



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA

**ESTUDIO TERMODINÁMICO Y CINÉTICO DE LA
INTERACCIÓN POLÍMERO-LIGANDO.**

Tesis Doctoral presentada por

Elia María Grueso Molina

Sevilla, 2010.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA.

**ESTUDIO TERMODINÁMICO Y CINÉTICO DE LA
INTERACCIÓN POLÍMERO-LIGANDO.**

Tesis Doctoral
En Ciencias Químicas
(Química Física)



Fdo. Elia María Grueso Molina.

FRANCISCO SÁNCHEZ BURGOS Y RAFAEL PRADO GOTOR

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo se ha realizado bajo su dirección en el Departamento de
Química Física de la Universidad de Sevilla.



Fdo.: Francisco Sánchez Burgos
Catedrático del Departamento de
Química Física de la Universidad
de Sevilla.



Fdo.: Rafael Prado Gotor
Profesor Titular del Departamento
de Química Física de la Universidad
de Sevilla.

ALFREDO MAESTRE ÁLVAREZ, Profesor Titular y Director del Departamento de
Química Física de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA:

que la Tesis Doctoral titulada: *Estudio Termodinámico y Cinético de la interacción polímero-ligando*, presentada por D^a Elia María Grueso Molina para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, se ha realizado en los laboratorios de este Departamento, bajo la dirección de los profesores, D. Francisco Sánchez Burgos y D. Rafael Prado Gotor.

Sevilla, 20 de Marzo de 2010.



Fdo. : Alfredo Maestre Álvarez.

PRESENTACIÓN.

Este trabajo es el resultado del esfuerzo de muchas personas. Sin ellas hubiera sido difícil llevarlo a cabo.

Así, en el capítulo sobre la cinética y la termodinámica de la interacción ADN/pireno intervinieron, además de los directores y la doctoranda, los componentes del grupo de la Universidad de Pisa que contribuyeron decisivamente en la obtención e interpretación de los datos cinéticos.

El segundo y tercer capítulo no fueron co-dirigidos, sino dirigidos, separadamente, por Francisco Sánchez Burgos y Rafael Prado Gotor, respectivamente.

Pero la intervención del Profesor D. Emilio Roldán, en relación con el segundo capítulo, fue importante. Sin él hubiera sido muy difícil preparar el sistema de medida empleado en el seguimiento de la cinética de la interacción tensioactivo/ADN.

También hay que agradecer a la Profesora D^a Soledad Penades, el habernos mostrado el camino para la síntesis de los nanoclusters de oro. Su ayuda fue fundamental para apreciar y conocer las propiedades de estos nanosistemas.

Los Directores.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a:

A todos los miembros del Departamento de Química y Química Industrial de la Universidad de Pisa, y muy en especial al Profesor D. Fernando Secco y las Profesoras D^a. Marcella Venturini y D^a. Tarita Biver, por su gran ayuda en los aspectos cinéticos y de determinación de los mecanismos de reacción, además de su constante disposición y apoyo humano.

Al Profesor D. Emilio Roldán, por su inestimable ayuda en la puesta a punto del método potenciométrico para el seguimiento de la cinética de los tensioactivos al ADN y su apoyo personal y dirección en el desarrollo de este apartado de la tesis.

A la Profesora D^a Soledad Penades y a todos los miembros de su grupo de investigación, en especial a D. David Alcántara y al Profesor D. Jesús de la Fuente, por su cooperación durante mi aprendizaje de los métodos de síntesis y caracterización de las nanopartículas de oro.

Al servicio de microscopía del CITIUS de la Universidad de Sevilla, concretamente a D. Francisco Varela y D^a. Cristina Vaquero por la formación que me han proporcionado en relación al uso de la microscopía TEM y SEM.

A todos los miembros del grupo de cinética del Profesor Julián Rodríguez Velasco, y en especial a los Profesores/as D^a. Pilar López Cornejo, D^a. Pilar Pérez Tejeda y D. Rafael Jiménez Sindreu, que me han acogido en su grupo desde el primer momento. Gracias también por los ánimos que me han dado en los momentos difíciles, su gran apoyo, y disposición a ayudarme en todo momento.

A todos los miembros del Departamento de Química Física de la Universidad de Sevilla, al que pertenezco, por su apoyo y constante disposición; así como a los Departamentos de Química Orgánica y Bioquímica, por su colaboración y por facilitarme siempre el uso de sus instalaciones, tan necesarias en todo lo relacionado con los aspectos de síntesis.

...Y muy especialmente quiero dar las gracias a mis directores de tesis, Profesores D. Francisco Sánchez Burgos y D. Rafael Prado Gotor, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y por depositar su confianza en mi tarea, así como por su inestimable labor de dirección y de formación científica, imprescindibles para la realización de este trabajo.

Esta Tesis Doctoral se ha realizado bajo el soporte económico de la Junta de Andalucía.

ÍNDICE.

ÍNDICE.

0. Prefacio.....	1
1. Estudio Termodinámico y Cinético de la Interacción 1-Pirenocarboxialdehido-ADN.....	13
1.1. Introducción y Antecedentes.....	14
1.2. Materiales y Métodos.....	28
1.2.1. Materiales.....	28
1.2.2. Métodos.....	29
1.3. Resultados y Discusión.....	36
1.3.1. Estudio fisicoquímico y estructural del modo de unión del 1-Pyrenocarboxialdehido al ADN: Evidencias de intercalación.....	36
1.3.2. Efectos del medio en la termodinámica de interacción del 1-PyCHO con ADN: Cuantificación de las interacciones del ADN con sales y codisolventes.....	51
1.3.3. Efectos del medio en la cinética de interacción del 1-PyCHO con ADN: Determinación del mecanismo de reacción.....	72
1.4. Referencias.....	87
2. Estudio Termodinámico y Cinético de la interacción ADN-Tensioactivo.....	92
2.1. Introducción y Antecedentes.....	93
2.2. Materiales y Métodos.....	116
2.2.1. Materiales.....	116
2.2.2. Métodos.....	118
2.3. Resultados y Discusión.....	123
2.3.1. Estudio Termodinámico de la interacción ADN-Tensioactivo.....	123

2.3.2. Estudio de la cinética de interacción ADN-Tensioactivo.....	140
2.4. Referencias.....	153
3. Interacciones no-covalentes Nanopartículas-ADN: Estudio Cinético y Termodinámico.....	158
3.1. Introducción y Antecedentes.....	159
3.2. Materiales y Métodos.....	187
3.2.1. Materiales.....	187
3.2.2. Métodos.....	189
3.3. Resultados y Discusión.....	194
3.3.1. Estudio Termodinámico de la interacción ADN/AuNPs.....	194
3.3.2. Estudio cinético de la interacción no-covalente ADN/AuNPs.....	208
3.4. Referencias.....	222
4. Conclusiones.....	227
5. Apéndices.....	231
5.1. Apéndice I. Procedimiento de ajuste de los datos termodinámicos al modelo de sigmoidea.....	232
5.2. Apéndice II. Parámetros de ajuste al modelo de sigmoidea obtenidos en la determinación de las diferentes constantes termodinámicas de interacción ADN/1-PyCHO.....	235
5.3. Apéndice III. El modelo de dos estados para la interacción ADN-ligando, en presencia de agentes que modifican la estructura del ADN: una simplificación.....	239
5.4. Apéndice IV. Valores de los inversos de los tiempos de relajación corto, $1/\tau_1$ y largo, $1/\tau_2$, en función de la concentración de ADN y de alcohol, para el sistema 1-PyCHO-ADN.....	243

5.5. Apéndice V. Valores de los inversos de los tiempos de relajación corto, $1/\tau_1$ y largo, $1/\tau_2$ en función de la concentración de ADN y sal, correspondientes al sistema ADN-CTAB.....	246
5.6. Apéndice VI. Valores de los inversos de los tiempos de relajación corto, $1/\tau_1$ y largo, $1/\tau_2$, para cada concentración de ADN y sal, correspondientes al sistema ADN-AuNPs.....	248

PREFACIO

Prefacio.

El reconocimiento molecular de proteínas y ácidos nucleicos por pequeños ligandos es un área de interés general. En el estudio de esta materia existe una estrecha relación entre la química, la física y la biología, ya que las interacciones que implican a moléculas biológicas se entienden mejor si se describen en términos químicofísicos. Los diferentes tipos de ligandos que forman complejos con los ácidos nucleicos pueden ser agua, simples iones, moléculas orgánicas de tamaño intermedio y hasta proteínas. La actividad biológica de los ácidos nucleicos no sólo depende de las propiedades termodinámicas de los complejos ADN-ligando, pueden estar condicionadas por la cinética de la formación de estos complejos. Por eso, nos ha parecido de interés abordar un estudio termodinámico y cinético de las interacciones del ADN con diferentes tipos de ligandos: agentes intercalantes, tensioactivos y nanopartículas.

El ADN es un polímero biológico natural. La estructura primaria del ADN está definida por su estructura de enlaces covalentes y la secuencia de nucleótidos. Los ácidos nucleicos son largos polímeros lineales constituidos por muchas unidades monoméricas llamadas nucleótidos. Cada nucleótido está constituido por tres componentes: una molécula de pentosa (polisacárido con cinco átomos de carbono), una molécula de ácido fosfórico y una base heterocíclica nitrogenada. Las bases en el ARN y ADN son las responsables, a través de la secuencia y de los acoplamientos, de la conservación y transmisión de la información genética. Dichas bases son: púricas y pirimidínicas. En el ADN, las bases púricas son la adenina y la guanina, mientras que las bases pirimidínicas son la citosina y la timina; en el ARN, el uracilo sustituye a la timina. Los átomos de oxígeno y de nitrógeno de cada base pueden actuar como donadores o aceptores formando puentes de hidrógeno, siendo ésta una de las interacciones fundamentales que mantiene unida la doble hélice.

La estructura secundaria y terciaria de los ácidos nucleicos determina su conformación. En cambio, la estructura primaria determina la configuración de la macromolécula. Esta configuración depende del medio en que se encuentra (temperatura, pH, concentración salina, grado de hidratación, interacciones con otras moléculas, etc...). Como resultado de la unión de distintos ligandos a una macromolécula, pueden originarse cambios conformacionales en la misma. Así, a modo de ejemplo, puede indicarse que la unión de tensioactivos al ADN produce la compactación de la biomolécula, desde su forma extendida hasta la globular compacta.¹

La doble hélice se mantiene unida, fundamentalmente, por dos tipos de fuerzas: una de ellas, que ya se ha mencionado, son las derivadas de los enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarias de las dos cadenas. La otra fuente de estabilidad de la doble hélice son las interacciones de apilamiento de las bases (interacciones π -stacking): los pares de bases se encuentran parcialmente superpuestos, de forma que esta disposición favorece las interacciones de apilamiento de parejas de bases situadas entre planos vecinos.² A diferencia de la dependencia de la naturaleza de las bases que presentan las interacciones de puentes de hidrógeno (en el caso del par G-C existen tres enlaces de hidrógeno por cada par de bases, mientras que en el caso de la pareja A-T, sólo dos³), las interacciones de apilamiento son prácticamente inespecíficas. El fenómeno de apilamiento (stacking) ha sido atribuido a interacciones electrostáticas, efectos hidrofóbicos e interacciones de dispersión o de London.⁴

Las interacciones de ligandos con macromoléculas están implicadas en una amplia variedad de procesos fisiológicos⁵, tales como biosíntesis y bioactividad de proteínas⁶, regulación y expresión génica.⁷ Por otra parte, algunos ligandos actúan como antibióticos que pueden unirse directamente al ADN bloqueando la transcripción.⁸ También pueden participar los ligandos en procesos de terapia génica⁹ o de transferencia de genes.¹⁰ Destaca, por ejemplo, la interacción del ADN con sondas de características clínicas y farmacológicas, como las de la familia de las aminoacridinas, con propiedades antisépticas y antimalarias, o de agentes mutágenos como la proflavina.¹¹ Muchas formas de cáncer y enfermedades infecciosas se producen por ataques de agentes externos al ADN que pueden producir mutaciones. La unión covalente de pequeñas moléculas orgánicas e inorgánicas (agentes alquilantes, iones metálicos pesados, complejos metálicos, etc...) a los ácidos nucleicos, puede causar varios tipos de daños en la macromolécula que, en última instancia, podrían impedir la correcta conservación y transmisión del código genético. Efectos de importancia similar podrían ser causados por pequeñas moléculas capaces de unirse no-covalentemente a los ácidos nucleicos.

En el caso específico de la unión de pequeños ligandos al ADN, ha existido una estrecha relación entre los estudios teóricos y experimentales, de forma que en la actualidad es posible dar una descripción detallada de cómo un complejo ADN-ligando se comporta a nivel molecular. Entre las técnicas que han proporcionado una respuesta a

esta cuestión, destacan la cristalografía de rayos X, la espectroscopia de RMN, el dicroísmo lineal y circular, y la mecánica cuántica. En relación con los avances realizados en el entendimiento de la formación de complejos de ADN con pequeños ligandos desde el punto de vista de la mecánica cuántica, cabe destacar la determinación del potencial electrostático en el entorno del ADN. El conocimiento de este potencial ha ayudado considerablemente en la predicción de la reactividad de la molécula frente a ligandos cargados (como ciertas sondas, tensioactivos y sales), así como en la predicción de los sitios de la molécula de mayor reactividad. Así, los estudios teóricos de Pullman¹² pusieron de relieve que el campo eléctrico en torno al ADN es fuertemente dependiente de la geometría de la doble hélice, y en el caso particular del ADN B, se encontró que este campo es más intenso a lo largo de las superficies de los surcos principal (mayor groove) y secundario (minor groove). Estos sitios de máximo potencial constituyen puntos clave para la unión de ligandos cargados positivamente o altamente bipolares.

Para analizar las interacciones no covalentes entre el ADN y pequeños ligandos, resulta adecuado considerar la doble hélice desde la perspectiva de un ligando. De acuerdo con esta perspectiva, ésta última puede verse como la superposición de dos partes bien diferenciadas: una parte exterior, relativamente homogénea, compuesta por los grupos fosfato cargados negativamente; y una organización interior, más heterogénea, compuesta por las parejas de bases apiladas. Dichas bases se encuentran a distancias de van der Waals y parcialmente superpuestas (debido a las interacciones π -stacking de las bases y de enlace de hidrógeno, fundamentalmente). Esta disposición interior es accesible a la unión de ligandos, tanto a través del surco principal (“major groove”), como del surco secundario (“minor groove”), en función del tamaño del ligando. La parte interior de la doble hélice se caracteriza por tener una secuencia heterogénea y por ello, una conformación local heterogénea, a la que los ligandos pueden unirse, tanto por intercalación como por interacciones específicas, con los grupos funcionales accesibles de las bases.

En relación con las interacciones (débiles) no-covalentes de pequeños ligandos con el ADN, pueden distinguirse en la bibliografía cuatro importantes modos de unión: unión externa (“external binding”), intercalación, unión electrostática y la unión a los surcos principal y/o secundario del ADN (“major groove” y “minor groove”). Nótese que esta clasificación es una simplificación de la realidad ya que en la práctica, todas las

interacciones que existen en la naturaleza son de carácter electrostático (salvo las magnéticas, insignificantes en este caso). Teniendo en cuenta esta salvedad, a continuación, se describen, brevemente, algunas características fundamentales de los distintos modos de unión de ligandos al ADN:

1) **Unión Externa**

Stone y Bradley en 1961 postularon la formación de agregados de la sonda naranja de acridina, apilados y enlazados externamente en torno al polianión, ADN.¹³ Estudios recientes han demostrado la existencia de sondas que forman agregados bien definidos con la doble hélice, formados por el apilamiento de la propia sonda en la parte externa del esqueleto de los ácidos nucleicos. En este tipo de compuestos, el ADN actúa como una plataforma que permite la agregación.¹⁴ Cuando se presenta este modo de unión, a diferencia de lo que ocurre en el caso de la intercalación y la unión a los surcos (donde las interacciones base-ligando son las de mayor importancia), las interacciones de apilamiento ligando-ligando son las que juegan mayor importancia.

Este modo de asociación no intercalativo se englobó, inicialmente, dentro del modo de unión por interacción electrostática.¹⁵ Sin embargo, el hecho de que este tipo de asociación ADN-ligando implique cambios en el espectro de absorción del complejo (desplazamiento hacia el azul del espectro de la sonda), permitió su distinción de la llamada asociación puramente electrostática. Además, es de destacar que las constantes de equilibrio asociadas a este tipo de unión, aunque inferiores a las correspondientes a modos de interacción intercalativos, son mayores que las que se encuentran generalmente en el caso de la asociación por interacción puramente electrostática ($\Delta G = -12.6 \text{ kJmol}^{-1}$).¹⁶

Por otro lado, resulta interesante que, tanto la asociación externa como la intercalación, requieren que el ligando sea una molécula plana y aromática, por lo que, estos dos modos de unión, pueden observarse en un mismo tipo de sonda o ligando. El predominio de un tipo u otro de asociación depende de las concentraciones relativas del ligando ([L]) y el receptor ([ADN]). Así, en general, para grandes valores del cociente $[\text{ADN}]/[\text{L}]$, predominan los procesos intercalativos: sólo unas pocas moléculas de ligando se unen al esqueleto del polímero, alejadas unas de otras, estando más impedidas las interacciones ligando-ligando, pero no así las interacciones base-ligando. La situación inversa se produce para pequeños valores de la razón $[\text{ADN}]/[\text{L}]$, ya que

bajo estas circunstancias, la molécula de ligando unida inicialmente, tiende a apilarse conjuntamente en torno al esqueleto del polímero.¹⁷

2) Intercalación.

Se define como intercalación, el proceso de introducción de moléculas con estructura aromática y plana entre las parejas de bases de los ácidos nucleicos. A comienzos de los años 70, la resolución de la estructura cristalina del complejo 2:1 deoxiguanosina-actinomicina, llevado a cabo por Sobell y colaboradores, sentó las bases para el modelo de intercalación, basándose en consideraciones puramente geométricas.¹⁸ Posteriormente, la disponibilidad de ADN y ARN comercial, permitió un estudio más profundo, de esta cuestión mediante estudios cristalográficos y de RMN. Estos estudios revelaron la existencia de un cambio en la estructura geométrica del enlace azúcar-fosfato, requerida generalmente para abrir la cavidad necesaria para la intercalación del ligando. Como los pares de bases deben separarse verticalmente (unstack) para permitir la intercalación, el esqueleto azúcar-fosfato se distorsiona y la estructura regular de la hélice se modifica. De acuerdo con este modelo, la cadena de ADN debe alargarse al aumentar la cantidad de agente intercalante incorporado. De forma general, en el caso del ADN en la conformación B, el ángulo de torsión del azúcar en la cara 5' cambia desde la configuración C_{2'}-endo, a la configuración C_{3'}-endo en el proceso de intercalación.¹⁹ Estos cambios conformacionales asociados al proceso de intercalación no se limitan sólo al par de bases inmediatamente delante y detrás del sitio de intercalación (como en el caso del ADN en la conformación A), sino que también ocurren en los sitios vecinos más lejanos.²⁰ Esto puede explicarse de acuerdo con el modelo de exclusión de sitios (“nearest neighbouring site exclusión”). Según este modelo, la intercalación de una molécula de ligando produce la inactivación de uno o más sitios adyacentes, a los previamente ocupados. De forma que, bajo condiciones de completa saturación, sólo una fracción de las cavidades del ácido nucleico, pueden ser ocupadas. Esto provoca una reducción en el número total de sitios disponibles. Por ejemplo, en el caso de la proflavina, sólo son ocupados el 44% de los sitios potenciales para la intercalación.

Las fuerzas que mantienen unidas a la doble hélice con este tipo de moléculas son de naturaleza hidrofóbica y de dispersión, es decir, las mismas fuerzas responsables de las interacciones de apilamiento entre las bases de los ácidos nucleicos. En todo caso,

parece que el proceso de intercalación también resulta facilitado por la presencia de cargas eléctricas positivas sobre el ligando.²¹ De forma que, la atracción electrostática entre el intercalante y los grupos fosfato del polinucleótido, favorece el proceso de penetración de la molécula entre los pares de bases del ADN.

Estudios computacionales sobre la interacción del bromuro de etidio (y un número de estructuras análogas) y el ADN,²¹ apuntan a que los complejos que resultan de la intercalación también se estabilizan como resultado de la interacción entre los orbitales frontera: el orbital molecular ocupado más bajo en energía del intercalador (LUMO) y el orbital molecular más alto en energía de las bases de purina adyacente (HOMO).²² La existencia de la carga positiva del anillo de la fenantrolina del bromuro de etidio, produce una disminución de energía del LUMO, facilitando así el mezclado de este orbital con el orbital HOMO de la base. Esta interacción entre orbitales da lugar a un desplazamiento batocrómico (desplazamiento hacia el rojo) en la banda de absorción del complejo respecto del ligando libre.

Respecto de las constantes de afinidad propias del modo de asociación intercalativo, éstas son relativamente altas, con energías libres asociadas del orden de -25 a -38 kJmol⁻¹.

Con frecuencia, la unión de ligandos al ADN por intercalación, se produce en dos pasos sucesivos. El primero, tiene lugar en la parte externa de la doble hélice, y suele tratarse de un proceso controlado por difusión. El segundo, consiste en el proceso de intercalación de las sondas entre las bases del ADN, que conlleva un alargamiento y desenrollamiento de la doble hélice, junto con un aumento de su rigidez.¹⁹

Se distinguen tres tipos de intercalación: intercalación clásica, intercalación ensartada (“threading intercalation”) e intercalación no clásica.

Los intercaladores clásicos son moléculas aromáticas que poseen carga positiva en el anillo o en una cadena unida al propio anillo. Este tipo de intercalación obedece al modelo de exclusión de sitios libres. Ejemplos típicos son las sales de acridinio, como el cloruro de proflavina, y las sales de fenantrolina, como el bromuro de etidio y el yoduro de propidio. Por otro lado, la intercalación ensartada (“threading intercalation”) tiene lugar cuando la parte aromática del ligando se inserta entre las bases de bases del ADN, al tiempo que un sustituyente catiónico se enlaza al surco principal y otro sustituyente del anillo interacciona con el surco secundario. Un ejemplo de ello lo constituye el naftaleno diimida. Los complejos que se forman, según este tipo de interacción, poseen

constantes de equilibrio comparables a las de los intercaladores clásicos, aunque pueden distinguirse cinéticamente de estos por poseer velocidades de asociación/disociación del ADN menores que los de tipo clásico. Por último, los intercaladores no clásicos son sistemas poliaromáticos conjugados que contienen átomos de nitrógeno o cadenas laterales protonadas unidas al anillo. En la gran mayoría de estos compuestos la intercalación va siempre acompañada por la unión al surco. Los derivados de la pirimidina son ejemplos de este tipo de intercalación no-clásica.

De forma general, los principales efectos biológicos de los intercaladores son la inhibición del crecimiento celular, la muerte celular y la transformación celular. Como estos efectos dan como resultado la inhibición de la proliferación celular, muchos agentes intercalantes se han usado como antibacterianos, antiparásitos y agentes antitumorales.

3) Unión electrostática:

Este tipo de unión se caracteriza por ser exclusivamente de carácter electrostático. A pesar de que como se indicó anteriormente prácticamente todas las interacciones en química son de naturaleza electrostática, en el caso de la interacción de pequeños ligandos con el ADN se considera generalmente que, son los ligandos cargados positivamente, los que sufren interacciones de este tipo. Estas interacciones electrostáticas contribuyen a estabilizar la doble hélice, independientemente del tipo de unión, aunque, bajo condiciones fisiológicas, esta interacción atractiva es generalmente débil.

La interacción electrostática con los grupos fosfato cargados negativamente del ADN, está siempre presente en la interacción de ligandos cargados con ADN, y como consecuencia de ello, en principio, la contribución de esta interacción no podría medirse de forma separada a la de otros tipos de unión con el ADN. Sin embargo, cálculos sencillos, basados en la teoría electrostática de electrolitos, y experimentos de interacción de iones metálicos fuertemente unidos a polinucleótidos, han sugerido que la unión electrostática constituye una interacción débil en comparación con otros modos de unión como la intercalación o la unión a los surcos.¹⁷ Es importante destacar que, ya que la interacción coulombiana posee un carácter altamente no específico, la unión electrostática debe ser independiente de la composición química y la conformación característica de los polinucleótidos.¹⁷ Aunque el efecto electrostático no puede ser

medido separadamente de otros tipos de interacciones polímero-ligando, su importancia relativa puede evaluarse por el efecto de la adición de sal sobre el proceso de unión.

La unión de pequeños iones cargados positivamente al ADN, produce la neutralización de los grupos fosfato con la correspondiente eliminación o desplazamiento de contraiones de la macromolécula hacia el seno de la disolución²³ (generalmente cationes metálicos como Na^+ y Mg^{2+}). En el caso del ADN, con contraiones Na^+ en su estructura, el desplazamiento de estos iones monovalentes produce generalmente, una estabilización del complejo ADN-ligando como consecuencia de la favorable contribución entrópica a la energía libre total de unión que supone la eliminación de iones de la superficie.

Es un hecho, que los ligandos cargados positivamente presentan una fuerte dependencia de la fuerza iónica en su afinidad por el ADN. En un intento de establecer la base teórica de esta observación experimental, Manning, Record y colaboradores aplicaron la teoría de polielectrolitos al ADN.^{23,24} Según esta teoría, el campo electrostático del ADN causa la condensación de los cationes en su superficie, de forma que en el caso del B-ADN, la concentración local es alrededor de 1M.

Este tipo de interacción es bastante significativa en el caso de moléculas de alta carga, incluyendo las proteínas. En líneas generales, la atracción entre el ligando y el ADN disminuye al aumentar la fuerza iónica del medio, lo que implica un descenso de la constante global de unión del ligando con la macromolécula. Como se verá más adelante, la dependencia de las constantes de asociación ADN-ligando, a diferentes concentraciones salinas, han sido determinadas para los tres sistemas objeto de estudio en esta tesis: sondas fluorescentes, tensioactivos y nanopartículas.

4) Unión a los surcos principal y secundario del ADN (“major groove” y “minor groove”):

Los ligandos capaces de unirse e interactuar con alta afinidad a los surcos del ADN han sido, investigados extensamente en los últimos años. En los surcos de la doble hélice del B-ADN, definidos por el esqueleto azúcar fosfato, los extremos de las bases quedan expuestos. El “major groove” es amplio y poco profundo, con una longitud de 12 Å, mientras que el “minor groove” es profundo y estrecho, con una longitud de unos 6 Å.²⁰

La existencia de un elevado potencial eléctrico negativo en los surcos del ADN juega un papel fundamental en el origen en este modo de unión.²⁵ Como era de esperar, los compuestos que se unen generalmente a los surcos se caracterizan por poseer carga positiva y anillos aromáticos unidos por enlaces que permiten el giro libre, lo que posibilita la adopción de una configuración apropiada por parte del ligando, que se ajuste a la curvatura del surco sin producir una perturbación significativa en la estructura del ADN. Debido a eso, a diferencia de lo que sucede en el caso de la intercalación, la unión al “groove” requiere moléculas con alta flexibilidad. Por otra parte, esta clase de unión supone una menor perturbación en la estructura del ADN que la que originan los agentes intercalantes. Además de las interacciones electrostáticas, la formación de enlaces de hidrógeno y las interacciones de van der Waals parecen contribuir también a las uniones a los surcos. La acción conjunta de estos últimos tres factores hace que los ligandos que se unen al groove den lugar a complejos más estables que aquellos que se producen por intercalación.¹⁷ Esto se pone de relieve en los valores de las constantes de equilibrio de asociación, que en el caso de los agentes intercalantes no suele exceder de 10^7 (M^{-1}), mientras que en el caso de agentes que se asocian a los surcos pueden llegar a ser del orden de 10^8 - 10^9 (M^{-1}).²⁶ La unión a través del surco principal se da preferentemente en el caso de ligandos de gran tamaño, como las poliaminas y las proteínas.²⁷ En el surco secundario la inserción de ligandos está estéricamente impedida en la secuencia GC. Esto se debe al enlace de hidrógeno existente entre el grupo amino de la guanina y el oxígeno del carbonilo de la citosina en las pares de bases de tipo GC. Dentro de los compuestos que se unen al surco secundario, destacan la espermina, fármacos como la neotripsina y la distamicina A, así como productos sintéticos como el DAPI y Hoechst 33258.

En esta tesis doctoral se presenta un estudio cinético y termodinámico de la interacción no-covalente entre el ADN y diferentes tipos de ligandos (1-pirenocarboxialdehído, tensioactivos catiónicos y nanopartículas de oro). Estos ligandos, en función de sus características serán susceptibles de unirse a la doble hebra presentando uno o algunos de los diferentes modos de unión expuestos. Se ha dedicado un capítulo de la tesis a cada uno de los sistemas ADN/ligando investigados. De esta forma, el capítulo I trata la interacción ADN/1-pirenocarboxialdehído, y los efectos que diferentes sales y codisolventes tienen en los aspectos termodinámicos y cinéticos de esta interacción. En el capítulo II se recoge un estudio de la interacción de tensioactivos

cati6nicos con el ADN, llevando a cabo un estudio sistem6tico de los aspectos termodin6micos de la interacci6n, en funci6n de la longitud de la cadena del tensioactivo. En este 6ltimo cap6tulo se desarrolla un estudio del mecanismo de reacci6n y del efecto salino de la interacci6n del tensioactivo CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) y el ADN. Por 6ltimo, en el tercer cap6tulo de la tesis, se ha abordado un estudio tanto cin6tico como termodin6mico, referente a la interacci6n de nanop6rticulas de oro (AuNPs) con ADN.

Una derivaci6n extensa de algunos de los modelos empleados en el ajuste de los datos termodin6micos y los par6metros de estos ajustes aparecen en los Ap6ndices I, II y III. As6 mismo, para los tres sistemas ADN/ligando estudiados se recogen en los Ap6ndices IV, V y VI, los inversos de los tiempos de relajaci6n obtenidos a partir de las curvas cin6ticas experimentales.

Referencias

- (1) Mel'nikov, S. M.; Sergey, V. G.; Yoshikawa, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9951.
- (2) Arturo, R; James, A. Platts. *J. Phys. Chem. A.* **2006**. *110*, 3992.
- (3) Burgess, S. K; Martin, N. H.; Connelly, T. L.; Reynolds. W. R.; Spiro. L. D. *Biochemical Education.* **1996**, *24 (4)*, 230.
- (4) (a) Hanlon, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1966**, *23*, 861. (b) Herskovits, T. T.; Singer, S. S.; Geiduschek. E. P. *Arch. Biochem. Biophys.* **1961**, *94*, 99. (c) Newcomb, L. F; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 4993.
- (5) Cantor y Schimmel, *Biophysical Chemistry. Part III: The Behaviour of biological macromolecules*, pp 849, ed., W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1980.
- (6) Akiyama, S. K; Yamada, K. M. *Journal of Biological Chemistry.* **1987**. *262 (36)*, 17536.
- (7) Chang, E. C; Charn, T. H; Park, S. H. *Molecular Endocrinology.* **2008**. *22(5)*, 1032.
- (8) Hurley, L. H; Boyd, F. L. *Trends. Pharm. Sci.* **1988**. *9*, 402.
- (9) Nierman, M; Bolten, M.; Eimer, W. *J. Phys. Chem. B.* **1999**. *103*, 10065.
- (10) (a) Xianfeng, Z; Xizhen, Z; Xianghui, Y; Xiao, Z; Qiu, F; Bin, L; Xueyun, W; Yan, C; Yue, C; Yaming, S; Yinghua, J; Yongge, W; Junqiu, L; Wei, K; Jiacong, S, *Biomaterials.* **2007**. *29*, 111. (b) Zhang, Z.; Huang, W.; Jang, J.; Wang, E.; Dong, S. *Biophys. Chem.* **2002**. *97*, 7.
- (11) Wasungu, L.; Scarzello, M.; Gooitzen, D.; Grietje, M.; Wagenaar, A.; Engberts, J. B., Jan, B. N. F.; Hoekstra, D. *J. Mol. Med.* **2006**, *84*, 774.

- (12) Pullman, A.; Pullman, B. *Q. Rev. Biophys.* **1981**, *14*, 289.
- (13) (a) Stone, A. L.; Bradley, D. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 3627. (b) Ogul'chansky, T. Y.; Losytsky, M. Y.; Kovalska, V. B.; Lukashov, S. S.; Yashchuk, V. M.; Yarmoluk, S. M. *Spectrochim. Acta A.* **2001**, *57*, 2705. (c) Ogul'chansky, T. Y.; Losytsky, M. Y.; Kovalska, V. B.; Yashchuk, V. M.; Yarmoluk, S. M. *Spectrochim. Acta A.* **2001**, *57*, 1525. (d) Garoff, R. A.; Litzinger, E. A.; Connor, R. E.; Fishman, I.; Armitage, B. A. *Langmuir*, **2002**, *18*, 6330. (e) Losytsky, M. Y.; Yashchuk, V. M.; Yarmoluk, S. M. *Mol. Cryst. Liquid. Crystal.* **2002**, *385*, 27. (f) Shaberle, F. A., Kuz'min, V. A.; Borissevitch, I. E. *Biochim. Biophys. Acta.* **2003**, *1621*, 183.
- (14) Seifert, J. L., Connor, R. E.; Kushon, S. A.; Whang, M.; Armitage, B. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2987.
- (15) LePecq J. B.; Paoletti, C. *J. Mol. Biol.* **1967**, *27*, 87.
- (16) Diebler H., Secco, F.; Venturinni, M. *Biophys. Chem.* **1987**, *26*, 193.
- (17) Boggioni, Alessia, *Mechanisms of the Interactions of Fluorescent Dyes with Nucleic Acids*. Tesis (Pisa) 2008.
- (18) Sobell, H. M.; Jain, S. C. *J. Mol. Biol.* **1972**, *68*, 21.
- (19) W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York, USA, **1988**, 362.
- (20) (a) Lerman, L. S. *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 18. (b) Müller, W.; Crothers, D. M. *J. Mol. Biol.* **1968**, *35*, 251. (c) Kopka, M. L.; Fratini, A. V.; Drew, H. R.; Dickerson, R. E. *J. Mol. Biol.* **1983**, *163*, 129.
- (21) Patterson, S. E.; Coxon, J. M.; Strekowski, L. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 277.
- (22) Schwartz, H. S, *Adv. Cancer. Chemother.* **1979**, *1*, 1.
- (23) Record, M. T; Anderson, C. F.; Lohaman, T. M. *Q. Rev. Biophys.* **1978**, *11*, 103.
- (24) Friedman, R. A. Manning, G. S. *Biopolymers.* **1984**, *23*, 2671.
- (25) Pullman, B. *Adv. Drug. Res.* **1989**, *18*, 1.
- (26) (a) Koleshikova D. V.; Zhuze, A. L.; Zasedatelev, A. S. (1998). DNK-Specificitye Nizkomolekulyarnye Soedineniya (in Russian), MFTI, Moskov. (b) Chaires J. B. *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, *453*, 26.
- (27) (a) Gao X., Mirau, P.; Patel, D. J. *J.Mol.Biol.* **1992**, *223*, 259. (b) Hannon M. J. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 280.

1. ESTUDIO TERMODINÁMICO Y CINÉTICO
DE LA INTERACCIÓN
1-PIRENOCARBOXIALDEHIDO-ADN.

1. ESTUDIO TERMODINÁMICO Y CINÉTICO DE LA INTERACCIÓN 1-PIRENOCARBOXIALDEHIDO -ADN.

1.1 Introducción y Antecedentes.

El reconocimiento selectivo de ácidos nucleicos, así como de sus principales estructuras secundarias y terciarias, ha constituido un puente de unión entre la química y la biología. Dado el interés actual por el reconocimiento molecular de nucleótidos y nucleósidos en las pasadas dos décadas, se ha trabajado en el diseño de estructuras cíclicas y en la síntesis de agentes complejantes que actúen como ligandos.

Muchos agentes anticancerígenos, antibióticos y fármacos antivirales ejercen sus efectos biológicos primarios mediante interacciones reversibles con los ácidos nucleicos. Por ello, numerosos autores han investigado los procesos de unión de pequeños ligandos al ADN desde puntos de vista termodinámico y cinético. Se han encontrado, por una parte, importante información sobre las afinidades y sobre el mecanismo de estos procesos y, por otra parte, información estructural, que ha permitido comprender la naturaleza de esta clase de complejos. Un estudio detallado de este tipo de interacciones ADN-ligando, desde un punto de vista termodinámico, cinético y estructural, es de interés para mejorar la eficacia clínica de los fármacos existentes y para el diseño de nuevos colorantes más efectivos en la detección de ácidos nucleicos. Es importante destacar que el estudio cinético y termodinámico de estos sistemas, que implican macromoléculas biológicas y pequeños ligandos es complejo, en comparación con el estudio de otros procesos de interacción ligando/receptor, ya que se deben tener en cuenta parámetros adicionales como el grado de saturación del polinucleótido y el tamaño del sitio.¹ Muchas moléculas biológicas, como el ADN, pueden dividirse en subunidades, dominios o unidades reactivas, las cuales sufren cambios físicos y/o químicos debido a su interacción con pequeños ligandos.² Estas interacciones entre las moléculas biológicas y los ligandos pueden variar desde la simple unión del ligando a la macromolécula, hasta procesos que impliquen cambios conformacionales en el ADN inducidos por la unión del ligando. Además, el comportamiento de estos sistemas puede complicarse por la presencia de los llamados efectos de cooperatividad.

El concepto de cooperatividad es complejo, y en el caso de la interacción de pequeñas moléculas con ADN, pueden distinguirse distintos tipos. En general, las interacciones

polímero-ligando se definen como cooperativas cuando la interacción del ligando con una subunidad del polímero durante el proceso de asociación afecta la capacidad de interacción de las otras subunidades.^{2,3} Las interacciones no cooperativas surgen cuando cada unidad interacciona de forma independientemente. Las interacciones cooperativas pueden subdividirse, a su vez, en interacciones de cooperatividad negativa (anticooperativas), que se producen cuando la interacción de una unidad con el ligando inhibe la interacción de otras unidades; y la cooperatividad positiva (cooperativas), se produce si la interacción de una unidad con el ligando favorece o mejora las interacciones de otras subunidades. Una de las razones básicas por la cual es importante realizar un estudio termodinámico de los sistemas ADN-ligandos, es la determinación de los factores que gobiernan la afinidad y la especificidad de estos ligandos por la macromolécula. Las constantes de equilibrio (constante de asociación, K) y la energía libre de Gibbs correspondientes ($\Delta G = -RT \ln K$), pueden determinarse siguiendo diferentes procedimientos, tanto para la obtención de los datos experimentales, como para su análisis. En relación con estos sistemas, los métodos espectroscópicos constituyen procedimientos generalmente efectivos para la obtención del parámetro K: la interacción ADN-ligando induce cambios en las propiedades espectroscópicas del ligando (o del ADN) y estos cambios pueden seguirse con el empleo de la técnica espectroscópica adecuada (UV-Vis, CD, RMN, o fluorescencia). Teniendo en cuenta la multitud de formas en que un ligando puede unirse al ADN, se han diseñado ligandos multifuncionales para determinar la contribución de distintas interacciones a la unión ligando/ADN.

A continuación, se presenta una revisión de la interacción del ADN con distintos tipos de sondas y compuestos macrocíclicos, tanto desde un punto de vista termodinámico como cinético. En esta revisión nos hemos centrado en aquellos ligandos que se encuentran más frecuentemente en la literatura científica.

1.1.1. Interacciones entre poliaminas con los ácidos nucleicos.

Las poliaminas son compuestos fluorescentes que se encuentran, generalmente, en forma protonada bajo condiciones fisiológicas. Esta propiedad hace que las poliaminas se unan fuertemente a los nucleótidos por interacciones electrostáticas entre los grupos amonio, cargados positivamente, y los grupos fosfato del ADN. Sin embargo, es

importante destacar que su interacción con el ADN depende de la estructura en particular de la amina y de su carga neta. Estudios estructurales y de difracción de rayos X, han mostrado que poliaminas como la espermina, neotripsina, distamicina A, DAPI, y Hoeschst 33258, se unen fundamentalmente a los surcos del ADN.⁴

Al igual que las poliaminas biológicas como la espermina, las poliaminas macrocíclicas se unen fuertemente al ADN gracias a su carga positiva. Sin embargo, para mejorar la selectividad de la interacción, es necesaria la existencia de sitios en la molécula capaces de formar enlaces de hidrógeno y/o de interaccionar con las bases. Algunos macrociclos constituidos por poliaminas que llevan insertado un fluoróforo en el anillo son conocidos por su capacidad como receptores de metales y como sensores. Sus propiedades luminiscentes dependen del metal con el que se coordinan y también del sustrato al que se unen. La estructura aromática y plana del fluoróforo, junto con la carga positiva del metal y las propiedades luminiscentes de estos compuestos, hace que estos metalo-receptores sean susceptibles de interaccionar con los ácidos nucleicos por intercalación del fluoróforo entre las bases⁵, y al mismo tiempo especialmente adecuados para la investigación de los mecanismos de interacción con los ácidos nucleicos. Un ejemplo claro de ello, lo constituyen los complejos de poliamina de Cu(II), Fe (II) y Zn (II).

Los estudios cinéticos de la interacción de estos sistemas macrocíclicos con ADN son bastante escasos, aunque existen algunos estudios en la literatura relativos a la cinética de la unión de Cu(II)Neotrien, Cu(II)Neotetren y Cu(II)₂Neotetren.⁶ En estos estudios se encontró que las cinéticas de estos sistemas se caracterizaban por la existencia de dos efectos cinéticos bien diferenciados en el tiempo, el más rápido en el rango de tiempo de los milisegundos, y el más lento del orden de minutos. La dependencia del inverso del tiempo de relajación rápido con la concentración de ADN es lineal, y en principio este resultado está de acuerdo con la existencia de un paso simple en el mecanismo de reacción. Sin embargo, los valores de las constantes de velocidad directa, son un orden de magnitud más bajo de lo esperado para la formación de un encounter por difusión, lo cual parece indicar la existencia de un paso previo en el mecanismo, muy rápido, y, por tanto no observable por los métodos cinéticos convencionales. De cualquier forma, la cinética rápida se indentifica con el proceso de intercalación del complejo metálico entre las bases del ADN, y está representado por el primer equilibrio que aparece en el esquema I. Este paso estaría precedido por la formación de un aducto externo,

(complejo metálico)/ADN, estabilizado principalmente por interacciones electrostáticas (la formación de este aducto no aparece representada en el esquema I). La cinética lenta fue atribuida a un cambio conformacional del ADN, inducido por la unión del ligando. Este paso corresponde al segundo equilibrio representado en el esquema I, en el que la conformación del complejo DS_I (formado en el primer paso del mecanismo) cambia, dando lugar a un complejo DS_{II}. De acuerdo con todo ello estos sistemas presentan un mecanismo en serie, representado en el esquema siguiente:

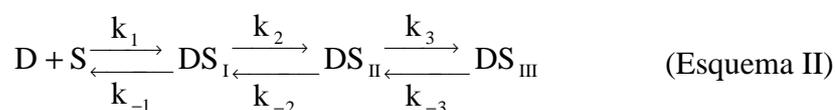


1.1.2. Acridinas y derivados.

Las acridinas son compuestos de interés, no sólo por su amplio uso en el ámbito farmacéutico e industrias de colorantes o tintes, sino también debido a sus interesantes propiedades químicas. Las sales de acridinio, junto con el cloruro de proflavina, se consideran intercaladores clásicos⁷. Los anillos, planos en su estructura, favorecen las interacciones de apilamientos entre las bases del ADN. Un ejemplo lo constituye el naranja de acridina, molécula con estructura similar a la proflavina (PR), donde los residuos N(CH₃)₂ son remplazados por NH₂.^{6a} Se encontró que esta molécula interacciona con el ADN por intercalación o por unión externa, según sea la relación de concentraciones ADN/ligando.⁸ Posteriormente, se han sintetizado derivados de acridinio más complejos, como los biciclo-bis-intercaladores basados en subunidades de acridinio. Estas subunidades se encuentran unidas por tres puentes de los cuales dos son de naturaleza diacetilénica, y su interacción con los nucleótidos del ADN está gobernada por fenómenos de apilamiento en los que participan interacciones de van der Waals y efectos hidrofóbicos. Las constantes de equilibrio correspondientes a la interacción de estos compuestos con ADN son alrededor de dos órdenes de magnitud más altas que las que presentan sus respectivos monómeros. Sin embargo, la rigidez de los puentes de diacetileno hace que estos biciclo-bis-intercaladores derivados de la molécula de acridinio, no estén bien adaptados para su intercalación en el ADN.⁹ Esto último no ocurre con los compuestos organometálicos, Pt-PR, sintetizados con el objetivo de combinar dos propiedades importantes: intercalación (residuos de proflavina) y actividad antitumoral (residuo de cis-platino).^{6a} Se ha constatado que el

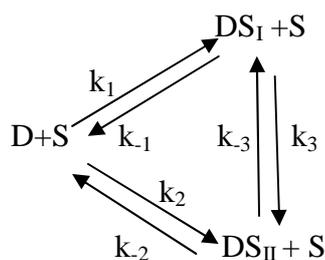
residuo de Pt que está unido a la proflavina (PtPR) es capaz de introducirse también entre las bases del ADN, circunstancia que no ocurre en la interacción del compuesto Pt-PR con otros polímeros.¹⁰

A pesar de la existencia de numerosos estudios sobre la termodinámica de interacción de aminoacridinas con ADN, los aspectos cinéticos y mecanísticos de estos procesos han sido poco analizados. Respecto a la cinética de la interacción del sistema PR/ADN, se ha establecido que está caracterizada por la existencia de un solo tiempo de relajación. Sin embargo, la curvatura observada en la variación del inverso de este tiempo de relajación, en función de la concentración de ADN indica la existencia de un paso previo en el mecanismo.^{6a} Según ello, el mecanismo de reacción sería similar al que presentan las poliaminas (véase esquema I). En este caso, los complejos DS_I y DS_{II}, representan complejos parcialmente y completamente intercalados, respectivamente.¹¹ La presencia del residuo de platino en el compuesto organometálico, Pt-PR, introduce un segundo efecto de relajación en la cinética de interacción de estos sistemas con el ADN. Esto sugiere la necesidad de una alteración importante en la cavidad del polímero (efecto desestabilizante) para la introducción del metal, como último paso del mecanismo¹⁰ (véase esquema II).



1.1.3. Derivados de fenantridinio.

Los derivados de fenantridinio constituyen un ejemplo típico de intercaladores clásicos. Se caracterizan por poseer grupos amino en las posiciones 3 y 8 del anillo de fenantreno. Entre ellos destaca el conocido bromuro de etidio. Las constantes de equilibrio correspondientes a su unión con ADN son del orden de 10^6 - 10^4 M⁻¹, un valor típico del modo de unión intercalativo.¹² Como en el caso del sistema ADN/PR, estos sistemas presentan una cinética compleja caracterizada por la presencia de dos tiempos de relajación; sin embargo, el mecanismo que presentan es más complejo que el descrito en el esquema I. El bromuro de etidio y los compuestos afines presentan un mecanismo de reacción cíclico denominado, *mecanismo de transferencia directa*¹³:



(Esquema III)

Se trata de un mecanismo complejo, en el que dos complejos, DS_I y DS_{II} , se forman en dos pasos que transcurren en paralelo, y sufren inter-conversión según un proceso que tiene lugar en el sitio de reacción. En la práctica, cuando uno de los dos residuos aromáticos del ligando se intercala (DS_I), el segundo residuo permanece fuera de la cavidad que existe entre los pares de bases adyacentes del ADN, pudiendo reaccionar, directamente, con otro sitio del polímero para formar DS_{II} , sin quedar libre el reactivo en disolución. Aunque no es fácil de distinguir, a priori, cuando estamos ante un tipo de mecanismo como el descrito en el esquema I, y cuando ante un mecanismo de transferencia directa, resulta de gran ayuda para ello realizar un estudio cinético de la dependencia de los tiempos de relajación con la concentración de ADN.^{6a} Así, el producto del tiempo de relajación corto por el tiempo largo, $(1/\tau_{\text{corto}} \times 1/\tau_{\text{largo}})$, produce, en el caso del mecanismo de transferencia directa, una dependencia parabólica de este producto en función de la concentración de ADN, cuando la concentración de éste es alta. Por otro lado, en el caso del mecanismo en pasos consecutivos, la dependencia que se encuentra es lineal. Si comparamos la estructura del bromuro de etidio y análogos con las de la proflavina, se encuentra que los primeros, a diferencia de ésta, no presentan posibilidad de unión fuerte a los surcos. Algo similar ocurre en el caso de la 10-metil-9-aminoacridina, que también se une al ADN por el mecanismo de transferencia directa.

Entre los compuestos macrocíclicos destacan, dentro de este grupo, una serie de ciclo bis-intercaladores, compuestos por 2 unidades de fenantridinio conectadas por puentes diacetilénicos. Estos últimos poseen elevadas constantes de equilibrio en su interacción con el ADN, que varían en el rango de 10^5 M^{-1} a 10^6 M^{-1} , siendo en este caso las interacciones de apilamiento (“stacking”), las principales responsables de la interacción.¹⁴ En cualquier caso, no está claro que el modo de unión de este tipo de compuesto al ADN sea de tipo intercalativo, por lo que se requieren estudios adicionales para confirmar esta hipótesis.

1.1.4. Porphirinas y derivados.

La interacción de porfirinas y complejos metálicos de porfirina con ADN, ha sido estudiada ampliamente desde que en 1979 se encontró que estos complejos eran capaces de unirse al ADN por intercalación.¹⁵ Los altos valores de absorbancia y fluorescencia que presentan estos compuestos los hace muy adecuados para el estudio de los mecanismos de interacción con ácidos nucleicos.^{6a}

Diversas técnicas han sido empleadas para ello: espectroscopía¹⁶, viscosimetría¹⁷ diálisis¹⁸ y RMN.¹⁸ Sin embargo, los estudios cinéticos son bastante escasos.¹⁹ Todos estos estudios han revelado la importancia de la interacción electrostática en la estabilidad de los complejos ADN/porfirinas, así como en las velocidades de asociación y disociación de los diferentes pasos del mecanismo de reacción.

Las porfirinas y derivados, constan en su estructura de un residuo central de porfirina que es capaz de intercalarse entre las bases del ADN, y residuos periféricos que cuando están cargados positivamente proporcionan una estabilidad adicional en la interacción con la macromolécula (debido a la interacción electrostática con los grupos fosfato del ADN). La introducción de un ión metálico en el complejo de porfirina, confiere a estos propiedades adicionales.^{19,20} Cuando los ligandos periféricos están en el mismo plano que el centro metálico (complejos de Ni(II) y Cu(II)), estos complejos son capaces de intercalarse en el ADN; sin embargo cuando los ligandos se unen axialmente al centro metálico, la intercalación se encuentra impedida y el modo de unión es externo (Mn(II), Fe(II); Co(II) y Zn(II) metalo-porfirinas).^{6a}

Se han descrito también la interacción de compuestos intercalantes cíclicos como los macrotetracíclicos y macropentacíclicos que combinan uno o dos anillos de porfirina, y los [18]-N₂O₄ aza-oxamacrociclos, que son capaces de intercalarse en la doble hebra y cuya interacción con el ADN es de carácter principalmente electrostático. Su unión se da en dos pasos. Estudios de “quenching” con bromuro y de anisotropía de fluorescencia han sugerido que este compuesto se une al surco principal de la doble hélice²¹ (probablemente debido a la rigidez de las paredes del macrociclo que impiden estéricamente la unión del anillo de porfirina por intercalación). Otros derivados macrocíclicos de la porfirina como los ciclobisintercaladores, compuestos por dos

anillos de porfirina, inducen la rotura de la doble hélice cuando se irradian con luz visible.

En cuanto a la cinética y los mecanismos de interacción con el ADN, se ha encontrado que derivados como el H₂T₄ (meso-Tetrakis(4-N-metilpiridinil))porfirina) presentan una cinética compleja con ADN caracterizada por la presencia de 3 tiempos de relajación.^{6a} La transferencia de la sonda a los sitios del ADN ocurre a través de transferencia interna directa (véase esquema III). No obstante, en el caso de los complejos metálicos de porfirina, como los de Cu(II), se ha encontrado que siguen un mecanismo en pasos sucesivos, como el que presentan la mayoría de las sondas cuando se intercalan.^{18,22}

1.1.5. Cianinas y derivados.

Las primeras cianinas fueron sintetizadas en 1856 por Williams²³ aunque hoy día sus aplicaciones continúan siendo de interés en una amplia variedad de campos, como la tecnología de láseres²⁴ y almacenamiento de energía solar²⁵, la síntesis de agentes antitumorales²⁶ o su empleo como marcadores fluorescentes²⁷ (en bioquímica). Los distintos derivados difieren, según la longitud del puente de polimetino que separa los dos átomos de nitrógeno. La carga positiva de la molécula se deslocaliza, por resonancia, sobre los átomos de nitrógeno de los anillos. Así, podemos distinguir entre cianinas, carbocianinas, dicarbocianinas y tricarbocianinas, que contienen 1 (n=0), 3 (n=1), 5 (n=2) o 7 (n=3), grupos metino en el puente (n es el número de enlaces dobles en el puente). Así mismo, los grupos nitrógeno que forman parte del heterociclo también pueden ser N-alquilados, siendo los heterociclos más comunes el indol, la quinolina, el benzoxazol y el benzotiazol. Entre las diferentes cianinas se encuentran algunas que interaccionan con el ADN por intercalación como el naranja de tiazol (TO), el amarillo de oxazol (YO), naranja de benzotiolato (BO) y Cyan-2; y otras que lo hacen uniéndose a los surcos como el ioduro de 4-[(3-metil-6-(benzotiazol-2-ilo)-2,3-dihidro-(benzo-1,3-tiazol)-2-metilideno)]-1-metilpiridina (BEBO), el cloruro de 4-[6-(benzoxazol-2-ilo-(3-metil)-2,3-dihidro-(benzo-1,3-tiazol-2-metilideno)]-1-metilquinolinio (BOXTO), y la dietilcarbocianina (DiSC₂). De hecho, las sondas constituidas por heterociclos planos en sus extremos, favorecen la intercalación como modo de unión; por otra parte, la semi-flexibilidad del puente de polimetino, permite la torsión necesaria como para adaptarse a la curvatura del surco secundario. El predominio de un modo de

unión u otro depende de la estructura de la sonda y de la secuencia del ADN. Además, estas sondas también son susceptibles de unirse al ADN por interacciones externas. Las cianinas y derivados tienden a autoagregarse,²⁸ y el ADN a jugar un papel en estos procesos actuando como soporte (unión externa).

Respecto a la termodinámica de unión de estos sistemas con ADN, las constantes de equilibrio para compuestos como el Cyan 40, Cyan-2, y BO, determinadas mediante técnicas espectrofotométricas y espectrofluorimétricas, son del orden de 10^4 M^{-1} ; y del orden de 10^5 M^{-1} para el sistema ADN/TO (en condiciones fisiológicas). En el caso de la interacción de ADN con bis-intercaladores como el YOYO-1, se encontraron constantes de equilibrio 10^2 veces mayores que las correspondientes al intercalador simple, YO.²⁹

La presencia de cargas positivas en estas moléculas, ha suscitado el estudio de la dependencia de las constantes de equilibrio de interacción ADN/cianinas con la concentración de sal en el medio. Se ha encontrado que la variación de las constantes de equilibrio correspondientes a la unión de estas sondas con el ADN en presencia de sales está de acuerdo con la Teoría de Manning y Record.^{7,30}

A pesar de que en la bibliografía pueden encontrarse diversos estudios termodinámicos y estructurales para el sistema cianina/ADN, los estudios de naturaleza cinética y de mecanismos de reacción de estos sistemas son bastante escasos.³¹ La cinética de sistemas como ADN/Cyan-40, ADN/Cyan-2, ADN/TO y ADN/BO ha sido estudiada mediante las técnicas de salto de temperatura y de flujo detenido. En todos los casos se encontró que la cinética era compleja y presentaba un mecanismo en serie en 3 pasos de acuerdo con el esquema II. Como ocurre en la interacción de los derivados de acridina y el ADN, la naturaleza del complejo D/S es la correspondiente a la de un complejo externo. Las formas DS_I y DS_{II} son complejos que difieren en el grado de intercalación.

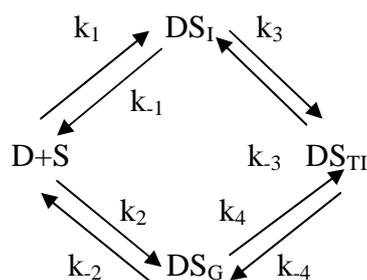
1.1.6. Naftaleno y derivados.

El naftaleno y sus derivados se unen al ADN por intercalación. Experimentos de desplazamiento competitivo con bromuro de etidio³² han demostrado que las moléculas de naftaleno presentan menor afinidad por las bases del ADN que el fenantreno y sus derivados. A pesar de ello, el estudio de las interacciones entre ADN y derivados

macrocíclicos del naftaleno ha suscitado interés recientemente.³³ Entre estos derivados destacan el naftaleno diimida y el naftalenofeno (BisNP), que presentan un modo de interacción con el ADN que no se corresponde con el proceso de intercalación clásico, quizás como consecuencia de la existencia de sustituyentes voluminosos en su estructura. Estos compuestos se unen al ADN en un proceso parecido a la operación de ensartar o enhebrar el hilo de una aguja (“threading intercalation”).^{4,34} La velocidad de asociación/disociación de este tipo de intercaladores es mucho menor que la que presentan los intercaladores clásicos, aunque las constantes termodinámicas son del mismo orden de magnitud. Por ello, estos modos de unión son fácilmente distinguibles mediante estudios cinéticos.

La estructura del ligando BisNP se caracteriza por poseer dos unidades aromáticas de naftaleno unidas por dos cadenas flexibles de dietilenotriamina (DIEN). La termodinámica de interacción del BisNP con nucleótidos se ha estudiado por las técnicas de RMN y fluorescencia a temperatura ambiente, encontrándose que este último se une a los nucleótidos con constantes de equilibrio elevadas, $K = (10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1})$. Esta fuerte interacción se atribuyó a la participación de interacciones electrostáticas e interacciones de apilamiento con los nucleótidos.³⁵

Se ha determinado que el mecanismo de interacción del naftaleno diimida con ADN implica la formación de dos tipos de complejos intermedios en el mecanismo.³⁶ Uno de ellos corresponde a un complejo parcialmente intercalado, en el cual los dos sustituyentes catiónicos de la molécula de naftaleno se unen al mismo surco del ADN, (DS_G). El segundo tipo de complejo implica la unión al surco mayor y menor del ADN de cada una de las caras de la molécula de naftaleno diimida. Esta unión resulta de una fuerte interacción del complejo con las bases del ADN (DS_I). El paso final del mecanismo consiste en la conversión de las dos especies semi-intercaladas en el complejo final enhebrado (DS_{TI}). Este mecanismo se encuentra representado esquemáticamente en el esquema IV:



(Esquema IV)

La lenta disociación/formación del complejo DS_{TI} , constituye el paso determinante del mecanismo ya que implica la rotura de uno de los pares iónicos ADN/naftaleno diimida, y el movimiento de la cadena lateral de la sonda entre los pares de bases del ADN. Por ello este tipo de mecanismo de intercalación es fácilmente distinguible cinéticamente. El estudio de la interacción de la molécula de naftaleno diimida con ADN, en presencia de sal, revela la formación de dos pares iónicos. Mientras que el estudio de la dependencia de las constantes de equilibrio de la concentración de sal, revela que estas disminuyen al aumentar la concentración salina.

Recientemente, se ha investigado también la interacción de macrociclos bisintercaladores con ADN. Como ejemplo puede citarse el bisintercalador compuesto por 2 unidades de naftalenodiimida, unidas por dos grupos amonio metilados. El complejo presenta una velocidad de disociación al ADN 10^3 veces menor que la que presenta el mono-intercalador correspondiente (naftaleno diimida). Aunque parece que en este caso también se da una intercalación no clásica, el modo de unión de este macrociclo al ADN no está aún totalmente establecido.

