformaciones "apilada" y "no apilada", respectivamente.

De acuerdo con los valores de la tabla 3.2., la absorptividad molar de la disolución de ApA tiende a coincidir en el límite superior experimental de temperatura con el valor de  $\epsilon_1$  de este compuesto (tabla 3.1.). Por el contrario, en el límite inferior de temperatura, la variación de la absorptividad es aún relativamente grande, y en consecuencia, no puede determinarse el valor a que tiende (fig. 3.3.); una aproximación razonable consistiría en tomar el valor de  $\epsilon_{\infty}$  del efecto hipocrómico que aparece en el intervalo de concentraciones al que pertenece la disolución estudiada, es decir:

$$\epsilon_{\max} = \epsilon_1 = 26630$$

$$\epsilon_{\min} = (\epsilon_{\infty})_d = 22180$$

Esta aproximación de ambos valores límites de absorptividad no presupone la identificación de los procesos que subyacen a la curva de fusión (apilamiento intramolecular) y a la curva de hipocromicidad (asociación intermolecular).

Se ha calculado, según este procedimiento, la constante aparente de apilamiento intramolecular a cada temperatura, utilizando la ecuación

$$K(T) = \frac{26630 - \epsilon(T)}{\epsilon(T) - 22180} \quad |25|$$

En la fig. 3.4. se representan los valores de  $\log K$  así calculados frente a los de  $1/T$ , a los que puede ajustarse una ecuación lineal, lo cual supone una confirmación de la validez del modelo empleado (20). A partir de la recta ajustada, se han estimado las magnitudes  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$  de la interacción intramolecular de apilamiento, mediante la ecuación |16| dada en el cap. 2.5., resultando:

$$\begin{aligned} \Delta H^\circ &= -9,4 \text{ kcal/mol} \\ \Delta S^\circ &= -33 \text{ cal/mol K} \end{aligned}$$

Este valor de  $\Delta H^\circ$  concuerda con los obtenidos por otros autores a partir de valores de hipocromismo de espectros UV (4,19,23).

A la vista de estos resultados, es obvio el interés que presenta el tratar de comparar el comportamiento de los dinucleósidos-fosfato con los de las unidades monoméricas, en relación con la temperatura. Con este objeto, se han obtenido las "curvas de fusión" de disoluciones de adenina, adenosina y 5'-AMP a una concentración equivalente a la

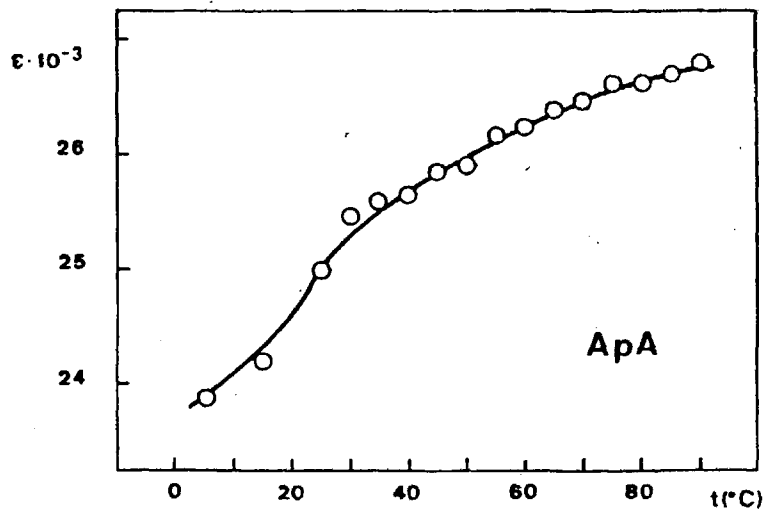


Fig. 3.3.- Curva de fusión de ApA.

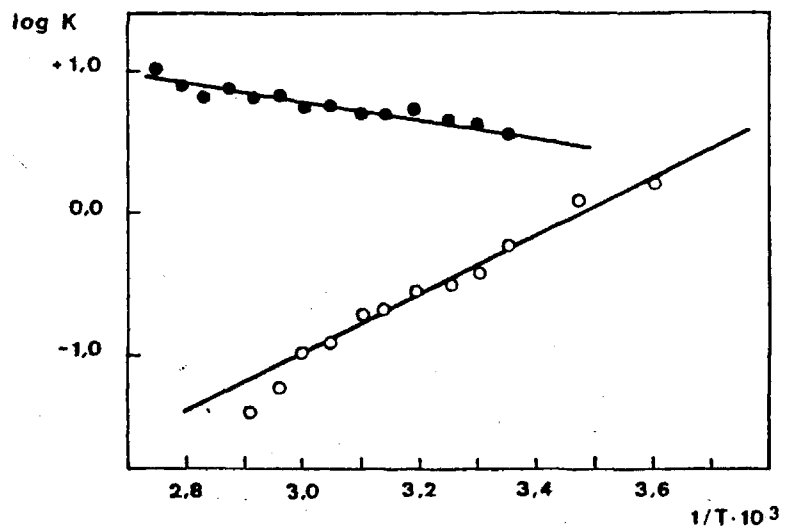


Fig. 3.4.- Representación de van't Hoff para ApA (○) y AMP (●).

utilizada para el ApA y, a partir de los valores de la absorptividad molar correspondientes a cada temperatura, leídos sobre dichas curvas, se han calculado los valores de  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$  aplicando el mismo método que acabamos de citar para el ApA, basado en el modelo de 2 estados. En la fig. 3.4. se da la representación de van't Hoff correspondiente a la "curva de fusión" del AMP, como ejemplo representativo. Los valores de  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$  calculados para estas unidades monoméricas son:

Adenina	$\Delta H^\circ = +4,8$ kcal/mol	$\Delta S^\circ = +16$ cal/mol K
Adenosina	$\Delta H^\circ = +2,5$ "	$\Delta S^\circ = +10$ "
AMP	$\Delta H^\circ = +2,0$ "	$\Delta S^\circ = +10$ "

Comparando estos valores con los de los parámetros termodinámicos de autoasociación de adenina, adenosina y AMP, dados en la tabla 2.27., se observa que el signo de estas magnitudes termodinámicas es positivo, tanto si se calculan a partir de las curvas de hipocromicidad, como de las curvas de fusión.

Teniendo en cuenta que, en el caso de la adenina, no hay lugar a considerar los equilibrios conformacionales sin-anti y endo-exo, únicamente se podrían tomar en consideración los equilibrios de formación de dímeros, bien por formación de enlace de hidrógeno o por apilamiento de bases, que, en todo caso, corresponderían a asociaciones intermoleculares.

Un razonamiento análogo para adenosina y 5'-AMP, sugiere que estas magnitudes termodinámicas no pueden asignarse aquí al tipo de equilibrios conformacionales citados para los dinucleósidos-fosfato, y por tanto, esta concordancia de signo podría indicar que los procesos fisicoquímicos estudiados en las unidades monoméricas mediante las cur-

vas de hipocromicidad y las curvas de fusión, son fundamentalmente, de la misma naturaleza; es decir, de autoasociación intermolecular y no de transiciones conformacionales.

Esta deducción revaloriza la interpretación de los signos de las magnitudes termodinámicas en función de la importancia de las interacciones hidrofóbicas en el proceso de la autoasociación, expuesta en el cap. 2.5.; es decir, el signo de  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$  se hace positivo cuando el proceso fisicoquímico que describen está condicionado, fundamentalmente, por las interacciones hidrofóbicas, de acuerdo con la aparente paradoja termodinámica discutida en los procesos de desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos.

## 2) UpU

### Curva de hipocromicidad

La curva de hipocromicidad experimental del UpU es de hábito análogo al de la curva que se obtiene sumando las curvas de hipocromicidad de Uridina y de UMP (U+pU), si bien pueden observarse las siguientes diferencias (fig. 3.2.):

1.- La curva de UpU se encuentra desplazada hacia valores más bajos de la absorptividad molar, y por consiguiente, presenta un efecto hipocrómico adicional, análogo al observado en el ApA (fig. 3.1.).

2.- En la curva de U+pU existen dos inflexiones. Esta aparente anomalía respecto a todas las curvas de hipocromicidad obtenidas experimentalmente, no refleja un nuevo fenómeno de interacción, sino que es, simplemente, el resultado "gráfico" de sumar 2 curvas de hipocromicidad, la de uridina y la de 5'-UMP, en las que son diferentes las con-

centraciones a las cuales se produce la transición del doble efecto hipocrómico (v. tablas 1.2. y 1.3.).

3.- En la curva de UpU existen dos efectos hipocrómicos, como en el caso del ApA. Ahora bien, la concentración de UpU a la que tiene lugar la transición entre estos 2 efectos, es notablemente inferior a la de sus componentes, y es, por otra parte, el valor más bajo observado en todos los sistemas estudiados por nosotros. Ello podría indicar que la asociación del UpU tiene, en conjunto, una naturaleza diferente a la de los otros compuestos.

#### Parámetros de asociación e hipocromicidad

El valor de la constante  $K_2$  es muy diferente en los dos sistemas que estamos comparando, siendo  $33 \cdot 10^3$  para el UpU y  $740 \cdot 10^3$  para U+pU. El valor de  $K_2$  de U+pU es muy alto, como corresponde a la "aditividad" de los valores de  $K_2$  excepcionalmente elevados de uridina ( $420 \cdot 10^3$ ) y 5'-UMP ( $2000 \cdot 10^3$ ), que fueron comentados explícitamente en el cap. 1. Sin embargo, el valor de  $K_2$  del dinucleósido-fosfato UpU es del mismo orden que el obtenido para el ApA.

Por el contrario, los valores de  $K_p$  concuerdan prácticamente en los dos sistemas.

El cálculo de la hipocromicidad  $h'$  (%) del UpU (tabla 3.6.) revela que, a dilución infinita de este compuesto, la hipocromicidad respecto a sus unidades monoméricas, no asociadas, es del 23,9%, y confirma la conclusión obtenida para el ApA de que la cadena ribosa-fosfato induce ya una ordenación intramolecular, que es la responsable de esta hipocromicidad adicional. La magnitud de  $h'$  aumenta gradualmente hasta

un valor máximo de 36,1%, a concentración infinita, que es comparable al de uridina (36,1%) y de UMP (27,7%), considerados aisladamente.

El valor de  $h''(\%)$  disminuye desde 23,9 a dilución infinita hasta 14,4 a la concentración correspondiente a la transición entre los 2 efectos hipocrómicos. En el 2° efecto,  $h''$  sigue disminuyendo hasta un valor de 6,0%, notablemente inferior al valor inicial. Este comportamiento es inverso al que presenta el ApA. Como se ha indicado en la introducción de este capítulo, el apilamiento intramolecular es poco importante en los dinucleósidos-fosfato que contienen uracilo (2), y ello podría condicionar que la ordenación del UpU en el estado correspondiente al 2° efecto hipocrómico, sea notablemente inferior a la de sus componentes, uridina y UMP. Esta situación podría estar relacionada con la conformación singular de los oligo-Us y poli U, que según todos los estudios realizados sobre ellos, es muy diferente a la de la serie del ácido adenílico, y ha exigido el establecimiento de la hipótesis de una conformación especial de lazos en forma de horquilla (24).

#### Influencia de la temperatura

Según se deduce de la "curva de fusión" de una disolución  $\approx 9 \cdot 10^{-5} M$  de UpU, la hipocromicidad calculada respecto del valor de  $\epsilon_1$  correspondiente al dinucleósido-fosfato libre, es del 8,5% a 5°C y disminuye hasta un 3,5% a 90°C (tabla 3.4.). Ello puede indicar que la temperatura ejerce una influencia desorganizadora sobre la estructura del UpU, si bien en el límite superior de temperatura no llega a alcanzarse un estado comparable al de mínima asociación, como en el caso del ApA (fig. 3.5.).

A partir de la citada "curva de fusión" se han estimado, basándose en el modelo de 2 estados, unas constantes aparentes de apilamiento intramolecular, a partir de la ecuación:

$$K(T) = \frac{19110 - \epsilon(T)}{\epsilon(T) - 16940} \quad |26|$$

en donde 19110 y 16940 son, respectivamente, los valores de  $\epsilon_1$  y de  $(\epsilon_\infty)_d$ , obtenidos en el ajuste de la absorptividad molar del UpU en función de la concentración.

En la fig. 3.6. se representan los valores de  $\log K$  así calculados frente a los de  $1/T$ . A partir de la recta ajustada, se han estimado las magnitudes  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$  de la interacción intramolecular de apilamiento, obteniéndose:

$$\Delta H^\circ = -4,6 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta S^\circ = -14 \text{ cal/mol K}$$

Estos parámetros termodinámicos son del mismo signo que los obtenidos para el ApA, pero de valor inferior. Este resultado permite concluir, dentro de las limitaciones impuestas por el modelo utilizado, que en el UpU la interacción intramolecular es menos intensa que en el ApA, de acuerdo con las observaciones comentadas en la introducción de este capítulo (2).

En un reciente trabajo sobre la separación cuantitativa de los procesos de apilamiento y autoasociación del dinucleósido-fosfato ApU por RMN (15), se calculan las magnitudes termodinámicas de ambos procesos, obteniéndose los valores:

$$\Delta H^\circ = -8,6 \text{ kcal/mol}$$

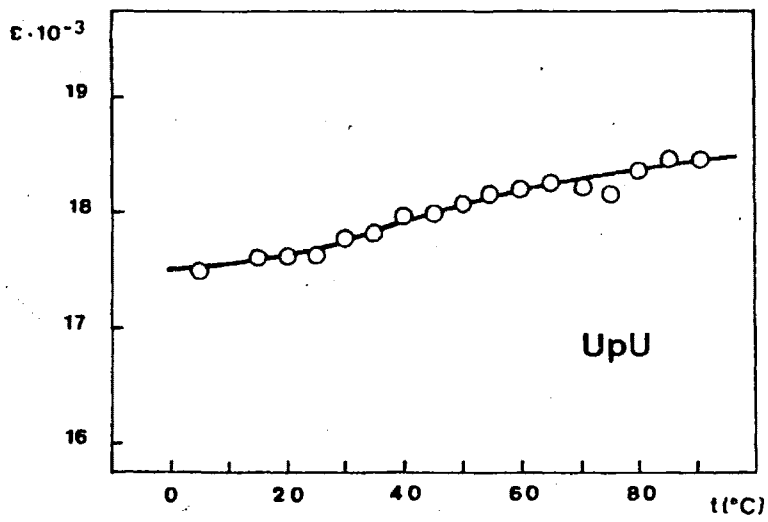


Fig. 3.5.- Curva de fusión de UpU.

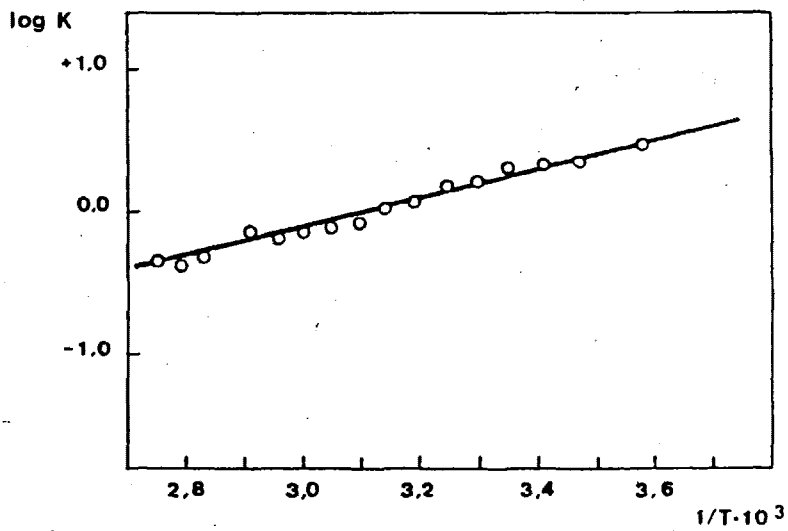


Fig. 3.6.- Representación de van't Hoff para UpU.

$$\Delta S^{\circ} = -24,8 \text{ cal/mol K}$$

para la autoasociación, y:

$$\Delta H^{\circ} = -6,4 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta S^{\circ} = -20,7 \text{ cal/mol K}$$

para el apilamiento intramolecular. Estos últimos valores son intermedios entre los obtenidos por nosotros para el apilamiento intramolecular de ApA y de UpU.

### 3.2. HETEROASOCIACION

En la asociación de los componentes de los ácidos nucleicos pueden distinguirse dos fenómenos distintos: autoasociación y heteroasociación.

En los capítulos anteriores y en la 1ª parte de este capítulo, se ha tratado solamente de la autoasociación, proceso según el cual los componentes de los ácidos nucleicos interaccionan entre sí, dando lugar a la formación de dímeros o polímeros de moléculas idénticas. Los resultados obtenidos en este estudio respecto al proceso de apilamiento de bases constituyen una aportación experimental importante para el conocimiento fisicoquímico de los ácidos nucleicos, ya que, como se reconoce unánimemente en la actualidad, los fenómenos de apilamiento suponen una contribución fundamental a su estructura y estabilidad.

Sin embargo, el factor determinante de la estructura de los ácidos nucleicos, es la especificidad de las interacciones entre bases complementarias por formación de enlace de hidrógeno, designada genéricamente con el nombre de "heteroasociación". Como es sabido, la heteroasociación entre bases complementarias ha sido demostrada en disolventes no polares, haciéndose más débil esta asociación a medida que aumenta la polaridad del disolvente. Su estudio resulta especialmente difícil en disoluciones acuosas. Existe, sin embargo, evidencia experimental, lograda por aplicación de la técnica de RMN, de la asociación por apareamiento de bases complementarias, en disolución acuosa, de 5'-ribonucleótidos (AMP.CMP, UMP.CMP, UMP.GMP, GMP.CMP y AMP.UMP) (25) y de dinucleósidos-fosfato (CpG.GpC y GpU.ApC) (8). No obstante, puede afirmarse que, en general, la heteroasociación en disolución acuosa ha sido estu-

diada mucho menos intensamente que la autoasociación, debido a las dificultades experimentales y de interpretación teórica que implica su investigación. Concretamente, por espectroscopía UV se han estudiado solamente la interacción entre polinucleótidos complementarios y la interacción monómero-polímero.

Consideramos, por tanto, que puede ser de gran interés efectuar algunas experiencias, de carácter exploratorio, encaminadas a poner de manifiesto, por espectroscopía UV, la interacción entre bases complementarias en disoluciones acuosas de compuestos más sencillos que los polinucleótidos.

Como hemos indicado anteriormente, dada la conformación de las moléculas de los dinucleósidos-monofosfato (9), estos compuestos constituyen, por sí mismos, la unidad estructural primaria de una cadena helicoidal. Teniendo en cuenta que la unión de dos cadenas complementarias por formación de enlaces de hidrógeno supone una interacción de carácter cooperativo (8), en la cual desempeña un papel importante la existencia de enlaces fosfodiéster 3'-5', la interacción entre dinucleósidos-fosfato de bases complementarias representa un sistema modelo adecuado para el estudio de los mecanismos que determinan la formación de dos cadenas complementarias.

De acuerdo con estas ideas, hemos realizado un estudio de la heteroasociación de ApA y UpU, entre sí y de cada uno de ellos con su nucleósido complementario (uridina y adenosina, respectivamente). Los datos obtenidos se exponen e interpretan a continuación.

### 3.2.1. Metodología experimental

Para poner de manifiesto la asociación entre dos compuestos diferentes, el método que hemos considerado más sensible consiste en comparar la absorbancia UV en el máximo, correspondiente a la mezcla de ambos compuestos en tampón fosfato, con la suma de las absorbancias, a dicha longitud de onda, de los componentes libres, a la misma concentración a que se encuentran en la mezcla. La aplicación de este método queda limitada a aquellos casos en los que las longitudes de onda del máximo de la banda de los componentes y del complejo resultante de su interacción sean, aproximadamente, coincidentes. Tal es el caso de los tres sistemas que se estudian a continuación.

La hipótesis básica de este método es que la existencia de un efecto hipocrómico en el espectro de la mezcla con respecto a los componentes, se considera como una medida de la interacción entre ambos compuestos, para dar lugar a una estructura ordenada. Definimos la hipocromicidad como:

$$h(\%) = \frac{A_{\text{calc}} - A_{\text{obs}}}{A_{\text{calc}}} 100 \quad |27|$$

siendo  $A_{\text{obs}}$  la absorbancia de la mezcla y  $A_{\text{calc}}$  la suma de las absorbancias de los componentes.

Para el estudio de la interacción de heteroasociación monómero-polímero, se ha utilizado el método de medir una propiedad sensible a dicha interacción, variando la relación molar de ambos compuestos y manteniendo constante la concentración de uno de ellos (26). De acuerdo con este método, hemos seguido el proceso de heteroasociación midiendo la hipocromicidad de una serie de disoluciones, en las cuales se mantie

ne constante la concentración de uno de los componentes y se varía la del otro.

Para estudiar la influencia de la temperatura sobre la heteroasociación, se han obtenido los espectros UV a diferentes temperaturas, tal como se describe en el apartado 3.1. de esta Memoria. La medida de absorbancias debe efectuarse con la máxima precisión posible, debido a que el efecto hipocrómico observado es de pequeña magnitud.

De acuerdo con esta metodología, se ha realizado el estudio de los 3 sistemas siguientes: UpU.Adenosina, ApA. Uridina y ApA.UpU. A continuación, se exponen los resultados experimentales obtenidos, de acuerdo con el siguiente esquema:

1) En cada apartado se da una tabla en la que se reseñan las concentraciones de los compuestos utilizados, las relaciones molares de los 2 componentes presentes en las diferentes disoluciones, la longitud de onda del máximo de absorción de cada disolución, y la hipocromicidad calculada, a dicha longitud de onda, a diferentes temperaturas (tablas 3.7.-3.10.).

2) A continuación, se dan las representaciones gráficas de los datos reseñados en las tablas anteriores, de la hipocromicidad de cada sistema, en función de la relación molar de los componentes, a cada una de las temperaturas estudiadas (fig. 3.7.-3.9.). La variación de la hipocromicidad en función de la relación molar, es diferente en los distintos sistemas, y se discute con detalle en cada uno de ellos.

3.2.2. Interacción UpU.Adenosina

TABLA 3.7.

Hipocromicidad de mezclas UpU.Adenosina, con respecto a los componentes libres (conc. de UpU= $2,57 \cdot 10^{-3}M$ ; [U]= $5,13 \cdot 10^{-3}M$ )

[Ado] (mol/l)	[Ado]/[U]	$\lambda_{max}$ (nm)	h (%)			
			t=25°C	t=15°C	t=10°C	t=5°C
$5 \cdot 10^{-4}$	0,097	261	0,70	0,70	2,10	2,80
$10^{-3}$	0,19	261	0,61	1,23	1,84	3,07
$2,5 \cdot 10^{-3}$	0,49	260	2,67	2,67	3,56	4,44
$5 \cdot 10^{-3}$	0,97	260	3,97	4,28	4,89	5,50
$10^{-2}$	1,95	260	4,26	5,04	6,20	7,17
$2 \cdot 10^{-2}$	3,90	260	4,00	5,48	6,28	6,85

Interpretación de resultados

Los resultados experimentales obtenidos manteniendo constante la concentración de UpU= $2,57 \cdot 10^{-3}M$ , revelan que, cuando la concentración de adenosina es superior a  $5 \cdot 10^{-4}M$ , las mezclas son hipocrómicas con respecto a los componentes puros, y por tanto, existe interacción entre ambos compuestos.

La hipocromicidad aumenta con la concentración de monómero, tendiendo a alcanzarse, a cada temperatura, un valor constante (fig. 3.7.), lo cual puede interpretarse en el sentido de que, en el intervalo de relaciones molares estudiado, se alcanza la saturación en la formación del posible complejo. La hipocromicidad también aumenta al dismi-

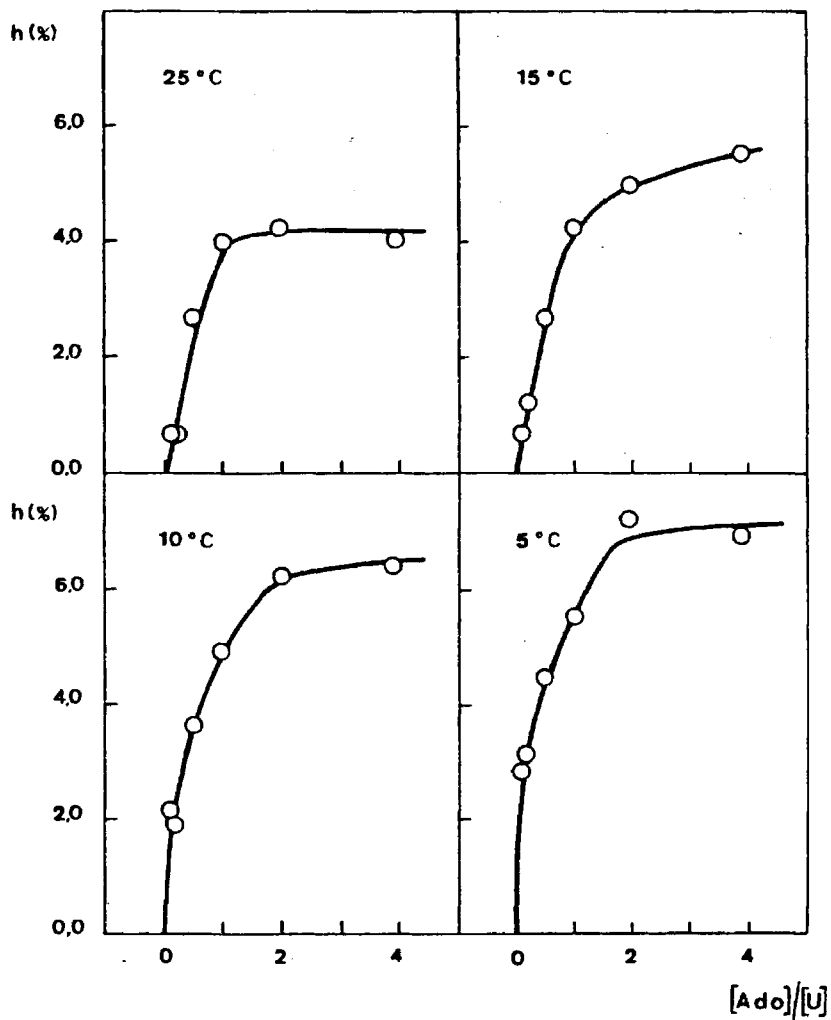


Fig. 3.7.- Interacción UpU.Adenosina.

nuir la temperatura. Este resultado autoriza a afirmar que la formación de dicho complejo está más favorecida a temperaturas bajas. La máxima hipocromicidad observada, a 5°C, es del orden del 7%.

Estos resultados pueden interpretarse como reveladores de

que se produce interacción entre UpU y adenosina para dar lugar a una estructura más ordenada que la correspondiente a ambos compuestos libres. Por otra parte, las curvas de la fig. 3.7. se pueden interpretar en el sentido de que, en los intervalos de 5 a 10°C y de 15 a 25°C, estas curvas de hipocromicidad están poniendo de manifiesto la existencia de dos procesos distintos de asociación, análogos a los que tienen lugar en la interacción poli U.adenosina, en el mismo intervalo de temperatura (26).

### 3.2.3. Interacción ApA.Uridina

TABLA 3.8.

Hipocromicidad de mezclas ApA.Uridina, con respecto a los componentes libres (conc. de ApA= $2,5 \cdot 10^{-3}M$ ; [A]= $5,0 \cdot 10^{-3}M$ )

[Urd] (mol/l)	[Urd]/[A]	$\lambda_{max}$ (nm)	h (%)	
			t=25°C	t=5°C
$5 \cdot 10^{-4}$	0,10	258	4,02	2,96
$2,5 \cdot 10^{-3}$	0,50	258	3,98	3,17
$5 \cdot 10^{-3}$	1,00	259	4,08	3,14
$10^{-2}$	2,00	259	6,56	6,20
$2 \cdot 10^{-2}$	4,00	260	4,43	5,68
$4 \cdot 10^{-2}$	8,00	261	4,36	5,88

#### Interpretación de resultados

Los resultados obtenidos revelan que, dentro del intervalo de concentraciones utilizado, las mezclas son hipocrómicas con relación

a los componentes puros. Las curvas de hipocromicidad a 25°C y 5°C muestran un valor máximo para una relación molar  $[Urd]/[A]=2$ . Este resultado es comparable al obtenido en una experiencia exploratoria realizada por nosotros, sobre la interacción poli A.Uridina, si bien en este último caso la hipocromicidad es menor. El efecto hipocrómico observado es del orden del 7%, comparable al detectado en el sistema UpU.Adenosina.

