

ARS PHARMACEUTICA

REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

Tomo XVI - Núm. 4

1975

Consejo de Redacción

Director:

Prof. Dr. D. Jesús Cabo Torres

Director Ejecutivo:

Prof. Dr. D. José Luis Valverde

Vocales:

Prof. Dr. D. Alberto Ramos
Cormenzana

Prof. Dr. D. Fermín Sánchez
de Medina Contreras

Prof. Dr. D. Antonio Cerezo
Galán

Secretario de Redacción:

Prof. Dr. D. Luis Bravo Díaz

Redacción y Administración:

Facultad de Farmacia,
Granada - España.

Dep. Legal, GR: núm. 17-1960

Imprime:

Gráficas del Sur, S. A.

Boquerón, 6

Granada 1975.

1.000 ejemplares

De conformidad con lo preceptuado en el artículo 21 de la vigente Ley de Prensa e Imprenta, se hace pública la relación de los *Organos Rectores* de esta revista.

Sumario

PAG.

TRABAJOS ORIGINALES DE LA FACULTAD

- Estudio cinético de hidrólisis ácida de ATP por técnicas de cambio iónico. Por J. M. Alvarez Pez y J. Thomas Gómez 479
- Estudio morfológico de la hembra, macho y ninfa de **Rallinyssus Candistigmus** Strandtmann, 1948 (**Acarina: Rhinonyssidae**), parásito de las fosas nasales de **Fulica Atra Atra** L. granadinas. Por D. Guevara-Benítez y J. M. Ubeda-Ontiveros 491
- Estudio polarográfico de los potenciales Redox de un derivado pteridínico. Por R. M. González Campos, L. Crovetto Montoya y J. Thomas Gómez 505
- Cuentas de la Real Botica desde 1571 a 1695, según documentación del Archivo del Palacio Real de Madrid. Por José-Luis Valverde y M.^a Carmen Vidal 515

TRABAJOS DE COLABORACION

- Separaciones cromatográficas sobre papeles impregnados en ácido 5,5'-Metilendisalicílico. Por F. Capitán, F. Salinas y J. L. Martínez 561
- Ensayos galénicos de formas sólidas orales de acción retardada: Revisión de técnicas y dispositivos. Por Quesada, E., Socías, M. S., Gómez, M. C., Suñé, J. M.^a y Cerezo, A. 569
- Crítica de Libros 597

TRABAJOS ORIGINALES DE LA FACULTAD

CATEDRA DE TECNICA FISICA Y FISICOQUIMICA APLICADA
Prof. Dr. J. THOMAS GOMEZ

ESTUDIO CINETICO DE HIDROLISIS ACIDA DE ATP POR TECNICAS DE CAMBIO IONICO

por

J. M. ALVAREZ PEZ y J. THOMAS GOMEZ

RESUMEN

Se ha estudiado la cinética de hidrólisis de ATP en ClH 1M a 60°C. Para ello se han medido las concentraciones de los productos de reacción a distintos tiempos, por espectrofotometría UV, después de separados mediante cromatografía de cambio iónico en columna de DEAE-Sephadex-A-25. Se ha confirmado que, en esas condiciones, la reacción sigue la secuencia: $ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP \rightarrow$ adenina, con pasos sucesivos de primer orden, cuyas constantes de velocidad se han determinado.

SUMMARY

It was been analyzed the kinetics of ATP acid hidrolisis. The UV spectrophotometry is the method for the evaluation of the reaction products, wich has been cromatographyed in ionic exchangers, DEAE-Sephadex-A-25. All steps are first order, wich rates are: $k_1 = 0,09023 \text{ m}^{-1}$; $k_2 = 0,03373 \text{ m}^{-1}$ and $k_3 = 0,00788 \text{ m}^{-1}$.

