

# CATEDRA DE FISICOQUIMICA

Prof. Dr. JESUS THOMAS

## ALGUNOS ASPECTOS FISICOQUIMICOS DE LA DEGRADACION DE FOSFATOS DE ADENOSINA

J. L. MORENO FRIGOLS y J. THOMAS GOMEZ

Ars Pharm. X, 427 (1969)

La degradación química y enzimática de nucleótidos ha sido tratada profusamente en la bibliografía. En estado sólido hay una cierta degradación que se describió por K. BAILEY (1) para la sal dibárica del ATP; S. S. MORELL y colaboradores (2) analizan la influencia de la temperatura en el caso de las sales sódica y bárica de nucleótidos. También se ha descrito por F. HOH (3) una reagrupación de moléculas de ATP, a la temperatura de 80° C, para dar lugar a la formación de tetrafosfatos.

En disolución los estudios han sido más extensos. Se pueden citar al respecto los trabajos de S. E. KERR (4), de L. F. LELOIR y C. E. CARDINI (5), L. B. NANNINGA (6) en relación a la influencia de los cationes presentes, C. LIEBECQ y M. JACQUEMOTTE-LOUIS (7) consideran los iones magnesio en la hidrólisis del ATP a diversos valores de pH. W. T. BOWEN y colaboradores (8) realizan investigaciones análogas en presencia de cloruros de cerio, lantano y uracilo.

Los calores y entropías de activación de la hidrólisis de fosfatos de adenosina han sido estudiados experimentalmente por S. L. FRIES (9) (10), quien encuentra que la parte de adenosina de la molécula no confiere propiedades a este respecto ya que el comportamiento hidrolítico es característico de los polifosfatos orgánicos. Sin embargo, R. M. BOCK (11) comenta los resultados obtenidos por FRIESS y al compararlos con los hallados por otros autores considera la conveniencia de una revisión experimental más amplia.

Según L. F. LELOIR y C. E. CARDINI (5) los fosfatos de pentosas son menos estables que los ésteres de otros azúcares y resultan afectados en cuanto a su hidrólisis por la naturaleza de los sustituyentes. Así, dichos autores indican que aunque los ribósidos de las purinas se hidrolizan en la misma cuantía, bajo iguales condiciones, que los fosfatos de ribosa, los fosfatos de pirimidina son más estables.

Los fosfatos orgánicos se han separado en dos grupos a efectos de su hidrólisis (11), lábiles como el ATP y ADP, y estables como los mononucleótidos y algunos dinucleótidos. Según A. M. MICHELSON y A. R. TODD (12) el adenosinmonofosfato es hidrolizado por ácido 0,1 N a 100° con valores de  $t_{1/2}$  (minutos) = 1.050 y  $k \cdot 10^3 = 0,26$ . R. CAPUTTO y colaboradores (13) encuentran que en las mismas condiciones anteriores el ATP es hidrolizado con  $t_{1/2}$  (minutos) = 8 y  $k \cdot 10^3 = 38$ . El ácido pirofosfórico, según R. ROBINSON y M. G. MAC-

FARLANE (14) posee valores de hidrólisis con ácido 1 N a 100° C que son  $t_{1/2}$  (minutos) = 1.2 y  $k \cdot 10^3 = 250$ .

Todos los trabajos consultados consignan la degradación en condiciones extremas de temperaturas, abordando el problema desde un punto de vista exclusivamente cualitativo. Así, T. TSUJIMOTO y T. YAMOMA (15) estudian la cinética de hidrólisis de ATP con ClH 2 N y a 100° C, de acuerdo con los siguientes pasos: ATP → AMP → ADP → adenina + ribosa-5-fosfato + fosfórico. A. HOCK y G. HUBBER, estudian la degradación a 100° C para varios valores de pH operando con ATP, ADP y AMP (16).