De la fig. 3.8. pueden destacarse dos diferencias fundamentales respecto al sistema UpU.Adenosina:

1) Aun en las disoluciones más diluídas, se observa una hipocromicidad del orden del 3-4%.

2) La curva de hipocromicidad en función de la relación molar, correspondiente a 5°C, es de hábito análogo a las del sistema UpU.Adenosina. La hipocromicidad de las disoluciones aumenta al aumentar la concentración del nucleósido, hasta que llega a un valor máximo para la relación molar  $[Urd]/[A]=2$ , que se mantiene constante si sigue aumentando la concentración de nucleósido, lo cual puede interpretarse, análogamente a como se ha expuesto en el caso de UpU.Adenosina, en el sentido de que, en el intervalo de relaciones molares estudiado, se alcanza la saturación en la formación del complejo ApA.Uridina. Por el contrario, a 25°C, la curva de hipocromicidad en función de la relación molar es de hábito diferente, pues si bien dicha hipocromicidad aumenta también hasta alcanzar un valor máximo para  $[Urd]/[A]=2$ , su valor disminuye si se sigue aumentando la concentración de nucleósido. Esta observación indica que la interacción a esta temperatura tiene lugar en un intervalo crítico de concentraciones. Una interpretación en profundidad de este hecho requeriría una investigación complementaria para diluci-

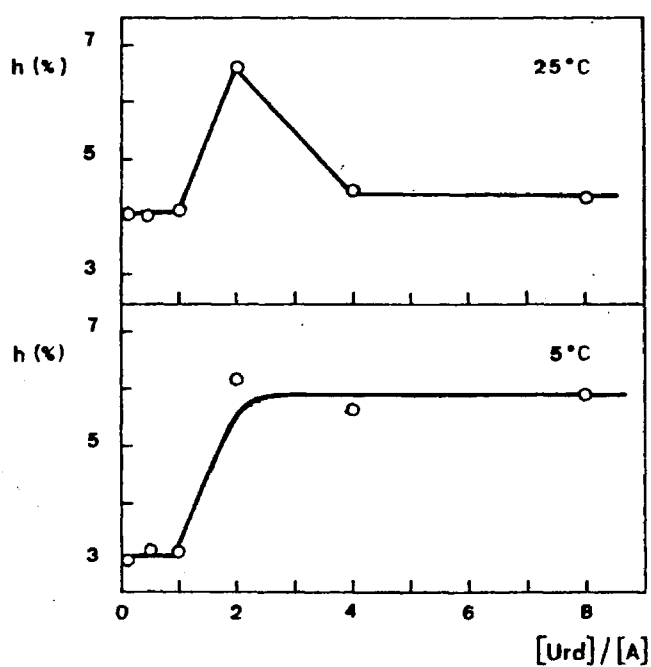


Fig. 3.8.- Interacción ApA.Uridina.

dar la naturaleza del complejo formado y la influencia que sobre su estabilidad tiene la presencia de uno u otro de sus componentes en exceso. En todo caso, este comportamiento puede estar relacionado con el hecho conocido de que la interacción monómero-polímero se encuentra muy desfavorecida cuando el monómero es pirimidínico (27).

3.2.4. Interacción ApA.UpU

TABLA 3.9.

Hipocromicidad de mezclas ApA.UpU, con respecto a los componentes libres (conc. de UpU= $1,03 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ;  $[U]=2,07 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

[A] (mol/l)	[A]/[U]	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	h (%)	
			t=25°C	t=5°C
$5 \cdot 10^{-4}$	0,24	262	0,0	0,0
$10^{-3}$	0,48	261	0,0	0,0
$2,5 \cdot 10^{-3}$	1,21	260	0,78	0,79
$5 \cdot 10^{-3}$	2,41	260	0,97	1,00
$10^{-2}$	4,83	259	1,67	1,98
$2 \cdot 10^{-2}$	9,66	258	2,00	2,06

TABLA 3.10.

Hipocromicidad de mezclas ApA.UpU, con respecto a los componentes libres (conc. de UpU= $2,53 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ;  $[U]=5,06 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )

[A] (mol/l)	[A]/[U]	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	h (%)	
			t=25°C	t=5°C
$5,1 \cdot 10^{-4}$	0,10	262	0,0	0,0
$1,0 \cdot 10^{-3}$	0,20	261	0,0	0,0
$2,5 \cdot 10^{-3}$	0,50	260	0,0	0,0
$5,1 \cdot 10^{-3}$	1,00	260	1,82	1,85
$1,0 \cdot 10^{-2}$	2,01	259	2,13	1,93
$2,0 \cdot 10^{-2}$	4,01	258	2,23	2,58

### Interpretación de resultados

Se han efectuado dos experiencias, manteniendo la concentración de UpU igual a  $10^{-3}$  y  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M, respectivamente. Las curvas de hipocromicidad (fig. 3.9.) muestran, en ambos casos, una inflexión correspondiente a la relación molar  $[A]/[U]=1$ , y son del mismo hábito que las curvas de hipocromicidad del sistema UpU.Adenosina (fig. 3.7.). La máxima hipocromicidad observada es sólo del orden del 2%, muy inferior a la detectada en las experiencias de interacción de UpU.adenosina y ApA.uridina

La curva de hipocromicidad es más abrupta cuando es mayor la concentración de U, lo que indica que la formación del posible complejo ApA.UpU se favorece aumentando la concentración de UpU. Por otra

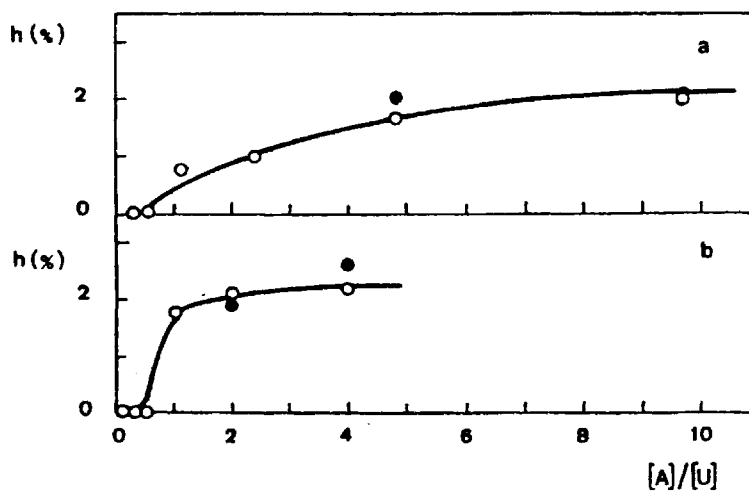


Fig. 3.9.- Interacción ApA.UpU. a)  $[U]=2 \cdot 10^{-3}$  M;  
b)  $[U]=5 \cdot 10^{-3}$  M. (○ 25°C; ● 5°C)

parte, la forma sigmoïdal de la curva correspondiente a la concentración de  $U=5.10^{-3}M$ , podría indicar que este proceso de heteroasociación es de naturaleza cooperativa, análogamente a lo observado en la interacción poli U.adenosina (26).

A diferencia de lo observado en los sistemas UpU.adenosina y ApA.uridina, la hipocromicidad del sistema ApA.UpU no varía significativamente al disminuir la temperatura.

En resumen, los resultados obtenidos revelan que, aunque existe interacción entre los dinucleósidos-fosfato complementarios ApA y UpU, dicha interacción es más débil que la que se produce entre cada uno de ellos y el nucleósido complementario correspondiente. En todo caso, estos resultados pueden apoyar la hipótesis de que el mecanismo de interacción entre poli A y poli U (28), se inicia ya a nivel de dímeros.

Conclusiones generales acerca de la autoasociación y heteroasociación de dinucleósidos-monofosfato en disolución acuosa

- 1) El estudio de los espectros UV de los dinucleósidos-monofosfato ApA y UpU, en disolución acuosa, en un amplio intervalo de concentraciones, pone de manifiesto la existencia de un doble efecto hipocrómico, análogo al descrito para las unidades monoméricas.
- 2) Los espectros UV de los dinucleósidos-fosfato revelan la existencia de una hipocromicidad adicional respecto de sus unidades monoméricas constituyentes, que es del 18,3%

para el ApA y del 23,9% para el UpU, a dilución infinita. Por tanto, la presencia de la cadena ribosa-fosfato induce por sí sola una ordenación de las bases.

- 3) La concordancia de los parámetros de autoasociación obtenidos para el ApA y para la mezcla adenosina+5'-AMP, puede interpretarse en el sentido de que los mecanismos que determinan la autoasociación en el ApA y en sus unidades monoméricas, adenosina y 5'-AMP, son de la misma naturaleza, si bien la forma polimérica del dinucleósido-fosfato tiene un mayor grado de ordenación que la de dichas unidades monoméricas.
- 4) La discrepancia de los parámetros de autoasociación obtenidos para el UpU y para la mezcla uridina+5'-UMP, en el 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico, indica que el proceso de asociación correspondiente es distinto en ambos sistemas. Así mismo, la variación de la hipocromicidad con la concentración revela que, en el estado correspondiente al 2° efecto hipocrómico, la ordenación del UpU es notablemente inferior a la que se podría predecir a partir de sus componentes, uridina y 5'-UMP. Estos resultados confirman que las propiedades fisicoquímicas singulares observadas originariamente en los polinucleótidos de la serie del uracilo, se ponen ya de manifiesto en las unidades monoméricas correspondientes (cap. 1 y 2), así como en sus dinucleósidos-monofosfato.

- 5) Ya en los dinucleósidos-fosfato, el enlace fosfodiéster 3'-5' contribuye especialmente al mecanismo de asociación que da lugar a la formación de cadenas helicoidales.
- 6) Las magnitudes termodinámicas de apilamiento intramolecular, deducidas de las curvas de fusión de ApA y de UpU según el modelo de dos estados, utilizando los valores de  $\epsilon_1$  y  $(\epsilon_\infty)_d$  de nuestras curvas de hipocromicidad, concuerdan, en magnitud y signo, con los valores dados en la bibliografía, y revelan que la tendencia al apilamiento intramolecular es mayor en el ApA que en el UpU.
- 7) Se ha demostrado experimentalmente, por espectroscopía UV, la existencia de procesos de heteroasociación en los sistemas UpU.adenosina, ApA.uridina y ApA.UpU. En la bibliografía consultada no se ha encontrado ninguna referencia acerca de la existencia de heteroasociación en estos sistemas, que pueden considerarse como modelos adecuados para el estudio de procesos de heteroasociación en moléculas de mayor complejidad estructural.
- 8) La variación de la hipocromicidad en función de la concentración, expresada como relación molar de los dos componentes de cada sistema, revela que el proceso de heteroasociación es distinto en los tres sistemas estudiados.

#### 4.- OLIGONUCLEOTIDOS Y POLINUCLEOTIDOS

En los capítulos 1 y 2 de esta Memoria, se han expuesto los resultados de la investigación realizada sobre la autoasociación de 16 unidades monoméricas de ácidos nucleicos, y en el capítulo 3, los relativos a la autoasociación y heteroasociación de dos dinucleósidos-monofosfato, ApA y UpU.

En este capítulo, y siguiendo el orden creciente de complejidad estructural de los compuestos que hemos designado, de una manera general, como "componentes de ácidos nucleicos", se ha realizado un estudio, de carácter análogo, de los primeros términos de dos series de oligonucleótidos: los ácidos oligoriboadenílicos,  $A(pA)_2$ ,  $A(pA)_3$ , y  $A(pA)_4$ , y los ácidos oligoribouridílicos,  $U(pU)_2$ ,  $U(pU)_3$ , y  $U(pU)_4$ .

En esta misma línea de trabajo, y de acuerdo con la idea directriz de explorar las posibilidades que ofrece la hipocromicidad de las bandas de absorción de los espectros ultravioleta para el conocimiento de las interacciones intermoleculares e intramoleculares, se ha extendido este estudio a los polinucleótidos poli A y poli U. Con ello, se lleva a término la investigación de las interacciones moleculares de componentes de ácidos nucleicos, iniciada en el nivel de mínima complejidad, que es el correspondiente a las unidades monoméricas libres, y continuada con la secuencia dinucleósidos-fosfato, oligonucleótidos y polinucleótidos, en orden creciente de aproximación a la estructura de los ácidos nucleicos.

#### 4.1. OLIGONUCLEOTIDOS

Como es sabido, se ha propuesto el modelo de estructura helicoidal de cadena simple para polinucleótidos tales como poli A y poli C, en determinadas condiciones de pH y temperatura. Esta conformación, debida al apilamiento de las bases consecutivas en la cadena polimérica, no es estática, como la estructura en doble hélice del DNA, en la que las bases complementarias se encuentran unidas por enlace de hidrógeno, sino que es una estructura dinámica con secuencias fluctuantes de regiones más o menos ordenadas. Como resultado de esto, la molécula tiene poca rigidez hidrodinámica y se comporta, en algunos aspectos, como una cadena estadística. Es importante determinar a qué nivel de polimerización aparecen los diferentes parámetros físicos relacionados con la existencia de una estructura ordenada. Diversos estudios han establecido que las interacciones esenciales surgen ya a nivel de dímero, habiendo sido especialmente estudiadas en series homólogas de oligonucleótidos, en función del efecto hipocrómico de los espectros UV (1).

En el área de las interacciones de los oligonucleótidos (1-4), son numerosos los trabajos publicados sobre tres temas principales:

- a) Asociación de homo-oligonucleótidos en disolución acuosa (5-16).
- b) Autoasociación de oligonucleótidos que contienen dos bases complementarias en secuencia alternante (oligómeros d(T-A)) (17) o en secuencias sucesivas (oligómeros  $A(pA)_{n-1}(pU)_n$ ) (18).
- c) Asociación de oligonucleótidos complementarios en disolución acuosa (15, 19-21).

#### 4.1.1. Acidos oligoriboadenilicos

Se ha utilizado la serie de ácidos oligoriboadenilicos ApA, A(pA)<sub>2</sub>, A(pA)<sub>3</sub> y A(pA)<sub>n</sub>, suministrados por "Boehringer" (Mannheim) con el nombre de "Combithek". Cada uno de los viales de esta colección contiene de 2 a 3 mg de producto, en forma de sal amónica liofilizada, que se utilizaron sin purificación adicional. Se desecaron a vacío, con gel de sílice, hasta peso constante. Las disoluciones de estos compuestos se han preparado en tampón fosfato.

##### Asociación intermolecular

El trabajo experimental realizado con los oligo-As ha estado condicionado y limitado por la pequeña cantidad de producto disponible. El objetivo de este trabajo era, en principio, determinar los parámetros de asociación intermolecular, para lo cual hubiese sido necesario obtener las curvas completas de absorptividad molar frente a la concentración, en un amplio intervalo de concentraciones, análogamente al método utilizado en el estudio de las unidades monoméricas y de ApA y UpU. Sin embargo, al disponer únicamente de cantidades muy limitadas de producto, este estudio se ha tenido que reducir a dos disoluciones, de concentraciones  $c_1 \approx 5 \cdot 10^{-6} M$  y  $c_2 \approx 5 \cdot 10^{-5} M$ .

En la tabla 4.1. se dan los valores de absorptividad molar correspondientes a las concentraciones citadas, para los diversos oligo-As. En la 4ª columna de la tabla se dan los valores de absorptividad molar,  $\epsilon[A+n(pA)]$ , calculados mediante la suma de las absorptividades de adenosina (A) y 5'-AMP, (pA), a la misma concentración que cada una de las disoluciones de la serie de oligonucleótidos estudiados. Se compara de este modo la absorptividad molar experimental de cada compuesto

$A(pA)_n$ , con la absorptividad molar calculada para el correspondiente sistema  $A+n(pA)$ , donde  $n$  varía desde 1 hasta 4. En la 5ª columna se dan los valores de hipocromicidad  $h_x^n(\%)$ , obtenidos a partir de los valores de  $\epsilon$ , a cada concentración  $x$ , mediante la ecuación:

$$h_x^n = \frac{\epsilon_x[A+n(pA)] - \epsilon_x[A(pA)_n]}{\epsilon_x[A+n(pA)]} 100 \quad |28|$$

La tabla 4.1. permite realizar una interpretación de resultados análoga a la descrita para el ApA en el capítulo anterior. Se incluyen en ella los resultados obtenidos para el ApA, procedente del mismo lote de "Combithek", con objeto de comprobar la reproducibilidad de las medidas de este compuesto con las obtenidas en el estudio específico del ApA, descrito en el cap. 3.

Por las razones expuestas anteriormente, no ha sido posible obtener las curvas de hipocromicidad completas de los oligo-As, como se hizo en el ApA, y por tanto, la interpretación de resultados se limita al intervalo de concentraciones estudiado.

La variación de la absorptividad molar con la concentración de los ácidos oligoadenílicos es análoga a la que se puede predecir, a partir de sus componentes correspondientes adenosina+n AMP, como se pone de manifiesto gráficamente en la fig. 4.1., en la que dicha variación, en este reducido intervalo de concentraciones, se representa por sendas líneas rectas, que resultan ser paralelas. Es razonable pensar que las curvas completas de hipocromicidad de todos los oligo-As estudiados serían del mismo hábito que la del ApA.

TABLA 4.1.

Absortividad molar e hipocromicidad de ácidos oligoadenílicos

Compuesto	c (mol/l)	$\epsilon [A(pA)n] \cdot 10^{-3}$ (l/mol cm)	$\epsilon [A+n(pA)] \cdot 10^{-3}$ (l/mol cm)	h" (%)
ApA	$4,6 \cdot 10^{-6}$	25,80	31,62	18,4
	$4,5 \cdot 10^{-5}$	24,00	29,83	19,5
A(pA) <sub>2</sub>	$6,67 \cdot 10^{-6}$	34,93	47,19	26,0
	$6,67 \cdot 10^{-5}$	31,93	44,19	27,7
A(pA) <sub>3</sub>	$4,67 \cdot 10^{-6}$	43,47	63,51	31,5
	$4,67 \cdot 10^{-5}$	39,26	59,40	33,9
A(pA) <sub>4</sub>	$4,24 \cdot 10^{-6}$	52,59	79,71	34,0
	$4,24 \cdot 10^{-5}$	47,60	74,43	36,0

Comparando entre sí las rectas experimentales de los ácidos oligoadenílicos (fig. 4.1.), se deduce que la absortividad molar de estos compuestos aumenta al aumentar la longitud de la cadena, como corresponde a la aditividad de la absorbancia del número de cromóforos que forman la cadena. Sin embargo, estas rectas, para cada oligonucleótido, se encuentran desplazadas hacia valores más bajos de absortividad molar en relación a las correspondientes rectas calculadas, lo cual revela la existencia de un efecto hipocrómico adicional, análogamente a lo expuesto para el ApA en el cap. 3.

Es, por tanto, interesante examinar la variación de la hipocromicidad de estos sistemas, para lo cual hemos calculado los valores de h" (%) que figuran en la tabla 4.1.. En la fig. 4.2. se represen-

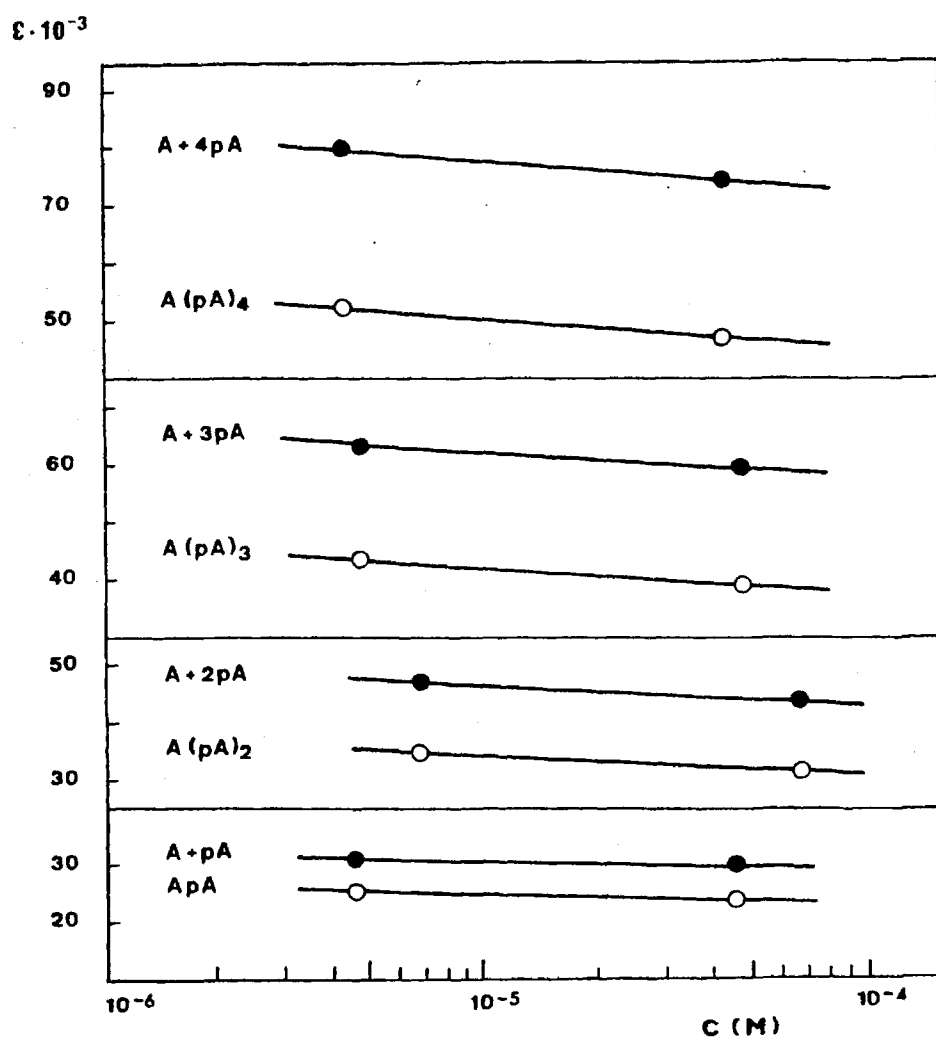


Fig. 4.1.- Absortividad molar de ácidos oligoadenílicos a 258 nm, experimental (O) y calculada a partir de las unidades monoméricas (●).

tan las hipocromicidades de los oligo-As en función de la concentración. Como puede observarse, las rectas obtenidas son, aproximadamente, paralelas, lo cual indica que la hipocromicidad varía con la concentración en la misma forma para todos los sistemas. La hipocromicidad, con respecto a los componentes, aumenta con la longitud de la cadena. Considerando que la hipocromicidad UV es una medida de la interacción entre las bases, y por tanto, de la ordenación de la cadena, este resultado se puede interpretar en el sentido de que la ordenación de los ácidos oligoadenílicos aumenta al aumentar la longitud de la cadena. El resultado más significativo es que la diferencia de hipocromicidad al pasar de un oligómero  $A(pA)_n$  al  $A(pA)_{n+1}$ , disminuye a medida que aumenta el valor de  $n$ , de tal modo que es razonable prever que se llegaría a un valor límite de hipocromicidad para una determinada longitud de cadena, para la cual se alcanzaría, por tanto, un máximo de ordenación de sus unidades monoméricas constituyentes.

Para una concentración de oligómero de  $5 \cdot 10^{-5} M$ , las hipocromicidades de los ácidos oligoadenílicos respecto a la del poli A, cuyo valor es, aproximadamente, del 40%, son:

ApA	49%
$A(pA)_2$	69%
$A(pA)_3$	85%
$A(pA)_4$	91%

Según Eigen y Pörschke (14), las hipocromicidades correspondientes a los siguientes oligómeros de esta serie, a pH ácido, son:

$(pA)_6$	92%
$(pA)_7$	92%
$(pA)_8$	97%
$(pA)_9$	97,5%

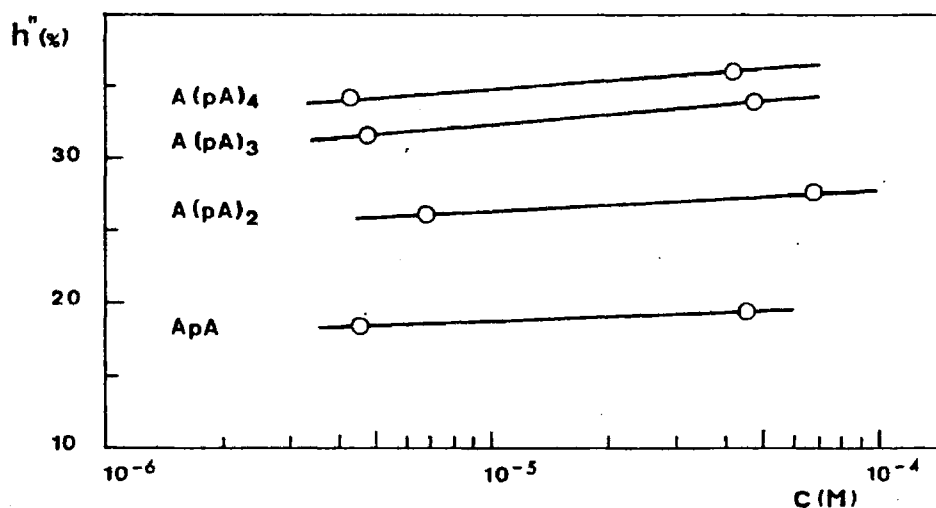


Fig. 4.2.- Hipocromicidad de ácidos oligoadenílicos.

Por consiguiente, puede estimarse que para una determinada longitud de cadena, del orden de unos 10 nucleótidos, tiende a alcanzarse el mismo valor de hipocromicidad que presenta el poli A.

#### Interacción intramolecular

Se ha realizado un estudio acerca de la influencia de la temperatura sobre las interacciones intramoleculares de los oligonucleótidos, análogo al descrito en el capítulo dedicado a los dinucleósidos-monofosfato. Para ello, se han obtenido las curvas de fusión de disoluciones diluidas de los ácidos oligoadenílicos, a una concentración del orden de  $2 \cdot 10^{-3} M$ , por monómero, en todas ellas. A partir de estas curvas de fusión, se han calculado las constantes aparentes de apilamiento intramolecular, de acuerdo con el modelo de 2 estados, y con ellas se han estimado las magnitudes  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$  de la interacción intramolecular de apilamiento mediante la ecuación de van't Hoff.

En estos sistemas, no se han podido obtener directamente los valores de  $\epsilon_1$  y  $(\epsilon_\infty)_d$ , utilizados en las ecuaciones del modelo de 2 estados, por no disponer de las curvas completas de hipocromicidad. Por consiguiente, se han estimado dichos valores por extrapolación, suponiendo que es válida la aproximación siguiente:

$$\frac{\epsilon_1(\text{ApA})}{\epsilon_1(\text{oligo A})} = \frac{\epsilon_x(\text{ApA})}{\epsilon_x(\text{oligo A})} \quad |29|$$

siendo  $\epsilon_x$  la absorptividad molar correspondiente a una concentración x.

En la tabla 4.2. se dan los valores de absorptividad molar, correspondientes a un intervalo de temperatura de 5 a 90°C, para  $\text{A(pA)}_2$ ,  $\text{A(pA)}_3$  y  $\text{A(pA)}_4$ , a las concentraciones respectivas de  $6,67 \cdot 10^{-5}\text{M}$ ;  $4,67 \cdot 10^{-5}\text{M}$  y  $4,24 \cdot 10^{-5}\text{M}$ , que corresponden a una concentración aproximada de  $2 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , por monómero, en todos ellos.

En las fig. 4.3., 4.5. y 4.7. se representan las curvas de fusión de  $\text{A(pA)}_2$ ,  $\text{A(pA)}_3$  y  $\text{A(pA)}_4$ . En las fig. 4.4., 4.6. y 4.8. se representan los valores de  $\log K$ , de las constantes de apilamiento intramolecular, frente a los de  $1/T$ , a los que se ajusta una línea recta en todos los casos. A partir de dichas rectas, se obtienen las magnitudes aparentes  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$  que se dan en la tabla 4.3..

TABLA 4.2.