I.—ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

El nucleótido 5'-ATP es considerado como lábil, desde el punto de vista de su hidrólisis ácida, al igual que el 5'-ADP. Son estables los mononucleótidos y algunos dinucleótidos. Según A. M. MICHELSON y A. R. TODD (1), el adenosín 5' monofosfato (AMP) es hidrolizado por ácido 0,1N a 100°C con un valor de $k \times 10^3 = 0,26 \text{ m}^{-1}$. En las mismas condiciones anteriores R. CAPUTTO, L. F. LELLOIR, C. E. CARDINI y A. C. PALADINI (2) encuentran que el ATP se hidro-

liza con un valor de $k \times 10^3 = 38 \text{ m}^{-1}$. También ha sido estudiada la hidrólisis ácida del ATP por S. E. KERR (3) quien indica que los dos enlaces pirofosfatos del ATP y el enlace pirofosfato del ADP se escinden por hidrólisis durante 7 minutos en ClH 1N a 100°C, formando AMP y fosfato inorgánico. K. LOHMANN (4), (5), (6), comprueba que se requieren 7 minutos para producir la hidrólisis de los 2/3 de la cantidad inicial de ATP en las condiciones anteriores, al tanto que C. H. FISKE y Y. SUBBAROW (7) establecen un tiempo de 15 minutos. Esta discrepancia ha sido estudiada por T. TSUJIMOTO y T. YAMABA (8) que siguen el curso de la reacción de hidrólisis del ATP en ClH 1N a 100°C, encontrando que se liberan las dos terceras partes del fosfato total en un tiempo de 7 minutos. Parece ser que la hidrólisis de la ribosa-5-fosfato es la causa de la diferencia entre los valores hallados anteriormente.

II.—PARTE EXPERIMENTAL

En nuestro trabajo hemos realizado el estudio de la marcha general de la reacción por cromatografía de cambio iónico en columna y en capa delgada.

Siguiendo el método cromatográfico propuesto por nosotros (9) se observó que las fracciones que se separan de las muestras de reacciones catalizadas por ácido clorhídrico 1 N corresponden a ATP, ADP, AMP y adenina. La pureza e identidad de la composición de las citadas fracciones fueron demostradas por cromatografía en capa delgada de cambio iónico en DEAE-celulosa DE 41.

De las experiencias mencionadas cabe deducir que la marcha de la reacción es la anteriormente descrita, en otras condiciones, por T. TSUJIMOTO y T. YAMABA (8).

El intercambiador en la técnica cromatográfica utilizado es DEAE-Sephadex-A-25. El hinchamiento del cambiador, así como el equilibrado de la columna se realiza con tampón tris-ClH de pH 8,3 y 0,1 M en tris; la columna empleada tiene $1 \text{ cm}^2 \times 20 \text{ cm}$ de altura; la compactación de ésta se consigue por tica debida a una columna de tampón de 10 cm de altura sobre la superficie del intercambiador. La elución se efectúa a base de un gradiente continuo de fuerza iónica. La velocidad de elución se ha regulado con una bomba de flujo constante, siendo el valor de 5 minutos para 1 ml el adoptado para que la separación se logre satisfactoriamente. La recogida de muestras se realizó con un colector

de fracciones Gilson; para conseguir una sensibilidad aceptable, ha bastado recoger fracciones de 5 ml (9).

Para obtener la cantidad de μ moles de cada derivado adenínico separado se ha usado la expresión:

$$n.^\circ \mu\text{moles} = \frac{5}{\epsilon} \sum E_i$$

Siendo $\sum E_i$ la suma de absorciones espectrofotométricas de cada una de las fracciones que componen el pico de elución de una sustancia; ϵ es el coeficiente de extinción molar de dicha sustancia. El $n.^\circ 5$ es el volumen en ml de cada fracción. Con el método seguido se pretende que el mismo ácido que cataliza la hidrólisis sea parte integrante del tampón que se utiliza en la separación cromatográfica; así se que acompaña al proton catalizador. También se aprecia la eficiencia de las separaciones conseguidas al ha que su hidrólisis es prácticamente nula.