1.1.7. Pireno y derivados.

El pireno y sus derivados han demostrado ser sondas muy eficaces para estudiar la dinámica molecular, la organización estructural de receptores, y para determinar la polaridad en entornos hidrofóbicos. De hecho, una de las propiedades más importantes del pireno es su versatilidad como cromóforo y fluoróforo.³⁷ En este sentido, pueden encontrarse en la literatura numerosos estudios termodinámicos y estructurales de la asociación del pireno y derivados con ADN, mediante el uso de diferentes técnicas tales como espectroscopía electrónica^{38,39,41,42}, espectroscopía de fluorescencia⁴⁰, CD³⁹ y ODRS.³⁸

Entre los estudios termodinámicos de las interacciones del pireno con ADN, destaca el estudio de Henry y colaboradores^{41a} en el que se utilizó ADN en sus formas nativa y desnaturalizada, en presencia de NaCl. Los datos termodinámicos fueron analizados según el método de Hildebrand-Benesi. Se encontró que la constante de asociación del ADN disminuía de forma sistemática al aumentar la concentración de sal en el medio, mientras que en el caso del ADN desnaturalizado se encontró que estas pasaban por un

máximo a una concentración de 0.1 M de NaCl. Entre los estudios sobre la termodinámica de unión de derivados del pireno con ADN, destacan los llevados a cabo en el caso del benzo(a)pireno y los enantiómeros R y S del piperazinacarboniloxi-2-propilpireno ((R)-3, (S)-3). Para este último ligando³⁹, se estudió la termodinámica de asociación con ADN tipo poli(dA-dT)₂ (AT) y poli(dG-dC)₂ (GC). Sorprendentemente, las constantes de equilibrio de ambos enantiómeros, (R)-3 y (S)-3, son un orden de magnitud mayor para el polímero tipo AT, siendo esta una evidencia clara de la especificidad del ligando por estas bases. Los datos experimentales fueron analizados considerando una unión no-cooperativa ($\omega = 1$), empleando el tratamiento de Mc-Guee y Von Hippel³ para polímeros lineales. De acuerdo con este tratamiento, se cumple:

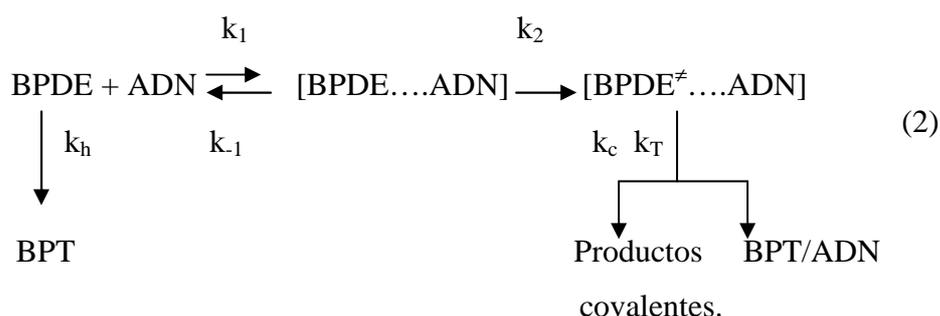
$$\frac{v}{L} = K(1 - nv) \left(\frac{1 - nv}{1 - (n-1)v} \right)^{n-1} \quad (1)$$

donde v son los moles de ligando (pireno) unido al ADN por mol de macromolécula; L es la concentración de ligando libre; K la constante de asociación; y n , el número de sitios ocupados por el ligando. Se obtuvieron constantes de equilibrio del orden de 10^5 M^{-1} para el sistema poli(dA-dT)₂, y constantes de 10^4 M^{-1} para el sistema poli(dG-dC)₂, siendo $n = 2$, esto es el ligando ocupa dos pares de bases en ambos casos. Parámetros termodinámicos, como la entalpía y la entropía libre, presentan valores negativos y positivos, respectivamente, encontrándose también diferencias notables para la interacción con las bases AT y GC. La especificidad de la sonda por las bases GC y AT del ADN, se reflejó, claramente, en los valores del cociente $-\Delta H^0/T\Delta S^0$, siendo éste significativamente menor para las bases de naturaleza GC. Esta diferencia muestra una asociación de carácter más exotérmica y un cambio entrópico menos favorable, en el caso de los residuos de tipo AT. Los autores interpretaron estos parámetros de acuerdo con la posibilidad de que las bases AT ejerzan un menor impedimento estérico en la penetración e intercalación de la sonda, lo que permite una intercalación más profunda, e interacciones de van der Waals significativas con las bases.

Uno de los pocos estudios presentes en la literatura sobre la cinética y el mecanismo de interacción de derivados del pireno con ADN es el llevado a cabo por Geacintov y colaboradores.^{41b} Estos autores investigaron la cinética de asociación del BPDE (benzo(a)pireno diolepóxido) con el ADN en función de la concentración salina y de la

temperatura. El seguimiento de la reacción fue llevado a cabo mediante la combinación de las técnicas de flujo detenido con detección por fluorescencia y la técnica de diálisis.

La presencia de la función epóxido en la estructura de la sonda produce su hidrólisis, en disolución acuosa, lo cual complica el mecanismo de la interacción. De esta forma, en medio acuoso, el camino de reacción que se da, en mayor proporción, no es la formación del aducto no-covalente ADN/BPDE, sino la hidrólisis de la sonda al tetraol BPT. El esquema cinético propuesto, que tiene en cuenta estas consideraciones, es el siguiente:



En este esquema la formación del complejo (no-covalente) inicial entre BPDE y el ADN da lugar a la unión externa e intercalación de la sonda, que da como resultado la hidrólisis y la formación del tetraol correspondiente BPT/ADN. La otra posibilidad es que la unión externa de la sonda a la doble hélice produzca la unión covalente de esta al ADN. De acuerdo con el mecanismo propuesto, la constante de velocidad observada resulta de una relación de constantes de equilibrio y velocidad correspondientes a los diferentes pasos de la reacción:

$$k = \frac{k_h}{1 + K'[D]} + k_2 \frac{K[D]}{1 + K'[D]} \quad (3)$$

En esta expresión, [D] es la concentración de ADN; k_h , es la constante de velocidad de hidrólisis del BPDE libre; $K = k_1/k_{-1}$, y $K' = k_1/(k_1+k_{-1}+k_2)$. Se encontró que la constante observada, k , disminuía considerablemente con la concentración salina. Por el contrario, los valores de la constante de hidrólisis, k_h , son independientes de la fuerza iónica. De acuerdo con ello, la variación en la constante observada cuando varía la concentración salina en el medio de reacción está marcada por la variación de la constante de velocidad del segundo paso, k_2 .

Los diferentes estudios que se encuentran en la bibliografía de este tipo de sondas, han demostrado que el pireno y la mayoría de sus derivados como el benzo-a-pireno, interaccionan con el ADN predominantemente intercalativamente. En el caso del pireno, este se intercala mayoritariamente entre las bases del ADN, preferencialmente alternado la secuencia de las bases dA-dT.⁴³ Sin embargo, aunque los antecedentes bibliográficos apuntan a que el modo de interacción del derivado 1-pirenocarboxialdehído (1-PyCHO) es también intercalativo, no existen evidencias en la bibliografía sobre esta cuestión. Por este motivo, como el 1-PyCHO va a ser empleado en este trabajo como sonda para detectar la interacción del ADN con otros ligandos, hemos considerado de interés realizar un estudio previo del modo de interacción de esta sonda con el ADN. Este estudio se presenta en el apartado 1.3.1 de esta memoria. Por otro lado, como se ha expuesto anteriormente, la interacción de pequeños ligandos con biomoléculas como el ADN, depende del medio en el que se encuentre la biomolécula y el ligando. Consecuentemente, resulta también de interés realizar un estudio de los efectos del medio en la termodinámica y cinética de la interacción del 1-PyCHO con el ADN. Así, en el apartado 1.3.2, se presenta el estudio termodinámico, en el que se determinan las constantes de equilibrio correspondientes a la interacción de la sonda con ADN en diferentes medios: en presencia de diferentes concentraciones de sales (NaClO_4 , BaClO_4 y $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$) y distintos tipos de codisolventes (etanol, isopropanol, terc-butanol y urea). En el último apartado de este primer capítulo, se presenta un estudio de los efectos del medio en la cinética de la interacción ADN/1-PyCHO.

1.2. Materiales y Métodos

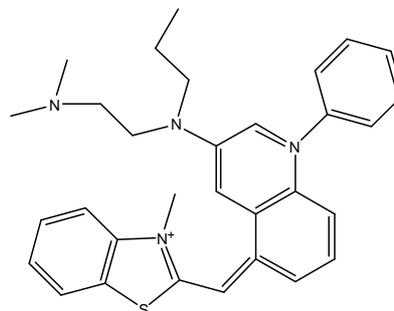
1.2.1. Materiales

1.2.1.1 Sondas

La estructura química de las sondas empleadas en este capítulo de la tesis aparece en la siguiente figura:



1-PyCHO



SYBER-Green

1-Pirenocarboxilaldehído (1-PyCHO) y SYBER-Green (SG) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Las disoluciones madres de 1-PyCHO fueron preparadas disolviendo una cantidad pesada del sólido en alcohol puro y manteniéndola en la oscuridad. Las disoluciones empleadas en las experiencias que se describen a continuación fueron preparadas por dilución con agua destilada de una conductividad menor que 10^{-6} Sm^{-1} , hasta alcanzar la concentración de la mezcla agua/alcohol y de pireno apropiada.

1.2.1.2 Ácidos nucleicos: ADN-CT.

El ADN de hígado de ternera, ADN-CT (sal sódica liofilizada, altamente polimerizada) fue obtenido de Pharmacia Biotech y disuelto en agua destilada de conductividad menor de 10^{-6} Sm^{-1} . Las disoluciones madre fueron estandarizadas espectrofotométricamente, usando $\epsilon = 6600 \text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ a 258 nm, en tampón cacodilato ($[\text{NaCl}] = 0.1 \text{ M}$; $[\text{cacodilato sódico}] = 0.01 \text{ M}$) para obtener la concentración de ADN (C_N) en nucleótidos o grupos fosfato.⁴⁴ La técnica de electroforesis en gel de agarosa verificó que la longitud del polímero era superior a 10000 pares de bases (véase Figura 1).

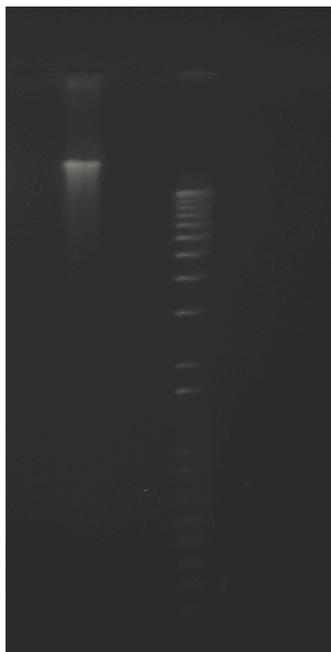


Figura 1. Electroforesis de CT-DNA en gel de agarosa, frente al marcador (a la derecha), usando bromuro de etidio. Las referencias del marcador corresponden a fragmentos de ADN de 10 Kb.

1.2.1.3 Otros reactivos.

Etanol, 2-propanol, terc-butanol, NaClO_4 , $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$, y urea, fueron obtenidos de Sigma- Aldrich. El complejo de cobalto $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6](\text{Cl})_3$ fue sintetizado y purificado de acuerdo con los procedimientos publicados en la bibliografía.⁴⁵ El agua empleada para la preparación de las disoluciones tuvo una conductividad menor que 10^{-6} (Sm^{-1}). Todas las disoluciones en presencia de sal y urea se realizaron a una concentración de etanol del 8% y 5% (en peso), respectivamente, para favorecer la solubilidad del 1-PyCHO.

1.2.2 Métodos.

Se han empleado técnicas de espectrofotometría UV-vis y de fluorescencia. Se han realizado también medidas de viscosidades, y de solubilidad de la sonda en mezclas de agua y alcoholes, y en disoluciones salinas (para determinar el coeficiente de actividad del 1-PyCHO en estos medios). Estos estudios se han completado empleando la técnica de dicroísmo circular, que da información de carácter estructural y la técnica de flujo detenido (“Stopped flow”), para el seguimiento de interacción 1-PyCHO/ADN.

1.2.2.1 Espectrofotometría de UV-vis.

Las medidas de absorción fueron realizadas con un espectrofotómetro UV-vis Cary 500, a 298.2 K. Los espectros de absorción del 1-PyCHO en presencia y ausencia de ADN fueron registrados entre 200 y 600 nm. Las valoraciones espectrofotométricas, fueron llevadas a cabo añadiendo volúmenes crecientes de ADN a un volumen conocido de disolución de colorante de concentración inicial, $2 \times 10^{-5} \text{M}$, colocada previamente en la cubeta. Las concentraciones de ADN variaron en el rango de 0 M a $1.6 \times 10^{-4} \text{M}$. Las disoluciones fueron preparadas en etanol al 18% en peso para facilitar la solubilidad de la sonda hasta concentraciones elevadas de la misma. La longitud de onda seleccionada para las valoraciones fue de 373 nm, para la cual la diferencia entre los coeficientes de extinción molar de los complejos colorante-polímero y del colorante libre ($\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{PD}} - \epsilon_{\text{D}}$) es máxima. Los valores de absorción obtenidos han sido corregidos teniendo en cuenta el efecto de dilución y analizados para la determinación del número de sitios de unión del pireno en condiciones de saturación.

La existencia de posibles procesos de auto-agregación de la sonda, fue investigada también en un espectrofotómetro Perkin-Elmer & Co. GmbH (Überlingen, Alemania) Lambda 17 UV/vis, en ausencia de ADN. La linealidad de la ley de Lambert-Beer fue verificada para disoluciones de 1-PyCHO de concentraciones entre $5 \times 10^{-7} \text{M}$ y $5 \times 10^{-4} \text{M}$ al 43 % en peso de etanol. Esta linealidad también fue verificada en disoluciones del 8% de etanol en un rango de concentraciones desde $5 \times 10^{-7} \text{M}$ hasta concentraciones próximas al límite de solubilidad del 1-PyCHO a este porcentaje de alcohol (véase Tabla 1, página 56).

1.2.2.2 Fluorimetría.

Mediante la técnica de fluorescencia se han realizado valoraciones fluorimétricas que han permitido determinar las constantes de formación del complejo ADN/1-PyCHO en presencia de diferentes concentraciones de sales monovalentes, bivalentes y trivalentes, así como en mezclas agua/alcohol y agua/urea de diferentes concentraciones. La técnica de fluorescencia tiene la ventaja de que permite trabajar con disoluciones de sonda poco concentradas ($\sim 10^{-7} \text{M}$), lo que permite el empleo de valores muy elevados de la relación de concentraciones ADN/1-PyCHO ($C_{\text{N}}/C_{\text{T}}$). Además, el empleo de bajas concentraciones de sonda permite eliminar los posibles efectos de auto-agregación de

ésta, lo que simplifica la interpretación de los resultados experimentales. Por otra parte se realizaron medidas de asociación competitiva con SYBR-Green, y se estudió el efecto de concentraciones elevadas de urea sobre la fluorescencia del complejo ADN/1-PyCHO. Estas medidas se llevaron a cabo con el objetivo de aportar evidencias adicionales a la intercalación de la sonda.

Las medidas de fluorescencia fueron llevadas a cabo en un espectrofluorímetro Hitachi f-2500 conectado a un ordenador para el tratamiento y lectura de los datos, a la temperatura de 298.2 K. Las medidas para la determinación de las constantes de equilibrio de asociación en presencia de sales y codisolventes fueron realizadas a una concentración de 1-PyCHO de 5×10^{-7} M. Las concentraciones de ADN en estos experimentos variaron en el rango de concentraciones de 5×10^{-5} M hasta 2×10^{-3} M. La longitud de onda de excitación fue 356 nm en todos los experimentos, y la de detección de la fluorescencia dependió del porcentaje de alcohol empleado en el experimento. Previamente, se comprobó que los resultados experimentales eran independientes de la longitud de onda de excitación en el rango de 300 nm a 425 nm.

Para el estudio de la asociación competitiva de la sonda con ADN, mediante el empleo del agente intercalante SYBR-Green, la concentración de éste fue de $[SG] = 5 \times 10^{-6}$ M, siendo la longitud de onda de excitación y de detección, 365 nm y 463 nm, respectivamente. Por otro lado, el estudio del efecto de la urea sobre la estabilidad del complejo ADN/1-PyCHO, se llevó a cabo a concentraciones fijas de $[1\text{-PyCHO}] = 5 \times 10^{-7}$ M y de $[ADN] = 1 \times 10^{-4}$ M; y a una concentración de urea que varió desde 0 M a 6 M.

1.2.2.3 Dicroísmo Circular (CD).

El dicroísmo circular está basado en el hecho de que ciertas moléculas o materiales interaccionan de forma diferente con la luz circularmente polarizada hacia la izquierda y la derecha.⁴⁶ Así, si la molécula objeto de estudio presenta actividad óptica, la señal de dicroísmo circular registrará la diferencia de absorbancia de la luz circularmente polarizada hacia la derecha y hacia la izquierda. Moléculas biológicas como los ácidos nucleicos son ópticamente activas y esta propiedad permite obtener a partir de medidas de CD una importante información estructural y conformacional de las mismas.^{47,48} De acuerdo con ello, una de las grandes ventajas de esta técnica es su sensibilidad para detectar los cambios conformacionales que presentan las macromoléculas en disolución.

En particular, en el caso del ADN, pueden distinguirse las diferentes conformaciones A, B o Z.⁴⁸ Esta técnica resulta especialmente útil en la investigación de las interacciones de pequeñas moléculas y ácidos nucleicos, sobre todo en el caso de moléculas de ligando que absorben en la región visible. Muchos ligandos poseen cromóforos aquirales, de manera que cuando están libres en disolución no presentan CD. Sin embargo, cuando se unen a la estructura quiral que presenta la doble hélice de ADN, adquieren un dicroísmo inducido⁴⁹ (ICD). La interpretación del signo y la magnitud del ICD es complicada, ya que depende del modo de unión y la orientación del momento dipolar de la transición del ligando. Sin embargo, se encuentran diferencias significativas entre las señales de dicroísmo de ligandos que se unen al ADN por intercalación y por unión a los surcos. Estas diferencias permiten distinguir los diferentes modos de interacción. Así, moléculas que se unen al surco principal del ADN, presentan espectros de ICD muy intensos, en comparación con los ligandos intercalantes, que generan bandas de ICD relativamente poco intensas, cuyo valor máximo toma valores de 10, en unidades de $\Delta\epsilon/ M^{-1}cm^{-1}$, probablemente debido a que la unión al surco requiere una mayor torsión y el ligando está en contacto con una región mayor de la doble hélice.^{48b} La técnica de dicroísmo circular puede usarse también para obtener información general acerca de la orientación relativa de las sondas respecto a los ejes helicoidales que componen la estructura del ADN, así como para la determinación cuantitativa de las constantes de asociación.

Como ya se ha indicado, una medida de dicroísmo circular es simplemente la diferencia en absorbancia entre la luz circularmente polarizada hacia la izquierda y la derecha, ΔA :

$$\Delta A = A_I - A_D \quad (1)$$

por tanto, sólo puede registrarse CD en la región espectral donde la muestra absorbe. En nuestro caso, esta región es la zona de ultravioleta (200 nm - 320 nm) para el ADN, y la región donde absorbe el complejo de 1-PyCHO en el visible-ultravioleta (320 nm - 450 nm) para el ICD. El CD se convierte en elipticidad, θ (deg) usando la expresión:

$$\theta = 2.303 \Delta A 180 / 4 \pi \quad (2)$$

Sin embargo, para confrontar los resultados de diferentes muestras que difieren en concentración, se trabaja, generalmente, con la elipticidad molar $[\theta]$ definida como:

$$[\theta] = \frac{100\theta}{Ml} \quad (3)$$

En esta expresión M corresponde a la concentración molar de la muestra y l representa el camino óptico de la disolución expresado en cm. Debido a precedentes históricos, la elipticidad molar se expresa, generalmente, en unidades de $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$

Los espectros electrónicos de CD fueron registrados en un espectropolarímetro BioLogic Mos-450 Electronic. En los experimentos se empleó una célula estándar de cuarzo de 1cm de espesor. Los espectros se obtuvieron en el intervalo de 220 nm a 310 nm para la región intrínseca del ADN y de 220 nm a 550 nm para el registro de las medidas de ICD. Todos los espectros se realizaron a una concentración fija de ADN, en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de 1-PyCHO, en el rango de 2.6×10^{-6} M a 1.5×10^{-5} M. Cada espectro presentado en este trabajo es el resultado del promedio de 5-10 medidas realizadas a una temperatura constante de 298.2 K, dejando siempre que transcurriera un intervalo de tiempo de al menos 5 minutos entre cada par de medidas consecutivas.

1.2.2.4. Medidas de viscosidad.

Las medidas de viscosidad se llevaron a cabo empleando un viscosímetro de tipo Ostwald, calibrado previamente con agua y etanol puro, empleando un baño con un termostato acoplado para controlar la temperatura. Cada valor de viscosidad fue el resultado del promedio de 5-10 medidas, y todos los experimentos se realizaron a una temperatura de 298.2 K. El tiempo de flujo se midió después de dejar la muestra colocada en el baño durante unos 15 min. Las muestras fueron preparadas en mezclas agua/etanol al 8% (en peso), empleando una concentración de fija ADN de 5×10^{-5} M en pares de bases, y de 1-PyCHO comprendida en el rango de 2.5×10^{-7} M a 1.5×10^{-6} M. Los resultados se presentan en la página 47, como $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ frente al grado de asociación, r, ($r = [\text{ADN}/1\text{-PyCHO}]/C_N$) donde η es la viscosidad de la disolución de ADN en presencia de 1-PyCHO, y η_0 es la viscosidad de la disolución de ADN en ausencia de la sonda.

1.2.2.5. Medidas de solubilidad.

Las solubilidades de la sonda, en disoluciones de diferentes concentraciones de sal y alcohol, se midieron de acuerdo con el siguiente procedimiento: se colocó una cantidad de sólido 1-PyCHO en exceso en un matraz de 100 ml de capacidad, en contacto con una disolución con la concentración deseada de sal o de alcohol, mantenido el sistema en continua agitación y a temperatura constante mediante el uso de un baño termostático a 298.2 K. Después de un tiempo suficiente (de 24 a 48 horas), se detenía la agitación para asegurar que todo el sólido no disuelto quedara depositado en la parte inferior del matraz. En esas condiciones se extraía una alícuota de la disolución saturada mediante una pipeta previamente termostaticada, y esta alícuota se diluía hasta la cantidad deseada. Posteriormente, las concentraciones de 1-PyCHO disueltas fueron medidas espectrofotométricamente mediante el uso de una recta de calibración a distintas concentraciones de la sonda en el medio deseado (cantidad apropiada de sal o alcohol).

A partir de las medidas de solubilidad de la sonda, se obtuvieron los coeficientes de actividad de esta en los distintos medios, tomando como referencia en nuestro caso, la solubilidad en agua. Así, si S_0 es la solubilidad en el medio de referencia y S en presencia de una concentración determinada de alcohol o de sal, la energía libre del 1-PyCHO relativa al medio de referencia, viene dada por:

$$RT \ln \gamma_{py} = RT \ln \frac{S_0}{S} \quad (4)$$

esto es:

$$\gamma_{py} = \frac{S_0}{S} \quad (5)$$

1.2.2.6 Medidas cinéticas.

Las medidas cinéticas fueron realizadas a la temperatura de 298.2 K, mediante la técnica de flujo detenido, empleando un aparato Biologic SF 300 y siguiendo el curso de la reacción a partir de los cambios de fluorescencia del sistema. Se empleó este modo de detección para el estudio de la cinética de la interacción del 1-PyCHO con ADN, porque la razón señal-ruido era más favorable que la que se obtuvo en el caso de medidas de absorbancia. La señal adquirida fue grabada en un PC y luego analizada

usando el programa Jandell. La concentración de la sonda fue de $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ en todos los experimentos. La concentración de ADN varió en el rango de entre $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ a $1 \times 10^{-3} \text{ M}$. Todos los experimentos cinéticos fueron realizados bajo condiciones de pseudo-primer orden ($[\text{DNA}] \gg 10[1\text{-PyCHO}]$) y fue repetido al menos 10 veces. Las trazas cinéticas obtenidas, en cada caso, fueron acumuladas para reducir la razón señal-ruido. El error promedio en las constantes de tiempo fue de un 10%.

1.3. Resultados y Discusión.

1.3.1 Estudio fisicoquímico y estructural del modo de unión del 1-pirenocarboxialdehído al ADN: Evidencias de intercalación.

Para dilucidar el modo de interacción de la sonda, 1-PyCHO, con la molécula de ADN, se llevó a cabo un estudio físico-químico y estructural basado en el uso de diferentes técnicas: espectroscopía de absorción, fluorescencia, y medidas de viscosidad. Estos estudios, junto con la técnica estructural de dicroísmo circular (CD), proporcionan evidencias de la intercalación de la sonda entre las bases del ADN. De hecho, esta última técnica espectroscópica de CD ha resultado crucial, no sólo para analizar el modo de unión de la sonda, sino también para determinar la orientación relativa del 1-PyCHO respecto del eje longitudinal de la macromolécula, así como los posibles cambios conformacionales en el ADN inducidos por la unión del 1-PyCHO.

1.3.1.1. Estudio de los espectros de absorción y emisión. Medidas de equilibrio y asociación competitiva del 1-PyCHO con la sonda SYBR Green I (SG). Determinación del tamaño del sitio de reacción.

Uno de los métodos más empleados para la detección de la formación de complejos ADN-ligando es el seguimiento de la absorbancia en el visible del complejo a diferentes relaciones de concentración ADN/ligando, representadas por el cociente C_N/C_T , donde C_N es la concentración de ADN en nucleótidos y C_T representa la concentración total de sonda (1-PyCHO). El estudio de los cambios en el espectro electrónico puede emplearse para dilucidar el modo de unión al ADN. En este sentido, como se indicó en el prefacio, estudios computacionales con bromuro de etidio²⁰ y análogos estructurales, han sugerido que la intercalación de los complejos está favorecida por la interacción de los orbitales frontera: el orbital molecular más bajo desocupado (LUMO) del agente intercalante y el más alto ocupado de las bases de purina adyacentes del ADN (HOMO)s.²¹ La interacción entre estos orbitales da lugar a desplazamientos batocrómicos en el máximo de longitud de onda del espectro de absorción del complejo formado por la molécula de ADN y el intercalador. Estas interacciones son mayores en el caso de ligandos intercaladores con carga positiva, como el bromuro de etidio. Por eso, en el caso que nos ocupa, dado que el 1-PyCHO, es una molécula no cargada, se registran pequeños desplazamientos batocrómicos en el espectro de absorción del

complejo 1-PyCHO/ADN (véase Figura 2). El efecto hipocrómico (disminución de la banda de absorción) observado para el 1-PyCHO en presencia de ADN, surge como consecuencia de una reducción de la polaridad que experimenta la sonda en su entorno al unirse al ADN. Esta reducción sería consistente con una intercalación de la sonda entre las bases del ADN.

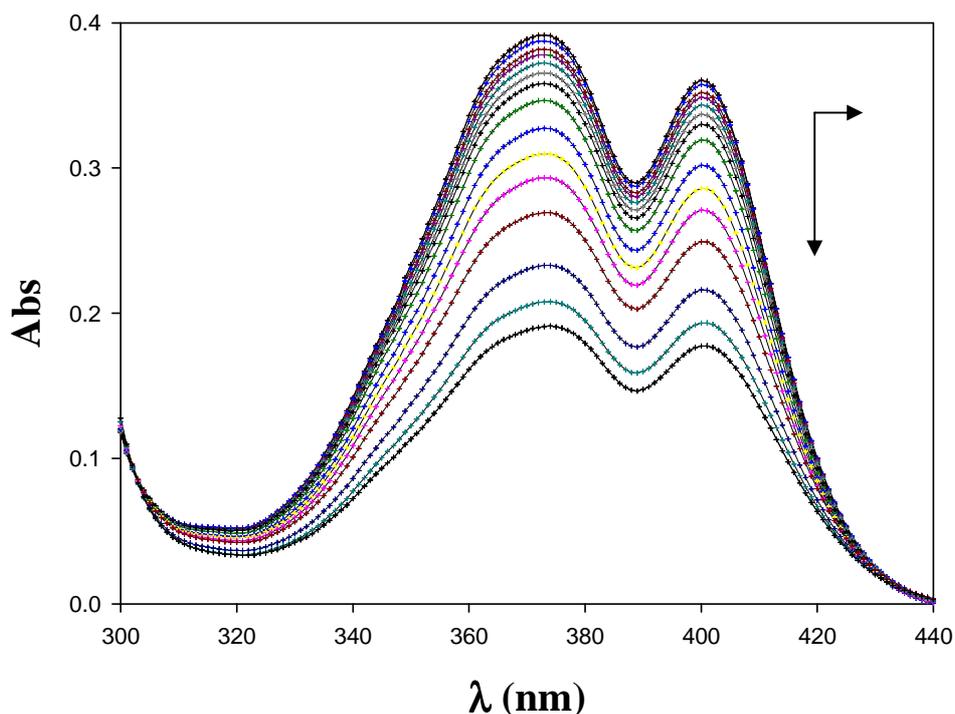


Figura 2. Espectro de absorción del 1-pirenocarboxialdehído en presencia de diferentes concentraciones de ADN y etanol al 18% en peso. Las curvas corresponden a concentraciones de ADN 0, 1.6, 3.2, 4.8, 7.8, 11.4, 19, 22.2, 35.4, 47.4, 58.4, 78.0, 102.0, 122.0, 139, 158 μM . La concentración de 1-PyCHO fue 2×10^{-5} M.

El tamaño del sitio de reacción, n , puede determinarse empleando el modelo de Scatchard⁵⁰ descrito por la ecuación:

$$\frac{r}{[D]} = K_{sc} B - K_{sc} r \quad (1)$$

donde $r = [1\text{-PyCHO}/\text{ADN}]/C_N$; K_{SC} es la constante de asociación del proceso y $[D]$ es la concentración de ligando libre. La ordenada en el origen, $K_{SC}B$, de la representación del cociente $r/[D]$ frente a r , representa la constante de equilibrio del proceso de asociación aislado, es decir, la constante de equilibrio del proceso de intercalación que tendría la primera molécula de 1-PyCHO que se intercala en el ADN. El cociente entre la ordenada en el origen de la recta y la pendiente de la misma, proporciona el parámetro B , que está relacionado con el tamaño del sitio de reacción, y representa el número de parejas de bases que se unen con una molécula de 1-PyCHO en condiciones de saturación. El modelo de Scatchard prevé la ocupación ordenada de los sitios del polímero, sin que ocurran procesos de reorganización de las moléculas de ligando. Para esta situación “ideal”, los gráficos de Scatchard serían lineales y el tamaño del lugar de reacción vendría dado por $1/B$. Sin embargo, esta situación es poco frecuente, debido a que, generalmente, la ocupación de un sitio del polímero por parte de un ligando inactiva las cavidades vecinas en los procesos intercalativos. McGhee y von Hippel demostraron que estas desviaciones de la linealidad en la representación de Scatchard indicaban un cambio del tamaño del lugar de reacción, que pasa de $1/B$ a n .³ Las desviaciones se deben a una tendencia al llenado de los sitios mayor que la supuesta en la teoría de Scatchard. En la teoría de McGhee y von Hippel³ el tamaño del lugar de reacción se define como n , y resulta más pequeño que el tamaño del sitio $1/B$ de Scatchard. A partir del tamaño del sitio de reacción que proporciona el análisis de Scatchard, $1/B$, podría obtenerse el valor de n de acuerdo con la relación:

$$n = \frac{1/B + 1}{2} \quad (2)$$

Las pequeñas concentraciones de 1-PyCHO, empleadas en las medidas de fluorescencia no permitieron una determinación exacta del tamaño del sitio de unión, n , debido a la gran incertidumbre de la intercepción con el eje x en el ajuste de Scatchard.⁵⁰ Para obtener un valor correcto del tamaño del sitio de unión mediante este procedimiento, las valoraciones espectrofotométricas deberían hacerse a altos valores de r , como ocurre en el caso del bromuro de etidio y otros intercalantes, condición que no se cumple en el caso del 1-PyCHO. Esto es debido a los pequeños valores de las constantes de asociación $K_{SC}B$, y la baja solubilidad del 1-PyCHO en agua. No obstante, otras metodologías permiten determinar el valor de n , de forma directa.⁵¹ Una de ellas

consiste en realizar una valoración a fuerza iónica muy baja, de forma que en estas condiciones se puede alcanzar fácilmente la completa saturación de los lugares de reacción, estando el equilibrio desplazado hacia la formación del complejo. Midiendo absorbancia, es posible trabajar a concentraciones de sonda mayores que mediante la técnica de fluorescencia. En efecto, representando $\Delta\text{Abs}/C_T$ en función del cociente C_P/C_T (siendo C_T la concentración total de 1-PyCHO y C_P la concentración de ADN en pares de bases), se obtienen dos tramos rectilíneos característicos de las asociaciones completas⁵²; la intersección de estas dos líneas proporciona el cociente C_P/C_T igual al tamaño del lugar de reacción, n . El cociente C_P/C_T resultó ser igual a ~ 2 pares de bases (véase la Figura 3). Esto quiere decir que el tamaño del lugar de reacción, es decir, el número de sitios que una molécula de 1-PyCHO ocupa en condiciones de saturación, es aproximadamente 2. Cabe destacar que valores de $n = 2$ (pares de bases) se dan frecuentemente en fenómenos intercalativos.⁵³

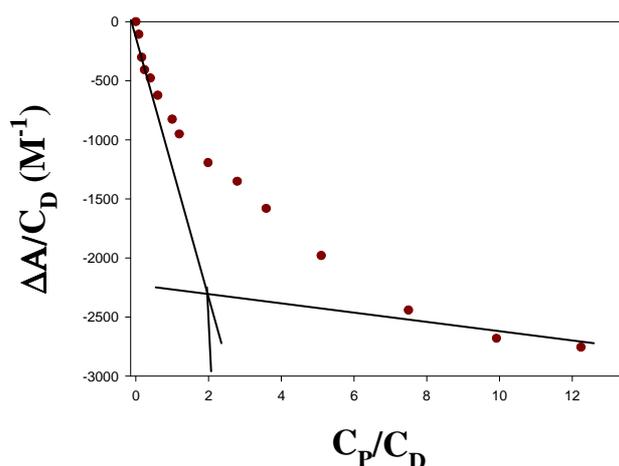


Figura 3. Determinación del tamaño del sitio de reacción, n , para el sistema ADN/1-PyCHO por valoración espectrofotométrica en condiciones de alta saturación. ($T = 298.2$ K, $l = 1$ cm y $\lambda = 373$ nm). La intersección de las dos líneas proporciona el valor de n .

Por otro lado, trabajando en modo fluorescencia, el uso de bajas concentraciones de sonda, permite que las contribuciones a la auto-agregación de la misma sean despreciables. Bajo estas condiciones, se observa que cantidades crecientes de ADN a

una concentración fija de 1-PyCHO producen un fuerte decrecimiento de la emisión de fluorescencia (véase Figura 4).

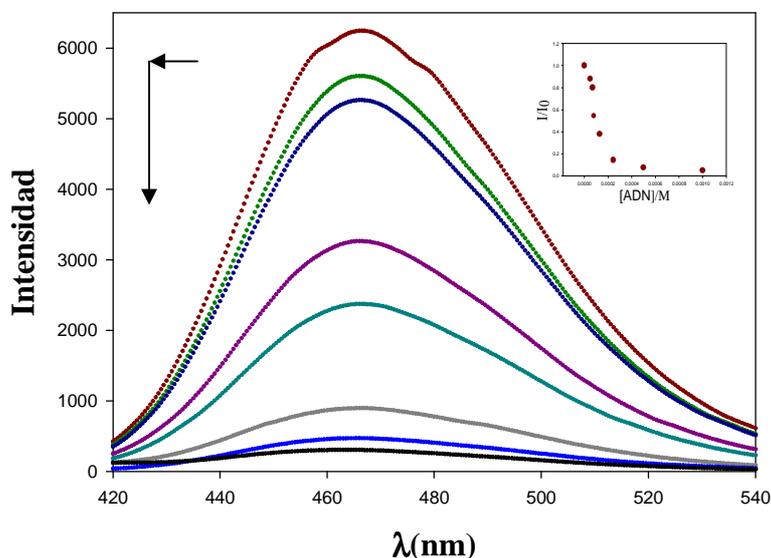


Figura 4. Espectro de emisión del 1-PyCHO, en presencia de diferentes concentraciones de ADN ($\lambda_{exc}= 356\text{nm}$; $\lambda_{em}= 468\text{nm}$). Las curvas corresponden a concentraciones de ADN 0, 50, 70, 80, 168, 246, 500, 1000 μM , respectivamente. La concentración de sonda fue $5 \times 10^{-7}\text{M}$ al 5% de etanol (en peso). El recuadro muestra la variación relativa de intensidad de fluorescencia con la concentración de ADN.

Estudio de la asociación competitiva con SYBR Green I (SG).

Para corroborar el modo de interacción del pireno con el ADN, se llevó a cabo un estudio de asociación competitiva de la sonda (1-PyCHO) con el intercalador SYBR-Green (SG). El SG es una sonda fluorescente que se introdujo en la década de los 90, y que se ha utilizado con éxito en una gran variedad de investigaciones con aplicaciones analíticas y diagnósticas.⁵⁴ Entre estas aplicaciones destaca su uso en técnicas de detección de ácidos nucleicos en geles⁵⁵ y en disolución.⁵⁶ Algunas de las propiedades más destacadas del SG son su alta estabilidad térmica y la alta selectividad por el ADN de doble hebra. Las propiedades fluorescentes de la sonda (libre y asociada al ADN) son similares a las que presenta el bromuro de etidio. Esto es, el SG emite fuertemente cuando se encuentra intercalado entre las bases del ADN, y su emisión es prácticamente

nula en ausencia de la macromolécula. No obstante, a diferencia de lo que ocurre en el caso del bromuro de etidio, el modo de unión del SG puede ser intercalativo o de asociación externa a la doble hélice. La existencia de un tipo de unión u otro depende de la relación $[SG]/[ADN]$. De tal forma que, el SG se intercala a bajos valores de este cociente, y por el contrario se une externamente a la doble hélice a valores del cociente $[SG]/[ADN]$, próximos a ~ 0.2 .⁵⁷ El estudio de asociación competitiva del 1-PyCHO y el SG por el ADN se llevó a cabo mediante dos titulaciones, para la determinación de las constantes de asociación 1-PyCHO/ADN, por la técnica de fluorescencia. Una de ellas se realizó en ausencia de SG, y la otra en su presencia ($[SG] = 5 \times 10^{-6} M$). Los datos de intensidad de fluorescencia experimentales, en presencia y en ausencia de SG, fueron analizados de acuerdo con el método de Hildebrand-Benesi⁵⁸, en el intervalo de concentraciones donde esta representación fue lineal. A continuación se describe, brevemente, este método de ajuste para el caso de valoraciones espectrofluorimétricas:

La asociación entre un polímero N y un ligando D, para formar un complejo genérico ND, puede describirse:



La constante de asociación, K, para el proceso definido en el esquema I viene dada por:

$$K = \frac{[ND]}{[N][D]} \quad (3)$$

donde en el caso de la interacción del 1-PyCHO con el ADN, [ND] sería la concentración de complejo ADN/1-PyCHO formado; [N], la concentración de ADN libre en grupos fosfato; [D], la concentración de 1-PyCHO libre; y K, la constante de Hildebrand-Benesi. Para cada reactivo (1-PyCHO y ADN) puede considerarse un balance de masa. Designando como C_N y C_T , las concentraciones analíticas totales de ADN y 1-PyCHO:

$$C_N = [N] + [ND] \quad (4)$$

$$C_T = [D] + [ND] \quad (5)$$

A una longitud de onda donde sólo emite el ligando en su forma libre y complejada, la fluorescencia total emitida es directamente proporcional a la concentración de la muestra, según una expresión formalmente similar a la ley de Lambert-Beer en espectrofotometría de absorbancia:

$$\Delta F = \phi_D 2.3 I_0 l \epsilon [D] + \phi_{ND} 2.3 I_0 l \epsilon [ND] \quad (6)$$

La cantidad de fluorescencia total es directamente proporcional a la concentración de pireno libre y enlazado al ADN en la muestra, pero también a I_0 , a l (longitud de la cubeta expresada en cm) y al parámetro ϕ (rendimiento cuántico). La fluorescencia medida es, por otra parte, la que se recoge en el detector, y es dependiente de la geometría del fluorímetro. De esta forma, para valores fijos de I_0 , de l , y empleando un mismo dispositivo experimental (con geometría fija), la cantidad de fluorescencia medida de una disolución a una determinada longitud de onda λ viene dada por:

$$\Delta F(\lambda) = k' \phi_D [D] + k' \phi_{ND} [ND] \quad (7)$$

con $k' = 2.3 \epsilon_{\lambda_{exc}} f(\lambda) I_0 K'$. $f(\lambda)$ representa la fluorescencia emitida a la longitud de onda de emisión. K' es un factor geométrico que incluye l y el parámetro d que representa la cantidad de fluorescencia recogida por el detector. De acuerdo con ello, cuando las ecuaciones 3, 4 y 5, se combinan con la ecuación 7, se obtiene la ecuación de Hildebrand-Benesi⁵⁸ para el ajuste de los datos experimentales de intensidad de fluorescencia del 1-PyCHO:

$$\frac{C_N C_T}{\Delta F} + \frac{\Delta F}{(\Delta \phi)^2} = \frac{1}{\Delta \phi K} + \frac{1}{\Delta \phi} (C_N + C_T) \quad (8)$$

En esta ecuación ΔF es la diferencia entre la intensidad de fluorescencia de la sonda en ausencia y en presencia de ADN, a una longitud de onda de emisión fija (la del máximo en el espectro de emisión de fluorescencia en cada titulación); $\Delta \phi$, es una magnitud que tiene un significado equivalente a la diferencia entre los coeficientes de extinción molar

de la sonda libre y enlazada ($\Delta\epsilon$, en absorbancia) y K es la constante de equilibrio según el método de Hildebrand-Benesi.

Utilizando esta ecuación y mediante iteraciones sucesivas, se pueden encontrar los valores de $\Delta\phi$ y K de Hildebrand-Benesi. El procedimiento para el ajuste de los datos experimentales es el siguiente: inicialmente se iguala a cero el segundo término cuadrático del miembro izquierdo de la ecuación 8, y se construye la gráfica $(C_N C_T / \Delta F)$ frente a $(C_N + C_T)$, que proporciona un valor aproximado de $\Delta\phi$. Este último, una vez sustituido en la ecuación 8 (en la que se incluye ahora el segundo término cuadrático), permite recalcular el miembro izquierdo de esta ecuación $(C_N C_T / \Delta F + \Delta F^2 / \Delta\phi^2)$, obteniéndose de esta forma, nuevos valores de K y de $\Delta\phi$. Sucesivas iteraciones permiten alcanzar la convergencia. En el presente estudio, fueron suficientes 3 iteraciones sucesivas para alcanzarla. De acuerdo con la aproximación de Hildebrand-Benesi, se obtuvo una constante de asociación del 1-PyCHO al ADN, en ausencia de SG de $1.14 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ al 18% en etanol. Para la determinación de la constante de equilibrio ADN/1-PyCHO en presencia de SG, se efectuaron experimentos preliminares para comprobar que esta sonda no emitía fluorescencia en el rango espectral de emisión del complejo 1-PyCHO/ADN. En presencia de una concentración del ligando $[SG] = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$, la constante de equilibrio ADN/1-PyCHO (en las mismas condiciones experimentales) fue $7.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, un valor bastante menor que el obtenido en ausencia de SG ($1.14 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Este resultado indica que el SG desplaza de forma aleatoria al 1-PyCHO, ocupando los sitios vacantes del ADN. La Figura 5, muestra el ajuste de los datos experimentales a la ecuación 8, correspondientes al experimento de asociación competitiva en presencia y en ausencia de SG. En esta figura puede observarse que los puntos a cada concentración de ADN siempre corresponden a valores más altos de intensidad cuando el SG está presente (véase recuadro en Figura 5).

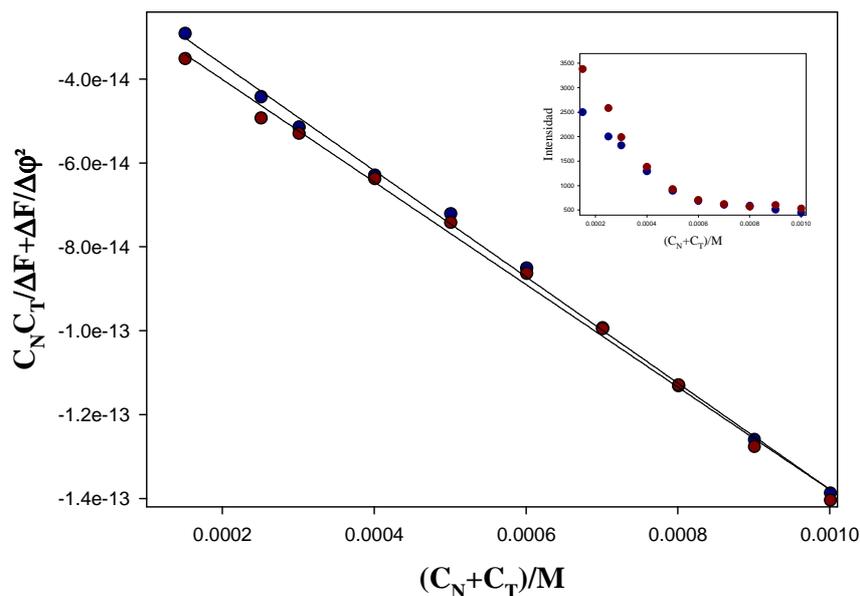


Figura 5. Estudio de la asociación competitiva con SYBR-Green del 1-PyCHO con ADN al 18% de etanol (en peso). [ADN] = ($1 \times 10^{-4} \text{ M} - 1 \times 10^{-3} \text{ M}$), $\lambda_{\text{exc}} = 356 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 463 \text{ nm}$. (●) [PyCHO] = $1 \times 10^{-6} \text{ M}$, [SB] = $5 \times 10^{-6} \text{ M}$; (●) [PyCHO] = $1 \times 10^{-6} \text{ M}$, [SB] = 0 M).

1.3.1.2. Efecto de la Urea en la asociación del 1-PyCHO al ADN.

La urea y sus derivados han recibido una atención considerable en el campo de la biología, debido a que pueden ser empleados como agentes desnaturalizantes de proteínas, polipéptidos y otros bio-polímeros como el ADN.⁵⁹ A altas concentraciones, la urea es capaz de desestabilizar la doble hélice de ADN, lo cual produce una disminución de la temperatura de disociación de las hebras (temperatura de “melting”).⁶⁰ En relación con este fenómeno, se ha sugerido que la adición de la urea a una disolución que contiene un complejo intercalado en el ADN, produce un debilitamiento de la asociación entre el agente intercalante y el ADN. Esta interacción de la urea con el ADN es capaz de promover el paso de la sonda intercalada a la disolución, y por tanto, una modificación del comportamiento fluorescente del sistema.⁶⁰ La adición gradual de urea a una disolución que contiene el complejo ADN/1-PyCHO, hace que el espectro de fluorescencia de la sonda se comporte de una forma cualitativamente opuesta, a la que se observa cuando en ausencia de urea, se añaden cantidades crecientes de ADN a la disolución de la sonda. Este comportamiento

cualitativo puede observarse en la Figura 6. En ausencia de urea, la adición gradual de ADN a la disolución produce una disminución de la intensidad de fluorescencia acompañada por un pequeño desplazamiento de la longitud de onda hacia el azul ($\sim 3\text{nm}$) (véase Figura 4). Contrariamente, el efecto de aumentar la concentración de urea a una disolución con 1-PyCHO y ADN, es un aumento de la fluorescencia junto con un desplazamiento hacia el rojo del máximo de longitud de onda ($\sim 3\text{nm}$). Este resultado es indicativo de la salida del 1-PyCHO desde el sitio que ocupa en el ADN a la disolución acuosa. Naturalmente, el grado de intercalación de la sonda depende, de alguna forma, de la concentración de urea necesaria para que la intensidad de fluorescencia del complejo ADN/1-PyCHO alcance la correspondiente a la sonda libre. Como puede verse en la Figura 6, en el caso del 1-PyCHO, esto ocurre a una concentración de urea 6 M, aproximadamente. Es importante destacar que esta misma concentración de urea se requiere en el caso de otros intercaladores, como la safranina-O (SO).⁶¹

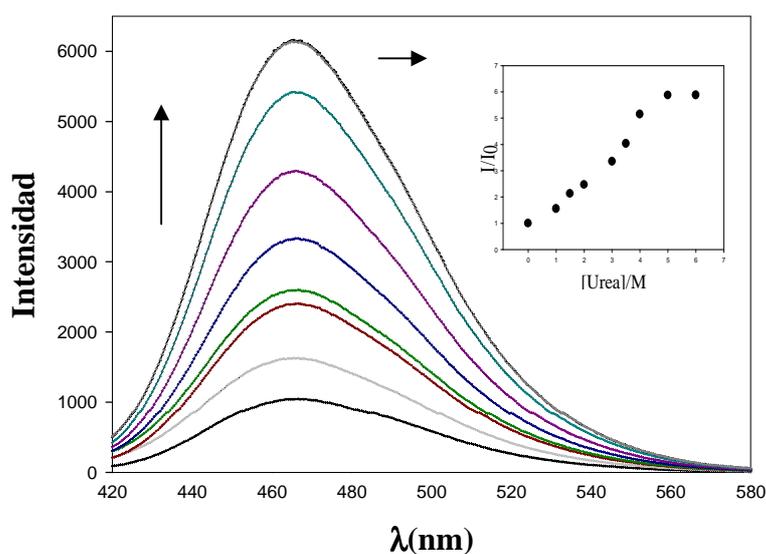


Figura 6. Intensidad de fluorescencia del complejo ADN/1-PyCHO, en función de la concentración de urea, en etanol al 5% (en peso). ($\lambda_{\text{exc}} = 356\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 467\text{nm}$. $[\text{ADN}] = 100\ \mu\text{M}$; $[\text{1-PyCHO}] = 0.5\ \mu\text{M}$). El recuadro muestra la variación relativa de intensidad de fluorescencia del sistema respecto a la fluorescencia del complejo, en ausencia de urea.

1.3.1.3. Estudio hidrodinámico.

La intercalación de diferentes ligandos y sondas entre los pares de bases del ADN produce un incremento significativo en la viscosidad de la disolución de ADN, debido a la separación entre las bases que se produce en el sitio donde tiene lugar el fenómeno de intercalación, todo ello junto con un incremento en el contorno longitudinal de la molécula de ADN. Para que el fenómeno de intercalación pueda ocurrir, las bases del ADN deben separarse verticalmente (“unstack”) y, generalmente, la cara 5' del azúcar, donde se produce la intercalación, cambia desde la configuración C2'-endo a la C3'-endo.⁶² Con el objeto de aportar otra prueba de apoyo a la interacción de la sonda 1-PyCHO al ADN, se midió la viscosidad de diferentes disoluciones que contenían una concentración fija de ADN y concentraciones crecientes de 1-PyCHO. Los resultados correspondientes a $[\text{ADN}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ aparecen en la Figura 7. Los resultados muestran el incremento en la longitud de contorno del ADN, indicando que el modo de interacción del 1-PyCHO es de tipo intercalativo.

La relación entre el cambio en la longitud de contorno del ADN (desde L_0 a L) y el cambio en la viscosidad intrínseca para el ADN libre, η_0 , y formando complejo con el pireno, η , viene dada por⁶³:

$$\frac{L}{L_0} = \left[\frac{\eta}{\eta_0} \frac{f(p)_o}{f(p)} \right]^{1/3} = 1 + r \quad (9)$$

donde r , es la razón entre la concentración ADN/sonda y la concentración total de ADN, expresada en pares de bases. $f(p)_o$ y $f(p)$ son funciones del radio axial, p , del ADN libre y formando complejo, respectivamente. Dado que estas últimas funciones son prácticamente independientes de “ p ” a altos radios axiales, frecuentemente se supone que estas se cancelan unas con otras.^{53,64} Esto implica que una representación de $[\eta/\eta_0]^{1/3}$ vs. r proporcionaría una recta de pendiente unidad para un intercalador ideal. Sin embargo, intercaladores clásicos como la proflavina y el bromuro de etidio, dan pendientes de 0.80 y 0.73 respectivamente.⁶⁵ En el caso del 1-PyCHO, se obtuvo una pendiente de 0.79.

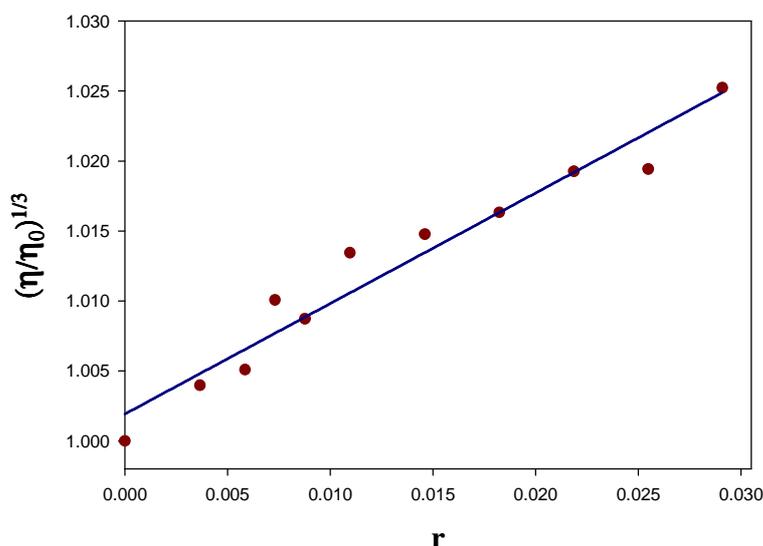


Figura 7. $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ vs. r (razón de mezcla). η , representa la viscosidad de la mezcla ADN/1-PyCHO a cada valor de r; η_0 , representa la viscosidad del ADN en ausencia de la sonda (referencia). [DNA] = 50 μ M (p.b); [1-PyCHO] = (2.5×10^{-7} M - 1.5×10^{-6} M).

1.3.1.4. Estudio de los espectros de Dicroísmo Circular Intrínseco e Inducido del sistema ADN/1-PyCHO.

La interacción y el modo de unión del 1-PyCHO al ADN, puede seguirse también del estudio de los espectros de dicroísmo circular intrínseco e inducido (ICD) del sistema. Esta técnica es una de las más sensibles a los cambios conformacionales de los ácidos nucleicos en disolución. La estructura secundaria del ADN se ve alterada por la intercalación de pequeñas moléculas.⁶⁶ Generalmente, la perturbación en las bandas de CD, que reflejan el apilamiento de las bases y la elipticidad del ADN, es menor o inexistente cuando la unión es a los surcos del ADN, o a través de interacciones electrostáticas. Sin embargo, los intercaladores aumentan la intensidad de ambas bandas como ocurre en el caso del intercalador clásico azul de metileno.⁶⁷

La conformación del esqueleto estructural del ADN muestra un espectro de CD característico de la forma B del ADN en el ultravioleta (220 - 320 nm). El espectro de CD intrínseco, en la región de 230 a 300 nm, es sensible a los cambios estructurales de la macromolécula. Las perturbaciones estructurales del ADN, como consecuencia de su interacción con los ligandos, se reflejan en cambios en el espectro de CD intrínseco. En la Figura 8a, el espectro de CD del ADN presenta un pico positivo a aproximadamente 278 nm, y otro, negativo a 247 nm. Estos picos son característicos de la conformación B

del ADN. Esta es la conformación habitual (10.4 pares de bases por vuelta) que presenta el ADN en disolución acuosa a concentraciones moderadas de sal (en condiciones fisiológicas). Estas bandas son causadas por las interacciones de apilamiento de las bases y la superestructura helicoidal del polinucleótido que proporciona un entorno asimétrico para las bases.⁶⁸ En la misma figura se presenta un ejemplo de una titulación realizada mediante medidas de dicroísmo circular, en mezclas agua/alcohol. Las intensidades de ambas bandas aumentan, al hacerlo la relación [1-PyCHO]/[ADN]. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en las posiciones de los máximos de ambas bandas cuando se añadieron cantidades crecientes de 1-PyCHO a la disolución. La interrupción de las interacciones de apilamiento de las bases refleja un desplegamiento local del esqueleto helicoidal del ADN, siendo ésta la causa del incremento de la banda a 278 nm.⁶⁹ Estos cambios en la banda positiva cuando la razón [1-PyCHO]/[ADN] aumenta, son consistentes con un proceso intercalativo, mostrando la disrupción de las interacciones de apilamiento de las bases en contacto entre sí, y una estabilización de la conformación B del ADN.

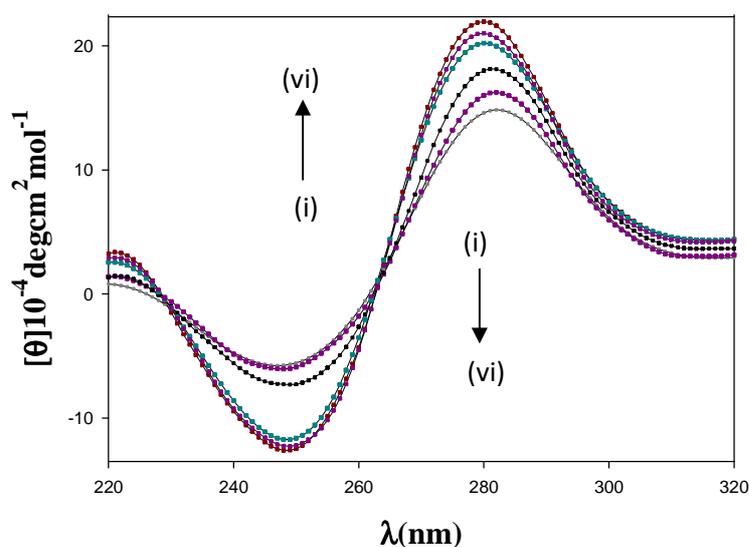
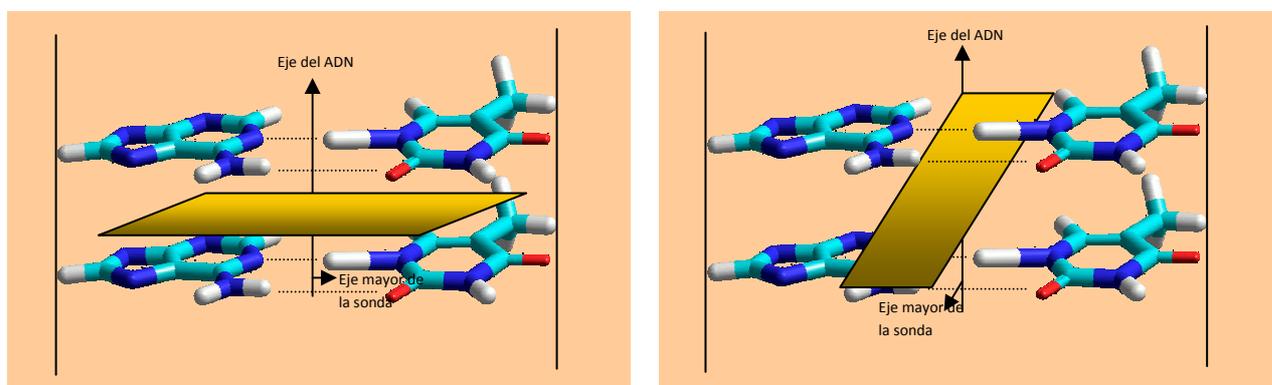


Figura 8a. Espectros de CD intrínseco del ADN al variar las concentraciones de 1-PyCHO, al 18% de etanol (en peso). Las curvas de la (i) a la (vi) corresponden a concentraciones de 1-PyCHO 0; 2.6; 8.1; 11.4; 13.4; 14.5 μM . La concentración de ADN fue 100 μM en cada caso.

El dicroísmo circular inducido (ICD) también refleja evidencias de la intercalación de la sonda. El ICD permite conocer la orientación angular y la localización del intercalador entre las bases del ADN.⁷⁰ Como el 1-PyCHO es un cromóforo plano y aquiral, sólo las moléculas que se enlacen a la estructura asimétrica de la doble hélice de ADN presentan dicroísmo circular (inducido).⁷¹ A medida que la razón [1-PyCHO]/[ADN] aumenta, aparece un máximo de ICD positivo a 410 nm (véase Figura 8b). Nordén y colaboradores⁷² encontraron que el dicroísmo circular inducido es positivo cuando el intercalador se orienta paralelamente al eje mayor de los pares de bases ($\theta = 0^\circ$); mientras que una orientación perpendicular ($\theta = 90^\circ$) en la misma posición produce un CD inducido negativo (véase esquema II). Esto es, para que una sonda se intercale entre los pares de bases del ADN, ésta se situará de forma perpendicular al esqueleto del ADN (DNA axis), pudiendo quedar además su eje mayor dispuesto paralela o perpendicularmente al eje mayor de los pares de bases del sitio de reacción.



Esquema II. Dos posibles orientaciones angulares para la intercalación de la sonda entre los pares de bases del ADN.

Considerando el ICD positivo observado para el ligando 1-PyCHO (véase Figura 8b), debe concluirse que éste se sitúa perpendicularmente al eje del ADN con su eje mayor orientado paralelamente al eje mayor de los pares de bases del ADN. Sin embargo, debido a la pequeña magnitud del ICD observado, y a la inexistencia de un punto isobéptico en esta región del espectro, la intercalación de la sonda 1-PyCHO con el

ADN podría ser de carácter heterogénea, esto es, pueden estar implicadas múltiples orientaciones en la asociación de la sonda con el ADN.

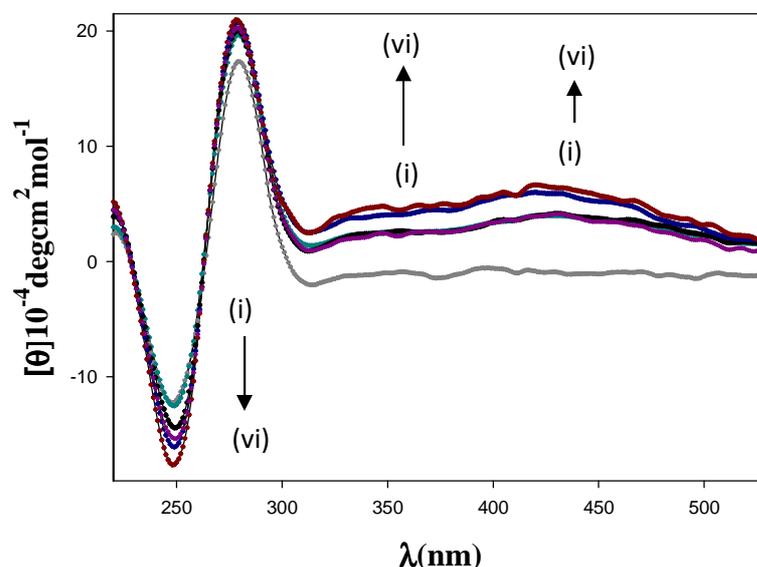


Figura 8 b. Espectro de dicroísmo circular correspondiente a la valoración del 1-PyCHO con ADN, al 18% de etanol (en peso). Las curvas de la (i) a la (vi) corresponden a concentraciones de 1-PyCHO 0; 2.6; 8.1; 11.4; 13.4; 14.5 μM . La concentración de ADN fue 100 μM en cada caso.