Variación con la temperatura de la absor-  
tividad molar de ácidos oligoadenilicos.

t(°C)	A(pA) <sub>2</sub> ε.10 <sup>-3</sup>	A(pA) <sub>3</sub> ε.10 <sup>-3</sup>	A(pA) <sub>4</sub> ε.10 <sup>-3</sup>
5	30,54	36,72	45,30
15	31,17	37,56	45,95
25	31,93	39,26	47,60
30	31,86	39,64	47,65
35	32,04	39,92	48,40
40	32,37	40,20	48,95
45	32,58	40,68	49,45
50	33,06	41,16	50,00
55	33,42	41,44	50,80
60	33,66	41,96	51,15
65	33,75	42,28	51,95
70	33,99	42,80	52,30
75	34,23	43,12	52,90
80	34,47	43,48	53,30
85	34,74	43,80	54,15
90	35,01	44,16	54,80

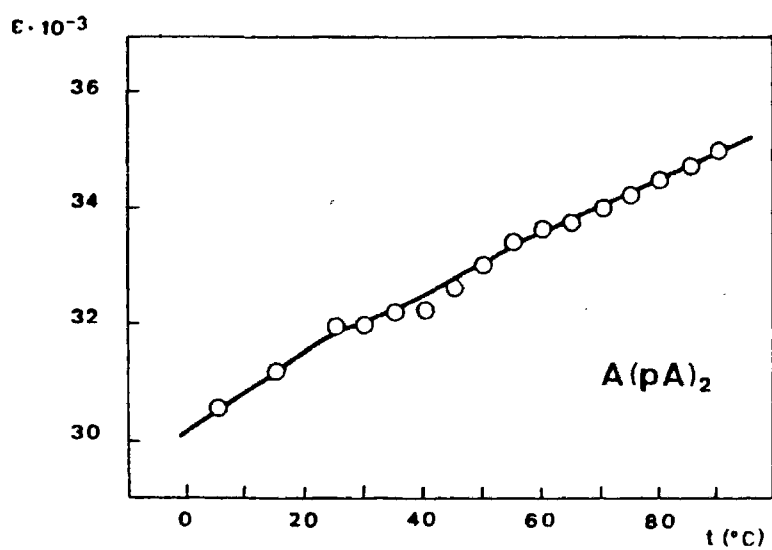


Fig. 4.3.- Curva de fusión de  $A(pA)_2$ .

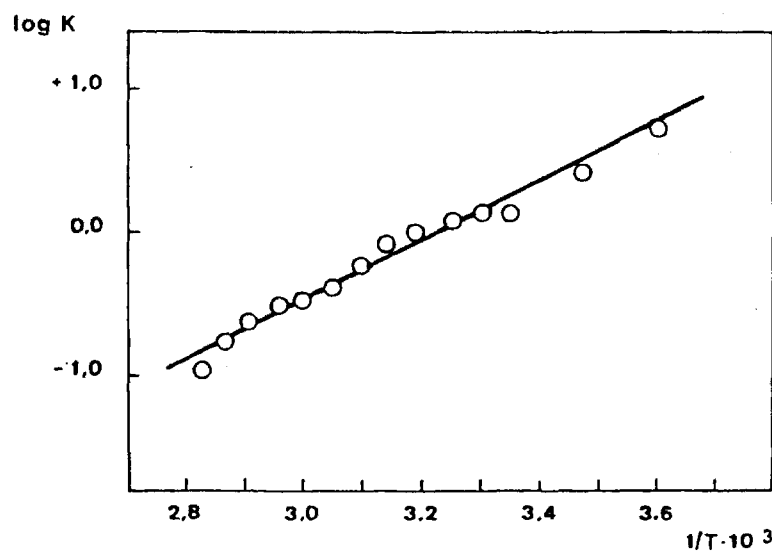


Fig. 4.4.- Representación de van't Hoff para  $A(pA)_2$ .

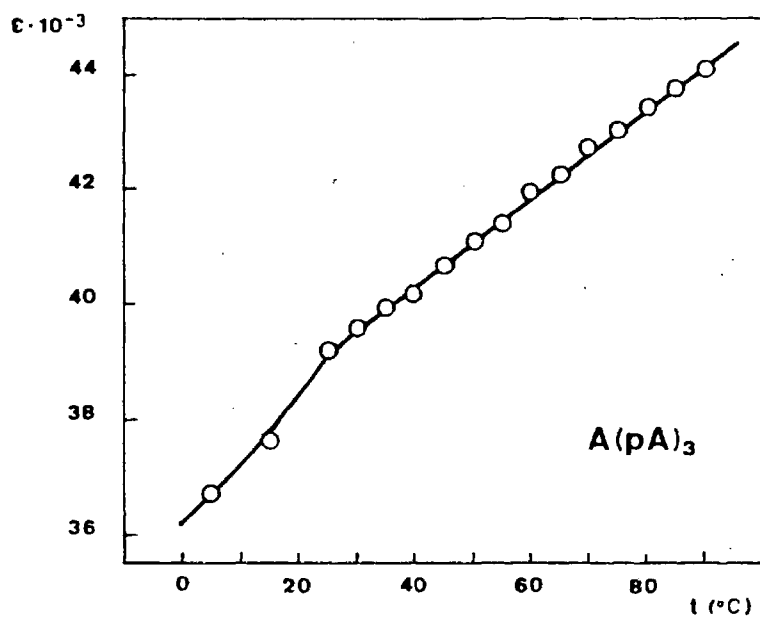


Fig. 4.5.- Curva de fusión de  $A(pA)_3$ .

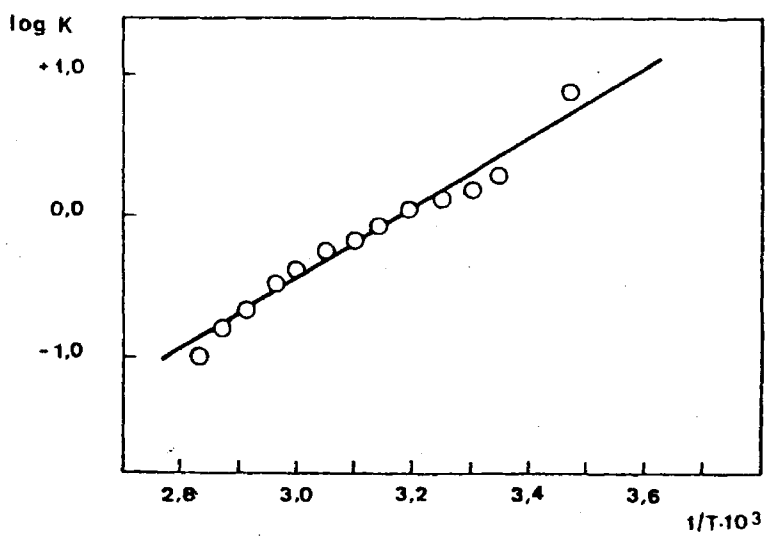


Fig. 4.6.- Representación de van't Hoff para  $A(pA)_3$ .

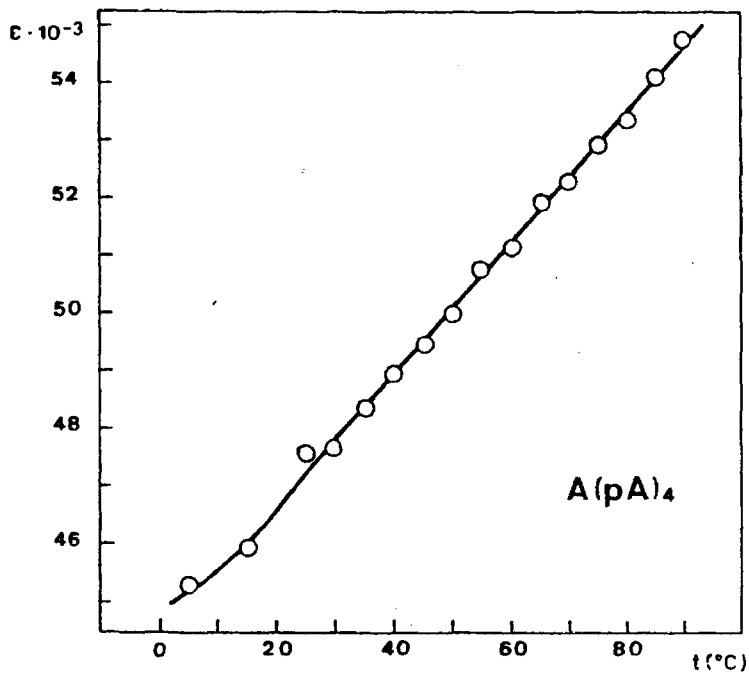


Fig. 4.7.- Curva de fusión de  $A(pA)_4$ .

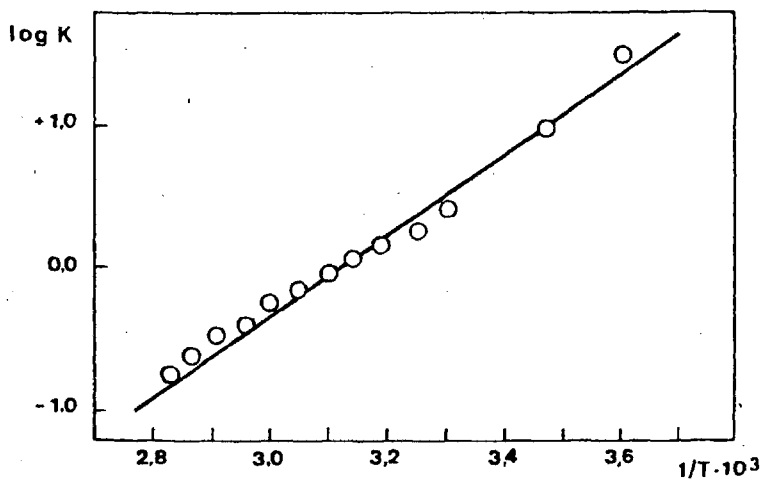


Fig. 4.8.- Representación de van't Hoff para  $A(pA)_4$ .

TABLA 4.3.

Magnitudes termodinámicas aparentes de apilamiento intramolecular

Compuesto	$\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$\Delta S^\circ$ (cal/mol K)
A(pA) <sub>2</sub>	- 9,7	-31
A(pA) <sub>3</sub>	-11,3	-36
A(pA) <sub>4</sub>	-13,1	-41

Los valores de los parámetros termodinámicos  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$  de A(pA)<sub>2</sub> son comparables, en magnitud y signo, a los de ApA ( $\Delta H^\circ = -9,4$ ;  $\Delta S^\circ = -33$ ), comentados en el capítulo anterior. Dentro de la serie de oligonucleótidos A(pA)<sub>2</sub>, A(pA)<sub>3</sub> y A(pA)<sub>4</sub>, se observa una variación muy regular de estos parámetros, que aumentan gradualmente en una cantidad aproximadamente constante al aumentar la longitud de la cadena. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por Leng y Felsenfeld (8), a partir de medidas de hipocromicidad UV de oligo-As y poli A.

Dentro de las limitaciones que impone la aplicación de nuestros datos experimentales al modelo de dos estados, los resultados obtenidos podrían interpretarse en función de un mecanismo de interacción con cierto carácter cooperativo, a medida que la longitud de la cadena permite el establecimiento de una conformación más helicoidal. Los datos obtenidos por otros autores mediante DC (11), indican que, en estos compuestos, el valor de  $\Delta H^\circ$  es aproximadamente constante, pero de la pequeña variación de  $\Delta S^\circ$ , detectada por ellos, deducen que la hipótesis de que el proceso de fusión sea no-cooperativo es, probablemente, una simplificación excesiva del fenómeno global.

#### 4.1.2. Ácidos oligoribouridílicos

Se ha utilizado la serie de ácidos oligoribouridílicos  $U(pU)_2$ ,  $U(pU)_3$  y  $U(pU)_4$  -sales amónicas liofilizadas- de "Boehringer" (Mannheim), sin purificación adicional, desecados a vacío con gel de sílice hasta peso constante. Las disoluciones de estos compuestos se han preparado en tampón fosfato.

##### Asociación intermolecular

Debido a la limitada cantidad de producto de que se disponía, para el estudio de la autoasociación se ha medido únicamente la absorbancia molar correspondiente a dos disoluciones, cuyas concentraciones son  $c_1 \approx 5 \cdot 10^{-6} M$  y  $c_2 \approx 5 \cdot 10^{-5} M$ , en una experiencia análoga a la de los ácidos oligoadenílicos.

En la tabla 4.4. se dan los valores de absorbancia molar para los diversos ácidos oligouridílicos utilizados, así como los valores de absorbancia molar,  $\epsilon[U+n(pU)]$ , correspondientes a los sistemas uridina+n UMP, y los de  $h''(\%)$ , definidos anteriormente, con objeto de realizar un estudio paralelo al efectuado para los ácidos oligoadenílicos.

En la fig. 4.9. se representan estos valores frente a las concentraciones de las disoluciones utilizadas. Análogamente a lo expuesto en el caso de los oligo-As, se observa que la absorbancia molar de los oligo-Us aumenta al aumentar la longitud de la cadena y tiene un valor inferior al calculado para la suma del nucleósido y nucleótidos correspondientes, lo cual revela la existencia de un efecto hipocrómico adicional. La diferencia de absorbancia molar entre las rectas calculadas y las experimentales de los oligo-Us, es inferior a la observada

en los oligo-As, lo que da lugar a valores más bajos de  $h''(\%)$  en los ácidos oligouridílicos.

TABLA 4.4.

Absortividad molar e hipocromicidad de ácidos oligouridílicos.

Compuesto	$c$ (mol/l)	$\epsilon [U(pU)_n] \cdot 10^{-3}$ (l/mol cm)	$\epsilon [U+n(pU)] \cdot 10^{-3}$ (l/mol cm)	$h''(\%)$
UpU	$8,64 \cdot 10^{-6}$	18,52	20,96	11,6
	$8,64 \cdot 10^{-5}$	17,63	20,07	12,2
U(pU) <sub>2</sub>	$5,73 \cdot 10^{-6}$	26,53	31,59	16,0
	$5,73 \cdot 10^{-5}$	25,50	30,20	15,6
U(pU) <sub>3</sub>	$4,20 \cdot 10^{-6}$	34,29	42,34	19,0
	$4,20 \cdot 10^{-5}$	32,83	40,42	18,8
U(pU) <sub>4</sub>	$3,06 \cdot 10^{-6}$	42,48	53,26	20,2
	$3,06 \cdot 10^{-5}$	39,70	50,74	21,8

En la fig. 4.10. se representan los valores de estas hipocromicidades en función de la concentración. Las rectas que representa la variación de la hipocromicidad tienen una pendiente prácticamente  $n$  la; es decir, en este intervalo de concentraciones, la hipocromicidad depende muy poco de la concentración. La hipocromicidad aumenta con la longitud de la cadena, apreciándose una disminución regular de las diferencias de hipocromicidad entre cada dos oligómeros consecutivos, como en el caso de los oligo-As. Por tanto, dentro de la serie estudiada podría también alcanzarse un máximo de ordenación, con respecto a las unidades monoméricas, para una determinada longitud de la cadena.

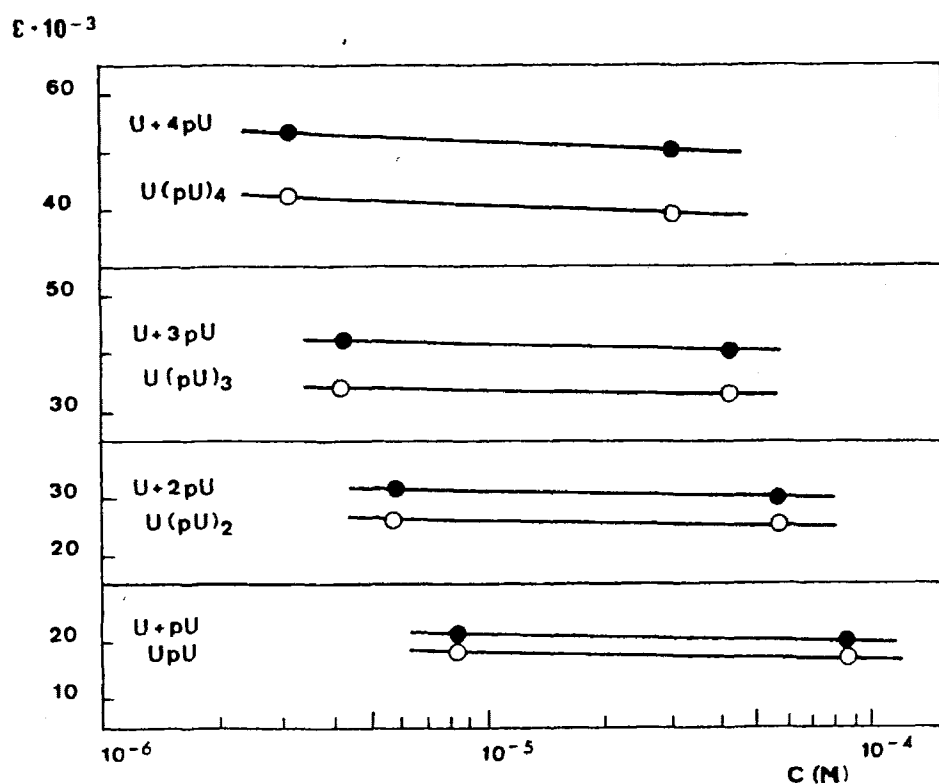


Fig. 4.9.- Absortividad molar de ácidos oligouridílicos a 261 nm, experimental (○) y calculada a partir de las unidades monoméricas (●).

Comparando estos resultados con los obtenidos en la serie de ácidos oligoadenílicos, se puede afirmar que los ácidos oligouridílicos presentan características singulares, que se inician ya en los dinucleósidos-monofosfato e incluso en las unidades monoméricas, de acuerdo con las ideas expuestas en el cap. 2 (pág. 162). Esta conclusión apoya la idea de que el origen de la estructura singular del poli U podría situarse ya a nivel de sus componentes más elementales: uridina, UMP, UpU y ácidos oligoribouridílicos.

### Interacción intramolecular

Con el fin de realizar un estudio análogo al que se ha llevado a cabo con los ácidos oligoadenilícos, acerca de la influencia de la temperatura sobre las interacciones intramoleculares, se han obteni

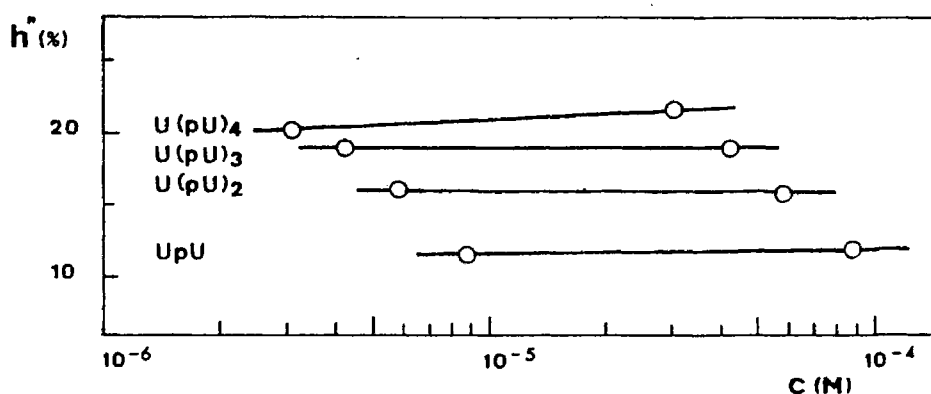


Fig. 4.10.- Hipocromicidad de ácidos oligouridílicos.

do las curvas de fusión de disoluciones diluídas de los ácidos oligouridílicos, a una concentración del orden de  $\sim 1,7 \cdot 10^{-4} M$ , por monómero, en todos ellos.

En la fig. 4.11. se representan las curvas de fusión de  $U(pU)_2$ ,  $U(pU)_3$  y  $U(pU)_4$ , que revelan que, en el intervalo de temperaturas estudiado, de 6 a 90°C, la variación de la absorptividad molar de estos compuestos está dentro del error experimental. Es obvio, por tanto, que en dicho intervalo, la temperatura no influye en el grado de ordenación de los ácidos oligouridílicos.

El distinto comportamiento frente a la temperatura de los ácidos oligoadenilícos y de los ácidos oligouridílicos, es una manifes

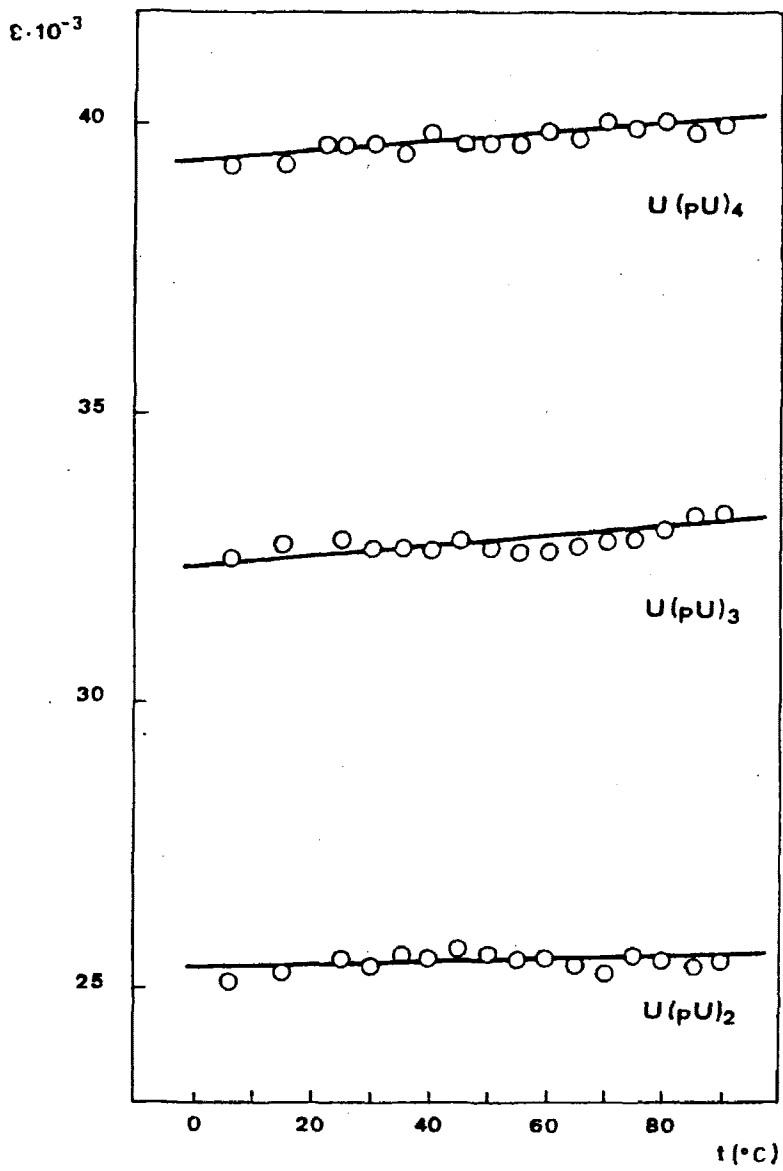


Fig. 4.11.- Curvas de fusión de ácidos oligouridílicos.

tación más de que los procesos de asociación, y por consiguiente, las estructuras que de ellos resultan, son notablemente distintos en ambas series.

Conclusiones generales acerca de las interacciones intermoleculares e intramoleculares de los ácidos oligoriboadenilicos y oligoribouridilicos

- 1) La variación de la absorptividad molar con la concentración de los ácidos oligoadenilicos y oligouridilicos, es análoga a la que podría predecirse a partir de sus componentes adenosina+nAMP y uridina+nUMP, respectivamente, pero todos ellos presentan un efecto hipocrómico adicional, que se interpreta como consecuencia del enlace covalente 3'-5' ribosa-fosfato, establecido entre las unidades monoméricas.
- 2) La hipocromicidad, y por tanto, el grado de ordenación de las bases, de los ácidos oligoadenilicos y oligouridilicos, con respecto a sus componentes, aumenta al aumentar la longitud de la cadena, si bien en los ácidos oligouridilicos la hipocromicidad depende muy poco de la concentración.
- 3) La hipocromicidad de los ácidos oligoadenilicos es mayor que la de los ácidos oligouridilicos homólogos.
- 4) La diferencia de hipocromicidad al pasar de un oligómero  $A(pA)_n$  al  $A(pA)_{n+1}$ , disminuye a medida que aumenta

el valor de  $n$ . Este hecho se interpreta en el sentido de que, para una determinada longitud de cadena, que puede estimarse del orden de 10 nucleótidos, se alcanza un máximo de ordenación de las unidades monoméricas constituyentes. En la serie de ácidos oligouridílicos se observa un comportamiento análogo.

- 5) Las magnitudes termodinámicas aparentes,  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$ , correspondientes al apilamiento intramolecular de las bases en los ácidos oligoadenílicos, son de signo negativo y aumentan gradualmente, en una cantidad aproximadamente constante, al aumentar la longitud de la cadena. Este resultado podría interpretarse en función de un mecanismo de asociación de cierto carácter cooperativo.
- 6) Las "curvas de fusión" de los ácidos oligouridílicos no revelan una variación detectable de la absorptividad molar con la temperatura, en el intervalo de 6 a 90°C. Atribuímos esta diferencia llamativa respecto a los ácidos oligoadenílicos, al comportamiento singular que, a todos los niveles de complejidad estructural, presentan los componentes de ácidos nucleicos que contienen uracilo.

#### 4.2. POLINUCLEOTIDOS

Inmediatamente después de que, en 1955, Ochoa y colaboradores (22,23) aislasen la poliribonucleótido fosforilasa, que cataliza la reacción de condensación de los ribonucleósidos-difosfato para dar poliribonucleótidos, fueron sintetizados el ácido poliadenílico (poli A) y el ácido poliuridílico (poli U). A partir de entonces, estos y otros polinucleótidos, de las más diversas estructuras, han sido objeto de numerosas investigaciones, por constituir los sistemas modelo más adecuados para el estudio de los ácidos nucleicos, habiéndose publicado diversas revisiones de los trabajos de tipo fisicoquímico que se han realizado sobre este tema (2,24-31).

##### 4.2.1. Ácido poliriboadenílico (poli A)

Se ha utilizado ácido poliriboadenílico (sal potásica liofilizada) de "Boehringer" (Mannheim), sin purificación adicional. Se han preparado sendas disoluciones de este polinucleótido en tampón fosfato (pH 6,8) y en tampón acetato (pH 4,6), con objeto de comparar el distinto comportamiento de las conformaciones de hélice simple (7,8, 32-38) y de doble hélice (7,32-34, 36, 39-42) que adopta el poli A a cada uno de los pH mencionados.

##### Asociación intermolecular

En el estudio de ácidos nucleicos y polinucleótidos por espectroscopía UV, se utiliza usualmente el valor de la absortividad mo-

lar  $\epsilon(P)$ , que corresponde a una absorptividad media por mol de nucleótido (35,36). Esta absorptividad molar,  $\epsilon(P)$ , del poli A de cadena simple a 25°C, puede calcularse a partir de los datos obtenidos mediante la hidrólisis alcalina del poli A, en la cual se escinden los enlaces fosfodiéster de la cadena polinucleotídica, con la subsiguiente liberación de AMP. (32,43).

El fundamento de este método es el siguiente: si se designa por  $\epsilon(P)$  la absorptividad molar en el máximo (257 nm), por monómero, del poli A de cadena simple a pH neutro y una temperatura dada, al consumarse la hidrólisis alcalina del poli A se verifica la siguiente relación:

$$\frac{\epsilon(P) (257 \text{ nm})}{\epsilon(\text{AMP}) (259 \text{ nm})} = \frac{A(\text{poli A}) (257 \text{ nm})}{A(\text{Poli A hidrolizado}) (259 \text{ nm})} \quad |30|$$

en donde  $\epsilon(P)$  y  $A(\text{poli A})$  se miden a pH neutro, y  $\epsilon(\text{AMP})$  y  $A(\text{Poli A hidrolizado})$  pueden medirse a pH alcalino. Por tanto, para determinar el valor de  $\epsilon(P)$  mediante la anterior relación, basta medir la absorbancia de una disolución de poli A a 257 nm a pH neutro, antes de ser hidrolizado, y a pH alcalino, una vez que se ha producido la hidrólisis completa del poli A a AMP. El criterio que permite decidir que la hidrólisis se ha completado, es que la absorbancia de la disolución no varíe con el tiempo (36).