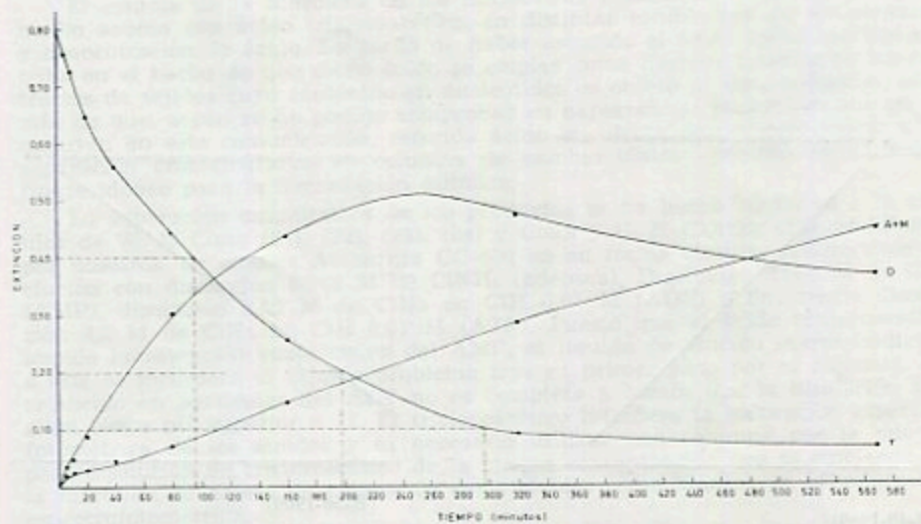
Como es sabido, se ha venido considerando que la energía de un fosfato "rico en energía" se encuentra adscrita a ciertos enlaces particulares P-O ó P-N que resultan rotos durante el proceso de hidrólisis. Sin embargo se sabe actualmente que la magnitud de la energía libre de hidrólisis,  $\Delta F^\circ$ , depende de otros muchos factores estructurales, como son la resonancia de oposición (diferencia entre la energía de resonancia del fosfato rico en energía y la suma de las energías de resonancia de sus fragmentos constitutivos), la energía de interacción electrostática, el tautomerismo ceto-enol de los productos de hidrólisis y la energía libre de ionización de dichos productos resultantes (17).

#### ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO CUALITATIVO DE LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS

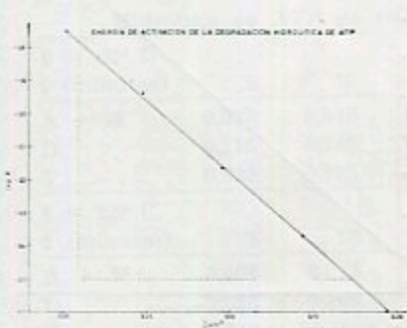
El estudio cualitativo de los productos formados en la degradación hidrolítica de los fosfatos de adenosina se ha realizado por cromatografía en papel. Las muestras tomadas a diferentes tiempos se aplicaron en la forma habitual sobre las tiras de papel Whatman n.º 1 y se desarrollaron por la técnica de doble desarrollo en sentido opuesto, el primero con fosfato disódico al 5 %, alcohol isoamílico a saturación mutua, según C. E. CARTER (19), y el segundo con propanol-amoniaco-agua (6:3:1), según R. BERGVIST y A. DEUTSCH (20). A los productos procedentes de la hidrólisis del AMP se les dio solamente el primer desarrollo. Los productos de hidrólisis en cada caso se identificaron por comparación de los valores de su  $R_f$  y los correspondientes a patrones sometidos a igual desarrollo

TABLA 1

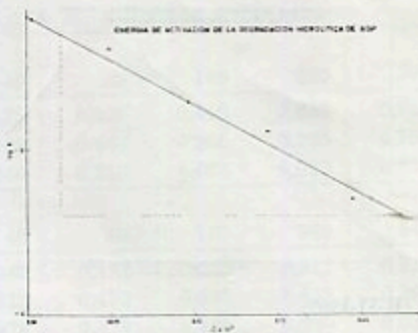
	$R_f$	
	Patrón	Problema
Adenina	0,42	0,42
Adenosina	0,59	No aparece
AMP	0,76	0,76
ADP	0,84	0,84
ATP	0,89	0,89