En conclusión, el modo de interacción del 1-PyCHO con el ADN ha sido estudiado mediante el uso de distintas técnicas espectroscópicas, así como a través de medidas de viscosidad. El valor obtenido para el tamaño del sitio de reacción es de, aproximadamente, 2 pares de bases, lo cual está de acuerdo con la intercalación de la sonda. El fuerte hipocromismo registrado, tanto en los espectros de emisión como de absorción del 1-PyCHO en presencia de ADN, junto con los resultados del estudio de la asociación competitiva con el SYBR Green I (SG), medidas de viscosidad, y el efecto de la urea sobre el complejo ADN/1-PyCHO indican que la molécula de 1-PyCHO se intercala en el ADN. Los espectros de dicroísmo circular inducido (ICD) del sistema muestran que el 1-PyCHO se intercala mayoritariamente con el eje mayor de la molécula paralelamente al eje principal de las bases del ADN, si bien, esta disposición es de carácter heterogéneo. Por otro lado, el dicroísmo circular intrínseco del polielectrolito muestra una estabilización de la conformación B del ADN durante el proceso intercalativo.

1.3.2. Efectos del medio en la termodinámica de interacción del 1-PyCHO con ADN: Cuantificación de las interacciones del ADN con sales y codisolventes.

El 1-Pirenocarboxialdehído (1-PyCHO) es una sonda neutra, cuyas características resultan apropiadas para determinar los cambios de polaridad de su entorno. Esto es consecuencia de la existencia de dos estados excitados del 1-PyCHO que están próximos en energía, un estado luminiscente y otro “oscuro”, cuyas poblaciones relativas dependen de la polaridad del medio.⁷³ Como consecuencia de la intercalación de la sonda entre las bases del ADN, el pireno y sus derivados, muestran una emisión de fluorescencia menor cuando se enlazan al ADN.⁷⁴ Este hecho nos ha permitido cuantificar la energía libre de asociación del 1-PyCHO al ADN. Las constantes de asociación 1-PyCHO/ADN se determinaron por valoración fluorimétrica, siguiendo los cambios en la intensidad de fluorescencia de la sonda, al aumentar la concentración de ADN. La Figura 9 muestra la variación de la intensidad de emisión del 1-PyCHO, en función de la concentración de ADN, para disoluciones que contienen un 16% de etanol. Comportamientos similares se observaron en presencia de sales y de los otros codisolventes estudiados.

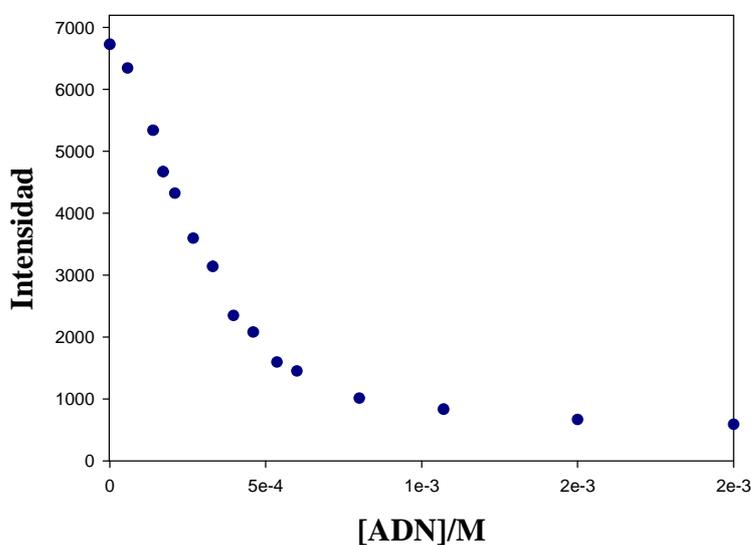
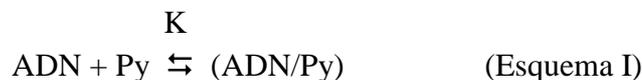


Figura 9. Intensidad de emisión del 1-PyCHO, I , frente a la concentración de ADN, $[ADN]$, en presencia de un 16% de etanol.

1.3.2.1 Alcoholes

El equilibrio entre la molécula de 1-PyCHO y el ADN en presencia de alcohol puede representarse mediante el esquema I:



Los datos de intensidad de fluorescencia obtenidos a distintas concentraciones de alcohol, fueron analizados en primer lugar según el método de Hildebrand-Benesi⁵⁹ en el intervalo de concentraciones donde la representación resultó ser lineal, siguiendo el procedimiento descrito en la página 42. Un ejemplo del ajuste de los datos experimentales al método de Hildebrand-Benesi se ilustra en la Figura 10.

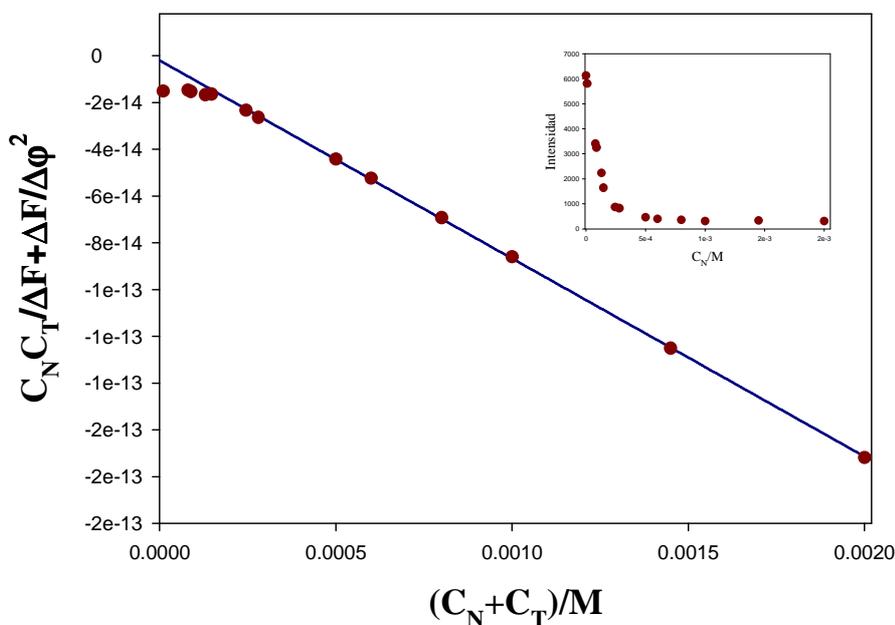


Figura 10. Análisis de la valoración fluorimétrica para la asociación ADN/1-PyCHO al 8 % de etanol, según el método de Hildebrand-Benesi: $C_T = 5.10^{-7}$ M, $T = 298.2$ K, $\lambda_{exc} = 356$ nm, $\lambda_{em} = 468$ nm. El recuadro muestra la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de ADN.

La Figura 10, muestra la existencia de desviaciones a altos valores del cociente C_B/C_N ($C_B/C_N = [\text{ADN/Py}]/[\text{ADN}]$), esto es a las concentraciones de ADN más bajas

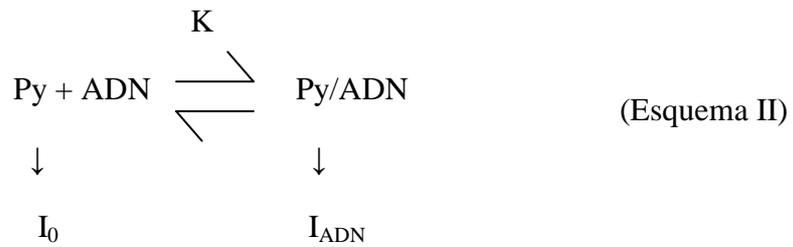
empleadas en los experimentos. Estas desviaciones de la linealidad pueden deberse a un proceso de *superposición de sitios* en condiciones próximas a la saturación del polímero. La tendencia del ligando a intercalarse entre los pares de bases del ADN, modifica la estructura secundaria del ADN, del lugar de reacción del polímero, incapacitando los lugares adyacentes para recibir nuevas moléculas de 1-PyCHO, y por tanto haciendo con ello más difícil la entrada de nuevas moléculas de la sonda. Por esta razón los datos de intensidad de fluorescencia se ajustaron, en todo el rango de concentraciones, teniendo en cuenta la dependencia de la constante termodinámica, K, con el cociente [ADN/Py]/[ADN]. K depende, para una concentración fija de pireno, de la concentración de ADN. Para describir esta dependencia se ensayó:

$$I = \frac{I_0 + I_{ADN} K[ADN]}{1 + K[ADN]} \quad (a)$$

$$K = K_{max} \frac{e^t}{1 + e^t} \quad (b) \quad (1)$$

$$t = \frac{[ADN] - h}{j} \quad (c)$$

El significado de estas ecuaciones es el siguiente: en presencia de ADN, el 1-PyCHO se enlaza parcialmente a este:



El 1-PyCHO libre emite a una intensidad I_0 , mientras que el 1-PyCHO enlazado lo hace con una intensidad I_{ADN} , de tal forma que la intensidad de emisión observada es el promedio dado por la ecuación 1a. Por otro lado, la ecuación 1b muestra la dependencia de la constante de asociación K, con el grado de saturación, donde K presenta un comportamiento sigmoideal con la concentración de ADN. Este comportamiento se ha observado en otros casos en los que pequeños ligandos se unen al ADN.⁷⁵ Finalmente,

en la ecuación 1c, h es el valor de $[ADN]$ para la cual $K = (1/2)K_{max}$ y j es un parámetro ajustable. En la ecuación 1b, K_{max} representa el valor límite máximo de K . Este valor de K_{max} es el que emplearemos para la cuantificación de las constantes de equilibrio de la interacción ADN/1-PyCHO en presencia de alcohol.

A altas concentraciones de alcohol, los datos de intensidad de fluorescencia se ajustaron directamente a la ecuación 1a. Una descripción detallada de cómo se realizaron los ajustes de intensidad de fluorescencia de la sonda al variar la concentración de ADN se recoge en el Apéndice I. Los valores de los parámetros obtenidos de los diferentes ajustes a la ec. 1, se encuentran en el Apéndice II. En la Figura 11, a modo de ejemplo, se ilustra uno de estos ajustes.

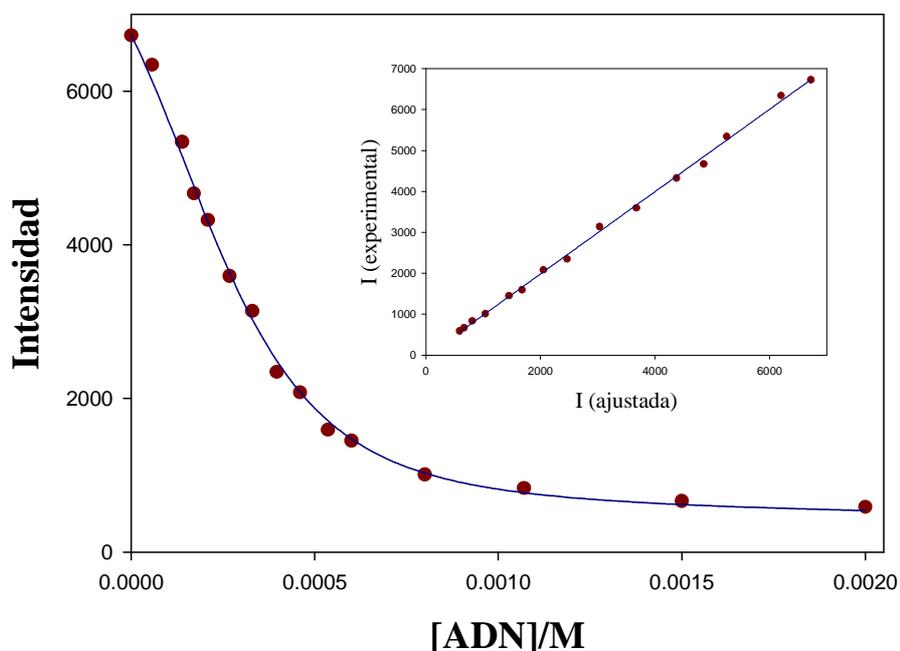


Figura 11. Ajuste de la intensidad de fluorescencia del 1-PyCHO frente a la concentración de ADN, al modelo de sigmoidea para una concentración de etanol del 16 % (en peso). El recuadro muestra el ajuste lineal de la intensidad experimental frente a la intensidad que predice el modelo.

Los valores de K_{\max} para el proceso de asociación del 1-PyCHO con el ADN, en presencia de diferentes concentraciones de alcoholes, aparecen recogidos en la Tabla 2. A partir de ellos puede obtenerse el valor de ΔG_{\max} :

$$\Delta G_{\max} = -RT \ln K_{\max} \quad (2)$$

Los valores de ΔG_{\max} representan la afinidad del 1-PyCHO por el ADN *relativa a las disoluciones donde el 1-PyCHO libre está presente*. Obviamente, los valores de ΔG_{\max} no pueden ser comparados directamente, debido a que estas disoluciones son diferentes. Sin embargo, las medidas de solubilidad que aparecen en la Tabla 1 nos permiten comparar estas energías libres, una vez que estas son corregidas, teniendo en cuenta las diferencias de energías libres de la sonda en las distintas disoluciones, debido a la presencia de diferentes concentraciones de codisolventes. Por tanto, si S_0 es la solubilidad en ausencia de alcohol o sal y S en presencia de una concentración dada de codisolvente o sal a la misma temperatura, esta energía libre, ΔG_{Py} , se relaciona con el coeficiente de actividad del 1-PyCHO, y este último con la solubilidad:

$$\Delta G_{\text{Py}} = RT \ln \gamma_{\text{Py}} = RT \ln \frac{S_0}{S} \quad (3)$$

De esta forma la energía libre de asociación de la sonda al ADN, corregida del efecto de la diferencia de energía libre de las disoluciones en las que se encuentra la sonda libre, vendría dada por:

$$\Delta G_{\max}^{\text{corr}} = \Delta G_{\max} - RT \ln \frac{S_0}{S} \quad (4)$$

Es importante destacar que este tipo de corrección no aparece en estudios previos sobre reacciones de intercalación en presencia de codisolventes o sales, por lo que en este estudio se ha obtenido por primera vez la “verdadera” energía libre del proceso de asociación de un agente intercalante con el ADN.

Tabla 1. Valores de solubilidad del 1-PyCHO correspondientes a diferentes concentraciones de alcoholes y sales.

X_m Etanol	$10^6 S_{\text{etanol}}/ M$	X_m 2-Propanol	$10^6 S_{2\text{-propanol}}/ M$
0.0201	0.86	0.0221	2.12
0.0264	1.21	0.0254	2.76
0.0328	1.87	0.0291	3.73
0.0693	9.27	0.0382	7.25
0.1141	66.00	0.0559	35.80
0.1430	167.00	0.0800	254.00
0.2310	1350.00	0.0939	984.00

X_m Terc-butanol	$10^6 S_{\text{terc-butanol}}/ M$	$10^3 [NaClO_4]/M$	$10^6 S_{NaClO_4}/ M$
0.0078	1.65	10.0	4.46
0.0126	1.61	28.0	3.83
0.0207	3.69	125.0	3.00
0.0362	19.39	250.0	3.11
0.0506	93.07	500.0	4.39
0.0655	498.50	1000.0	12.20

$10^4[Ba(ClO_4)_2]/M$	$10^6 S_{Ba(ClO_4)_2}/ M$	$10^6 [Co(NH_3)_6Cl_3]/M$	$10^6 S_{[Co(NH_3)_6Cl_3]}/M$
0.5	4.00	5.0	2.30
1.0	3.86	6.0	2.27
5.0	3.41	7.5	2.25
10.0	3.10	10.0	2.22
50.0	2.34	20.0	2.13
100.0	2.04		

Como se mencionó en la parte introductoria de este capítulo, el pireno y sus derivados constituyen poderosas sondas para estudiar la influencia de la polaridad, en especial en medios de características hidrofóbicas. Como es de esperar, la solubilidad del 1-PyCHO también depende del entorno. Por tanto, dicha solubilidad debería estar relacionada con λ_{em} , que depende del medio en que se encuentra la sonda. La figura adjunta confirma esta cuestión.

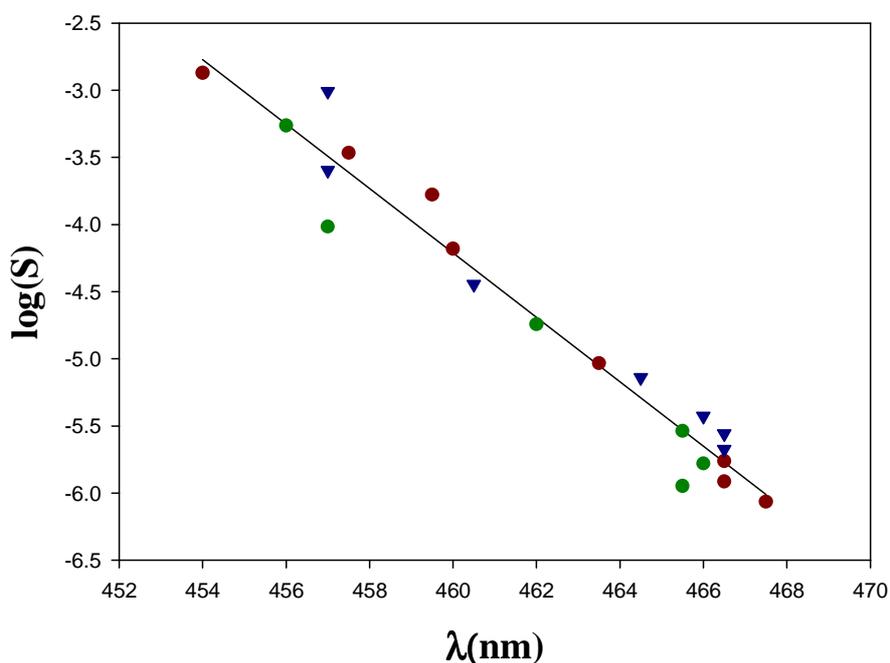


Figura 12. Correlación lineal entre el logaritmo de la solubilidad de los diferentes codisolventes, $\log(S)$, frente a la longitud de onda, λ (nm). (●) etanol, (●) terc-butanol, (▼) 2-propanol.

Esta Figura muestra que todos los puntos experimentales correspondientes a las diferentes mezclas agua/codisolvente caen en la misma línea. El 1-PyCHO, cuando se disuelve en mezclas agua/alcohol, exhibe una fuerte luminiscencia cuya intensidad y máximo en la longitud de onda depende de la polaridad del disolvente.⁷⁶ Reichardt y Dimroth⁷⁷, emplearon otra sonda fluorescente sensitiva a los cambios en la polaridad del

disolvente, la piridinio N-fenolbetaina, que presenta una diferencia considerable entre el momento dipolar de los estados excitados y fundamental, representados por la variación del parámetro $E_T(30)$.^{77-b,78} La Figura 13 A muestra un ejemplo de la correlación encontrada entre los valores de la solubilidad del 1-PyCHO en mezclas etanol/agua y el parámetro $E_T(30)$. Para los otros alcoholes estudiados, también hemos encontrado correlaciones similares con el parámetro de polaridad $E_T(30)$ y con otros parámetros tales, como la constante dieléctrica del medio (D) (véase Figura 13 B).

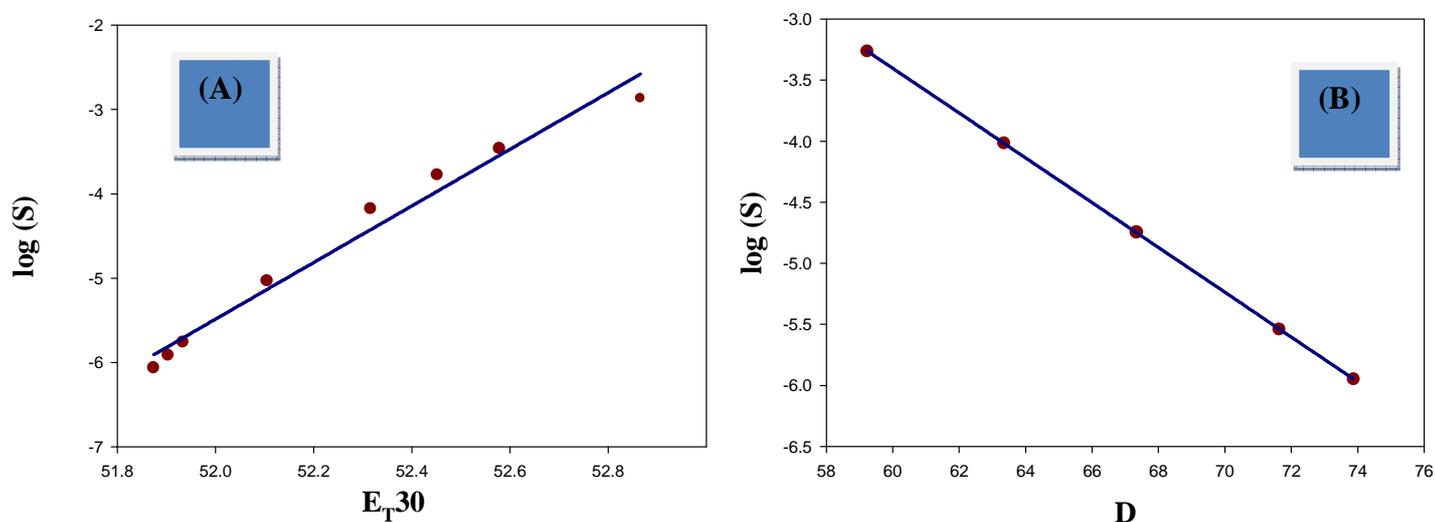


Figura 13. A) $\log(S)$ vs. $E_T(30)$ para mezclas agua/etanol. B) $\log(S)$ vs. D para mezclas terc-butanol-agua.

Volviendo a la discusión anterior, y teniendo en cuenta tanto los valores de la solubilidad del 1-PyCHO en los distintos medios, como los de K_{\max} (obtenidos del tratamiento de los datos experimentales al modelo de sigmoidea, véase ec. 1), los valores de la energía libre de asociación, 1-PyCHO/ADN, se corrigieron del coeficiente de actividad del 1-PyCHO. La Tabla 2, recoge los valores de K_{\max} y $\Delta G_{\max}^{\text{corr}}$, a diferentes concentraciones de alcohol (etanol, 2-propanol y terc-butanol).

Tabla 2: Valores de las constantes de asociación para la interacción ADN/1-PyCHO, K_{\max} ; y de la energía libre corregida, $\Delta G_{\max}^{\text{corr}}$, en presencia de diferentes concentraciones de alcohol.

X_m (etanol)	$10^{-3} K_{\max}/M$	$\Delta G_{\max}^{\text{corr}}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
0.0202	730	-35.57
0.0264	315	-34.37
0.0329	177	-33.63
0.0693	13	-31.52
0.1150	2	-31.74
0.1430	1	-32.33
0.2310	1	-37.50
X_m (2-propanol)	$10^{-3} K_{\max}/M$	$\Delta G_{\max}^{\text{corr}}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
0.0220	157	-33.95
0.0254	110	-33.81
0.0291	77	-33.71
0.0382	37	-33.70
0.0566	13	-34.59
0.0800	5	-37.55
0.0939	4	-40.08
X_m (terc-butanol)	$10^{-3} K_{\max}/M$	$\Delta G_{\max}^{\text{corr}}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
0.0078	134	-32.77
0.0126	90	-32.45
0.0207	49	-32.45
0.0362	18	-33.89
0.0506	8	-36.26
0.0655	5	-38.96

Como puede verse en la Tabla 2, los valores de $\Delta G_{\max}^{\text{corr}}$, muestran un comportamiento similar para los tres alcoholes, etanol, 2-propanol y terc-butanol. Estos valores de energía libre corregida se han calculado tomando como referencia la solubilidad del 1-PyCHO en agua. La Figura 14, muestra como los valores de $\Delta G_{\max}^{\text{corr}}$ de todos los alcoholes pasan a través de un máximo cuando la fracción molar de alcohol aumenta. El valor de la fracción molar a la que se encuentra el máximo, se desplaza hacia valores más pequeños cuando el número de átomos de carbono del alcohol aumenta: $X_{\text{terc-butanol}} < X_{\text{2-propanol}} < X_{\text{etanol}}$.

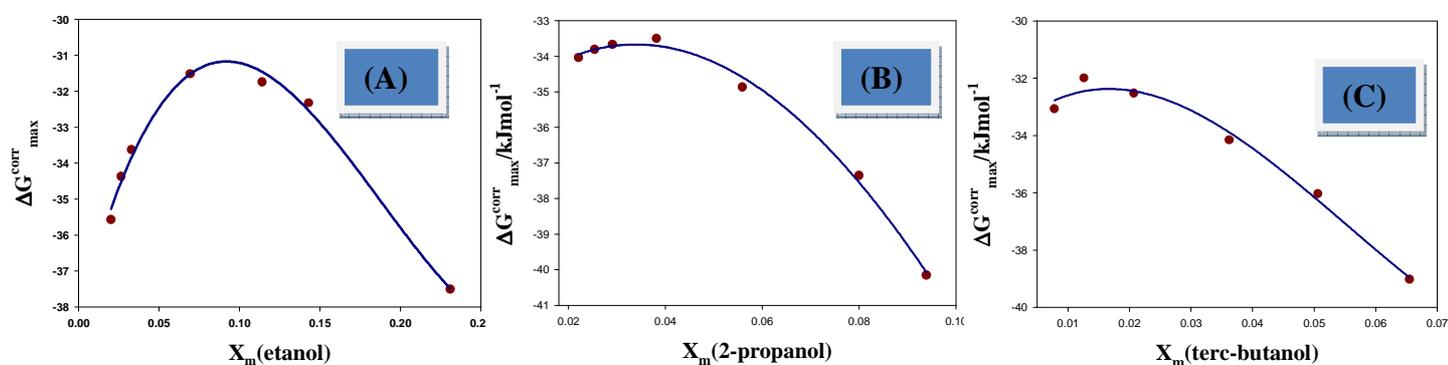


Figura 14. Energía libre corregida de la interacción 1-PyCHO/ADN, $\Delta G_{\max}^{\text{corr}}$, frente a la fracción molar de alcohol X_m . A) agua/etanol B) agua/2-propanol C) agua/terc-butanol.

Las mezclas acuosas binarias pueden clasificarse dentro de tres grupos fundamentales, de acuerdo con los diferentes valores que presentan sus funciones termodinámicas molares de exceso. Se conoce que las mezclas alcohol-agua pertenecen al grupo denominando típicamente como disolventes acuosos, donde ΔG^{exc} (la energía libre de las mezclas) es positiva y está dominada por su componente entrópica, $|\Delta S^{\text{exc}}| > |\Delta H^{\text{exc}}|$. Esta clase de mezclas está caracterizada por el hecho de que algunas propiedades pasan a través de valores extremos (máximos y mínimos) cuando son representadas frente a la fracción molar de alcohol. Este tipo de solutos se denominan estructurantes (aumentan el orden de las molécula de agua que rodean al soluto). De modo que, la existencia de los máximos en $\Delta G_{\max}^{\text{corr}}$ puede considerarse una consecuencia de los cambios de hidratación del ADN causados por las modificaciones que el alcohol promueve en la

estructura del agua.⁷⁸ Esta idea se sustenta en que las fracciones molares mágicas del alcohol a las cuales las propiedades de las mezclas acuosas pasan a través de un máximo o un mínimo, son cercanas a la secuencia de fracciones molares, X_m , para las que $\Delta G_{\max}^{\text{corr}}$ pasa a través de un máximo, en el presente estudio. De acuerdo con ello, puede considerarse que, esencialmente, la influencia del alcohol sobre el ADN, que modifica la capacidad de la macromolécula para unirse al pireno, es una interacción indirecta, debido no tanto a la interacción de las moléculas de alcohol con el ADN, sino más bien a las modificaciones que los alcoholes producen en la estructura del agua.

1.3.2.2. Urea

Como estudio complementario a la influencia de los alcoholes en la termodinámica de asociación del 1-pirenocarboxialdehído al ADN, se llevó a cabo un estudio en presencia de diferentes concentraciones de urea, manteniendo constante la concentración de alcohol (5% de etanol) para facilitar la solubilidad de la sonda. Los datos de intensidad de fluorescencia al variar la concentración de ADN, se ajustaron al modelo de sigmoidea. Los valores de las constantes termodinámicas de asociación del 1-PyCHO con el ADN, en presencia de urea y etanol al 5%, aparecen en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de las constantes de asociación, K_{\max} , y de la energía libre corregida, $\Delta G_{\max}^{\text{corr}}$, para la interacción 1-PyCHO/ADN, en mezclas agua/urea

[Urea]	$10^{-3} K_{\max}/M$	$\Delta G_{\max}^{\text{corr}} / \text{kJmol}^{-1}$
0.000	730	-33.45
0.001	182	-30.01
0.010	144	-29.43
0.100	140	-29.36
0.350	130	-29.17
0.500	91	-28.29
1.000	55	-27.04

La variación en las constantes de equilibrio de asociación del 1-PyCHO con el ADN en presencia de distintas concentraciones de urea no puede explicarse de la misma forma que lo que ocurre en el caso de las mezclas agua/codisolvente. La urea es un soluto desestructurante. Estos solutos de carácter hidrofílico están caracterizados por presentar $|\Delta H^{exc}| > |T\Delta S^{exc}|$, al contrario que sucedía con los alcoholes. Este cosoluto es de interés, debido a que posee un elevado potencial como donador y aceptor de puentes de hidrógeno, desestabilizando la doble hélice de ADN.⁷⁹ Debido a la fuerte capacidad de la urea para formar enlaces de hidrógeno, puede competir con el agua por los sitios de enlace de hidrógeno en el ADN, deshidratando la doble hebra. A diferencia de los alcoholes y sales, la solubilidad del 1-PyCHO a diferentes concentraciones de urea no varía, apreciablemente, en el rango de estudio, por lo que la energía libre del 1-PyCHO al ADN en este caso, coincide con la energía libre corregida. Estas energías libres presentan un comportamiento similar al que presentaban las mezclas agua/alcohol a fracciones molares antes del máximo. Esto es, la energía libre corregida, ΔG^{corr}_{max} , se hace menos negativa a medida que aumenta la concentración de urea y la interacción 1-PyCHO/ADN está cada vez menos favorecida. La interacción de la urea con la doble hélice, produce, por un lado, el desplazamiento de moléculas de agua de la superficie del ADN, debido a la formación de enlaces de hidrógeno entre la urea y la macromolécula⁸⁰; y por otro, esta deshidratación progresiva del ADN produce la desnaturalización y apertura progresiva de la doble hélice, impidiendo, por tanto, la intercalación de la sonda.⁸¹

1.3.2.3. Sales.

Se ha llevado a cabo un estudio sistemático de la influencia de sales de diferente carga (NaClO_4 , $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ y $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$) en la termodinámica de asociación del 1-PyCHO con el ADN. Este estudio se ha llevado a cabo a diferentes concentraciones de sal, manteniendo constante la de alcohol (8% de etanol) para facilitar la solubilidad de la sonda. Los datos de intensidad de fluorescencia al variar la concentración de ADN, fueron ajustados al modelo de Hildebrand-Benesi. A diferencia de los alcoholes, no se observaron desviaciones de linealidad en las representaciones de Hildebrand-Benesi, incluso a concentraciones bajas de ADN, por lo que no fue necesario el ajuste de los

datos experimentales al modelo de sigmoidea. Un ejemplo de la calidad de estos ajustes aparece en la Figura 15:

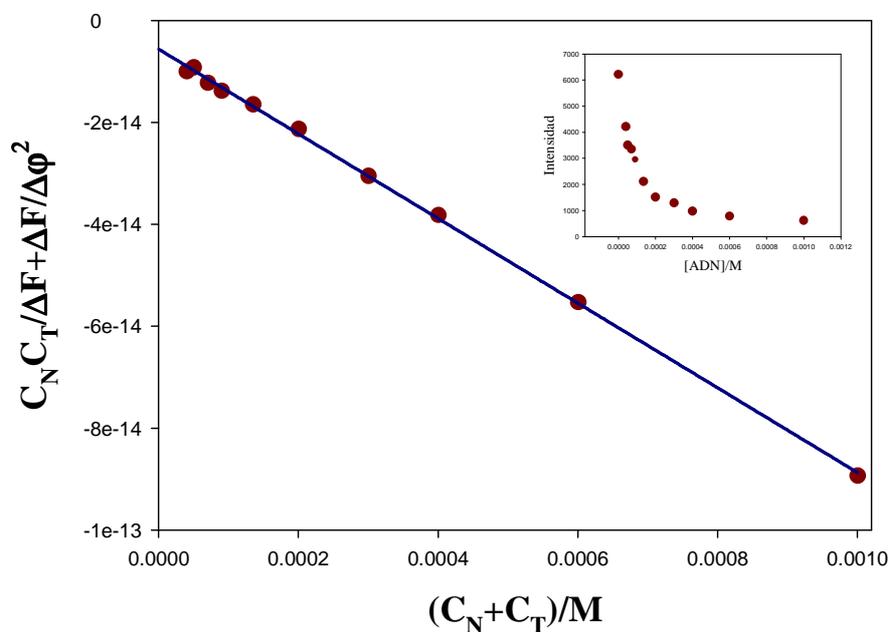


Figura 15. Análisis de la valoración espectrofluorimétrica entre ADN y 1-PyCHO según el método de Hildebrand-Benesi: $C_T = 5.10^{-7}$ (M), $[NaClO_4] = 0.01$ (M); $T = 298.2$ K; $\lambda_{exc} = 356$ nm; $\lambda_{em} = 468$ nm; 8% de etanol. El recuadro muestra la intensidad experimental en función de la concentración de ADN.

Los valores de las diferentes constantes de equilibrio para la asociación 1-PyCHO/ADN, así como los de ΔG^{corr} , en presencia de diferentes concentraciones de sal, aparecen en la Tabla 4.

Tabla 4: Valores de las constantes de equilibrio, K y de la energía libre corregida, ΔG^{corr} , para la asociación del 1-pirenocarboxialdehído con ADN en presencia de sales.

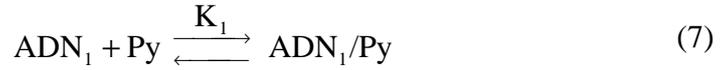
$10^3 [\text{NaClO}_4]/\text{M}$	10^{-3} K/M	$\Delta G^{\text{corr}} / \text{kJmol}^{-1}$
1.0	30.4	-26.75
10.0	14.8	-25.99
28.0	12.7	-25.18
125.0	7.2	-23.18
250.0	3.9	-21.76
500.0	2.5	-21.45
1000.0	1.0	-21.72
$10^4 [\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2] / \text{M}$	10^{-3} K/M	$\Delta G^{\text{corr}} / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
0.5	14.3	-25.59
1.0	14.1	-25.46
5.0	7.4	-23.55
10.0	5.0	-22.35
50.0	2.8	-20.23
100.0	2.3	-19.39
$10^6 [\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3]/\text{M}$	10^{-3} K/M	$\Delta G^{\text{corr}} / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
5.0	19.8	-25.03
6.0	17.0	-24.61
7.5	11.8	-23.69
10.0	9.7	-23.17
20.0	7.0	-22.26

Las variaciones de ΔG^{corr} que aparecen en la Tabla 4 son cualitativamente, diferentes a las encontradas en el caso de los alcoholes, en el sentido de que no existen máximos ni mínimos, sino una variación monótona en la energía libre de asociación. Estas variaciones de ΔG^{corr} pueden explicarse de acuerdo con un modelo de dos estados para la unión del ADN con el 1-PyCHO, en presencia de un segundo ligando que se une al ADN, el catión de la sal. Suponiendo que los cationes de las sales interactúan directamente con el ADN, causando un cambio estructural en la biomolécula, existirán dos clases de ADN en disolución, ADN libre (ADN_1), y ADN enlazado (ADN_2) al catión de la sal (S). Estos dos tipos de ADN presentarán diferentes afinidades para enlazarse a la sonda. Hanlon y colaboradores⁸² estudiaron los cambios en la banda positiva de CD del CT-ADN inducidos por diferentes sales, encontrando que el ángulo de giro (“winding angle”) del ADN disminuía de forma lineal al aumentar la concentración salina. Estos cambios pueden interpretarse de acuerdo con un cambio conformacional progresivo del ADN desde su estado B a un estado más próximo a la conformación C del ADN, a medida que la concentración de sal aumenta.⁸² En el sistema formado por el ADN, el 1-PyCHO y la sal están implicados al menos 3 equilibrios. El primero corresponde a la asociación del ADN libre con la sal: a medida que concentraciones crecientes de sal son añadidas a la disolución que contiene a la biomolécula y la sonda, el ADN cambia desde un estado 1 (ADN_1 , no unido a la sal), a un estado 2 (ADN_2 , unido a la sal). Este cambio conformacional del ADN está representado según el siguiente equilibrio (ecs. 5 y 6):



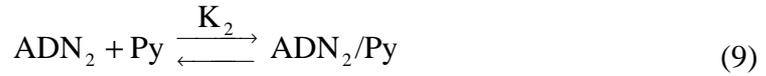
$$K_{\text{ADN}}^{\text{S}} = \frac{[\text{ADN}_2]}{[\text{ADN}_1][\text{S}]} \quad (6)$$

Los otros equilibrios implicados en el sistema corresponderían a la asociación de la sonda 1-PyCHO, al ADN en las dos conformaciones presentes en el sistema. La asociación del 1-PyCHO a la biomolécula en el estado 1 (libre de sal) viene dada por las siguientes ecuaciones:



$$K_1 = \frac{[\text{ADN}_1/\text{Py}]}{[\text{ADN}_1][\text{Py}]} \quad (8)$$

Y el equilibrio correspondiente a la asociación de la sonda al ADN, en el estado 2 (unido a la sal) vendría dado por:



$$K_2 = \frac{[\text{ADN}_2/\text{Py}]}{[\text{ADN}_2][\text{Py}]} \quad (10)$$

En general, para cualquier propiedad de interés del sistema, P, el valor medido de esta propiedad ($\langle P \rangle$), es la suma de las contribuciones de cada estado⁷⁹:

$$\langle P \rangle = \sum X_i P_i \quad (11)$$

$$\langle P \rangle = P_1 X_1 + P_2 X_2 + P_3 X_3 \quad (12)$$

donde $\langle P \rangle$ es el valor promedio de la propiedad P y X_i es la contribución a P del estado i. Teniendo en cuenta los equilibrios descritos previamente en las ecuaciones 5-10, y en condiciones en las que la concentración de sustrato libre es muy pequeña, se llega a la siguiente expresión que relaciona la variación de cualquier propiedad P del sistema con la concentración de sal:

$$\langle P \rangle = \frac{P_1 + P_2 \frac{K_2}{K_1} K_{\text{ADN}}^S [\text{S}]}{1 + \frac{K_2}{K_1} K_{\text{ADN}}^S [\text{S}]} \quad (13)$$

Una derivación más completa de esta ecuación se recoge en el apéndice III. Considerando las energías libres corregidas de formación del complejo 1-PyCHO/ADN, $\Delta G_{\text{max}}^{\text{corr}}$, a diferentes concentraciones de sal, como propiedad, P, de interés se obtiene:

$$\Delta G^{\text{corr}} = \frac{\Delta G_1^{\text{corr}} + \Delta G_2^{\text{corr}} \frac{K_2}{K_1} K_{\text{ADN}}^{\text{S}} [\text{S}]}{1 + \frac{K_2}{K_1} K_{\text{ADN}}^{\text{S}} [\text{S}]} \quad (14)$$

En esta ecuación, ΔG_1^{corr} es la energía libre corregida de asociación del 1-PyCHO al ADN en el estado 1 (libre de sal), y ΔG_2^{corr} corresponde a la energía libre corregida para la unión del 1-PyCHO al ADN en el estado 2, en el cual el ADN está unido a los cationes de la sal S. Finalmente, $K_{\text{ADN}}^{\text{S}}$ es la constante de equilibrio correspondiente a la asociación de los cationes de la sal al ADN. Por tanto, la aplicación de este modelo a la variación de energía libre corregida 1-PyCHO/ADN con la concentración salina, permite determinar las constantes de afinidad de las diferentes sales al ADN ($K_{\text{ADN}}^{\text{S}}$). Nótese que esta ecuación puede simplificarse a la ecuación dada para el modelo de dos estados, en el caso particular de que la afinidad del 1-PyCHO por el ADN en el estado 1, representada por la constante de equilibrio K_1 , fuese aproximadamente igual a la de la sonda por el ADN en estado 2, K_2 ($K_2/K_1 \sim 1$). Las figuras 16, 17 y 18, proporcionan el ajuste de los datos de ΔG^{corr} frente a la concentración de sal, para el NaClO_4 , $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ y $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, respectivamente, ajustados a la ecuación 14:

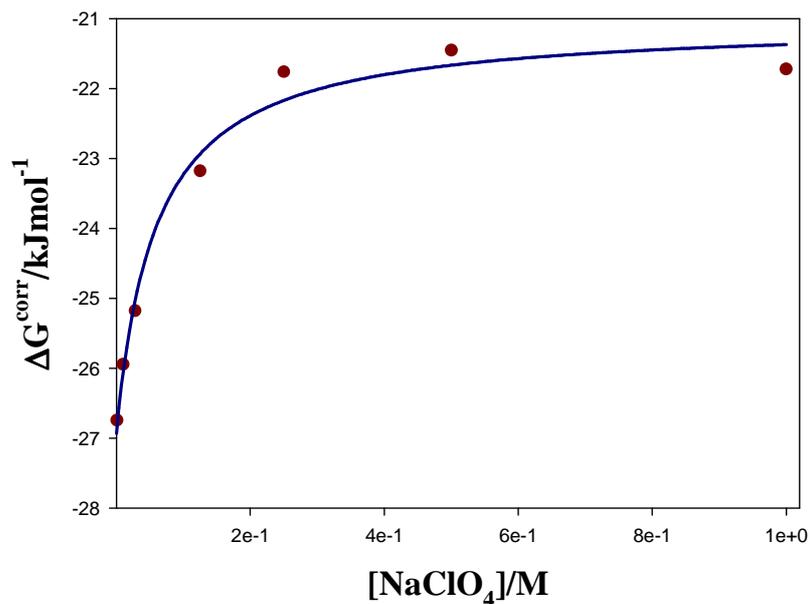


Figura 16. Energía libre corregida, $\Delta G^{\text{corr}}/\text{kJmol}^{-1}$, correspondiente a la interacción 1-PyCHO/ADN vs. $[\text{Na}^+]/\text{M}$. Los símbolos son los datos experimentales, y la línea es el mejor ajuste a la ecuación 14.

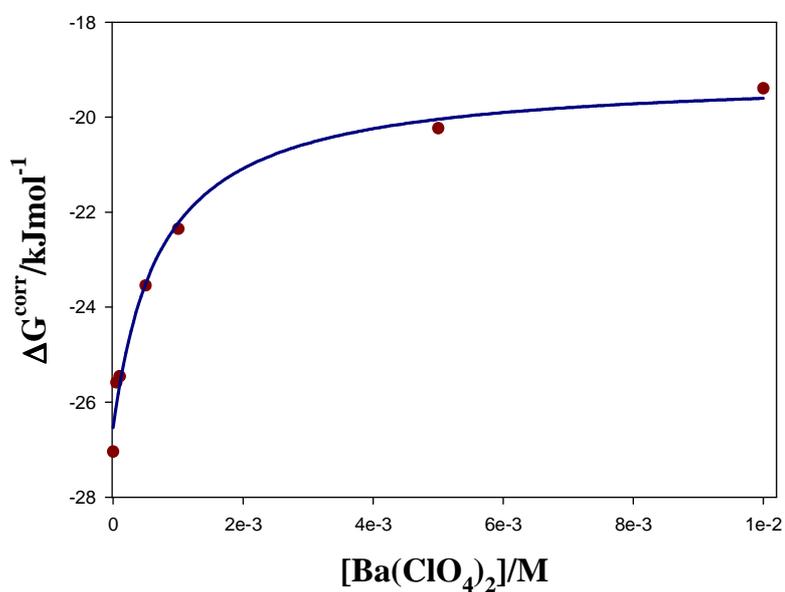


Figura 17. Energía libre corregida, $\Delta G^{\text{corr}}_{\text{max}}/\text{kJmol}^{-1}$, correspondiente a la interacción del 1-PyCHO/ADN vs. $[\text{Ba}^{2+}]/\text{M}$. Los símbolos son los datos experimentales, y la línea es el mejor ajuste a la ecuación 14.

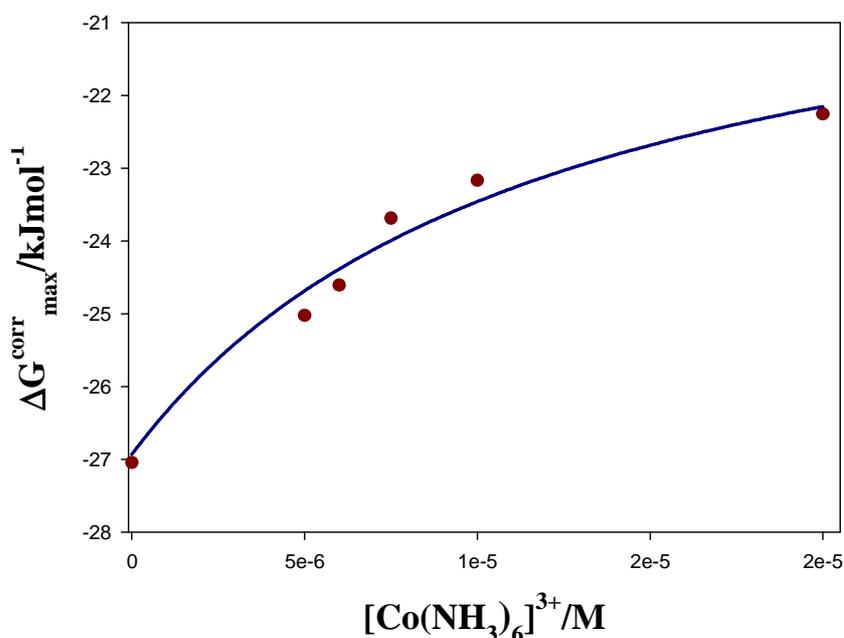


Figura 18. Energía libre corregida, $\Delta G_{\max}^{\text{corr}}/\text{kJmol}^{-1}$, correspondiente a la interacción del 1-PyCHO/ADN vs. $[\text{Co}^{3+}]/\text{M}$. Los símbolos son los datos experimentales, y la línea es el mejor ajuste a la ecuación 14.

De esta forma ha sido posible cuantificar de forma indirecta la interacción de las sales con el ADN. Los resultados muestran que la energía libre de los cationes al ADN se hace más negativa (la interacción ADN/catión es más favorable), como es de esperar, cuando la carga del catión aumenta (véase tabla 5). Considerando la carga de los cationes correspondientes a las diferentes sales, un ajuste del $\ln(K_{\text{ADN}}^{\text{S}})$ frente a la valencia del catión resultó ser lineal (véase Figura 19). Esto es, conforme a las ecuaciones:

$$\ln(K_{\text{ADN}}^{\text{S}}) = \ln(K_{\text{ADN}}^{\text{S}})_{\text{ne}} + \ln(K_{\text{ADN}}^{\text{S}})_{\text{elec}} \quad (15)$$

con

$$\ln(K_{\text{ADN}}^{\text{S}})_{\text{elec}} = \frac{Z_{\text{s}}F\Psi}{RT} \quad (16)$$

donde $-RT\ln(K_{\text{ADN}}^{\text{S}})_{\text{ne}}$ es la componente no electrostática de la energía libre de unión del catión al ADN; $-RT\ln(K_{\text{ADN}}^{\text{S}})_{\text{elec}}$ es su componente electrostática; y Ψ es el potencial eléctrico promedio que el catión siente cuando está enlazado al ADN.

Tabla 5. Valores de energía libre de asociación de los cationes al ADN.

Cationes	$\Delta G/\text{kJmol}^{-1}$
Na^+	-5.5
Ba^{2+}	-17.3
Co^{3+}	-26.9

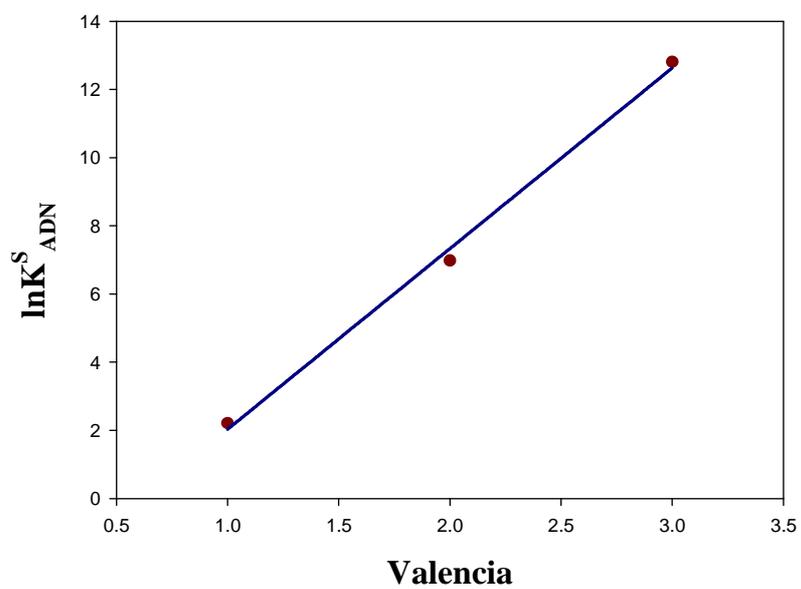


Figura 19. Representación del $\ln(K^S_{\text{ADN}})$ frente a la valencia de los cationes de las diferentes sales.

Como conclusión a este estudio sobre la termodinámica de interacción de la sonda 1-PyCHO con ADN, en presencia de diferentes sales y codisolventes, puede indicarse que se han encontrado evidencias de que la interacción de los alcoholes con el ADN es de tipo indirecta, y está basada en los cambios causados por los mismos sobre la estructura del agua, modificaciones que provocan una alteración en el grado de hidratación del ADN. Por otro lado, la influencia donadora y aceptora de puentes de hidrógeno de la urea sobre la estructura del ADN provoca la apertura de la doble hélice a medida que la concentración de urea aumenta, disminuyendo de esta forma la intercalación de la sonda sobre el ADN. Respecto a la interacción de las sales con el ADN, se ha encontrado que estas interaccionan de manera directa con la biomolécula, de forma que sus constantes de interacción han sido cuantificadas. La energía libre de asociación de los cationes disminuye linealmente, al hacerlo la carga del catión.

1.3.3. Efectos del medio en la cinética de interacción del 1-Pirenocarboxialdehído con ADN: determinación del mecanismo de reacción.

El estudio de los efectos del disolvente en la interacción ADN-ligando es un área de interés que ha sido explorada principalmente por metodologías estructurales, de transporte y desde el punto de vista termodinámico. Por el contrario, los estudios de la influencia del disolvente en la cinética de interacciones ADN-ligando, en particular, en lo que respecta a las mezclas agua-alcohol, son relativamente escasos.⁸³ Por todo ello, como contribución a este campo y como estudio complementario al termodinámico previo, en este capítulo de la tesis se presenta un estudio cinético de la influencia de las mezclas agua-alcohol de características hidrofóbicas diferentes (etanol, 2-propanol y terc-butanol) en la velocidad de asociación del intercalador, 1-PyCHO, al ADN.

El estudio cinético del sistema 1-PyCHO/ADN se ha realizado mediante la técnica de flujo detenido (stopped flow) con sistema de detección por fluorescencia. Se ha trabajado en condiciones óptimas para la detección fluorimétrica, a concentraciones de 1-PyCHO de 5×10^{-7} M (es decir con disoluciones de la sonda que tienen un absorción menor de 0.1), procurando además que el cociente C_N/C_T , fuese lo mayor posible para poder trabajar en condiciones de asociación aislada de la sonda y hacer más simple el tratamiento de los datos.

Todos los experimentos sobre la cinética de la interacción del 1-PyCHO y el ADN muestran una cinética de decaimiento de la fluorescencia biexponencial, caracterizada por la presencia de dos tiempos de relajación, τ_1 y τ_2 , que difieren alrededor de un orden de magnitud. La Figura 20 muestra un ejemplo de estas curvas de decaimiento y su ajuste a una biexponencial.

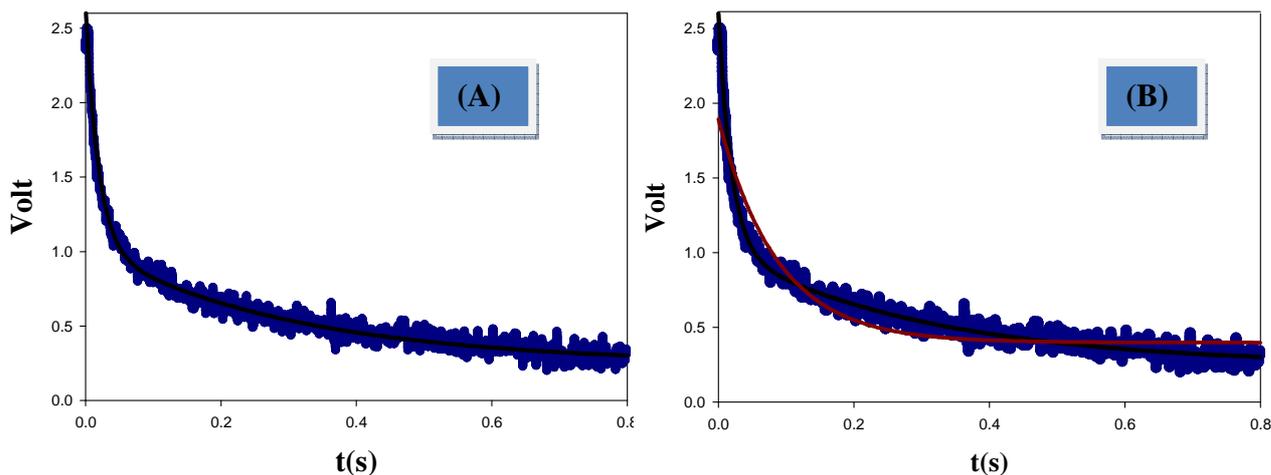
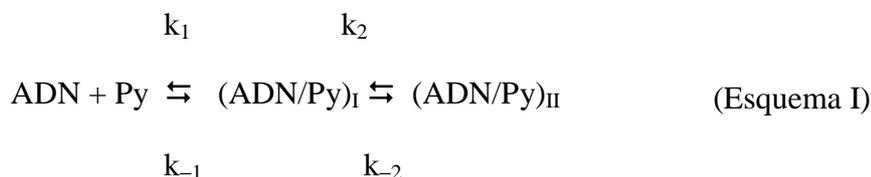


Figura 20. Curvas de relajación obtenidas por la técnica de flujo detenido para el sistema 1-PyCHO/ADN. $[1\text{-PyCHO}] = 5 \times 10^{-7} \text{M}$, $[\text{ADN}] = 2 \times 10^{-4} \text{M}$, $T = 298.2 \text{ K}$, 2-Propanol 16.7% (en peso). (A) La línea negra representa el mejor ajuste a la ecuación biexponencial (B). La línea roja representa el mejor ajuste a la ecuación monoexponencial.

El comportamiento cinético del sistema es compatible con un esquema de reacción en dos pasos sucesivos:



En este esquema, $(\text{ADN/Py})_{\text{I}}$ y $(\text{ADN/Py})_{\text{II}}$ representan dos complejos diferentes ADN/1-PyCHO. La dependencia del inverso del tiempo de relajación corto, $1/\tau_1$, de la concentración de ADN es lineal, de acuerdo con la ecuación 1:⁸⁴

$$\frac{1}{\tau_1} = k_1[\text{ADN}] + k_{-1} \quad (1)$$

Por tanto, k_1 y k_{-1} , pueden obtenerse de la representación de $1/\tau_1$ frente a la concentración de ADN. Un ejemplo de este tipo de representación aparece en la Figura 21.

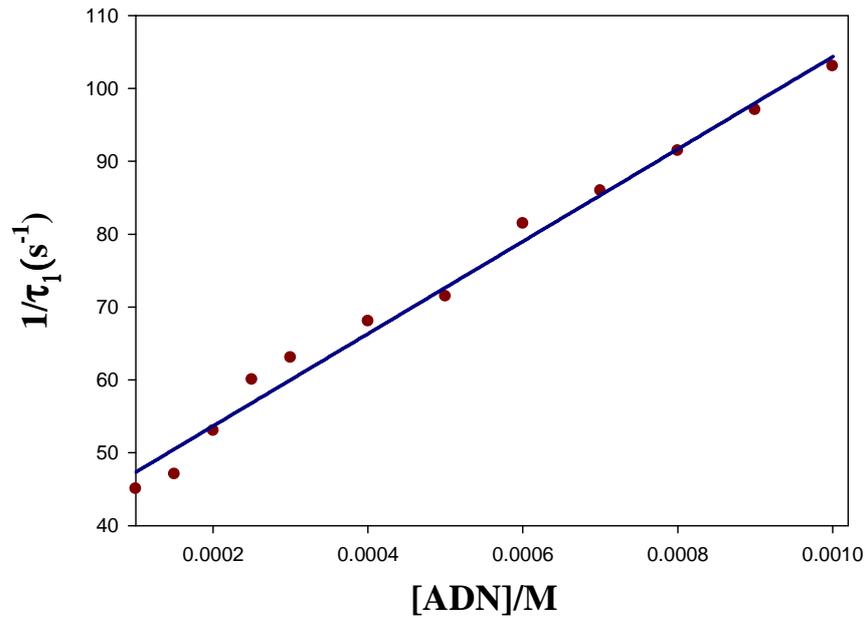


Figura 21. Dependencia del inverso del tiempo de relajación rápido, $1/\tau_1$, de la concentración de ADN a $T = 298.2 \text{ K}$, 2-Propanol 16.7 % (en peso).

Una vez que se obtuvieron k_1 y k_{-1} se obtuvieron a partir de la ecuación 1, el valor de la constante de equilibrio del primer paso, K_1 , fue calculado ($K_1 = k_1/k_{-1}$).

Por otro lado, la dependencia del inverso del tiempo de relajación largo, $1/\tau_2$ de la concentración de ADN, tiende a un plató a concentraciones elevadas de polímero, de acuerdo con la ecuación 2.⁸⁴

$$\frac{1}{\tau_2} = \frac{k_2 K_1 [\text{ADN}]}{1 + K_1 [\text{ADN}]} + k_{-2} \quad (2)$$

El valor de K_1 se introdujo en la ecuación 2 como un parámetro conocido, mientras que los valores de k_2 y k_{-2} fueron evaluados a partir del ajuste de los datos experimentales a la ecuación 2 (Figura 22).

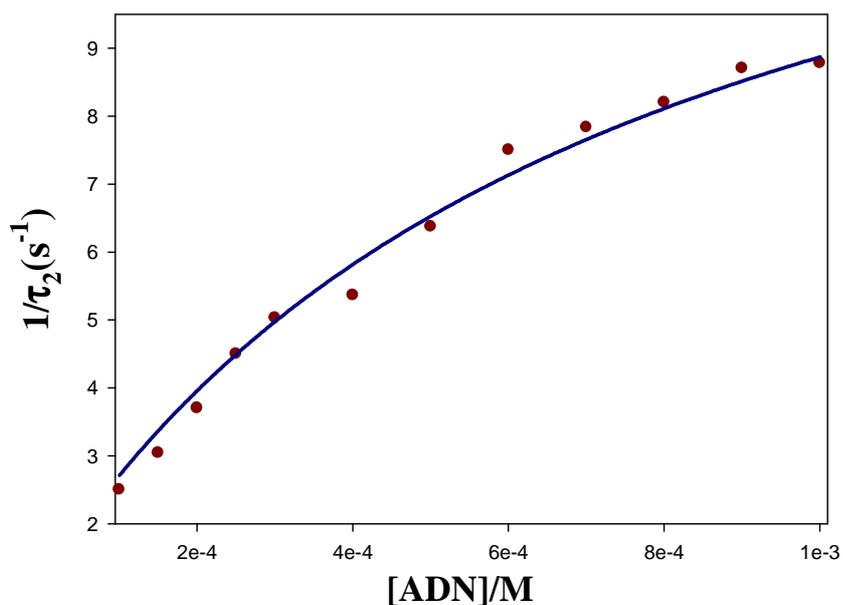


Figura 22. Dependencia del inverso del tiempo de relajación lento, $1/\tau_2$, de la concentración de ADN a $T = 298.2 \text{ K}$, 16.7% de 2-Propanol (en peso).

Los valores de las constantes de velocidad directa e inversa correspondientes al primer (k_1 y k_{-1}) y segundo paso (k_2 y k_{-2}) del esquema I, se recogen en la Tabla 6. En esta Tabla también aparecen los valores de las constantes de equilibrio correspondientes al primer (K_1) y segundo paso (K_2). En el Apéndice IV, se encuentran tabulados los valores de los tiempos de relajación para las distintas concentraciones de polímero.

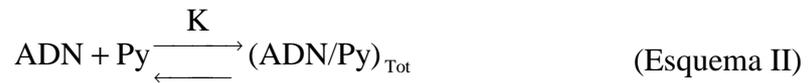
Tabla 6. Parámetros cinéticos y termodinámicos del proceso de interacción del ADN con 1-PyCHO en diferentes mezclas de alcohol/agua (T = 298.2 K; X es la fracción molar del alcohol).

$X_{(\text{etanol})}$	$10^{-4}k_1$ ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{-1} (s^{-1})	k_2 (s^{-1})	k_{-2} (s^{-1})	$10^{-3} K_1$ (M^{-1})	K_2
0.0202	16.6	106	72	1.47	1.56	49
0.0329	10.4	82	49	1.30	1.26	37
0.0507	6.7	57	28	1.10	1.19	25
0.0693	4.9	38	15	0.91	1.29	16
0.0891	3.7	24	8	0.75	1.54	11
0.1150	2.8	13	4	0.55	2.17	5

$X_{(2\text{-propanol})}$	$10^{-4}k_1$ ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{-1} (s^{-1})	k_2 (s^{-1})	k_{-2} (s^{-1})	$10^{-3} K_1$ (M^{-1})	K_2
0.0220	13.4	123	102	2.17	1.09	47
0.0291	10.4	99	66	1.82	1.05	36
0.0382	8.2	75	48	1.60	1.10	30
0.0566	5.8	41	15	1.13	1.44	13
0.0717	4.9	24	5	0.84	1.98	5

$X_{(\text{Ter-butanol})}$	$10^{-4}k_1$ ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{-1} (s^{-1})	k_2 (s^{-1})	k_{-2} (s^{-1})	$10^{-3} K_1$ (M^{-1})	K_2
0.0126	17.2	121	96	3.38	1.40	28
0.0207	11.9	106	77	3.30	1.15	23
0.0271	9.5	94	63	3.26	1.02	19
0.0362	7.5	77	45	3.14	0.95	14
0.0526	5.5	48	13	2.99	1.14	4

En cuanto a la constante de equilibrio global (K) del proceso que se muestra en el Esquema II,



en el que $(ADN/Py)_{\text{Tot}} = (ADN/Py)_{\text{I}} + (ADN/Py)_{\text{II}}$, dicha constante puede obtenerse a partir de la ecuación:

$$K = K_1(1+K_2). \quad (3)$$

Los valores de K derivados de los datos cinéticos mediante la ecuación 3, están de acuerdo con los valores de estas constantes obtenidos a partir de las valoraciones espectrofluorimétricas, descritas en el apartado anterior (véase Tabla 7), lo que apoya el mecanismo de reacción propuesto en el Esquema I.