Puesto que el poli A se hidroliza a AMP, la absorbancia de la disolución hidrolizada es una medida de la concentración de este nucleótido, a la cual, teniendo en cuenta el espesor de la célula utilizada, corresponde un determinado valor de  $\epsilon(\text{AMP})$ , que puede deducirse a partir de la curva de  $\epsilon$  frente a concentración molar del AMP. La absorbancia del poli A hidrolizado puede medirse directamente en la di-

solución alcalina, o bien en esta disolución una vez neutralizada. Según se adopte uno u otro procedimiento, deberá utilizarse la curva de hipocromicidad del AMP a pH 13 (fig. 2.24.) o a pH 7 (fig. 1.12.), respectivamente. Los valores que hemos obtenido mediante ambos métodos son concordantes. Para el poli A de cadena simple, a pH neutro y 25°C,  $\epsilon(P) = 10,1 \cdot 10^3$  l/mol cm, que concuerda con los de la bibliografía (35,36).

Una vez calculado, según este método, el valor de  $\epsilon(P)$  del poli A a pH neutro y 25°C, es posible determinar la absorptividad del poli A a una temperatura determinada, a partir de la medida de la absorbancia a esta temperatura, así como calcular la concentración molar, por monómero, de la disolución de poli A.

La absorptividad molar  $\epsilon(P)$  del poli A, en el máximo de absorción (257 nm a pH neutro y 252 nm a pH ácido), no varía con la concentración, en el intervalo  $5 \cdot 10^{-6}$  -  $4 \cdot 10^{-2}$  M, a diferencia de lo observado en las unidades monoméricas de adenina y en los ácidos oligoadenilicos. Este resultado puede interpretarse en el sentido de que, a estos valores de pH, el poli A no se autoasocia al aumentar la concentración o bien de que, al nivel de complejidad estructural de este polinucleótido, la posible autoasociación debida al aumento de la concentración no da lugar a un efecto hipocrómico como el observado en sus componentes. Esta última deducción implicaría que, una vez alcanzada una determinada longitud de cadena, se obtendría un valor máximo del hipocromismo del sistema, que ya no aumentaría aunque siguiera aumentando la longitud de la cadena.

Por otra parte, al disminuir el pH a un valor inferior a 6 se produce una transición estructural según la cual se asocian dos ca-

denas helicoidales de poli A para constituir una doble hélice (7,33,34, 36). La formación de esta doble hélice puede considerarse como un proceso de asociación intermolecular en el poli A de cadena simple, y según nuestros resultados experimentales, está acompañada por una disminución del valor de  $\epsilon(P)$  desde  $10,1 \cdot 10^3$  a  $9,1 \cdot 10^3$  a  $25^\circ\text{C}$ , lo cual supone un efecto hipocrómico aparente del 10%.

#### Interacción intramolecular

Hemos llevado a cabo un estudio de la influencia de la temperatura sobre las interacciones intramoleculares en el poli A, análogo al descrito para los ácidos oligoadenilicos. Para ello, se midió la variación de la absorptividad molar en el máximo de disoluciones de poli A, a pH neutro y a pH ácido, en función de la temperatura. En las fig. 4.12. y 4.13. se dan las "curvas de fusión" correspondientes. Los espectros a diferentes temperaturas se obtuvieron mediante el procedimiento experimental descrito en el cap. 3. Al aumentar la temperatura se observó, tanto a pH neutro como a pH ácido, un notable efecto hipercrómico que acompaña a la transición orden-desorden de este polinucleótido.

Se han dedicado numerosos trabajos al estudio de la transición hélice-cadena estadística de polinucleótidos (44). No entraremos aquí, por tanto, en la discusión en profundidad del significado de este fenómeno, cuyo tratamiento no es el objeto del presente trabajo. Utilizaremos únicamente las "curvas de fusión" del poli A, en sus dos conformaciones de hélice simple y de doble hélice, para relacionar los valores de hipocromicidad obtenidos a partir de ellas con los datos, obtenidos por nosotros, relativos a las interacciones de las unidades mono

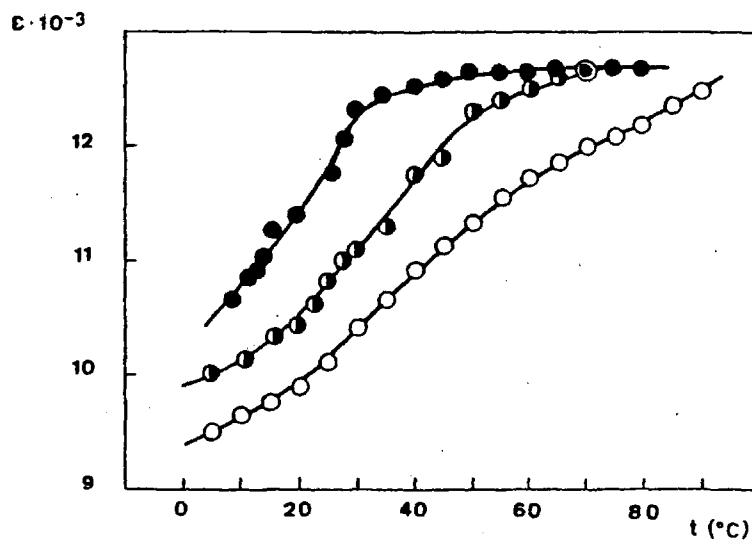


Fig. 4.12.- Curvas de fusión de poli A a pH neutro.  
 ○ T. fosfato; ◐ Etanol (50%); ● DMSO (50%).

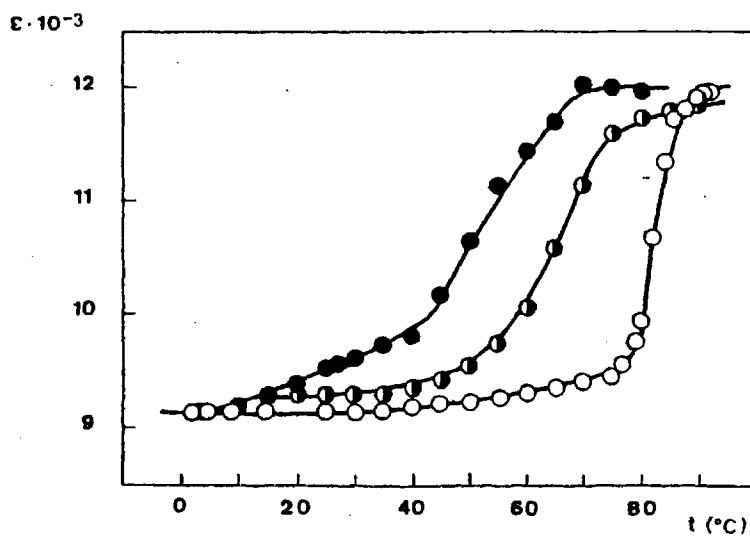


Fig. 4.13.- Curvas de fusión de poli A a pH ácido.  
 ○ T. acetato; ◐ Etanol (50%); ● DMSO (50%).

méricas y de los ácidos oligoadenilicos, con objeto de establecer una correlación acerca del estado de ordenación de los diferentes sistemas.

Las curvas de fusión del poli A a pH neutro (fig. 4.12.), se han obtenido, con idénticos resultados, en tampón fosfato, de pH 6,8 y en tampón cacodilato 0,05 M, de pH 6,9. El cacodilato, como tampón, ha sido utilizado por diversos autores (8,15,21) sin justificar explícitamente las razones de su empleo, que inicialmente, según Fresco y Alberts (43), fue impedir la contaminación bacteriana de las disoluciones. Sin embargo, la concordancia de los resultados obtenidos por nosotros en ambos tampones confirma la fiabilidad de las medidas realizadas en las disoluciones en tampón fosfato.

En estas curvas de fusión a pH neutro, se observa un efecto hipercrómico, que aumenta gradualmente al aumentar la temperatura, asociado con la transición no-cooperativa de la hélice simple a la cadena estadística (7,8,11,34). Las curvas presentan un punto de inflexión ( $T_m$ ), poco definido, hacia 45°C, pero en el intervalo de temperaturas estudiado no se completa la transición. Es de interés destacar, por otra parte, que la curva de fusión a pH neutro no depende de la concentración de poli A, pues, al representar la absortividad molar en función de la temperatura, se ha obtenido la misma curva para disoluciones de poli A de concentraciones  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$  y  $5 \cdot 10^{-3}$  M.

La curva de fusión del poli A a pH ácido (fig. 4.13.) se ha obtenido, a una concentración de  $6 \cdot 10^{-5}$  M, en tampón acetato, de pH 4,6. Con el fin de impedir la formación de agregados insolubles de poli A, que se produce si se disuelve directamente este polinucleótido en el tampón, fue necesario disolver previamente el poli A en agua y añadir a

continuación, por separado, los componentes del tampón en la proporción adecuada (36). La curva de fusión obtenida revela también un efecto hipercrómico, pero la transición es mucho más abrupta que a pH neutro, debido a la cooperatividad de la disociación de la doble hélice (7,33,34). Existe en dicha curva un punto de inflexión a una temperatura de 82°C, notablemente superior a la detectada a pH neutro, lo cual revela que, a pH ácido, la transición conformacional requiere alcanzar una temperatura más elevada. Por otra parte, la longitud de onda del máximo se desplaza desde 252 hasta 259 nm en el curso de la transición.

Las curvas de fusión se obtienen representando el valor de la absorbancia frente a la temperatura, pero pueden representarse también, más rigurosamente, en términos de absorptividad molar frente a temperatura, o bien de hipocromicidad frente a temperatura.

El cálculo de la hipocromicidad del poli A, con respecto al monómero libre (AMP), puede realizarse a partir de los valores de  $\epsilon(P)$  del poli A a diferentes temperaturas. Para ello, hacemos uso de una ecuación análoga a la [21]:

$$h'_x = \frac{\epsilon_1(\text{AMP}) - \epsilon_x}{\epsilon_1(\text{AMP})} 100 \quad [31]$$

en donde  $h'_x$  es la hipocromicidad de una disolución de poli A de absorptividad  $\epsilon_x$ .

Para calcular los valores de la hipocromicidad  $h'(\%)$  del poli A a pH neutro y a pH ácido, que se dan en la 4ª columna de la tabla 4.5., se toman como referencia los valores de  $\epsilon_1$  del AMP a esas mismas condiciones de pH,  $\epsilon_1=1676$  (tabla 1.3., pág. 39) y  $\epsilon_1=15010$  (tabla 2.17., pág. 155), respectivamente. Mediante este procedimiento, y considerando que la hipocromicidad es una medida de la interacción de las bases, se puede estimar el grado de ordenación del poli A, sometido a diferentes condiciones de pH y temperatura, en relación al estado de mínima asociación posible, que es el que corresponde al monómero libre, caracterizado por el valor de  $\epsilon_1$ .

La fig. 4.14. muestra los resultados obtenidos representando la hipocromicidad en el máximo del poli A a pH neutro y a pH ácido, frente a la temperatura. Esta representación ofrece las ventajas, frente a las representaciones clásicas, de que proporciona directamente una medida del desordenamiento del sistema al aumentar la temperatura, y de que permite comparar fácilmente el grado de ordenación de ambas conformaciones de poli A, con respecto al monómero. Por otra parte, con este tipo de representación aparece algo más abrupta la transición conformacional.

El modelo de dos estados es aplicable solamente a transiciones no-cooperativas, y por ello, no puede utilizarse para el cálculo de magnitudes termodinámicas de la transición del poli A a pH ácido (8, 35). Sin embargo, a partir de la curva de fusión a pH neutro pueden calcularse las constantes aparentes de apilamiento intramolecular, de acuerdo con el modelo de dos estados, y mediante la variación con la temperatura de dichas constantes hemos estimado las magnitudes termodinámicas aparentes de la interacción intramolecular de apilamiento, utilizando la ecuación de van't Hoff. Los valores de  $\epsilon_{\min}$  y  $\epsilon_{\max}$  se han obtenido directamente de la curva de fusión, a las temperaturas de 5° y 90°C, respectivamente.

En la fig. 4.15. se da la representación de van't Hoff para el poli A. A partir de la recta obtenida, se han calculado los siguientes parámetros termodinámicos aparentes:

$$\Delta H^\circ = -14,4 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta S^\circ = -45 \text{ cal/mol K}$$

que tienen el mismo signo que los obtenidos para ApA, A(pA)<sub>2</sub>, A(pA)<sub>3</sub>, y

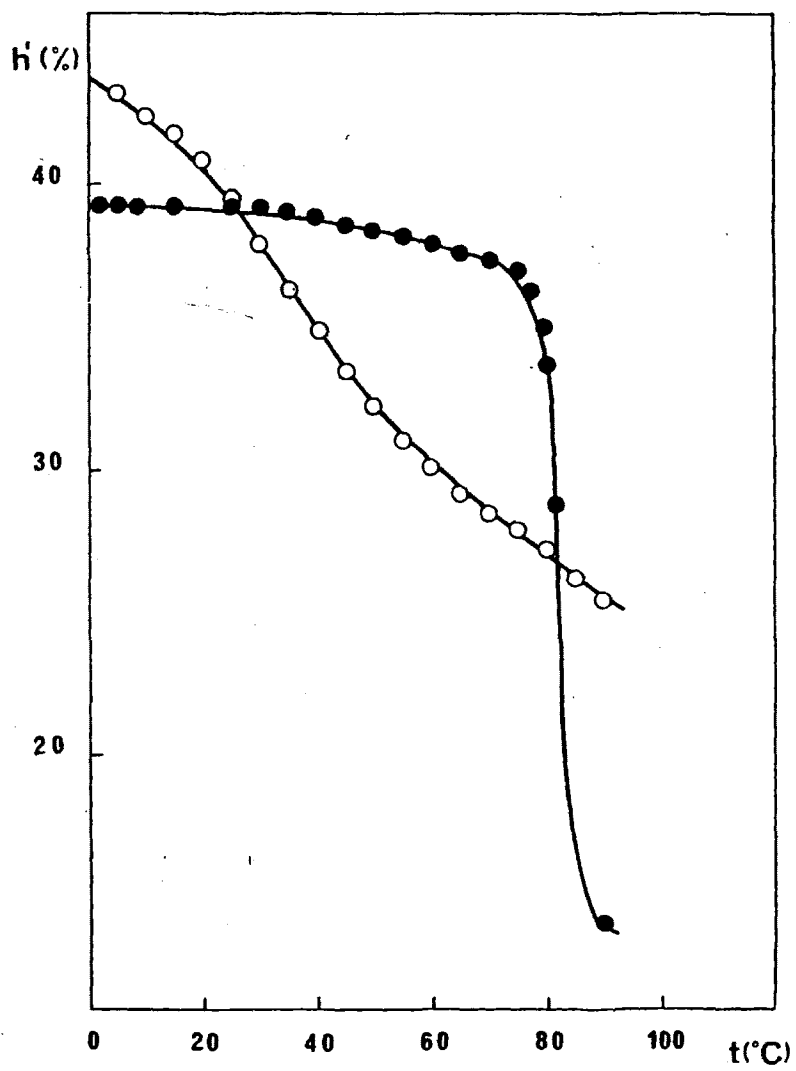


Fig. 4.14.- Hipocromicidad de poli A, respecto de AMP, a pH neutro (O) y a pH ácido (●).

$A(pA)_n$ , comentados anteriormente. Por otra parte, la magnitud de estos parámetros parece representar el valor límite a que tienden los calculados para los citados oligonucleótidos (tabla 4.3.). Este límite de las magnitudes termodinámicas de las cadenas de longitud creciente de los compuestos  $A(pA)_n$  podría tener una relación causal con el valor límite de hipocromicidad que se ha discutido al exponer los resultados de la interacción intermolecular de los oligonucleótidos en función de la hipocromicidad.

Discusión conjunta de la variación de la hipocromicidad de 5'-AMP, ácidos oligoriboadenilicos y poli A

En la tabla 4.5. se dan conjuntamente los resultados de las medidas de hipocromicidad correspondientes a AMP y ácidos oligoadenili-

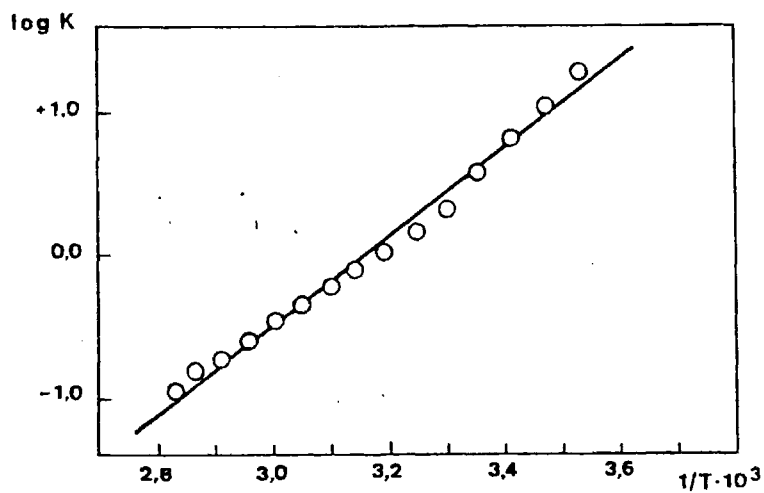


Fig. 4.15.- Representación de van't Hoff para poli A, a pH neutro.

cos, así como las del ácido poliadenílico, en sus dos conformaciones de hélice simple a pH neutro y de doble hélice a pH ácido.

La 2ª columna de esta tabla se refiere a los diferentes grados de interacción entre las bases, para los que se ha determinado, en cada caso, el valor de la absorptividad molar. En ella se da la concentración de las disoluciones, en el AMP y en los oligonucleótidos, y la temperatura, en las disoluciones de poli A.

La 3ª columna resume los valores de la absorptividad molar, en el máximo, que corresponden a cada grado de interacción; en AMP y ApA, se dan los valores de  $\epsilon_1$ ,  $(\epsilon_\infty)_d$  y  $(\epsilon_\infty)_p$  obtenidos a partir del método de cálculo de parámetros de autoasociación; en A(pA)<sub>2</sub>, A(pA)<sub>3</sub> y A(pA)<sub>4</sub>, se dan los valores experimentales de absorptividad molar a las concentraciones citadas y en el poli A, los valores de  $\epsilon(P)$  obtenidos directamente de las curvas de fusión a las temperaturas correspondientes teniendo en cuenta el desplazamiento del máximo de absorción al aumentar la temperatura.

Finalmente, la 4ª columna recoge los valores de la hipocromicidad. Para hacer comparables entre sí los valores de la hipocromicidad de los diferentes compuestos, se ha realizado su cálculo adoptando como "criterio de normalización" el referir la hipocromicidad de AMP al valor de  $\epsilon_1$  del mismo; la de los oligonucleótidos, a la suma  $\epsilon_1(\text{Ado}) + n\epsilon_1(\text{AMP})$ , donde  $n$  varía desde 1 hasta 4; y la del poli A, a pH neutro y a pH ácido, al valor de  $\epsilon_1$  del AMP a cada uno de esos valores de pH. En resumen, todas las hipocromicidades están referidas a la absorptividad de los monómeros sin asociar.

De los valores de hipocromicidad dados en la tabla 4.5.,

TABLA 4.5.

Hipocromicidad de 5'-AMP, ácidos oligoriboadenilicos y poli A

Compuesto	Concehtración o temperatura	$\epsilon_m$ (l/mol.cm)	h' (%)
5'-AMP (pH 6,8)	c=0	$\epsilon_1=16760$	0,0
	c=5.10 <sup>-5</sup> M	$\epsilon =15000$	10,5
	c=4.10 <sup>-3</sup> M	$(\epsilon_\infty)_d=13640$	18,6
	c=∞	$(\epsilon_\infty)_p=11400$	32,0
ApA (pH 6,8)	c=0	$\epsilon_1=26630$	18,3
	c=4,8.10 <sup>-5</sup> M	$\epsilon =24200$	25,7
	c=3.10 <sup>-3</sup> M	$(\epsilon_\infty)_d=22180$	31,9
	c=∞	$(\epsilon_\infty)_p=16400$	49,7
A(pA) <sub>2</sub> (pH 6,8)	c=6,67.10 <sup>-5</sup> M	31930	35,3
A(pA) <sub>3</sub> (pH 6,8)	c=4,67.10 <sup>-5</sup> M	39260	40,6
A(pA) <sub>4</sub> (pH 6,8)	c=4,24.10 <sup>-5</sup> M	47600	42,5
Poli A (pH 6,8)	t= 5°C	9500	43,3
	t=25°C	10100	39,7
	t=45°C=T <sub>m</sub>	11100	33,8
	t=90°C	12500	25,4
Poli A (pH 4,6)	t= 2°C	9100	39,4
	t=25°C	9100	39,4
	t=82°C=T <sub>m</sub>	10700	28,7
	t=90°C	12900	14,1

pueden deducirse las siguientes conclusiones:

1°) Los valores de hipocromicidad a 25°C del poli A a pH neutro y a pH ácido, con relación al monómero libre, son aproximadamente del 40% en ambos casos. Este resultado representaría que la interacción de las bases en el poli A respecto al AMP es análoga en ambas conformaciones, pero la hipocromicidad no aporta información específica, directa, sobre la naturaleza de éstas. Por tanto, el valor de la hipocromicidad no permite discernir entre las ordenaciones correspondientes a una hélice de cadena simple y a una doble hélice, sino que únicamente refleja, de una manera global, el grado de interacción entre las bases, pero no la contribución que cada uno de los nuevos factores que implica la formación de una doble hélice, tienen sobre su valor total.

2°) La hipocromicidad del poli A en cadena simple, en su más alto grado de ordenación, según la curva de fusión obtenida por nosotros, es del 43,3%. La hipocromicidad del AMP, en el 2° efecto hipocrómico, a concentración infinita (v. cap. 1) es del 32,0%. Esta diferencia de hipocromicidad puede suponer una estimación del efecto favorable del esqueleto ribosa-fosfato de la cadena polinucleotídica en el apilamiento de las bases.

Este resultado apoyaría nuestra hipótesis de que el 2° efecto hipocrómico, observado en las disoluciones acuosas de las unidades monoméricas, corresponde a un fenómeno de apilamiento vertical de éstas formando pilas de moléculas no unidas covalentemente, pero entre las cuales existe una evidente interacción. Cuando estas mismas moléculas quedan unidas por los enlaces 3'-5' fosfodiéster, formando un polinucleótido (poli A), la disposición apilada de las unidades monoméricas

asa a ser una cadena en la que las interacciones entre las bases son más intensas, lo cual justificaría la mayor hipocromicidad del poli A.

3°) La diferencia, de un 10,7%, entre el valor de la hipocromicidad de la conformación en doble hélice del poli A, en el intervalo de bajas temperaturas ( $h'=39,4\%$ ), y la del "estado" correspondiente a la temperatura de transición a  $82^{\circ}\text{C}$ , aproximadamente, ( $h'=28,7\%$ ), representa el aumento de hipocromicidad que debe producirse por el incremento de la interacción entre las bases, como consecuencia de la formación de los enlaces intercatenarios en la doble hélice.

4°) En ambas conformaciones del poli A, hélice simple y doble hélice, disminuye el valor de la hipocromicidad al aumentar la temperatura, pero se obtiene un valor límite de hipocromicidad residual, que es del 25,4% en el poli A a pH neutro, y del 14,1% a pH ácido.

La interpretación de este resultado se ve dificultada por el hecho de que aún no se ha podido establecer, con carácter definitivo, la naturaleza real del apilamiento en las cadenas polinucleotídicas y la conformación que puedan adoptar cuando la temperatura se eleva hasta dar lugar a un grado de desorden elevado, aunque limitado. En todo caso, la hipocromicidad residual, puesta de manifiesto en las curvas de fusión, es compatible con la hipótesis establecida por algunos autores (45,46) de que, en la cadena estadística, la rotación de los enlaces del esqueleto del polinucleótido está notablemente restringida, con el consiguiente incremento de interacción entre las bases con respecto al monómero.

5°) En la transición conformacional del poli A a pH ácido, en el intervalo de temperatura de 5° a 90°C, la diferencia total de hipocromicidad es 39,4-14,1=25,3%, mientras que a pH neutro, dicha diferencia es 43,3-25,4=17,9%. Así pues, la formación de la doble hélice da lugar a una hipocromicidad adicional del orden del 7,5%. La interpretación obvia de este resultado, es que la hipocromicidad adicional es consecuencia del mayor grado de ordenación y estabilidad de la doble hélice respecto a la hélice simple.

6°) Los valores de hipocromicidad  $h'$  (%) de los oligonucleótidos, que varían según la secuencia  $A(pA)_{25,7}-A(pA)_{35,3}-A(pA)_{40,6}-A(pA)_{42,5}$ , confirman la conclusión, deducida en el estudio de los ácidos oligoriboadenilicos (apartado 4.1.), de que, en esta serie, se llega a un valor límite de hipocromicidad para una determinada longitud de cadena. El poli A tiene, justamente, el valor de hipocromicidad que corresponde a este límite.

#### Influencia del disolvente

Con objeto de extender el estudio, descrito en el cap. 2.1. acerca de la influencia del disolvente sobre la interacción de las unidades monoméricas, adenina, adenosina y 5'-AMP, al ácido poliadenilico, hemos obtenido las curvas de fusión del poli A, en disoluciones de disolventes orgánicos, a pH neutro (fig. 4.12.) y a pH ácido (fig. 4.13.) Para ello, se han utilizado mezclas al 50%, en volumen, de tampón fosfato y de tampón acetato con etanol y con dimetilsulfóxido.

Como puede verse en las fig. 4.12. y 4.13., el valor máximo de  $\epsilon(P)$ , que en disolución acuosa se obtiene a unos 90°C, se alcanza e

presencia de etanol a 65°C a pH neutro y a 80°C a pH ácido, y en DMSO, a 50°C a pH neutro y a 70°C a pH ácido. Por tanto, los resultados obtenidos en ambas condiciones de pH, muestran que el etanol y el DMSO favorecen la transición orden-desorden del poli A.

Por otra parte, las curvas de fusión obtenidas a pH ácido en las mezclas del tampón con los citados disolventes, pierden su forma abrupta y tienden a adquirir la forma característica de la curva de fusión a pH neutro. El valor de  $T_m$  disminuye al pasar de tampón acetato (82°C) a etanol (65°C), y más aún a DMSO (50°C).

De acuerdo con los argumentos expuestos en las págs. 82 y 83, los disolventes orgánicos utilizados tenderían a favorecer la posible formación de enlaces de hidrógeno entre las bases de las dos cadenas que forman la doble hélice (a pH ácido), lo cual daría lugar a una mayor estabilidad de la doble hélice, en contra de la deducción que acabamos de apuntar de que ambos disolventes favorecen la transición orden-desorden. En consecuencia, los resultados obtenidos apoyan la idea de que la estabilidad de la estructura del poli A a pH ácido está condicionada, fundamentalmente, por el apilamiento de las bases. Por otra parte, el hecho de que también a pH neutro los disolventes orgánicos favorezcan la transición orden-desorden, podría apoyar las conclusiones establecidas en el cap. 2.1. (pág. 106) acerca de la importancia de las interacciones hidrofóbicas en la estabilidad de las estructuras ordenadas de componentes de ácidos nucleicos.

#### Influencia de la urea

Con objeto de comprobar si los resultados obtenidos al es-

tudiar la influencia de la urea en la autoasociación de las unidades monoméricas de adenina (cap. 2.4.), pueden extenderse al correspondiente polinucleótido, hemos obtenido las curvas de fusión del poli A en disoluciones de urea 7M, a pH neutro y pH ácido (fig. 4.16.).