De acuerdo con lo mencionado, se ha calculado la cantidad de disolución de tris y la molaridad que ha de tener ésta, para que al añadir una cierta cantidad del producto de la reacción, se forme tampón tris-ClH, de pH 8,3 y 0,08 M en tris. Esta molaridad mencionada difiere en 0,02 moles de la predicha para el tampón equilibrante; la diferencia resulta provocada por el aumento de la fuerza iónica al incorporarse los nucleótidos a la disolución. Al sumarse ese valor al 0,1 enunciado con anterioridad, se proporciona una cifra demasiado elevada y la adsorción por parte del cambiador no es total ya que a esa fuerza iónica los derivados adenínicos comienzan a disociarse de éste.

El volumen extraído del producto de la reacción es 0,2 ml, que se añade a la disolución formada por 3,5 ml de tris 0,2 M y 4,95 ml de agua, formándose de esta forma el tampón mencionado. Estas cantidades se pueden variar proporcionalmente. Se ha escogido el valor 0,3 ml para los productos de reacción, teniendo en cuenta la conveniencia de que el volumen agregado a la columna no sea excesivamente grande.

Se han pesado 0,035 g de ATP que se vierten sobre 10 ml de ClH 1 M a la temperatura de 60°C. Las muestras de la reacción se han tomado a los siguientes tiempos: 5 m, 10 m, 20 m, 30 m, 60 m, 120 m, 240 m y 480 m.

Se realiza la separación cromatográfica descrita, así como los cálculos. Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla I.

TABLA I

Tiempo de reacción	μ moles/0,3 ml de adenina	μ moles/0,3 ml de AMP	μ moles/0,3 ml de ADP	μ moles/0,3 ml de ATP
5	0,088	0,101	0,353	0,832
10	0,178	0,200	0,552	0,527
20	0,289	0,341	0,583	0,215
30	0,366	0,401	0,531	0,087
60	0,741	0,496	0,226	0,000
120	1,131	0,347	0,000	0,000
240	1,324	0,147	0,000	0,000
480	1,443	0,000	0,000	0,000

La representación gráfica de la marcha general de la reacción se expone en la figura 1.

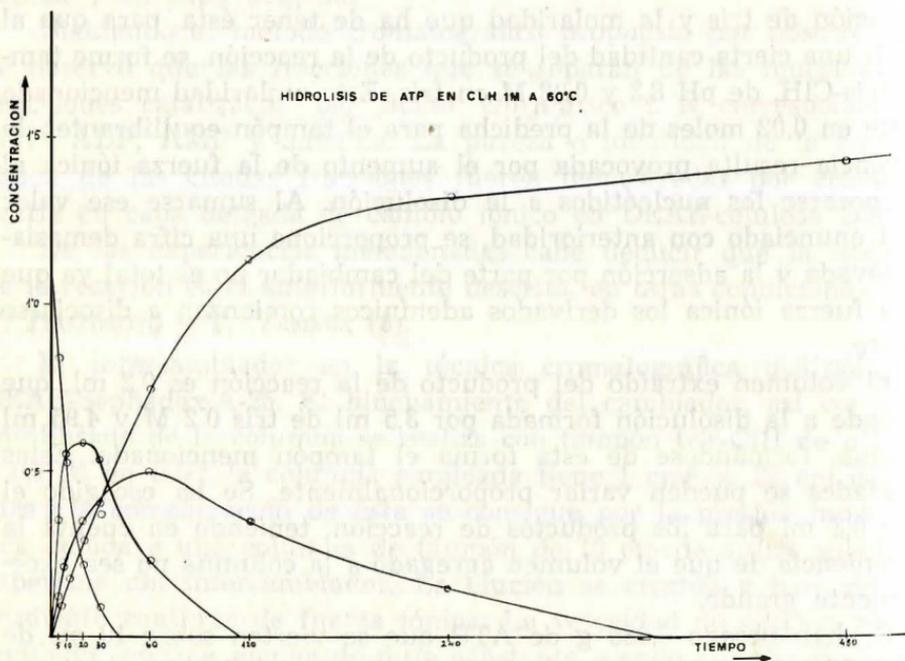


Fig. 1

En primer lugar se ha ensayado, por el método gráfico, si la reacción sigue una cinética de primer orden. Para ello se han representado los valores de $\log (a-x)$ en función del tiempo, figura 2.