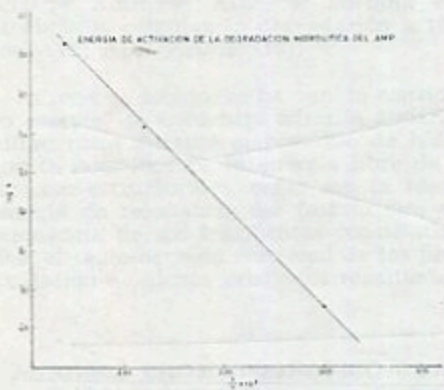
(R-46-1969)



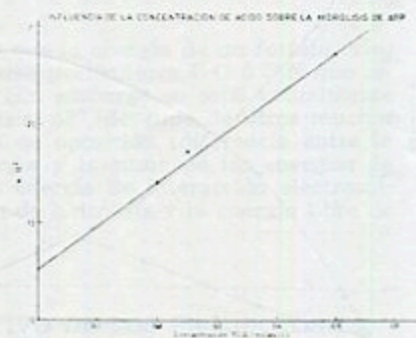
(R-47-1969)



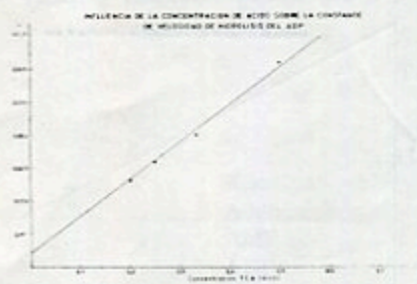
(R-48-1969)



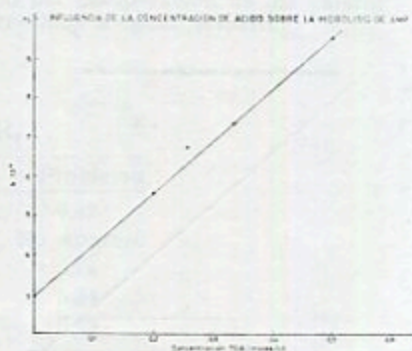
(R-49-1969)



(R-50-1969)



(R-51-1969)



(R-52-1969)

## ESTUDIO CUANTITATIVO DE LOS PRODUCTOS DE HIDROLISIS

El estudio de la hidrólisis de los nucleótidos ensayados se ha efectuado en medio acuoso con ácido tricloroacético, en distintas condiciones de temperatura y concentración de ácido. La razón de haber escogido el ácido tricloroacético estriba en el hecho de que dicho ácido se emplea como desproteinizante en los extractos de tejidos cuyo contenido en nucleótidos es objeto de determinación, además de que, según se ha podido comprobar en experiencias personales que no se incluyen en esta comunicación, referido ácido no afecta desfavorablemente a la separación cromatográfica en columna de cambio iónico; además es un ácido fuerte idóneo para la degradación química.

La separación cuantitativa de los productos se ha hecho conforme a la técnica de W. E. COHN (21), (22), (23), (24) y COHN y C. E. CARTER (25) modificada por nosotros. Se emplea Amberlita CG-400 en su forma cloruro, realizándose la elución con disolución 0,003 M de  $\text{C}_2\text{NH}_2$  (adenina), Disolución 0,003 M de  $\text{ClH}$  (AMP), disolución 0,02 M de  $\text{ClNa}$  en  $\text{ClH}$  0,01 M (ADP) y finalmente disolución 0,2 M de  $\text{ClNa}$  en  $\text{ClH}$  0,01 M (ATP). Puesto que el ácido tricloroacético impide la retención cuantitativa del AMP, el líquido de elución correspondiente a éste se incorpora al líquido problema tras su primer paso por la columna. La retención en particular del ADP no es completa a menos que la disolución original tenga pH superior a 11. El tricloroacético interfiere la valoración espectrofotométrica de los eluidos y es necesario utilizar una columna por la que se pasa disolución de tricloroacético de la misma concentración que la empleada en la hidrólisis, al objeto de valerse de estos eluidos como blancos en la valoración espectrofotométrica.

## ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE HIDROLISIS

Seguidamente se consignan los resultados de la hidrólisis del ATP en tricloroacético 1/3 M, a distintas temperaturas; expresando los resultados en extinciones ópticas a la longitud de onda de 260  $\text{m}\mu$ .