La influencia de la urea sobre las curvas de fusión del poli A es, en conjunto, diferente de la del etanol y DMSO:

a) El valor de la absorptividad molar, tanto a pH neutro como a pH ácido, es menor en presencia de urea, análogamente a lo observado en las disoluciones de AMP en urea 7M (fig. 2.27., pág. 173). Por el contrario, su valor aumenta, respecto al tampón, en etanol y en DMSO

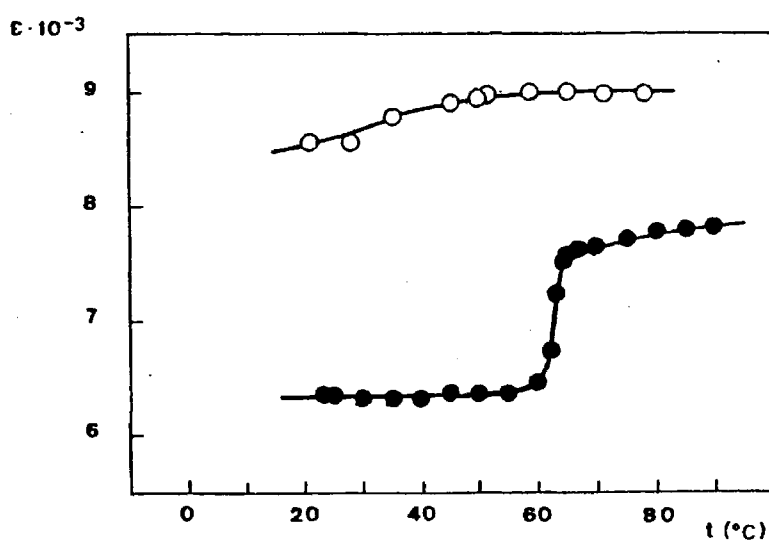


Fig. 4.16.- Curvas de fusión de poli A en urea 7M, a pH neutro (○) y a pH ácido (●).

b) El efecto hipercrómico total, producido en la transición térmica, es menor en las disoluciones de urea 7M que en las disoluciones acuosas, tanto a pH neutro como a pH ácido.

c) A pH ácido, la forma de la curva de fusión es del mismo hábito que la de la disolución acuosa, y por tanto corresponde a un proceso cooperativo; es decir, la presencia de urea no parece afectar a la transición conformacional.

d) En urea 7M a pH ácido, el valor de  $T_m$  disminuye, igual que en etanol, de 82° a 62°C, lo cual indica que, en presencia de urea, es menor el aporte de energía necesario para producir la escisión de la doble hélice. Por consiguiente, la urea facilita la desnaturalización del poli A en la conformación de doble hélice; es decir, en este sentido, ejerce un efecto análogo al del etanol y DMSO.

En resumen, estos resultados son concordantes con las conclusiones expuestas en el cap. 2.4. (pág. 181 y ss.), en el sentido de que la urea tiene una influencia menos significativa que los disolventes utilizados, sobre las interacciones de las unidades monoméricas.

#### 4.2.2. Acido poliribouridílico (poli U)

De acuerdo con la revisión crítica de los trabajos publicados acerca de la conformación y de las interacciones intermoleculares e intramoleculares del poli U (24,29,30,31,47-50), se concluye que las interpretaciones de los diversos resultados experimentales obtenidos hasta ahora, no son, en general, concordantes.

El fin que nos proponemos con este trabajo es, por una parte, aportar algunos resultados experimentales que puedan ser útiles

para contribuir al esclarecimiento de estas cuestiones, y por otra parte, poner de manifiesto las diferencias existentes entre el poli A, cuya conformación helicoidal de cadena simple o de doble cadena se ha comentado anteriormente, y el poli U, en el cual la conformación y propiedades fisicoquímicas, como hemos indicado reiteradamente, tienen un carácter singular. Para ello, hemos aplicado los mismos criterios y técnicas de espectroscopía UV, expuestos en el estudio del poli A.

En este sentido, hemos realizado dos tipos complementarios de estudios experimentales.

#### Variación de la hipocromicidad con la concentración

Se ha utilizado ácido poliribouridílico (sal potásica liofilizada) de "Boehringer" (Mannheim), sin purificación adicional. Las disoluciones de este polinucleótido se prepararon en tampón fosfato. Las concentraciones se calcularon teniendo en cuenta el valor de  $\epsilon(P)$ , determinado por el mismo método que empleamos para el poli A.

Se ha medido la absortividad molar  $\epsilon(P)$  en el máximo (259 nm), de una serie de 10 disoluciones de poli U a pH neutro, en el intervalo de concentraciones comprendido entre  $5 \cdot 10^{-6}$  y  $5 \cdot 10^{-3}M$ . En la tabla 4.6. se dan los valores de absortividad molar de cada una de ellas. Como puede observarse, la absortividad del poli U varía significativamente con la concentración.

No consideramos trivial el subrayar esta variación de la absortividad, ya que en la bibliografía revisada no hemos encontrado referencia alguna relativa a este hecho experimental. Por otra parte, y de acuerdo con la intención de poner de manifiesto las analogías y diferencias entre el poli A y el poli U, es oportuno subrayar que, co

TABLA 4.6.

Absortividad molar de disoluciones de poli U

c(moles/l)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$ (l/mol cm)
$5,00 \cdot 10^{-6}$	11,0
$1,00 \cdot 10^{-5}$	10,9
$2,50 \cdot 10^{-5}$	10,8
$5,00 \cdot 10^{-5}$	10,7
$1,00 \cdot 10^{-4}$	10,5
$2,50 \cdot 10^{-4}$	10,4
$5,00 \cdot 10^{-4}$	10,3
$1,00 \cdot 10^{-3}$	10,2
$2,50 \cdot 10^{-3}$	10,0
$5,00 \cdot 10^{-3}$	9,8

indicamos en el apartado anterior, el comportamiento del poli A es, en este sentido, totalmente distinto, ya que la absortividad molar de sus disoluciones es independiente de la concentración.

El descenso de la absortividad molar del poli U al aumentar la concentración, es del mismo orden que el detectado en el 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico de las unidades monoméricas. Por consiguiente, y teniendo en cuenta la hipótesis básica de nuestro trabajo, de que el efecto hipocrómico se debe a la autoasociación de las unidades monoméricas, este fenómeno podría atribuirse, también en el poli U, a un proceso de interacción entre las bases existentes en él.

Ahora bien, consideramos que sería arriesgado aplicar nuestro método de cálculo de parámetros de autoasociación a la curva de hipocromicidad  $\epsilon$  frente a  $c$  correspondiente a los valores de la tabla

4.6., porque las hipótesis básicas de este método se refieren a la formación de dímeros o polímeros a partir de unidades monoméricas libres, y no a la asociación de éstas formando ya parte de una cadena polinucleotídica. Por tanto, la posible concordancia, o discrepancia, de los valores obtenidos para los "parámetros de autoasociación" del poli U y de sus unidades monoméricas, podría dar lugar a una interpretación no

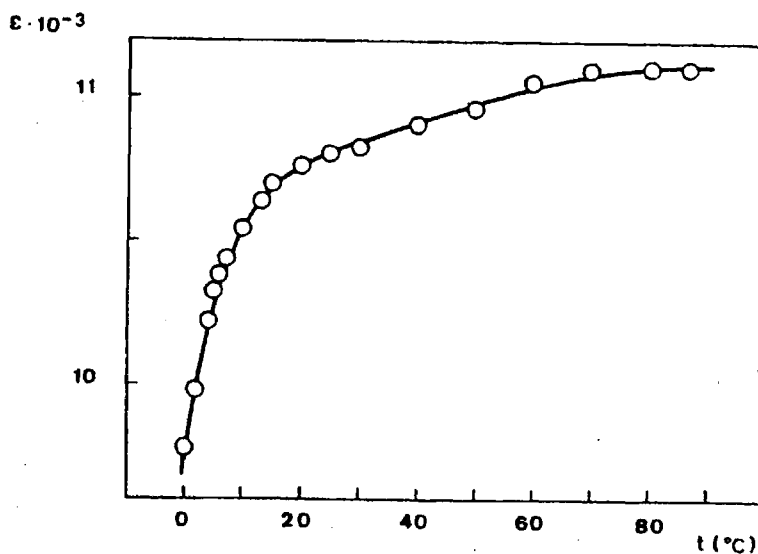


Fig. 4.17.- Curva de fusión de poli U  $5 \cdot 10^{-5}$  M.

correcta.

#### Variación de la hipocromicidad con la temperatura

Se han obtenido las "curvas de fusión", en tampón fosfato, de sendas disoluciones de poli U, de concentraciones  $5 \cdot 10^{-5}$  y  $5 \cdot 10^{-4}$  M. Debido a que la absortividad molar del poli U varía con la concentración, las curvas de fusión de disoluciones de poli U de distintas con

centraciones, son diferentes. En la fig. 4.17. se da la curva de fusión en el intervalo de 0 a 90°C, de la disolución  $5 \cdot 10^{-5} M$ . La variación de la absorptividad que se produce en el intervalo de 0° a 25°C es mucho más acusada que la que se observa de 25° a 90°C, y corresponde al característico efecto hipercrómico del poli U, observado por otros autores (47). Sin embargo, la curva de fusión completa no presenta el punto de inflexión definido de las curvas de fusión que caracterizan las transiciones cooperativas, como el que se observa, por ejemplo, en la curva de fusión del poli A a pH ácido, y por otra parte, tampoco es de hábito análogo a la curva de fusión del poli A a pH neutro. En resumen, de la curva de fusión del poli U no puede deducirse que su conformación

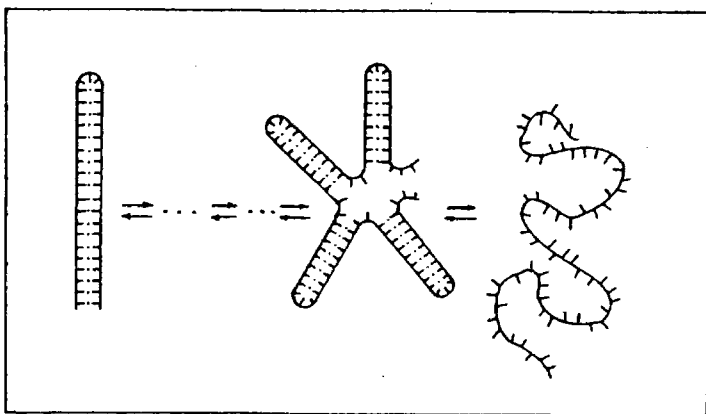


Fig. 4.18.- Representación esquemática de la transición estructural del poli U, según Thrierr, Dourlent y Leng (50), basada en resultados de espectrofotometría de relajación.

sea de doble hélice o de hélice simple, lo cual constituye una eviden-

cia experimental más de que los mecanismos de interacción que tienen lugar en ambos polinucleótidos (poli A y poli U) son distintos. Este resultado es consistente con las ideas expuestas por diversos autores (31,50), que anticipamos ya en la pág. 162, según las cuales en el poli U tiene lugar un proceso de autoasociación por enlace de hidrógeno entre las bases de la cadena polinucleotídica, la cual se pliega sobre sí misma para constituir lazos en forma de horquilla, que de una manera muy esquemática y simplificada, serían del tipo representado en la fig. 4.18..

Para analizar el proceso de fusión del poli U, es oportuno recordar que esta conformación en horquilla puede ser de dos tipos distintos: de cadenas abiertas o de cadenas de forma circular cerradas (51). En la fig. 4.19.a. se representa el efecto de la fusión de una horquilla de bases apareadas en una cadena simple. Cuando se sobrepasa la temperatura de fusión y se escinde todo el sistema de bases apareadas, las dos secuencias complementarias aún permanecen próximas en la disolución.

El efecto de la fusión de una horquilla de bases apareadas en una cadena simple circular cerrada, da lugar a una estructura circular, cuyo grado de ordenamiento es mayor que el de la cadena lineal simple (fig. 4.19.b.). En estas condiciones, la fusión está acompañada de un menor aumento de entropía y es, por tanto, menos probable que la de una horquilla de cadena abierta (51).

De acuerdo con estas ideas, no resulta sorprendente el comportamiento del poli U, en relación con la relativa insensibilidad de la hipocromicidad de este polinucleótido al aumento de temperatura en

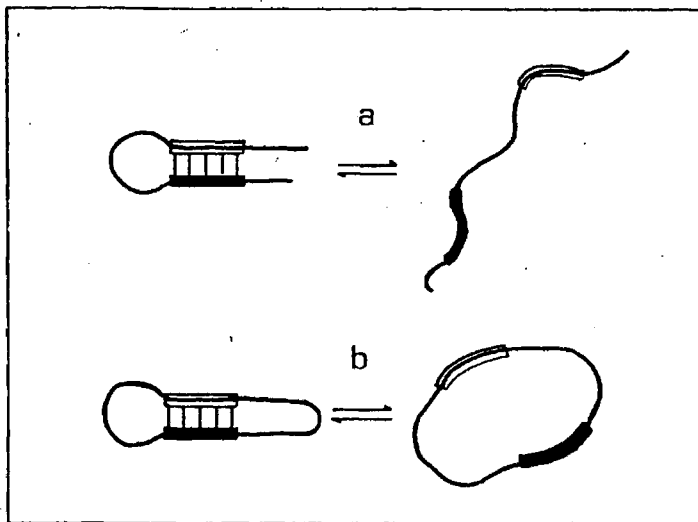


Fig. 4.19.- Fusión de una horquilla de bases apareadas. a) Cadena abierta; b) Cadena circular cerrada.

el intervalo de  $25^{\circ}$  a  $90^{\circ}\text{C}$ , ya que, si el poli U existe en forma de cadena circular cerrada, la fusión de esta estructura estaría desfavorecida por el mencionado efecto entrópico, y en consecuencia, la variación de absorptividad sería menos notable que la correspondiente a la transición orden-desorden de las cadenas helicoidales que forman otros polinucleótidos, como, por ejemplo, el poli A.

Estas referencias a la estructura del poli U y a su comportamiento frente a la temperatura, dan una idea de la complejidad de este polinucleótido y justifican, a nuestro juicio, los resultados experimentales, aparentemente anómalos, que acabamos de exponer, los cuales dentro de sus evidentes limitaciones, pueden representar una pequeña aportación para el esclarecimiento de las propiedades del poli U.

Conclusiones generales acerca de las interacciones intermoleculares e intramoleculares de los ácidos polia-  
denflico y poliuridílico

- 1) El valor de la absortividad molar de las disoluciones del poli A permanece invariable al aumentar la concentración de este polinucleótido. La posible autoasociación debida al aumento de la concentración, no da lugar a un efecto hipocrómico como el observado en las disoluciones de sus componentes.
- 2) Las curvas de fusión de disoluciones de poli A de distintas concentraciones, son prácticamente iguales.
- 3) Los parámetros termodinámicos aparentes de la interacción intramolecular de apilamiento del poli A a pH neutro, tienen signo negativo, lo mismo que los de los ácidos oligoriboadenflicos, y su magnitud es ligeramente superior a la de éstos.
- 4) La elevada hipocromicidad del poli A en la conformación de hélice simple (a pH neutro) respecto a la de sus unidades monoméricas, se interpreta como consecuencia de que el esqueleto ribosa-fosfato de la cadena polinucleotídica, favorece el apilamiento de las bases.
- 5) La transición conformacional correspondiente a la fusión del poli A a pH ácido, pone de manifiesto que la

formación de la doble hélice da lugar a un aumento de la hipocromicidad, como consecuencia de la formación de los enlaces intercatenarios correspondientes.

- 6) En las disoluciones de poli A en etanol y en DMSO, está favorecida la transición orden-desorden, respecto a las disoluciones acuosas. Por tanto, las interacciones hidrofóbicas contribuyen a la estabilización de las estructuras ordenadas de este polinucleótido.
- 7) El valor de la absorptividad molar de las disoluciones del poli U disminuye gradualmente al aumentar la concentración del polinucleótido, de una manera análoga a la observada en las unidades monoméricas. De acuerdo con esta variación, las curvas de fusión de disoluciones de poli U de distintas concentraciones, son diferentes.
- 8) La influencia de la temperatura sobre la hipocromicidad de las disoluciones acuosas de poli U, tiene características notablemente diferentes a las del poli A. El análisis de las curvas de fusión del poli U revela que las variaciones estructurales de este polinucleótido con la temperatura, son compatibles con el modelo de cadena constituida por lazos en forma de horquilla.

5.- ESTUDIO COMPLEMENTARIO POR ESPECTROSCOPIA  
IR DE AUTOASOCIACION Y HETEROASOCIACION  
DE UNIDADES MONOMERICAS EN DISOLUCION  
ACUOSA

Como hemos expuesto en los capítulos precedentes, el estudio por espectroscopía UV de la asociación de los componentes de ácidos nucleicos, en disolución acuosa, permite establecer la conclusión de que entre las bases tienen lugar fuertes interacciones, fundamentalmente de apilamiento. Ahora bien, las interacciones base-base son de dos tipos fundamentales: las "interacciones verticales", que condicionan el apilamiento de las bases, y las "interacciones horizontales", que dan lugar al apareamiento de las mismas por formación de enlace de hidrógeno (1). Presenta, por tanto, un gran interés establecer la contribución relativa de estos mecanismos, ya que ambos pueden tener lugar simultáneamente en los procesos de interacción entre bases.

En este sentido, hemos iniciado un trabajo, de carácter exploratorio, para valorar las posibilidades que ofrece la espectroscopía IR en el estudio de los mecanismos de la autoasociación y heteroasociación de unidades monoméricas en disolución acuosa (2).

El estudio por espectroscopía IR tiene un doble objeto:

1º) obtener una evidencia experimental de la existencia de bases apareadas según el modelo de Watson-Crick, en disolución acuosa, y determinar las constantes de asociación correspondientes; y 2º) estimar cuantitativamente la contribución que representa el enlace de hidrógeno en el proceso global de asociación de las unidades monoméricas.

La espectroscopía IR ha sido aplicada ampliamente al estudio de apareamiento de bases, por enlace de hidrógeno, en disolventes orgánicos: cloroformo, tetracloruro de carbono, etc. (3-8). La formación de enlaces de hidrógeno entre bases se pone de manifiesto por el desplazamiento, a frecuencias más bajas, de las bandas de las zonas de 3300 y 1700  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a las vibraciones de tensión de los grupos funcionales N-H y C=O, respectivamente. Ahora bien, las conclusiones obtenidas acerca de las interacciones base-base en disolventes orgánicos, no pueden ser transferidas a las disoluciones acuosas. De hecho, por espectroscopía IR, no se ha logrado detectar hasta ahora, a nivel de monómero, interacciones de este tipo. Sin embargo, existe evidencia experimental, obtenida por RMN, de la asociación por apareamiento de bases complementarias, en disolución acuosa, de dinucleósidos-fosfato (9) y de diversos 5'-mononucleótidos (10), como indicamos en el apartado 3.2. (pág. 240). Sería de gran interés, por tanto, confirmar la existencia de estas interacciones mediante la aplicación de la espectroscopía IR, teniendo en cuenta las posibilidades que, en principio, ofrece esta técnica para el estudio de los enlaces de hidrógeno (11).

Aunque las experiencias que hemos realizado por espectroscopía IR tienen sólo un carácter exploratorio, con todas las limitaciones que se indican en la discusión de los resultados obtenidos, consideramos oportuna su inclusión en esta Memoria por la importancia que, dentro de la valoración general del trabajo realizado, puede tener la confirmación, mediante otra técnica experimental, de los principales resultados obtenidos por espectroscopía UV acerca de la aso-

ciación de las unidades monoméricas en disolución acuosa. Por otra parte, la espectroscopía IR presenta, en principio, mayores posibilidades que la espectroscopía UV para obtener una información más profunda sobre los mecanismos responsables de los procesos de asociación, y por ello, consideramos que estas experiencias pueden constituir el inicio de una nueva línea de trabajo, dentro de la investigación de las interacciones intermoleculares de los componentes de ácidos nucleicos.

### 5.1. AUTOASOCIACION EN D<sub>2</sub>O

Teniendo en cuenta que la evidencia experimental del apareamiento de bases, en disolución acuosa, ha sido obtenida en los 5'-mononucleótidos (10), hemos iniciado el estudio de la autoasociación de las unidades monoméricas en algunos nucleótidos, de los cuales exponemos únicamente los resultados relativos a 5'-GMP y 5'-CMP. Hemos realizado además algunas experiencias exploratorias para extender este estudio a los nucleósidos; incluyéndose en este capítulo solamente los resultados correspondientes a la adenosina.

En todos los casos se ha utilizado un método análogo al descrito en el cap. 1 para espectroscopía UV, ya que las bandas de absorción IR de las disoluciones de estos compuestos en D<sub>2</sub>O presentan un efecto hipocrómico comparable al detectado por UV.

#### 5.1.1. Metodología experimental

El estudio de disoluciones acuosas por espectroscopía IR presentaba hasta ahora grandes dificultades, debido a las limitaciones propias de los espectrofotómetros convencionales (6,12). Con el perfeccionamiento de los últimos modelos de espectrofotómetros de IR, a los que se ha incorporado una tecnología electrónica avanzada, y su acoplamiento a ordenadores adecuados para el tratamiento de los datos obtenidos, se ha facilitado notablemente el estudio de disoluciones acuosas.

Los espectros IR del presente trabajo, se han registrado, a temperatura ambiente, con un espectrofotómetro Perkin-Elmer 580, ac

plado a un computador Interdata 6/16, utilizando una célula de  $F_2Ca$ , de 23  $\mu m$  de espesor. La principal ventaja que presenta el uso de este espectrofotómetro es su acoplamiento al ordenador, que posibilita la obtención de espectros de diferencia calculada, así como la acumulación de estos espectros.

Todas las disoluciones utilizadas en las experiencias que se describen a continuación, fueron preparadas en  $D_2O$ , registrándose los espectros IR en el intervalo de 4000 a 1000  $cm^{-1}$ . De acuerdo con las bandas de absorción que presentan las unidades monoméricas estudiadas, se ha seleccionado el intervalo de 2000 a 1300  $cm^{-1}$ . En esta zona, el agua pesada no presenta una gran absorción, siendo, en este sentido, la zona más favorable del espectro del  $D_2O$ . Por otra parte, se ha elegido un espesor de célula (23  $\mu m$ ) adecuado para que la absorción de fondo de este disolvente sea de baja intensidad. No obstante, para minimizar los errores de medida de la absorbancia de las bandas correspondientes a las unidades monoméricas, es necesario efectuar la corrección de la absorción de fondo con precisión suficiente.

La compensación del disolvente se ha realizado mediante el ordenador, que resta numéricamente el espectro del disolvente del de cada una de las disoluciones. Para ello, es preciso digitalizar previamente ambos espectros y transformar las medidas de transmitancia en absorbancias, a las cuales ya son aplicables los criterios de aditividad de los espectros. Se obtienen así los llamados espectros de diferencia calculada. De esta forma, se evita uno de los mayores problemas que tiene el estudio de disoluciones acuosas por espectroscopía IR, que es la deficiente compensación del disolvente, dada la gran absorción del agua.

Debido a que el intervalo de concentraciones utilizado en las experiencias de autoasociación de las unidades monoméricas es relativamente amplio (aproximadamente  $10^{-3}$ - $10^{-1}$ M), la intensidad de las bandas correspondientes a las disoluciones más diluidas es demasiado pequeña para permitir mediciones precisas. Por ello, ha sido necesario utilizar la técnica de acumulación de espectros, con objeto de que los valores de absorbancia medidos se encuentren siempre en el intervalo de 0,2 a 0,8, que, como es sabido, son los afectados de un error relativo mínimo.

La ventaja del empleo de la técnica de acumulación de espectros radica en que, mediante ella, se obtiene un aumento efectivo de la relación señal/ruido en un factor  $\sqrt{n}$ , siendo  $n$  el número de acumulaciones. Por consiguiente, resulta preferible la acumulación de un espectro determinado a su mera multiplicación por un factor, en la cual se mantendría invariable la relación señal/ruido.

La colección de programas facilitada por Perkin-Elmer-Interdata para la utilización del ordenador acoplado al espectrofotómetro, contiene un programa que permite acumular directamente los espectros experimentales registrados por el espectrofotómetro. En nuestro caso, no ha sido posible utilizarlo, debido a que la absorción del  $D_2O$  es muy intensa y, por ello, el fondo resulta excesivamente elevado. En consecuencia, hemos tenido que elaborar un programa original para la acumulación, no de los espectros experimentales, sino de los espectros de diferencia calculada, en los cuales se ha eliminado ya la absorción de fondo. A continuación, se adjuntan las dos versiones de este programa, "ACUM 5" y "ACUM N", que permiten acumular un total de 5 espectros y grupos sucesivos de 5 espectros, respectivamente.

Programa "ACUM 5", utilizado para la acumulación de  
5 espectros, mediante el ordenador Interdata 6/16.

```

**ACUM5.
C ESTE PROGRAMA PERMITE ACUMULAR 5 ESPECTROS, RESTANDO A CADA UNO
C EL ESPECTRO DEL DISOLVENTE. CONDICIONES: ISM 2, 2000-1300 CM-1,
C DELTA=2 CM-1. B CONTIENE EL ESPECTRO DEL DISOLVENTE; A, LOS
C SUCESIVOS ESPECTROS Y C EL RESULTADO DE CADA ACUMULACION
C ANTES DE EJECUTAR EL PROGRAMA, CARGAR EN B EL ESPECTRO DEL
C DISOLVENTE QUE SE VA A UTILIZAR.
MODE 2
SCAN A,2000,1300,2
RUN A
DIFF A,B,C
STATUS C
C ESTE STATUS CORRESPONDE AL PRIMER ESPECTRO
PLOT C
C
C QUITAR LA PLUMILLA DEL CURSOR
RUN A
DIFF A,B,A
ADD A,C,C
STATUS C
RUN A
DIFF A,B,A
ADD A,C,C
STATUS C
RUN A
DIFF A,B,A
ADD A,C,C
STATUS C
RUN A
DIFF A,B,A
ADD A,C,C
STATUS C
C
C POR DIFERENCIA DE LOS VALORES MINIMOS DEL PRIMER Y ULTIMO STATUS
C OBTENER EL VALOR DE K Y CORREGIR EL FONDO POR MEDIO DE SUB C,K.
C DESPUES, ORDENAR GOTO 2100, Y PLOT C. EL ESPECTRO REGISTRADO
C CORRESPONDE A 5 ACUMULACIONES.
*>

```

Programa "ACUM N", utilizado para la acumulación de espectros  
en grupos de 5, mediante el ordenador Interdata 6/16.

```

**ACUM N
C ESTE PROGRAMA PERMITE ACUMULACIONES SUCESIVAS, EN GRUPOS DE 5 ESPECTROS
C CADA UNA, EN LAS MISMAS CONDICIONES QUE EL PROGRAMA ACUM5.
C SU UTILIZACION DEBE IR PRECEDIDA POR LA DE ESTE, SIN ALTERAR EL CONTE-
C NIDO DE LAS AREAS A,B,C.
C
C QUITAR LA FLUMILLA DEL CURSOR SI NO SE DESEA REGISTRAR LOS ESPECTROS
RUN A
DIFF A,B,A
ADD A,C,C
RUN A
DIFF A,B,A
ADD A,C,C
RUN A
DIFF A,B,A
ADD A,C,C
RUN A
DIFF A,B,A
ADD A,C,C
RUN A
DIFF A,B,A
ADD A,C,C
STATUS C
C
C POR DIFERENCIA DE LOS VALORES MINIMOS DE ESTE STATUS Y EL DEL PRIMER
C ESPECTRO, OBTENIDO EN EL PROGRAMA ACUM5, OBTENER EL VALOR DE K Y
C CORREGIR EL FONDO MEDIANTE SUB C,K. DESPUES, PONER LA FLUMILLA EN EL
C CURSOR, ORDENAR GOTO 2122 Y PLOT C. EL ESPECTRO REGISTRADO CORRESPON-
C DE A 5 ACUMULACIONES SUCESIVAS.
*>

```

Las variables de operación utilizadas para el registro de estos espectros corresponden a las del programa ISM 2 del espectrógrafo: tiempo de barrido de 2,5 minutos para el intervalo de 2000 a 1300  $\text{cm}^{-1}$  (la velocidad de registro es, aproximadamente, 280  $\text{cm}^{-1}/\text{min}$ ), resolución máxima de 2,8  $\text{cm}^{-1}$  y ruido relativo de 0,3T. El intervalo empleado para la digitalización de los espectros, agotando las posibilidades de resolución de los mismos, ha sido de 2  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 5.1.2. Autoasociación de 5'-GMP

Se han obtenido los espectros IR de una serie de ocho disoluciones de 5'-GMP (sal disódica cristalizada, de "Boehringer", Mannheim) en  $\text{D}_2\text{O}$ , del 99,8% (Stohler Isotope Chemicals, USA), en el intervalo de concentraciones comprendidas entre  $5 \cdot 10^{-3}$  y  $2 \cdot 10^{-1}\text{M}$ , cuyos límites están determinados por la absorción del compuesto para el espesor de la célula utilizada y por su solubilidad.