Tabla 7. Constantes de equilibrio global de formación del complejo 1-PyCHO/ADN en mezclas agua/alcohol. (T =298 K; X es la fracción molar de alcohol).

$X_{(\text{etanol})}$	$10^{-3}K_{(a)} (M^{-1})$	$10^{-3}K_{(b)}(M^{-1})$
0.0202	78 ± 9	74 ± 5
0.0329	48 ± 8	55 ± 4
0.0507	31 ± 7	-----
0.0693	22 ± 4	15 ± 1
0.0891	19 ± 4	-----
0.1150	13 ± 2	9 ± 1

$X_{(2\text{-propanol})}$	$10^{-3}K_{(a)} (M^{-1})$	$10^{-3}K_{(b)} (M^{-1})$
0.0220	52 ± 8	61 ± 5
0.0291	39 ± 4	36 ± 5
0.0382	34 ± 4	25 ± 4
0.0566	20 ± 4	20 ± 3
0.0717	12 ± 3	-----

$X_{(\text{Terc-butanol})}$	$10^{-3}K_{(a)} (M^{-1})$	$10^{-3}K_{(b)} (M^{-1})$
0.0126	41 ± 6	41 ± 3
0.0207	28 ± 6	37 ± 4
0.0271	20 ± 4	-----
0.0362	14 ± 2	9 ± 1
0.0526	6 ± 0.8	8 ± 1

(a) A partir de la combinación de los parámetros cinéticos de la Tabla 6, de acuerdo con la ecuación 3.

(b) A partir de datos termodinámicos obtenidos por valoración espectrofluorimétrica, ajustados al modelo de Hildebrand-Benesi.

Respecto a la variación de k_1 y k_{-1} con la concentración de alcohol, las Figuras 23 y 24 muestran que existe una correlación entre estas constantes y la actividad del agua, (a_w) ,⁸⁵ en las diferentes mezclas agua/alcohol empleadas. Los valores del logaritmo de la constante cinética directa (k_1), cuando se representan frente al $\log(a_w)$, caen en la misma línea recta, independientemente del tipo de alcohol empleado (Figura 23).

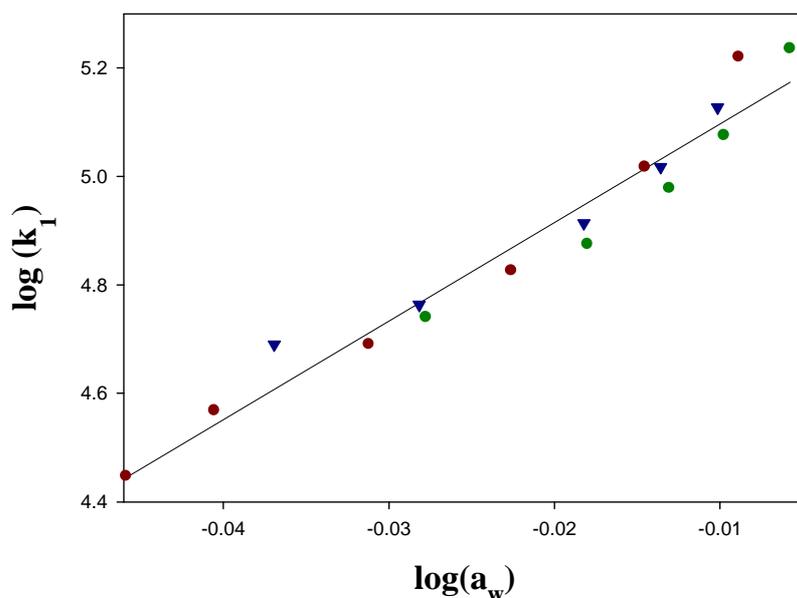


Figura 23. Ajuste de $\log(k_1)$ vs. $\log(a_w)$ para diferentes mezclas agua/alcohol ($T = 298.2$ K), donde k_1 es la constante cinética directa definida en el Esquema I y a_w representa la actividad del agua en la disolución. Etanol (●), 2-propanol (▼) y tert-butanol (●).

Un comportamiento similar se observa para la constante de velocidad indirecta, k_{-1} (Figura 24).

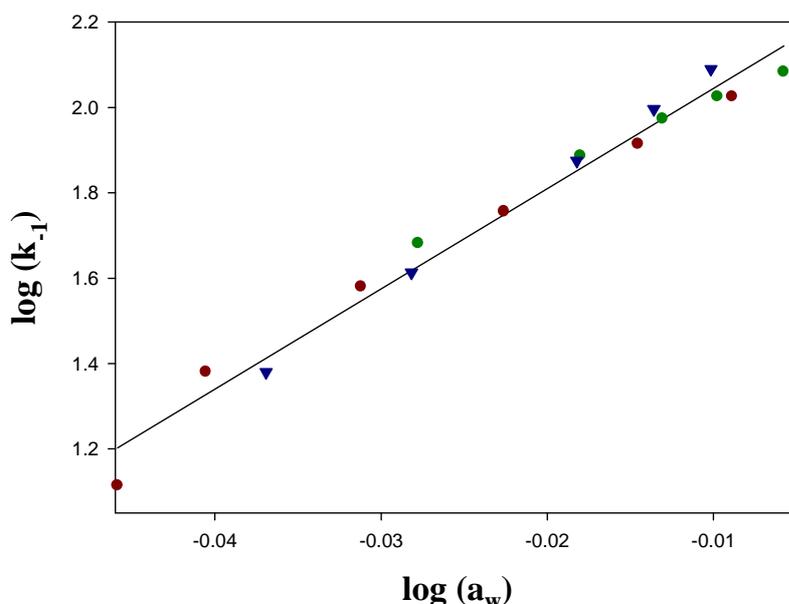


Figura 24. Ajuste de $\log(k_{-1})$ vs. $\log(a_w)$ para diferentes mezclas agua/alcohol ($T = 298.2$ K), donde k_1 es la constante cinética directa definida en el Esquema I y a_w representa la actividad del agua en la disolución. Etanol (●), 2-propanol (▼), y terc-butanol (●).

Estos hechos sugieren que la actividad del agua (o algún parámetro directamente relacionado con ella) juega un papel fundamental en el primer paso del esquema cinético y apoyan el hecho de que la hidratación de las especies implicadas en esta etapa del mecanismo es un factor de relevada importancia.

Los cambios en k_1 y k_{-1} pueden explicarse tomando como punto de partida la ecuación de Brönsted:⁸⁶

$$k_1 = k_1^0 \frac{\gamma_{ADN} \gamma_{Py}}{\gamma_{\ddagger}} \quad (4)$$

$$k_{-1} = k_{-1}^0 \frac{\gamma_{(ADN/Py)_I}}{\gamma_{\ddagger}} \quad (5)$$

donde k_i^0 es la constante de velocidad en el estado de referencia, y γ_{DNA} , γ_{Py} , $\gamma_{(ADN/Py)}$, y γ_{\ddagger} , son, respectivamente, los coeficientes de actividad del ADN, el 1-PyCHO, el $(ADN/Py)_I$ y el estado de transición. De acuerdo con las ecuaciones 4 y 5, los cambios en los coeficientes de actividad de los reactivos y del estado de transición, se reflejan en cambios en k_1 y k_{-1} .

Como se recordará, los valores de γ_{Py} , fueron estimados a partir de las medidas de solubilidad de la sonda en los diferentes medios alcohólicos (Véase ec 3, página 55). A partir de los valores de γ_{Py} , puede corregirse k_1 :

$$(k_1)_{corr} = \frac{k_1}{\gamma_{Py}} = k_1^0 \frac{\gamma_{ADN}}{\gamma_{\neq}} \quad (6)$$

El coeficiente de actividad de la sonda disminuye alrededor de dos órdenes de magnitud cuando la concentración de alcohol aumenta. Por otra parte, la Tabla VI muestra que k_1 decrece cuando la concentración de alcohol aumenta 5 veces. Esta disminución se debe, al menos en parte, a la estabilización que sufre el 1-PyCHO en presencia de concentraciones cada vez mayores de alcohol en el medio. De hecho, cuando los valores de k_1 se corrigen de este efecto, mediante el uso de la ecuación 6, los valores de $(k_1)_{corr}$ aumentan, al hacerlo también la fracción molar de alcohol (Figura 25).

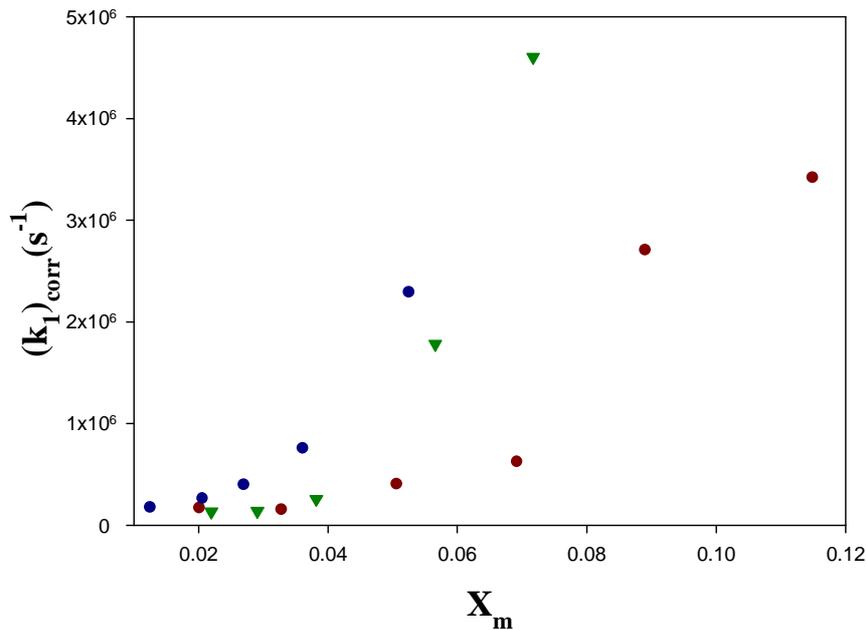


Figura 25. Representación gráfica de la constante cinética directa corregida, $(k_1)_{corr}$, en función de la fracción molar de alcohol, X_m , para diferentes mezclas agua/alcohol (298.2 K). Etanol (●), 2-propanol (▼) y terc-butanol (●).

Respecto a k_{-1} , puede verse en la Tabla VI que esta constante disminuye cuando la fracción molar de alcohol aumenta. Esto es, la disociación de la sonda del ADN está impedida por la presencia de cantidades crecientes de alcohol.

Respecto a las variaciones de k_2 y k_{-2} , con la concentración de alcohol, puede suponerse de forma razonable, que la transformación del complejo (ADN/Py)_I, formado en el primer paso, en el complejo intercalado (ADN/Py)_{II} (y su proceso inverso), están acompañados de perturbaciones estructurales en la molécula de ADN. Como se indicó en el apartado 1.3.1.3, esta perturbación es necesaria para la intercalación de la sonda en la doble hélice,^{43a} ya que para permitir la intercalación de la sonda entre las bases del ADN, éstas deben separarse verticalmente, y el esqueleto del azúcar, en la cara 5' a la intercalación debe cambiar desde la configuración C2'-endo hasta la C3'-endo.⁶² Las alteraciones estructurales del ADN causadas por su interacción con la sonda, pueden verse reflejadas en los cambios en el espectro de CD intrínseco.⁸⁷ Estas perturbaciones en la estructura secundaria del ADN debido a la intercalación de la sonda, fueron identificadas en un capítulo anterior, de forma apropiada, por la técnica de dicróismo circular (véase p. 48, apartado 1.3.1.4).

McGregor y Clegg^{83a} realizaron un estudio de la influencia de la asociación del bromuro de etidio con polyd(G-C). Encontraron que las constantes de velocidad cinéticas del proceso de asociación disminuían, al crecer la viscosidad del disolvente. El tratamiento de Kramer⁸⁸ para las velocidades de reacción proporciona una explicación para la comprensión de estos procesos. La teoría de Kramer sostiene que la constante de velocidad k_j (en el presente sistema k_2 y k_{-2}) es proporcional a $\gamma^{-1} \exp(-\Delta G_j^\ddagger / RT)$, donde ΔG_j^\ddagger es la barrera de energía libre de activación y γ es un parámetro de fricción. Extensiones de la teoría de Kramer se han usado para describir reacciones de plegamiento/desplegamiento de proteínas⁸⁹ y en general para obtener información sobre la dinámica de los cambios conformacionales en macromoléculas.⁹⁰ Una de tales extensiones^{90c,91} es la inclusión de un parámetro ajustable, ξ , que junto con la viscosidad del disolvente en el seno de la disolución (η_s), proporciona la dependencia de las constantes de velocidad para procesos que implican el cambio conformacional de una proteína en términos de la ecuación 7:

$$k_j = \frac{v}{\eta_s + \xi} \exp(-\Delta G_j^\ddagger / RT) \quad (7)$$

En esta ecuación, ΔG^\ddagger es la variación de la barrera de energía libre de activación que separa las dos conformaciones de la proteína y ν es una constante de proporcionalidad. Aplicando el argumento anterior al intercambio de conformaciones $(\text{DNA}/1\text{-PyCHO})_{\text{I}} \rightleftharpoons (\text{DNA}/1\text{-PyCHO})_{\text{II}}$, podría usarse la ecuación 7 para interpretar la dependencia de k_2 y k_{-2} con el contenido de alcohol en el medio.

Aplicando el modelo de interacción débil de los alcoholes con el ADN, puede suponerse que el cambio de energía libre del cambio conformacional inducido por el proceso de intercalación del 1-PyCHO entre las bases del ADN, depende linealmente de la fracción molar de alcohol, X_m ^{92,93}:

$$\Delta G_j^\ddagger = (\Delta G_j^\ddagger)^0 + aX_m \quad (8)$$

En esta ecuación, $(\Delta G_j^\ddagger)^0$ representa la barrera de energía libre en ausencia de codisolvente, y “a” es un parámetro que se evalúa a partir de la pendiente de la representación del logaritmo de la constante de velocidad en presencia de alcohol frente a la concentración de codisolvente, X_m . Considerando la dependencia de la viscosidad del sistema con la concentración de alcohol, también en forma lineal⁹⁴: $\eta_s = \eta_s^0 + bX_m$, e introduciendo la ecuación 8 en la 7, se obtiene la ecuación 9.

$$k_j = \frac{\nu}{(\eta_s^0 + bX_m) + \xi} \exp - \frac{((\Delta G_j^\ddagger)^0 + aX_m)}{RT} \quad (9)$$

La dependencia de la viscosidad de la composición del disolvente se ha obtenido a partir de datos de la bibliografía⁹⁴, encontrándose que las viscosidades varían linealmente al variar la fracción molar de alcohol en el rango de composición empleado. En ausencia de codisolvente, la ecuación 7 puede escribirse como sigue:

$$k_{j,0} = \frac{\nu}{\eta_s^0 + \xi} \exp - \frac{(\Delta G_j^\ddagger)^0}{RT} \quad (10)$$

En presencia de alcohol, la combinación de las ecuaciones 9 y 10, generan la ecuación 11:

$$k_j = \frac{k_{j,0}(\eta_s^0 + \xi)}{(\eta_s^0 + bX_m) + \xi} \exp - \frac{aX_m}{RT} \quad (11)$$

Esta ecuación relaciona los cambios en los parámetros cinéticos en función de la concentración de alcohol y permite una estimación, en base a la teoría de Kramer, de la influencia de la viscosidad local tanto en k_2 como en k_{-2} . Los ajustes a la ecuación 11, correspondientes a las variaciones de $k_2/k_{2,0}$ y $k_{-2}/k_{-2,0}$ en función de la concentración de alcohol se muestran en las Figuras 26, 27 y 28 para mezclas agua/etanol, agua/2-propanol y agua/terc-butanol, respectivamente.

Los valores de ξ obtenidos fueron 1, 4 y 9 (cP) para el etanol, 2-propanol y terc-butanol, respectivamente. La viscosidad efectiva puede obtenerse a cada concentración de alcohol⁹⁴ a partir de la expresión:

$$\eta^{\text{efectiva}} = \eta_s + \xi \quad (12)$$

De esta forma, se obtiene que los cambios en la viscosidad efectiva siguen el orden: terc-butanol > 2-propanol > etanol, siendo esta variación principalmente debida al coeficiente, ξ , que es distinto para cada alcohol. De manera que, al aumentar el carácter hidrofóbico del alcohol (terc-butanol > 2-propanol > etanol), la viscosidad efectiva es mayor. Este resultado probablemente refleja la importancia del tamaño del alcohol y de su carácter hidrofóbico en la viscosidad, cuyas variaciones están relacionadas con los cambios en las constantes cinéticas del segundo paso del mecanismo, según el modelo de Kramer.

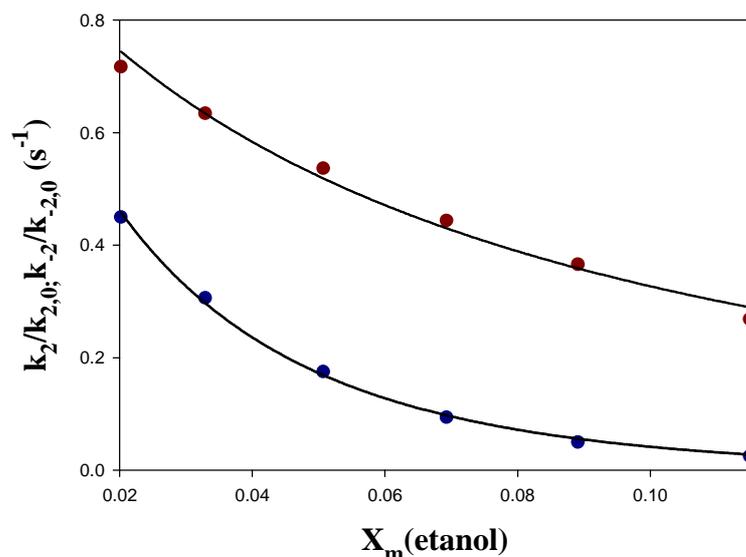


Figura 26. Constantes cinéticas relativas del proceso directo, $k_2/k_{2,0}$ (●) y del proceso inverso, $k_{-2}/k_{-2,0}$ (●) correspondientes al segundo paso del Esquema I (ecuación 11) vs. $X_{m,\text{etanol}}$ ($T = 298.2 \text{ K}$). Las constantes cinéticas directas e inversas fueron representadas relativas a su valor límite en ausencia de codisolvente. ($k_{2,0} = 160 \text{ s}^{-1}$; $k_{-2,0} = 2.05 \text{ s}^{-1}$).

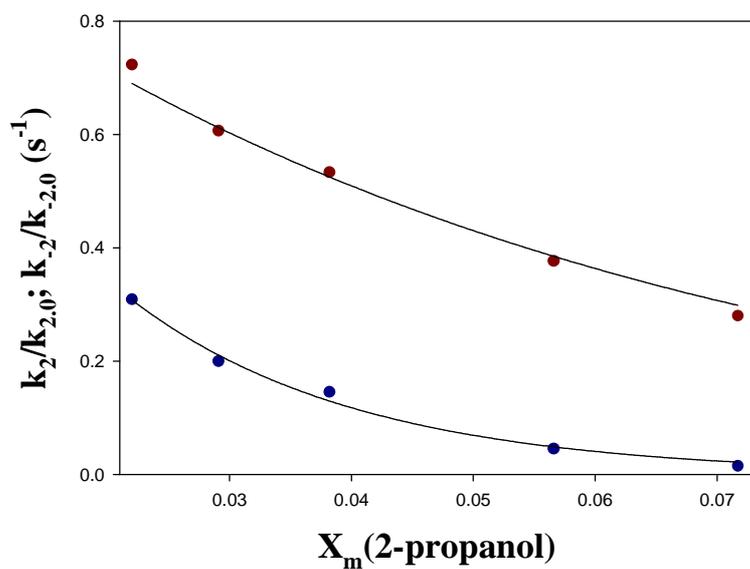


Figura 27. Constantes cinéticas relativas directa $k_2/k_{2,0}$ (●) y del proceso inverso $k_{-2}/k_{-2,0}$ (●) correspondientes al segundo paso del Esquema I (ecuación 11) vs. $X_{m(2\text{-propanol})}$ ($T = 298.2 \text{ K}$). Las constantes cinéticas directas e inversas fueron representadas relativas a su valor límite en ausencia de codisolvente ($k_{2,0} = 330 \text{ s}^{-1}$; $k_{-2,0} = 3 \text{ s}^{-1}$).

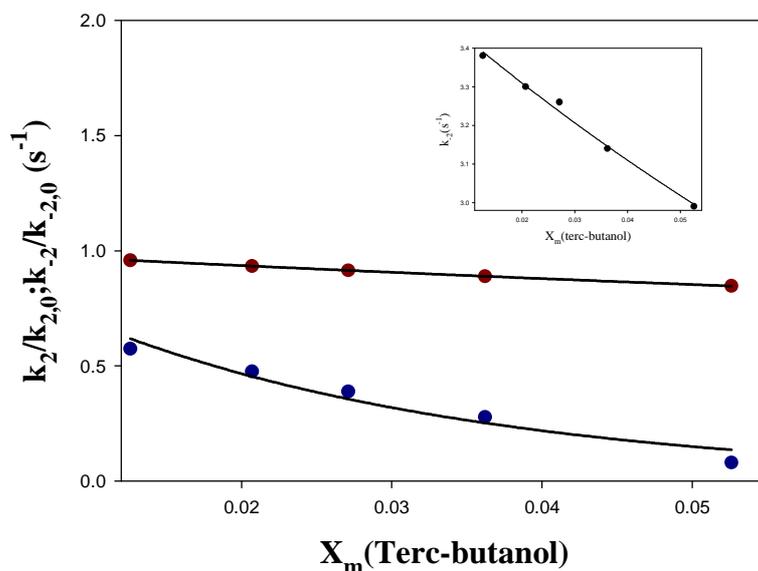


Figura 28. Constantes cinéticas relativas directa $k_2/k_{2,0}$ (•) y del proceso inverso $k_{-2}/k_{-2,0}$ (•) correspondientes al segundo paso del Esquema I (ecuación 11) vs. $X_{m,\text{tercbutanol}}$ ($T = 298.2 \text{ K}$). Las constantes cinéticas directas e inversas fueron representadas relativas a su valor límite en ausencia de codisolvente ($k_{2,0} = 161.9 \text{ s}^{-1}$; $k_{-2,0} = 3.54 \text{ s}^{-1}$). Las constantes k_2 tomadas para el ajuste fueron las obtenidas del ajuste previo de los datos experimentales al modelo de dos estados. El recuadro muestra este ajuste.

Como conclusión a este estudio, cabe destacar que se ha propuesto un mecanismo reversible en dos pasos sucesivos para la asociación del 1-PyCHO al ADN. De acuerdo con nuestros resultados, el efecto del disolvente en la cinética de la reacción está controlado, por la influencia del alcohol en la estructura del agua. El primer paso de la reacción implica la formación de un complejo externo $(ADN/Py)_I$, cuya formación está gobernada por la influencia del alcohol en la solvatación del pireno. Esta idea se apoya en el hecho de que se observa una relación lineal entre el logaritmo de las constantes de velocidad de los procesos directo e inverso del primer paso, y la actividad del agua en las diferentes mezclas. El segundo paso se ha interpretado como la intercalación de la sonda entre las bases del ADN, siendo la variación de las constantes de velocidad, directas e inversas de este paso, dependientes de la viscosidad del disolvente.

1.4. Referencias.

- (1) (a) Jovin, T. M; Striker, G. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* **1977.** 24, 245. (b) McGregor, R. B; Clegg, R. M; Jovin, T. M. *Biochemistry*, **1985**, 24, 5503.
- (2) Cantor, C. R; Schimmel, P. R: *Biophysical Chemistry*, part III. W. H. Freeman and Co., San Francisco 1981.
- (3) McGuee, J. D; Von Hippel, P. H. *J. Molec. Biol.* **1974**, 86, 469.
- (4) Streckowski, L; Wilson, B. *Mutation Research.* **2007.** 623, 3.
- (5) (a) Liu, J; Liu, T; Deng, H; Ji, L; Qu, L; Zhou, H. *Transit. Met. Chem.* **2003.** 28, 116.
(b) Liu, C; Yu, S; Li, D; Liao, Z; Sun, X; Xu, H. *Inorg. Chem.* **2009.** 41, 913.
- (6) (a) Biver, T; Secco, F; Venturini, M. *Coordination Chemistry Reviews.* **2008.** 252, 1163. (b) Biver, T; Lombardi, D; Secco, F; Tiné, M. R; Venturini, M; Bencini, A; Bianchi, A; Giorgi, C. J. *Inorg. Biochem.* **2004.** 98, 1531. (c) Biver, T; Lombardi, D; Secco, F; Tiné, M. R; Venturini, M; Bencini, A; Bianchi, A; Giorgi, C; Valtancoli, B. *Dalton. Trans.* **2006.** 10, 1524.
- (7) Records, M. T; Anderson, C. F; Lohman, T. M. *Q. Rev. Biophys.* **1978.** 11, 103.
- (8) Hammes, G. G; Hubbard, C. D. *J. Phys. Chem.* **1966.** 70, 2889.
- (9) Claude, S; Lehn, J-M; Vigneron, J. P. *Tetrahedrom Lett.* **1989.** 30, 941.
- (10) Biver, T; Secco, F; Tiné, M. R; Venturini, M. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, 418, 63.
- (11) Hsueh Jei Li y Donald M. Crothers. *J. Mol. Biol.* **1969**, 39, 461.
- (12) Wakelin, L. P; Waring, M. J. *J. Mol. Biol.* **1980**, 144, 183.
- (13) Bressloff, J. L; Crothers, D. M. *J. Mol. Biol.* **1975**, 95, 103.
- (14) Piantanida, I; Palm, B. S; Cudic, P; Zinic, M; Schneider H-J. *Tetrahedrom Lett.* **2001.** 42, 6779.
- (15) Fiel, R. J; Howard, J. C; Mark, E. H; Gupta, N. D. *Nucleic Acids Research.* **1979.** 6, 3093.
- (16) Balaz, M; Bitsch-Jensen, K; Mammana, A; Ellestad, G. A; Nakanishi, K; Berova, N. *Pure. Appl. Chem.* **2007.** 79, 801.
- (17) Tjahjono, D. H; Kartasmita, R. E; Nawawi, A; Mima, S; Akutsu, T; Yoshioka, N; Inoue, H. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006.** 11, 527.
- (18) Strickland, J. A; Marzilli, L. G; Wilson, W. D. *Biopolymers.* **1990.** 29, 1307.
- (19) Pasternack, R. F; Gibbs, E; Villafranca, J. J. *Biochemistry.* **1983.** 22, 5409.
- (20) Pasternack, R. F; Gibbs, E; Villafranca, J. J. *Biochemistry.* **1983.** 22, 2406.

- (21) Wilson, W. D; Wang, Y. H; Krishnamoorthy, C. R; Smith, J. C. *Biochemistry*, **1985**, *24*, 3991.
- (22) Thomas, K. E; McMillin, D. R. *J. Phys. Chem. B*. **2001**, *105*, 12628.
- (23) Williams, C. H. G. *Trans. R. Soc. Edinburgh*. **1856**. *21*, 377.
- (24) Lanzafame, J. M; Muentner, A. A; Brumbaugh, D. V. *Chem. Phys*. **1996**, *210*, 79.
- (25) Saito, K; Yokoyama, H. *Thin Solid Films*. **1994**. *243*, 526.
- (26) Kawakami, M; Koya, K; Ukai, T; Tatsuta, N; Ikegawa, A; Ogawa, K; Shishido, T; Chen. L. B. *J. Med. Chem*. **1998**, *41*, 130.
- (27) Norman, D. G; Grainger, R. J; Uhrin, D; Lilley, D. M. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 6317.
- (28) West, W; Pearce, S. *J. Phys. Chem*. **1965**, *69*, 1894.
- (29) Melissa, J; Taylor, J. C; McGown, L. B; Pitner, J. B; Linn, C. P. *Biospectroscopy*. **1996**. *2*, 173.
- (30) Record, M. T; Lohaman, T. M; De Haseth, P. *J. Mol. Biol*. **1976**, *107*, 145.
- (31) (a) Biver, T; Boggioni, A; Secco, F; Turriani, E; Venturini, M; Yarmoluk, S, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2007**, *465*, 90. (b) Biver, T; A. De Biassi; Secco, F; Venturini, M; Yarmoluk, S. *Biophys. J*. **2005**, *89*, 374.
- (32) Pandey, P. C; Weetall, H. H. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **1995**. *55*, 87.
- (33) Perry, P. J; Jeckins, T. C. *Mini. Rev. Med. Chem*. **2001**, *1*, 31.
- (34) Steullet, V; Dixon, D. W; Takenata, S; Wilson, W. D. First International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-1) 1997.
- (35) Demeunynik, M; Bailly, C; Wilson, W. D. *Small Molecule DNA and RNA binders: From Small Molecules to Drugs*. pp 285, ed. W. D. Wilson, Vol 1, 2003.
- (36) Tanious, F. A; Yen, S. F; Wilson, W. D. *Biochemistry*. **1991**, *30*, 1813.
- (37) (a) Cong Dong, D; Winnik, M. A. *Can. J. Chem*. **1984**, *11*, 2560, (b) Tucker, S. A; Zuaigzne, A. I; Acree, W. E; Fetzer, J. C; Zander. M, *Appl. Spectrosc*. **1991**. *45*, 424. (c) Karpovich, D. S; Blanchard, G. J. *J. Phys. Chem. B*. **1995**, *99*, 3951.
- (38) Namjun, Ch; Sanford, A. A. *J. Am. Chem .Soc*. **1993**, *115*, 6349.
- (39) Becker, H. C; Nordén, B. *J. Am. Chem. Soc*. **2000**, *122*, 8344.
- (40) Christensen, U. B; Pedersen, E. B. *Nucleic Acids Research*. **2002**. *30*, 4918.
- (41) (a) Nelson, H. P; Devoe, H. *Biopolymers*. **1984**. *23*, 897. (b) Geacintov, N. E; Hibshoosh, H; Ibanez, V; Benjamin, M. J; Harvey, R. G. *Biophysical Chemistry*. **1984**. *20*, 121.
- (42) Joshy Joseph, M. H; Ramaiah, D. *J. Phys. Chem. B*. **2006**, *110*, 24678.

- (43) (a) Cho, N.; Asher, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6349. (b) Nakamura, M; Fukunaga, Y; Sasa, K; Ohtoshi, Y; Kanaori, K; Hayashi, H; Nakano, H; Yamana, K *Nucleic. Acid. Res.* **2005**, *33*, 5887.
- (44) Felsenfeld, G; Hirschman, S. Z. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 409.
- (45) Dixon, N. E; Jackson, W. G; Lancaster, M. J; Lawrence, G.A; Sargeson, A. M. *Inorg. Chem.* **1981**, *20*, 470.
- (46) Gordon G. Hammes, *Spectroscopy for the Biological Sciences*, Ed.; Willey Inter-Science: USA 2005, pp. 66.
- (47) Woody, R. W. *Methods in Enzymology.* **1995**, *246*, 34.
- (48) (a) Calladine, C. R; Drew, H. R. *Understanding DNA: the molecule and how it works*, Academic Press, Cambridge (1992). (b) Berova, N; Nakarishi, K; Woody, R. W. *Circular Dichroism. Principles and Applications*, 2^a edición. Ed. Willey-VCH: New York, 2000, pag. 712.
- (49) (a) Lyng, R; Rodger, A; Nórden, B. *Biopolymers.* **1992**, *31*, 1709. (b) Lyng, R; Rodger, A; Nórden, B. *Biopolymers.* **1992**, *32*, 1201.
- (50) Scatchard, G. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1949**, *51*, 660.
- (51) Biver, T; Secco, F; Venturini, M. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **2005**, *437*, 215.
- (52) (a) Ciatto, C; D' Amico, L; Natile, G; Secco, F; Venturini, M, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 2717. (b) Zimmerman, H. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 115.
- (53) Dougherty, G; Pilbrow, J. R. *Int. J. Biochem.* **1984**, *16* (12), 1179.
- (54) Vitzthum, F; Bernhagen, J. *Recent Res. Devel. Anal. Biochem.* **2002**, *2*, 65.
- (55) (a) Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F. and Zeillinger, R. *PCR Methods Appl.* **1995**, *4*, 234. (b) Diggle, C. P., Bentley, J; Kiltie, A. E. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, e83.
- (56) (a) Vitzthum, F; Geiger, G; Bisswanger, H; Brunner, H; Bernhagen, J. *Anal. Biochem.* **1999**, *276*, 59. (b) Rengarajan, K; Cristol, S. M; Mehta, M; Nickerson, J. M. *Mol. Vis.* **2002**, *8*, 416.
- (57) Zipper, H; Brunner, H; Bernhagen, J; Vitzthum, F. *Nucleic. Acid. Res.* **2004**, *32*, e103.
- (58) Benesi, H. A; Hildebrand, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2703.
- (59) Creighton, T. E. *Proteins: Structures and Molecular Principles*: Freeman: New York, 1993; Capítulo 7.
- (60) E. Olins, D; Bryan, P; Harrington, R.; Hill, W. E. *Nucleic Acids Res.* **1977**, *4*, 1911.

- (61) Sulkowska, A.; Bojko, B.; Rownicke, J.; Pentak, D.; Sulkowski, W *Journal of Molecular Structure*. **2003**, 237, 651.
- (62) Wolfram Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, pp 350, Ed. Springer-Verlag, New York, 1988.
- (63) Cohen G; Eisenberg H. *Biopolymers*. **1969**. 8, 45.
- (64) Suh, D; Chaires, J. B. *Bioorganic & Medical Chemistry*. **1995**, 3(6), 723.
- (65) Saucier, J. M.; Festy, B; Le Pecq, J. B. *Biochimie*. **1971**. 53, 973.
- (66) Tan, M; Zhu, J; Pan, Y; Chen, Z; Liang, H; Liu, H; Wang, H. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. **2009**. ID. 413175.
- (67) Norden, B; Jjerneld, F. *Biopolymers*. **1982**. 21, 1713.
- (68) Long, Y. F.; Liao, Q. G.; Zhi Huang, C.; Ling, J.; Li, Y. F. *J. Phys. Chem. B*, **2008**, 112, 1783.
- (69) Monnot, M.; Mauffret, O.; Lescot, E.; Femandjian, S. *Eur. J. Biochem*. **1992**. 204, 1035.
- (70) Allenmark, S. *Chirality*. **2003**. 15, 409.
- (71) Monnot, M.; Mauffret, O.; Simon, V.; Lescot, E. ; Psaume, B. ; Saucier, J. M. ; Chana, M.; Belehradec, Jr. J; Femandjiam, S. *J. Biol. Chem*. **1991**. 266, 1820.
- (72) (a) Lyng, L; Hård, T; Nordén, B. *Biopolymers*. **1987**. 26, 1327. (b) Becker, H. C; Nordén, B. *J. Am. Chem. Soc*. **1999**. 121, 11947.
- (73) Kalyanasundaram, K; Thomas, J. K. *J. Phys. Chem*. **1977**. 81, 2176.
- (74) Nakamura, M; Fukunaga, Y; Sasa, K; Ohtoshi, Y; Kanaori, K; Hayashi, H; Nakano, H; Yamana, K. *Nucleic.Acid. Res*. **2005**, 33, 5887.
- (75) Lopez-Cornejo, P; Perez, P; García, F; De la Vega, R; Sánchez, F. *J. Am. Chem. Soc*. **2002**, 124, 5154.
- (76) Grand, D; Dokutchayev, A. *J. Phys. Chem. B*, **1997**, 101, 3181.
- (77) (a) Reichardt, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **1979**. 18, 98. (b) Reichardt, C. "Solvent Effects in Organic Chemistry", Verlag Chemie, Weinheim, New York, 1979.
- (78) F. Franks, in: A. Covington, P. Jones (Eds.), *Hydrogen-Bonded Solvents Systems*, Taylor y Francis, London, 1968.
- (79) Donald T. Hayne, *Biological Thermodynamic*, Cambridge University Press, **2001**, pp 201.
- (80) Nordstrom, L. J; Clark, C. A; Andersen, B; Champlin, S. M; Schweinfus, J. J. *Biochemistry*. **2006**. 45, 9604.

- (81) (a) Hong, J; Capp, M. W; Anderson, C. F; Saecker, R. M; Felitsky, D. J; Anderson, M. W; Record, M. T. Jr. *Biochemistry*. **2004**, *43*, 14744. (b) Wallqvist, A; Covell, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 427. (c) O' Brien, E. P; Dima, R. I; Brooks, B; Thirumalai, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7346. (d) Mountain, R. D; Thirumalai, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7346.
- (82) Chan, A; Kilkuskie, R; Hanlon, S. *Biochemistry*. **1979**, *18*, 84.
- (83) (a) Macgregor Jr, R. B.; Clegg, R. M.; Jovin, T. M. *Biochemistry*. **1987**, *26*, 4008. (b) Garcia, B.; Ibeas, S.; Ruiz, R.; Leal, J. M.; Biver, T.; Boggioni, A.; Secco, F.; Venturini, M. *J. Phys. Chem. B*. **2009**, *113*, 188.
- (84) *Relaxation kinetics*; Bernasconi, C. F., Ed.; Academic Press: New York, 1976.
- (85) Miyawaki, O.; Saito, A.; Matsuo, T.; Nakamura, K. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1997**, *61*, 466.
- (86) (a) Bjerrum, N. *Z. Phys. Chem.* **1924**, *108*, 82. (b) Brönsted, J. N. *Z. Phys. Chem.* **1922**, *102*, 169.
- (87) Bonincontro, A.; Falivene, M.; LaMesa, C.; Risuleo, G.; RuizPena, M. *Langmuir*. **2008**, *24*, 1973.
- (88) Kramers, H. A. *Physica*. **1940**, *7*, 284.
- (89) (a) Kleinert, T.; Doster, W.; Leyser, H.; Petry, W.; Schwarz, V.; Settles, M. *Biochemistry*. **1998**, *37*, 717. (b) Jacob, M.; Schmid, F. X. *Biochemistry*. **1999**, *38*, 13773. (c) Pradeep, L.; Udgaonkar, J. B. *J. Mol. Biol.* **2007**, *366*, 1016.
- (90) Ansari, A.; Jones, C. M.; Henry, E. R.; Hofrichter, J.; Eaton, W. A. *Science*. **1992**, *256*, 5065.
- (91) Bisel, O.; Matthews, C. R. *Adv. Protein. Chem.* **2000**, *53*, 153.
- (92) Lee, J. C.; Timasheff, S. N. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 7193.
- (93) (a) Timasheff, S. N. *Adv. Protein. Chem.* **1998**, *51*, 355. (b) Record, M. T.; Zhang, W.; Anderson, C. F. *Adv. Protein. Chem.* **1998**, *51*, 281.
- (94) (a) Fong-Meng, P.; Chye-Eng, S.; Tjoon-Tow, T.; Ibrahim, M. H. *J. Mol. Liq.* **2007**, *136*, 71. (b) Kay, R. L.; Broadwater, T. L. *J. Solution Chem.* **1976**, *5*, 57. (c) Lukyanchikova, I. A.; Ivlev, D. V.; Kiselev, M. G.; Al'per, G. A. *Russ. J. Gen. Chem.* **2004**, *74*, 1156.

2. ESTUDIO TERMODINÁMICO Y CINÉTICO
DE LA INTERACCIÓN
ADN-TENSIOACTIVO.

2. ESTUDIO TERMODINÁMICO Y CINÉTICO DE LA INTERACCIÓN ADN-TENSIOACTIVO.

2.1. Introducción y Antecedentes bibliográficos.

En disolución acuosa, el ADN está presente en una conformación B en la que la doble hélice se encuentra en un estado enrollado y alargado (“extended coil”), si no están presentes agentes compactantes en el medio.^{1,2} Estos agentes inducen la compactación del ADN por diversas causas, tales como la modificación de las interacciones electrostáticas entre grupos fosfato, cambios en las interacciones ADN-disolvente, exclusión de contra-iones, y/o debido a una curvatura o distorsión en la estructura de la hélice. In vitro, la compactación de la molécula de ADN, puede llevarse a cabo mediante la adición de agentes como poliaminas, cationes metálicos multivalentes, polímeros hidrofílicos, polímeros catiónicos, liposomas catiónicos, tensioactivos catiónicos y neutros, y más recientemente se ha encontrado que ésta puede inducirse por adición de nanopartículas. También pueden inducirse estos cambios variando la permitividad relativa del medio, por adición de codisolventes como los alcoholes, y sales de iones de alta carga. El grado de compactación es una propiedad que tiene una importancia significativa en la terapia génica y en la eficiencia en la transfección.^{2a} En efecto, la compactación del ADN junto con la reducción de su carga, facilita el transporte de los ácidos nucleicos a través de la membrana celular³. En este capítulo de la tesis, nos ocuparemos de la interacción de una clase en particular de agentes compactantes, los tensioactivos catiónicos de amonio cuaternario y ADN. Los tensioactivos aniónicos también pueden usarse para la de-compactación de complejos de ADN y tensioactivos catiónicos. Otros usos de los tensioactivos, en relación con su interacción con el ADN, están relacionados con la precipitación de la macromolécula para su extracción y purificación.⁴ Recientemente, además, se han empleado tensioactivos catiónicos para la separación de mezclas de ADN de doble y simple hebra en función de su afinidad por la naturaleza de la hélice.⁵

En la asociación de tensioactivos catiónicos y ADN participan dos tipos de fuerzas fundamentales: electrostáticas e hidrofóbicas. Como consecuencia de estas últimas, las isothermas de asociación tensioactivo/ADN son fuertemente dependientes de la longitud de la cadena carbonada.⁶ Se ha sugerido que las interacciones hidrofóbicas de las cadenas carbonadas de los tensioactivos producirían una auto-adsorción actuando como iones multivalentes, e induciendo la compactación. Por otro lado, las interacciones

electrostáticas, a menudo, ponen en juego una mayor energía que la correspondiente a las interacciones hidrofóbicas.^{6,7}

En la compactación del ADN, se considera que intervienen también interacciones atractivas entre las cadenas del ADN. Estas interacciones permiten la formación de un centro de nucleación en la cadena de ADN que crece a lo largo de la cadena molecular hasta que las moléculas alcanzan el estado compacto.⁸

En el estudio de la formación de complejos entre tensioactivos y ADN, se han empleado una amplia variedad de técnicas, como la electroforesis capilar, experimentos de “quenching” de fluorescencia, dispersión de rayos X de pequeño ángulo (SAXS) para determinar la distribución de tamaños de los complejos, dicroísmo circular, microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica para determinar los cambios estructurales del sistema, etc... En la pasada década, la aplicación de la técnica de microscopía de fluorescencia a los estudios de interacción de ADN de gran tamaño (varios Kbp) con tensioactivos catiónicos reveló, que estos últimos inducen sobre el ADN transiciones o cambios conformacionales discretos desde su forma extendida “extended coil” a la forma globular compacta “compact globule”. A concentraciones intermedias de tensioactivo coexisten las dos formas, la globular y la extendida.⁹ Esta coexistencia de regiones es un fenómeno común en las moléculas de ADN cuando se añaden agentes condensantes.

Las moléculas de tensioactivo, debido a su carácter anfifílico, tienen la habilidad de auto-asociarse en disolución. La presencia de otros compuestos, como el ADN, puede influenciar notablemente este proceso. Los diagramas de fase del sistema ADN-tensioactivo, describen las regiones de existencia de diferentes fases y el equilibrio entre ellas. En estos diagramas pueden diferenciarse zonas características. En relación con esto último, para una apropiada transfección del ADN a la célula, mediante el uso de estos sistemas como vehículos de transporte génico, es clave que los complejos ADN-tensioactivo sean estables y se evite la separación de fases. Para concentraciones muy por debajo de la cmc del tensioactivo, en varios órdenes de magnitud, y bajas concentraciones de ADN, el sistema ADN/tensioactivo precipita. Esto ocurre en torno a la cac (concentración de agregación crítica). Este hecho se explica considerando que la unión de los tensioactivos al ADN es un proceso de formación de micelas o hemi-micelas a lo largo de la molécula de polímero.¹⁰ La cac aumenta con la adición de sales.¹¹ Este aumento, se debe a un debilitamiento en las interacciones entre

el ADN y los tensioactivo, debido a la estabilización que se produce en la micela y al apantallamiento de las interacciones electrostáticas al aumentar la concentración de sal. El efecto complejo de la sal puede atribuirse al efecto de los iones monovalentes tanto en la auto-asociación de tensioactivos a la cadena de ADN, como en la asociación de las cadenas de ADN. Por otro lado, el efecto de la longitud de la cadena carbonada del tensioactivo, también es de gran importancia en la asociación de los tensioactivos al ADN, como ya se mencionó. Este importante efecto, se refleja en las diferentes zonas del diagrama de fases y en el comportamiento de estos sistemas. De esta forma, la concentración a la que se produce la separación de fases disminuye cuando aumenta el tamaño de la cadena carbonada; por ejemplo, el CTAB se une más fuertemente al ADN que el DTAB, dando lugar a un precipitado a concentraciones más bajas.

Así como la unión de tensioactivos catiónicos al ADN produce la compactación del mismo, la adición de tensioactivos aniónicos a estos sistemas (ADN + tensioactivo catiónico) produce el proceso inverso, la de-compactación del sistema. Es decir, los tensioactivos aniónicos producen un cambio conformacional del ADN (unido al tensioactivo catiónico), desde la forma globular a la conformación extendida.¹² A estos sistemas, resultado de la mezcla de tensioactivos aniónicos y catiónicos se les conoce como mezclas catiónicas.¹³ La adición de tensioactivos aniónicos a la mezcla ADN-tensioactivo catiónico, produce la formación de micelas mixtas que contienen los dos tipos de tensioactivos. Cuando se alcanza la cmc_{mixta} (concentración micelar crítica de la mezcla), el ADN queda libre (en su forma elongada) en la disolución. Al contrario que en el proceso de compactación del ADN por tensioactivos catiónicos, el proceso de de-compactación no depende de la longitud de la cadena carbonada del tensioactivo catiónico que está unido al ADN, es decir, la concentración de tensioactivo aniónico necesaria para producir la de-compactación no depende de la hidrofobicidad del tensioactivo catiónico.^{2a,14} No obstante, se ha encontrado que el uso de tensioactivos aniónicos de cadena más larga, produce, fenómenos de de-compactación del ADN más eficientes.

A pesar de que en la literatura se encuentran múltiples estudios acerca de los cambios conformacionales que producen los tensioactivos catiónicos sobre el ADN, estudios termodinámicos relacionados con la cuantificación de constantes de equilibrio y otras propiedades termodinámicas como los cambios de entropía y entalpía asociados con estas interacciones, son más bien escasos. Entre las técnicas empleadas en los estudios

de interacción ADN/T en la cuantificación de los parámetros termodinámicos de asociación, destacan la valoración potenciométrica con electrodos selectivos¹⁵, la diálisis¹⁶ y el empleo de agentes intercalantes como sondas.¹⁷ Los métodos empleados para el análisis de los datos experimentales y la obtención de los datos termodinámicos, también varían de unos trabajos a otros, destacan entre ellos el modelo de Mc-Guee y Von Hippel¹⁸, Swartz¹⁹ o el modelo de Stake y Yang.²⁰ Algunos autores han desarrollado modelos de asociación tensioactivo/ADN que tienen en cuenta dos regímenes de unión diferenciados, obteniendo dos constantes de equilibrio asociadas a cada regimen. Básicamente, el primer paso, se asocia a la unión individual de moléculas de tensioactivo al ADN, estando éste en su forma elongada. Este primer paso lleva asociada una constante de equilibrio K_1 . La constante de equilibrio del segundo paso está asociada al cambio conformacional del ADN como consecuencia de la unión del tensioactivo desde su forma elongada a la forma globular. Generalmente, se encuentra que $K_1 > K_2$. Entre los estudios presentes en la bibliografía relativos a la termodinámica de interacción del ADN con tensioactivos catiónicos se distinguen:

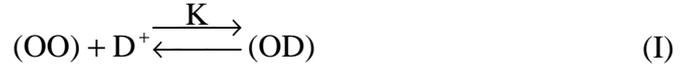
A) Estudios de la termodinámica de interacción ADN-tensioactivo mediante la técnica de titulación potenciométrica con electrodos selectivos.

Se han encontrado diversos estudios en el campo de la interacción ADN-tensioactivo, que se basan en el empleo de esta técnica para cuantificar dicha interacción.¹⁵ Fundamentalmente, esta técnica se basa en el uso de una celda potenciométrica compuesta por un electrodo de referencia y un electrodo selectivo al tensioactivo en cuestión. La f.e.m del sistema es proporcional a la concentración del tensioactivo en disolución, de forma que la construcción de una recta de calibrado con patrones de concentración conocida de tensioactivo, permite determinar la concentración de tensioactivo en la disolución problema. La isoterma de asociación a una temperatura de trabajo determinada se obtiene midiendo la concentración de tensioactivo libre. La isoterma de asociación se construye representando el grado de asociación, β , frente a la concentración de tensioactivo libre C_f .

$$\beta = (C_s - C_f) / C_p \quad (1)$$

donde C_p es la concentración residual de grupos fosfato del ADN y C_s es la concentración de tensioactivo total.

Diferentes autores analizan las constantes de equilibrio mediante un esquema de unión cooperativo basado en procedimientos matemáticos estadísticos desarrollados en el modelo de Ising.¹⁹⁻²¹ De acuerdo con la naturaleza de la asociación ADN-tensioactivo, a altas concentraciones de tensioactivo deben tenerse en cuenta los siguientes equilibrios por separado:



Esquema I

donde K y Ku son constantes de equilibrio aparentes; OO representan dos sitios libres vecinos en la molécula de ADN; D⁺, representa una molécula de tensioactivo libre en disolución, y D un sitio ocupado en la macromolécula. El proceso I, la unión de un tensioactivo D⁺ a un sitio aislado del polímero, está caracterizado por la constante de equilibrio K. Esta constante se considera función del potencial eléctrico en torno al ADN y/o función de la concentración de salina. El segundo proceso indica la unión de un tensioactivo a un sitio adyacente a otro ya ocupado por un tensioactivo, y está caracterizada por una constante de equilibrio Ku. El parámetro u, es el parámetro de cooperatividad, que proporciona una estimación de la cooperatividad en la unión ADN-tensioactivo. De esta forma, si:

$u > 1$ (unión es cooperativa, cooperatividad positiva)

$u = 1$ (unión no cooperativa)

$u < 1$ (unión es anti-cooperativa, cooperatividad negativa).

La unión de tensioactivos a un biopolímero lineal que contiene sitios de unión equivalentes (en este caso se asume que el ADN cumple este requisito), puede describirse mediante la función de partición para una dimensión dada por el modelo de Ising:

$$Z = (\mathbf{1}, \mathbf{1}) \begin{pmatrix} \mathbf{1}, \mathbf{1} \\ \mathbf{s} \\ \mathbf{u}, \mathbf{s} \end{pmatrix}^n \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (2)$$

donde u es el parámetro de cooperatividad; $s = KuC_f$; n es el número de sitios de unión en la molécula de ADN, y K es la constante de equilibrio intrínseca de unión de un tensioactivo a un sitio aislado en el biopolímero. El grado de unión del tensioactivo puede obtenerse empleando la función de partición definida en la ecuación 2:

$$\beta = \frac{\left(\frac{d \ln Z}{d \ln C_f}\right)}{n} \quad (3)$$

Si se conoce el número de sitios de unión del tensioactivo al ADN (n), el grado de asociación, β , puede obtenerse del cálculo matricial. Otra forma de obtener las constantes de equilibrio Ku y K es mediante un procedimiento gráfico a partir de la isoterma de asociación^{21a,22}.

El valor de Ku puede obtenerse a partir de la expresión:

$$Ku = \frac{1}{(C_f)_{\beta=0.5}} \quad (4)$$

donde $(C_f)_{\beta=0.5}$, es la concentración de tensioactivo libre en el punto medio de la isoterma de unión. De acuerdo con Schmitz y Schurr²³, a partir del ajuste de la correspondiente isoterma de asociación a la ecuación 5 puede obtenerse el valor del parámetro de cooperatividad u :

$$\left(\frac{d\beta}{d \ln C_f}\right)_{\beta=0.5} = \frac{\sqrt{u}}{4} \quad (5)$$

De acuerdo con este modelo, Shirahama y colaboradores⁷ estudiaron potenciométricamente la interacción del tensioactivo DTAB con ADN de tipo T4, así como el efecto de la concentración de sal (NaCl) en la constante termodinámica de asociación ADN-tensioactivo. Se encontró que el parámetro de cooperatividad, “ u ”, aumentaba, mientras que la constante intrínseca K disminuía al aumentar la concentración salina, alcanzando un valor constante a concentraciones de NaCl 0.16 M. Desafortunadamente, los autores no aportaron una explicación clara al efecto de la sal en la interacción ADN-tensioactivo.

Posteriormente, Mel'nikov y colaboradores^{15a} estudiaron también la unión del tensioactivo CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) al ADN T4 (166000 pares de bases), a una temperatura de 20°C. El valor obtenido de Ku fue $9.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{L}$, siendo L la longitud de la hebra de ADN T4 medida mediante la técnica de microscopía de

fluorescencia. El valor del parámetro de cooperatividad “u” se obtuvo por ajuste de la ecuación 6, tomando la parte lineal de la isoterma de asociación, obteniéndose un valor de 80, con lo que el de la constante de equilibrio para el primer paso de la reacción K fue $1.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{L}$.

Hayakawa y colaboradores^{15b} por un procedimiento similar, estudiaron la interacción de tensioactivos de la misma familia con otro tipo de ADN más corto, DTAB (bromuro de dodeciltrimetilamonio) y TTAB (bromuro de tetradeciltrimetil amonio), a 30°C, en un intervalo de concentraciones de los tensioactivos de $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ hasta el valor de su cmc correspondiente. Así mismo se estudió la influencia de la adición de sal (NaCl) sobre la constante de asociación ADN-tensioactivo en cada caso. A altas concentraciones de tensioactivo, en la región cooperativa de la unión se obtuvieron valores de K_u para DTAB y TTAB, de $9.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ y $1.07 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectivamente, por ajuste a la ecuación 4. Igualmente, del ajuste a la ecuación 5 se obtuvieron valores de u de 6 y 20. El valor deducido para la constante de equilibrio intrínseca K fue de 1600 M^{-1} y 5400 M^{-1} para el DTAB y TTAB, respectivamente.

En condiciones de baja concentración de tensioactivo, son poco significativos los fenómenos de cooperatividad en la constante de equilibrio de asociación (equilibrio II), por lo que la constante de equilibrio global se obtendría de la pendiente del ajuste del término izquierdo de la ecuación (6) frente a la concentración de tensioactivo libre:

$$\beta/(1-\beta) = KC_f \quad (6)$$

La presencia de sal, 0.1 M de NaCl, afecta tanto al valor de K_u y K , como al valor del parámetro de cooperatividad u . Los valores que se obtuvieron para el parámetro K_u fueron $1.38 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ y $1.66 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el DTAB y TTAB, respectivamente. Así mismo, los valores para el parámetro de cooperatividad u fueron 20 y 80 respectivamente. Los autores no aportaron una explicación clara para las diferencias entre el parámetro de cooperatividad de los distintos tensioactivos en presencia y en ausencia de sal. Sin embargo, se encontró que la dependencia del $\log(K_u)$ con la concentración de sal (NaCl), mostraba un comportamiento similar a la dependencia de la cmc de ambos sistemas con la concentración salina.²⁴ Estas similitudes, según Hayakawa, se deben a que tanto el proceso de formación de micelas, como el segundo proceso del mecanismo descrito en el esquema I (proceso de unión cooperativo,

caracterizado por la constante de equilibrio K_u), implican la transferencia de un ion de tensioactivo hasta un polion de alta carga e hidrofóbico (OD) o una micela.²⁵ Nótese que los valores obtenidos por Hayakawa y Mel'nikov de los parámetros termodinámicos de interacción ADN-tensioactivo no son directamente comparables, porque el ADN empleado en cada caso fue de distinto tamaño y de distinta procedencia.

B) Estudios de la termodinámica de interacción ADN-tensioactivo mediante la técnica de diálisis y a partir de medidas de la tensión superficial.

El método de diálisis para la determinación de parámetros termodinámicos de asociación de tensioactivos al ADN se basa en la determinación directa de la concentración de tensioactivo en ausencia y presencia de ADN. Este método permite determinar la concentración de tensioactivo libre en disolución. Chatterjee y colaboradores¹⁶, emplearon esta técnica para estudiar la termodinámica de la interacción de diferentes tensioactivos (MTAB, CTAB, DTAB y CPCL) con ADN a concentraciones por debajo de sus cmc_s . También estudiaron el efecto de la concentración de sal en dicha interacción. A partir del método de diálisis (para la determinación de la concentración de tensioactivo libre, C) y midiendo la tensión superficial, γ , de la disolución que contenía al tensioactivo, se construyeron curvas γ - C , en el rango de concentraciones desde 10^{-5} M hasta concentraciones próximas a la cmc de cada tensioactivo, y a diferentes temperaturas. De forma que, para determinar la concentración de tensioactivo libre (C) en otras disoluciones, es suficiente medir la tensión superficial (γ) e interpolar en las curvas γ - C , a la temperatura de trabajo correspondiente. Una vez calculado el valor de C , el número de moles de tensioactivo enlazado por mol de macromolécula, Γ_a , se determinó a partir de la expresión:

$$\Gamma_a = \left(\frac{C_t - C}{C_N} \right) \left(\frac{V_i + V_o}{V_i} \right) \quad (7)$$

En esta ecuación C_t y C son las concentraciones inicial y de equilibrio del tensioactivo, respectivamente, y V_i y V_o son los respectivos volúmenes de la disolución separados por la membrana, siendo $V_i + V_o$ el volumen total. C_N representa la concentración de ADN total.

De acuerdo con el modelo de Scatchard²⁶:

$$\frac{\Gamma_a}{C} = K_{sc} B - K_{sc} \Gamma_a \quad (8)$$

en esta expresión, Γ_a representa el número de moles de ligando enlazado por mol de macromolécula total; C , la concentración de ligando libre; K_{sc} , la constante de equilibrio ADN-tensioactivo; y B es un parámetro directamente relacionado con el número de sitios.

La representación de Γ_a/C frente a Γ_a para la unión de un ligando (tensioactivo) a una macromolécula (ADN en este caso), sería lineal, supuesto que la carga y la conformación del biopolímero no se alteraran en el transcurso de la unión. Sin embargo, en el caso de los tensioactivos estudiados y el ADN, las curvas de Scatchard no son lineales, en el intervalo de concentraciones empleado. Esto sugiere que tanto la carga como la conformación del ADN, no permanecen inalteradas en el transcurso de la asociación. Por ello, en lugar de la determinación de la constante de equilibrio, K_{sc} , se cuantificó la energía libre de asociación correspondiente al valor máximo, ΔG^m , empleando un modelo termodinámico que tiene en cuenta la interacción tanto del tensioactivo como del disolvente con una cantidad dada de macromolécula²⁷:

$$\Delta G = -RT \int_0^C \Gamma_a dc + \Gamma_a RT \ln c \quad (9)$$

La ecuación (9), deriva de la integración de la isoterma de adsorción de Gibbs. Según ésta, la energía libre, ΔG , aumenta con la concentración del tensioactivo, C , hasta un valor que llega a ser independiente de la concentración de éste, ΔG^m . Se obtuvieron los siguientes valores de energía libre de asociación máxima a 30°C: -31.4 kJmol⁻¹ para el CPCL; -37.2 kJmol⁻¹ para el CTAB; -27.2 kJmol⁻¹ para el MTAB; y -10.0 kJmol⁻¹ para el DTAB. Se evaluó, así mismo, la constante de equilibrio en presencia de sales de diferente naturaleza y concentración, encontrándose una variación considerable de la constante de asociación ADN-tensioactivo al aumentar la fuerza iónica del medio, debido a la modificación de la interacción electrostática entre los grupos fosfato del ADN, cargados negativamente, y el tensioactivo catiónico. La pendiente de la isoterma, Γ_a vs. C , alcanza su valor máximo a fuerza iónica muy baja, aunque el valor de esta pendiente disminuye con el aumento de la fuerza iónica y, por tanto, también lo hace la constante de equilibrio asociada a esta interacción.

El estudio de sistemas ADN/tensioactivo a distintas temperaturas, ha permitido la determinación de la entalpía, ΔH^m y entropía, ΔS^m , máximas asociadas al proceso. Según estos estudios la mayor contribución a la energía libre del proceso viene determinada por el término entrópico ($-T\Delta S^m$):

$$\Delta G^m = \Delta H^m - T\Delta S^m \quad (10)$$

El cambio de entropía ($-\Delta S^m$) para la transferencia de 1 mol de ligando (tensioactivo) desde el ADN (unido al tensioactivo) al medio acuoso es siempre negativo. De acuerdo con Frank y Evans²⁸, la naturaleza de este cambio negativo en la entropía, se debe a la existencia de un orden local de las moléculas de agua en la vecindad del complejo ADN-tensioactivo, en cuya formación participan interacciones hidrofóbicas. El grado de hidratación del ADN (y su conformación) se ve afectado por la presencia de sales en disolución.²⁹ En la interacción del ADN con tensioactivos catiónicos, en presencia de diferentes sales, se encontró que la naturaleza del cambio en el término entrópico ($-T\Delta S^m$), y en gran medida de los cambios en ΔG^m dependía significativamente de la clase y la valencia de los iones de la sal. Los valores de ΔG^m a 30°C en presencia de diferentes sales aumentan en valor absoluto en el orden: KCl > NaCl > LiCl > Na₂SO₄ > MgCl₂. Este hecho apuntó que el estado de hidratación del ADN debido a la presencia de sales, contribuye a las interacciones hidrofóbicas entre el ADN y el tensioactivo.