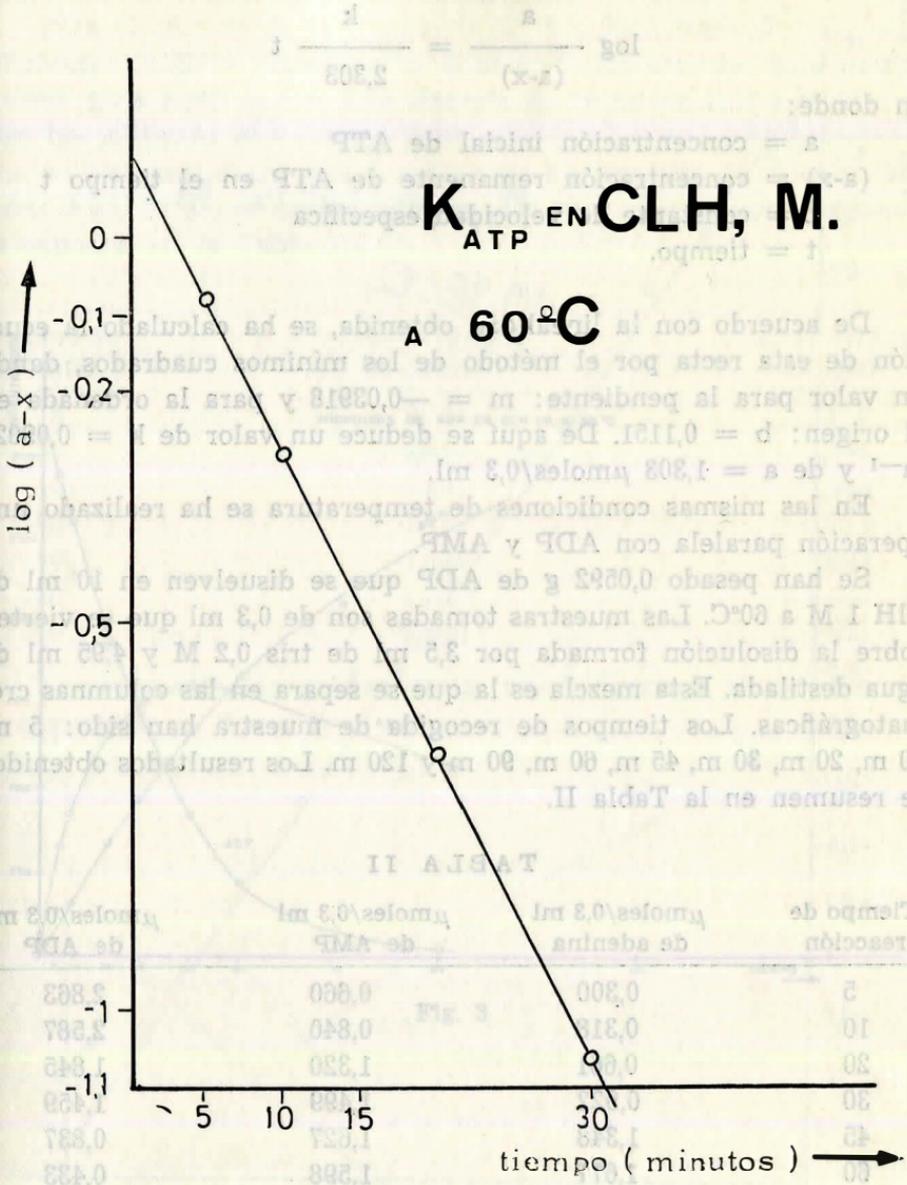


Fig. 2

TABLA II

tiempo de reacción	Amoles/0,3 ml de adenina	Amoles/0,3 ml de AMP	Amoles/0,3 ml de ADP
5	0,300	0,860	2,863
10	0,318	0,840	2,587
30	0,66	1,330	1,845
30	0	1,08	1,459
45	1,34	1,627	0,837
60	1,04	1,588	0,433
90	2,021	1,383	0,183
120	2,585	1,195	0,082

La representación de la marcha general de la reacción se expone en la figura 3.