La fig. 5.1. muestra los espectros IR del  $\text{D}_2\text{O}$  utilizado como disolvente, y de dos disoluciones de GMP, en el intervalo de 2000 a 1300  $\text{cm}^{-1}$ . Como puede observarse, la absorción de fondo del disolvente es bastante elevada, por lo cual se ha realizado la corrección de la absorción de fondo como se ha indicado anteriormente.

En la fig. 5.2. se representan los espectros de diferencia calculada correspondientes a tres concentraciones distintas, en el intervalo espectral de 1750 a 1300  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros IR de las disoluciones de GMP en  $\text{D}_2\text{O}$ , a temperatura ambiente, revelan que, análogamente a lo observado en los espectros UV de este nucleótido (fig. 1.13.), la absortividad molar de

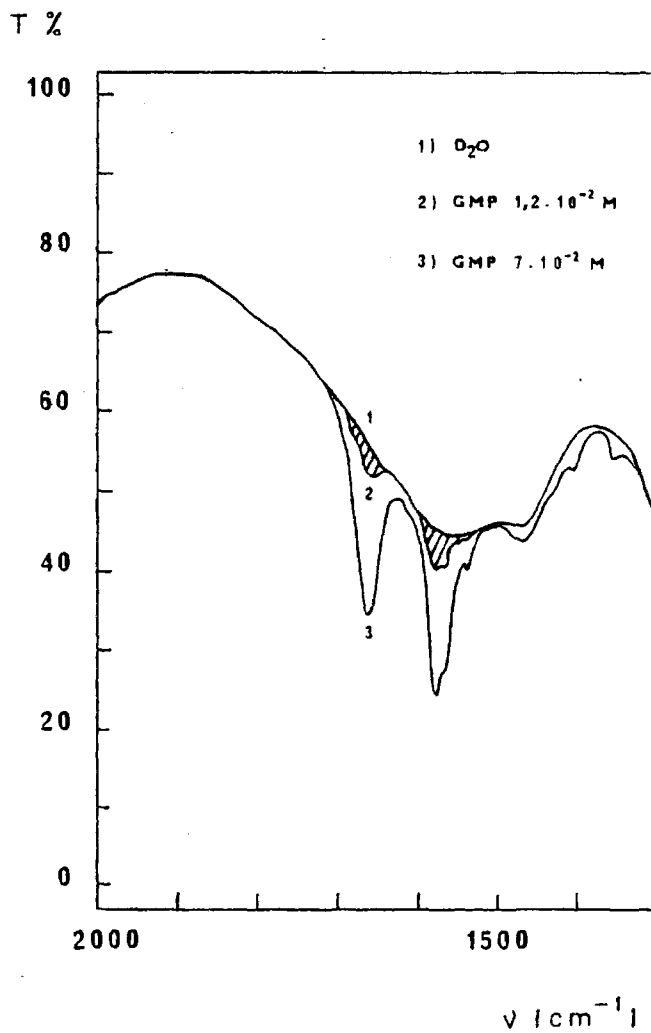


Fig. 5.1.- Espectros experimentales de D<sub>2</sub>O y de disoluciones de GMP en D<sub>2</sub>O, obtenidos en una célula de F<sub>2</sub>Ca de 23 μm de espesor.

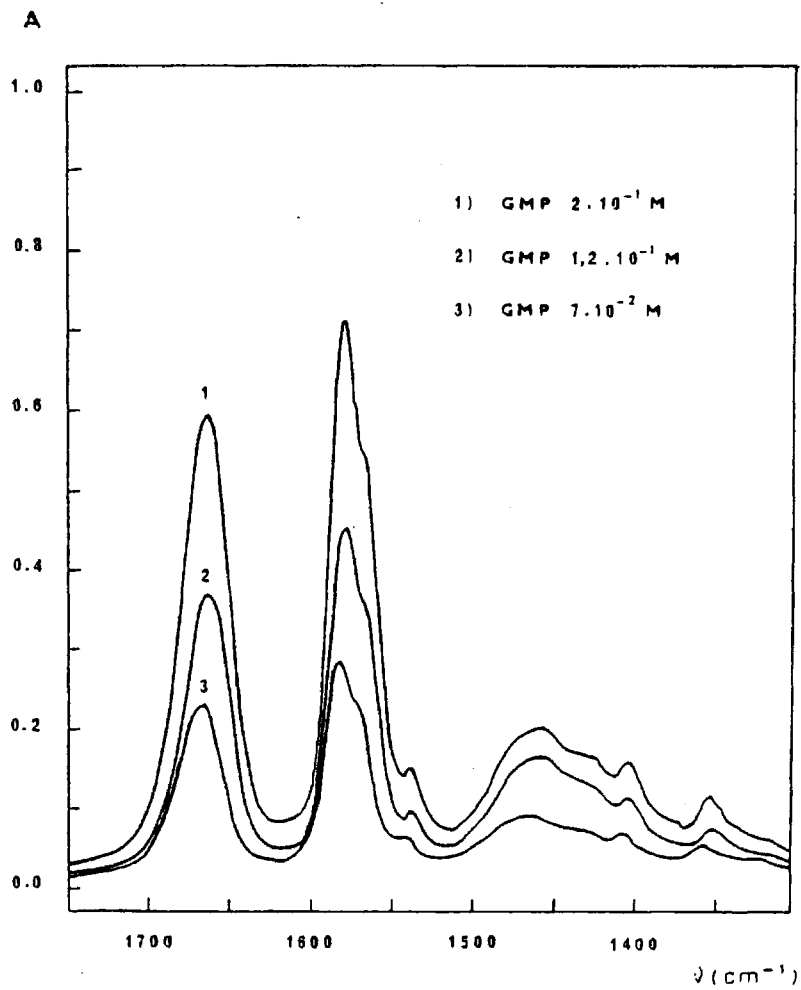


Fig. 5.2.- Espectros de diferencia calculada de disoluciones de GMP en D<sub>2</sub>O.

la disolución disminuye a medida que aumenta la concentración de soluto. Este efecto hipocrómico afecta a las bandas situadas a 1355, 1405, 1430, 1467, 1538, 1568, 1577 y 1663  $\text{cm}^{-1}$ .

Con el fin de obtener mediciones suficientemente precisas de la variación de la intensidad de estas bandas con la concentración, ha sido necesario recurrir al procedimiento de acumulación de espectros comentado en el apartado anterior. Como ejemplo, en la fig. 5.3. se dan los espectros resultantes de la acumulación de 20 espectros para una disolución  $\sim 10^{-2}\text{M}$  de GMP. Las acumulaciones se han efectuado en grupos de 5 espectros. Puede observarse que, solamente a partir de una acumulación de 5 espectros, la absorbancia de las bandas más intensas del espectro comienza a ser superior a 0,2. Se ha comprobado que la relación lineal entre los valores de absorbancia y el número de acumulaciones (fig. 5.4.), se encuentra dentro de los límites de precisión de la medida de absorbancias.

La asignación de bandas de este tipo de compuestos, en disolución acuosa, se encuentra actualmente en estudio (7). Sin embargo, la asignación de la banda de tensión del enlace C=O parece establecida con cierto grado de certidumbre (5-7). Por ello, y teniendo en cuenta que el grupo carbonilo interviene en la formación de enlaces de hidrógeno, hemos centrado nuestro estudio previo en dicha banda, que en el GMP aparece a 1663  $\text{cm}^{-1}$  (13). En la tabla 5.1. se dan los valores de absorptividad molar en el máximo de esta banda, correspondientes a las diferentes disoluciones de GMP estudiadas.

Partiendo de la hipótesis de que el efecto hipocrómico de esta banda (fig. 5.5.) se debe a la autoasociación del nucleótido, he-

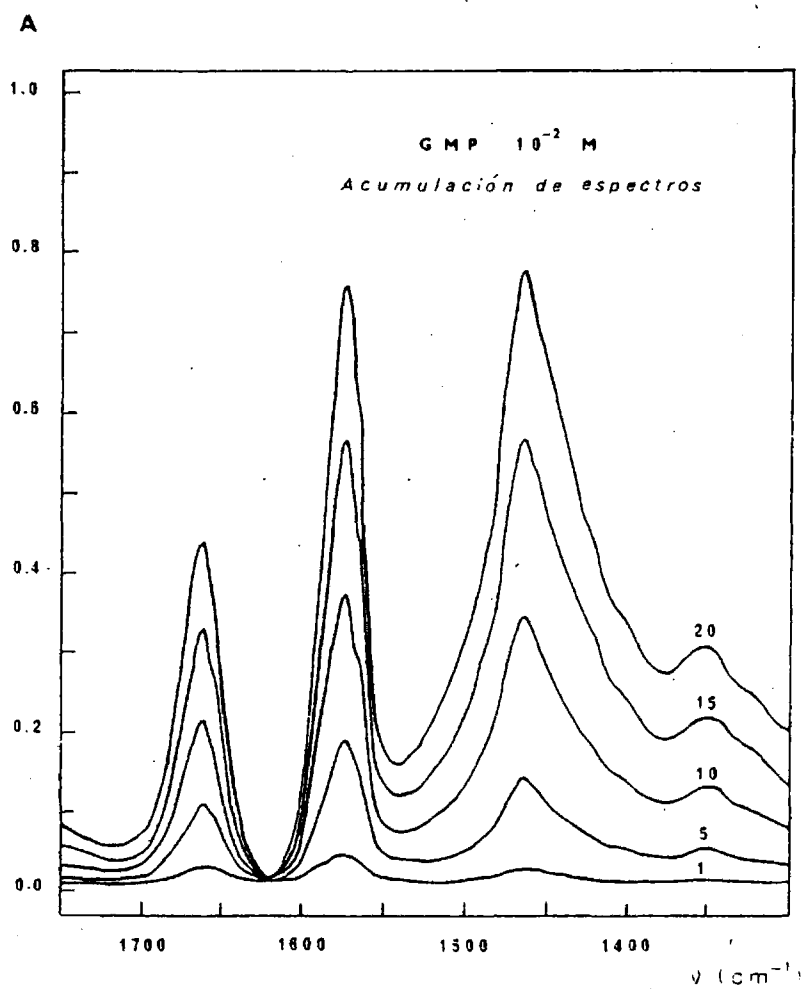


Fig. 5.3.- Acumulación de espectros de diferencia calculada de una disolución  $10^{-2}$  M de GMP en  $\text{D}_2\text{O}$ .

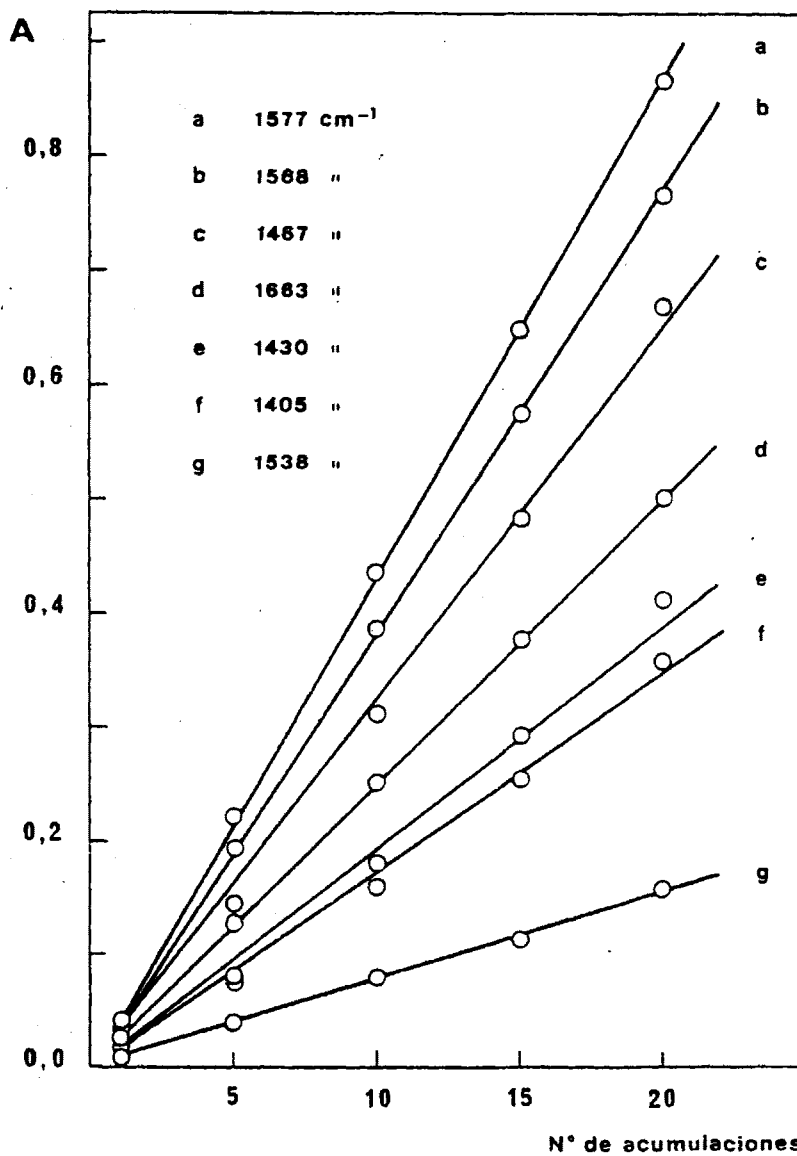


Fig. 5.4.- Relación lineal entre los valores de absorbancia y el número de acumulaciones, para diferentes bandas del espectro de una disolución  $10^{-2}$  M de GMP en  $D_2O$ .

TABLA 5.1.

Absortividad molar de 5'-GMP en D<sub>2</sub>O ( $\nu_m=1663 \text{ cm}^{-1}$ )

c (mol/l)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$ (l/mol.cm)
$5,00 \cdot 10^{-3}$	1,60
$1,20 \cdot 10^{-2}$	1,52
$2,00 \cdot 10^{-2}$	1,48
$3,08 \cdot 10^{-2}$	1,39
$7,00 \cdot 10^{-2}$	1,38
$1,20 \cdot 10^{-1}$	1,33
$1,60 \cdot 10^{-1}$	1,31
$2,00 \cdot 10^{-1}$	1,30

mos aplicado nuestro programa de cálculo de parámetros de autoasociación a los valores experimentales ( $\epsilon, c$ ) dados en la tabla 5.1., obteniendo los resultados:

$$K_p = 230.$$

$$\delta_p = 660$$

$$h = 35,2\%$$

Es realmente significativo el hecho de que el valor de la constante de autoasociación sea del mismo orden que el obtenido por espectroscopía UV para el máximo de la banda de absorción a 252 nm, en este mismo intervalo de concentraciones ( $K_p=400$ , v. pág. 45). Esta concordancia podría interpretarse en el sentido de que los procesos que dan lugar a los efectos hipocrómicos detectados en los espectros UV e IR del GMP son, fundamentalmente, de la misma naturaleza.

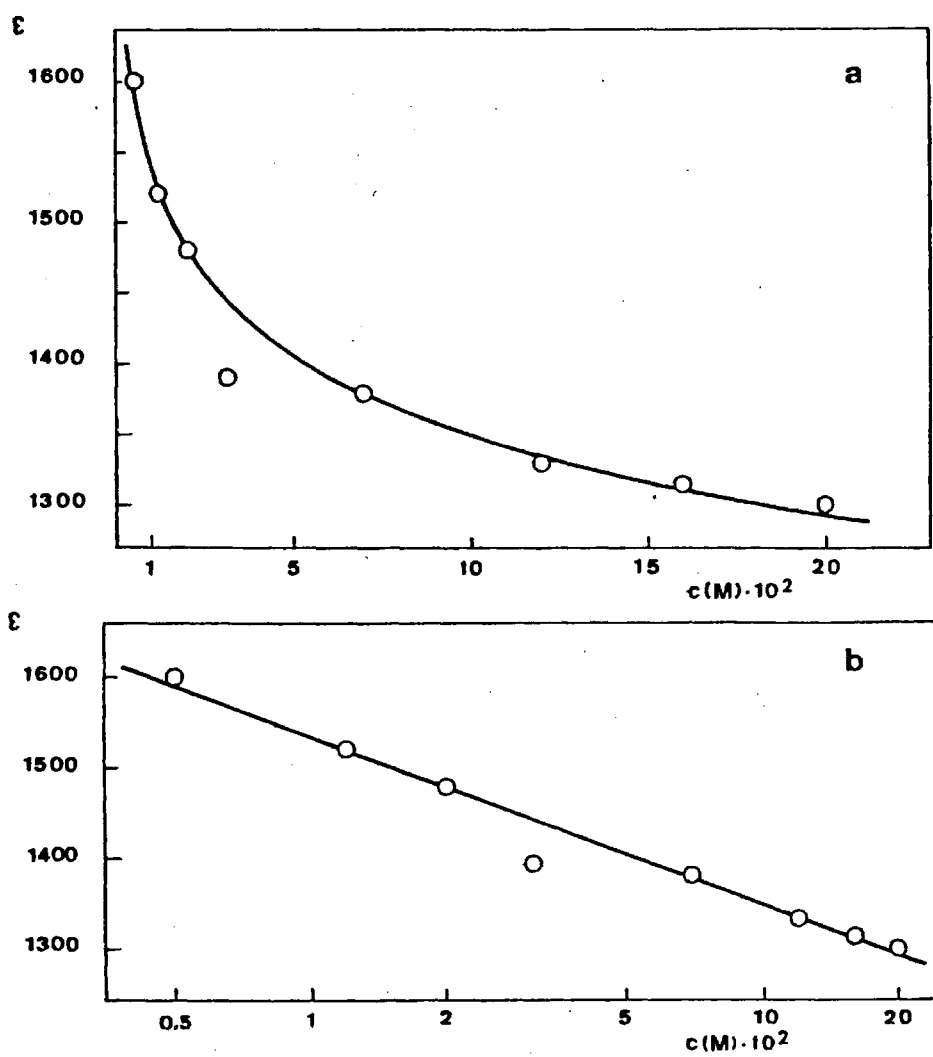


Fig. 5.5.4 Absortividad molar de la banda a  $1663 \text{ cm}^{-1}$  de disoluciones de GMP en  $\text{D}_2\text{O}$ . a) Representación lineal. b) Representación semilogarítmica.

Sin embargo, hemos de señalar la conveniencia de aumentar el número de puntos experimentales en este intervalo, especialmente a concentraciones bajas, para obtener el valor de la constante de auto-asociación con el menor error posible, ya que el método de cálculo utilizado por nosotros se basa en la extrapolación del valor de absorptividad molar a concentración nula, y por tanto, la precisión de los resultados finales depende del rigor con que se efectúe dicha extrapolación.

Dada la gran importancia que tiene el poder llevar a cabo un estudio sistemático del doble efecto hipocrómico, análogo al realizado por espectroscopía UV, es necesario ampliar el intervalo de concentraciones. Para ello, debe mejorarse la relación señal/ruido en los espectros experimentales, mediante una elección adecuada de las variables de operación del instrumento, con el fin de aumentar el número de acumulaciones hasta un límite que permita ampliar el intervalo de concentraciones hasta la zona del 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico, que, como comentamos en el cap. 1, se detecta en los espectros UV a concentraciones inferiores a  $5 \cdot 10^{-3} M$ . Hemos iniciado los ensayos necesarios para mejorar, en este sentido, la técnica experimental, que aplicaremos al estudio de disoluciones en este intervalo de concentraciones bajas.

Finalmente, consideramos imprescindible subrayar que, para interpretar con rigor los resultados de este estudio comparativo por espectroscopía UV e IR, hay que tener presente, además de las consideraciones expuestas, que las disoluciones "acuosas" para el estudio por IR, son disoluciones en  $D_2O$  y no en  $H_2O$ , como las empleadas en UV. Por ello, hemos iniciado el estudio de las variaciones espectrales debidas

al intercambio isotópico que puede tener lugar entre soluto y disolvente en los diversos sistemas investigados.

### 5.1.3. Autoasociación de 5'-CMP

Se ha realizado una experiencia para el estudio de la autoasociación de 5'-CMP en D<sub>2</sub>O, análoga a la descrita para el 5'-GMP. En la fig. 5.6. se representan los espectros de diferencia calculada de varias disoluciones de CMP. Las bandas más intensas son las situadas a 1460, 1503, 1522, 1614 y 1651 cm<sup>-1</sup>. Con objeto de hacer un estudio comparativo de la autoasociación de GMP y CMP, se ha medido la absorptividad molar de la banda de tensión del enlace C=O, a 1651 cm<sup>-1</sup> (14). En la tabla 5.2. se dan los valores de absorptividad molar en el máximo de esta banda, correspondientes a las diferentes disoluciones de CMP estudiadas.

TABLA 5.2.

Absorptividad molar de 5'-CMP en D<sub>2</sub>O ( $\nu_m=1651 \text{ cm}^{-1}$ )

$c(\text{mol/l})$	$\epsilon \cdot 10^{-3} (\text{l/mol.cm})$
$2,73 \cdot 10^{-3}$	1,56
$5,17 \cdot 10^{-3}$	1,43
$7,60 \cdot 10^{-3}$	1,53
$1,20 \cdot 10^{-2}$	1,41
$3,02 \cdot 10^{-2}$	1,39
$7,70 \cdot 10^{-2}$	1,43
$1,20 \cdot 10^{-1}$	1,47
$2,02 \cdot 10^{-1}$	1,45

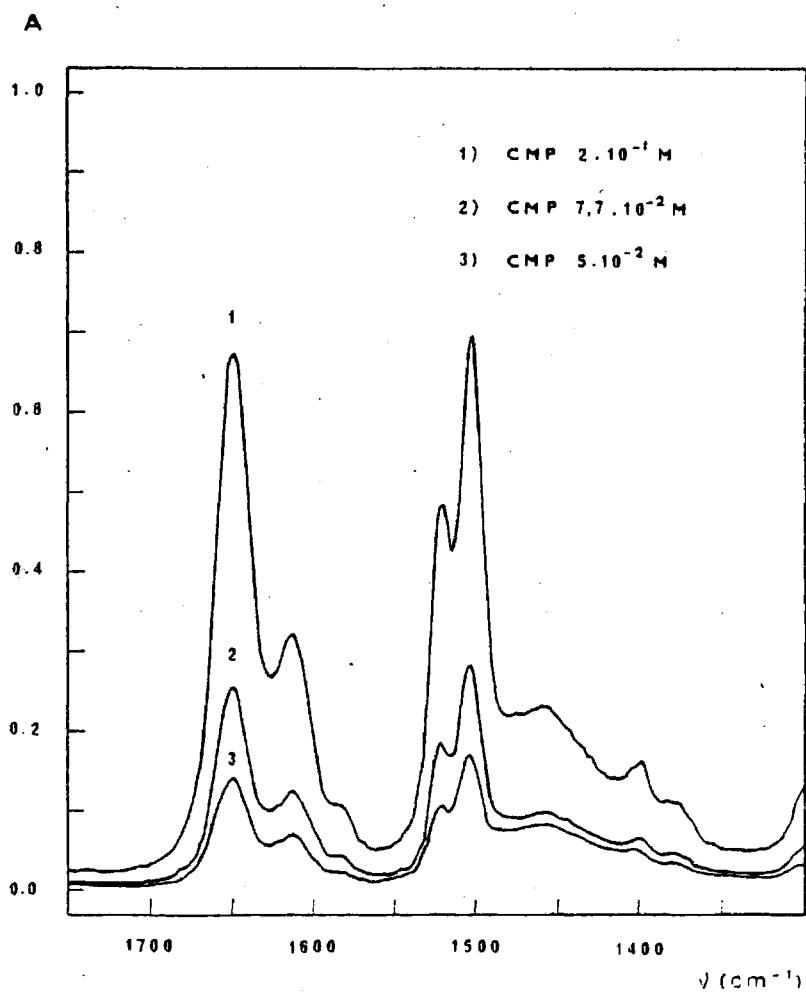


Fig. 5.6.- Espectros de diferencia calculada de disoluciones de CMP en D<sub>2</sub>O.

Como puede verse en esta tabla, la absorptividad molar permanece prácticamente constante al aumentar la concentración, al contrario de lo observado en el GMP. Este resultado es concordante con el obtenido por espectroscopía UV para el máximo de la banda de absorción del CMP a 271 nm, en este mismo intervalo de concentraciones (fig. 1.14.), que indica que, a diferencia de los otros nucleótidos estudiados por nosotros (v. tabla 1.4.), el CMP no presenta 2° efecto hipocrómico.

#### 5.1.4. Autoasociación de Adenosina

Con objeto de comprobar si el efecto hipocrómico detectado por espectroscopía IR en disoluciones de GMP, se presenta también en los nucleósidos, hemos aplicado el método experimental descrito anteriormente a una serie de trece disoluciones, en D<sub>2</sub>O, de adenosina. El intervalo de concentraciones utilizado ha sido  $\sim 10^{-3}$ - $4 \cdot 10^{-2}$ M.

La fig. 5.7. muestra los espectros de diferencia calculada correspondientes a tres disoluciones distintas de adenosina. Del conjunto de bandas situadas a 1460, 1489, 1577 y 1625 cm<sup>-1</sup>, hemos elegido para este estudio la banda más intensa, a 1625 cm<sup>-1</sup>, que ha sido asignada a una vibración de anillo en la que predomina la tensión C=N (15). Esta elección está justificada, en principio, porque si el mecanismo de asociación es por apilamiento, estará condicionado fundamentalmente, como ya ha sido comentado, por las interacciones de los anillos de las bases, y en consecuencia, la variación de absorptividad molar de una de las bandas características de éstos puede constituir una medida de la interacción.

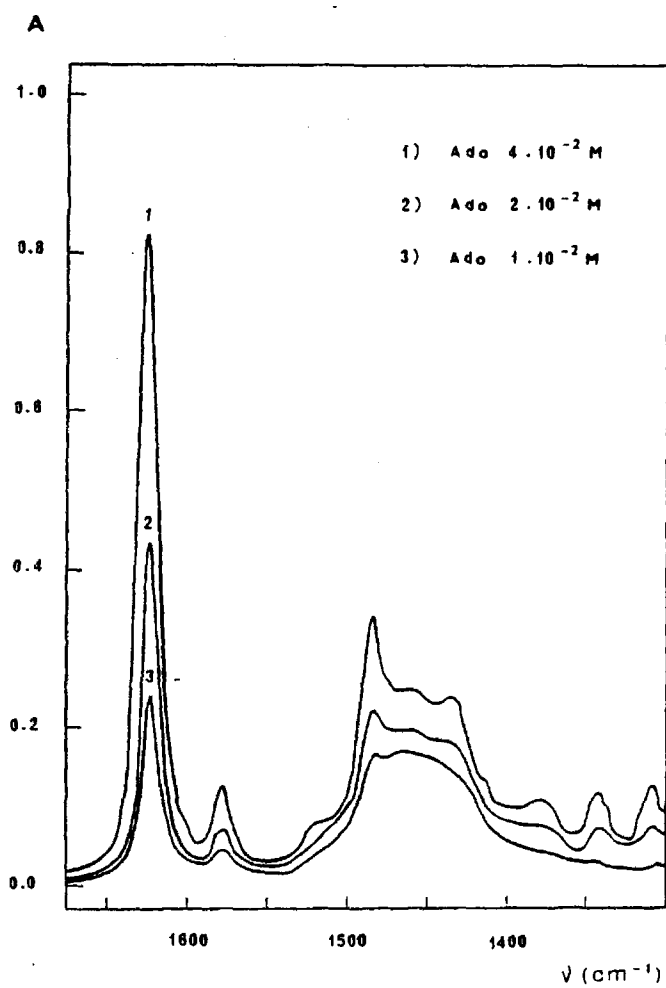


Fig. 5.7.- Espectros de diferencia calculada de disoluciones de Adenosina en D<sub>2</sub>O (5 acumulaciones).

Los valores de absorptividad molar en el máximo de la banda a  $1625\text{ cm}^{-1}$ , ponen de manifiesto la existencia de un efecto hipocrómico al aumentar la concentración (tabla 5.3.). Al representar gráficamente los puntos experimentales ( $\epsilon, c$ ) de la tabla 5.3. (fig. 5.8.), se observa que estos puntos pueden ajustarse a dos rectas de pendiente muy distinta, cuya intersección se produce, aproximadamente, a la concentración  $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ .

Este resultado es comparable al obtenido por espectroscopía UV, que revela la existencia de dos efectos hipocrómicos consecutivos, cuya separación tiene lugar en esta misma zona de concentraciones

TABLA 5.3.