C) Estudios de la termodinámica de interacción ADN-tensioactivo mediante interacción con sondas fluorescentes.

Recientemente, diferentes autores³⁰ han empleado sondas fluorescentes de tipo intercalantes y que se asocian a los surcos del ADN, para el estudio de la interacción ADN-tensioactivo. El estudio termodinámico de la interacción de ADN con tensioactivos de amonio cuaternario de diferente longitud de cadena, empleando como sonda el agente intercalante, 1-PyCHO, que se expone en este capítulo de la tesis, está basado en esta técnica.³¹ La cuantificación de los parámetros termodinámicos empleando este método de tipo indirecto, es menos frecuente que los anteriores, en la bibliografía. A pesar de ello, diferentes sondas como el bromuro de etidio (EB), pireno y Hoechst 33258 (HO) se han empleado para la determinación de las interacciones

ADN/tensioactivo. Llères y colaboradores^{30b}, emplearon el bromuro de etidio como sonda para cuantificar la energética de la interacción de tensioactivos catiónicos del tipo, $C_{10}\text{-C}^{G+}$ (N-decilamina guanidino cisteína), $C_{14}\text{-CO}$ (ornitnil-cisteinil-tetradecilamina), y CTAB, con ADN. Su estudio se basa en el seguimiento de los cambios de intensidad de fluorescencia del bromuro de etidio, en presencia de ADN libre y unido al tensioactivo. Postularon que la conformación del ADN depende de la concentración de tensioactivo presente en disolución, pudiendo encontrarse éste en una conformación extendida (en agua) y/o globular compacta (en presencia de tensioactivo). Se determinó que la intensidad de fluorescencia de la sonda variaba de acuerdo con la siguiente expresión:

$$I = I_0 \frac{[\text{ADN}]_F}{[\text{ADN}]_t} + I_{pl} \frac{[\text{ADN}]_B}{[\text{ADN}]_t} \quad (11)$$

En esta expresión, $[\text{ADN}]_F$, $[\text{ADN}]_B$ y $[\text{ADN}]_t$ corresponden a las concentraciones de ADN libre, unido a tensioactivo y total, respectivamente; I_0 , es la fluorescencia del bromuro de etidio en presencia de ADN (libre de tensioactivo); y I_{pl} , es la fluorescencia del conjunto de moléculas de bromuro de etidio que quedan libres en disolución, después de la asociación del tensioactivo con el ADN. De esta forma, la fracción de ADN enlazado al tensioactivo (grado de asociación), β , corresponde a:

$$\beta = \frac{I_0 - I}{I_0 - I_{pl}} \quad (12)$$

Nótese que en este modelo está implícita la suposición de que la sonda no presenta afinidad por el ADN enlazado al tensioactivo. Esta suposición podría no ser del todo cierta y más aún cuando se trabaja a altas relaciones $[\text{ADN}]_t/C_t$. La constante de equilibrio tensioactivo/ADN se determinó de acuerdo con el modelo de Mc-Guee y Von Hippel.¹⁸ A partir de los valores del parámetro β , pueden calcularse el cociente entre el número de moles de tensioactivo unido al ADN y el número de moles de ADN total, ν , y la concentración de tensioactivo libre, C_f , según estas expresiones :

$$\nu = \frac{\beta}{n} \quad (a) \quad (13)$$

$$C_f = C_t - \nu N_t \quad (b)$$

En las ecuaciones anteriores, n es el número de grupos fosfato que participan en la asociación de una molécula de tensioactivo al ADN ($n = 1$ para el CTAB); C_t es la concentración total de tensioactivo; y N_t es la concentración total de ADN. Los valores de la constante termodinámica de equilibrio fueron obtenidos del ajuste de v/C_f frente a v de acuerdo con el modelo de Mc-Guee y Von Hippel¹⁸:

$$\frac{v}{C_f} = K(1 - nv) \left(\frac{(2\omega - 1)(1 - nv) + v - R}{2(\omega - 1)(1 - nv)} \right)^{n-1} \left(\frac{1 - (n + 1)v + R}{2(1 - nv)} \right)^2$$

$$R = \sqrt{(1 - (n + 1)v)^2 + 4\omega v(1 - nv)}$$
(14)

En esta expresión, ω es el parámetro de cooperatividad (de significado similar al parámetro u del modelo de Schwarz); K es la constante de equilibrio intrínseca; y $K\omega$ es la constante de equilibrio para la unión de un tensioactivo a un sitio adyacente, a otro ya ocupado por un tensioactivo. El valor encontrado para $K_{obs} = K\omega$ fue 93000 M^{-1} , que es próximo al obtenido para la interacción de este tensioactivo con ADN-T4 por métodos potenciométricos.^{15a} El valor del parámetro de cooperatividad fue $\omega = 20$ y el valor de K intrínseca, 5400 M^{-1} . Por tanto, la energía libre de asociación del proceso global corresponde a -28 kJmol^{-1} . La aplicación del formalismo de Record,³² permitió determinar a su vez la contribución electrostática y no electrostática de la interacción ADN-tensioactivo. Este modelo relaciona estas contribuciones con la constante de equilibrio observada en presencia de diferentes concentraciones de sal:

$$\log K_{obs} = \log K_T - m' \Psi'_m \log[M^+]$$
(15)

En la ecuación anterior, K_T es la constante de unión no-electrostática; m' , es el número de pares iónicos entre el tensioactivo y el ácido nucleico; y Ψ'_m es la fracción de polímero catiónico, M^+ , enlazado por grupo fosfato. Para determinar la contribución no electrostática de la unión, se empleó el valor de la cmc del tensioactivo en cuestión en presencia de ADN, suponiendo que la formación de micelas fuese un proceso de naturaleza no-electrostática y altamente cooperativo. De esta forma, $K_T = 1/cmc$. De acuerdo con esta hipótesis, los valores de la energía libre de unión electrostática y no electrostática del ADN al CTAB que se obtuvieron fueron -7.8 kJmol^{-1} y -20.2 kJmol^{-1} , respectivamente.

En relación con esta técnica de tipo indirecto para la cuantificación de los parámetros termodinámicos de interacción ADN-tensioactivo, destacan también los estudios realizados por Petrov y colaboradores.^{30c} En ellos se empleó el pireno como sonda para evaluar la contribución electrostática y no electrostática de la interacción de dos tensioactivos catiónicos con ADN, DDA (dodecilamina) y DTAB. Estos tensioactivos se caracterizan por poseer la misma cadena carbonada y diferir, en la naturaleza de su cabeza polar.

Las constantes termodinámicas de interacción ADN-tensioactivo, fueron determinadas por un procedimiento similar al empleado por Llères y colaboradores.^{30b} A diferencia del caso anterior, la formación del complejo ADN-tensioactivo se estudió midiendo la variación de la razón de intensidades de fluorescencia del pireno a 383 y 372 nm, I_3/I_1 , ya que esta razón de intensidades da cuenta de los cambios de polaridad local del medio que experimenta la sonda. El estudio de la variación de I_3/I_1 en función de la concentración de tensioactivo y de ADN, proporcionó diferentes isothermas de asociación, que tendían en todos los casos a un valor asintótico a elevadas concentraciones de tensioactivo, $(I_3/I_1)_{\max}$. El espectro de fluorescencia resulta de la superposición de las señales del pireno localizado en diferentes microentornos: $(I_3/I_1)_{\text{hidrofílico}}$, y en el entorno del clúster de naturaleza hidrofóbica, $(I_3/I_1)_{\text{hidrofóbico}}$:

$$\frac{I_3}{I_1} = \alpha \left(\frac{I_3}{I_1} \right)_{\text{hidrofílico}} + (1 - \alpha) \left(\frac{I_3}{I_1} \right)_{\text{hidrofóbico}} \quad (16)$$

donde α y $(1-\alpha)$ corresponderían a la fracción molar de moléculas de pireno localizadas en el medio acuoso y en el entorno hidrofóbico, respectivamente. La cuantificación de los parámetros termodinámicos de interacción se realizó empleando el tratamiento de Schwarz¹⁹ y Satake y Yang²⁰, para la unión de ligandos de bajo peso molecular a polímeros lineales. Estos modelos, ya mencionados cuando se describió el estudio de la interacción ADN-tensioactivo mediante el empleo de la técnica potenciométrica, suponen la existencia de dos constantes de equilibrio bien diferenciadas. La primera de ellas, relativa al proceso de asociación a un sitio aislado, K y la segunda, relativa a la asociación de un ligando a un sitio de unión adyacente a otro ya ocupado por otro ligando, K_u . Los autores dan un paso más allá en la aplicación de este modelo a la interacción ADN-tensioactivo, en lo que respecta a la naturaleza de las interacciones implicadas en el sistema. Como primera aproximación, la constante K del proceso

aislado se identificó como la contribución electrostática de la interacción del tensioactivo catiónico y los grupos fosfatos cargados negativamente del ADN, $K = K_{el}$. La segunda constante de equilibrio, K_u , se identificó con el producto de la constante de interacción electrostática, K_{el} , por la correspondiente a la interacción hidrofóbica entre moléculas de tensioactivo vecinas, K_h , de manera que $K_u = K_{el}K_h$. El análisis de los datos se llevó a cabo de acuerdo con la expresión:

$$\beta = \frac{1}{2} \left[1 - (1 - K_{el}K_h C_f) / ((1 - K_{el}K_h C_f)^2 + 4K_{el}C_f)^{1/2} \right] \quad (17)$$

donde C_f es la concentración de tensioactivo libre, y β es el grado de asociación que se calcula asumiendo una estequiometría 1-1 para la interacción:

$$\beta = \frac{[(I_3/I_1) - (I_3/I_1)_{\min}]}{[(I_3/I_1)_{\max} - (I_3/I_1)_{\min}]} \quad (18)$$

A partir de estas ecuaciones, puede deducirse:

$$K_{el}K_h = 1/(C_f)_{\beta=0.5} \quad (a)$$

$$\left(\frac{\partial \beta}{\partial C_f} \right)_{\beta=0.5} = \frac{\sqrt{K_h}}{4} \quad (b)$$

Las ecuaciones 19 a y 19 b son similares a la 4 y 5, sustituyendo las constantes K_u y K por $K_{el}K_h$ y K_{el} , respectivamente. Esto permite separar a partir de la isoterma de asociación, las contribuciones no electrostáticas y electrostáticas de la interacción. En el caso del tensioactivo DDA, los parámetros de interacción encontrados para una concentración de $[NaCl] = 0.01$ M fueron $K_{el} = 150$ M⁻¹, $K_h = 30$; en el caso del DTAB fueron, $K_{el} = 8.2$ M⁻¹ y $K_h = 166$. La mayor contribución electrostática en la unión del DDA al ADN, respecto de la misma para el DTAB, que difiere del anterior, únicamente, en la naturaleza de su cabeza polar, se racionalizó atendiendo a las diferencias existentes entre el tipo de unión de los tensioactivos y la cadena de polinucleótido. En el caso del DDA, la interacción electrostática ADN/DDA se produce por contacto directo del grupo amino del tensioactivo con los grupos fosfato cargados negativamente del ADN, (unido al efecto desestabilizante del DDA sobre la doble hélice). Mientras que en el caso del DTAB, la interacción sería de tipo indirecta, a través de moléculas de agua en contacto

con la molécula de tensioactivo y con los grupos fosfato (todo ello unido a la interacción estabilizante que produce este tensioactivo sobre la doble hélice). Para el tensioactivo DDA, con una contribución electrostática más importante en su asociación con el ADN, se estudió la influencia de la concentración de sal (NaCl). Este estudio se realizó en el intervalo de concentraciones desde 10^{-3} a 0.1 M de NaCl, encontrándose una bajada en K_{el} equivalente a 10 kJmol^{-1} . Así mismo, se encontró que K_h , aumentó ~ 10 veces en este mismo rango de concentraciones. Es importante destacar, que este aumento está de acuerdo con la idea de que las interacciones hidrofóbicas están favorecidas al aumentar la fuerza iónica del medio³³

Otros autores han empleado también sondas fluorescentes para estudiar la naturaleza de la interacción de diferentes tensioactivos y el ADN. Sin embargo, estos estudios se diferencian de los anteriores, en que en estos no se llegan a cuantificar los parámetros termodinámicos de la interacción ADN/Tensioactivo. Pueden destacarse entre ellos, los realizados por Bhattacharya y colaboradores^{30a}, en los que se hace un estudio comparativo de la interacción de sales y tensioactivos con el ADN, utilizando para el seguimiento de la interacción la sonda intercalante EB. Se emplearon los tensioactivos de naturaleza catiónica y aniónica, DODAB, CTAC, DHDAB, y SDS, cuya interacción con la macromolécula, a diferencia de las sales, no fue únicamente de carácter electrostática. Las diferencias en la naturaleza de la interacción de los tensioactivos y sales con el ADN fue atribuída a la presencia de cadenas alquílicas en los tensioactivos (no presentes en las sales), que son susceptibles de interaccionar con los restos hidrofóbicos de la macromolécula de ADN, por interacciones hidrofóbicas.

Goracci y colaboradores^{30d}, emplearon otra sonda fluorescente, Hoeschst 33258 (HO), para el estudio de la interacción de ADN tipo CT con los tensioactivos anfifílicos, DDAO (óxido de dodecildimetilamina) y pDoAO (óxido de p-dodeciloxilbencildimetilamina). Las variaciones en la intensidad de fluorescencia del complejo Hoeschst/ADN en presencia de estos tensioactivos son similares a las encontradas en el estudio de la interacción CTAB-ADN empleando EB como sonda. Esto es, en ambos casos la intensidad de fluorescencia de la sonda unida al ADN disminuye al aumentar la concentración de tensioactivo en la disolución. Sin embargo, la sonda Hoeschst es más sensible que el EB a los cambios en el medio que la rodea, produciéndose tanto una disminución de fluorescencia del complejo Hoeschst/ADN, como desplazamientos en el máximo de longitud de onda (hacia λ menores), al

aumentar la concentración de tensioactivo en la disolución. Estos cambios son atribuidos a un cambio local de pH en la vecindad inmediata de la sonda, debido a la presencia de complejos ADN-tensioactivo y agregados de tensioactivo en disolución.

D) Estudios calorimétricos de la termodinámica de interacción ADN-tensioactivo.

La contribución entálpica y entrópica a la energía libre del proceso de asociación de ADN con diferentes tensioactivos, ha sido ampliamente estudiada por diferentes autores mediante técnicas de valoración calorimétricas.³⁴ Estos estudios han demostrado que el proceso de asociación de tensioactivos catiónicos con ADN está gobernado por la contribución entrópica del proceso, acompañado de una pequeña contribución entálpica positiva, y una capacidad calorífica negativa y elevada, a temperatura ambiente. Estos valores de la capacidad calorífica son indicativos de las fuertes interacciones hidrofóbicas entre las cadenas de tensioactivo en el proceso de asociación.

La técnica de valoración calorimétrica, se basa en la medida del calor desprendido al añadir un ligando (tensioactivo) a una disolución de ADN de concentración conocida presente en la célula de medida. El calor medido, a presión constante, es proporcional a la cantidad de ligando enlazado en la interacción. Durante la titulación, se obtienen diferentes valores de entalpía en función de la concentración de ligando añadido. Se cumple que:

$$y = y_f + \beta = \frac{[C]_{total}}{[DNA]_{total}} \quad (a)$$

$$\partial H(y) = \Delta H \frac{\partial \beta}{\partial y} \quad (b)$$
(20)

En las ecuaciones anteriores, ΔH es el valor de entalpía molar integral de asociación del ligando, que se obtiene experimentalmente sumando todos los calores registrados a cada concentración adicional de ligando. Y_f es la razón entre la concentración de ligando libre y la concentración total de ADN expresada en grupos fosfato. Finalmente, β es la fracción de ligando enlazado por grupos fosfato.

Entre los estudios calorimétricos de interacción ADN/tensioactivo destaca el realizado por Matulis y colaboradores^{34a}, sobre la asociación de tensioactivos de alquil-1-amonio con ADN pUC118 de 3000 pares de bases, en función de distintas variables como la longitud de la cadena carbonada del tensioactivo, la temperatura y concentración salina

en el medio. Los autores consideran la existencia de dos procesos de asociación que no pueden ser estudiados independientemente por la técnica calorimétrica porque ocurren de manera simultánea. De acuerdo con ello, la entropía y entalpía medidas por esta técnica se asocian a la suma de las contribuciones de ambos procesos. Uno de ellos implica el desplazamiento de los iones sodio por los iones de tensioactivo, en las proximidades del ADN. El otro proceso se corresponde con la condensación del ADN inducido por la unión del tensioactivo. Para cuantificar los parámetros termodinámicos de interacción de los tensioactivos al ADN, se usó el modelo de Zimm-Bragg^{22,35}, que se emplea frecuentemente para el estudio de la apertura de la doble hélice (“melting”): la asociación de tensioactivos catiónicos al ADN puede describirse de forma matemática y conceptualmente similar, al proceso de “melting” del ADN. Este modelo, como ya se ha dicho, fue originariamente aplicado al estudio de los procesos de melting del ADN. En este tratamiento, β , la fracción de ADN disociado (“melted”), se expresaba en función de dos parámetros: s , que describe la constante de interacción a un sitio aislado y σ , el parámetro de cooperatividad:

$$\beta = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \left(\frac{s-1}{\sqrt{(s-1)^2 + 4s\sigma}} \right) \quad (21)$$

Para el caso de la unión de los tensioactivos catiónicos al ADN, el parámetro s se sustituye por el parámetro K y el parámetro de cooperatividad σ , por $\omega = 1/\sigma$. De esta forma, la fracción de tensioactivo unido por grupo fosfato se expresa ahora en función de K y ω como:

$$\beta = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \left(\frac{K-1}{\sqrt{(K-1)^2 + 4\frac{K}{\omega}}} \right) \quad (22)$$

Los autores designaron la constante de equilibrio K , como el producto de la constante de equilibrio electrostática, K_{elec} , y el factor de cooperatividad, ω ($K = K_{elec}\omega$). La constante de equilibrio electrostática se calculó como el cociente entre la constante de asociación de los cationes sodio en la superficie del ADN, K_{Na^+} , y la correspondiente a los cationes de amonio cuaternario (tensioactivo), $K_{RNH_3^+}$:

$$K_{\text{elec}} = \frac{K_{\text{Na}^+}}{K_{\text{RNH}_3^+}} = \left(\frac{[\text{RNH}_3^+]}{[\text{Na}^+]} K_{\text{sp}} \right)^\alpha \quad (23)$$

En esta expresión, $[\text{RNH}_3^+]$ y $[\text{Na}^+]$ son las concentraciones de tensioactivo e iones sodio libres en disolución; K_{sp} es la constante de competición específica que indica la energética de la unión de una amina hipotética (sin cadena alquílica), al ADN relativa a la unión de los cationes sodio a la macromolécula; y α , un parámetro que depende de la fuerza iónica de la disolución y que equivale a la unidad a baja fuerza iónica ($[\text{NaCl}] \rightarrow 0$) y 1/2 a alta fuerza iónica ($[\text{NaCl}] \rightarrow 1\text{M}$).³⁶ De esta forma la constante global que aparece en la ecuación (22), vendría dada por la siguiente expresión:

$$K = K_{\text{elec}} \omega = \left(\frac{[\text{RNH}_3^+]}{[\text{Na}^+]} K_{\text{sp}} \right)^\alpha \omega = \left(Y_f \frac{[\text{ADN}]_{\text{tot}}}{[\text{Na}^+]} K_{\text{sp}} \right)^\alpha \omega \quad (24)$$

con lo que la fracción de ligando enlazado, β , puede calcularse sustituyendo la ecuación (24) en la ecuación (22) como:

$$\beta = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \left(\frac{\left(y_f \frac{[\text{ADN}]_{\text{tot}}}{[\text{Na}^+]} K_{\text{sp}} \right)^\alpha \omega - 1}{\sqrt{\left(\left(y_f \frac{[\text{ADN}]_{\text{tot}}}{[\text{Na}^+]} K_{\text{sp}} \right)^\alpha \omega - 1 \right)^2 + 4 \left(y_f \frac{[\text{ADN}]_{\text{tot}}}{[\text{Na}^+]} K_{\text{sp}} \right)^\alpha}} \right) \quad (25)$$

Para concentraciones bajas de sal ($[\text{NaCl}] < 0.05 \text{ M}$), puede considerarse $\alpha = 1$. De esta forma, a partir de los datos experimentales del experimento calorimétrico, se obtienen las constantes de asociación, K_{el} y K , directamente del ajuste de los valores de la fracción de ligando enlazado, β , frente a y_f , según la ecuación (25).

Para determinar las contribuciones electrostáticas y no-electrostáticas (de naturaleza hidrofóbica) de la interacción, los autores consideran que la energía libre del proceso global es la suma de dos contribuciones aditivas:

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta G_{\text{elect}} + \Delta G_{\text{hidrof}} \quad (26)$$

donde la contribución electrostática vendría dada por K_{el} :

$$\Delta G_{elect} = -RT\alpha * \ln\left(\frac{[RNH_3^+]}{[Na^+]} K_{sp}\right) = -RT\alpha * \ln\left(y_f \frac{[ADN]_{tot}}{[Na^+]} K_{sp}\right) \quad (27)$$

Y la contribución hidrofóbica depende de un parámetro m , el número de átomos de carbono en la cadena alquílica del tensioactivo:

$$\Delta G_{hidrof} = RT \ln \omega = \Delta G_0 + \Delta G_{CH_2} m \quad (28)$$

En esta expresión, ΔG_0 es la energía libre de referencia y ΔG_{CH_2} es la contribución a la energía libre por grupo metileno. El incremento de un grupo metileno en la cadena de tensioactivo, supuso un incremento de energía libre de -3.58 kJmol^{-1} , cuya componente electrostática fue invariante ($\Delta G_{elec} = -2.6 \text{ kJmol}^{-1}$). Para el cálculo de la entalpía libre de asociación del proceso se asumió que la entalpía electrostática de unión era equivalente a la correspondiente a la unión de un catión monovalente al ADN. En base a ello, se determinó la componente hidrofóbica de la entalpía por substracción de esta de la total, suponiéndolas aditivas:

$$\Delta H_{hidrof} = \Delta H - \Delta H_{elect} \quad (29)$$

La entalpía libre de asociación, ΔH resultó ser positiva y prácticamente independiente de la longitud de la cadena carbonada. Prueba de ello fueron los valores de ΔH de los diferentes tensioactivos que variaron desde 6.4 a 5.4 kJmol^{-1} para tensioactivos de 9 a 13 carbonos en su cadena carbonada, siendo ΔH_{elect} invariante e igual a 1 kJmol^{-1} . El valor positivo y pequeño de la entalpía se explicó de acuerdo con la posibilidad de un recubrimiento desordenado de las cadenas de tensioactivo en torno a la superficie del polímero.

A partir de las diferentes contribuciones a la energía libre total y a la entalpía libre se determinó la correspondiente contribución entrópica. La componente hidrofóbica de la entropía ($-T\Delta S_{hidrof}$) resultó ser positiva y prácticamente igual en magnitud al valor de la energía libre total correspondiente, ya que la componente entálpica, como se vió anteriormente, es prácticamente nula. El valor de la componente electrostática fue $\Delta S_{elect} = 11.9 \text{ J/molK}$. Estos resultados indican que la reacción estaba controlada

enteramente por la componente entrópica, aumentando la componente hidrofóbica de ésta al aumentar la cadena carbonada del tensioactivo.

La dependencia de los parámetros termodinámicos con la concentración de sal se determinó para el tensioactivo de 12 C, DTAB, y el correspondiente de 11 C, encontrándose un fuerte decrecimiento de la constante de asociación del proceso global al aumentar la concentración salina. La contribución entálpica a la energía libre total no parece estar afectada por la concentración salina. Por tanto, la disminución en la constante de asociación estuvo marcada, fundamentalmente, por la componente entrópica.

Posteriormente, De Min Zhu y colaboradores^{34d} presentaron un estudio termodinámico similar al de Matulis, sobre la interacción de plásmidos de ADN (6.4 Kb) con diferentes tensioactivos catiónicos: CPC (cloruro de cetilpiridinio), CTAC (cloruro de cetiltrimetilamonio), BAK₁₂ (Cloruro de benzildimetildodecilamonio) y cloruro de benzildimetiltetradecilamonio. Sus estudios revelaron, por primera vez, por diferentes técnicas analíticas, como la espectroscopía de UV-vis, calorimetría, medidas de dispersión de la luz polarizada y medidas de tensión superficial, la existencia de una cac (concentración de agregación crítica) por debajo de la cual la interacción ADN-tensioactivo no era detectable. Estas evidencias mostraron que las interacciones electrostáticas entre moléculas de ADN y tensioactivo, durante la formación del complejo, podían ser precedidas de una agregación de los monómeros de tensioactivo en torno a la superficie del ADN a través de interacciones hidrofóbicas. El tratamiento de los datos termodinámicos se realizó en base al modelo de pseudofase de separación micelar³⁷, según el cual la energía libre de Gibbs de micelización del tensioactivo puede calcularse como sigue:

$$\Delta G^0 = RT\ln(\text{cmc}) + \gamma RT\ln(a_{\text{con}}) \quad (30)$$

donde γ es la fracción molar de contraiones de tensioactivo en la micela, y a_{con} es la actividad de los contraiones. Dada la similitud de la cac y de la cmc en términos de agregación de moléculas de tensioactivo y la asociación de contraiones, la energía libre de asociación del tensioactivo a la cac, ΔG^0_{T} , puede aproximarse como:

$$\Delta G^0_{\text{T}} = RT(\ln(\text{cac}) + \beta \ln(a_{\text{PO}^{4-}_{\text{ADN}}}) + \gamma \ln(a_{\text{Cl}^-})) \quad (31)$$

$a_{\text{PO}_4^-_{\text{ADN}}}$, es la actividad de los grupos fosfato del ADN; γ es la razón molar de Cl^- en el complejo de tensioactivo, y a_{Cl^-} es la actividad de los iones cloruro en la disolución (“bulk”). La estequiometría del complejo ADN-tensioactivo, β , se calculó a partir del calor de disolución medido por la técnica calorimétrica.

$$\beta = \frac{\Delta H_T^0}{\Delta H_{\text{ADN}}^0} \quad (32)$$

siendo ΔH_T^0 y ΔH_{ADN}^0 , las entalpías estándar de reacción. La interacción del tensioactivo, T, y los grupos fosfato del ADN se expresó como:



con $\Delta H_T^0 = \Delta H_T / (C_T - \text{cac})V$ y ; $\Delta H_{\text{ADN}}^0 = \Delta H_{\text{ADN}} / C_{\text{PO}_4^-_{\text{ADN}}}V$. En estas ecuaciones, ΔH_{ADN} es la entalpía neta de reacción cuando todo el ADN que había inicialmente en la célula de calorimetría se encuentra formando complejo con la molécula de tensioactivo, T. ΔH_T es la entalpía correspondiente cuando todo el tensioactivo inicial en la célula de medida, está formando complejo con el ADN. $C_{\text{PO}_4^-_{\text{ADN}}}$, es la concentración de grupos fosfato del ADN ($C_{\text{PO}_4^-_{\text{ADN}}}(\text{mM}) = 3C_{\text{ADN}}(\text{mg/ml})$); C_T , es la concentración de tensioactivo, y V el volumen de la muestra en la célula de calorimetría. Se comprobó que la cac de los tensioactivos no se modificaba en presencia de diferentes concentraciones de ADN. Este resultado está de acuerdo con la idea de que la molécula de ADN se comporta como una pseudofase en la interacción con el tensioactivo y la $a_{\text{PO}_4^-_{\text{ADN}}}$ puede tomarse como la unidad. En cambio, la actividad de los iones cloruro en la disolución es siempre mayor que la cac en presencia de NaCl (el contraíón de los tensioactivos es Cl^-), ya que estos iones son reemplazados fuertemente por los grupos fosfato del ADN. La fracción molar de contraíones de tensioactivo en la micela en presencia de ADN, γ es un número $\ll 1$. Teniendo en cuenta estas consideraciones, la ecuación (31) queda simplificada en la siguiente expresión:

$$\Delta G_T^0 = RT \ln(\text{cac}) \quad (34)$$

A fuerza iónica 150 mM, los valores de la energía libre total de la interacción ADN-tensioactivo variaron en el rango de -18.6 kJmol^{-1} para el BAK12 hasta -25.1 kJmol^{-1}

para el CPC. Respecto a la contribución entálpica, se encontraron valores positivos y pequeños para todos los tensioactivos que variaron desde 1.89 kJmol⁻¹ para el CTAC, hasta 2.59 kJmol⁻¹ para CPC. Los valores de entropía correspondiente variaron desde 69.1 JK⁻¹mol⁻¹ para el BAK12 hasta 92.9 JK⁻¹mol⁻¹ para el CPC. Estos resultados ponen de manifiesto, una vez más, que la interacción ADN-tensioactivo está controlada por el factor entrópico, ya que las interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante en la formación del complejo.

En el caso del tensioactivo BAK12, se llevó a cabo también un estudio del efecto salino, tanto en los parámetros termodinámicos de equilibrio como en el valor de la cac y la cmc en presencia de ADN. Los valores de entalpía y entropía de interacción se hacen más positivos al aumentar la fuerza iónica de la disolución, siendo el aumento entrópico mucho más marcado. Como explicación a este hecho, se apuntó a que el aumento entrópico era inducido por la disociación de moléculas de agua de hidratación del ADN y del tensioactivo, siendo este efecto dominante en la interacción.

Nan-Jiang y colaboradores^{34b}, pusieron de manifiesto la fuerte dependencia de la estructura del tensioactivo en la termodinámica de interacción con ADN, mediante el estudio de la interacción de tensioactivos géminis del tipo $[C_mH_{2m+1}(CH_3)_2N(CH_2)_6N(CH_3)_2C_nH_{2n+1}]Br_2$, por calorimetría. Los autores determinaron la energía libre, entalpía y entropía asociadas al proceso de agregación de los tensioactivos en presencia de ADN, encontrando una correlación entre el grado de disimetría del tensioactivo m/n , y los parámetros termodinámicos. Este último fue atribuido a un aumento de las interacciones hidrofóbicas del tensioactivo al aumentar la relación m/n .

Cinética de la interacción ADN-tensioactivo:

A pesar de que existen múltiples estudios en la literatura sobre la termodinámica de interacción de tensioactivos catiónicos con ADN^{15-17,30,34}, hasta ahora los aspectos cinéticos han sido relativamente poco explorados.³⁸ Estos estudios son importantes porque la eliminación de ADN de los vectores, que tiene implicaciones cinéticas, es uno de los parámetros fundamentales que controla los procesos de transferencia génica³⁹. Los únicos estudios, hasta la fecha, sobre la cinética de la unión de tensioactivos al ADN se han llevado a cabo empleando electrodos selectivos de membrana. Destaca, a este respecto, el estudio de Maulik y colaboradores,³⁸ sobre la cinética de interacción

del CTAB y el ADN en agua y en presencia de distintas concentraciones de NaCl. Los autores calcularon el número de moles de tensioactivo enlazado por mol de macromolécula, Γ_a en función del tiempo. Estos valores son después ajustados a una ecuación triexponencial, de la forma:

$$\Gamma_a = \Gamma_a^e - \Gamma_a^1 e^{-k_1 t} - \Gamma_a^2 e^{-k_2 t} - \Gamma_a^3 e^{-k_3 t} \quad (35)$$

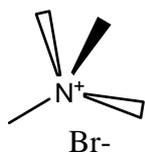
Los autores sugieren un proceso cinético irreversible en 3 etapas sucesivas con constantes de velocidad que variaron en el orden $k_1 > k_2 > k_3$ (aunque también advierten que es posible ajustar los datos experimentales a un modelo en 2 etapas, con la constante del tercer paso, $k_3 = 0$). Los valores de las constantes cinéticas fueron determinados, directamente, a partir del inverso de los tiempos de relajación, suponiendo que el mecanismo de interacción del ADN con el CTAB se daba en tres etapas irreversibles. No se llevó a cabo, sin embargo, un estudio de la variación de los tiempos de relajación con la concentración de ADN, necesario para una determinación adecuada del mecanismo de reacción. De acuerdo con esto, hemos considerado conveniente realizar un estudio más profundo sobre la termodinámica y la cinética de interacción del ADN con tensioactivos catiónicos de amonio cuaternario.

2.2. Materiales y Métodos.

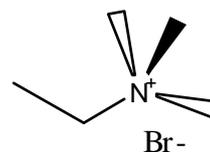
2.2.1 Materiales.

2.2.1.1. Tensioactivos y sales.

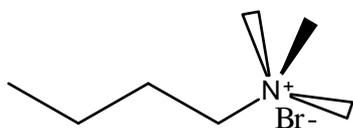
La estructura química de los tensioactivos empleados en este capítulo de la tesis aparece a continuación:



$\text{N}(\text{CH}_3)_4^+ \text{Br}^-$ (Bromuro de tetrametilamonio)

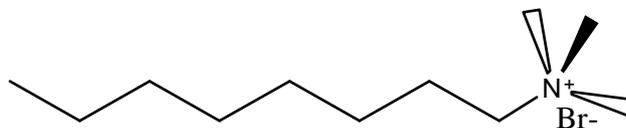


$\text{C}_2\text{H}_5\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \text{Br}^-$ (Bromuro de etiltrimetilamonio)



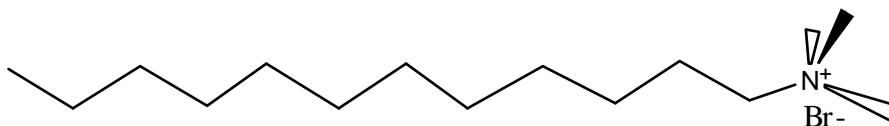
$\text{C}_4\text{H}_9\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \text{Br}^-$

(Bromuro de butiltrimetilamonio)

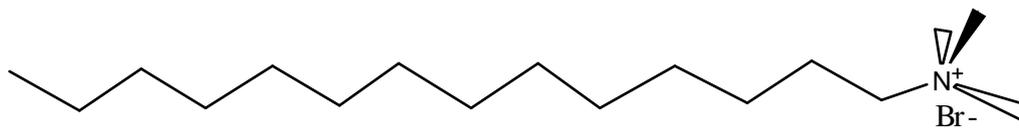


$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \text{Br}^-$

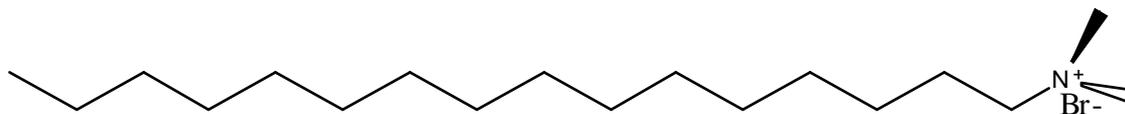
(Bromuro de octiltrimetilamonio)



DTAB (Bromuro de dodeciltrimetilamonio)



TTAB (Bromuro de tetradeciltrimetil amonio)



CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetil amonio)

Las sales de amonio cuaternario $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ y $\text{C}_4\text{H}_9\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ se prepararon y purificaron como se indica en las referencias 40 y 41, respectivamente. El contraión de los tensioactivos fue siempre Br^- . El CTAB se obtuvo de Fluka. Los demás tensioactivos y sales se obtuvieron de Sigma-Aldrich y se usaron sin purificación adicional.

2.2.1.2. Sonda.

La estructura química de la sonda empleada en este capítulo de la tesis aparece en la siguiente figura:



1-pirenocarboxialdehido

El 1-Pirenocarboxialdehido (1-PyCHO) fue obtenido de Sigma-Aldrich. Las disoluciones madres de 1-PyCHO fueron preparadas disolviendo una cantidad pesada del sólido en alcohol puro y manteniéndola en la oscuridad. Las disoluciones de trabajo fueron preparadas por dilución con agua destilada de conductividad menor que 10^{-6} Sm^{-1} , hasta alcanzar un porcentaje en peso de 8% de etanol y una concentración de 1-PyCHO de $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ en todas las muestras.

2.2.1.3. ADN.

El ADN de hígado de ternera, ADN-CT (sal sódica liofilizada, altamente polimerizado) fue obtenido de Pharmacia Biotech y disuelto en agua destilada de conductividad menor que 10^{-6} Sm^{-1} . Las disoluciones madre fueron estandarizadas espectrofotométricamente, usando para el coeficiente de extinción el valor de $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 258 nm (en tampón cacodilato, $[\text{NaCl}] = 0.1 \text{ M}$, $[\text{cacodilato sódico}] = 0.01 \text{ M}$). Este valor de ϵ , proporciona la concentración de ADN expresada en nucleótidos o grupos fosfato.⁴²

2.2.1.4. Otros reactivos empleados en los experimentos cinéticos.

El cloruro de polivinilo de alto peso molecular (PVC) y el tetrahidrofurano (THF), se obtuvieron de Fluka. El plastificante, dioctilftalato, se obtuvo de Aldrich, Milwaukee, WI. NaCl y el tetrafenilborato de sodio de Merck, Darmstadt, Alemania. Todos estos reactivos se usaron tal como fueron suministrados por las respectivas casas comerciales.

2.2.2. Métodos.

El estudio de la termodinámica y de la cinética, y mecanismos de interacción ADN-tensioactivo, ha requerido el empleo de diferentes técnicas experimentales que se describen a continuación.

2.2.2.1 Espectroscopía de fluorescencia.

Las medidas de fluorescencia fueron llevadas a cabo mediante un espectrofluorímetro Hitachi f-2500, conectado a un ordenador para la lectura y almacenamiento de los espectros, a 298.2 K. Las medidas de intensidad de emisión fueron realizadas a una concentración de sonda [1-PyCHO] = $5 \cdot 10^{-7}$ M. La longitud de onda de excitación fue 356 nm, mientras que la emisión se registró a 466 nm. Se comprobó que los resultados eran independientes de la longitud de onda de excitación en el rango de 300 a 425 nm. Las concentraciones de ADN empleadas en cada titulación, a cada concentración de tensioactivo, variaron desde 10^{-5} M a 10^{-3} M. Las concentraciones de tensioactivos empleadas se indican en la Tabla 1, página 127-128.

2.2.2.2. Medidas de solubilidad.

Las medidas de solubilidad de la sonda 1-PyCHO fueron realizadas agitando un exceso de sólido en la disolución de concentración de sal o de tensioactivo apropiada, en un baño termostatzado (298.2 K). Después de esperar un tiempo largo, de 24 a 48 horas, para que el sólido alcanzara el nivel de saturación, se extrajo una alícuota de la disolución saturada, usando una pipeta pre-termostatzada, a la temperatura de trabajo y la disolución fue diluida hasta la cantidad necesaria en el mismo medio. Las concentraciones fueron determinadas espectrofotométricamente, haciendo uso de una recta de calibrado previa. Las solubilidades correspondientes a las distintas concentraciones de tensioactivos, se muestran en la Tabla 2, página 130.

2.2.2.3. Medidas de viscosidad.

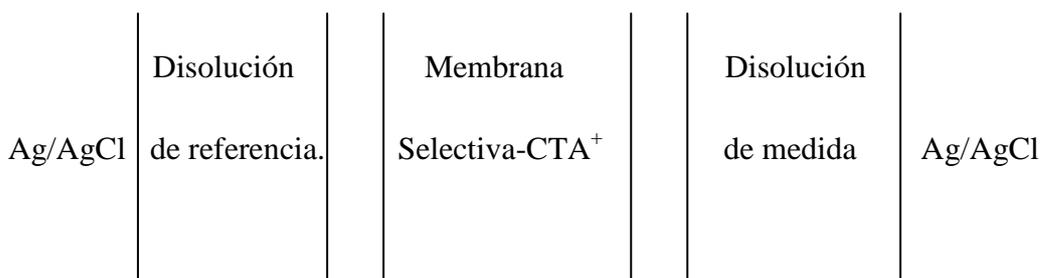
Las medidas de viscosidad fueron realizadas empleando un viscosímetro de Ostwald, calibrado con agua y etanol. Cada valor de viscosidad es el resultado promedio de 10 medidas. Los resultados de estos experimentos aparecen en la página 138.

2.2.2.4. Medidas cinéticas.

Para el estudio cinético de la interacción ADN-Tensioactivo, se empleó un método potenciométrico que requirió la construcción de un electrodo de membrana selectivo al catión cetiltrimetilamonio (CTA^+), empleando el par iónico CTA^+ -tetrafenilborato como material de intercambio. El complejo portador se sintetizó mezclando cantidades equimoleculares de CTAB y tetrafenilborato de sodio, en disolución. El precipitado blanco resultante del complejo se lavó repetidas veces con agua destilada, y se recrystalizó en THF.

Las membranas se prepararon siguiendo un procedimiento similar al descrito previamente por Hayakawa y colaboradores.⁴³ De esta forma, 0.350 g de PVC de alto peso molecular se pesaron en un pequeño frasco de vidrio, lavado y secado previamente con THF. Después se añadieron, lentamente, 6 ml de THF, agitando de forma continuada para disolver el PVC. En un segundo frasco de vidrio se añadieron 10 mg del par iónico (CTA^+ -Tetrafenilborato), y seguidamente se adicionó a la mezcla 1.15 g de plastificante, dioctifalato, que permite una distribución homogénea del ion selectivo en la matriz de PVC. Esta mezcla se agitó lentamente durante unos minutos para asegurar la mezcla adecuada de ambos componentes. Posteriormente, la disolución que contenía el PVC se añadió al frasco con la mezcla del plastificante y el par iónico, manteniendo la mezcla resultante en agitación durante unos minutos. Una vez homogeneizada la mezcla, se traslada a una placa de Petri, colocando un papel de filtro encima de la placa, para permitir una evaporación lenta y controlada del disolvente, THF, y evitar la exposición directa a la luz. El THF se dejó evaporar entre 48-72 horas, quedando la membrana lista para ser usada. Estas membranas fueron colocadas en el extremo de un tubo de PVC, empleando una pasta de PVC y THF como adhesivo. La membrana se acondicionó durante 3 - 4 horas con la disolución de CTAB de referencia antes de usarse (10^{-3} M conteniendo 0.01 M NaCl).

El esquema básico de la célula electroquímica, empleada en las medidas cinéticas, está representado en el Esquema I:

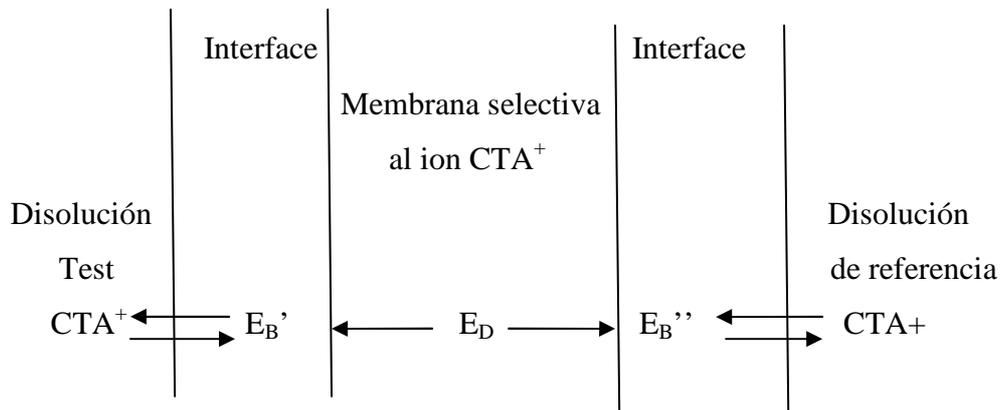


Esquema I

Los puentes salinos empleados fueron preparados en gel de agar-agar, saturados en KCl. La fuerza electromotriz (emf) del sistema se midió con un amplificador diferencial de alta impedancia, dispositivo construido en nuestro laboratorio usando un INA 116 Ultra Low Input Bias Current Amplifier seguido de una unidad de filtro pasabajo Sallen & Key ($n = 4$, $f_c = 15$ Hz (-3db)). La estabilidad de las lecturas fue de 0.1 mV.

La respuesta fue monitorizada con la ayuda de un voltímetro, PROTEK 6800 DMM, conectado a un ordenador a través de una interface RS232.

Las membranas para electrodos selectivos se basan en la incorporación de un ion intercambiador, capaz de unirse al ion de interés, dentro de una matriz polimérica inerte de PVC. El potencial que se desarrolla a través de la membrana es función de la actividad del ión CTA^+ en la disolución de medida.



Esquema II

El potencial desarrollado a través de la membrana puede simplificarse en 3 componentes: dos de ellas son los potenciales frontera, E_B' y E_B'' ("boundary potentials"), desarrollados en la interface entre la disolución de medida y la disolución de referencia y la membrana selectiva, respectivamente. El tercer potencial es el potencial de difusión del ion a través de la membrana, E_D . La localización de estos potenciales se describe en el esquema II.

Los potenciales frontera vienen dados por las expresiones:

$$E'_B = \frac{RT}{Z_{CTA^+} F} \ln \frac{k_{CTA^+} a'_{CTA^+}}{C'_{CTA^+}} \quad E''_B = \frac{RT}{Z_{CTA^+} F} \ln \frac{k_{CTA^+} a''_{CTA^+}}{C''_{CTA^+}} \quad (1)$$

donde a'_{CTA^+} y a''_{CTA^+} , son las actividades del ion CTA^+ en las disoluciones de medida y de referencia, respectivamente. C'_{CTA^+} y C''_{CTA^+} son las concentraciones de los iones en la interface de la membrana que está en contacto con la disolución de medida y de referencia; y k_{CTA^+} es una constante que describe la distribución del ion, entre la disolución y la membrana selectiva al ión. Suponiendo que la diferencia de potencial entre la membrana selectiva y la disolución de referencia (E''_B) y el potencial de difusión E_D son constantes, el potencial global estaría gobernado por la variación en el potencial entre la membrana selectiva y la disolución de medida E'_B . Además, si la concentración C'_{CTA^+} en la interface se supone constante, entonces, la f.e.m. de la pila, E , vendría dada por la expresión:

$$E = E^* + 2.303 \frac{RT}{Z_{\text{CTA}^+} F} \log_{10} a_{\text{CTA}^+} \quad (2)$$

El cociente $2.303RT/F$ tiene un valor teórico de 59.1 mV a 298 K. El término E^* es una constante que incluye la suma de todos los términos invariantes en el sistema. Esta ecuación muestra que si una membrana es permeable a una especie iónica de forma específica, la representación de la fuerza electromotriz, E (e.m.f), en función del logaritmo de la actividad del ion en la disolución de medida debe ser lineal y con una pendiente igual a 59.1 mV a 25°C. Si no es así, podría deberse a que otros iones interfirieran en la medida de la f.e.m. En nuestro caso, la membrana construida tuvo siempre una respuesta nernstiana a las concentraciones de trabajo de CTA^+ , con pendientes en el rango de entre -0.057 a -0.060 V, descartando de esta forma la existencia de iones interferentes en la medida del potencial.

Las medidas de calibrado de los electrodos se consideraron válidas durante un solo día. Todos los experimentos cinéticos fueron realizados por duplicado y a una temperatura de 298.2 ± 0.1 K, a una concentración inicial fija de tensioactivo y sal, y a diferentes concentraciones de ADN, variando esta última en el intervalo de 5×10^{-5} a 1×10^{-3} M. Se encontró que la variación de la concentración de CTA^+ libre en el transcurso del tiempo fue de carácter biexponencial. Estudios cinéticos preliminares de este sistema a una concentración fija de ADN (5×10^{-4} M) revelaron que los tiempos de relajación permanecían independientes de la concentración de CTAB, dentro de los límites del error experimental, en el rango de concentraciones de 7.5×10^{-6} a 5×10^{-5} M (véase Figura 1). Esto implica que no existen efectos de cooperatividad en la cinética de reacción, porque en presencia de estos efectos, las constantes de equilibrio ADN-

tensioactivo (y por tanto las constantes cinéticas correspondientes) serían dependientes de la relación de concentraciones ADN/Tensioactivo.⁴⁴

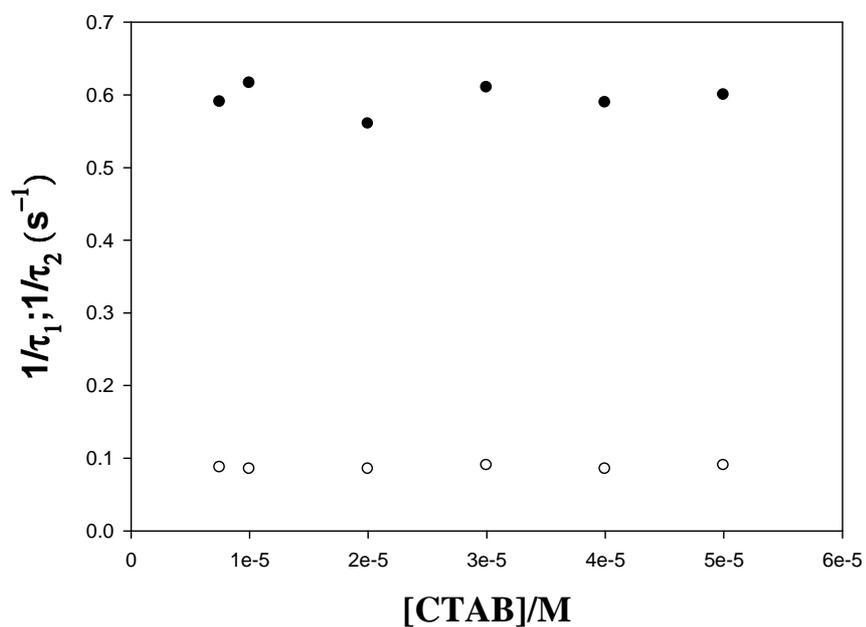


Figura 1. Dependencia del recíproco de los tiempos de relajación $1/\tau_1$ (●) y $1/\tau_2$ (○), con la concentración de CTAB. $[\text{NaCl}] = 0 \text{ M}$, $[\text{ADN}] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$, $T = 298.2 \text{ K}$.

2.3. Resultados y Discusión.

2.3.1. Estudio termodinámico de la Interacción ADN-Tensioactivo.

La interacción de un polielectrolito como el ADN con un tensioactivo de carga opuesta implica, generalmente, la participación de interacciones electrostáticas y no electrostáticas. Entre estas últimas, resulta particularmente importante la interacción que existe entre las colas de los tensioactivos y las porciones hidrofóbicas de polímero, ya que estas producen cambios sustanciales en la estructura del polímero. Aunque, como es sabido, pequeños cationes mono y bivalentes, no son capaces, por sí solos, de condensar el ADN, los cationes monovalentes de alquilamonio cuando poseen cadenas alifáticas lo suficientemente largas son capaces de hacerlo de forma eficiente.^{15a,34a,34d} En el caso del ADN, la complejación con tensioactivos catiónicos ha recibido un interés particular debido a la relación de estos procesos con la purificación de la macromolécula, y en especial en relación a la transferencia de genes⁴⁵ y aplicaciones en terapia genética.⁴⁶ La mayoría de los estudios realizados con sistemas ADN/tensioactivo se han llevado a cabo para determinar la influencia de los tensioactivos en los cambios conformacionales y en la estabilidad del ADN.^{15a,16,47} Cuantificar las constantes termodinámicas de interacción ADN/tensioactivo, nos ha parecido de interés en relación con el establecimiento de la contribuciones de grupo. Estas son importantes, a su vez, debido a que son fundamentales en relación con el diseño de ligandos capaces de realizar funciones específicas.⁴⁸

Como contribución a este campo, en este capítulo de la tesis se presenta un procedimiento para medir la energía libre de asociación ADN/tensioactivo. Este procedimiento se empleó para diferentes tensioactivos del tipo $\text{RN}(\text{CH}_3)_3^+$ ($\text{R} = \text{CH}_3$, C_2H_5 , C_4H_9 , C_8H_{17} , $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$ (DTAB), $\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ (TTAB), $\text{C}_{16}\text{H}_{33}$ (CTAB)) con el objetivo de determinar las contribuciones electrostáticas y no electrostáticas a la energía libre de asociación del tensioactivo al ADN. Por otro lado, fue nuestra intención examinar si existía alguna relación entre la energía libre ADN/tensioactivo y la contribución de grupo CH_2 al variar la longitud de la cadena carbonada del tensioactivo, manteniendo la misma cabeza polar. Nuestro método se basa en el uso de la sonda fluorescente 1-pirenocarboxialdehído, cuya asociación con el ADN había sido estudiada previamente en presencia de sales y codisolventes. Como se ha indicado en la sección anterior, y en

estudios precedentes, el 1-PyCHO es una sonda apropiada para verificar los cambios de polaridad en el medio.⁴⁹ En presencia de tensioactivos, como consecuencia de la asociación de estos con el ADN, y de los cambios estructurales que estos provocan sobre la macromolécula, la energía libre de asociación del 1-PyCHO al ADN sufre cambios. La magnitud de estos cambios depende del grado de asociación de los tensioactivos con el ADN. Esta circunstancia nos permite medir la energía libre de asociación de los tensioactivos al ADN a partir de los cambios en la energía libre de asociación ADN/1-PyCHO. Este procedimiento está relacionado con uno ya empleado por Bhattacharya^{30a} y Petrov^{30c}, aunque estos autores no llegaron a cuantificar la energía libre de asociación ADN/tensioactivo.

El equilibrio de interacción ADN-tensioactivo fue estudiado siguiendo los cambios en la intensidad de emisión de la sonda 1-PyCHO al variar la concentración de ADN y de tensioactivo. El pireno y los derivados del pireno emiten una fluorescencia menor cuando están enlazados al polinucleótido, debido al proceso de intercalación de éstos entre las bases del ADN.⁵⁰ Este comportamiento fue verificado en presencia de sales y alcoholes, en el primer capítulo de la tesis. Un comportamiento similar se observa también cuando los tensioactivos son añadidos a la disolución, como puede verse en la Figura 2, en presencia de DTAB.

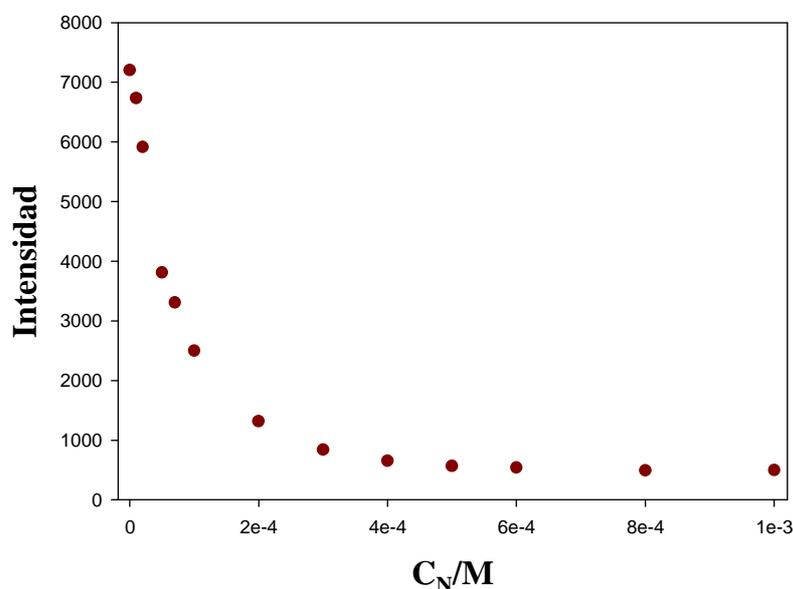


Figura 2. Intensidad de emisión del 1-PyCHO frente a la concentración de ADN, C_N . [DTAB] = 5×10^{-5} M, [1-PyCHO] = 5×10^{-7} M, al 8% de etanol.

Para el estudio de la interacción ADN-tensioactivo, cada experimento fue realizado a una concentración fija de 1-PyCHO ($C_T = 5 \times 10^{-7} \text{M}$) y a una concentración dada de tensioactivo, variando la concentración de ADN (C_N) en el rango de $5 \times 10^{-6} \text{M}$ a $1 \times 10^{-3} \text{M}$. En este rango, a concentraciones bajas de ADN, no se trabaja a bajos cocientes $[\text{ADN}/1\text{-PyCHO}]/C_N$. En estas circunstancias, no trabajamos en condiciones de asociación ADN/1-PyCHO aislada (véase Figura 3), por lo que los datos termodinámicos fueron ajustados al modelo de sigmoidea, teniendo en cuenta la dependencia de la constante termodinámica con la concentración de ADN. Esta dependencia se debe a los efectos de interacción entre sitios de unión, que varía con el grado de saturación. De este modo, al realizar el ajuste de los datos experimentales al modelo de Hildebrand-Benesi, la representación gráfica de $C_N C_T / \Delta F + \Delta F / \Delta \phi^2$ en función de $(C_N + C_T)$, produce rectas como las de la Figura 3.

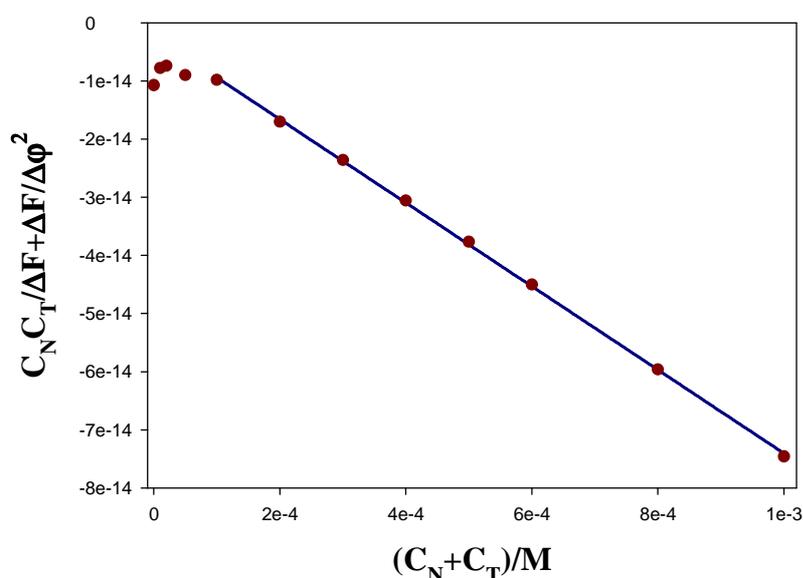


Figura 3. Análisis de la valoración fluorimétrica entre ADN y 1-PyCHO según la ecuación de Hildebrand-Benesi: $C_T = 5 \cdot 10^{-7} \text{M}$; $[\text{DTAB}] = 5 \times 10^{-5} \text{M}$; $T = 298.2 \text{ K}$; $\lambda_{\text{exc}} = 356 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 468 \text{ nm}$.

La Figura 3 muestra desviaciones de la linealidad a concentraciones bajas de ADN (C_N). Estas desviaciones de la linealidad son achacables a un proceso de *superposición de sitios* en condiciones próximas a la saturación del polímero. La tendencia del ligando a intercalarse entre los pares de bases del ADN, modifica la estructura secundaria del ADN, del lugar de reacción del polímero, incapacitando los lugares adyacentes para

recibir nuevas moléculas de 1-PyCHO, y por tanto haciendo con ello más difícil la entrada de nuevas moléculas de 1-pirenocarboxialdehído.

En todos los casos se encontró que la intensidad, I, podía ajustarse a la ecuación que describe el modelo de sigmoidea:

$$I = \frac{I_0 + I_{ADN} K[ADN]}{1 + K[ADN]} \quad (a)$$

$$K = K_{max} \frac{e^t}{1 + e^t} \quad (b) \quad (1)$$

$$t = \frac{[ADN] - h}{j} \quad (c)$$

Una descripción detallada de cómo se realizaron los ajustes de los datos termodinámicos a la ecuación 1 se encuentra en el Apéndice I de la tesis. Así mismo, los valores de los parámetros de ajuste a la ec. 1 se recogen en el Apéndice II.

La Tabla 1 proporciona los valores de Kmax correspondientes al ajuste de los datos experimentales de la intensidad de fluorescencia de la sonda, I, en función de la concentración de ADN, a la ecuación 1. A partir de estos valores, se obtiene los correspondientes de ΔG_{max} :

$$\Delta G_{max} = -RT \ln K_{max} \quad (2)$$

Tabla 1. Valores de K_{\max} y ΔG_{\max} para la asociación del 1-pirenocarboxialdehído con ADN correspondientes a diferentes concentraciones de tensioactivos y sales de amonio cuaternarias.