Seguidamente se ha calculado la constante de velocidad específica para el paso de $ATP \rightarrow ADP + P_i$ haciendo aplicación de la expresión:

$$\log \frac{a}{(a-x)} = \frac{k}{2,303} t$$

en donde:

a = concentración inicial de ATP

(a-x) = concentración remanente de ATP en el tiempo t

k = constante de velocidad específica

t = tiempo.

De acuerdo con la linealidad obtenida, se ha calculado la ecuación de esta recta por el método de los mínimos cuadrados, dando un valor para la pendiente: $m = -0,03918$ y para la ordenada en el origen: $b = 0,1151$. De aquí se deduce un valor de $k = 0,09023 \text{ m}^{-1}$ y de $a = 1,303 \text{ } \mu\text{moles}/0,3 \text{ ml}$.

En las mismas condiciones de temperatura se ha realizado una operación paralela con ADP y AMP.

Se han pesado 0,0592 g de ADP que se disuelven en 10 ml de ClH 1 M a 60°C. Las muestras tomadas son de 0,3 ml que se vierten sobre la disolución formada por 3,5 ml de tris 0,2 M y 4,95 ml de agua destilada. Esta mezcla es la que se separa en las columnas cromatográficas. Los tiempos de recogida de muestra han sido: 5 m, 10 m, 20 m, 30 m, 45 m, 60 m, 90 m y 120 m. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla II.

TABLA II

Tiempo de reacción	$\mu\text{moles}/0,3 \text{ ml}$ de adenina	$\mu\text{moles}/0,3 \text{ ml}$ de AMP	$\mu\text{moles}/0,3 \text{ ml}$ de ADP
5	0,300	0,660	2,863
10	0,318	0,840	2,587
20	0,661	1,320	1,845
30	0,922	1,499	1,459
45	1,348	1,627	0,837
60	1,677	1,598	0,433
90	2,021	1,383	0,182
120	2,535	1,195	0,062

La representación de la marcha general de la reacción se expone en la figura 3.

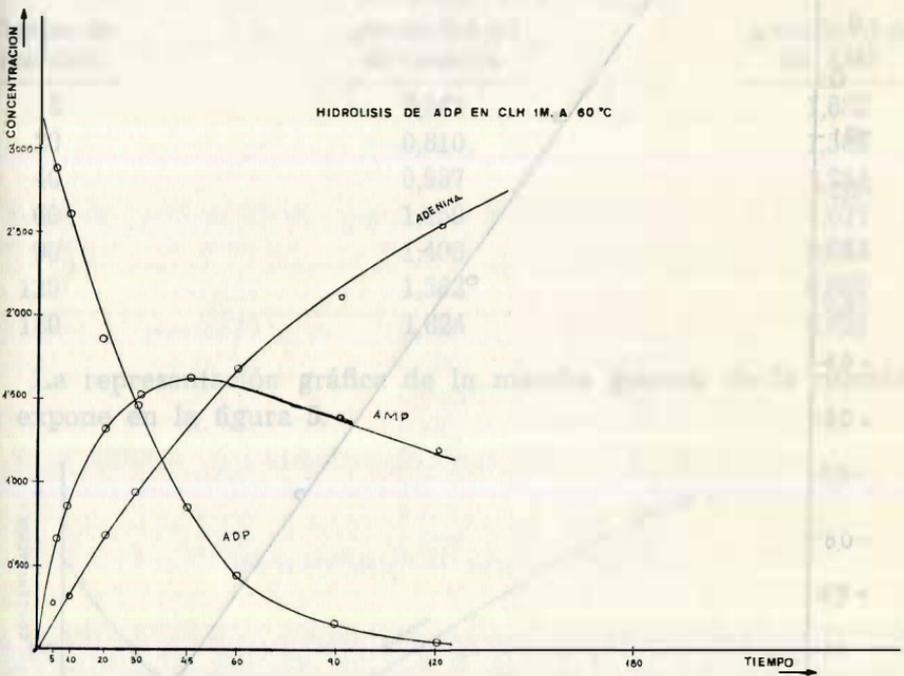


Fig. 3

Se realiza la representación gráfica de $\log (a-x)$ en función de t , obteniéndose la figura 4.