TABLA 2

*Hidrólisis de ATP en tricloroacético 1/3 M, a varias temperaturas*

<i>t = 60° C</i>								
<i>t (minutos)</i>	5	10	20	40	80	160	320	500
A + M	0,030	0,040	0,070	0,135	0,205	0,410	0,650	0,765
D	0,110	0,140	0,230	0,365	0,460	0,500	0,265	0,155
T	0,835	0,705	0,605	0,440	0,210	0,085	0,030	0,035
<i>t = 55° C</i>								
<i>t (minutos)</i>	5	10	20	40	80	160	360	540
A + M	0,004	0,015	0,035	0,062	0,132	0,263	0,512	0,710
D	0,068	0,106	0,174	0,323	0,470	0,580	0,435	0,305
T	0,910	0,859	0,770	0,576	0,378	0,137	0,030	0,030
<i>t = 50° C</i>								
<i>t (minutos)</i>	5	10	20	40	80	160	320	570
A + M	0,020	0,025	0,028	0,044	0,069	0,147	0,285	0,443
D	0,035	0,051	0,088	0,171	0,300	0,435	0,472	0,363
T	0,756	0,724	0,643	0,562	0,446	0,254	0,088	0,040

t = 45° C								
t (minutos)	5	10	20	40	80	160	320	510
A + M	0,011	0,011	0,018	0,026	0,045	0,096	0,153	0,241
D	0,043	0,053	0,086	0,129	0,214	0,350	0,485	0,483
T	0,765	0,695	0,695	0,646	0,505	0,395	0,198	0,083
t = 40° C								
t (minutos)			32	90	115	270	400	510
A + M			0,079	0,044	0,041	0,120	0,122	0,169
D			0,080	0,169	0,216	0,341	0,443	0,475
T			0,683	0,629	0,586	0,388	0,289	0,212

Los resultados recogidos en estas tablas se han representado en la gráfica de la figura 1, que es típica de un proceso de reacciones sucesivas de primer orden.

Los resultados obtenidos a partir del ADP, paralelos a los anteriores, son los siguientes (con tridoroacético 1/2 M).

TABLA 3  
*Hidrolisis de ADP en tricloroacético 1/2 M, a varias temperaturas*

t = 60° C								
t (minutos)	5	10	30	45	80	160	370	510
A + M	0,186	0,233	0,392	0,437	0,594	0,875	1,094	1,174
D	1,040	0,954	0,850	0,765	0,633	0,373	0,102	0,033
t = 55° C								
t (minutos)	10	20	40	80	130	180	310	540
A + M	0,170	0,187	0,249	0,336	0,458	0,521	0,686	0,845
D	0,761	0,721	0,685	0,595	0,480	0,385	0,225	0,095
t = 50° C								
t (minutos)	15	30	45	60	90	210	450	
A + M	0,175	0,211	0,248	0,259	0,297	0,503	0,770	
D	0,850	0,830	0,810	0,782	0,737	0,601	0,362	
t = 45° C								
t (minutos)	30	60	90	120	180	305	420	540
A + M	0,140	0,176	0,190	0,211	0,270	0,372	0,482	0,528
D	0,746	0,746	0,700	0,668	0,616	0,546	0,443	0,389
t = 40° C								
t (minutos)	30	60	90	120	180	305	420	540
A + M	0,170	0,198	0,217	0,206	0,266	0,298	0,404	0,466
D	0,790	0,775	0,748	0,748	0,722	0,685	0,625	0,607

Por un método análogo a los anteriores se ha estudiado el paso AMP → Adenina + ribosa-5-fosfato, encontrándose los siguientes resultados (con tricloroacético 1/2 M).