$10^5[\text{CH}_3\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	$10^{-3}K_{\max}/\text{M}$	$\Delta G_{\max}/\text{kJmol}^{-1}$
0	177	-29.94
1	170	-29.84
10	158	-29.66
100	122	-29.02
400	80	-27.97
1000	59	-27.22
$10^5[\text{C}_2\text{H}_5\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	$10^{-3}K_{\max}/\text{M}$	$\Delta G_{\max}/\text{kJmol}^{-1}$
0	177	-29.94
2	165	-29.76
20	151	-29.55
100	98	-28.47
200	88	-28.21
500	77	-27.88
$10^5[\text{C}_4\text{H}_9\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	$10^{-3}K_{\max}/\text{M}$	$\Delta G_{\max}/\text{kJmol}^{-1}$
0	177	-29.94
2	200	-30.24
5	230	-30.59
7	265	-30.94
10	280	-31.08

$10^5[\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	$10^{-3}\text{K}_{\text{max}}/\text{M}$	$\Delta\text{G}_{\text{max}}/\text{kJmol}^{-1}$
0	177	-29.94
2	208	-30.34
5	245	-30.74
7	260	-30.89
10	280	-31.08
$10^5[\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	$10^{-3}\text{K}_{\text{max}}/\text{M}$	$\Delta\text{G}_{\text{max}}/\text{kJmol}^{-1}$
0.0	177	-29.94
2.0	210	-30.36
3.5	245	-30.74
5.0	260	-30.89
6.0	269	-30.98
7.0	272	-31.00
$10^5[\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	$10^{-3}\text{K}_{\text{max}}/\text{M}$	$\Delta\text{G}_{\text{max}}/\text{kJmol}^{-1}$
0.0	177	-29.94
1.0	216	-30.43
2.0	233	-30.62
3.0	253	-30.82
4.0	265	-30.94
5.0	270	-30.98
$10^5[\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	$10^{-3}\text{K}_{\text{max}}/\text{M}$	$\Delta\text{G}_{\text{max}}/\text{kJmol}^{-1}$
0.0	177	-29.94
1.1	215	-30.42
1.7	235	-30.64
2.2	255	-30.84
3.5	265	-30.94
5.0	275	-31.03

Los valores de ΔG_{\max} que aparecen en la Tabla 1, representan la afinidad del 1-pirenocarboxialdehido por la macromolécula de ADN, *relativa a las disoluciones en las que el 1-PyCHO libre está presente*. Obviamente, ΔG_{\max} no pueden compararse, directamente entre sí, debido a que estas disoluciones son diferentes (la concentración de tensioactivo o sal de amonio cuaternario en el medio es constante en cada titulación y proporciona un valor de K_{\max} y de ΔG_{\max} para cada concentración de tensioactivo o sal empleada). Sin embargo, cuando comparamos las distintas constantes de equilibrio 1-PyCHO/ADN, éstas corresponden a la afinidad de la sonda por el ADN en diferentes medios, en los que están presentes diferentes concentraciones de sal o tensioactivo. No obstante, esto puede corregirse teniendo en cuenta como varía el coeficiente de actividad de la sonda en estos medios. Las medidas de solubilidad de la sonda, 1-PyCHO, a cada concentración de tensioactivo o sal empleada en los experimentos, que aparecen en la Tabla 2, nos permiten comparar la diferente afinidad del 1-PyCHO por el ADN (ΔG_{\max}) en presencia de diferentes concentraciones de tensioactivos o sales de amonio cuaternarias. Por tanto, si S_0 es la solubilidad del 1-PyCHO en ausencia de tensioactivo (o sal), y S es la solubilidad a una concentración de tensioactivo (o sal) dada, esta energía libre ΔG , se relaciona con el coeficiente de actividad del 1-PyCHO, y este último con la solubilidad, teniendo en cuenta la siguiente relación:

$$\Delta G = RT \ln \gamma_{\text{Py}} = RT \ln \frac{S_0}{S} \quad (3)$$

De esta forma, los valores de $\Delta G_{\max}^{\text{corr}}$ que aparecen en la Tabla 3 se obtienen como:

$$\Delta G_{\max}^{\text{corr}} = \Delta G_{\max} - RT \ln \frac{S_0}{S} \quad (4)$$

Tabla 2. Valores de solubilidad del 1-PyCHO correspondientes a diferentes concentraciones de tensioactivos y sales de amonio cuaternarias.

$10^5[\text{CH}_3\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	10^6 Solubilidad/M	$10^5[\text{C}_2\text{H}_5\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	10^6 Solubilidad/M
0	1.87	0	1.87
1	1.92	2	2.02
10	1.92	20	2.05
100	1.94	100	2.19
400	2.00	200	2.37
1000	2.13	500	2.89
10000	4.00	1000	3.77
$10^5[\text{C}_4\text{H}_9\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	10^6 Solubilidad/M	$10^5[\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	10^6 Solubilidad/M
0	1.87	0	1.87
2	2.19	2	2.32
5	2.48	5	2.93
7	2.68	7	3.34
10	2.97	10	3.95
$10^5[\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	10^6 Solubilidad/M	$10^5[\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	10^6 Solubilidad/M
0.0	1.87	0	1.87
2.0	2.51	1	2.10
3.5	2.99	2	2.33
5.0	3.46	3	2.57
6.0	3.78	4	2.80
7.0	4.09	5	3.04
$10^5[\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	10^6 Solubilidad/M		
0.0	1.87		
1.1	2.23		
1.7	2.44		
2.2	2.53		
3.5	2.89		
5.0	3.31		

Tabla 3. Valores de energía libre corregida para la asociación del 1-PyCHO con ADN, en presencia de diferentes concentraciones de tensioactivos y sales de amonio cuaternarias.

$10^5[\text{CH}_3\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	$\Delta G_{\text{max}}^{\text{corr}}/\text{kJmol}^{-1}$	$10^5[\text{C}_2\text{H}_5\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	$\Delta G_{\text{max}}^{\text{corr}}/\text{kJmol}^{-1}$
0	-29.94	0	-29.94
1	-29.92	2	-29.84
10	-29.81	20	-29.54
100	-29.00	100	-28.80
400	-28.03	200	-28.43
1000	-27.57	500	-28.23
$10^5[\text{C}_4\text{H}_9\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	$\Delta G_{\text{max}}^{\text{corr}}/\text{kJmol}^{-1}$	$10^5[\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	$\Delta G_{\text{max}}^{\text{corr}}/\text{kJmol}^{-1}$
0	-29.94	0	-29.94
2	-30.50	2	-30.82
5	-31.19	5	-31.78
7	-31.58	7	-32.27
10	-32.10	10	-32.86
$10^5[\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	$\Delta G_{\text{max}}^{\text{corr}}/\text{kJmol}^{-1}$	$10^5[\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	$\Delta G_{\text{max}}^{\text{corr}}/\text{kJmol}^{-1}$
0.0	-29.94	0.0	-29.94
2.0	-31.18	1.0	-30.73
3.5	-31.85	2.0	-31.21
5.0	-32.39	3.0	-31.61
6.0	-32.70	4.0	-31.94
7.0	-32.98	5.0	-32.21
$10^5[\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+]/\text{M}$	$\Delta G_{\text{max}}^{\text{corr}}/\text{kJmol}^{-1}$		
0.0	-29.94		
1.1	-30.93		
1.7	-31.32		
2.2	-31.51		
3.5	-32.01		
5.0	-32.47		

Un punto interesante a destacar sobre la Tabla 3, es que $\Delta G_{\max}^{\text{corr}}$ *aumenta* para $\text{RN}(\text{CH}_3)_3^+$ con $\text{R} = \text{CH}_3$ y C_2H_5 , cuando aumenta la concentración de estos iones de amonio cuaternario. Por el contrario, para $\text{RN}(\text{CH}_3)_3^+$ cuando el resto R equivale a $\text{R} = \text{C}_4\text{H}_9$, C_8H_{17} , $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$, $\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ y $\text{C}_{16}\text{H}_{33}$, $\Delta G_{\max}^{\text{corr}}$ *disminuye*, al aumentar las concentraciones de estas especies. De acuerdo con ello, puede concluirse que la cabeza de los tensioactivos, de naturaleza polar, y las colas modifican la estructura secundaria del ADN, debido a la asociación de éstas con la macromolécula. Sin embargo, esta modificación es diferente en el sentido de que las cabezas inducen un cambio en el ADN que lo hace menos eficiente que el ADN libre en disolución (en ausencia de tensioactivo) para unirse al 1-PyCHO. Las colas de los tensioactivos, por otro lado, producen un cambio en la estructura del ADN que lo hace más eficiente que el ADN en su conformación nativa para unirse al 1-PyCHO. Esta diferencia refleja el distinto carácter que tienen las interacciones de las cabezas y las colas de los tensioactivos con el ADN. Esto está de acuerdo con el hecho de que el ion, $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$, aumenta la temperatura de “melting” del ADN. Por el contrario, las cadenas hidrofóbicas de los tensioactivos disminuyen esta temperatura, siendo esta disminución tanto mayor cuanto mayor es la longitud de la cadena.⁵¹ Los efectos de los tensioactivos de cadena larga ($\text{R} \geq \text{C}_4\text{H}_9$) o de cadenas cortas ($\text{R} = \text{CH}_3$, C_2H_5) pueden interpretarse de la siguiente forma: el efecto que producen los tensioactivos, tipo $\text{RN}(\text{CH}_3)_3^+$ sobre el ADN, para cualquier R , es inducir un cambio estructural sobre la macromolécula, de forma que la estructura del ADN cambia. Este cambio sería producido por las modificaciones estructurales que producen sobre el ADN las cabezas y las colas de los tensioactivos. De acuerdo con ello, puede suponerse que existen dos tipos de ADN en disolución: ADN libre y ADN enlazado al tensioactivo. Estos dos tipos de ADN se unirán a la sonda, 1-PyCHO, con diferente afinidad. En este sentido, la energía libre corregida de unión de la sonda sería diferente para cada clase de ADN. La variación de la energía libre corregida de interacción del 1-PyCHO con el ADN, en función de la concentración de tensioactivo, puede predecirse según la siguiente ecuación (véase apéndice III):

$$\Delta G_{\max}^{\text{corr}} = \frac{\Delta G_{\max,1}^{\text{corr}} + \Delta G_{\max,2}^{\text{corr}} \frac{K_2}{K_1} K_{\text{ADN}}^{\text{T}} [\text{T}]}{1 + \frac{K_2}{K_1} K_{\text{ADN}}^{\text{T}} [\text{T}]} \quad (5)$$

En esta ecuación, ΔG_1^{corr} es la energía libre corregida de asociación del 1-PyCHO al ADN en estado 1 (libre de tensioactivo); ΔG_2^{corr} corresponde a la energía libre corregida para la unión del 1-PyCHO al ADN en estado 2, en el cual el ADN está unido al tensioactivo. K_1 y K_2 , son las constantes de equilibrio de la sonda, 1-PyCHO, al ADN libre de tensioactivo y al ADN unido al tensioactivo, respectivamente. Finalmente, $K_{\text{ADN}}^{\text{T}}$ es la constante de equilibrio de unión del tensioactivo al ADN.



Por tanto, la aplicación de este modelo a la variación de energía libre corregida 1-PyCHO/ADN, con la concentración de tensioactivo, nos permite determinar las constantes de afinidad de los diferentes tensioactivos al ADN. Nótese que esta ecuación puede simplificarse en la ecuación dada para el modelo de dos estados, en el caso particular de que la afinidad del 1-PyCHO por el ADN en el estado 1, representada por la constante de equilibrio K_1 , no sea muy diferente a la de la sonda por el estado 2, K_2 ($K_2/K_1 \sim 1$). En este caso, la ecuación 5 quedaría como:

$$\Delta G_{\text{max}}^{\text{corr}} = \frac{(\Delta G_{\text{max}}^{\text{corr}})_1 + K_{\text{ADN}}^{\text{T}} (\Delta G_{\text{max}}^{\text{corr}})_{\text{ADN}}^{\text{T}} [\text{T}]}{1 + K_{\text{ADN}}^{\text{T}} [\text{T}]} \quad (6)$$

De hecho, en primera aproximación podría suponerse válida la ecuación 6 para el ajuste de los datos de $\Delta G_{\text{max}}^{\text{corr}}$, ya que los valores de K_2/K_1 que predice la ecuación 5 están comprendidos en el intervalo de 1.00 a 1.18. El ajuste de los valores de $\Delta G_{\text{max}}^{\text{corr}}$ frente a la concentración de tensioactivo según la ecuación 5, correspondientes a los diferentes tensioactivos presentes en este estudio, del tipo $\text{RN}(\text{CH}_3)_3^+$ ($\text{R} = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_4\text{H}_9, \text{C}_8\text{H}_{17}, \text{C}_{12}\text{H}_{25}$ (DTAB), $\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ (TTAB), $\text{C}_{16}\text{H}_{33}$ (CTAB)), se muestra en las figuras 4A a 4G, respectivamente.

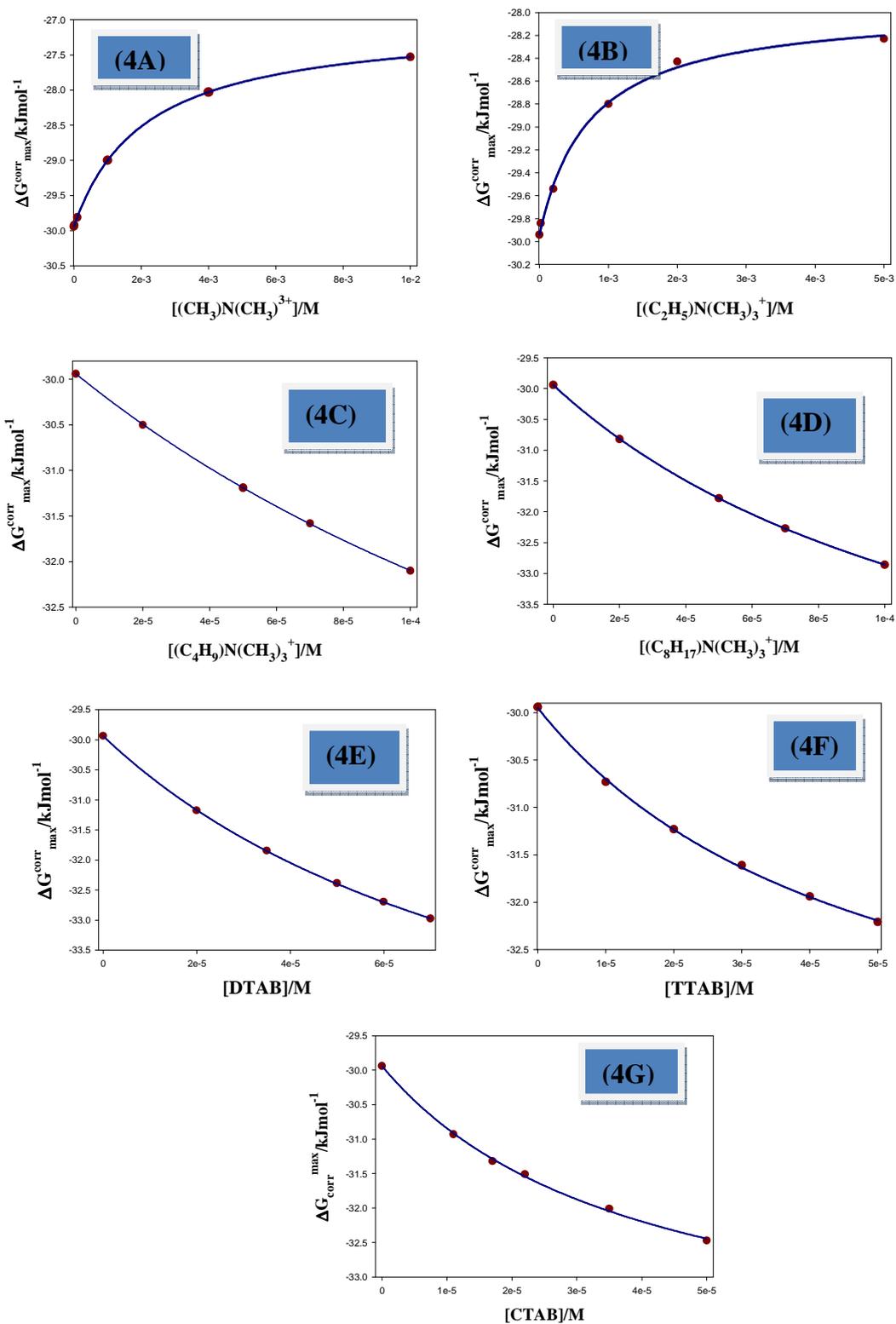


Figura 4. $\Delta G_{\max}^{\text{corr}} / \text{kJmol}^{-1}$ de la interacción del 1-PyCHO/ADN vs. $[\text{RN}(\text{CH}_3)_3]^+$. Los puntos rojos representan los datos experimentales, y la línea azul es el mejor ajuste a la ecuación 5. Las figuras de la A a la G, corresponden a los tensioactivos con $\text{R} = \text{CH}_3$, C_2H_5 , C_4H_9 , C_8H_{17} , $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$ (DTAB), $\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ (TTAB) y $\text{C}_{16}\text{H}_{33}$ (CTAB), respectivamente.

Las figuras 4A y 4B; y 4C-4G muestran que los cambios en la energía libre corregida, al variar la concentración de tensioactivo, van en sentido opuesto cuando se trata de tensioactivos de corta o larga cadena, como se mencionó previamente. Algo similar ocurría con los alcoholes a fracciones molares por debajo y por encima del mínimo dado por la fracción molar mágica, X_m . De cualquier forma, a partir de los valores de K_{ADN}^T la energía libre asociada al equilibrio ADN/T descrito por la ecuación 7, puede obtenerse como:

$$\Delta G_{ADN}^T = -RT \ln K_{ADN}^T \quad (7)$$

La Tabla 4, permite una comparación de los valores obtenidos de ΔG_{ADN}^T y de K_2/K_1 correspondientes al cociente entre la constante de equilibrio del 1-PyCHO al ADN libre (K_1) y enlazado al tensioactivo (K_2), procedentes del ajuste de los datos experimentales de ΔG_{max}^{corr} a la ecuación 5, junto con los valores obtenidos del ajuste de los datos experimentales a la ecuación 6 (suponiendo $K_2/K_1 = 1$).

Tabla 4. Valores de ΔG_{ADN}^T obtenidos del ajuste de los datos de ΔG_{max}^{corr} frente a la concentración de tensioactivo, $RN(CH_3)_3^+$, a las ecuaciones 5 y 6.

Nº Carbonos en R	$\Delta G_{ADN}^T / \text{kJmol}^{-1}$	K_2/K_1	$\Delta G_{ADN}^T / \text{kJmol}^{-1}$
1	-14.87 (a)	1.18	-15.40 (b)
2	-17.53 (a)	1.16	-17.83 (b)
4	-20.44 (a)	1.00	-20.44 (b)
8	-21.94 (a)	1.02	-21.97 (b)
12	-22.81 (a)	1.02	-22.84 (b)
14	-24.46 (a)	1.04	-24.48 (b)
16	-25.02 (a)	1.03	-24.08 (b)

(a) Datos obtenidos del ajuste de ΔG_{max}^{corr} vs. [T] a la ecuación 5.

(b) Datos obtenidos del ajuste de ΔG_{max}^{corr} vs. [T] a la ecuación 6.

La Tabla 4, muestra como los valores de energía libre, $\Delta G_{\text{ADN}}^{\text{T}}$, obtenidos por ajuste de los datos de la energía libre corregida 1-PyCHO/ADN, que aparecen en la Tabla 3, al modelo de dos estados descrito por la ec 5, están en muy buen acuerdo con aquellos obtenidos según el modelo simplificado, suponiendo que $K_1=K_2$ (ec.6), para $n \geq 4$, siendo n el número de átomos de carbono del resto R del tensioactivo. Sin embargo, el acuerdo es algo peor para tensioactivos con $n < 4$. Una representación gráfica de las energías libres ($\Delta G_{\text{ADN}}^{\text{T}}$), obtenidas por ajuste de los datos experimentales a la ec. 5, frente al número de átomos de carbono en R, aparece en la Figura 5:

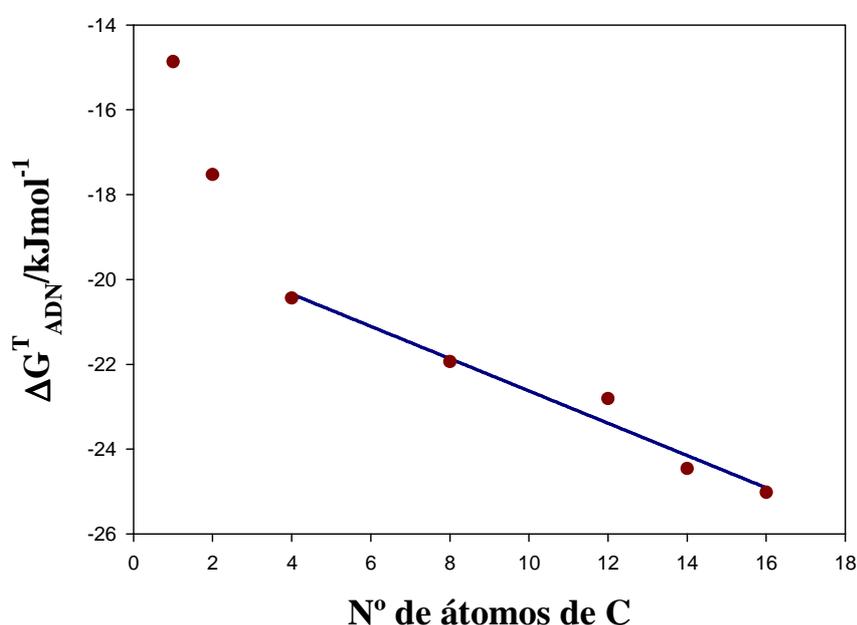


Figura 5. Energía libre, $\Delta G_{\text{ADN}}^{\text{T}}$, de la interacción ADN-Tensioactivo vs. al número de átomos de carbono de la cadena alquílica R.

A partir de la Figura 5, puede deducirse que a partir de $n \geq 4$, existe una buena correlación lineal entre la energía libre de asociación del tensioactivo al ADN y el número de átomos de carbono de la cadena. En cambio, en el caso de las sales de amonio cuaternarias de $n = 1$ y 2 , se observa que los valores de energía libre de asociación se desvían de esta correlación. Además, la intercepción ($n = 1$) de la recta correspondiente a los tensioactivos de “cadena larga” proporcionaría un valor de la energía libre para el $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ de $-19.2 \text{ kJ mol}^{-1}$. Este valor de $\Delta G_{\text{ADN}}^{\text{T}}$ es menor que

aquel que se obtiene directamente del ajuste de los datos de $\Delta G_{\max}^{\text{cor}}$ 1-PyCHO/ADN (ec. 5) para el ion tetrametilamonio, aunque no difiere demasiado de este valor, $-14.9 \text{ kJ mol}^{-1}$. Estos hechos implican que, estrictamente hablando, los efectos de las colas y las cabezas de los tensioactivos no son aditivos, aunque no están muy alejados de serlo. A partir de los datos de la Figura 5, se puede obtener, además, la contribución a la energía libre de asociación tensioactivo-ADN por cada grupo CH_2 . Esta contribución resulta ser de $-0.36 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Por otro lado, la contribución de la cabeza del tensioactivo es de $-19.2 \text{ kJ.mol}^{-1}$ (extrapolada a $n = 1$, véase Figura 5), de tal forma que la mayor contribución a la energía libre de asociación correspondería a la interacción electrostática entre la cabeza del tensioactivo y el ADN. De hecho, teniendo en cuenta la contribución de grupo a la energía libre de la interacción de las colas podría igualarse (o ser mayor) a la interacción de la cabeza polar del tensioactivo para $R \geq \text{C}_{33}\text{H}_{67}$.

Un segundo procedimiento para medir la energía libre de asociación ADN-tensioactivo, fue llevado a cabo como apoyo al procedimiento anterior basado en el uso del 1-PyCHO como sonda fluorescente. Este nuevo procedimiento se basa en el hecho de que si los tensioactivos producen cambios conformacionales en el ADN desde la forma extendida a la globular compacta, estos cambios podrían generar también un cambio en la viscosidad de la disolución que los contiene. De acuerdo con ello, se realizaron medidas de la viscosidad de disoluciones conteniendo una concentración fija de ADN, mientras se variaba la concentración de tensioactivo. Estas medidas fueron realizadas, únicamente, para el caso del CTAB. Los resultados obtenidos para una concentración de $[\text{ADN}] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$ y otra de $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, se muestran en la Figura 6. Los valores de viscosidad así obtenidos fueron ajustados a la ecuación 8, que es formalmente similar a la ec.6:

$$\eta = \frac{\eta_{\text{ADN}} + K_{\text{ADN}}^{\text{T}} \eta_{\text{ADN}}^{\text{T}} [\text{T}]}{1 + K_{\text{ADN}}^{\text{T}} [\text{T}]} \quad (8)$$

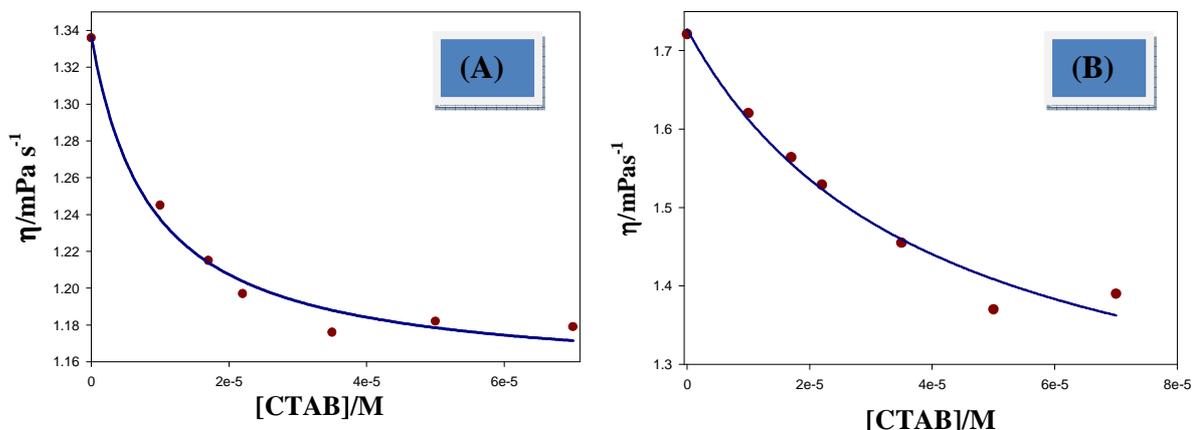


Figura 6. Viscosidades de disoluciones ADN-CTAB vs. [CTAB]. La concentración de ADN es constante en los experimentos. (A) $[\text{ADN}] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$. (B) $[\text{ADN}] = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$.

A partir de la ecuación 8, puede obtenerse la constante de equilibrio de interacción del tensioactivo al ADN, $K_{\text{ADN}}^{\text{T}}$, y a partir de esta última, la energía libre de asociación del CTAB al ADN (ec. 7). El valor promedio (correspondiente a las diferentes concentraciones de ADN empleadas) fue de $-26.4 \text{ kJ mol}^{-1}$. Este valor es muy cercano al obtenido por el procedimiento expuesto anteriormente, basado en los cambios de intensidad de fluorescencia del 1-PyCHO, que fue de $-25.0 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Como conclusión a nuestro estudio termodinámico de la interacción de ADN con tensioactivos catiónicos, puede indicarse que se ha desarrollado un procedimiento con el que ha sido posible obtener la energía libre de asociación de los diferentes tensioactivos al ADN ($\Delta G_{\text{ADN}}^{\text{T}}$). De acuerdo con los resultados obtenidos, los datos termodinámicos reflejan, de manera indirecta, que los tensioactivos y sales de amonio cuaternarias, inducen un cambio conformacional en la estructura del ADN. Estos cambios son consecuencia de las interacciones electrostáticas entre la cabeza polar y los grupos fosfato, y las no-electroestáticas de las colas con el ADN, que actúan de forma cooperativa. Estos cambios parecen ser diferentes en el caso de tensioactivos de cadena corta ($n < 4$) y de “cadena larga” ($n \geq 4$), en el sentido de que las interacciones electrostáticas de las cabezas polares producen un cambio en el ADN que lo hace menos eficiente para la unión de la sonda ($\Delta G_{\text{max}}^{\text{corr}}$ disminuye al aumentar la concentración de

tensioactivo). Por el contrario, las interacciones de las colas aumentan la afinidad de la sonda 1-PyCHO por el ADN ($\Delta G_{\text{max}}^{\text{corr}}$ aumenta, al hacerlo la concentración de tensioactivo). Además, las interacciones de las colas y las cabezas de los tensioactivos resultan aditivas para $\text{RN}(\text{CH}_3)_3^+$ con $\text{R} \geq \text{C}_4\text{H}_9$. Este hecho ha permitido separar las contribuciones de grupo para tensioactivos de cadena “larga”.

2.3.2. Estudio de la cinética de interacción ADN-tensioactivo.

El estudio sistemático de las interacciones entre tensioactivos pertenecientes a una serie homóloga del tipo alquiltrimetilamonio, $R-N(CH_3)_3$ con ADN, usando 1-PyCHO como sonda fluorescente, nos ha permitido determinar las constantes termodinámicas de interacción ADN-tensioactivo, y, al mismo tiempo, se han conseguido separar las contribuciones electrostáticas y no-electrostáticas de la energía libre. Estos resultados se interpretaron teniendo en cuenta un modelo que se apoya en la idea de que cuando los tensioactivos están presentes en una disolución de ADN, surge como resultado de su interacción una mezcla de dos estados conformacionales en la macromolécula, la conformación extendida típica del ADN en disolución acuosa y el estado globular. La proporción de ADN en ambos estados es dependiente de la concentración y el tipo de tensioactivo presentes en el medio. De acuerdo con lo esperable, la energía libre de asociación de la sonda, 1-PyCHO, con el ADN, en presencia de tensioactivos, resulta ser el promedio de las que corresponden a la asociación de la sonda con cada uno de los dos estados diferentes del ADN. Dicho promedio, por supuesto, depende de la proporción de los dos estados del ADN que, a su vez, depende de la concentración de tensioactivo.

En este apartado de la tesis se presenta un estudio de la cinética de la interacción del ADN con el tensioactivo CTAB. Los resultados obtenidos, aconsejaron, como se verá más adelante, estudiar la influencia de una sal, NaCl, sobre dicha cinética.

El estudio cinético se realizó haciendo uso de una técnica potenciométrica. Para ello, se construyeron electrodos selectivos al tensioactivo CTAB. Estos electrodos constan de una membrana preparada empleando el par iónico neutro CTA^+ -tetrafenilborato. El tetrafenilborato se eligió de entre otros posibles aniones, como el SDS, para formar el par iónico, porque se comprobó que este anión, era capaz de formar pares iónicos estables con el resto de las sales de amonio cuaternario y tensioactivos empleados en el estudio termodinámico, descrito anteriormente. Esto último permitiría realizar un estudio posterior de la cinética de interacción ADN-tensioactivo variando la longitud de la cadena del tensioactivo, sin necesidad de variar las características del contraión de la membrana.

La variación de la fuerza electromotriz del sistema, f.e.m, en el transcurso del tiempo, se transformó, en variación de la concentración de tensioactivo libre con el tiempo,

mediante el uso de un procedimiento de calibrado apropiado. La respuesta de la membrana fue siempre nernstiana al variar la concentración de CTA^+ . Las pendientes de las representaciones de la f.e.m. frente al $\log[\text{CTA}^+]$ variaron desde -0.057 hasta -0.060 V. Un ejemplo de estas representaciones aparece en la Figura 7.

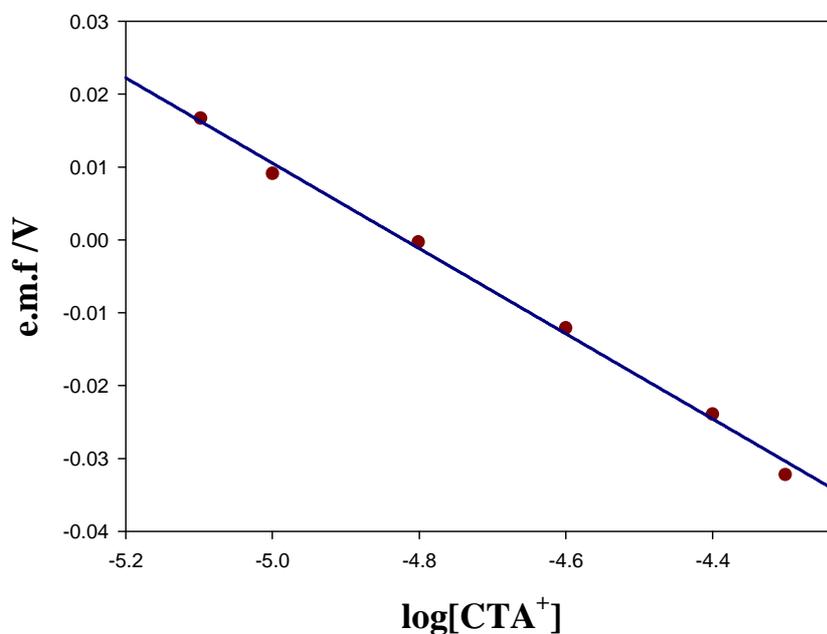


Figura 7. Recta de calibrado, emf vs. $\log[\text{CTA}^+]$ ($\text{e.m.f} = -0.2821 - 0.0585 \times \log[\text{CTA}^+]$), para una concentración de sal $[\text{NaCl}] = 0.02 \text{ M}$.

En todos los casos, el cambio en el tiempo de la concentración de tensioactivo fue de carácter biexponencial:

$$[\text{CTA}^+] = A_1 e^{\frac{-t}{\tau_1}} + A_2 e^{\frac{-t}{\tau_2}} \quad (1)$$

Un resultado típico de un experimento cinético aparece en la figura 8.

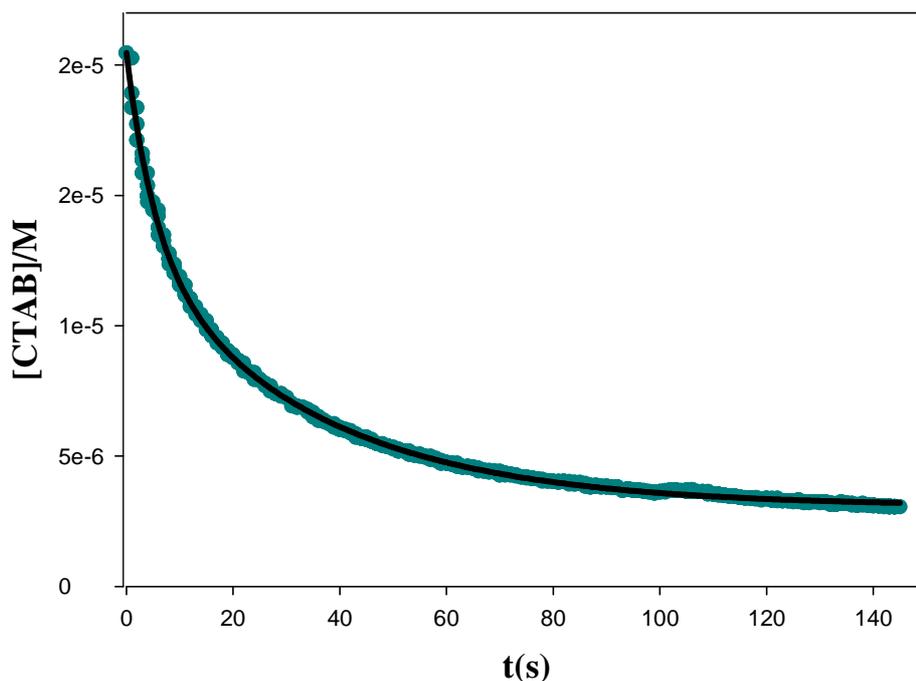
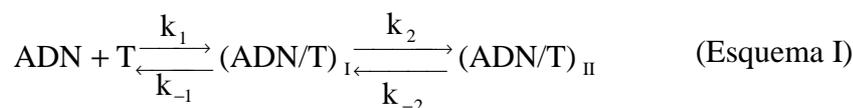


Figura 8. Ajuste de $[CTA^+]$ frente al tiempo, t , para un experimento cinético. En azul aparecen los puntos experimentales, mientras que la línea negra representa el mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación 1. $[CTA^+] = 2 \times 10^{-5} M$; $[ADN] = 2.5 \times 10^{-5} M$; $[NaCl] = 0.01 M$.

La cinética de la unión de los tensioactivos con el ADN se caracteriza por presentar dos tiempos de relajación, τ_1 y τ_2 . El comportamiento cinético del sistema es consistente con un proceso en dos etapas (véase esquema I), como se observa frecuentemente en estudios cinéticos concernientes a la asociación de otras especies al ADN⁵²:



Puede demostrarse que la dependencia del recíproco del tiempo de relajación corto, $1/\tau_1$ con la concentración de ADN (en exceso) vendría dada por⁵²:

$$\frac{1}{\tau_1} = k_1 [ADN] + k_{-1} \quad (2)$$

Por tanto, k_1 y k_{-1} pueden obtenerse a partir de la representación gráfica de $1/\tau_1$ vs. $[\text{ADN}]$. La Figura 9, muestra uno de estos ajustes.

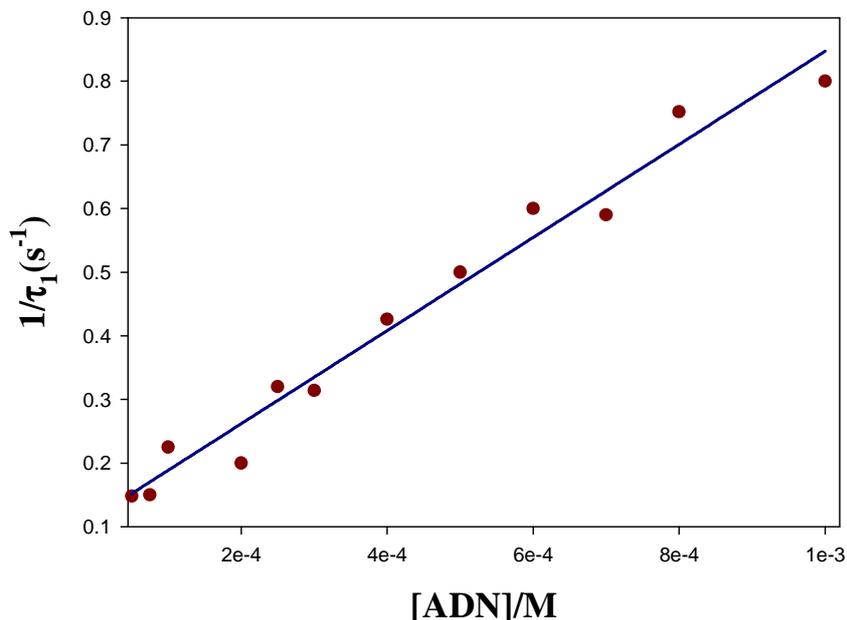


Figura 9. Dependencia del recíproco de tiempo de relajación corto, $1/\tau_1$, con la concentración de ADN según ec. 2 ($[\text{NaCl}] = 0.01 \text{ M}$).

Por otro lado, la dependencia del recíproco del tiempo de relajación largo, $1/\tau_2$, viene dada por⁵³:

$$\frac{1}{\tau_2} = \frac{k_2 K_1 [\text{DNA}]}{1 + K_1 [\text{DNA}]} + k_{-2} \quad \text{a)}$$

(3)

$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad \text{b)}$$

Consecuentemente, k_2 y k_{-2} pueden obtenerse del ajuste de $1/\tau_2$ a la ecuación 3, una vez que los valores de k_1 y k_{-1} son obtenidos del ajuste lineal (ec. 2), de tal forma que K_1 es un parámetro conocido (véase la Figura 10).

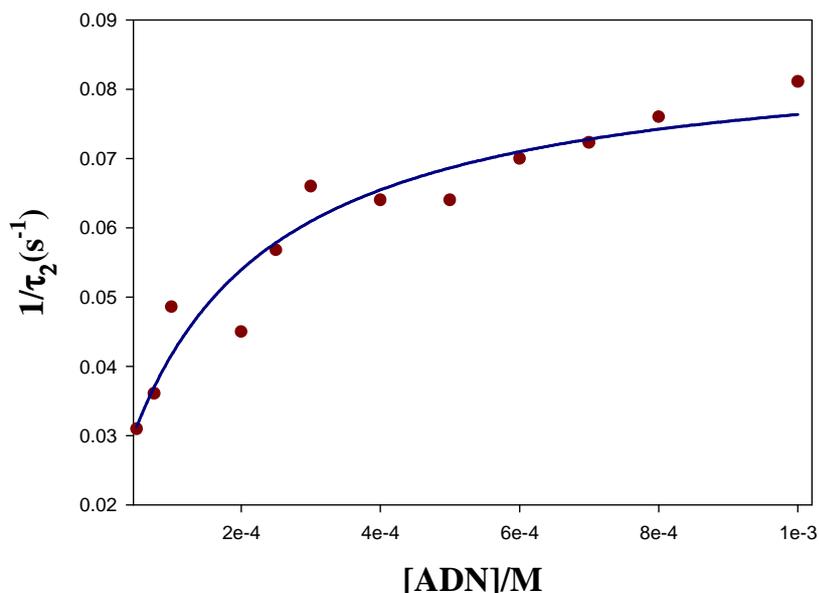


Figura 10. Dependencia del recíproco del tiempo de relajación largo, $1/\tau_2$, con la concentración de ADN ($[\text{NaCl}] = 0.001\text{M}$).

Los valores de k_1 , k_{-1} , k_2 y k_{-2} , obtenidos por el procedimiento mencionado anteriormente, aparecen en la Tabla 5. Los valores de las constantes termodinámicas individuales del primer paso (K_1), segundo paso (K_2) y global (K), correspondientes a la interacción del CTAB según el Esquema I, aparecen recogidos en la Tabla 6. Los datos de los inversos de los tiempos de relajación corto, $1/\tau_1$, y rápido, $1/\tau_2$, a cada concentración de NaCl estudiada, se recogen en el Apéndice V de la tesis.

Tabla 5. Constantes de velocidad para la interacción del ADN con CTA^+ .

[NaCl](M)	$k_1(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$10^3 k_{-1}(\text{s}^{-1})$	$10^4 k_2(\text{s}^{-1})$	$10^3 k_{-2}(\text{s}^{-1})$
0.000	939	140	866	19.3
0.001	732	115	720	15.0
0.003	597	100	591	12.2
0.010	443	90	415	6.1
0.020	33	19	96	0.55
0.050	29	22	20	0.10
0.100	8	19	17	0.06

Tabla 6. Constantes de equilibrio para la interacción del ADN con CTA⁺.

[NaCl](M)	10 ⁻⁴ K(M ⁻¹)	10 ⁻³ K ₁ (M ⁻¹)	K ₂
0.000	3.6	6.5	4.6
0.001	3.5	6.0	4.8
0.003	3.5	6.0	4.8
0.010	3.4	4.5	6.7
0.020	3.1	1.8	17.4
0.050	2.7	1.3	20.0
0.100	1.5	0.4	32.0

Como puede verse en la Tabla 6, todas las constantes de velocidad del proceso disminuyen al aumentar la fuerza iónica (NaCl) de la disolución que contiene al ADN y los tensioactivos.

La disminución de k_1 con la concentración de NaCl está en la línea argumental de que la fuerza impulsora de la unión de los tensioactivos con el ADN es de naturaleza electrostática. Este resultado resulta esperable, según la teoría clásica sobre el efecto salino. Esto es, en todos los casos se observa un efecto salino negativo. De hecho, de acuerdo con la ecuación de Brönsted-Debye⁵⁴, el logaritmo de la constante de velocidad debería disminuir proporcionalmente según el factor $2A|Z_+Z_-|\sqrt{I}/(1+\sqrt{I})$:

$$\log k = \log k_0 - \frac{2A|Z_+Z_-|\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} \quad (4)$$

En esta ecuación, k_0 es la constante de velocidad a fuerza iónica cero; A, es la constante de Debye-Hückel ($\sim 0.5 \text{ L}^{1/2}\text{mol}^{-1/2}$ en agua a 298.1 K); y Z_+ y Z_- son las cargas de los iones que participan en la reacción ($Z_+ = +1$ para el tensioactivo). En el

caso del ADN, dado su carácter polielectrolítico resulta difícil establecer un valor para Z . En cualquier caso, la Figura 11 muestra que existe una correlación lineal entre el $\log(k_1)$ y $\sqrt{I}/(1+\sqrt{I})$.

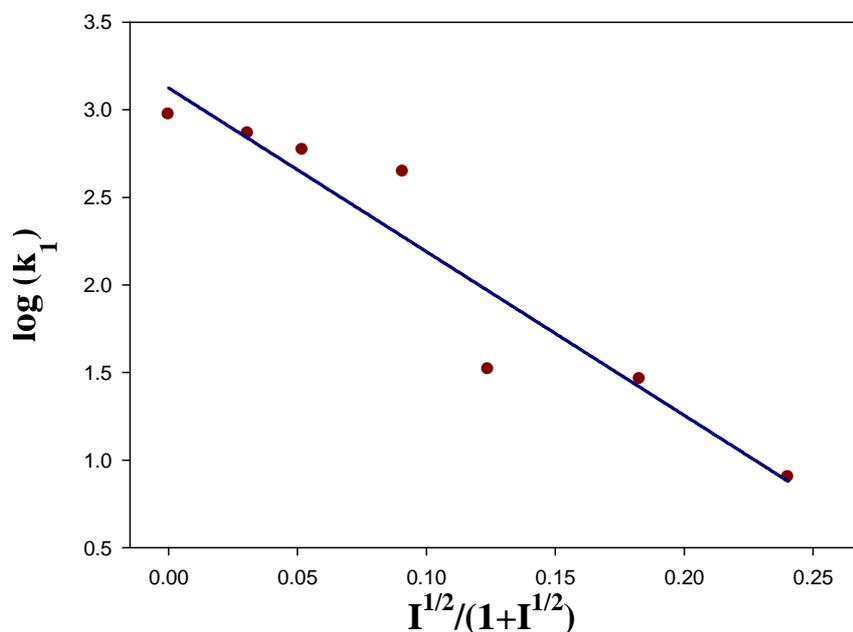


Figura 11. Ajuste de $\log. k_1$ vs. $\sqrt{I}/(1+\sqrt{I})$. I representa la fuerza iónica de la disolución.

Por tanto, la fuerza impulsora de la unión ADN/tensioactivo (proceso directo del primer paso del mecanismo dado por el Esquema I parece ser de naturaleza electrostática. A partir de la pendiente de la recta $\log(k_1)$ vs. $\sqrt{I}/(1+\sqrt{I})$, que aparece en la Figura 11, puede obtenerse la carga *efectiva* del ADN que sienten las moléculas de tensioactivo. El valor de la carga efectiva encontrado fue $Z=9$, el cual parece razonable: a pesar de la elevada carga que tiene la molécula de ADN, el efecto de apantallamiento que ejerce el electrolito soporte, a una concentración relativamente alta, en la proximidad del ADN, da lugar a que la molécula de tensioactivo en su acercamiento sintiera una carga menor de la molécula de ADN, cerca del punto de unión.

Respecto a los valores de k_{-1} , la Tabla 5, muestra que la constante de velocidad, al igual que lo que ocurría con k_1 , disminuye al aumentar la fuerza iónica. Sin embargo, la disminución de k_1 es más marcada que la disminución de k_{-1} , siendo estas

disminuciones de dos y un orden de magnitud, respectivamente. Esta variación en k_1 y k_{-1} , produce una disminución de la constante de equilibrio individual del primer paso, K_1 (esquema I), como puede verse en la Tabla 6.

La disminución de k_{-1} al aumentar la fuerza iónica resulta contra-intuitiva, si se considera el primer paso del mecanismo como la simple unión (paso directo, k_1) o separación (paso inverso, k_{-1}) de cargas de signo opuesto. Es decir, considerando la unión/separación de las cabezas polares de los tensioactivos, cargadas positivamente, y los grupos fosfato del ADN, cargados negativamente, se esperaría un efecto salino positivo en k_{-1} . El hecho de que k_{-1} disminuya al aumentar la concentración de electrolito soporte, que en principio puede resultar sorprendente, puede explicarse atendiendo al carácter hidrofóbico de las cadenas de tensioactivo. Es importante destacar que en el producto resultante del primer paso de la reacción, el complejo $(ADN/T)_I$, (esquema I), intervienen las interacciones hidrofóbicas entre las colas de los tensioactivos, así como las existentes entre las colas y los restos hidrofóbicos que componen la molécula de ADN.⁵⁵ La participación de las interacciones hidrofóbicas en la formación del primer complejo $(ADN/T)_I$, implica una estabilización adicional del estado final, $(ADN/T)_I$. Esta estabilización se incrementa al aumentar la fuerza iónica, debido al conocido efecto de “salting-out” de los solutos hidrofóbicos.⁵⁶ Es interesante destacar que, de acuerdo con esta explicación, para la disminución de k_{-1} al aumentar la concentración de sal, las interacciones hidrofóbicas estarían ausentes en el estado de transición o, al menos, serían menos importantes que éstas en el estado final $(ADN/T)_I$. Posteriormente se volverá sobre el efecto salino en k_{-1} .

La constante de velocidad k_2 se correspondería con el proceso de cambio conformacional del complejo ADN/tensioactivo formado en el primer paso del mecanismo, $(ADN/T)_I$, hacia la conformación final del complejo $(ADN/T)_{II}$. Obviamente, k_{-2} correspondería al cambio conformacional del proceso inverso.⁵⁷ Estos cambios configuracionales son relativamente lentos, sin embargo implican cambios microscópicos correspondientes a pequeñas porciones de ADN suficientemente rápidos, dado que la configuración final del complejo se alcanza en un tiempo razonable. Si estos cambios micro-configuracionales están controlados por difusión, un aumento de la concentración de sal produciría un aumento en la viscosidad, que haría más difíciles tanto el proceso directo como el inverso del segundo paso del mecanismo. De acuerdo con el tratamiento de Smoluchowsky para las reacciones controladas por difusión⁵⁸, la

constante de velocidad para esta clase de procesos es inversamente proporcional a la viscosidad del medio de reacción (η).⁵⁹ En principio, es difícil demostrar que este efecto es el que determina la disminución de k_2 y k_{-2} , porque dichas constantes de velocidad deberían relacionarse con la *viscosidad local*, η_{loc} . Sin embargo, se ha realizado una estimación de esta viscosidad local según el siguiente procedimiento: la concentración de los contraiones (Na^+) en la vecindad próxima al ADN puede calcularse suponiendo una distribución de Boltzman para estos contra-iones:

$$\frac{[Na^+]_{ADN}}{[Na^+]_{bulk}} = e^{-\Psi F / RT} \quad (5)$$

donde Ψ es la diferencia de potencial electrostático entre el ADN y el “bulk”. Los valores (negativos) de Ψ fueron tomados de la bibliografía.⁶⁰ A partir de los valores de $[Na^+]_{ADN}$ puede estimarse la viscosidad local, suponiendo que es la misma que la viscosidad de la disolución de NaCl a la misma concentración ($[Na^+]_{ADN}$):

$$\begin{aligned} \eta_{local} &= \eta_{agua} (1 + A[Na^+]_{ADN}^{1/2} + B[Na^+]_{ADN}) \\ A(1^{1/2} \text{ mol}^{-1/2}) &= 0.0062 \\ B(1 \text{ mol}^{-1}) &= 0.082 \end{aligned} \quad (6)$$

Esta suposición parece adecuada porque la contribución del ion cloruro a la viscosidad es pequeña, como corresponde al pequeño valor del coeficiente B de Jones-Dole para este ion.⁶¹ En otras palabras, los cambios en la viscosidad local son principalmente debidos a la concentración local del ion Na^+ .

Una vez que se obtienen los valores de la viscosidad local por este procedimiento, las constantes k_2 y k_{-2} pueden representarse gráficamente frente a los valores del inverso de la viscosidad local, $1/\eta_{loc}$, de acuerdo con la ecuación de Smoluchowsky. Como puede verse en la Figura 12, existe una correlación lineal entre las constantes de velocidad del segundo paso del mecanismo y $1/\eta_{loc}$, lo que parece apoyar la idea de que tanto k_2 como k_{-2} corresponden a cambios configuracionales controlados por difusión.

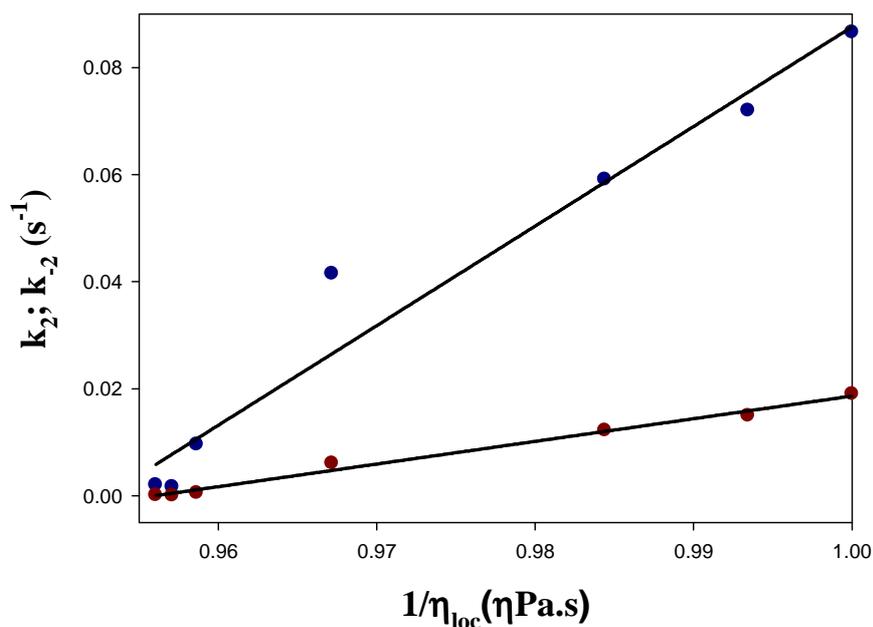


Figura 12. Constantes directa e inversa, $k_2(\bullet)$ y $k_{-2}(\bullet)$, correspondientes al segundo paso de la reacción (véase esquema I) vs. $1/\eta_{loc}$. η_{loc} es la viscosidad local estimada como se indicó en el texto.

Una vez que las concentraciones de los iones Na^+ han sido estimadas, puede considerarse, con más detalle, la variación en la constante de velocidad k_{-1} . De acuerdo con la discusión previa de este parámetro, su variación se relaciona con el incremento en las interacciones hidrofóbicas de las colas de los tensioactivos, debido a la presencia de las sales. Este incremento en las interacciones hidrofóbicas es una consecuencia del efecto de “salting-out” de las sales sobre los solutos hidrofóbicos. Estos efectos de “salting-out”, implicarían la existencia de una relación lineal entre $\log(k_{-1})$ y la concentración local de los iones Na^+ . Por tanto, según la ecuación de Brønsted, en este caso:

$$\log(k_{-1}) = \log(k_{-1})_0 + \log \frac{\gamma_{(ADN/T)_1}}{(\gamma \neq)_1} \quad (7)$$

y de acuerdo con Setchenow⁶²:

$$\log \gamma_i = K_s^i [\text{NaCl}] \quad (8)$$

Consecuentemente:

$$\log k_{-1} = \log(k_{-1})_0 + \Delta K_s [\text{NaCl}] \quad \text{a)}$$

$$\Delta K_s = (K_s)_{(\text{ADN/T})_1} - (K_s)_{\neq 1} \quad \text{b)}$$

Como puede verse en la Figura 13, la ecuación 9a se cumple aceptablemente:

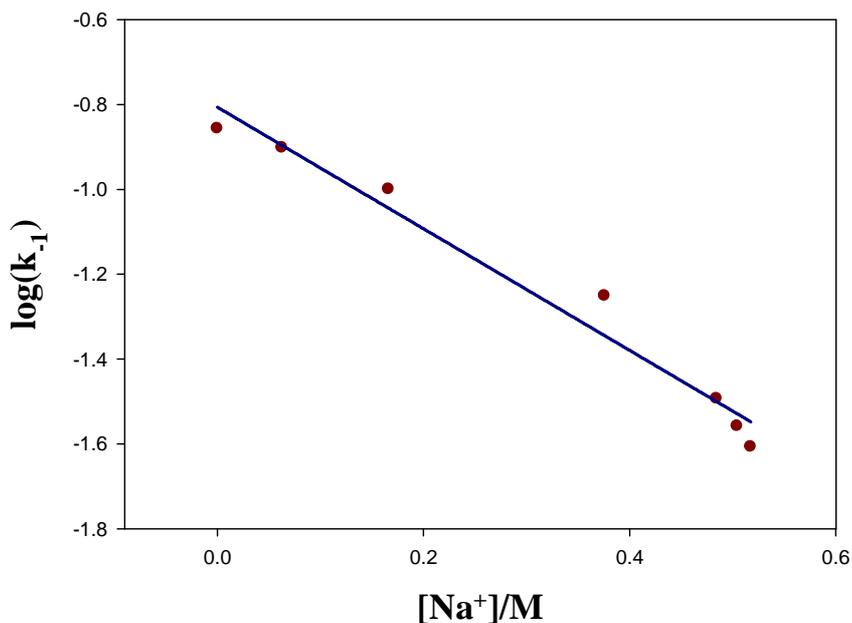


Figura 13. Ajuste de $\log.k_{-1}$, la constante de velocidad inversa del primer paso en la ec. 2, vs. $[\text{Na}^+]$, la concentración local del catión sodio.

Esto apoya la hipótesis de la causa de los cambios en k_{-1} cuando la concentración de sal varía. Además, la disminución en k_{-1} cuando la concentración de sal aumenta ($\Delta K_s < 0$), implica que el efecto estabilizante de las interacciones hidrofóbicas (estabilizantes) es

mayor en el estado inicial de la reacción inversa, $(\text{ADN/T})_I$, que en el estado de transición, de acuerdo con la explicación cualitativa dada anteriormente.

Finalmente, respecto a las constantes de equilibrio individuales de los pasos I y II en el esquema I, la Tabla 6 muestra que K_1 disminuye al aumentar la concentración de sal. Esta disminución es claramente consecuencia del hecho de que los cambios en esta constante de equilibrio están principalmente controlados por la variación de k_1 , que a su vez depende de las interacciones electrostáticas entre las cabezas polares de los tensioactivos y los grupos fosfato del ADN. Por otro lado, la constante de equilibrio del segundo paso, K_2 , aumenta al hacerlo la concentración de sal. Este comportamiento compensa, al menos en parte, la variación en K_1 , de tal forma que las variaciones de las constantes de equilibrio global del proceso, K , son relativamente menores:

$$K = K_1(1 + K_2) \quad (10)$$

Donde la constante de equilibrio global:



Es importante destacar que el valor de la constante de equilibrio K , en ausencia de sal, obtenido del ajuste de los datos cinéticos al mecanismo propuesto (Esquema I), está de acuerdo con el valor obtenido para este parámetro a partir de la constante promedio obtenida a partir de las medidas de viscosidad y las variaciones de fluorescencia del 1-PyCHO al interactuar con el ADN, en presencia de CTAB (apartado 2.3.1), $K = 34000 \text{ M}^{-1}$, donde el valor de la constante de equilibrio, así obtenida, proviene de un método puramente termodinámico. Este hecho, da validez al mecanismo propuesto ya que la ec. 10 es consecuencia de dicho mecanismo.

Como conclusión a este estudio, puede indicarse que se ha propuesto un mecanismo reversible en dos pasos para la unión de los tensioactivos al ADN. Se ha encontrado que el proceso directo del primer paso está controlado por las interacciones electrostáticas entre las cabezas polares de los tensioactivos y los grupos fosfato del ADN. El proceso inverso es dependiente de las interacciones hidrofóbicas de las colas de los tensioactivos, una vez que se han unido al ADN. El segundo paso, tanto en el sentido directo como en el inverso, se trata de un cambio conformacional controlado por difusión.

2.4. Referencias

- (1) Matsumoto, M; Sakaguchi, T; Kimura, M; Doi, K; Mingawa, K; Matsuzawa, Y; Yoshikawa, K. *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* **1992**, 30, 779.
- (2) (a) Dias, R. S; Pais, A. C. C.; Miguel, M. G; Lindman, B. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects.* **2004**. 250, 115 (b) Bloomfield, V. A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 334. (c) Bloomfield, V. A. *Biopolymers.* **1997**. 44, 269.
- (3) (a) Wagner, E; Cotton, M; Foisner, R; Birnstiel, M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, **1991**, 88, 4255. (b) Ogris, M; Steinlein, P; Kursa, M; Mechtler, R; Wagner, E. *Gene Therapy.* **1998**. 5, 1425. (c) Kimure, T; Yamaoka, T, Iwase, R; Muraki, A, *Macrom. Biosci.* **2002**. 2, 437. (d) Yoshikawa, K. *Adv. Drug. Del. Rev.* **2002**. 52, 235. (e) Köping-Höggard, M; Mel'nikova, Y. S; Varum, K. M; Lindman, B; Artursson, P. *J. Gene. Med.* **2003**, 5, 130.
- (4) Trewavas, A. *Anal. Biochem.* **1967**. 21, 324.
- (5) Rita, M. R; Miguel, M. G; Lindman, B. *Biomacromolecules.* **2005**. 6, 2164.
- (6) Hayakawa, K; Santerre, J; Kwak, J. *J. Biophys. Chem.* **1983**. 17, 175.
- (7) Shirahama, K; Takashima, K; Takisawa, N. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**. 60, 43.
- (8) Matsuzawa, Y; Yonezawa, Y; Yoshikawa, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**. 225, 796.
- (9) Mel'nikov, S. M; Sergeyev, V. G; Yoshikawa, K, "In Recent Research Developments in Chemical Sciences"; Pandalai, S. G; Ed. Transworld Research Network: Trivandrum, India, 1997: Vol. 1, p. 69.
- (10) (a) Goddard, E. D. *Colloids Surface.* **1986**. 19, 255. (b) Cabane, B; Duplessix, R. *J. Phys (Paris).* **1982**. 43, 1529.
- (11) Lindman, B; Thalberg, K. "In Interactions of Surfactants with Polymers and Proteins"; Goddard, E; Ananthapadmanabhan, K. Eds. CRC Press: Boca Raton, 1993, p. 203.
- (12) Mel'nikov, S. M; Dias, R; Mel'nikova, Y; Marques, E. F; Miguel, M. G; Lindman, B, *FEBS Lett.* **1999**. 453, 113.
- (13) Khen, A; Marques, E. F. "Catanionic Surfactants. In Specialists Surfactants." Robb, I. D; Ed; Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall: London, 1997; p. 37.
- (14) Dias, R. S; Lindman, B; Miguel, M. G. *J. Phys. Chem. B.* **2002**, 106, 12608.