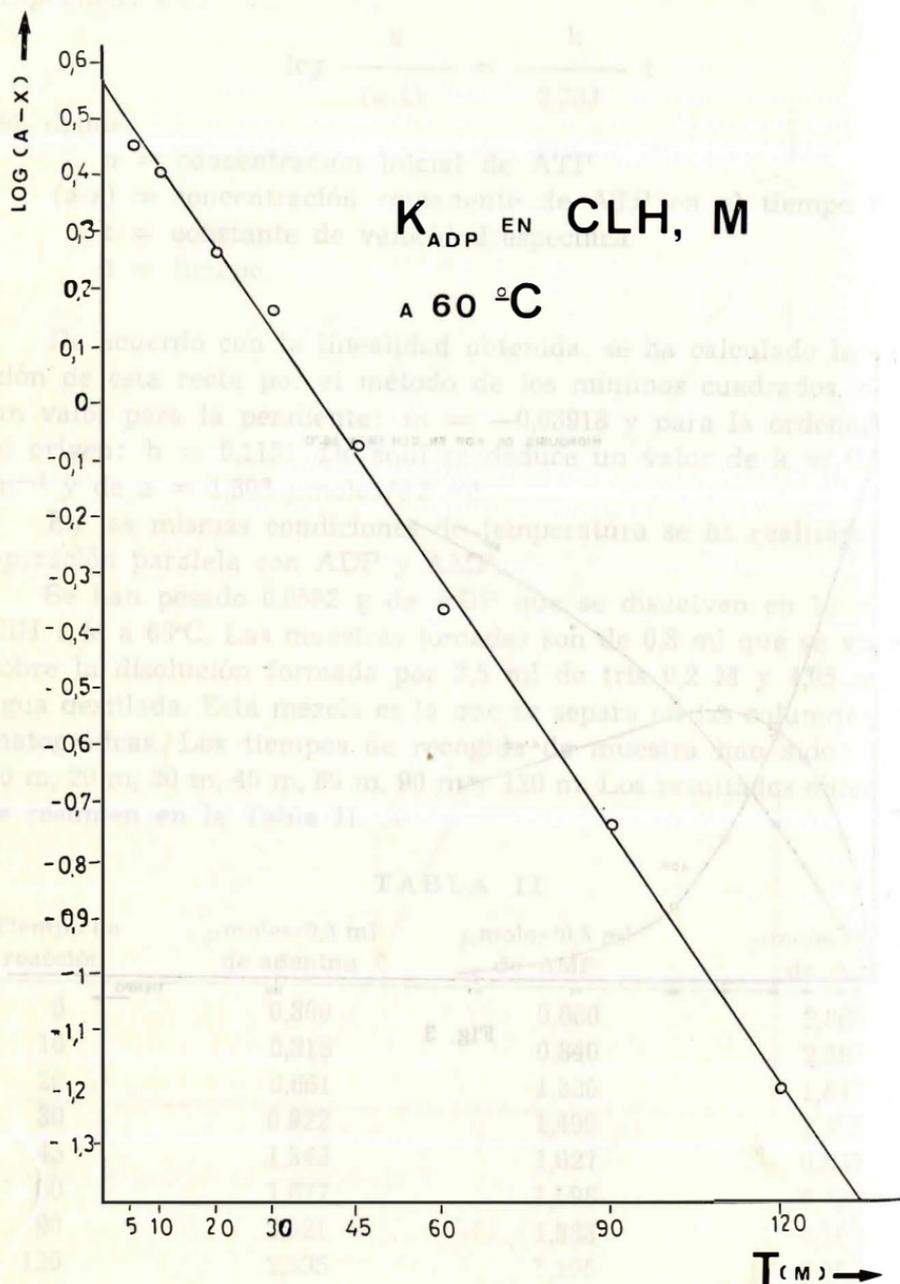


Fig. 4

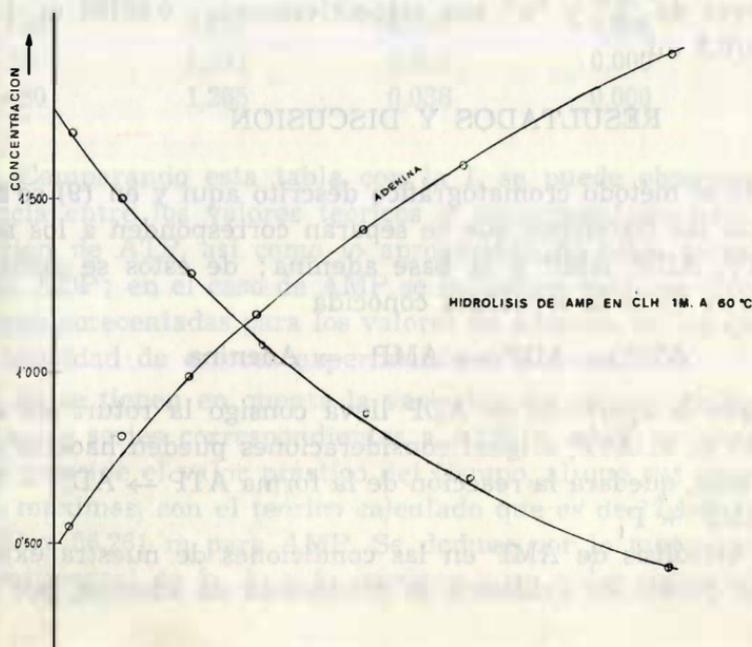
Se ha calculado el valor de "k" y "a", por el mismo método ya citado, obteniéndose: $k = 0,03373 \text{ m}^{-1}$ y $a = 3,628 \text{ } \mu\text{moles}/0,3 \text{ ml}$. Este valor de k se refiere a la reacción $\text{ADP} \rightarrow \text{AMP} + \text{P}_i$.

Para el cálculo de la constante de velocidad específica del paso siguiente: $\text{AMP} \rightarrow \text{Adenina} + \text{Ribosa-5-fosfato}$, se han pesado $0,03965 \text{ g}$ de AMP que se han disuelto en 10 ml de $\text{ClH } 1 \text{ M}$ a 60°C . Con las muestras de la reacción se efectúan las mismas operaciones