TABLA 4

Hidrolisis de AMP en tricloroacético 1/2 M, a varias temperaturas

t = 60° C						
t (minutos)	60	120	300	365	420	480
A	0,085	0,140	0,260	0,350	0,420	0,380
M	0,850	0,800	0,740	0,640	0,595	0,560
t = 65° C						
t (minutos)	40	90	140	280	390	480
A	0,090	0,175	0,250	0,415	0,570	0,570
M	0,815	0,730	0,640	0,480	0,400	0,315
t = 70° C						
t (minutos)	40	90	140	280	390	480
A	0,145	0,260	0,350	0,580	0,670	0,600
M	0,760	0,615	0,535	0,360	0,275	0,230
t = 75° C						
t (minutos)	40	90	140	280	390	480
A	0,160	0,295	0,420	0,590	0,570	0,680
M	0,635	0,465	0,365	0,195	0,195	0,090

A partir de los datos de las tablas 2, 3 y 4, y mediante aplicación de la ecuación de Arrhenius, se ha comprobado que existe linealidad entre los valores de  $\log k$  y  $1/T$ , (figuras 2, 3 y 4). Los valores de la energía de activación,  $E_a$ , y los de factor de frecuencia,  $A$ , se han determinado por los métodos gráficos, de los promedios y de los mínimos cuadrados.

TABLA 5

Variación de  $k$  y de  $t_{1/2}$  con la temperatura

(ATP en tricloroacético 1/3 M)							
T (° K)	333	328	323	318	313		
$k(\text{min}^{-1}) \cdot 10^3$	17,8	11,5	6,8	4,2	2,5		
Energía de activación = $E_a$	= 20,5 kcal/mol						20.500
Factor de frecuencia = $A$	= $0,048 \cdot 10^{13} \text{ min}^{-1}$					$k = 0,048 \cdot 10^{13} e^{-\frac{E_a}{RT}}$	RT
(ADP en tricloroacético 1/2 M)							
T (° K)	333	328	323	318	313		
$k(\text{min}^{-1}) \cdot 10^3$	6,2	4,1	2,0	1,3	0,5		
Energía de activación = $E_a$	= 26,3 kcal/mol						26.300
Factor de frecuencia = $A$	= $21,7 \cdot 10^{13} \text{ min}^{-1}$					$k = 21,7 \cdot 10^{13} e^{-\frac{E_a}{RT}}$	RT
(AMP en tricloroacético 1/2 M)							
T (°K)	333	338	343	348			
$k(\text{min}^{-1}) \cdot 10^3$	0,9	1,9	2,6	4,3			
Energía de activación = $E_a$	= 25,0 kcal-mol						25.000
Factor de frecuencia = $A$	= $2,3 \cdot 10^{13} \text{ min}^{-1}$					$k = 2,3 \cdot 10^{13} e^{-\frac{E_a}{RT}}$	RT $k$

Al objeto de conocer la influencia de la concentración de ácido sobre el valor de la velocidad específica se han realizado las experiencias que se resumen en las siguientes tablas:

TABLA 6

<i>Variación de la concentración de productos con la concentración de ácido</i>								
<i>(t = 60° C) ATP</i>		<i>Tricloroacético 1/2 M</i>						
<i>tiempo (min.)</i>	5	10	20	40	160	320	410	500
A + M	0,044	0,054	0,110	0,167	0,590	0,849	0,918	0,970
D	0,125	0,196	0,320	0,480	0,402	0,157	0,072	0,034
T	0,890	0,800	0,600	0,385	0,073	0,052	0,040	0,040
<i>(t = 60° C) ATP</i>		<i>Tricloroacético 1/4 M</i>						
<i>t. (minutos)</i>	20	40	60	90	120	150	285	
A	0,025	0,045	0,080	0,105	0,140	0,140	0,160	
M	0,035	0,055	0,085	0,115	0,160	0,220	0,330	
D	0,180	0,310	0,405	0,515	0,515	0,480	0,440	
T	0,710	0,530	0,400	0,215	0,135	0,080	0,020	
<i>(t = 80° C) ATP</i>		<i>Tricloroacético 1/5 M</i>						
<i>t. (minutos)</i>	20	40	60	90	120	150	285	
A	0,025	0,040	0,065	0,085	0,095	0,120	0,160	
M	0,035	0,040	0,065	0,080	0,110	0,160	0,210	
D	0,180	0,245	0,325	0,385	0,425	0,420	0,400	
T	0,580	0,440	0,365	0,230	0,135	0,195	0,035	

En esta experiencia anterior se han determinado, a diferencia de las anteriores, las concentraciones de adenosina y adenosin-monofosfato independientemente, de acuerdo con la técnica expuesta al principio de esta parte experimental.