- (15) (a) Mel'nikov, S. M; Sergeev, V. G; Yoshikawa, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*(40), 9951. (b) Hayakawa, K; Santerre, J. P; Jan C. T. Kwak. *Biophysical Chemistry*. **1983**, *17*, 175. (c) Shirahama, K; Takashima, K; Takisawa, N. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 43.
- (16) Chatterjee, R; Chatteraj, D. K. *Biopolymers*. **1979**, *18*, 147.
- (17) Llères, D; Clamme, J. P; Dauty, E; Blessing, T; Krishnamoorthy, G; Duportail, G; Mély, Y. *Langmuir*. **2002**, *18*, 10340.
- (18) McGuee, J. D; Von Hippel, P. H. *J. Mol. Biol.* **1974**, *86*, 469.
- (19) Schwarz, G. *Eur. J. Biochem.* **1970**, *12*, 442.
- (20) Satake, I; Yang, J. T. *Biopolymers*. **1976**, *15*, 2263.
- (21) (a) Bradley, D. F; Lifson, S; In Molecular Association in Biology (edited by B. Pullman), Academic Press, New York and London 1968, p. 261. (b) Schneider, F. W; Crona, C. L; Podder, S. K. *J. Phys. Chem.* **1968**, *72*, 4563.
- (22) Zimm, B. H; Bragg, J. K. *J. Chem. Phys.* **1959**, *31*, 526.
- (23) Schmitz, K. S; Schurr, J. M. *Biopolymers*. **1970**, *9*, 697.
- (24) Haydon, D. A; Taylor, F. H. *Phil. Trans. R. Soc. Lon. Ser. A*. **1960**, *252*, 225.
- (25) (a) Goddard, E. D; Hannan, R. B. *J. Colloid. Interface. Sci.* **1973**, *44*, 475. (b) Shinoda, K. *J. Phys. Chem.* **1955**, *59*, 432.
- (26) Scatchard, G. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1949**, *51*, 660.
- (27) Chatteraj, D. K; Mitra, S. P. *Indian J. Biochem. Biophys.* **1977**, *14*, 7.
- (28) Frank, H. S; Evans, M.W. *J. Chem. Phys.* **1945**, *13*, 507.
- (29) Chatteraj, D. K; Bull, H. B. *Arch. Biochem. Biophys.* **1971**, *142*, 363.
- (30) (a) Bhattacharya, S; Mandal, S. S. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1997**, *1323*, 29. (b) Llères, D; Clamme, J-P; Dauty, E; Blessing, T; Krishnamoorthy, G; Duportail, G; Mély, Y. *Langmuir*, **2002**, *18*, 10340. (c) Petrov, A. I; Khalil, D. N; Kazaryan, R. L; Savintsev, I. V; Sukhorulov, B. I. *Bioelectrochemistry*. **2002**, *58*, 75. (d) Goracci, L; Germani, R; Savelli, G; Bassani, D. M. *ChemBioChem*. **2005**, *6*, 197.
- (31) Grueso, E; Sánchez, F. *J. Phys. Chem. B*. **2008**, *112*, 689.
- (32) Record, M. T; Jr. Lohman, T. M; Dettaseth, P. *J. Mol. Biol.* **1976**, *107*, 145.
- (33) C. Tanford; *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*; Wiley, New York, 1980.
- (34) (a) Matulis, D; Rouzina, I; Bloomfield, V. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7331. (b) Jiang, N; Wang, J; Wang, I; Yan, H; Thomas, R. K. *J. Colloids. Interface. Sci.* **2005**,

- 284, 759. (c) Mónica, R; Dias, R; Maria da Graca, M; Björn, L. *Biomacromolecules*. **2005**, 6, 2164. (d) Zhu, D-M; Evans, R. K. *Langmuir*. **2006**. 22(8), 3735. (e) Marchetti, S; Onori, G; Cametti, C. *J. Phys. Chem.B*. **2006**. 110, 24761. (f) Kim, W; Yamasaki, Y; Kataoka, K. *J. Phys. Chem. B*. **2006**. 110, 10919.
- (35) Grosberg, A. Y; Khokhlov, A. R. "In Statistical Physics of Macromolecules". American Institute of Physics: New York, 1994; p. 289.
- (36) Rouzina, I; Bloomfield, V. A. *J. Phys. Chem*, **1996**, 100, 4292.
- (37) Hiemenz, P. C; Rajagopalau, R. Principles of Colloid and Surface Chemistry; Dekker: New-York, 1997, pp. 361-362.
- (38) Maulik, S; Chatteraj, D. K; Moulik, S. P. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **1998**, 11, 57.
- (39) Vourimaa, E; Urtti, A; Seppänen, R; Lemmetyinen, H; Yiperttula, M. *J. Am. Chem. Soc*. **2008**, 130, 11695.
- (40) Grovenstein, E; Blanchard, E. P; Gordon, D. A; Stevenson, R. W. *J. Am. Chem. Soc*. **1959**, 81, 4842.
- (41) Smith, P. A; Frank, S. *J. Am. Chem. Soc*. **1952**, 74, 509.
- (42) Felsendeld, G; Hirschaman, J. *Mol. Biol*. **1965**, 13, 409.
- (43) Hayakawa, K; Kwak, C. T. *J. Phys. Chem*. **1982**, 86, 3866.
- (44) (a) Secco, F.; Venturini, M.; Lopez, M.; Perez, P.; Prado, R.; Sanchez, F. *PCCP*. **2001**, 3(19), 4412. (b) Lopez-Cornejo, P.; Perez, P.; Garcia, F.; De laVega, R.; Sánchez, F. *J. Am. Chem. Soc*. **2002**, 124(18), 5154.
- (45) Kirby, A. J.; Camilleri, P; Engberts, J. B. F. N; Feiters, N. C; Nolte, R. J. M; Soderman, D; Bergsma, M.; Bell, P. C.; Fielden, M. L.; García Rodriguez, C; Guedat, P; Kremer, A; Mc Gregor, C; Perrin, C; Ronsin, G; Van Eijk, M. C. P. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2003**. 42, 1448 (y referencias en éste artículo).
- (46) Symietz, C; Schneider, M; Brezesinski, G; Möhwald, H. *Macromolecules*. **2004**, 37, 3865.
- (47) (a) Spink, C. H; Chaires, J. B. *Biochemistry*. **1999**, 38, 496. (b) Zantl, R; Baiai, L; Artzner, F; Sprenger, I; Rapp, G; Radler, J. O. *J. Phys. Chem. B*. **1999**. 103, 10300. (c) Barreleiro, P. C. A; Olofsson, G; Alexandridis, P. *J. Phys. Chem. B*. **2000**. 104, 7795. (d) Cardenas, M.; Nylander, T.; Thomas, R. K; Lindman, B. *Langmuir*. **2005**. 21, 6495. (e) Jiang, N.; Li, P.; Wang, Y.; Wang, J.; Yan, H; Thomas, R. K. *J. Phys. Chem. B*. **2004**, 108, 15385. (f) Chen, X.; Wang, J.; Shen, N.; Liu, Y.; Li, L.; Liu, M; Thomas, R.

- K. *Langmuir*. **2002**, 18, 6222. (g) Wang, C.; Li, X.; Wettig, S. D.; Badea, I.; Foldvari, M.; Verreel, R. E. *P.C.C.P.* **2007**, 9, 1616.
- (48) (a) Chaires, J. B.; Satyanarayana, S.; Suh, D.; Fokt, I.; Przwloha, T.; Pribe, W. *Biochemistry*. **1999**, 35, 2048. (b) Leal, C.; Bilalov, A.; Lindman, B. *J. Phys. Chem. B*. **2006**, 110, 17221.
- (49) (a) Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. *J. Phys. Chem.* **1977**, 81, 2176. (b) Okamoto, A.; Kanatani, K.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 4820. (c) Kawamoto, T.; Hashidzume, A.; Morishima, Y. *J. Colloid. Interface. Sci.* **2005**, 291, 537. (y referencias en estos artículos).
- (50) Nakamura, M.; Fukunaga, Y.; Sasa, K.; Ohtoshi, Y.; Kanaori, K.; Hayashi, H.; Nakano, H.; Yamana, K. *Nucleic. Acid. Research*. **2005**, 33, 5887.
- (51) Nótese que aunque los tensioactivos aumentan la temperature de melting del ADN, este incremento es debido a la contribución de las cabezas polares, de forma que el melting es menor en presencia de $N(CH_3)_4^+$. De acuerdo con ello, el efecto de las cadenas hidrofóbicas es el de disminuir la temperatura de melting del ADN (véase Tabla 2 en referencia 30a).
- (52) (a) Biver, T.; Secco, F.; Venturini, M. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, 437, 215. (b) Li, H. J.; Crothers, D. M. *J. Mol. Biol.* **1969**, 39, 461. (c) Ciatto, C.; D'Amico, M. L.; Natile, G.; Secco, F.; Venturini, M. *Biophys. J.* **1999**, 77, 2717 (d) Biver, T.; Secco, F.; Tiné, M. R.; Venturini, M. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, 418, 63.
- (53) *Relaxation kinetics*; Bernasconi, C. F.; Ed.; Accademic Press: New York, 1976; p 21
- (54) Brönsted, J. N. *Z. Physik. Chem.* **1922**, 102, 169. Véase también, Livingston, R. *J. Chem. Ed.* **1930**, 7, 2887.
- (55) Dias, R. S.; Magno, L. M.; Valente, A. J. M.; Das, D. Das, P. K.; Maity, S.; Miguel, M. G.; Lindman, B. *J. Phys. Chem. B*. **2008**, 112, 14446.
- (56) Desnoyers, J. E.; Arel, M.; Perron, G.; Jolicoeur, C. *J. Phys. Chem.* **1969**, 73, 3346.
- (57) Strikland, J. A.; Marzilli, L. G.; Wilson, W. D. *Biopolymers*. **1990**, 29, 1307.
- (58) Smoluchowski, M. V. *J. Phys. Chem.* **1917**, 92, 129.
- (59) Pradeep, L.; Udgaonkar, J. B. *J. Mol. Biol.* **2007**, 366, 1016.
- (60) Carrasco, M.; Coca, R.; Cruz, I.; Daza, S.; Espina, M.; Garcia-Fernandez, E.; Guerra, F. J.; Leon, R.; Marchena, M. J.; Perez, I.; Puente, M.; Suarez, E.; Valencia, I.; Villalba, I.; Jimenez, R. *Chem. Phys. Letters*. **2007**, 441, 148.

(61) Stokes, R. H; Mills, R. *Viscosity of Electrolytes and Related Properties*, Pergamon Press: London, 1965; p.31.

(62) Setchenow, J. Z. *Phys.Chem*, **1889**, 4, 117.

3. INTERACCIONES NO-COVALENTES
NANOPARTÍCULAS-ADN:
ESTUDIO CINÉTICO Y TERMODINÁMICO.

3. INTERACCIONES NO-COVALENTES NANOPARTÍCULAS-ADN: ESTUDIO CINÉTICO Y TERMODINÁMICO.

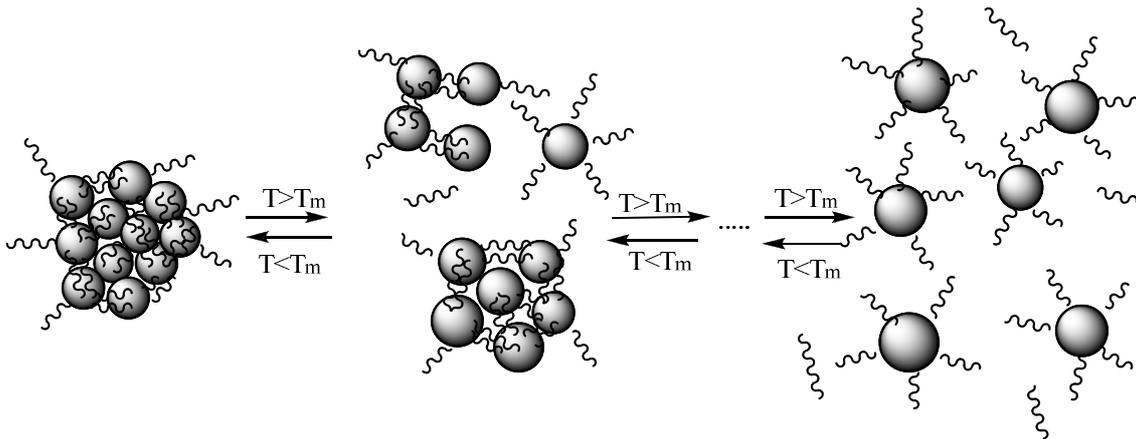
3.1. Introducción y Antecedentes.

Un gran número de aplicaciones en el área de investigación de la nanotecnología están relacionadas, directamente, con la asociación de nanopartículas metálicas a pequeños ligandos¹ tales como azúcares² y tensioactivos³, proteínas⁴, dendrímeros⁵ y ADN.⁶

En general, las nanopartículas se han empleado para la construcción de nuevos materiales, el desarrollo de bioensayos y como sistemas multivalentes para estudios de diferentes interacciones sustrato/ligando. Cabe destacar el potencial empleo de las nanopartículas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades⁷, la detección de agentes patógenos⁸, el transporte de sondas y medicamentos⁹, y la fabricación de biosensores.¹⁰ De todas ellas, las nanopartículas de oro son, entre las metálicas, las más estables en disolución. Se caracterizan, además, por presentar una excelente biocompatibilidad con moléculas como el ADN. Las aplicaciones de las nanopartículas de oro son especialmente prometedoras en el campo de la nanotecnología debido a sus extraordinarias propiedades estructurales, electrónicas, ópticas, magnéticas y catalíticas.¹¹ Estas características son, precisamente, las que hacen a las nanopartículas muy diferentes de aquellos sistemas constituidos por los materiales que las componen por separado. Frente a las partículas metálicas simples o semiconductores, las propiedades que presentan las nanopartículas, en general, no son sólo las propias del clúster metálico que constituye el núcleo central de su estructura, sino también aquellas propiedades referentes a las de las moléculas orgánicas que constituyen la mono-capa, cuya función principal es conferir estabilidad a la estructura y evitar la formación de agregados metálicos. Más específicamente, las nanopartículas de oro constituidas por alcanotiolatos como agentes protectores, han recibido recientemente, una atención considerable debido a que éstos agentes confieren ciertas ventajas al sistema. Algunas de ellas son: (i) alta estabilidad; (ii) solubilidad en agua; (iii) funcionalización versátil y flexible y (iv) simple caracterización mediante técnicas analíticas estándares¹² (RMN, UV-Vis y MET).

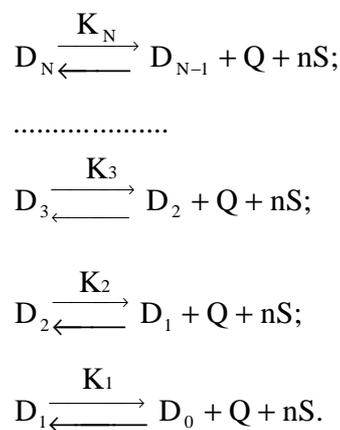
Durante las últimas décadas, diferentes autores han dirigido sus esfuerzos a la preparación de nanopartículas covalentemente unidas al ADN.¹³ La mayoría de los estudios que implican nanopartículas covalentemente unidas con ADN se han llevado a cabo con moléculas de ADN de pequeño tamaño y oligonucleótidos. En particular,

resulta de relevancia fundamental para mejorar la selectividad y sensibilidad de los sistemas de detección de ADN, el estudio de la termodinámica de los procesos de hibridación-deshibridación de cadenas de ADN unidas covalentemente a nanopartículas, así como el estudio de la formación de posibles agregados de nanopartículas. Las transiciones implicadas en los procesos hibridación/deshibridación de la molécula de ADN unida covalentemente a la nanopartícula, presentan curvas de “melting” muy pronunciadas. Esto último hace que el uso de las nanopartículas como sistemas de detección de macromoléculas como el ADN sea muy diferente, en cuanto a lo que la selectividad se refiere, siendo estos últimos mejores que otros sistemas que emplean fluoróforos en lugar de nanopartículas para la detección de la macromolécula. Además, se ha encontrado que la disociación de la doble hebra, en sistemas que contienen agregados de moléculas ADN/nanopartícula es de carácter cooperativo, en el sentido de que la disociación de una cadena de ADN en el agregado favorece la disociación de la siguiente, conduciendo a estructuras más dispersas en disolución. Jin y colaboradores¹⁴ han desarrollado un modelo teórico para la evaluación de la importancia relativa que tienen diversos factores, en los procesos de agregación de nanopartículas covalentemente unidas a oligonucleótidos. Algunos de estos factores son: el tamaño y la posición de unas nanopartículas respecto a otras, la concentración de ADN, y el efecto del medio. Es importante destacar que, en este modelo, por término “melting”, se entiende “aquel proceso que implica la deshibridación del ADN que está unido covalentemente a la nanopartícula.” Cabe destacar, como se mencionó anteriormente, que los procesos de melting que se producen en la interacción entre sistemas de nanopartículas funcionalizadas con oligonucleótidos, difieren de aquellos que ocurren en otros sistemas más simples. Así, el mecanismo de estos procesos (véase esquema I) está controlado por dos factores clave: (i) la presencia de múltiples cadenas de polinucleótidos por cada par de nanopartículas (circunstancia que favorece la agregación del sistema) y (ii) una progresiva disminución de la temperatura de melting a medida que la deshibridación ocurre (se abren las cadenas de ADN), debido, entre otros factores, a la reducción que conlleva este proceso en la constante dieléctrica local.



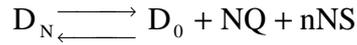
Esquema I

El modelo propuesto por Jin¹⁴ parte de la suposición de que inicialmente existen muchas nanopartículas por agregado, y que cada pareja de nanopartículas está unida por multitud de hebras dobles de ADN. De esta forma, las transiciones de melting del sistema podrían describirse mediante un mecanismo en serie en múltiples pasos sucesivos, donde el número de etapas en el mecanismo dependería del número de oligonucleótidos existentes por nanopartícula. Cada paso del mecanismo supone la disociación de una hebra de ADN, Q, y la liberación de contraiones, S. Este proceso se describe suponiendo que inicialmente, todas las nanopartículas se encuentran agrupadas en un solo agregado. La concentración de nanopartículas en el agregado se denota como D_i , donde el subíndice i indica el número de oligonucleótidos por nanopartícula que permanecen unidos, covalentemente, al resto de nanopartículas del agregado. Este número es característico de cada grupo de nanopartículas, cuya concentración se define como D_i . Así, el proceso de hibridación/deshibridación puede describirse según el esquema:



Esquema II

siendo n, el número de contraiones que quedan libres en disolución por cada cadena de oligonucleótido; N, es el número total de cadenas oligonucleótidos que existen por nanopartícula, en el agregado; D₀ representa el estado final en el que se ha producido el “melting” de todas las cadenas de ADN, quedando el agregado inicial (D_N) en forma de nanopartículas dispersas en disolución. El proceso global de “melting” del sistema viene dado por:



Esquema III

La fracción que hay en el estado D₀ se calcula como:

$$f = \frac{D_0}{D_T} = \frac{D_0}{\sum_i D_i} = \frac{1}{\frac{\sum_i D_i}{D_0}} \quad (1)$$

donde D_T es la concentración total del agregado. A partir del esquema II, puede deducirse el valor de $\sum_i D_i/D_0$ como:

$$\frac{\sum_i D_i}{D_0} = \frac{D_0}{D_0} + \frac{D_1}{D_0} + \frac{D_2}{D_0} + \frac{D_3}{D_0} \dots + \frac{D_N}{D_0} = 1 + \frac{QS^n}{K_1} + \frac{Q^2S^{2n}}{K_1K_2} + \frac{Q^3S^{3n}}{K_1K_2K_3} \dots + \frac{Q^NS^{Nn}}{K_1K_2K_3 \dots K_N} \quad (2)$$

Sacando factor común QSⁿ/K₁:

$$\frac{\sum_i D_i}{D_0} = 1 + \frac{QS^n}{K_1} \left(1 + \frac{QS^n}{K_2} + \frac{Q^2S^{2n}}{K_2K_3} \dots + \frac{Q^{N-1}S^{(N-1)n}}{K_2K_3 \dots K_N} \right) \quad (3)$$

Experimentalmente se comprueba que la concentración local de sal en el agregado disminuye de forma gradual al tener lugar la disociación de las hebras de ADN; y esta disminución en la concentración de sal, que conlleva una bajada en la constante dieléctrica local, provoca una disminución de la temperatura de “melting” del sistema. Estos hechos fueron claves para suponer un mecanismo cooperativo para la disociación/agregación de las nanopartículas de oro, en el que el primer paso del mecanismo lleva asociada una temperatura de melting mayor, y por tanto una constante de equilibrio más pequeña que el siguiente paso, y así sucesivamente, K_N<K_{N-1}<...<K₁.

Esto supone que el último término en la ecuación 3 sería dominante siempre que la temperatura de “melting” disminuya, progresivamente, al tener lugar cada paso del mecanismo (véase esquema II). Por consiguiente, la ecuación 3 se simplifica:

$$\frac{\sum_i D_i}{D_0} \approx 1 + \frac{Q^N S^{nN}}{K_1 K_2 K_3 \dots K_N} \quad (4)$$

La constante de equilibrio global K, está relacionada con las constantes de equilibrio K_i , asociadas con cada paso del mecanismo:

$$\frac{1}{K} \approx \frac{Q^N S^{nN}}{K_1 K_2 K_3 \dots K_N} \quad (5)$$

Teniendo en cuenta las ecuaciones 4 y 5, la fracción total de agregado en el estado D_0 puede expresarse en función de la constante de equilibrio global como:

$$f = \frac{1}{1 + \frac{1}{K}} \quad (6)$$

La relación entre la constante de equilibrio individual de cada paso, K_i , y la temperatura de “melting” del sistema viene determinada por la expresión de Van`Hoff¹⁵:

$$K_i = QS^n \exp\left(-\frac{\Delta H_i}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{m,i}}\right)\right) \quad (7)$$

donde $T_{m,i}$ se refiere a la temperatura de disociación del paso i (definida como $K_i/QS^n = 1$ cuando $T = T_{m,i}$). La entalpía total del proceso, ΔH_{tot} (ec. 8) se obtiene suponiendo que esta es el resultado de la suma de las entalpías individuales, ΔH_i , correspondientes a cada paso del mecanismo (véase esquema I). Algo parecido sucedería con la temperatura de melting global del proceso, T_m , cuyo valor se obtiene empleando la ecuación 9:

$$\Delta H_{tot} = \sum_i \Delta H_i \quad (8)$$

$$T_m = \frac{\Delta H_{tot}}{\sum_i \frac{\Delta H_i}{T_{m,i}}} \quad (9)$$

Sustituyendo las ecuaciones 5 y 6, en la ecuación 7, y teniendo en cuenta las ecuaciones 8 y 9, se llega a la siguiente expresión, que relaciona la fracción total de agregado (véase esquema I) con la entalpía libre total del proceso y la temperatura:

$$f = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{\Delta H_{tot}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m}\right)\right)} \quad (10)$$

De acuerdo con la ecuación 10, el análisis de los valores de la fracción total de agregado, f , en función de la temperatura, T , proporciona los valores de ΔH_{tot} y de T_m . El valor de la entalpía total del proceso, ΔH_{tot} marca la anchura de la curva de melting. En esta curva con forma sigmoïdal, T_m (promedio de las temperaturas de melting individuales, T_i) coincide con el punto donde la derivada de f con respecto a la temperatura ($[\partial f/\partial T]$) presenta su valor máximo. Es importante destacar que la curva de melting que predice el modelo es, en cierta forma, sensible al número de conexiones, N existentes entre cada par de nanopartículas:

$$\Delta H_{tot} = \sum_i \Delta H_i \approx N\Delta H_1 \quad (11)$$

Esto es, ya que una de las premisas para que se cumpla la ec. 10 es que ΔH_i tenga el mismo valor, para cada paso del mecanismo. De forma que, esta suposición implica que cuanto mayor sea el valor de N , más pronunciada es la curva de “melting” del sistema. Este modelo termodinámico ha servido, en estudios teóricos posteriores de dinámica molecular, para determinar y comparar la distribución de iones en torno a la doble hélice de ADN, con aquella que existe, cuando se encuentra formando clústeres o agregados de ADN, a diferentes concentraciones de NaCl.¹⁶

Como se indicó anteriormente, los procesos de hibridación/deshibridación del ADN y la agregación/disociación de los sistemas ADN/nanopartícula, están influenciados por múltiples variables como son: el tamaño de la nanopartícula, la densidad superficial de

los oligonucleótidos, la constante dieléctrica del medio, la concentración salina y la concentración de ADN. Por tanto, un modelo termodinámico completo que explique estos procesos debe tratar, al menos, la dependencia de la constante de equilibrio de interacción de estos sistemas, en función de estas variables. La aplicación del modelo termodinámico de Rongchao Jin¹⁴ a las curvas de disociación de agregados de nanopartículas de oro funcionalizadas con oligonucleótidos con distinto tamaño del core, 13, 31 y 50 nm, conduce a valores de entalpía libre, ΔH_{tot} , de 275.8, 473.8 y 706.8 kcal.mol⁻¹, respectivamente. De acuerdo con este resultado, las curvas de melting resultan más verticales o pronunciadas cuanto mayor es el tamaño de la nanopartícula. Este incremento en la entalpía de disociación, con el tamaño de la nanopartícula implica, de acuerdo con la ecuación 11, que el número de conexiones entre cada par de nanopartículas (N) aumenta al hacerlo el tamaño de las mismas.

Resulta interesante también indicar la predicción que este modelo hace del efecto de la concentración salina en la temperatura de disociación. Considerando la constante de equilibrio global en la ecuación 7, tomando logaritmos y diferenciando respecto al logaritmo de la concentración de sal, se obtiene la dependencia de la temperatura de melting con la concentración salina:

$$\frac{dT_m}{d \ln S} = \frac{nNRT_m^2}{\Delta H_{tot}} \quad (12)$$

De la ecuación anterior puede concluirse que, la disociación de la hebra puede inducirse mediante una disminución o un aumento de la concentración salina, dependiendo del signo de ΔH_{tot} . Para el caso de la interacción de estas nanopartículas de oro, dado el signo positivo en ΔH_{tot} , una disminución en la concentración salina produciría una mayor disociación de la doble hebra. Por ejemplo, el modelo teórico predijo que, a una temperatura de 47°C, el melting se produciría a una concentración de sal de ~ 0.1 M. Este valor de concentración que predice el modelo es muy próximo al que se obtiene experimentalmente ([NaCl] = 0.15 M). La influencia de la concentración salina en la disociación de la doble hebra de ADN se explica atendiendo a las propiedades electrostáticas de la molécula. La molécula de ADN es de muy alta carga, por lo que la concentración local de sal, en la superficie de la macromolécula, es diferente a la que existe cuando se produce la disociación de la doble hebra a cadenas simples. Por otro lado, Rongchao también realizó algunos estudios de índole experimental sobre el efecto

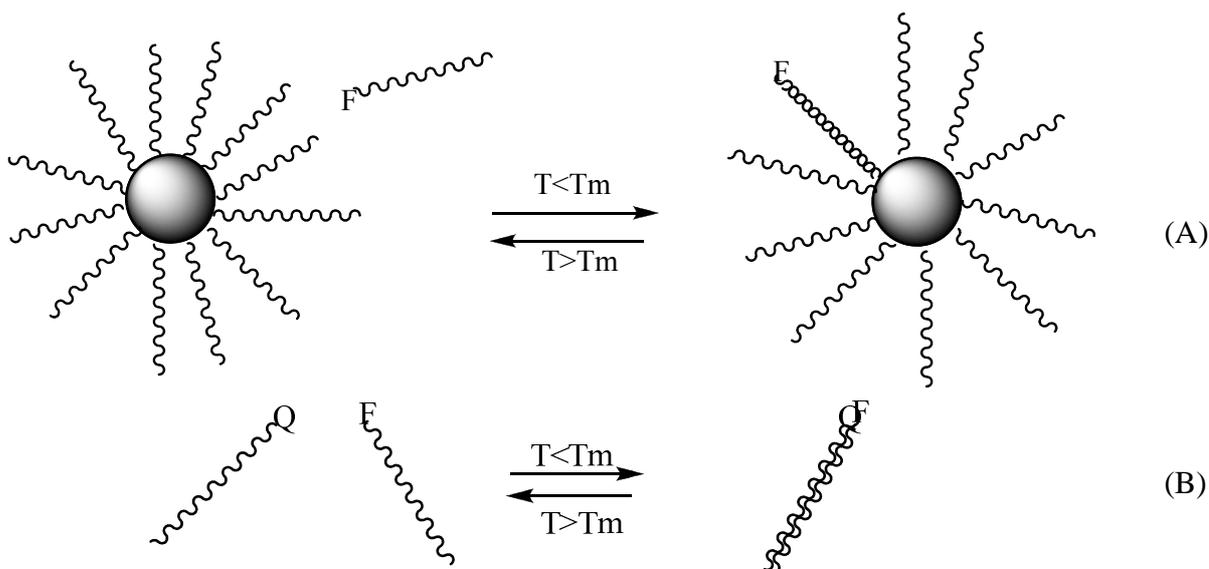
de la concentración salina en la cinética de hibridación de oligonucleótidos de ~ 30 pares de bases unidos covalentemente al centro de oro. Este estudio se llevó a cabo en el intervalo de concentraciones de NaCl de entre 0.1 y 1 M de NaCl. El seguimiento de la reacción de hibridación se realizó registrando la disminución de absorbancia de la banda de resonancia de plasmón de superficie (SPB) de las nanopartículas de oro de 13 nm, a una longitud de onda de 520 nm, a medida que la agregación de las nanopartículas tenía lugar. Las cinéticas registradas fueron del orden de horas, y se observó un aumento de la velocidad de hibridación al aumentar la concentración de salina.

El efecto de la concentración del oligonucleótido, Q , en la temperatura de melting también puede deducirse de este modelo. Considerando la constante de equilibrio global en la ecuación 7, tomando logaritmos y diferenciando respecto al logaritmo de la concentración de oligonucleótido, se obtiene:

$$\frac{dT_m}{d\ln Q} = \frac{NRT_m^2}{\Delta H_{tot}} \quad (13)$$

De esta expresión se deduce que la disociación de la doble hebra de ADN puede inducirse también mediante una disminución en la concentración de oligonucleótido que recubre a la nanopartícula (siempre que el signo de ΔH_{tot} sea positivo). La pendiente de la representación T_m frente a $\ln Q$ proporciona el número de conexiones entre nanopartículas, N ($N = 2$ para nanopartículas de 13 nm).

Por otro lado, en relación con la aplicación de los sistemas ADN/nanopartícula para la fabricación de biosensores resulta de interés analizar y comparar, las propiedades termodinámicas de asociación de estos sistemas con los sistemas que emplean sondas fluorescentes, con este mismo fin. De acuerdo con ello, Mirkin y colaboradores¹⁷ estudiaron dos sistemas tipo: (i) el sistema constituido por nanopartículas funcionalizadas con oligonucleótidos (13 nm) y su interacción con hebras complementarias de ADN funcionalizadas con sondas fluorescentes, 5'-fluoresceína (véase esquema IV.A); y (ii) el sistema constituido por las mismas cadenas de oligonucleótidos funcionalizadas con una molécula de quencher, (Q), en sus extremos y su interacción con oligonucleótidos complementarios funcionalizados con la misma sonda 5'-fluoresceína (véase esquema IV.B)



Esquema IV

El primer estudio llevado a cabo con este objetivo comparaba la interacción entre las cadenas de oligonucleótidos de ambos sistemas tipo, a través del estudio de las curvas de melting, en función de la concentración de reactivos. Como puede verse en el esquema IV, a diferencia del modelo de Jin¹⁴, en este otro modelo, se trata la asociación/disociación de nanopartículas (funcionalizadas con oligonucleótidos), con oligonucleótidos (complementarios), suponiendo un esquema simple de reacción, sin considerar la posible agregación del sistema. En el caso del sistema (i), representado en el esquema IV.A, la constante termodinámica de asociación del oligonucleótido con la nanopartícula fue $1.8 \times 10^{14} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; mientras que en el caso del sistema (ii) representado en el esquema IV.B, la constante de equilibrio fue $1.8 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (dos órdenes de magnitud menores que las correspondientes al sistema análogo en el que intervenía la molécula de nanopartícula).¹⁷ Los parámetros termodinámicos de ambos sistemas fueron determinados por la técnica de espectroscopía de fluorescencia. La unión de las nanopartículas de oro fluorescentes a las cadenas complementarias de ADN, modificadas por la presencia de un fluoróforo en su extremo terminal (5'-fluoresceína), producen una disminución de fluorescencia debido a fenómenos de quenching.¹⁸ Una vez formado el complejo (sonda/oligonucleótido)-

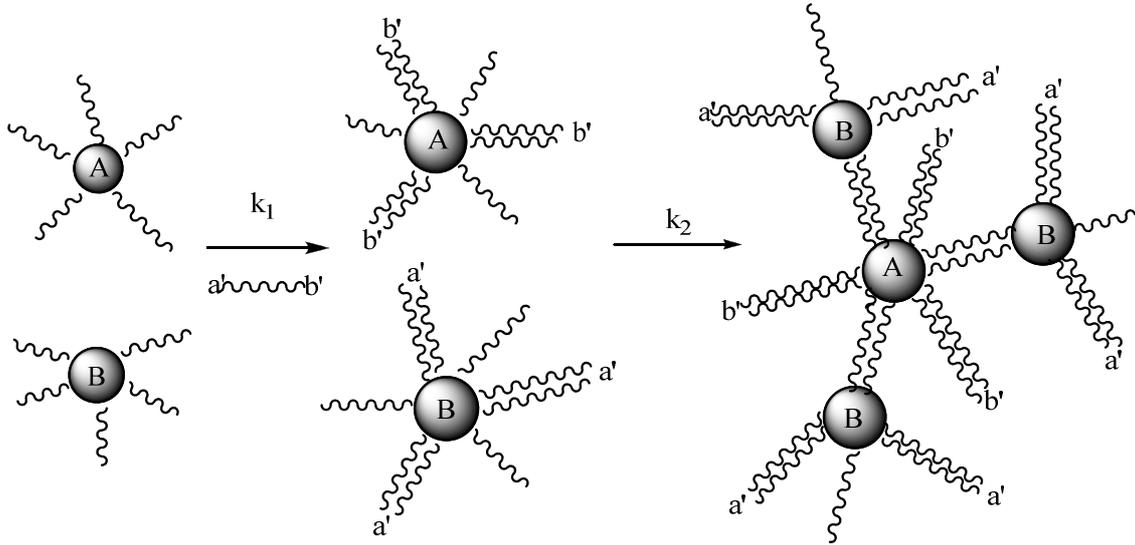
(oligonucleótido/AuNPs) (véase el esquema VI.A), un aumento de la temperatura del sistema produciría un desplazamiento del equilibrio hacia los reactivos y la disociación del complejo formado. Disociación que conlleva un aumento en la fluorescencia del sistema, permitiendo determinar la temperatura de melting del sistema, T_m , a partir del valor máximo de la representación de la primera derivada de la curva de melting ($[\partial I/\partial T]$) en función de la temperatura, T . En el caso del sistema (ii) la determinación de la temperatura de melting se llevó a cabo por un procedimiento similar, pero en este caso siguiendo la disminución de fluorescencia del sistema al aumentar la concentración de quencher. Distintas concentraciones iniciales de los reactivos produjeron diferentes temperaturas de disociación. Una representación lineal de $1/T_m$ frente a $\ln C_T$ (C_T es la concentración total de nanopartícula y fluoróforo (i) o de quencher más fluoróforo (ii)), permitió la determinación de los parámetros de equilibrio de ambos sistemas (ΔH^0 , ΔS^0 , K) de acuerdo con la ecuación de Breslauer¹⁹:

$$\frac{1}{T_m} = \frac{R}{\Delta H^0} \ln C_T + \frac{\Delta S^0 - R \ln 4}{\Delta H^0} \quad (14)$$

La diferencia entre las constantes de asociación en ambos sistemas tipo se explicó de acuerdo con la alta densidad de hebras complementarias de ADN en torno al centro de oro de la nanopartícula (sistema i), en comparación con la menor densidad de hebras existentes en el caso del sistema ii.

Como se mencionó anteriormente, estudios cinéticos de los procesos de hibridación/deshibridación de nanopartículas unidas covalentemente a oligonucleótidos son menos frecuentes, que los estudios termodinámicos. Storhoff y colaboradores²⁰ emplearon las técnicas de espectroscopía de UV-vis, “dynamic light scattering” (DLS) y medidas de velocidades de sedimentación, para estudiar las velocidades de crecimiento de agregados de nanopartículas de Au de 15nm. Estas nanopartículas fueron modificadas covalentemente con oligonucleótidos, de diferente tamaño, variando éste entre 24 y 72 pares de bases. Es importante destacar que este tipo de estudios resulta fundamental en el desarrollo de sensores colorimétricos de ADN. Los sensores de ADN que emplean nanopartículas funcionalizadas con oligonucleótidos poseen una alta especificidad, ya que la velocidad de crecimiento de los agregados depende, entre otros factores, tanto del tamaño del oligonucleótido que está unido a la nanopartícula, como de la distancia promedio entre las mismas. Se consideran dos procesos críticos en la

velocidad de formación de los agregados, que son: (i) la velocidad de unión de la cadena de ADN a la hebra complementaria (hibridación), que puede caracterizarse por una constante k_1 , y (ii) la velocidad de crecimiento de los agregados, a partir del ADN ya hibridado en la nanopartícula, caracterizado por una constante k_2 . Se postuló que ambos procesos tenían lugar en dos pasos sucesivos, representados en el esquema V:



Esquema V

Sin embargo, no se llegaron a cuantificar las constantes de velocidad, k_1 y k_2 , de ambos pasos. Únicamente se aportaron pruebas cualitativas sobre la dependencia de la velocidad de crecimiento del agregado al variar el tamaño de los oligonucleótidos. Según la relación de Stokes-Einstein, el coeficiente de difusión D_s del oligonucleótido es inversamente proporcional al radio hidrodinámico, R_h :

$$D_s = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (15)$$

Donde R_h es proporcional al radio de giro de la molécula, R_g , que a su vez está relacionado directamente con el tamaño de la molécula de oligonucleótido ($R_g = Lp/3)^{1/2}$). De acuerdo con esta expresión, se espera que la velocidad de difusión de una cadena de oligonucleótido a la nanopartícula (funcionalizada con las hebras complementarias) sea menor cuanto mayor sea el tamaño del oligonucleótido.²¹ Esto se traduciría en una disminución de la velocidad de hibridación del sistema, representada

por la constante k_1 en el esquema V. Por otro lado, cualitativamente hablando, puede suponerse que la constante de velocidad de crecimiento del agregado, k_2 (segundo paso del mecanismo, esquema V) también sería menor en el caso de nanopartículas funcionalizadas con cadenas de oligonucleótidos de mayor tamaño, debido en parte al mayor impedimento estérico que ofrecerían las mismas al aumentar el tamaño de la cadena. Por tanto, en conclusión, la velocidad de ambos procesos se vería ralentizada tanto más cuanto mayor fuese el tamaño del oligonucleótido. Este comportamiento, se comprobó empleando la técnica de DLS, esto es, siguiendo el cambio del diámetro efectivo del agregado en función del tiempo. Se encontró que nanopartículas funcionalizadas con oligonucleótidos de menor tamaño producían un cambio en el diámetro efectivo mayor que en el caso de oligonucleótidos de mayor tamaño, para un mismo intervalo de tiempo t (~20 min). Sin embargo, como se indicó anteriormente no se llevó a cabo un análisis cuantitativo de las constantes de velocidad de los distintos pasos del mecanismo propuesto.

Estudios más recientes han permitido una primera estimación de las constantes de velocidad de agregación de estos sistemas, haciendo uso de la ley de Avrami para el crecimiento por nucleación de agregados moleculares.²² La cinética de multitud de reacciones heterogéneas es demasiado compleja para tratarse de forma analítica y, por tanto es necesario recurrir a ecuaciones empíricas. Una de ellas, que puede aplicarse al crecimiento isotrópico de agregados de nanopartículas, la constituye la ecuación integral de Johnson-Mehl-Avrami (JMA), definida a partir de la relación:

$$\chi = 1 - \exp(-((t - t_0)/\tau)^n) \quad (16)$$

En esta expresión, χ es la fracción de volumen del agregado; t_0 es el tiempo inicial; $1/\tau$, es una constante de velocidad cuyo valor está influenciado, en cierta forma, por la geometría del agregado; y n , es el exponente de Avrami, que depende del mecanismo de crecimiento del agregado, que está vinculado con la forma de las partículas que lo componen. Esta ley de crecimiento exponencial, que se aplica a la cinética de procesos de cambios de fases, implica que la densidad de los núcleos de la nueva fase es constante y que el crecimiento ocurre en una sólo dimensión. Es decir, el movimiento de la interfase ocurre en una sola dirección.

La agregación de nanopartículas de oro funcionalizadas con ADN produce cambios conformacionales en el polímero.²³ Estos cambios se reflejan en las variaciones en la banda de plasmón de superficie (SPB) de la nanopartícula, y pueden seguirse, fácilmente, empleando la técnica de espectroscopía de absorbancia. Maye y colaboradores²⁴ estudiaron tres sistemas diferentes de nanopartículas de oro funcionalizadas con ADN de 9.6 nm de diámetro, con el objeto de investigar la cinética de agregación de estos sistemas, en función de las características de las hebras de oligonucleótido unidas covalentemente al centro de oro. El sistema I, estaba constituido por nanopartículas de oro funcionalizadas con cadenas de ADN de hebra simple; mientras que en el sistema II, las cadenas de ADN fueron primero parcialmente hibridadas, formando un sistema más rígido compuesto por cadenas dobles de ADN unidas al centro de oro, fundamentalmente. Por último, en un tercer sistema, se mezclaron cantidades equivalentes de los sistemas I y II. Las modificaciones en el espectro de absorbancia (banda SPB de las distintas nanopartículas) que acompañan al proceso de agregación en los distintos sistemas pueden resumirse en un desplazamiento hacia el rojo en el máximo de longitud de onda, acompañado por un ensanchamiento de la banda y una disminución del coeficiente de absorción del sistema. La cinética de agregación fue monotorizada siguiendo la absorbancia del plasmón de superficie de los diferentes sistemas en función del tiempo, a una longitud de onda fija de 525 nm. La variación de la absorbancia, a esta longitud de onda, se supuso que era debida principalmente a partículas individuales y agregados relativamente pequeños (de menos de unos cientos de átomos de oro). Desde un punto de vista cualitativo, la cinética de agregación del sistema I fue mucho más lenta que la correspondiente al sistema II. Para cuantificar estas diferencias, se hizo uso de la ley de Avrami.²² Aplicando esta ley a los cambios de absorbancia registrados a 525 nm:

$$A = A_0 \exp(-((t - t_0)/\tau)^n) \quad (17)$$

En esta expresión A_0 , está directamente relacionada con la concentración de partículas/pequeños clústers, C , en disolución. El ajuste de los datos experimentales a la ecuación 17, permitió una estimación de la velocidad de crecimiento de ambos sistemas. Los valores de τ encontrados fueron 568, 492 y 328 min para los sistemas I, III y II, respectivamente. Estos resultados apuntan, más bien, a que un aumento en la rigidez del ADN que está unido covalentemente a la nanopartícula, hace más rápida la cinética de

agregación del sistema. Esta aproximación es importante, ya que, puede extrapolarse a otros sistemas más sofisticados de nanomateriales, con el objeto de mejorar su construcción y diseño.

A pesar de que en la bibliografía se encuentran numerosos estudios relativos a los procesos de agregación de nanopartículas covalentemente unidas al ADN, y de hibridación/deshibridación de las cadenas de ADN unidas al centro de oro, estudios de la interacción no-covalente de sistemas ADN-nanopartícula²⁵, y de forma más particular con largas cadenas de ADN, son relativamente escasos en la literatura científica.^{25a,26} La interacción de los sistemas de nanopartículas con largas cadenas poliméricas es de importancia en relación con el campo de la medicina y la biología molecular. Dentro del núcleo de las células eucariotas, y más específicamente en el interior de la cromatina, el ADN se encuentra empaquetado y unido fuertemente a proteínas. La cromatina es un complejo de ADN y proteínas cuyo componente proteico se designa conjuntamente con el nombre de histonas (H₁, H_{2A}, H_{2B}, H₃ y H₄). Éstas contienen muchos residuos de arginina y de lisina, lo cual les confiere una carga positiva, siendo su estructura bastante similar en todos los organismos vivos y su tamaño del orden de unos pocos nanómetros.²⁷ La carga positiva de las histonas permite una unión rápida de éstas al ADN, a través de las cargas negativas de los grupos fosfato de la macromolécula. Una de las características fundamentales de la cromatina es que su estructura permite, además, un empaquetamiento ordenado de las moléculas de ADN, posibilitando a su vez que se lleven a cabo procesos tan importantes como la expresión de la información genética y la replicación del ADN. De ahí que el estudio de estas estructuras sea de importancia. De todas las histonas, la secuencia de la histona H₄, en particular parece notablemente bien conservada a lo largo de la evolución. A pesar de ello, una determinada histona puede sufrir numerosos cambios durante el ciclo celular. Procesos como la fosforilación o la acetilación de la histona H₄, pueden desempeñar un papel regulador en los procesos de transcripción y replicación del ADN. Así, por ejemplo, cuando el residuo N-terminal es fosforilado por una quinasa, la carga neta del residuo terminal puede variar desde +1 a -1. Estos cambios pueden alterar la afinidad del dominio N-terminal de la histona H₄ por el ADN y alterar también la afinidad de la histona por otras proteínas. Durante la mayor parte del ciclo celular, la cromatina se encuentra en forma de filamentos delgados de 30 nm de espesor. Sin embargo, en los seres humanos, la longitud de estas fibras oscila entre 0.25 y 2 nm. Por eso, la estructura

de la cromatina es muy condensada. En este sentido, el sistema ADN-nanopartícula, constituye un modelo que simula las interacciones que ocurren entre las proteínas y el ADN en las histonas. De acuerdo con ello, en las últimas décadas investigaciones relativas a la estructura microscópica de diferentes complejos compuestos por moléculas de ADN de gran longitud, y diferentes agentes complejantes, han sido consideradas de interés.^{25a,26,28} Algunos de estos estudios han clarificado que el modo de interacción entre largas cadenas de ADN semiflexibles y nanopartículas, está estrechamente correlacionado con la conformación del ADN, la rigidez de la cadena y el tamaño de la nanopartícula.^{25a,26} De forma específica, estudios estructurales de complejos ADN/nanopartícula, han sugerido la existencia de diferentes tipos de estos complejos y distintos modos de unión, que dependen, de hecho, del tamaño de la nanopartícula y la longitud de la cadena de ADN. Estos complejos son debido a la adsorción del ADN en la superficie de la nanopartícula (“adsorption”), envoltura de las nanopartículas por el ADN (“wrapping”), y asociación de las nanopartículas a la cadena de ADN (“collection”).^{25a}



Mecanismo de Adsorción



*Mecanismo de envoltura
del ADN*



Asociación simple

La determinación de la existencia de un complejo u otro se puede llevar a cabo por combinación de la observación directa, del número de nanopartículas por cadena de ADN mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión, medidas de microscopía de fluorescencia y estudios teóricos de simulación molecular. Anatoly y colaboradores^{25a} determinaron así los diferentes tipos de complejos de ADN (T4, 166000 pares de bases) con nanopartículas de oro, en condiciones de completa compactación del biopolímero. De esta forma, distinguieron entre nanopartículas XL,

(de entre 5 a 8 nanopartículas por cadena de ADN); nanopartículas L (entre 40 y 50 NPs por cadena de ADN); nanopartículas M (entre 600 y 1200 NPs por cadena); y nanopartículas S, que contenían más de 5000 nanopartículas por cadena. En el caso de las nanopartículas de gran tamaño, XL y L, se postuló que estas interactuaban con el ADN mediante el denominado mecanismo de adsorción. Esta forma de complejación está caracterizada por la existencia de una gran cantidad de ADN adsorbido por nanopartícula y por tanto, un pequeño número de partículas complejadas por cadena de ADN. En cambio, las nanopartículas de tamaño intermedio, en relación con la longitud de la cadena de ADN de tipo M, presentan un mecanismo de envoltura como modo de interacción característico, en el que la rigidez de la cadena de polímero llega a ser significativamente importante y la complejación se alcanza mediante una o varias vueltas de la cadena de ADN alrededor de las nanoesferas. Finalmente, en el caso extremo de pequeñas nanopartículas tipo S, el mecanismo de interacción es el de asociación simple, en el que las pequeñas nanopartículas se adsorben en la superficie del ADN. En este caso, el número de nanopartículas requerido para saturar una larga cadena del biopolímero como el ADN genómico de tipo T4 es extremadamente grande.

Independientemente del tipo de mecanismo de asociación implicado en los distintos sistemas ADN/nanopartícula, la unión de este tipo especial de ligandos con el ADN produce un cambio conformacional reversible en la estructura del ADN conduciendo a éste hacia formas más compactas y condensadas. Este cambio conformacional conlleva, finalmente, la compactación de la biomolécula, como se ha demostrado empleando diferentes técnicas, como difracción circular^{25a,b}, microscopía TEM^{25a,25b,26}, o microscopía de fluorescencia.²⁶

En relación con el grado de compactación del ADN en presencia de nanopartículas, resulta de interés investigar el efecto salino. En general, independientemente del tamaño de la nanopartícula, la adición de sal al sistema ADN/AuNP requiere pequeñas concentraciones de nanopartículas para inducir la compactación de las cadenas de ADN. Se ha comprobado que este efecto resulta más pronunciado en el caso de la interacción de pequeñas nanopartículas (S y M) con ADN.^{25a} Kyungnam y colaboradores²⁹ investigaron el efecto de la adición de ADN y sal en nanopartículas de oro recubiertas con citrato (cargadas negativamente), encontrando que la adición de estos reactivos al sistema producía una modificación en las propiedades electrostáticas de éste, favoreciendo la agregación de las nanopartículas. Esta agregación puede detectarse

fácilmente por la técnica de UV-Vis, debido al cambio de color que experimenta la disolución que contiene la nanopartícula, cuando se añade el ADN y la sal. Este cambio de color se traduce en un desplazamiento en el espectro de absorción de UV-vis del sistema hacia longitudes de onda mayores (hacia el rojo). De hecho, esta propiedad ha permitido el uso de estos sistemas como biosensores para la detección de ADN.³⁰ La agregación del sistema no es detectable hasta concentraciones salinas correspondientes a 0.015 M de NaCl. Por debajo de estas concentraciones se observaron cambios mínimos en el espectro de UV-vis, descartando la agregación de las nanopartículas.²⁹ Por otro lado, la adición de sal produce, además, una desestabilización de las nanopartículas de oro en disolución, debido a un apantallamiento de las repulsiones electrostáticas entre las mismas. Esto último sugiere que el control de la concentración salina del medio permitiría regular, de alguna forma, las repulsiones electrostáticas entre nanopartículas de oro, e inducir la agregación selectiva de las mismas.

Independientemente del tamaño de la nanopartícula, a bajas concentraciones de sal (NaCl), la eficiencia en la compactación del sistema aumenta con la concentración de sal hasta llegar a ser máxima. Así, por ejemplo, el óptimo de compactación de las nanopartículas catiónicas con ADN de elevada longitud de cadena (tipo T4), corresponde a una concentración de NaCl de 0.1 M. Esta concentración de sal concuerda con las concentraciones de sal típicas a nivel fisiológico, cuando se alcanza el óptimo nivel de compactación en las histonas.³¹ Seguidamente, un posterior aumento en la concentración salina produciría el efecto opuesto, originando una fuerte disminución en el grado de compactación del ADN junto con una disminución en la distancia AuNP-AuNP. Este efecto también es similar al que ocurre en las histonas de las células vivas. Esto es, la adición de altas concentraciones de sal induce una pérdida de compactación y complejación.³² En presencia de fuerza iónica elevada (~0.5 M de NaCl), la cromatina de las células eucariotas se desenrolla, parcialmente, debido a distorsiones en las interacciones histona-ADN. Estas interacciones se producen entre los cationes de la sal y los grupos fosfato del ADN cargado negativamente, así como entre los aniones de la sal y las histonas cargadas positivamente.

El efecto de la concentración de sal en la interacción ADN-nanopartícula ha sido estudiado también mediante técnicas estructurales y de simulación por dinámica molecular, en el caso de nanopartículas catiónicas.^{25a}

De todo lo anteriormente expuesto se deduce que se han empleado una gran variedad de técnicas estructurales y espectroscópicas para caracterizar la interacción de nanopartículas con ADN. Sin embargo, se han dirigido pocos esfuerzos a la cuantificación de parámetros termodinámicos como la energía libre, la entalpía o la entropía del proceso, y menos aún hacia los aspectos cinéticos.

Entre los primeros estudios relativos a la termodinámica de interacción no-covalente ADN/nanopartícula, destaca el de J. Murphy y colaboradores.³³ Estos autores emplearon partículas coloidales catiónicas semiconductoras de CdS³⁴ del tamaño de proteínas (tamaño promedio por MET~ 4nm), también llamadas “quantum dots”, para estudiar su interacción con pequeños oligonucleótidos (~100 pares de bases). Uno de los objetivos fundamentales del trabajo era emplear estos sistemas para simular la interacción del ADN con proteínas, y al mismo tiempo detectar las diferentes estructuras del ADN presentes en disolución acuosa. De acuerdo con ello, se determinó que la superficie luminiscente de las partículas de Cd²⁺, servía para discriminar entre oligonucleótidos con diferente estructura en disolución: recta (“straight”), curvada (“bent”) y retorcida (“kinked”). La termodinámica de interacción de las nanopartículas de Cd²⁺ y oligonucleótidos se evaluó mediante la técnica de espectroscopía de fluorescencia siguiendo el quenching que ofrecía la unión del oligonucleótido en la fluorescencia de las nanopartículas. A partir de los cambios de intensidad de fluorescencia registrados en el sistema, se determinó tanto la fracción de superficie recubierta de la partícula, θ , como la fracción de cambio de la intensidad³⁵:

$$\theta = \ln(I/I_{\text{ref}})/\ln(I_{\text{sat}}/I_{\text{ref}}) \quad (18)$$

En esta expresión, I_{ref} , I_{sat} corresponden a la intensidad de referencia ($\theta = 0$), y saturada ($\theta = 1$), respectivamente, e I representa valores de intensidad intermedios. La fracción de superficie recubierta, θ , ($\theta = KC/(1+KC)$) a cada concentración de oligonucleótido, C , se analizó mediante la teoría de Frisch-Simha-Eirich (FSE) para largos polímeros adsorbidos a una superficie plana.³⁶ Este modelo se diseñó, inicialmente, para estudiar la formación de monocapas que surgen de la adsorción de macromoléculas flexibles (sustrato) a un receptor (la nanopartícula, en el caso que nos ocupa). Para cadenas muy largas de polímero, se considera que estos están constituidos por unidades (o segmentos) equivalentes susceptibles de unirse a la superficie del receptor. De acuerdo

con ello y a partir de consideraciones de tipo estadísticas, la forma de la isoterma de adsorción que predice el modelo FSE, es la siguiente:

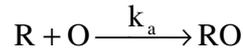
$$\frac{[\theta \exp(2K_1\theta)]}{(1-\theta)} = (KC)^{1/\nu} \quad (19)$$

En esta isoterma, la constante de equilibrio K_1 es función de los segmentos de polímero adsorbidos; K es la constante de equilibrio de la interacción; y ν es el número promedio de segmentos unidos a la superficie de la nanopartícula. La aplicación de este modelo a la interacción polímero/nanopartícula, implica los siguientes supuestos: (i) la nanopartícula contiene un número fijo de sitios susceptibles de adsorción por el polímero. La deposición de todas las cadenas de polímero sobre la superficie de la nanopartícula se considera altamente improbable, y por tanto sólo una fracción, θ , de los sitios de unión son ocupados (a cada concentración de polímero C y temperatura T). (ii) Cada sitio de la nanopartícula puede ocuparse por una sólo molécula de polímero (iii) A niveles bajos de ocupación de la superficie, el calor de adsorción es el mismo en todos los sitios, siendo independiente de θ y proporcional a la raíz cuadrada del peso molecular del polímero. (iv) las moléculas de polímero adsorbidas no interactúan entre sí. Para el caso particular en que $K_1 = 0$ y $\nu = 1$, la ecuación se reduciría a una isoterma de Langmuir simple.

En el análisis de los datos experimentales a la isoterma FSE se hizo la suposición de que K_1 tenía el mismo valor ($K_1 = 0.5$), independientemente del tipo de oligonucleótido. Es decir, se abogó por la hipótesis de que la interacción de los oligonucleótidos, enlazados a la superficie de la nanopartícula, entre sí, es independiente de la secuencia de los mismos. El buen ajuste de los datos experimentales al modelo de FSE refleja que muy probablemente, la naturaleza de las interacciones entre polímeros sea electrostática, y por tanto la constante de equilibrio K_1 responda a estas interacciones. De acuerdo con ello se obtuvieron valores aceptables de K , correspondientes a cada una de las diferentes estructuras: $K = 7200M^{-1}$ (para la estructura de ADN retorcida); $K = 4200 M^{-1}$ (para la estructura de ADN curvada) y $K = 1000$ (para la estructura rígida). De los resultados obtenidos, se deduce que los polinucleótidos de estructura retorcida (más curvada) son los que interactúan más favorablemente con las nanopartículas de Cd^{2+} , seguidos de los de estructura curvada y rígida. Estos resultados apuntan, de forma clara, a que la estructura es un parámetro de elevada importancia en la termodinámica de asociación de

los sistemas nanopartícula/ADN. Es importante destacar que en este trabajo se llevó a cabo también un estudio cinético preliminar de tipo cualitativo, siguiendo los cambios en la luminiscencia de las partículas con el tiempo, por la técnica de mezclado manual. En el caso de la cinética de interacción del ADN más enrollado (kinked) con las nanopartículas, se obtuvo una disminución de un 40% de la fluorescencia de las partículas, al añadir los oligonucleótidos a la disolución. Por el contrario, en el caso de las otras estructuras no se detectaron cambios apreciables.

Murphy y colaboradores³⁷, en estudios posteriores, emplearon estas mismas partículas de cadmio, pero a diferencia del caso anterior, se sintetizaron neutralizadas y estabilizadas con mercaptoetanol ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), para el estudio de la termodinámica y cinética de la interacción con ADN polimérico. La termodinámica de la interacción fue de nuevo analizada mediante medidas de quenching de fluorescencia, en base al modelo de Frisch-Simha-Eirich.³⁶ En este caso, únicamente la interacción de estas partículas con ADN retorcido (“kinked DNA”) pudo detectarse mediante la técnica fluorimétrica, con una constante de asociación de 1800 M^{-1} (cuatro veces menor que la correspondiente a la constante de interacción de este mismo tipo de ADN con las partículas de cadmio, cargadas positivamente). La cinética de interacción de este sistema de nuevo fue seguida mediante los cambios registrados en la intensidad de fluorescencia de las partículas al interaccionar con elevadas concentraciones de ADN. A diferencia del trabajo anterior³³, en este caso, se llegó a obtener, aunque de forma aproximada, una cuantificación de la cinética de interacción ADN-nanopartícula. Los datos cinéticos fueron ajustados en primera aproximación, a la formulación de Von Hippel para la cinética de asociación de proteínas al ADN.³⁸ Según este modelo, el proceso de asociación ADN-nanopartícula se adaptaría a un modelo mecanístico en dos pasos sucesivos, en el cual el represor, (R), difundiría inicialmente a un sitio de unión del ADN formando un complejo RD, y luego rápidamente, mediante un mecanismo de transferencia directa, se trasladaría hacia un sitio adyacente de la cadena polimérica, para quedar localizado en el operador (O), sitio al que finalmente quedaría unido el represor para formar el complejo RO. Ambos procesos son de carácter reversible. Murphy y colaboradores³⁷ adaptaron este mecanismo al estudio de la cinética de asociación ADN/nanopartícula. Los datos cinéticos se analizaron en términos de una reacción de segundo orden. En estas condiciones, la ecuación de velocidad integrada correspondiente para un proceso irreversible de segundo orden es la siguiente:



(Esquema VI)

$$\left[\frac{1}{[R] - [O]} \right] \ln \left[\frac{[O]([R] - [RO])}{[R]([O] - [RO])} \right] = k_a t \quad (20)$$

En esta expresión [R] es la concentración de partícula libre; [O] es la concentración de ADN libre; y [RO] la concentración de ADN enlazado a la partícula. Esta simplificación del tratamiento de von Hippel, implica que la asociación ADN/nanopartícula consiste en una reacción irreversible de segundo orden en el que no se ha considerado el paso inverso del equilibrio (véase esquema VI), ya que en las condiciones experimentales la reacción de disociación es suficientemente lenta como para no ser considerada, en primera aproximación, en el tratamiento de los datos cinéticos. Cabe reseñar que el tratamiento de los datos no es del todo riguroso, y supone una simplificación del problema real, ya que su aplicación requiere el cumplimiento de ciertas premisas, que de hecho no cumple éste sistema. Por ejemplo: (i) El ADN empleado en este estudio es de pequeño tamaño, frente al ADN de longitud infinita que exige el modelo; (ii) el hecho de que las constantes termodinámicas deben ser elevadas, frente a un valor de $K = 1800 \text{ M}^{-1}$ para la interacción del ADN retorcido con la nanopartícula; (iii) la constante de velocidad del proceso inverso debe ser despreciable. A pesar de todo, salvando todos estos inconvenientes, la aplicación de la formulación de Von Hippel a la cinética de asociación de nanopartículas al ADN produjo un valor de la constante de velocidad directa aproximado de $k_a = 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($[\text{ADN}] = 940 \text{ } \mu\text{M}$; $[\text{CdS}] = 1 \text{ } \mu\text{M}$).

En el caso de las partículas de cadmio cargadas positivamente, se postuló que la fuerza impulsora de la reacción era fundamentalmente de naturaleza electrostática. Sin embargo, no puede deducirse lo mismo en el caso de la interacción de estas partículas neutras con el biopolímero. En este caso, parece probable la participación de interacciones derivadas de los enlaces de hidrógeno;³⁹ de van Der Waals o hidrofóbicas;⁴⁰ y la eliminación de moléculas de disolvente de la superficie del ADN y/o de la partícula.⁴¹ Los datos termodinámicos y cinéticos correspondientes a la interacción de estas partículas de cadmio, neutras, con ADN (en comparación con los obtenidos en la interacción de las partículas análogas cargadas positivamente), sugiere

que incluso en ausencia de interacciones electrostáticas, la secuencia y estructura del ADN afecta a la asociación de sustratos del tamaño de proteínas (partículas de cadmio). Esto es, la estructura y flexibilidad del polímero juega un papel fundamental en la interacción.