que en los casos anteriores. Los tiempos de recogida de muestra han sido: 5 m , 20 m , 40 m , 60 m , 90 m , 120 m y 180 m . Los resultados se exponen en la Tabla III.

TABLA III

Tiempo de reacción	$\mu\text{moles}/0,3 \text{ ml}$ de adenina	$\mu\text{moles}/0,3 \text{ ml}$ de AMP
5	0,542	1,682
20	0,810	1,503
40	0,987	1,284
60	1,150	1,077
90	1,406	0,883
120	1,582	0,688
180	1,824	0,421

La representación gráfica de la marcha general de la reacción se expone en la figura 5.



Se hace la representación gráfica de $\log (a-x)$ frente a t , obteniéndose la línea de la figura 6.

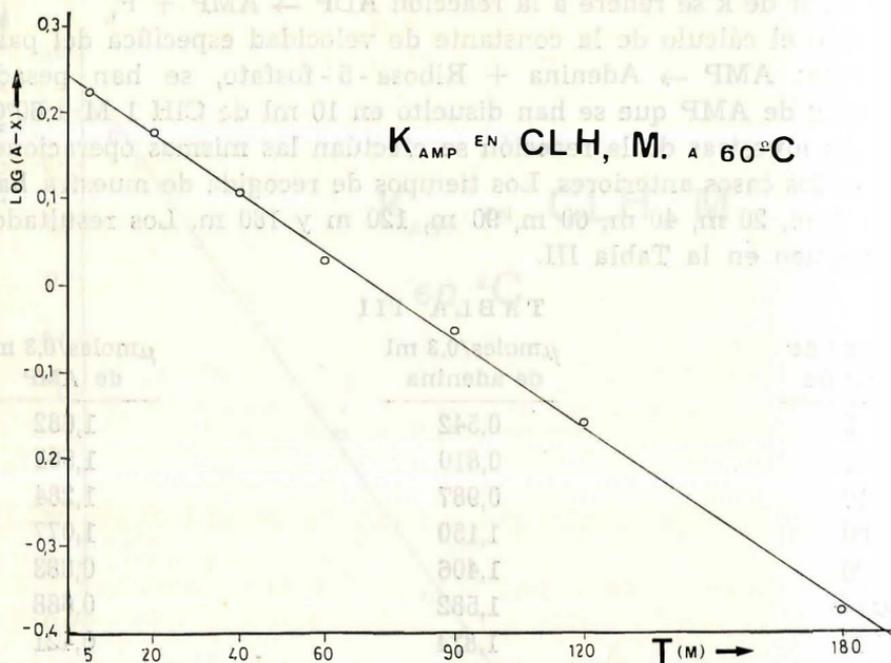
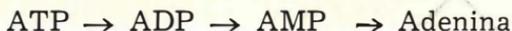