TABLA 7

<i>Variación de la concentración de productos con la concentración de ácido</i>								
<i>(t = 60° C) ADP</i>		<i>Tricloroacético 1/3 M</i>						
<i>t. (minutos)</i>	5	10	20	40	80	160	320	500
A + M	0,185	0,219	0,253	0,333	0,475	0,637	0,939	1,138
D.	1,000	0,997	0,990	0,919	0,765	0,550	0,298	0,140
<i>(t = 60° C) ADP</i>		<i>Tricloroacético 1/4 M.</i>						
<i>t. (minutos)</i>	20	40	80	140	305	420	495	
A + M	0,200	0,260	0,360	0,455	0,790	0,890	0,940	
D	0,850	0,810	0,710	0,550	0,310	0,200	0,155	
<i>(t = 60°) ADP</i>		<i>Tricloroacético 1/5 M</i>						
<i>t. (minutos)</i>	20	40	80	140	305	420	495	
A + M	0,165	0,210	0,270	0,375	0,590	0,720	0,740	
D	0,725	0,690	0,630	0,545	0,305	0,250	0,190	



TABLA 8

Variación de la concentración de productos con la concentración de ácido

(t = 60° C)	AMP		Tricloroacético 1/3 M			
t. (minutos)	70	120	195	330	420	550
A	0,065	0,095	0,165	0,270	0,290	0,390
M	0,850	0,820	0,800	0,680	0,640	0,620
(t = 60° C)	AMP		Tricloroacético 1/4 M.			
t. (minutos)	45	90	150	215	335	540
A	0,005	0,016	0,055	0,080	0,140	0,225
M	0,650	0,650	0,650	0,585	0,550	0,480
(t = 60° C)	AMP		Tricloroacético 1/5 M			
t. (minutos)	70	120	195	330	420	550
A	0,055	0,080	0,130	0,180	0,210	0,300
M	0,890	0,890	0,870	0,755	0,735	0,720

TABLA 9

Variación de la constante de velocidad específica con la concentración del ácido

ATP	t = 60°				
Concentración TCA (moles/l)	0,50	0,33	0,25	0,20	
k x 10 <sup>3</sup>	27,3	17,8	17,5	14,1	
ADP	t = 60°				
Concentración TCA (moles/l)	0,50	0,33	0,25	0,20	
k x 10 <sup>3</sup>	6,23	4,00	3,18	2,65	
AMP	t = 60°				
Concentración TCA (moles/l)	0,50	0,33	0,25	0,20	
k x 10 <sup>3</sup>	0,93	0,74	0,68	0,60	

Estos resultados se han llevado a las gráficas de las figuras 5, 6 y 7.

## RESUMEN Y DISCUSION

El estudio de la hidrólisis de ATP hasta adenina, en medio ácido y en distintas condiciones de concentración y temperatura, realizado en este trabajo con auxilio de la cromatografía de cambio iónico nos ha permitido seguir cada uno de los pasos de la reacción:



lo que se ha comprobado por el hecho de que estos cuatro productos se encuentran en los hidrolizados analizados, no hallándose manchas de adenosina en los cromatogramas sobre papel (tabla 1).

La velocidad de hidrólisis de la reacción global se ha estudiado siguiendo por separado cada paso, utilizando sucesivamente, como sustancia de partida, cada uno de los productos que se originan en la reacción y midiendo la velocidad con que disminuye su concentración.

La representación de los valores de los logaritmos de las extinciones del producto inicial, a diferentes tiempos, frente a estos últimos, suministra líneas rectas en todos los casos. Por otra parte de la gráfica 1, correspondiente a los datos de la tabla 2, se aprecia que los sucesivos periodos de semitransformación son constantes, lo que demuestra cómo todos los pasos son de primer orden. Se trata, pues, de cuatro reacciones sucesivas de primer orden, ninguna de las cuales es reversible. El tratamiento teórico de dichas reacciones prevé una representación gráfica totalmente análoga a la mencionada.

Se ha encontrado, como cabía esperar, una dependencia de la velocidad específica con la temperatura que sigue la ecuación de Arrhenius, lo cual puede observarse en la tabla 5, y en las gráficas 2, 3 y 4, correspondientes. A partir de dichas gráficas se han determinado las energías de activación y factor de frecuencia, para cada paso.