Absorptividad molar de Adenosina en  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\nu_m = 1625\text{ cm}^{-1}$ )

$c(\text{mol/l})$	$\epsilon \cdot 10^{-3} (\text{l/mol.cm})$
$1,30 \cdot 10^{-3}$	2,78
$1,50 \cdot 10^{-3}$	2,50
$1,70 \cdot 10^{-3}$	2,41
$2,60 \cdot 10^{-3}$	2,04
$3,00 \cdot 10^{-3}$	2,08
$3,40 \cdot 10^{-3}$	1,97
$4,00 \cdot 10^{-3}$	2,03
$5,20 \cdot 10^{-3}$	1,95
$8,00 \cdot 10^{-3}$	1,99
$1,00 \cdot 10^{-2}$	1,93
$2,00 \cdot 10^{-2}$	1,80
$2,40 \cdot 10^{-2}$	1,85
$4,00 \cdot 10^{-2}$	1,73

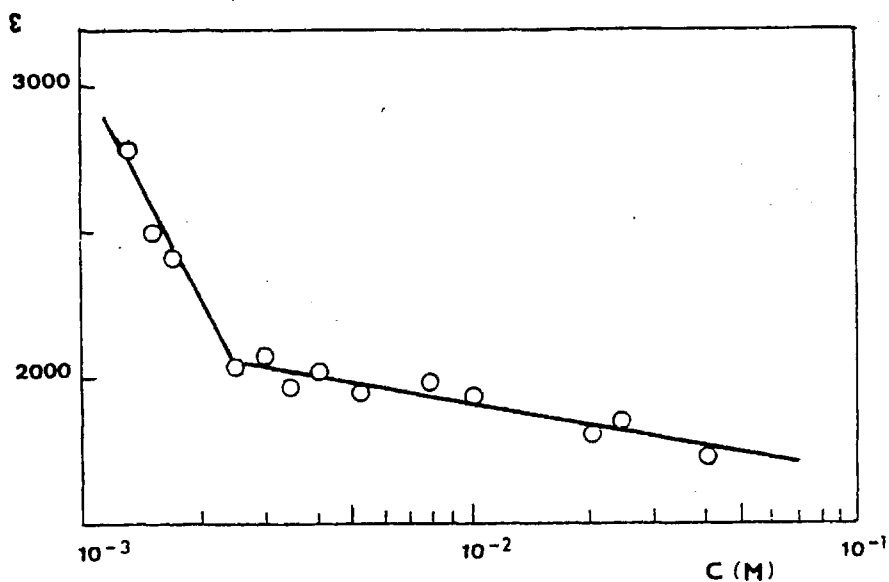


Fig. 5.8.- Absortividad molar de la banda a  $1625\text{ cm}^{-1}$  de disoluciones de Adenosina en  $\text{D}_2\text{O}$ .

(fig. 1.6.), y constituye, por tanto, una confirmación del doble efecto hipocrómico, detectado por nosotros, por primera vez, por espectros copía UV. Sin embargo, al aplicar el método de cálculo de parámetros de asociación a los datos de IR, no ha sido posible obtener convergencia en la extrapolación del valor de  $\epsilon_1$ , debido al aumento tan brusco de la pendiente en la zona de concentraciones bajas, al escaso número de puntos experimentales en dicha zona y a la imposibilidad práctica de obtener valores precisos correspondientes a disoluciones aún más diluidas, tal como se ha efectuado en las experiencias mediante espectros copía UV.

Mejorando las condiciones de operación del espectrógrafo,

esperamos subsanar estas dificultades y lograr con ello una extrapolación idónea del valor de  $\epsilon_1$ , que permitirá obtener las constantes de asociación correspondientes a ambos efectos y su subsiguiente comparación con las obtenidas por espectroscopía UV.

## 5.2. HETEROASOCIACION EN D<sub>2</sub>O

La aplicación de la espectroscopía IR para la investigación de las interacciones moleculares de unidades monoméricas de ácidos nucleicos, se basa, fundamentalmente, en la posibilidad de detectar variaciones de intensidad y desplazamientos de determinadas bandas cuando tiene lugar un fenómeno de heteroasociación, en el cual se forman pares de bases complementarias, unidas por enlace de hidrógeno (5).

Para estimar las posibilidades que ofrece la espectroscopía IR de disoluciones acuosas en la investigación de este fenómeno, hemos realizado un estudio previo de la heteroasociación de GMP y CMP en D<sub>2</sub>O. Estos compuestos se han elegido intencionadamente, por estimarse que son especialmente favorables para detectar la heteroasociación, ya que son capaces de formar entre sí tres enlaces de hidrógeno, y su solubilidad en agua es lo suficientemente elevada para permitir el estudio de disoluciones relativamente concentradas.

### 5.2.1. Heteroasociación de 5'-GMP y 5'-CMP

El método más directo para poner de manifiesto la existencia de posibles interacciones de heteroasociación, es la comparación entre los espectros experimentales de mezclas equimoleculares de los nucleótidos de bases complementarias y la suma de los espectros de las disoluciones de cada uno de estos nucleótidos, a la misma concentración que en la mezcla.

En la fig. 5.9. se representan el espectro experimental de la disolución en D<sub>2</sub>O de una mezcla equimolecular de 5'-GMP y 5'-CMP

(cada uno de ellos a la concentración de  $1,2 \cdot 10^{-1} M$ ), y la suma, calculada mediante el ordenador, de los espectros de ambos compuestos, a esa misma concentración.

Las diferencias que se observan entre los espectros experimental y calculado de la mezcla, se deben únicamente a la existencia de un proceso de heteroasociación, ya que el espectro calculado corresponde al estado de autoasociación de ambos componentes, a esa concentración; es decir, en los espectros de las disoluciones aisladas que se han utilizado para calcular el espectro suma, está contenido el efecto del posible fenómeno de autoasociación de cada uno de los nucleótidos. En el espectro experimental de la mezcla existe un efecto hipocrómico, respecto al espectro calculado, en las bandas a 1655, 1525, 1505, 1462, 1405, 1355 y  $1295 \text{ cm}^{-1}$ , que puede atribuirse a la interacción entre GMP y CMP y que ofrece, en principio, la posibilidad de estudiar cuantitativamente la heteroasociación de unidades monoméricas complementarias.

Merece destacarse el hecho de que las concentraciones de GMP y CMP utilizadas en esta experiencia, son mayores que las empleadas en las experiencias realizadas por espectroscopía UV, debido a que la intensidad de las bandas de absorción en IR es menor que en UV. Por tanto, es posible que el efecto observado en IR no sea accesible a la observación por UV.

Es de gran importancia señalar el hecho de que el efecto hipocrómico se observa en algunas bandas de absorción, pero no en todas. Por tanto, las variaciones espectrales observadas permitirán, previa asignación de las bandas implicadas en la heteroasociación, obte-

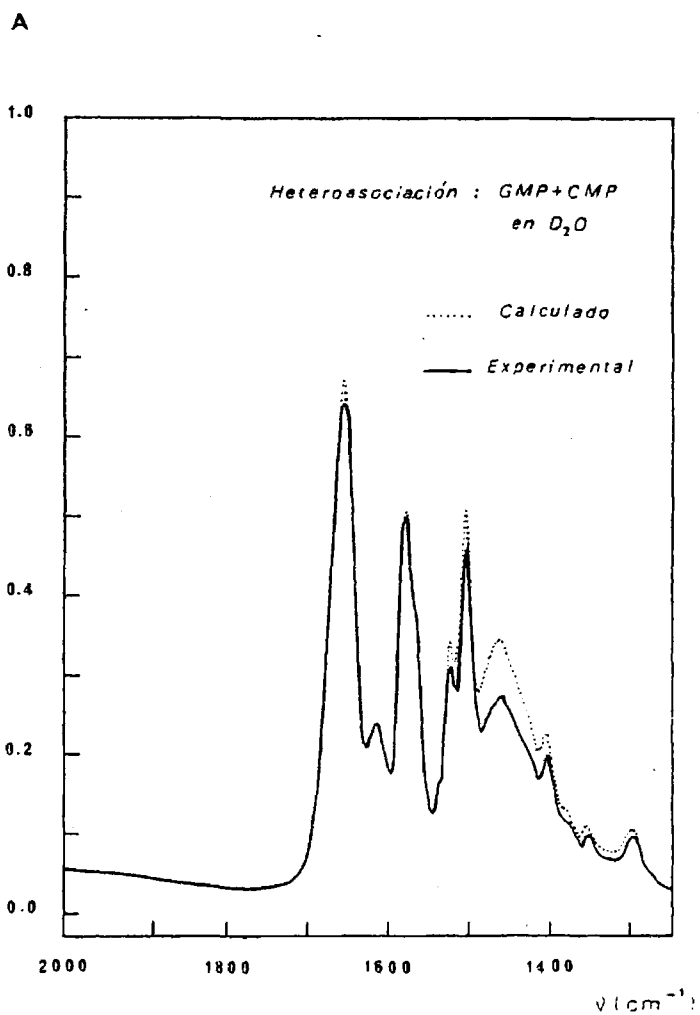


Fig. 5.9.- Espectros experimental y calculado de una mezcla de GMP y CMP, cada uno de ellos  $1,2 \cdot 10^{-1}$  M, en D<sub>2</sub>O.

ner conclusiones para postular un modelo de heteroasociación en disolución acuosa.

De acuerdo con los argumentos expuestos, son evidentes las ventajas que presenta la espectroscopía IR respecto de la espectroscopía UV, para profundizar en el estudio del mecanismo de heteroasociación, cuyo desarrollo será objeto de una investigación ulterior.

Conclusiones generales acerca del estudio por espectroscopía IR de la autoasociación y heteroasociación de unidades monoméricas en disolución acuosa

- 1) Para el estudio, mediante espectroscopía IR, de las interacciones intermoleculares de autoasociación y heteroasociación de unidades monoméricas de ácidos nucleicos, en disolución acuosa, se ha aplicado el mismo método que hemos utilizado para espectroscopía UV, ya que las bandas de absorción IR de las disoluciones acuosas de estos compuestos, presentan un efecto hipocrómico comparable al detectado por UV.
- 2) El valor de la constante de autoasociación del nucleótido 5'-GMP en D<sub>2</sub>O, en el intervalo de concentraciones de  $5 \cdot 10^{-3}$  a  $2 \cdot 10^{-1}$  M ( $K_p=230$ ), es del mismo orden de magnitud que el obtenido por espectroscopía UV, para este compuesto, en el mismo intervalo de concentraciones. Esta concordancia se interpreta en el sentido de que los

procesos que dan lugar a los efectos hipocrómicos detectados en los espectros UV e IR del GMP, en la región de concentraciones correspondiente al 2° efecto hipocrómico, son, fundamentalmente, de la misma naturaleza.

- 3) El estudio de la autoasociación de 5'-CMP en D<sub>2</sub>O revela que, en el intervalo de concentraciones utilizado, de  $2,7 \cdot 10^{-3}$  a  $2,0 \cdot 10^{-1}$ M, la absorptividad molar permanece prácticamente constante al aumentar la concentración. Este resultado es concordante con el obtenido por espectroscopía UV, en este mismo intervalo de concentraciones, que revela que el CMP no presenta 2° efecto hipocrómico.
- 4) Los espectros IR de las disoluciones de adenosina en D<sub>2</sub>O, en el intervalo de concentraciones de  $1,3 \cdot 10^{-3}$  a  $4 \cdot 10^{-2}$ M, ponen de manifiesto la existencia de un doble efecto hipocrómico al aumentar la concentración, cuyo punto de transición corresponde a una concentración de  $2 \cdot 10^{-3}$ M. Este resultado constituye una confirmación del doble efecto hipocrómico, detectado por nosotros, por primera vez, por espectroscopía UV.
- 5) Los resultados del estudio por espectroscopía IR de la autoasociación en D<sub>2</sub>O de 5'-GMP, 5'-CMP y adenosina, confirman los principales resultados obtenidos por espectroscopía UV acerca de la autoasociación de estas

unidades monoméricas en disolución acuosa.

- 6) El espectro IR de la mezcla de los nucleótidos 5'-GMP y 5'-CMP, pone de manifiesto la existencia de un efecto hipocrómico en 7 bandas de absorción, que puede atribuirse a la interacción por heteroasociación entre ambos compuestos y que ofrece, por tanto, la posibilidad de estudiar cuantitativamente la heteroasociación de las unidades monoméricas complementarias por espectroscopía IR.

6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

### RESUMEN

Se ha realizado un estudio, por espectroscopía ultravioleta e infrarroja, en disolución acuosa, de las interacciones inter- e intramoleculares de diversos componentes de ácidos nucleicos.

En el desarrollo de este trabajo, se ha seguido un orden lógico de aproximación a la estructura de los ácidos nucleicos. Se han estudiado, en primer lugar, por espectroscopía UV, las interacciones moleculares de autoasociación de 16 unidades monoméricas: nucleobases (adenina, guanina, citosina, uracilo y timina), nucleósidos (adenosina desoxiadenosina, guanosina, citidina, uridina y timidina) y nucleótidos (5'-AMP, 5'-GMP, 5'-CMP, 5'-UMP y 5'-TMP).

Siguiendo el orden creciente de complejidad estructural de los compuestos que hemos designado genéricamente con la expresión "componentes de ácidos nucleicos", se ha realizado un estudio, de carácter análogo al de las unidades monoméricas, de los siguientes sistemas:

1°) Dinucleósidos-monofosfato, ApA y UpU, que son las más pequeñas unidades estructurales que contienen el enlace fosfodiéster 3' 5', y por consiguiente, constituyen los "oligonucleótidos" más sencillos que pueden utilizarse como modelos para el estudio de los ácidos nucleicos y polinucleótidos.

2°) Ácidos oligoriboadenílicos: A(pA)<sub>2</sub>, A(pA)<sub>3</sub>, y A(pA)<sub>4</sub>, y Ácidos oligoribouridílicos: U(pU)<sub>2</sub>, U(pU)<sub>3</sub>, y U(pU)<sub>4</sub>.

3°) Ácido poliriboadenílico (poli A), en forma de hélice simple y de doble hélice, y Ácido poliribouridílico (poli U).

El fenómeno fundamental en el que se basa todo el estudio experimental realizado, es el efecto hipocrómico que presentan las bandas de absorción características de estos compuestos. Este efecto hipocrómico se ha atribuido, de acuerdo con los estudios teóricos realizados por otros autores, a la interacción de las bases para dar lugar a una estructura ordenada. Partiendo de esta hipótesis básica, se ha llevado a cabo el análisis numérico de los resultados experimentales, y se han determinado los principales parámetros de autoasociación de los sistemas mencionados, utilizando un método de cálculo adecuado para el tratamiento de los fenómenos de asociación, que tienen lugar según un proceso de multiequilibrio.

El objetivo final de este trabajo es tratar de precisar la naturaleza de las fuerzas intermoleculares que se ponen en juego en las interacciones de los "componentes" de los ácidos nucleicos. Para ello, se han elegido los sistemas más idóneos según los criterios que se acaban de citar, y se han establecido las condiciones experimentales más adecuadas para poner de manifiesto los diversos factores que contribuyen, en cada caso, a la energía total de interacción. En consecuencia, se ha dedicado especial atención a la influencia que, sobre los procesos de interacción, tienen diversos cambios inducidos en el medio, como la naturaleza del disolvente, los iones presentes en disolución, los agentes desnaturalizantes, el pH y la temperatura.

Si bien el estudio fundamental se ha realizado por espectroscopía UV, debido a las ventajas que tiene esta técnica en investigaciones de carácter cuantitativo, se ha efectuado también un estudio

complementario, por espectroscopía IR, de la interacción de las unidades monoméricas en disolución acuosa, con objeto de valorar las posibilidades de esta técnica en el estudio de la autoasociación y heteroasociación.

Las conclusiones de alcance más general logradas en este trabajo son las siguientes:

1) La detección e interpretación de un doble efecto hipocrómico en un intervalo de concentraciones de cinco órdenes de magnitud, como ampliación del trabajo realizado previamente en este Laboratorio. Consideramos que esta aportación puede ser de gran importancia en el área de investigación de las interacciones moleculares.

2) La consecución de una evidencia experimental que ha permitido cuantificar, dentro de ciertos límites, la importante contribución de las fuerzas hidrofóbicas en el proceso de asociación de los componentes de ácidos nucleicos.

3) La confirmación experimental de que el estudio de los componentes más simples de los ácidos nucleicos, proporciona una información valiosa para la comprensión de los principios fundamentales que gobiernan las propiedades de estos biopolímeros.

### CONCLUSIONES

1) Los espectros UV de nucleobases, nucleósidos y nucleótidos, en disolución acuosa, en el intervalo de concentraciones de  $\sim 10^{-6}$  a  $\sim 10^{-1}$ M, revelan una desviación de la ley de Lambert-Beer, de carácter hipocrómico, cuyo origen se atribuye a la autoasociación de estos compuestos.

2) Se ha puesto de manifiesto la existencia de un doble efecto hipocrómico; un primer efecto en disoluciones diluídas ( $c < 10^{-3}$ M) y un segundo efecto en disoluciones concentradas ( $c > 10^{-3}$ M) de los siguientes compuestos: adenina, adenosina, desoxiadenosina, guanosina, citidina, uridina, 5'-AMP, 5'-GMP, 5'-UMP y 5'-TMP.

El doble efecto hipocrómico se interpreta en función de un multiequilibrio de asociación, en el que el 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico corresponde a la formación de dímeros, caracterizado por una constante de asociación  $K_2$ , y el 2° efecto, a la formación de polímeros, en los que las constantes de asociación correspondientes a los sucesivos grados de polimerización, son menores que  $K_2$ .

3) Utilizando el método de cálculo, desarrollado previamente en este Laboratorio, para la determinación de los parámetros de autoasociación de unidades monoméricas de ácidos nucleicos, se han obtenido los valores que se indican en la tabla 1.4. (página 45).

4) Se ha hecho una estimación de los diversos factores que contribuyen a la energía total de la interacción de autoasociación,

utilizando la aproximación de dipolo, de DeVoe y Tinoco, para el tratamiento teórico del hipocromismo. La interpretación de los valores obtenidos permite establecer la conclusión de que las interacciones hidrofóbicas desempeñan un papel fundamental en el proceso de autoasociación.

5) Se ha realizado un estudio detallado de la influencia que sobre la autoasociación ejercen la naturaleza del disolvente (agua, etanol y dimetilsulfóxido), los iones presentes en la disolución (cloruros, sulfatos y percloratos), el pH y la urea.

Los resultados experimentales ponen de manifiesto que los mecanismos de asociación responsables de cada uno de los dos efectos hipocrómicos observados, no son de la misma naturaleza. Del análisis conjunto de los resultados obtenidos en este trabajo se deduce que la autoasociación de unidades monoméricas en disolución acuosa está condicionada, fundamentalmente, por un mecanismo de apilamiento, si bien algunos de los resultados experimentales son compatibles con la hipótesis de que el 1<sup>er</sup> efecto hipocrómico se debe a la formación de enlaces de hidrógeno entre las bases.

6) Se han determinado los parámetros termodinámicos de autoasociación de adenina, adenosina y 5'-AMP, en el intervalo de 5°C a 25°C, cuyos valores, para cada uno de los dos efectos hipocrómicos, son los siguientes:

	<u>1<sup>er</sup> efecto</u>		<u>2<sup>o</sup> efecto</u>	
	$\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$\Delta S^\circ$ (cal/mol K)	$\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$\Delta S^\circ$ (cal/mol K)
Adenina	+ 5,7	+38	+ 6,5	+33
Adenosina	+ 9,6	+51	+ 4,4	+24
5'-AMP	+19,5	+87	+11,2	+51

El signo y la magnitud de los valores obtenidos para  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$  revelan que la asociación de estas unidades monoméricas, en medio acuoso, se debe principalmente a la contribución entrópica, tanto en el 1° como en el 2° efecto hipocrómico, y en consecuencia, estos resultados son consistentes con la hipótesis de que las interacciones hidrofóbicas deben ser el factor condicionante de la asociación.

7) Los espectros UV de los dinucleósidos-monofosfato ApA y UpU, en disolución acuosa, ponen de manifiesto la existencia de un doble efecto hipocrómico, análogo al descrito para las unidades monoméricas.

8) Los parámetros de autoasociación de los dinucleósidos-monofosfato pueden predecirse a partir de los parámetros de autoasociación de las unidades monoméricas correspondientes. Esta conclusión se puede generalizar en el sentido de que el estudio de las unidades monoméricas proporciona una información que es directamente aplicable a la predicción de la estructura y comportamiento de componentes de ácidos nucleicos de mayor grado de complejidad.

9) Los espectros UV de los dinucleósidos-fosfato revelan la

existencia de una hipocromicidad adicional respecto de sus unidades monoméricas constituyentes. La interpretación global de este hecho es consistente con la hipótesis de que el enlace fosfodiéster 3'-5' da lugar a un mayor grado de ordenación de las bases.

Este resultado es especialmente significativo, porque constituye, dentro de ciertos límites, una evidencia experimental de que, con este enlace, se inicia ya a nivel de los dinucleósidos-fosfato, la estructura helicoidal característica de los polinucleótidos.

10) Se han determinado las magnitudes termodinámicas aparentes de apilamiento intramolecular de ApA y de UpU, a partir de sus curvas de fusión, obteniéndose los valores  $\Delta H^\circ = -9,4$  kcal/mol y  $\Delta S^\circ = -33$  cal/mol K, para el ApA, y  $\Delta H^\circ = -4,6$  kcal/mol y  $\Delta S^\circ = -14$  cal/mol K, para el UpU.

Estos resultados indican que la interacción intramolecular de apilamiento en estos dímeros se debe, principalmente, a la contribución entálpica, en contraposición a las interacciones intermoleculares de las unidades monoméricas, que están condicionadas por el término entrópico.

11) Se ha demostrado experimentalmente, por primera vez, la existencia de procesos de heteroasociación en los sistemas UpU.adenosina, ApA.uridina y ApA.UpU.

12) La variación con la concentración de la absorptividad molar de los ácidos oligoriboadenilícos y oligoribouridilícos, es análoga a la que puede predecirse a partir de sus unidades monoméricas con

tituyentes. En ambas series de oligonucleótidos, se presenta un efecto hipocrómico adicional, análogo al observado en los dinucleósidos-fosfato, que puede interpretarse en función del mayor grado de ordenación a que da lugar el enlace covalente 3'-5' fosfodiéster.

13) El grado de ordenación de las bases en los oligonucleótidos aumenta al aumentar la longitud de la cadena, alcanzándose un límite máximo de ordenación para una longitud de cadena del orden de 10 nucleótidos.

14) Se han determinado las magnitudes termodinámicas aparentes,  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$ , de apilamiento intramolecular de los ácidos oligoribonucleicos y del polinucleótido poli A, a partir de sus curvas de fusión. Los resultados obtenidos son del mismo signo que los del dímero ApA, si bien su magnitud aumenta gradualmente, en una cantidad aproximadamente constante, al aumentar la longitud de la cadena.

15) El poli A, en la conformación de hélice simple, presenta una hipocromicidad mayor que la de sus unidades monoméricas y correspondientes oligonucleótidos. Este hecho confirma que el esqueleto ribosa-fosfato favorece el apilamiento de las bases, como ya se había puesto de manifiesto en el dímero y en los oligómeros.

16) La transición conformacional correspondiente a la fusión del poli A a pH ácido, revela que la formación de la doble hélice da lugar a un aumento de la hipocromicidad del orden del 11%, como consecuencia de la formación de los enlaces intercatenarios correspondientes.

17) El valor de la absorptividad molar de las disoluciones del poli A permanece invariable al aumentar la concentración de este poli nucleótido. Por el contrario, la absorptividad molar de las disoluciones de poli U, disminuye gradualmente al aumentar la concentración, de una manera análoga a la observada en las unidades monoméricas. Esta diferencia de comportamiento es consistente con las diferencias estructurales postuladas para ambos polinucleótidos.

18) Los espectros IR de las disoluciones de 5'-GMP y adenosina, revelan que algunas de las bandas de absorción características de estos compuestos, presentan un efecto hipocrómico comparable al detectado por UV.

19) El valor de la constante de autoasociación del nucleótido 5'-GMP, en D<sub>2</sub>O, en el intervalo de concentraciones correspondiente al 2° efecto hipocrómico, es del mismo orden de magnitud que el obtenido por espectroscopía UV. El nucleótido 5'-CMP no presenta efecto hipocrómico en este intervalo de concentraciones, análogamente a lo observado en UV.

20) Los espectros IR de las disoluciones de adenosina en D<sub>2</sub>O, ponen de manifiesto la existencia de un doble efecto hipocrómico, que confirma el resultado obtenido en este Laboratorio por espectroscopía UV.

21) Se ha detectado la existencia de un efecto hipocrómico en diversas bandas de absorción del espectro IR correspondiente a la

mezcla de sendas disoluciones de 5'-GMP y 5'-CMP. Este hecho, que pone de manifiesto una interacción de heteroasociación, ofrece la posibilidad de realizar el estudio cuantitativo de la heteroasociación de unidades monoméricas complementarias por espectroscopía IR.

7.- BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA DEL CAPITULO 1.- Autoasociación de bases, nucleósidos y nucleótidos en disolución acuosa. Estudio por espectroscopía UV.

- (1) GALLEGO, E., MORCILLO, J. y RODRIGUEZ DE BODAS, A.; Anales de la Real Academia de Ciencias E.F. y N.. Volumen "Homenaje al Prof. Manuel Lora Tamayo", 637 (1975).
- (2) RODRIGUEZ DE BODAS, A.; Tesis Doctoral, Madrid (1975).
- (3) RODRIGUEZ DE BODAS, A., GALLEGO, E. y MORCILLO, J.; An. Quím., 73, 1085 (1977).
- (4) TS'O, P.O.P., en "Fine Structure of Proteins and Nucleic Acids", ed. Fasman, G.D. y Timasheff, S.N.; Marcel Dekker, N. York (1970), cap. 2.
- (5) LENG, M., DOURLANT, M. y HÉLÈNE, C., en "Physicochemical Properties of Nucleic Acids", vol. 3; Duchesne, J., ed., Academic Press, London (1973), cap. 18.
- (6) TS'O, P.O.P., en "Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry", vol. 1; Ts'o, P.O.P., ed., Academic Press, N. York (1974), cap. 6.
- (7) GUSCHLBAUER, W., "Nucleic Acid Structure", Springer-Verlag, N. York (1976), cap. 6.
- (8) GELLERT, M., LIPSETT, M.N. y DAVIES, D.R.; Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 48, 2013 (1962).
- (9) RASZKA, M. y KAPLAN, N.O.; Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 69, 2025 (1972).
- (10) MURTHY, A.S.N. y RAO, C.N.R., Applied Spectroscopy Reviews, 2, 118 (1968).
- (11) GIBSON, K.S., "Spectrophotometry", Nat. Bur. Standards (U.S.), Circ. 484 (1949).
- (12) EDISBURY, J.R., "Practical Hints on Absorption Spectrometry (Ultra-violet and visible)", Hilger&Watts, London (1966).
- (13) NESBET, R.K.; Biopolymers Symp n°1, 129 (1964).
- (14) TINOCO, I.; J. Am. Chem. Soc., 82, 4785(1960); 83, 5047(1961).

- (15) TINOCO, I.; J. Chem. Phys., 33, 1332(1960); 34, 1067(1961)..
- (16) RHODES, W.; J. Am. Chem. Soc., 83, 3609 (1961).
- (17) BOLTON, H.C. y WEISS, J.J.; Nature, 195, 666 (1962).
- (18) DE VOE, H. y TINOCO, I.; J. Mol. Biol., 4, 500 (1962).
- (19) Ref. (6), pág. 512.
- (20) EDELHOCH, H. y OSBORNE, J.C., en "Advances in Protein Chemistry", vol. 30, Academic Press, London (1976), pág. 215.

BIBLIOGRAFIA DEL CAPITULO 2.- Influencia sobre la autoasociación de  
cambios inducidos en el medio

2.1.- Influencia de la naturaleza del disolvente.