Fig. 6

Los valores de "k" y "a" son respectivamente: $0,00788 \text{ m}^{-1}$ y $1,757 \mu\text{moles}/0,3 \text{ ml}$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Siguiendo el método cromatográfico descrito aquí y en (9) se ha observado que las fracciones que se separan corresponden a los nucleótidos ATP, ADP, AMP y la base adenina; de estos se deduce que la reacción tiene la secuencia conocida



Puesto que la aparición de ADP lleva consigo la rotura de un enlace fosfato en el ATP, e igual consideraciones pueden hacerse en el paso siguiente, quedará la reacción de la forma $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$ y $\text{ADP} \rightarrow \text{AMP} + \text{P}_i$

Para la hidrólisis de AMP en las condiciones de nuestra experiencia, se ha puesto en evidencia la producción de adenina, por lo

que la secuencia de este paso debe ser AMP \rightarrow adenina + Ribosa-5-fosfato. Este resultado está de acuerdo con los obtenidos por T. TSUJIMOTO y T. YAMABA (8).

Para los tres pasos consecutivos se ha demostrado que la reacción sigue una cinética de primer orden. Este hecho se puede observar también por la constancia de los períodos de semitransformación.

Integrando las ecuaciones que rigen la velocidad de reacción en cada paso se obtienen las expresiones para las concentraciones de cada uno de los productos resultantes en función de los valores de k_1 , k_2 y k_3 calculados y del tiempo de reacción. Haciendo aplicación de dichas expresiones y de los valores calculados para las constantes de velocidad específica se obtiene la concentración a los distintos tiempos de reacción de cada uno de los productos.

TABLA IV

Tiempo de reacción	$\mu\text{mcles}/0,3 \text{ ml}$ de adenina	$\mu\text{mcles}/0,3 \text{ ml}$ de AMP	$\mu\text{moles}/0,3 \text{ ml}$ de ADP	$\mu\text{moles}/0,3 \text{ ml}$ de ATP
5	-0,157	0,198	0,432	0,831
10	-0,223	0,357	0,641	0,528
20	-0,213	0,585	0,717	0,214
30	-0,107	0,723	0,600	0,087
60	0,199	0,834	0,265	0,005
120	0,637	0,630	0,036	0,000
240	1,047	0,256	0,000	0,000
480	1,265	0,038	0,000	0,000

Comparando esta tabla con la I, se puede observar la concordancia entre los valores teóricos y experimentales para la concentración de ATP, así como lo aproximado de estos pares de valores para ADP; en el caso de AMP se muestran mayores diferencias que se ven acrecentadas para los valores de adenina, en las que se suman la totalidad de errores experimentales y de cálculo.

Si se tienen en cuenta la variación de valores para las series correspondientes a ADP y AMP, se puede observar que coincide el valor práctico del tiempo, al que sus concentraciones son máximas, con el teórico calculado que es de 17,458 minutos para ADP y 56,261 m para AMP. Se deduce por lo tanto que el cálculo experimental de k_1 , k_2 y k_3 conduce a un valor correcto del tiempo