Asimismo se ha estudiado la influencia de la concentración de ácido, encontrándose una correspondencia lineal, lo cual indica que la reacción es catalizada por el ácido (Tablas 6, 7 y 8 y gráficas 5, 6 y 7).

Si se toma como referencia la reacción en tricloroacético 1/M, las constantes de velocidad de hidrólisis de ATP, ADP y AMP se encuentran en la relación siguiente:

$$\frac{K_{ATP}}{K_{ADP}} = 4,5 \quad \frac{K_{ATP}}{K_{AMP}} = 30 \quad \frac{K_{ADP}}{K_{AMP}} = 6,5$$

por lo que mientras que, en estas condiciones, el ATP necesita solamente 25 minutos para reducir la concentración inicial a la mitad, el ADP lo hace en 112 minutos y el AMP en 750. Puede observarse que la velocidad de reacción es más reducida para cada caso conforme menos radicales fosfóricos hay unidos a la adenosina.

En otras condiciones varían las relaciones mencionadas ya que las energías de activación son diferentes para cada uno de los nucleótidos ensayados.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1.—BAILLEY, K.: *Biochem. J.*, 45, 479 (1949).
- 2.—MORELL, S. A., LIPTON, S. H. y FRIEDEN, S. H.: *Science*, 114, 333 (1951)
- 3.—HOH, F.: M. S. Tesis. Universidad de Wisconsin, 1956.
- 4.—KERR, S. E.: *J. Biol. Chem.*, 139, 131 (1941).
- 5.—LELOIR, L. F. y CARDINI, C. E.: en "Methods in Enzymology", Vol. III, página 840. Academic Press, New York, 1957.
- 6.—NANNINGA, L. B.: *J. Phys. Chem.*, 61, 1.144 (1957).
- 7.—LIEBECK, C. y JACQUEMOTTE-LOUIS, M.: *Bull. soc. chim. biol.*, 40, 759 (1958).
- 8.—BOWEN, W. T., y KERWIN, T. D.: *Proc. Spc. Exptl. Biol. Med.*, 88, 115 (1955).
- 9.—FRIESS, S. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 4.027, 5.521 (1952).
- 10.—FRIESS, S. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 323 (1953).
- 11.—BOCK, R. M.: "Adenine Nucleotides and Pyrophosphate compounds" en "The Enzymes", Vol. II, pág. 3, Academic Press, New York, 1960.
- 12.—MICHELSON, A. M. y TODD, A. R.: *J. Chem. Soc.* 2.476 (1949).
- 13.—CAPUTTO, R., LELOIR, L. F., CARDINI, C. E. y PALADINI, A. C.: *J. Biol., Chem.* 184 (1950).
- 14.—ROBINSON, R. y MACFARLANE, M. G.: en "Methoden der Mermenforschung", Vol. 1, pág. 296, Leipzig, 1941.
- 15.—TSUJIMOTO, T. y YAMODA, T.: *Wakayama Med. Repts.*, 3, 77 (1956).

- 16.—HOCK, A. y HUBBER, G.: *Biochem. Z.*, 328, 44 (1956).
- 17.—WILLIAMS, R. J. y LANSFORD, M.: Edit. "The Encyclopedia of Biochemistry", Jr. Reinhold Publishing Corporation, New York, 1967.
- 18.—PULLMAN, B. y PULLMAN, A.: *Radiation Res.*, Suppl. 2, 160 (1960).
- 19.—CARTER, C. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 1.466 (1950).
- 20.—BERGKVIST, R. y DEUTSCH, A.: *Acta Chem. Scand.*, 9, 1.398 (1955).
- 21.—COHN, W. E.: *Science*, 109, 377 (1949).
- 22.—COHN, W. E.: *Annal. N. Y. Acad. Sci.*, 57, 204 (1953).
- 23.—COHN, W. E.: "The Nucleic Acids", Vol. I, pág. 211, Academic Press, New York, 1955.
- 24.—COHN, W. E.: *J. Amer. chem. Soc.*, 72, 1.471 (1950).
- 25.—COHN, W. E. y CARTER, C. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 4.273 (1950).