- (1) HELMKAMP, G.K. y TS'O, P.O.P.; J. Am. Chem. Soc., 83, 138 (1961).
- (2) LEVINE, L., GORDON, J.A. y JENCKS, W.P.; Biochemistry, 2, 168 (1963).
- (3) MASSOULIE, J. y MICHELSON, A.M.; Compt. Rend., 259, 2923 (1964).
- (4) SCRUGGS, R.L., ACHTER, E.K. y ROSS, P.D.; Biopolymers, 11, 1961 (1972).
- (5) ALVAREZ, J. y BILTONEN, R.; Biopolymers, 12, 1815 (1973).
- (6) LOWE, M.J. y SCHELLMAN, J.A.; J. Mol. Biol., 65, 91 (1972).
- (7) MAHLER, H.R. y GREEN, G.; Biochemistry, 10, 2200 (1971).
- (8) TRAVERS, F., MICHELSON, A.M. y DOUZOU, P.; Biochim. Biophys. Acta, 217, 1 (1970).
- (9) KYOGOKU, Y., LORD, R.C. y RICH, A.; J. Am. Chem. Soc., 89, 496 (1967).
- (10) MILLER, J.H. y SOBELL, H.M.; J. Mol. Biol., 24, 345 (1967).
- (11) NEWMARK, R.A. y CANTOR, C.R.; J. Am. Chem. Soc., 90, 5010 (1968).
- (12) WANG, S.M. y LI, N.C.; J. Am. Chem. Soc., 90, 5069 (1968).
- (13) D'ALBIS, A., WICKENS, M.P. y GRATZER, W.B.; Biopolymers, 14, 1423 (1975).
- (14) SINANOGLU, O. y ABDULNUR, S.; Photochem. Photobiol., 3, 333 (1964).
- (15) SINANOGLU, O. y ABDULNUR, S.; Fed. Proc., 24(15), S-12 (1965).
- (16) SINANOGLU, O., en "Molecular Associations in Biology", B. Pullman, ed.; Academic Press, N. York (1968), pág. 427.
- (17) TS'O, P.O.P., en "Molecular Associations in Biology", B. Pullman, ed.; Academic Press, N. York (1968), pág. 39.
- (18) TS'O, P.O.P.; Ann. N.Y. Acad. Sci., 153, 785 (1969).
- (19) TS'O, P.O.P., en "Fine Structure of Proteins and Nucleic Acids", ed..

- Fasman, G.D. y Timasheff, S.N.; Marcel Dekker, N. York (1970),  
pág. 49.
- (20) BUNCEL, E. y WILSON, H., en "Advances in Physical Organic Chemistry", vol. 14; Gold, V. y Bethell, D., eds.; Academic Press, London (1977), pág. 133.
- (21) DOUZOU, P., en "Molecular Associations in Biology", B. Pullman, ed.; Academic Press, N. York (1968), pág. 447.
- (22) EDELHOCH, H. y OSBORNE, J.C., en "Advances in Protein Chemistry", vol. 30, Academic Press, London (1976), pág. 234.
- (23) PARKER, A.J.; Chem. Rev., 69, 1 (1969).
- (24) LEWIN, S., "Displacement of water and its control of biochemical reactions", Academic Press, London (1974).
- (25) GRAMSTAD, T.; Spectrochim. Acta, 19, 829 (1963).
- (26) KATZ, L. y PENMAN, S.; J. Mol. Biol., 15, 220 (1966).
- (27) FOX, M.F. y WHITTINGHAM, K.P.; J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1, 71, 1407 (1975).
- (28) BLANDAMER, M.J.; en "Advances in Physical Organic Chemistry", vol. 14, Gold, V. y Bethell, D., eds.; Academic Press, London (1977), pág. 203.

2.2.- Influencia de sales estabilizadoras y desestabilizadoras de la estructura del agua.

- (1) VINOGRADOV, S.N. y LINNELL, R.H.; "Hydrogen Bonding", Van Nostrand (1971), pág. 206.
- (2) EISENBERG, D. y KAUZMANN, W.; "The structure and properties of water"; Oxford University Press, (1969), pág. 150.
- (3) NÉMETHY, G. y SCHERAGA, H.A.; J. Chem. Phys., 36, 3382 (1962).
- (4) POPLE, J.A.; Proc. Roy. Soc. (London), A205, 163 (1951).
- (5) BERNAL, J.D.; Proc. Roy. Soc. (London), A280, 299 (1964).
- (6) BLANDAMER, M.J.; en "Advances in Physical Organic Chemistry", vol. 14, Gold, V. y Bethell, D., eds.; Academic Press, London (1977), pág. 203.
- (7) CAVALIERI, F.; J. Am. Chem. Soc., 74, 1242 (1952).
- (8) SHACK, J., JENKINS, R.J. y THOMPSETT, J.M.; J. Biol. Chem., 198, 85 (1952).
- (9) SHACK, J., JENKINS, R.J. y THOMPSETT, J.M.; J. Biol. Chem., 203, 373 (1953).
- (10) HAMAGUCHI, K. y GEIDUSCHEK, E.P.; J. Am. Chem. Soc., 84, 1329 (1962).
- (11) GRUENWEDEL, D.W., HSU, C.H. y LU, D.S.; Biopolymers, 10, 47 (1971).
- (12) KUZNETSOV, I.A., LUKANIN, A.S. y TSURKONOV, L.F.; Biofizika, 16, 144 (1971).
- (13) ARCHER, B.G., CRANEY, C.L. y KRAKAUER, H.; Biopolymers, 11, 781 (1972).
- (14) ZIMMER, C. y LUCK, G.; Biochim. Biophys. Acta, 312, 215 (1973).
- (15) RICH, A. y DAVIES, D.R.; J. Am. Chem. Soc., 78, 3548 (1956).
- (16) DOVE, W.F. y DAVIDSON, N.; J. Mol. Biol., 5, 467 (1962).
- (17) NISHIMURA, S. y NOVELLI, G.D.; Biochem. Biophys. Res. Commun., 11, 161 (1963).

- (18) NISHIMURA, S., HARADA, F., NARUSHIMA, U. y SENO, T.; *Biochim. Biophys. Acta*, 142, 133 (1967).
- (19) MANNING, G.S.; *Biopolymers*, 11, 951 (1972).
- (20) DOTY, P., BOEDTKER, H., FRESCO, J.R., HALL, B.D. y HASELKORN, R.; *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 81, 693 (1959).
- (21) SCHILDKRAUT, C. y LIFSON, S.; *Biopolymers*, 3, 195 (1965).
- (22) BASU, S.; *Stud. Biophys.*, 10, 109 (1968).
- (23) FELSENFELD, G. y MILES, H.T.; *Ann. Rev. Biochem.*, 36, 407 (1967).
- (24) INMAN, R.B. y BALDWIN, R.L.; *J. Mol. Biol.*, 5, 172 (1962).
- (25) FRANK-KAMENETSKII, M.D.; *Biopolymers*, 10, 2623 (1971).
- (26) MANNING, G.S.; *Biopolymers*, 11, 937 (1972).
- (27) JOHNSON, N.P. y SCHLEICH, T.; *Biochemistry*, 13, 981 (1974).
- (28) POWELL, J.T. y RICHARDS, E.G.; *Biochim. Biophys. Acta*, 281, 145 (1972).
- (29) HUANG, W.M. y TS'O, P.O.P.; *J. Mol. Biol.*, 16, 523 (1966).
- (30) SCHLEICH, T. y GOULD, G.; *Biopolymers*, 13, 327 (1974).
- (31) MAEVSKII, A.A. y SUKHORUKOV, B.I.; *Biofizika*, 21, 1122 (1976).
- (32) BERNAL, J.D. y FOWLER, R.H.; *J. Chem. Phys.*, 1, 515 (1933).
- (33) FRANK, H.S. y EVANS, M.W.; *J. Chem. Phys.*, 13, 507 (1945).
- (34) IZATT, R.M., CHRISTENSEN, J.J. y RYTTING, J.H.; *Chem. Rev.*, 71, 439 (1971).
- (35) EDELHOCH, H. y OSBORNE, J.C.; en "Advances in Protein Chemistry", vol. 30, Academic Press, London (1976), pág. 241.

### 2.3.- Influencia del pH.

- (1) PHILLIPS, R.; Chem. Rev., 66, 501 (1966).
- (2) IZATT, R.M., CHRISTENSEN, J.J. y RYTTING, J.H.; Chem. Rev., 71, 439 (1971).
- (3) FRESCO, J.R. y DOTY, P.; J. Am. Chem. Soc., 79, 3928 (1957).
- (4) FRESCO, J.R. y KLEMPERER, E.; Ann. N.Y. Acad. Sci., 81, 730 (1959).
- (5) AKINRIMSI, E.O., SANDER, C. y TS'O, P.O.P.; Biochemistry, 2, 340 (1963).
- (6) HOLCCMB, D.N. y TINOCO, I.; Biopolymers, 3, 121 (1965).
- (7) LEVENE, P.A. y SIMMS, H.S.; J. Biol. Chem., 65, 519 (1925).
- (8) LEVENE, P.A., BASS, L.W. y SIMMS, H.S.; J. Biol. Chem., 70, 229 (1926).
- (9) SHUGAR, D. y FOX, J.F.; Biochim. Biophys. Acta, 9, 199 (1952).
- (10) BEAVEN, G.H., HOLIDAY, E.R. y JOHNSON, E.A., en "The Nucleic Acids" vol. 1; Chargaff, E. y Davidson, J.N., eds.; Academic Press, N. York (1955), cap. 14.
- (11) JORDAN, D.O., "The Chemistry of Nucleic Acids", Butterworths, London (1960), cap. 7.
- (12) GUSCHLBAUER, W., RUET, A. y FROMAGEOT, P.; Compt. Rend. Acad. Sci., ser. D, 265, 287 (1967).
- (13) WOLFENDEN, R.V.; J. Mol. Biol., 40, 307 (1969).
- (14) ABRAMS, W.R. y KALLEN, R.G.; J. Am. Chem. Soc., 98, 7789 (1976).
- (15) PULLMAN, B.; J. Chem. Soc., 1621, 1959.
- (16) BLOOMFIELD, V.A., CROTHERS, D.M. y TINOCO, I.; "Physical Chemistry of Nucleic Acids", Harper & Row, N. York (1974), pág. 78.
- (17) LEWIN, S.; J. Chem. Soc., 792, 1964.
- (18) "Handbook of Biochemistry. Selected data for Molecular Biology"; Sober, H.A., ed., CRC Press, Cleveland (1973).

- (19) IZATT, R.M., HANSEN, L.D., RYTTING, J.H. y CHRISTENSEN, J.J.; J. Am. Chem. Soc., 87, 2760 (1965).
- (20) SUCHORUKOW, B.T., POLTEW, V.I. y BLUMENFELD, L.; Abh. Deut. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Med., 381, 1964.
- (21) CHRISTENSEN, J.J., RYTTING, J.H. e IZATT, R.M.; J. Chem. Soc., B, 1643, 1970.
- (22) WATSON, J.D. y CRICK, F.H.C.; Nature, 171, 964 (1953).
- (23) RICH, A., DAVIES, D.R., CRICK, F.H.C. y WATSON, J.D.; J. Mol. Biol 3, 71 (1961).
- (24) DAWSON, R.M.C. y ELLIOTT, W.H., en "Data for Biochemical Research" Oxford Univ. Press (1959), cap. 3.
- (25) GOMORI, G., en "Methods in Enzymology", vol. 1; Colowick, S.P. y Kaplan, N.O., eds.; Academic Press, N. York (1955), pág. 138.
- (26) PLOESER, J.M. y LORING, H.S.; J. Biol. Chem., 178, 431 (1949).
- (27) Ref. (16), pág. 96.
- (28) GUSCHLBAUER, W., "Nucleic Acid Structure", Springer-Verlag, N. York (1976), pág. 71.

#### 2.4.- Influencia de la Urea.

- (1) TANFORD, C., "Physical Chemistry of Macromolecules", J. Wiley, N. York, (1961), pág. 624.
- (2) LEWIN, S., "Displacement of water and its control of biochemical reactions", Academic Press, London (1974), cap. 4.
- (3) RICE, S.A. y DOTY, P.; J. Am. Chem. Soc., 79, 3937 (1957).
- (4) EDELHOCH, H. y OSBORNE, J.C., en "Advances in Protein Chemistry", vol. 30, Academic Press, London (1976), pág. 237-239.
- (5) ZIMM, B.H. y KALLENBACH, N.R.; Ann. Rev. Phys. Chem., 13, 171 (1962).
- (6) KAUZMANN, W.; Advan. Protein. Chem., 14, 1 (1959).

- (7) NOZAKI, Y. y TANFORD, C.; J. Biol. Chem., 238, 4074 (1963).
- (8) WHITE, A., HANDLER, P. y SMITH, E.L.; "Principles of Biochemistry", McGraw-Hill, N. York, (1964), pág. 176.
- (9) BLANDAMER, M.J., en "Advances in Physical Organic Chemistry", vol. 14, Gold, V. y Bethell, D., eds.; Academic Press, London (1977), pág. 260.
- (10) SCHELLMAN, J.A.; Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chem., 29, (14-15), 223 (1955).
- (11) CLARE SPEAKMAN, J., "The hydrogen bond and other intermolecular forces", The Chemical Society, London (1975), pág. 28.
- (12) Ref. (2), cap. 2.

#### 2.5.- Influencia de la temperatura.

- (1) FRANK, H.S. y EVANS, M.W.; J. Chem. Phys., 13, 507 (1945).
- (2) KAUZMANN, W.; Advan. Protein. Chem., 14, 1 (1959).
- (3) NÉMETHY, G. y SCHERAGA, H.A.; J. Chem. Phys., 36, 3382 (1962).
- (4) NÉMETHY, G. y SCHERAGA, H.A.; J. Chem. Phys., 36, 3401 (1962).
- (5) NÉMETHY, G. y SCHERAGA, H.A.; J. Phys. Chem., 66, 1773 (1962).
- (6) TANFORD, C.; "The Hydrophobic Effect", Wiley-Interscience, N. York (1973), cap. 4.
- (7) SINANOGLU, O. y ABDULNUR, S.; Federation Proc., 24, Suppl. 15, S-12 (1965).
- (8) SINANOGLU, O., en "Molecular Associations in Biology", B. Pullman, ed., Academic Press, N. York (1968), pág. 427.
- (9) SCRUGGS, R.L., ACHTER, E.K. y ROSS, P.D.; Biopolymers, 11, 1961 (1972).
- (10) ALVAREZ, J. y BILTONEN, R.; Biopolymers, 12, 1815 (1973).
- (11) GILL, S.J., DOWNING, M. y SHEATS, G.F.; Biochemistry, 6, 272 (1967).
- (12) STOESSER, P.R. y GILL, S.J.; J. Phys. Chem., 71, 564 (1967).

- (13) PÖRSCHKE, D. y EGGERS, F.; Eur. J. Biochem., 26, 490 (1972).
- (14) MARENCHIC, M.G. y STURTEVANT, J.M.; J. Phys. Chem., 77, 544 (1973).
- (15) PLESIEWICZ, E., STEPIEN, E., BOLEWSKA, K. y WIERZCHOWSKI, K.L.; Biophys. Chem., 4, 131 (1976).
- (16) BRAHMS, J., MAURIZOT, J.C. y MICHELSON, A.M.; J. Mol. Biol., 25, 481 (1967).
- (17) BRAHMS, J. y VAN HOLDE, K.E.; en "Ordered Fluids and Liquid Crystals", American Chemical Society, Washington (1967), cap. 18.
- (18) LOWE, M.J. y SCHELLMAN, J.A.; J. Mol. Biol., 65, 91 (1972).
- (19) LENG, M. y FELSENFELD, G.; J. Mol. Biol., 15, 455 (1966).
- (20) TS'O, P.O.P., en "Fine Structure of Proteins and Nucleic Acids", Fasman, G. y Timasheff, S.N., eds., Marcel Dekker, N. York (1970), pág. 166.

BIBLIOGRAFIA DEL CAPITULO 3.- Dinucleósidos-monofosfato

- (1) MASSOULIÉ, J. y MICHELSON, A.M.; C.R. Acad. Sc. Paris, 259, 2923 (1964).
- (2) WARSHAW, M.M. y TINOCO, I.; J. Mol. Biol., 13, 54 (1965); 20, 29 (1966).
- (3) BRAHMS, J., MAURIZOT, J.C. y MICHELSON, A.M.; J. Mol. Biol., 25, 481 (1967).
- (4) DAVIS, R.C. y TINOCO, I.; Biopolymers, 6, 223 (1968).
- (5) LOWE, M.J. y SCHELLMAN, J.A.; J. Mol. Biol., 65, 91 (1972).
- (6) BANGERTER, B.W. y CHAN, S.I.; J. Am. Chem. Soc., 91, 3910 (1969).
- (7) TS'O, P.O.P., KONDO, N.S., SCHWEIZER, M.P. y HOLLIS, D.P.; Biochemistry, 8, 997 (1969).
- (8) KRUGH, T.R., LAING, J.W. y YOUNG, M.A.; Biochemistry, 15, 1224 (1976).
- (9) TS'O, P.O.P., en "Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry", vol. 2, Ts'o, P.O.P., ed., Academic Press, N. York (1974), cap. 5.
- (10) BRAHMS, J. y BRAHMS, S., en "Fine Structure of Proteins and Nucleic Acids", Fasman, G.D. y Timasheff, S.N., eds., M. Dekker, N. York (1970), p. 223.
- (11) SUNDARALINGAM, M.; Biopolymers, 7, 821 (1969).
- (12) CHAN, S.I. y NELSON, J.H.; J. Am. Chem. Soc. (1969).
- (13) KONDO, N.S. y DANYLUK, S.S.; Biochemistry, 15, 756 (1976).
- (14) EZRA, F.S., LEE, C., KONDO, N.S., DANYLUK, S.S. y SARMA, R.H.; Biochemistry, 16, 1977 (1977).
- (15) ALTONA, C., HARTEL, A.J., OLSTHOORN, C.S.M., DE LEEUW, H.P.M. y HAASNOOT, C.A.G.; en "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Molecular Biology", B. Pullman, ed.; D. Reidel Pub. Co., Dordrecht (1978), p. 87.
- (16) BRANDTS, J.F., en "Structure and Stability of Biological Macromo-

- lecules", Timasheff, S.N. y Fasman, G.D., eds., M. Dekker, N. York (1969), p. 223.
- (17) RIESNER, D. y RÖMER, R., en "Physicochemical properties of nucleic acids", vol. 2, Duchesne, J., ed., Academic Press, London (1973), p. 239.
- (18) VAN HOLDE, K.E., BRAHMS, J. y MICHELSON, A.M.; J. Mol. Biol., 12, 726 (1965).
- (19) LENG, M. y FELSENFELD, G.; J. Mol. Biol., 15, 455 (1966).
- (20) POWELL, J.T., RICHARDS, E.G. y GRATZER, W.B.; Biopolymers, 11, 235 (1972).
- (21) CATLIN, J.C. y GUSCHLBAUER, W.; Biopolymers, 14, 51 (1975).
- (22) OGASAWARA, N. e INOUE, Y.; J. Am. Chem. Soc., 98, 7054 (1976).
- (23) APPLEQUIST, J. y DAMLE, V.; J. Am. Chem. Soc., 87, 1450 (1965).
- (24) THRIERR, J.C., DOURLENT, M. y LENG, M.; J. Mol. Biol., 58, 815 (1971).
- (25) RASZKA, M. y KAPLAN, N.; Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., 69, 2025 (1972).
- (26) HUANG, W.M. y TS'O, P.O.P.; J. Mol. Biol., 16, 523 (1966).
- (27) TS'O, P.O.P., en "Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry", vol. 1, Ts'o, P.O.P., ed., Academic Press, N. York (1974), cap. 6, p. 565.
- (28) FELSENFELD, G. y RICH, A.; Biochim. Biophys. Acta, 26, 457 (1957).

BIBLIOGRAFIA DEL CAPITULO 4.- Oligonucleótidos y polinucleótidos

- (1) MICHELSON, A.M.; en "Molecular Associations in Biology", Pullman, B., ed.; Academic Press, N. York (1968), pág. 93.
- (2) JANIK, B.; "Physicochemical characteristics of oligonucleotides and polynucleotides"; Plenum, N. York (1971).
- (3) RIESNER, D. y RÖMER, R.; en "Physicochemical Properties of Nucleic Acids", vol. 2; Duchesne, J., ed., Academic Press, London (1973), cap. 15.
- (4) TS'O, P.O.P., en "Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry", vol. 2, Ts'ou, P.O.P., ed., Academic Press, N. York (1974), cap. 5, pág. 388.
- (5) LIPSETT, M.N.; J. Biol. Chem., 239, 1250 (1964).
- (6) APPLEQUIST, J. y DAMLE, V.; J. Am. Chem. Soc., 87, 1450 (1965).
- (7) BRAHMS, J., MICHELSON, A.M. y VAN HOLDE, K.E.; J. Mol. Biol., 15, 467 (1966).
- (8) LENG, M. y FELSENFELD, G.; J. Mol. Biol., 15, 455 (1966).
- (9) POLAND, D., VOURNAKIS, J.N. y SCHERAGA, H.A.; Biopolymers, 4, 223 (1966).
- (10) BRAHMS, J., MAURIZOT, J.C. y MICHELSON, A.M.; J. Mol. Biol., 25, 465 (1967).
- (11) BRAHMS, J. y VAN HOLDE, K.E.; en "Ordered Fluids and Liquid Crystals", American Chemical Society, Washington (1967), cap. 18.
- (12) VOURNAKIS, J.N., POLAND, D. y SCHERAGA, H.A.; Biopolymers, 5, 403 (1967).
- (13) DOURELLENT, M., THRIERR, J.C., BRUN, F. y LENG, M.; Biochem. Biophys. Res. Commun., 41, 1590 (1970).

- (14) EIGEN, M. y PÖRSCHKE, D.; J. Mol. Biol., 53, 123 (1970).
- (15) PÖRSCHKE, D. y EIGEN, M.; J. Mol. Biol., 62, 361 (1971).
- (16) MAURIZOT, J.C., BLICHARSKI, J. y BRAHMS, J.; Biopolymers, 10, 1429 (1971).
- (17) SCHEFFLER, I.E., ELSON, E.L. y BALDWIN, R.L.; J. Mol. Biol., 48, 145 (1970).
- (18) CRAIG, M.E., CROTHERS, D.M. y DOTY, P.; J. Mol. Biol., 62, 383 (1971).
- (19) JASKUNAS, S.R., CANTOR, C.R. y TINOCO, I.; Biochemistry, 7, 3164 (1968).
- (20) MARTIN, F.H., UHLENBECK, O.C. y DOTY, P.; J. Mol. Biol., 57, 201 (1971).
- (21) PÖRSCHKE, D.; Biopolymers, 10, 1989 (1971).
- (22) GRUNBERG-MANAGO, M. y OCHOA, S.; J. Am. Chem. Soc., 77, 3165 (1955).
- (23) GRUNBERG-MANAGO, M., ORTIZ, P.J. y OCHOA, S.; Science, 122, 907 (1955).
- (24) STEINER, R.F. y BEERS, R.F.; "Polynucleotides"; Elsevier, Amsterdam (1961).
- (25) DOTY, P.; en "The Structure and Biosynthesis of Macromolecules", Bell, D.J. y Grant, J.K., eds., Biochemical Society Symposia, n° 21, Cambridge Univ. Press (1962), cap. 2.
- (26) ZIMM, B.H. y KALLENBACH, N.B.; Ann. Rev. Phys. Chem., 13, 171 (1962).
- (27) FELSENFELD, G. y MILES, H.T.; Ann. Rev. Biochem., 36, 407 (1967).
- (28) DAVIES, D.R.; Ann. Rev. Biochem., 36, 321 (1967).
- (29) STEINER, R.F. y MILLAR, D.B.S.; en "Biological Polyelectrolytes", Veis, A., ed., Marcel Dekker, N. York (1970), cap. 2.
- (30) LENG, M., DOURELLENT, M. y HÉLÈNE, C.; en "Physicochemical Properties of Nucleic Acids", vol. 3; Duchesne, J., ed., Academic Press, London (1973), cap. 18, pág. 32 y ss.

- (331) GUSCHLBAUER, W.; "Nucleic Acid Structure", Springer-Verlag, N. York (1976), cap. 6.
- (332) WARNER, R.C.; J. Biol. Chem., 229, 711 (1957).
- (333) FRESCO, J.R. y DOTY, P.; J. Am. Chem. Soc., 79, 3928 (1957).
- (334) FRESCO, J.R. y KLEMPERER, E.; Ann. N.Y. Acad. Sci., 81, 730 (1959).
- (335) STEVENS, C. y FELSENFELD, G.; Biopolymers, 2, 293 (1964).
- (336) HOLCOMB, D.N. y TINOCO, I.; Biopolymers, 3, 121 (1965).
- (337) EISENBERG, H. y FELSENFELD, G.; J. Mol. Biol., 30, 17 (1967).
- (338) STANNARD, B.S. y FELSENFELD, G.; Biopolymers, 14, 299 (1975).
- (339) RICH, A., DAVIES, D.R., CRICK, F.H.C. y WATSON, J.D.; J. Mol. Biol., 3, 71 (1961).
- (440) KLUMP, H., ACKERMANN, T. y NEUMANN, E.; Biopolymers, 7, 423 (1969).
- (441) JANIK, B., SOMMER, R.G. y BOBST, A.M.; Biochim. Biophys. Acta, 281, 152 (1972).
- (442) ZIMMERMAN, S.B. y COLEMAN, N.F.; Biopolymers, 11, 1943 (1972).
- (443) FRESCO, J.R. y ALBERTS, B.M.; Proc. Nat. Acad. Sci., 46, 311 (1960).
- (444) POLAND, D. y SCHERAGA, H.A.; "Theory of helix-coil transitions in biopolymers"; Academic Press, N. York (1970).
- (445) SUNDARALINGAM, M.; Biopolymers, 7, 821 (1969).
- (446) Ref. 30, pág. 36.
- (447) LIPSETT, M.N.; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 46, 445 (1960).
- (448) THRIERR, J.C. y LENG, M.; Biochim. Biophys. Acta, 182, 577 (1969).
- (449) MILLAR, D.B. y MACKENZIE, M.; Biochim. Biophys. Acta, 204, 82 (1970).
- (550) THRIERR, J.C., DOURLENT, M. y LENG, M.; J. Mol. Biol., 58, 815 (1971).
- (551) LEVITT, M.; en "Polymerisation in Biological Systems", Ciba Foundation Symposium, Elsevier (1972), p. 147 y ss.

BIBLIOGRAFIA DEL CAPITULO 5.- Estudio complementario por espectroscopía IR de autoasociación y heteroasociación de unidades monoméricas en disolución acuosa

- (1) PULLMAN, B. y PULLMAN, A.; en "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology", vol. 9; Academic Press, N. York (1969), p. 354.
- (2) PERAL, F., BASCONES, A. y GALLEGO, E.; Rev. Real Acad. Ciencias E., F. y N., LXXIII, cuad. 1º, 68 (1979).
- (3) SUSI, H., en "Structure and Stability of Biological Macromolecules", Timasheff, S.N. y Fasman, G.D., eds., Marcel Dekker, N. York (1969), cap. 7.
- (4) TSUBOI, M.; Applied Spectroscopy Reviews, 3(1), 45 (1969).
- (5) PARKER, F.S.; "Applications of Infrared Spectroscopy in Biochemistry, Biology and Medicine", Adam Hilger, London (1971), cap. 12.
- (6) HARTMAN, K.A., LORD, R.C. y THOMAS, G.J.; en "Physicochemical Properties of Nucleic Acids", vol. 2; Duchesne, J., ed., Academic Press, London (1973), cap. 10.
- (7) TSUBOI, M., TAKAHASHI, S. y HARADA, I.; en "Physicochemical Properties of Nucleic Acids", vol. 2; Duchesne, J., ed., Academic Press, London (1973), cap. 11.
- (8) TS'O, P.O.P.; en "Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry", vol. 1, Ts'o, P.O.P., ed.; Academic Press, N. York (1974), cap. 6, p. 531.
- (9) KRUGH, T.R., LAING, J.W. y YOUNG, M.A.; Biochemistry, 15, 1224 (1976).
- (10) RASZKA, M. y KAPLAN, N.; Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., 69, 2025 (1972).
- (11) HADŽI, D. y BRATOS, S.; en "The Hydrogen Bond. II. Structure and spectroscopy", Schuster, P., Zundel, G. y Sandorfy, C., North-Holland, Amsterdam (1976), cap. 12.

(12)2) Ref. (5), pág. 53.

(13)3) HOWARD, F.B. y MILES, H.T.; J. Biol. Chem., 240, 801 (1965).

(14)4) Ref. (7), pág. 124.

(15)5) TSUBOI, M., KYOGOKU, Y. y SHIMANOUCI, T.; Biochim. Biophys. Acta, 55, 1 (1962)..