Posteriormente, en un intento de comprender en mayor profundidad la termodinámica de interacción de estas partículas de cadmio con ADN, se llevó a cabo un estudio de la influencia de la temperatura en la interacción de estas nanopartículas con el ADN, obteniéndose las contribuciones entrópicas y de entalpía a la energía libre; también se estudió el efecto de la concentración salina en la interacción⁴². Para el estudio termodinámico en función de la temperatura (25 - 50°C), se empleó ADN del tipo CT (de ~10000 pares de bases de longitud), debido a que su estabilidad a altas temperaturas es mayor comparada con la que presentan pequeños oligonucleótidos. La aplicación de la ecuación de van't Hoff a las constantes de asociación obtenidas ($\sim 10^3 \text{M}^{-1}$), produjo valores de $\Delta H \sim 30 \text{ kJmol}^{-1}$ y $\Delta S \sim 150 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$, siendo la reacción, por tanto, entrópicamente favorable. Este resultado, junto con los estudios realizados mediante el empleo de la técnica de dicroísmo circular, sugirió que la fuerza impulsora de la interacción es la contribución entrópica, siendo la entálpica ligeramente desfavorable. La fuente del incremento de entropía se atribuyó a la eliminación de disolvente, a medida que la asociación ADN/nanopartícula se produce.

Con el objetivo de determinar la contribución electrostática de interacción de estas partículas con el ADN, se estudió la influencia de la concentración de sal en la constante de equilibrio de asociación. Las constantes de asociación a distintas concentraciones de NaCl fueron ajustadas según la siguiente expresión:

$$SK = \partial \log K / \partial \log [\text{Na}^+] = -Z\Psi \quad (21)$$

De acuerdo con la teoría de polielectrolitos, SK equivale al número de contraiones eliminados de la superficie del ADN como consecuencia de la unión con la partícula; Z es la carga en la nanopartícula por grupo fosfato; y Ψ la fracción de contraiones asociados a cada grupo fosfato ($\Psi = 0.88$ para el B-ADN).⁴³ La contribución electrostática a la energía libre de asociación a cada concentración de sal se calculó como:

$$\Delta G_{\text{elec}} = SK(RT)\ln[\text{Na}^+] \quad (22)$$

y la no electrostática, fue determinada de acuerdo con la diferencia entre la energía libre total y la electrostática.⁴³ Los autores encontraron un valor de ~65% para la contribución electrostática. La contribución no-electrostática (~35%) es también significativa, probablemente debido a la combinación de la influencia de los factores ya mencionados, tales como la eliminación de moléculas de agua del sistema, resultado de la interacción ADN-partícula; y la existencia de posibles interacciones de van der Waals entre las bases del ADN y la superficie de la nanopartícula. Estos estudios fueron realizados empleando únicamente, NaCl. En un intento de entender con mayor profundidad el papel que juega la atmósfera iónica que rodea al ADN, en la termodinámica de asociación de éste con las nanopartículas semiconductoras de CdS, Mahtab y colaboradores⁴⁴ llevaron a cabo un estudio posterior de la influencia de distintos cationes bivalentes, Cd^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , en la termodinámica de asociación de nanopartículas de CdS de 4.5 nm con pequeños oligonucleótidos. La interacción de cationes con ADN ha sido explorada extensamente y se ha demostrado que está íntimamente relacionada con la estructura del ADN y la dinámica de plegamiento de la macromolécula en torno a la superficie de la nanopartícula, que depende de la flexibilidad y secuencia del ADN.⁴⁵ La atmósfera iónica que rodea al ADN juega un papel importante en la estructura, dinámica y empaquetamiento en disolución de la biomolécula. De hecho, estudios estructurales corroboran que cationes bivalentes como el Zn^{2+} y Mg^{2+} inducen la curvatura en el ADN,⁴⁶ debido a la localización preferente del catión bivalente en el surco principal del ADN, que promueve la curvatura del biopolímero hacia este surco; mientras que una localización preferente del catión bivalente en torno al surco secundario, produciría una curvatura de la macromolécula hacia este otro surco. De acuerdo con esto, resulta de interés, en comparación con los estudios anteriores de estas mismas nanopartículas en presencia de cationes sodio monovalentes⁴², el estudio de la termodinámica de interacción, en presencia de cationes bivalentes, de las diferentes estructuras del ADN (rígida, curvada y retorcida), con ligandos que presenten superficies curvas, como ocurre en el caso de las nanopartículas. Las constantes de equilibrio de interacción de estos tipos de ADN y las nanopartículas de Cd^{2+} se determinaron según la técnica de fluorescencia, siguiendo la variación que experimenta la fluorescencia de la nanopartícula, al aumentar la concentración de ADN, en presencia de cada uno de estos cationes bivalentes. El análisis de los datos

termodinámicos se realizó de nuevo de acuerdo con el modelo de Frisch-Simha-Eirich (FSE)³⁶ (véase ec. 19). Las constantes de equilibrio evaluadas para las distintas estructuras de ADN fueron del orden de 10^3 - 10^4 M⁻¹, similares a las encontradas para la interacción no-específica de proteínas y ADN.⁴⁷ Estas, además, disminuyeron en el orden: $K_{Zn^{2+}} \sim K_{Mg^{2+}} \gg K_{Cd^{2+}}$, siendo a su vez mayores para el ADN de estructura retorcida (“kinked”), seguida del ADN de estructura curvada y el ADN rígido. Una explicación de los resultados obtenidos se llevó a cabo atendiendo tanto al valor que presentaban las constantes de asociación de los diferentes cationes al ADN en ausencia de nanopartículas, como al efecto de estas sales sobre la curvatura de los oligonucleótidos, cuya eficiencia en orden de magnitud sigue la misma tendencia que las constantes de asociación observadas. Esta idea está íntimamente relacionada con el hecho de que la energía del sistema ADN/nanopartícula se minimiza a medida que la superficie de contacto entre la nanopartícula (de superficie esférica) y el ADN se hace máxima. Atendiendo a la diferente capacidad de las sales para curvar al ADN, los iones magnesio y zinc, permitirían una mejor adaptación del oligonucleótido a la estructura curva de la nanopartícula, en comparación con el Cd²⁺. Esto minimiza el coste energético de la asociación y conlleva un aumento en la constante de equilibrio.

Otros estudios termodinámicos de interacciones no-covalentes en sistemas de ADN, pero en este caso con nanopartículas de oro, fueron realizados por Gosh y colaboradores.⁴⁸ Estos autores emplearon nanopartículas estabilizadas con cadenas de L-aminoácidos catiónicas y neutras de diferente estructura con ADN marcado en su estructura con una sonda fluorescente, fluoresceína isotiocianato (FITC). Se encontró, empleando la técnica de dicroísmo circular, que la estructura secundaria del ADN era distorsionada por la asociación de las nanopartículas, siendo el grado de distorsión de la misma dependiente de la estructura de la cadena de aminoácido. La termodinámica de asociación de estas partículas al ADN fue investigada siguiendo la disminución de la fluorescencia del ADN modificado con FITC, al aumentar la concentración de nanopartícula. La fluorescencia del marcador, unido covalentemente al ADN, disminuía debido a la transferencia de energía existente entre el fluoróforo y el centro de oro.⁴⁹ Las intensidades de fluorescencia fueron analizadas mediante un método de ajuste no-lineal.⁵⁰ El análisis de las constantes termodinámicas de asociación de estas nanopartículas modificadas con aminoácidos de diferente carácter hidrofóbico e hidrofílico, reveló que las nanopartículas estabilizadas con cadenas de aminoácidos

cati6nicos de car6cter hidrof6lico, NP-L-Lys ($K = 165 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) y NP-L-Arg ($K = 129 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), presentaban constantes de afinidad un orden de magnitud mayor que en el caso de las nanop6rticulas estabilizadas con amino6cidos neutros y de car6cter hidrof6bico, como la NP-L-Phe ($K = 49 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) y el NP-L-Trp ($K = 47 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). Estos resultados indican que las nanop6rticulas de car6cter hidrof6lico son capaces de acomodar m6s cadenas de ADN en su superficie que aquellas con cadenas de naturaleza hidrof6bica, dominando por tanto la interacci6n electrost6tica sobre la hidrof6bica. Lo que antecede est6 de acuerdo con los resultados de Mathab y colaboradores sobre la asociaci6n de nanop6rticulas de CdS, en lo que respecta a la mayor importancia de las interacciones electrost6ticas frente a las no-electrost6ticas, en la termodin6mica de interacci6n de este tipo de nanop6rticulas con ADN. Adem6s, los resultados de ambos autores sugieren que la eficiencia en la regulaci6n y el transporte g6nico podr6an modularse mediante la elecci6n de nanop6rticulas con caracter6sticas estructurales adecuadas como vectores.

M6s recientemente, se han llevado a cabo estudios sobre la termodin6mica de interacci6n de peque6as nanop6rticulas de car6cter neutro con grandes cadenas de ADN (~800 pares de bases).⁵¹ En estos estudios, se ha examinado la interacci6n con ADN, de tipo CT, con nanop6rticulas de CdS de 2.3 nm estabilizadas con mercaptoetanol; y nanop6rticulas de Au de 2.8 nm estabilizadas con un derivado de etilenglicol. En el caso de las nanop6rticulas de cadmio, la determinaci6n de la constante de asociaci6n de 6stas al ADN fue posible mediante la t6cnica de espectrofotometr6a de absorbancia, mientras que en el caso de las nanop6rticulas de Au, la existencia de peque6as variaciones en la banda de SPB hizo imposible su determinaci6n. La constante de equilibrio K , fue analizada de acuerdo con una extensi6n del modelo de Hildebrand-Benessi⁵² para la evaluaci6n de constantes de equilibrio sustrato/ligando:

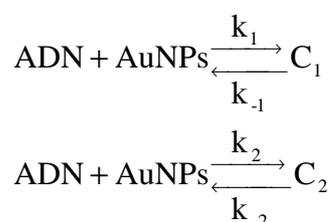
$$\frac{C_{\text{ADN}} C_{\text{CdS}_{\text{NP}}}}{\Delta A} + \frac{\Delta A}{\Delta \epsilon^2} = \frac{1}{K \Delta A} + \frac{1}{\Delta \epsilon} (C_{\text{ADN}} + C_{\text{CdS}_{\text{NP}}}) \quad (23)$$

En esta expresi6n, C_{ADN} es la concentraci6n de ADN en pares de bases y $C_{\text{CdS}_{\text{NP}}}$ es la concentraci6n de nanop6rticulas expresada en gramos de Cd por litro; $\Delta A = A - A_0$; $\Delta \epsilon = \epsilon_{\text{NP/ADN}} - \epsilon_{\text{NP}}$; A y A_0 son los valores de densidades 6pticas de la nanop6rticula en presencia y en ausencia de ADN, respectivamente. $\Delta \epsilon$, se estim6, en primera aproximaci6n, mediante la amplitud de la curva de titulaci6n. El valor de $\Delta \epsilon$ obtenido

se usó para re-evaluar el miembro izquierdo de la ecuación 23, y el procedimiento se repitió hasta convergencia. La constante de equilibrio para la interacción de las nanopartículas neutras de cadmio con ADN es de $2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ($K' = 130 \times K$, si la concentración de CdS se expresa por molécula de nanopartícula, 1 nanopartícula/130 moléculas de CdS). El alto valor de la constante de equilibrio para las nanopartículas de cadmio, en comparación con las obtenidas por otros autores,³⁷ se explicó como una consecuencia de la gran longitud de las fibras de ADN (800 pares de bases) empleada en estos nuevos experimentos. El empleo de ADN de mayor longitud, de acuerdo con los autores, mejora las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas puestas en juego en la interacción⁵³, que son la fuerza impulsora de la reacción. Por otro lado, el tamaño del agente protector de la superficie de la nanopartícula también puede jugar un papel fundamental en la eficiencia de la interacción. Así, el tamaño del agente estabilizante de las nanopartículas de cadmio (~3nm) es mucho menor que el correspondiente a las de oro (~9 nm). El surco principal (“major groove”) del ADN posee alrededor de 1.8 nm de anchura y 1 nm de profundidad, por tanto, de acuerdo con ello, es de esperar que las nanopartículas de cadmio sean más susceptibles de interactuar mediante interacciones tipo hidrofóbico con los surcos del ADN, que las de Au.

A pesar de que los sistemas ADN/nanopartícula han sido ampliamente estudiados durante las últimas décadas mediante técnicas estructurales y termodinámicas, una comprensión de los mecanismos que controlan el comportamiento cinético de estos sistemas resulta de interés para el desarrollo de diferentes aplicaciones. Un protocolo para la regulación de la cinética de asociación ADN/nanopartícula, podría ser beneficioso, porque permitiría construir sistemas de detección más sofisticados, con un control más exhaustivo de los métodos de síntesis de estos sistemas por la técnica “bottom-up”. No obstante, existen muy pocos estudios cinéticos y de los mecanismos de interacción de sistemas ADN/nanopartícula. Entre ellos, destaca el llevado a cabo por Murray y colaboradores⁵⁴, referente a la cinética de asociación de nanopartículas de oro con ADN de entre 50-600 pares de bases de longitud. Se emplearon dos tipos de nanopartículas de oro con diferentes agentes protectores en su estructura: nanopartículas de oro (AuNPs) recubiertas con ligandos tiopronina/etidio, y otras estabilizadas con N,N,N-trimetil(mercaptopropionil)glicina/etidio (TMA/etidio) de 1.8 y 4.4 nm de diámetro, respectivamente. La introducción de varias moléculas de bromuro de etidio en la estructura, confiere una mejor selectividad en la interacción con ADN, a

la vez que permite llevar a cabo el seguimiento de la cinética por métodos relativamente simples, como la espectroscopía de fluorescencia. La interacción de la sonda (bromuro de etidio) con el centro de oro, produce un “quenching” en la fluorescencia de la sonda que se elimina, de forma parcial, debido a la intercalación del etidio entre las bases del ADN. Estos cambios en la fluorescencia del sistema constituyen la base para el seguimiento cinético de la reacción. En el caso de la interacción entre las nanopartículas de Au recubiertas por tiopronina/etidio y el ADN, la cinética registrada fue bastante lenta, del orden de horas, muy probablemente debido a la carga parcialmente negativa de los grupos carboxilo de la tiopronina al pH de trabajo (pH = 8). Se descartaron posibles impedimentos estéricos de la nanopartícula respecto a la intercalación del etidio, ya que, cualitativamente, en el caso de las nanopartículas análogas de Au, recubiertas por TMA/etidio, la cinética observada fue muy rápida en las mismas condiciones experimentales (ésta última no fue cuantificada por los autores). Los cambios de fluorescencia registrados en función del tiempo para el sistema Tiopronina/etidio, requirieron dos exponenciales para el ajuste de los datos experimentales. Las constantes de velocidad de los procesos directos de intercalación del bromuro de etidio en el ADN (libre de nanopartícula) son del orden de 10^5 - 10^6 ($M^{-1}s^{-1}$).⁵⁵ En el caso que nos ocupa, la cinética de la interacción de las AuNPs con el ADN, tiene lugar en una escala de tiempo mucho menor. Uno de los motivos más importantes de esta diferencia, quizás sea la carga negativa de la tiopronina al pH de trabajo (pH = 8) y/o la existencia de un paso previo en el mecanismo no detectado mediante la técnica empleada para el seguimiento de la cinética. El mecanismo de reacción propuesto por los autores para la interacción de estas partículas con ADN, fue similar al propuesto anteriormente por Porschke’s para la reacción del bromuro de etidio con ADN⁵⁶:



(Esquema VII)

Se trata de un mecanismo en paralelo con la formación de dos tipos de complejos ADN/nanopartícula, C_1 y C_2 . Se postuló que la formación de ambos tipos de complejos era el resultado de la posible unión de la nanopartícula al surco secundario y principal del ADN (la inter-conversión rápida de los complejos C_1 y C_2 formados, se consideró inexistente en el análisis de los datos cinéticos). Las constantes de velocidad correspondientes a cada paso del mecanismo a la temperatura de 298 K fueron $k_1 = 7 \times 10^{-2} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; $k_{-1} = 1.9 \times 10^{-3}$; $k_2 = 3 \times 10^{-2} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ y $k_{-2} = 1 \times 10^{-4}$. A partir de los valores de estas constantes de velocidad pueden obtenerse las constantes de equilibrio $K_1 = k_1/k_{-1}$ y $K_2 = k_2/k_{-2}$, correspondientes a cada paso del mecanismo. Estas fueron ~ 40 y $\sim 300 \text{M}^{-1}$, respectivamente. Ambas constantes difieren en un factor de 8, muy similar en orden de magnitud al encontrado por Porschke⁵⁶ para las constantes de equilibrio de unión del bromuro de etidio a los surcos mayor y menor del ADN, que se relacionan a través de un factor de 10.

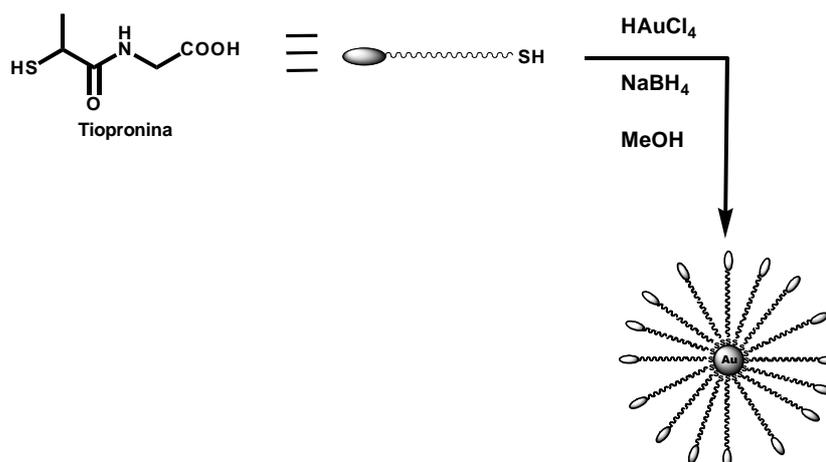
A continuación se presenta un estudio, tanto cinético como termodinámico, de las interacciones no-covalentes entre ADN de hígado de ternera (~ 10000 pares de bases) y nanopartículas de oro funcionalizadas con el ligando tiopronina, de un tamaño aproximado de 1.4 nm.

3.2. Materiales y Métodos.

3.2.1. Materiales.

3.2.1.1. Nanopartículas de oro, Au@tiopronina.

Las nanopartículas de Au@tiopronina fueron preparadas de acuerdo con el procedimiento de Templeton y colaboradores,⁵⁷ que consiste en la reducción con NaBH_4 , en disolución acuosa, de una sal de oro (HAuCl_4), en presencia de un exceso de tiopronina. El nanocluster de oro se protege de esta forma, in situ, a través de un enlace covalente Au-S, formando una capa autoensamblada de tiol en torno al centro de oro. Siguiendo este procedimiento, 1 equivalente de hidrógeno tetracloroaureato (III) trihidrato y 5.5 equivalentes de N-(2-mercaptopropionil)glicina (tiopronina), fueron codisueltos en 35 ml de una mezcla de metanol/ácido acético 6:1, dando como resultado una disolución color rojo rubí. Posteriormente, se añadieron 22 equivalentes del agente reductor, borohidruro sódico, disueltos en 15 ml de agua, manteniendo la mezcla en constante y rápida agitación después de haberse enfriado. La suspensión resultante color marrón se agitó durante 30 min, y se eliminó el disolvente bajo vacío a 40°C. La muestra cruda resultante fue completamente insoluble en metanol, pero soluble en agua. El crudo se disolvió en 20 ml de agua, se ajustó el pH hasta un valor de 1, gota a gota, con una disolución de ácido clorhídrico concentrada y se sometió a purificación por diálisis. Para la diálisis, la disolución se repartió en segmentos de membrana de 15 cm de éster de celulosa exenta de roturas (Sigma, MWCO = 10.000). Estas membranas se colocaron en un vaso de precipitado que contenía 4L de agua, manteniéndose en lenta agitación, y renovando el agua cada 10 horas durante un periodo de 72 horas. Posteriormente, la disolución fue centrifugada para eliminar los posibles restos de oro por precipitación. El producto resultante fue de 120 mg. Espectros de RMN, indicaron que la tiopronina no se encuentra libre sino ligada covalentemente al oro.



Esquema de la síntesis de las nanopartículas de oro.

Las nanopartículas de oro fueron caracterizadas mediante espectros de ultravioleta visible (UV-vis), análisis elemental de C, H, N, S (14.04 % C; 2.25 % H; 3.51% N; 7.78% S), y microscopía electrónica de transmisión (TEM). De acuerdo con estos datos y los resultados del TEM, la relación entre el número de átomos de Au y ligandos tiopronina fue de 119/105.⁵⁷ La fórmula molecular de las nanopartículas Au@tiopronina sintetizadas es $\text{Au}_{119}(\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2\text{NS})_{105}(\text{H}_2\text{O})_{67}$. Todas las disoluciones de nanopartículas de oro (AuNPs) fueron preparadas por pesada, atendiendo al peso molecular del nanocluster.

3.2.1.2. Disoluciones del agente intercalante, 1-Pirenocarboxialdehído (1-PyCHO).

Las disoluciones madres de 1-PyCHO se prepararon disolviendo una cantidad pesada del sólido en alcohol puro y manteniéndola en la oscuridad. Las disoluciones de trabajo fueron obtenidas por dilución con agua destilada (de conductividad menor que 10^{-6} Sm^{-1}) hasta alcanzar un porcentaje en peso al 5% de etanol y una concentración de 1-PyCHO de $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ en todas las muestras.

3.2.1.3. Disoluciones de ADN.

Las disoluciones madre de ADN fueron estandarizadas espectrofotométricamente, empleando $\epsilon = 6600 \text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ a 258 nm, en tampón cacodilato ($[\text{NaCl}] = 0.1 \text{ M}$; $[\text{cacodilato sódico}] = 0.01 \text{ M}$), para obtener la concentración en nucleótidos o grupos

fosfato.⁵⁸ La concentración de las cadenas dobles de polinucleótido fue expresada en molaridad por nucleótidos, e indicadas como C_N .

3.2.2. Métodos.

El estudio cinético y termodinámico de la interacción ADN/AuNPs, ha requerido el empleo de diferentes técnicas experimentales para la obtención de información, tanto de carácter termodinámico como estructural y cinético. Se han empleado técnicas espectroscópicas como la medida de fluorescencia y de dicroísmo circular para la cuantificación de las constantes de equilibrio ADN/nanopartícula. Para determinar los cambios estructurales en el ADN se han empleado, además, técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía de barrido electrónico (SEM) y dicroísmo circular. Por otra parte, el seguimiento de la cinética de la interacción se ha llevado a cabo por la técnica de flujo detenido, empleando el dicroísmo circular intrínseco del ADN como señal analítica para el seguimiento de la cinética. A continuación, se detallan brevemente los aspectos experimentales.

3.2.2.1. Espectroscopía de fluorescencia.

Las medidas de fluorescencia fueron realizadas en un espectrofluorímetro (Hitachi f-2500), conectado a un PC para la lectura de los datos y la obtención de los espectros. Las medidas de intensidad fueron realizadas a una concentración de sonda $[1\text{-PyCHO}] = 5 \cdot 10^{-7}$ M. La longitud de onda de excitación fue 356 nm y la de emisión 458 nm. Se comprobó que los resultados fueron independientes de la longitud de onda de excitación, en el rango de 300 a 425 nm. Las concentraciones de ADN para la determinación de las constantes de equilibrio ADN/nanopartícula, empleando el agente intercalante 1-PyCHO como sonda, variaron en el rango de 10^{-5} M a 10^{-3} M. Todos los experimentos se realizaron a una temperatura constante de 298.2 ± 0.1 K, y el agua empleada en la preparación de todas las disoluciones contuvo un 5% etanol. La presencia de alcohol fue necesaria para facilitar la solubilidad del 1-PyCHO. Los cambios en la intensidad de fluorescencia de la nanopartícula, en ausencia de 1-PyCHO, se llevaron a cabo para una concentración de nanopartícula $[\text{AuNPs}] = 1.5 \times 10^{-6}$ M en un rango de concentraciones de ADN que varió desde 10^{-5} M a 7×10^{-5} M. La longitud de onda de excitación en este caso fue 451 nm y la de emisión 656 nm. Prácticamente se comprobó la linealidad de los valores de la intensidad de fluorescencia de la

nanopartícula, en ausencia de ADN, en el rango de concentraciones $[AuNPs] = 5 \times 10^{-8}$ - $2.16 \times 10^{-6} M$.

3.2.2.2. Espectroscopía de absorbancia.

El registro de los espectros de AuNPs, en presencia y en ausencia de ADN, fue llevado a cabo en un espectrofotómetro Cary 500 a 298.2 K, en el rango de longitudes de onda de 280 nm a 800 nm. El espectro UV-vis de la nanopartícula muestra una banda de plasmón de superficie (SPB), casi no detectable, como consecuencia del pequeño tamaño de las mismas, en torno a 350 nm (véase Figura 1). Las concentraciones de reactivos empleadas en estos experimentos fueron $[AuNPs] = 1.58 \times 10^{-6} M$; $[ADN] = 6.7 \times 10^{-6} M$ - $9.6 \times 10^{-5} M$.

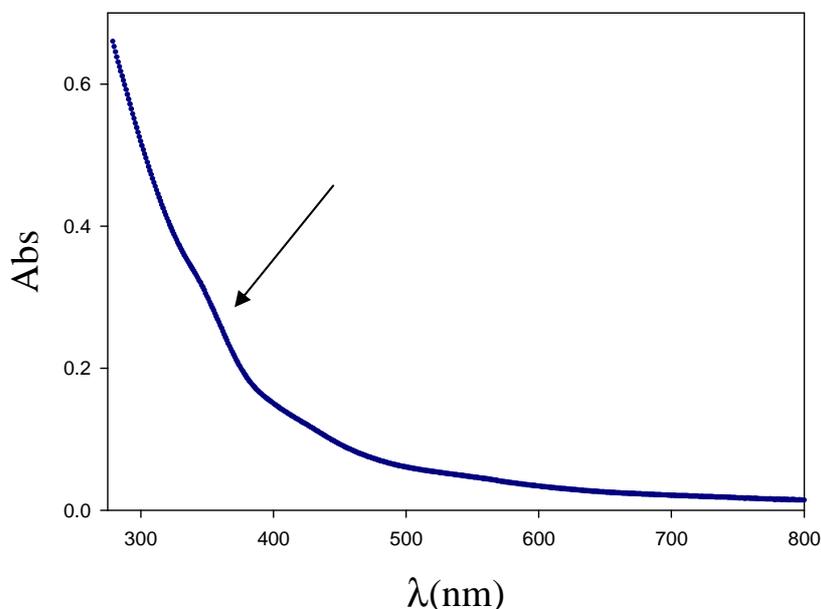


Figura 1. Espectro de UV-vis de las nanopartículas Au@tiopronina.

3.2.2.3. Medidas de dicroísmo circular.

Los espectros de dicroísmo circular (CD) fueron registrados en un espectropolarímetro BioLogic Mos-450. Para las medidas estáticas se empleó una célula de cuarzo estándar de 10 mm. Los espectros fueron expresados en términos de elipticidad, θ . Para cada espectro se realizaron barridos desde 220 nm a 310 nm, a una temperatura constante de 298.2 K. Cada espectro fue obtenido de la suma acumulativa

de 5-10 barridos simples, entre los cuales se dejó un tiempo de equilibrio de 5 min. Todos los espectros se realizaron a una concentración constante de ADN de 10^{-4} M. Los experimentos cinéticos fueron realizados a la misma temperatura mediante la técnica de flujo detenido, empleando un instrumento SF-20 stopped flow (BioLogic) y siguiendo el curso de la reacción haciendo uso del dicroísmo circular intrínseco del ADN como señal de detección. Las medidas se realizaron a una longitud de onda de excitación de 258 nm, usando una cuveta de cuarzo FC-15 para medidas de dicroísmo circular. Todos los experimentos cinéticos se llevaron a cabo empleando una concentración fija de nanopartícula (5×10^{-7} M) y a diferentes concentraciones de ADN (de 1×10^{-4} M a 1×10^{-3} M), a cada concentración de sal. En todos los casos se encontró una dependencia biexponencial de la variable θ (elipticidad) en función del tiempo. La señal registrada fue analizada mediante el programa Jandell. Todos los experimentos cinéticos fueron realizados bajo condiciones de pseudoprimer orden ($[DNA] \gg 10[AuNPs]$). Cada experiencia cinética fue repetida al menos 10 veces y las trazas fueron acumuladas para reducir la razón señal-ruido. La desviación estándar encontrada en los tiempos de relajación fue de un 10 %.

3.2.2.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Para caracterizar las nanopartículas de oro sintetizadas y confirmar la existencia de los clusters de oro unidos a la tiopronina, es necesario un análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se ha empleado la técnica de TEM para determinar el tamaño, el estado de agregación y la distribución de tamaños de las nanopartículas de oro, pero también para observar los cambios conformacionales en el ADN (de forma indirecta), y en las nanopartículas de oro como consecuencia de la interacción con el ADN.

En microscopía electrónica de transmisión, la muestra se irradia con un haz de electrones, aplicando un alto voltaje y sometiendo la muestra a un alto vacío. El haz de electrones pasa a través de una serie de lentes hasta llegar a la muestra y atravesarla. Son los electrones transmitidos los que proporcionan información sobre la muestra, donde la imagen se obtiene a través de una pantalla fluorescente. La observación de muestras por TEM se llevó a cabo depositando una gota (10 μ L) de una disolución acuosa de 0.1 mg/ml de nanopartícula sobre una rejilla de cobre recubierta con una película de carbón. La gota se dejó evaporar al aire durante varias horas a temperatura

ambiente y se introdujo en el microscopio. El análisis de las muestras se realizó en un microscopio electrónico Philips CM 200 trabajando a 200 kV.



Philips CM 200.

En la figura 2, se observa una imagen de las nanopartículas de oro funcionalizadas con tiopronina obtenidas por TEM y el histograma de distribución de tamaños de éstas. El número de partículas consideradas para la estimación del tamaño fue entre 200 y 300 tomadas de distintas fotografías de TEM. El tamaño medio del diámetro de las partículas estimado fue 1.4 ± 0.6 nm.

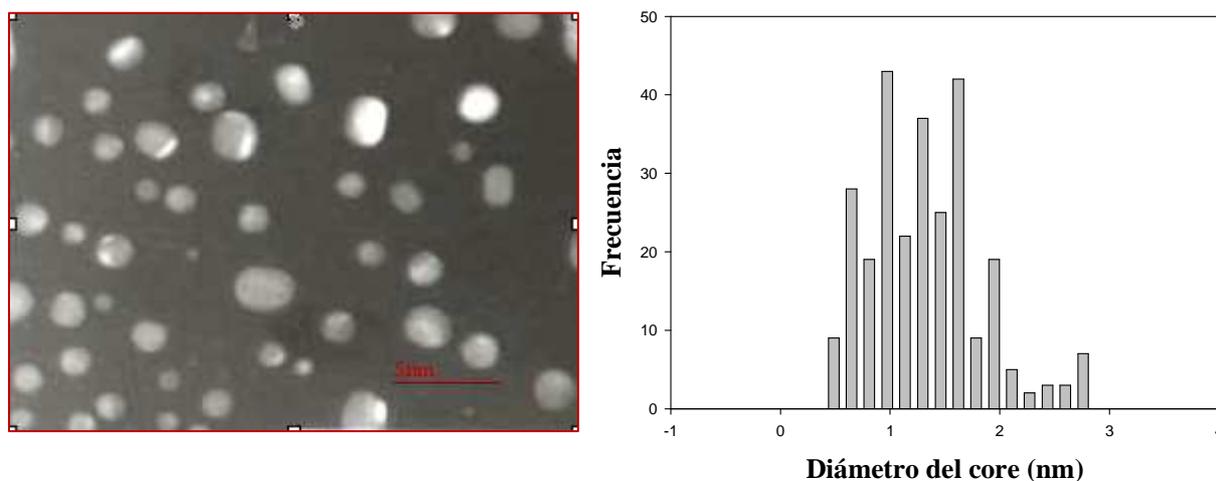


Figura 2. Imágen de TEM de la distribución de tamaño de las nanopartículas de oro.

Por otro lado, para obtener un mayor contraste, se obtuvieron imágenes de AuNPs en presencia de diferentes concentraciones de ADN empleando la técnica de campo oscuro, en combinación con la técnica de selección de patrones de difracción (SADPs). Este estudio confirmó la interacción de las nanopartículas con el ADN y aportó pruebas de la formación de agregados de AuNPs/ADN como se mostrará más adelante.

3.2.2.5. Microscopía de barrido electrónico (SEM).

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido, SEM, fueron llevadas a cabo empleando un microscopio JEOL 6460LV Scheduler. Para la caracterización de las muestras por SEM, se depositó una gota (10 μ L) de una disolución acuosa de ADN o ADN/AuNPs en un porta-muestras y se eliminó el disolvente, dejando la muestra durante un día a temperatura ambiente. Las muestras así preparadas fueron recubiertas con una fina capa de oro (“sputtering”), para mejorar su conductividad.



JEOL 6460LV Scheduler

3.3. Resultados y Discusión.

3.3.1. Estudio termodinámico de la interacción ADN/AuNPs.

Como se ha expuesto en la introducción de este capítulo, la mayoría de los estudios sobre la interacción de ADN con nanopartículas que aparecen en la literatura científica implican la unión covalente de éstas a pequeños oligonucleótidos. Sin embargo, los estudios en disolución sobre interacciones no-covalentes de nanopartículas con largas cadenas de ADN son relativamente escasos. Estudios sistemáticos sobre los cambios conformacionales de estos polielectrolitos inducidos por su unión con los nanosistemas son también relativamente infrecuentes. Por estas razones, se ha llevado a cabo un estudio de la termodinámica de interacción no-covalente entre nanopartículas de oro y ADN de hígado de ternera, con objeto de cuantificar la energía libre de asociación y los cambios conformacionales implicados en la interacción ADN/AuNPs.

La presencia del grupo carboxílico y amino de la tiopronina permite modificar la carga de la nanopartícula en función del pH del medio. En consecuencia, este nanosistema puede emplearse positiva o negativamente cargado. Es importante destacar que todos los experimentos llevados a cabo en este estudio fueron realizados a $\text{pH} = 6$. De acuerdo con el valor de pK_a del ligando tiopronina enlazado al clúster de oro ($\text{pK}_a \approx 5.6 \pm 0.5$)⁵⁷, estas nanopartículas son prácticamente neutras.

Es sabido que las nanopartículas de oro de pequeño tamaño presentan emisión de fluorescencia.⁵⁹ Atendiendo al tamaño de las nanopartículas de Au@tiopronina empleadas en este estudio (1.4 nm), esta propiedad podría aportar información sobre la interacción de estas partículas con el ADN. De acuerdo con ello, se registraron los cambios en el espectro de fluorescencia de la nanopartícula que resultaron de añadir cantidades crecientes de ADN a una disolución que contenía una cantidad fija de nanopartícula ($[\text{AuNPs}] = 1.5 \times 10^{-6} \text{M}$). Previamente, se comprobó la linealidad de la representación gráfica de los valores de intensidad de fluorescencia de la nanopartícula frente a la concentración de nanopartícula, $[\text{AuNPs}]$, para descartar la agregación de los mismos en ausencia de ADN y posibles fenómenos de auto-quenching (véase Figura 3). A bajas concentraciones de AuNPs ($< 2.16 \mu\text{M}$), la intensidad de fluorescencia se mantuvo lineal al variar la concentración de nanopartícula, como puede verse en la figura; sin embargo, a concentraciones más elevadas, la linealidad desaparece, probablemente, debido a la existencia de posibles fenómenos de auto-quenching

producidos por los núcleos de oro de la nanopartícula. Debe resaltarse la importancia del pequeño tamaño del núcleo de las nanopartículas metálicas, en relación con la luminiscencia que éstas presentan en medio acuoso. Murray y colaboradores estudiaron la emisión de nanopartículas de oro recubiertas con el ligando tiopronina de diferentes tamaños (1.8, 2.2, 3.1 and 3.9 nm),⁵⁹ encontrando que la luminiscencia era más significativa en el caso de las más pequeñas (1.8 nm de diámetro; $\lambda_{em} = 770$ nm). Además, se encontró que el máximo de fluorescencia se desplaza hacia energías más bajas al aumentar el tamaño del core.^{60, 61} En este sentido, los resultados que aparecen en la Figura 3, correspondientes a nuestras nanopartículas de 1.4nm ($\lambda_{em} = 656$ nm) están en buen acuerdo con los publicados por Murray.⁵⁶ Por otro lado, la figura muestra cómo, la presencia de cantidades crecientes de ADN, modifica la intensidad de emisión de la nanopartícula. Este comportamiento se ha observado también en el caso de nanopartículas de oro recubiertas con tiopronina de 1.8 nm en las que previamente se insertaron uno o dos ligandos etidio.⁵⁴

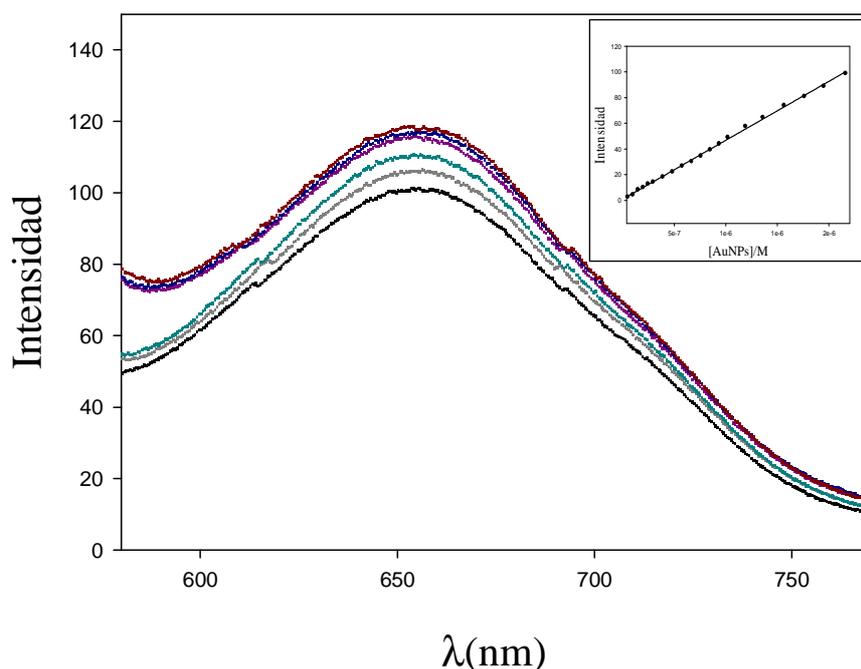


Figura 3. Espectros de fluorescencia del sistema AuNPs/ADN al 5% de etanol. $[AuNPs] = 1.5 \times 10^{-6}$ M; $[ADN] = (0 \text{ M} - 7 \times 10^{-5} \text{ M})$. El recuadro muestra la linealidad de la intensidad de fluorescencia de la nanopartícula en ausencia de ADN.

La técnica de UV-vis también aportó evidencias de la interacción de las nanopartículas Au@tiopronina con el ADN. La Figura 4, muestra los cambios registrados en la banda de plasmón de superficie (SPB) de los coloides de oro al aumentar la concentración de ADN. A pesar de que, de acuerdo con el pequeño tamaño de la nanopartícula, la banda SPB de ésta es casi indetectable, la Figura 4, muestra como el espectro de la nanopartícula cambia debido a su asociación con la molécula de ADN. La presencia de un punto isobéptico, poco definido, alrededor de 303 nm da cuenta de la formación del complejo ADN/AuNPs.

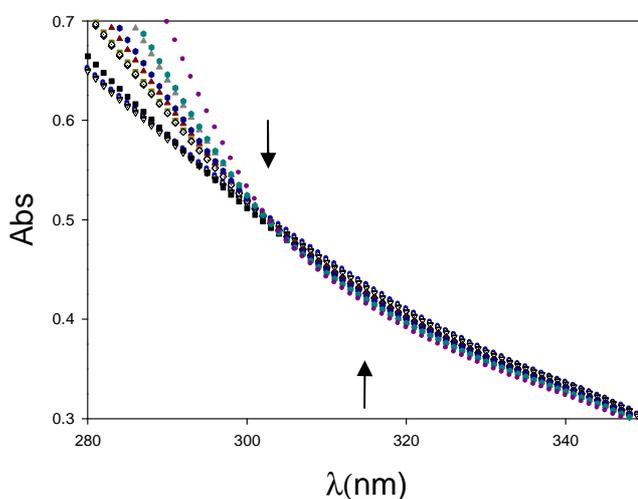


Figura 4. Valoración espectrofotométrica del sistema AuNPs/ADN. [AuNPs] = 1.58×10^{-6} M; [DNA] = (0 M - 9.6×10^{-5} M).

Estas dos técnicas (espectroscopía de absorción y fluorescencia) proporcionaron evidencias de la interacción, pero, desafortunadamente, no son apropiadas para cuantificar la constante de equilibrio del proceso de asociación, debido a los pequeños cambios en la señal registrados en ambos casos. Sin embargo, como se verá a continuación, la técnica de dicroísmo circular ha supuesto un camino alternativo adecuado para la cuantificación de la interacción.

El ADN en su conformación B presenta un espectro de CD característico en la región de ultravioleta lejano (220 - 320 nm). Las alteraciones estructurales del ADN debido a su interacción con los ligandos pueden verse reflejadas en los cambios experimentados

por ella, en el espectro de CD intrínseco. En la Figura 5 A, se observa el espectro de CD del ADN libre en disolución. Presenta un espectro típico del ADN en la conformación B, con un pico positivo a aproximadamente 278 nm y otro negativo a 247 nm. Estas bandas se deben a las interacciones de apilamiento entre las bases y a la supraestructura helicoidal del polinucleótido, que proporcionan un ambiente asimétrico para las bases.⁶² En la misma figura se presenta un ejemplo de una titulación de ADN en agua, monitorizada con la técnica de CD. La Figura 5 muestra cómo el aumento de la concentración de nanopartículas produce una disminución de la banda positiva (~278 nm) y negativa en intensidad. Estos cambios van acompañados por un desplazamiento del máximo de la banda positiva de CD hacia longitudes de onda mayores, como puede verse en la Figura 5A.

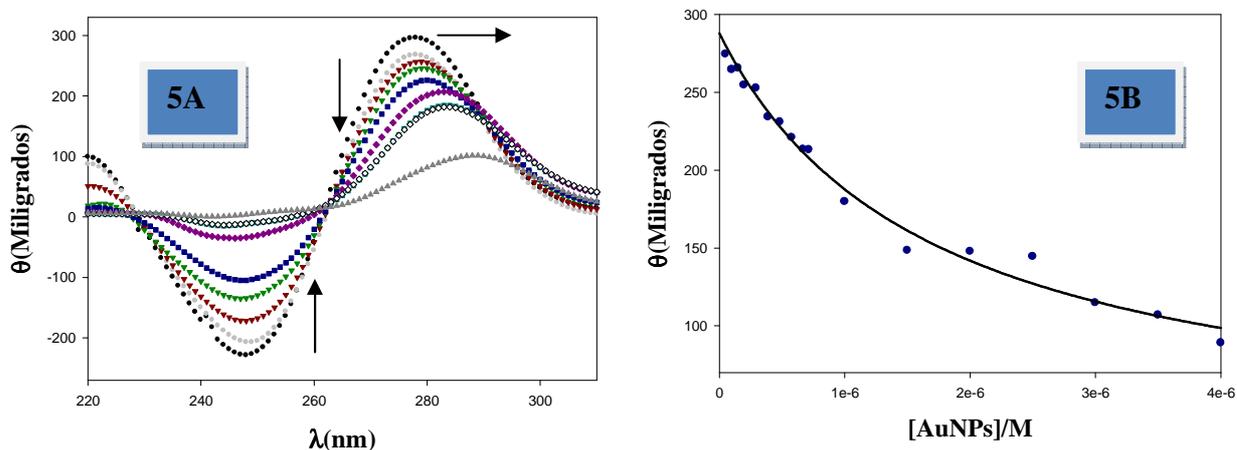
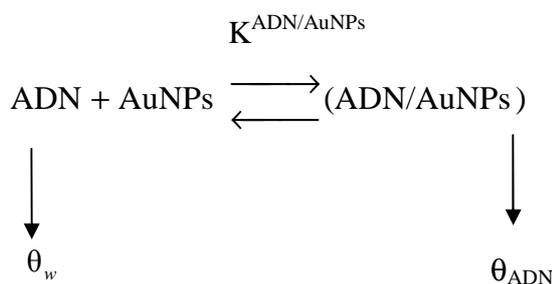


Figura 5. (A) Titulación de CD para la interacción de las nanopartículas Au@tiopronina con ADN en agua. ($[\text{ADN}] = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{AuNPs}] = (0 \text{ M} - 4 \times 10^{-6} \text{ M})$). (B) Elipticidad, θ vs. $[\text{AuNPs}]$. Los símbolos (●) representan los datos experimentales y la línea es el mejor ajuste al modelo de dos estados, de acuerdo con la ecuación 1.

Las modificaciones de estas bandas reflejan la existencia de cambios estructurales en la doble hélice, a medida que las nanopartículas se incorporan a la disolución de ADN. Tomando como base estos cambios del espectro de CD, es posible cuantificar la constante de asociación del proceso. Los cambios registrados en la elipticidad del ADN al aumentar la concentración de nanopartícula, pueden racionalizarse de acuerdo con un modelo de dos estados.⁶³ Los cambios en la elipticidad, θ , serían consecuencia de la

distribución de los clúster de oro entre el medio acuoso (bulk) y la superficie del ADN, de acuerdo con el esquema I:



Esquema I

La medida de ciertas propiedades del sistema a diferentes concentraciones de receptor, permite la obtención de K , y a partir de ésta, la energía libre de interacción sustrato/receptor.⁶⁴ El modelo de dos estados implica que, cualquiera que sea la propiedad del sistema, la medida del valor de esta propiedad es la suma de las fracciones correspondientes a cada estado. Considerando la elipticidad del ADN como propiedad objeto de estudio, se obtiene la siguiente expresión, que relaciona los cambios medidos en la elipticidad del ADN con la concentración de nanopartícula:

$$\langle \theta \rangle = \frac{\langle \theta \rangle_w + \langle \theta \rangle_{\text{ADN}} K^{\text{ADN/AuNPs}} [\text{AuNPs}]}{1 + K^{\text{ADN/AuNPs}} [\text{AuNPs}]} \quad (1)$$

De esta forma, la constante de asociación del proceso puede obtenerse por ajuste de los datos experimentales correspondientes a la ecuación 1. Un ejemplo aparece en la Figura 5 para una concentración de ADN 10^{-4} M. En ausencia de sal, el valor de la constante de equilibrio fue $K = 6.4 \times 10^5$ M, correspondiente a una energía libre de asociación de -33.12 kJ/mol.

Para corroborar la validez de este método, en la cuantificación de la energía libre de asociación ADN-nanopartícula, basado en los cambios de CD intrínseco del ADN, se empleó también otro procedimiento similar al utilizado en los capítulos precedentes de la tesis. Este método está basado en el uso del intercalador fluorescente, 1-PyCHO. Como ya ha sido expuesto la medida de la habilidad del ADN para unirse a este ligando

puede deducirse fácilmente a partir de los cambios de la intensidad de fluorescencia de la sonda, al incorporarse al ADN. Estos cambios permiten determinar las constantes de equilibrio para la asociación del 1-PyCHO al ADN según el modelo de sigmoidea descrito en capítulos anteriores (véase apéndice I). En todos los casos se encontró que la intensidad, I, podía ajustarse a la siguiente ecuación:

$$I = \frac{I_0 + I_{\text{ADN}} K[\text{ADN}]}{1 + K[\text{ADN}]} \quad (\text{a})$$

$$K = K_{\text{max}} \frac{e^t}{1 + e^t} \quad (\text{b}) \quad (2)$$

$$t = \frac{[\text{ADN}] - h}{j} \quad (\text{c})$$

Los parámetros de ajuste al modelo de sigmoidea están recogidos en el Apéndice II. A las concentraciones de nanopartícula más altas ($[\text{AuNPs}] = 1 \times 10^{-5} \text{M}$ y $2 \times 10^{-5} \text{M}$), sin embargo, los datos de intensidad de fluorescencia fueron ajustados, adecuadamente, a la ec. 2a, sin incluir la dependencia sigmoidea en la constante, K. Las representaciones gráficas de los valores de intensidad del 1-PyCHO frente a la concentración de ADN, a distintas concentraciones de nanopartícula, aparecen en la Figura 6, donde los datos experimentales fueron ajustados según la ecuación 2.

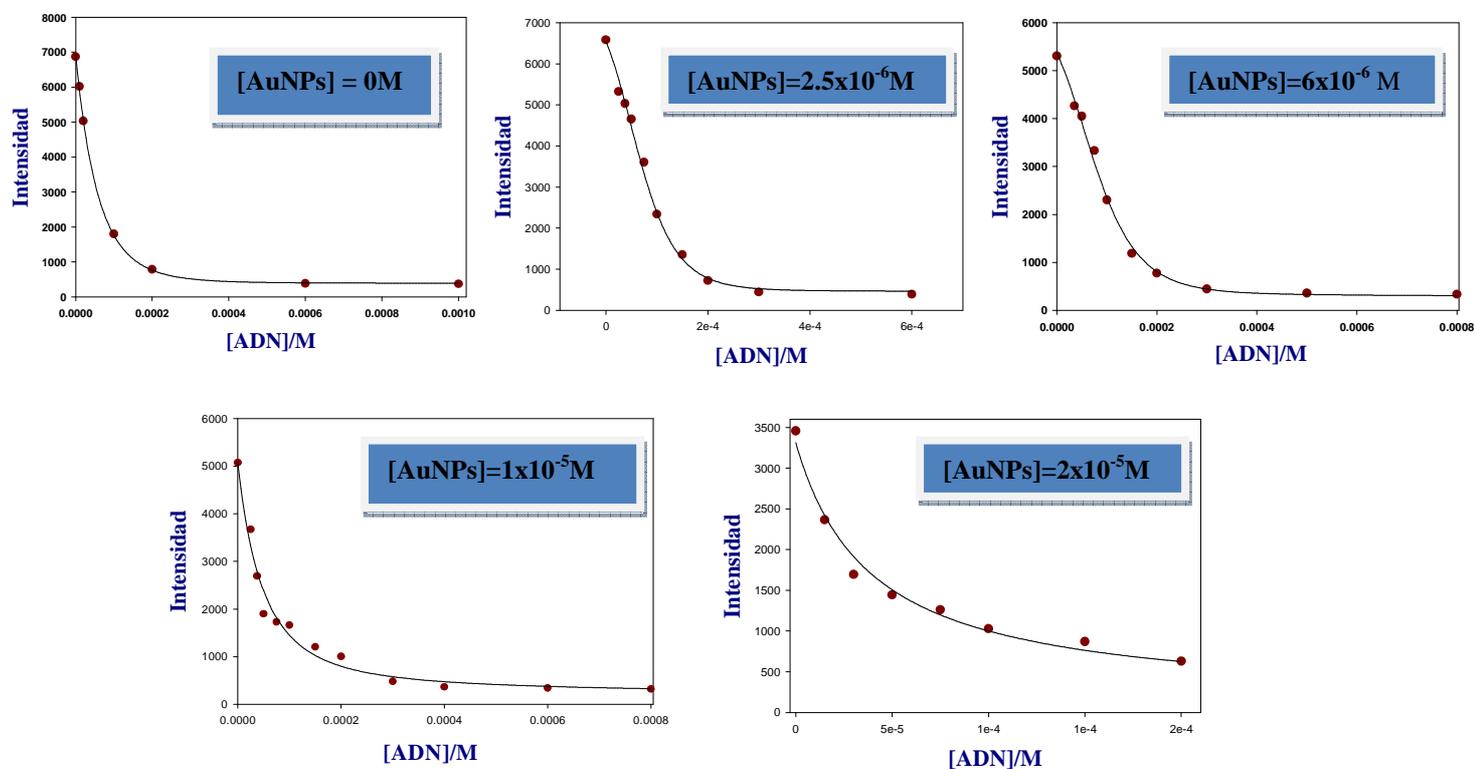


Figura 6. Intensidad de fluorescencia del 1-PyCHO frente a la concentración de ADN ajustada al modelo de sigmoidea (ecuación 2).

Como puede verse en la Figura 6, en todos los casos, la intensidad de emisión de la sonda disminuye al aumentar la concentración de ADN. Esta disminución de la intensidad es menos pronunciada a medida que la concentración de AuNPs aumenta. Los valores de las constantes de equilibrio 1-PyCHO/ADN, a cada concentración de nanopartícula, aparecen en la Tabla 1

Tabla 1. Valores de las constantes de equilibrio de asociación, K_{\max} y de la energía libre correspondiente, ΔG_{\max} , para la interacción entre el 1-PyCHO y el ADN, a diferentes concentraciones de AuNPs.

$10^{-7}[\text{AuNPs}]/\text{M}$	$10^{-5} K_{\max}^{\text{PY/ADN}}/\text{M}$	$\Delta G_{\max}/\text{kJmol}^{-1}$
0.0	73.0	-33.45
2.5	55.0	-32.75
6.0	20.2	-30.27
10.0	4.0	-26.25
20.0	2.6	-25.19

Estas constantes de equilibrio, se emplearon luego para la determinación de la constante de asociación ADN/AuNPs, de acuerdo con el tratamiento que se incluye en el Apéndice III. La siguiente expresión relaciona los cambios de la energía libre ADN/1-PyCHO con la concentración de nanopartícula, [AuNPs]:

$$\Delta G_{\max}^{\text{Py/ADN}} = \frac{\Delta G_{\max,1}^{\text{Py/ADN}} + \Delta G_{\max,2}^{\text{Py/ADN}} \frac{K_2}{K_1} K[\text{AuNPs}]}{1 + \frac{K_2}{K_1} K[\text{AuNPs}]} \quad (3)$$

En esta ecuación, K_1 y K_2 son las constantes de equilibrio de la sonda (1-PyCHO) al ADN₁ (libre de nanopartícula), y al ADN₂ (unido a las nanopartículas), respectivamente. El ajuste de los valores de $\Delta G_{\max}^{\text{Py/ADN}}$ a la ecuación 3, proporcionó un valor de la constante de equilibrio ADN/AuNPs de $K = 6.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, así como un valor de $K_2/K_1 = 1.23$; $\Delta G_{\max,1}^{\text{Py/ADN}} = -33.5 \text{ kJmol}^{-1}$, y $\Delta G_{\max,2}^{\text{Py/ADN}} = -24.94 \text{ kJmol}^{-1}$. El valor de la constante de equilibrio, K , encontrado según este método para la interacción ADN/1-PyCHO, está en buen acuerdo con el obtenido a partir del procedimiento

anterior haciendo uso de las medidas de CD. La Figura 7 muestra el ajuste de los datos de energía libre que aparecen en la Tabla 1 a la ecuación 3.

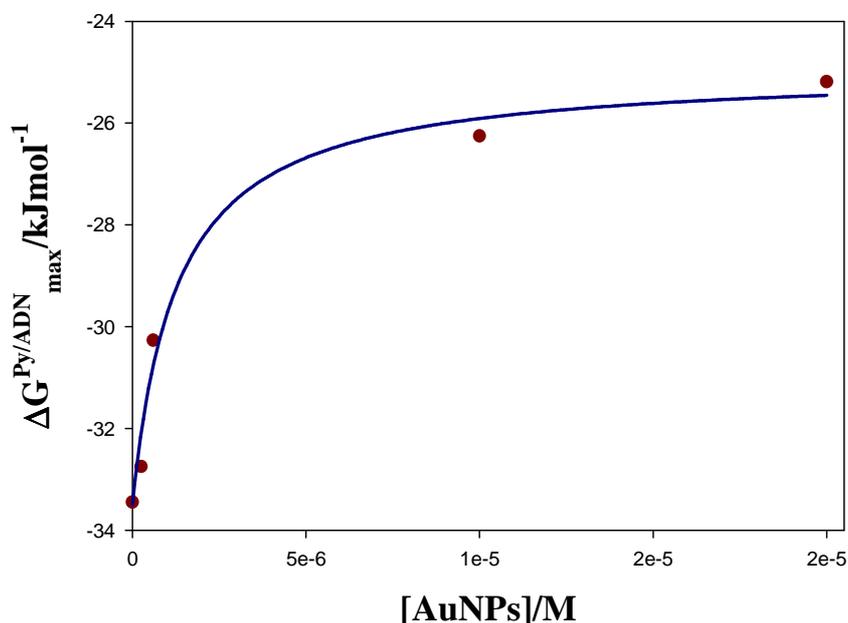


Figura 7. Ajuste de la energía libre de asociación 1-PyCHO/ADN, ΔG_{\max} , en función de la concentración de nanopartícula, $[\text{AuNPs}]$, de acuerdo con la ecuación 6.

Debido a la mayor simplicidad del primer procedimiento para la determinación de las constantes de equilibrio ADN/AuNPs, basado en la medición de los cambios de CD del ADN, el efecto de la concentración de sal (NaCl) en la termodinámica de asociación ADN/AuNPs se abordó mediante la técnica de CD. La Figura 8, muestra los espectros de CD del ADN en presencia de diferentes concentraciones de NaCl y los correspondientes a la adición de una concentración fija de nanopartícula ($[\text{AuNPs}] = 4.84 \times 10^{-7} \text{ M}$) a la disolución que contenía el ADN y la sal. En todos los casos puede observarse que el espectro de CD intrínseco del ADN se modifica por la adición de AuNPs, indicando un cambio conformacional en el ADN debido a la asociación de éste con las nanopartículas de oro. A medida que la concentración de sal aumenta, la interacción ADN/nanopartícula se ve debilitada (véase Figura 8), quedando totalmente apantallada a altas concentraciones de sal ($[\text{NaCl}] = 0.5 \text{ M}$).

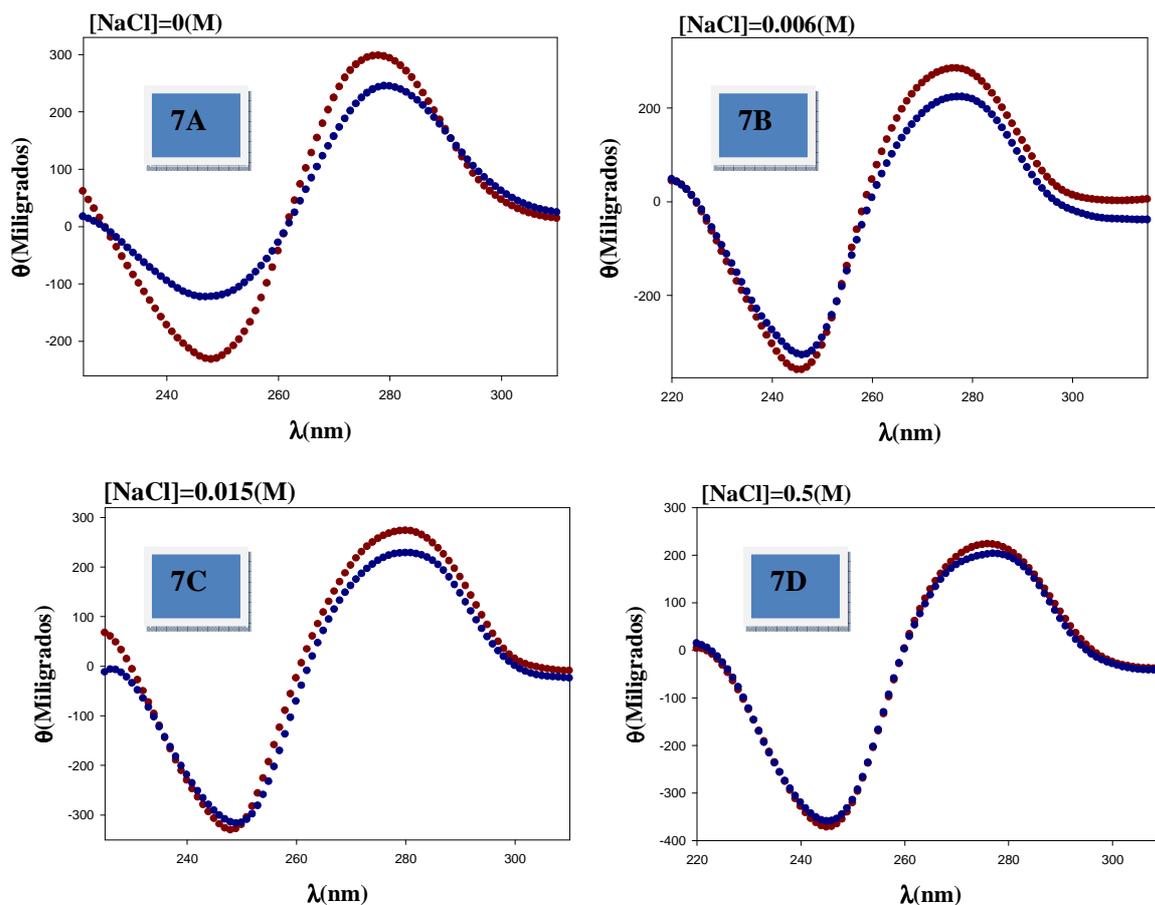


Figura 8. Espectros de dicroísmo circular intrínseco (CD) del ADN a diferentes concentraciones de NaCl (en rojo) y en presencia de $[AuNPs] = 4.84 \times 10^{-7} \text{ M}$ (en azul).

A bajas concentraciones de sal, el efecto del cloruro de sodio sobre la disminución de la asociación ADN/AuNPs no es tan significativo, lo cual indica la presencia de interacciones no-electrostáticas en el proceso de unión. Es importante destacar que todos las experiencias fueron llevadas a cabo a $\text{pH} = 6$, y de acuerdo con el valor de pK_a (~ 5.6) de la tiopronina enlazada al clúster las nanopartículas de oro son esencialmente neutras. Esto implicaría que la interacción ADN/AuNPs fuese, fundamentalmente, de carácter no-electrostático. Para obtener la contribución electrostática y no-electrostática de la asociación y confirmar esta idea, se determinaron las constantes de equilibrio ADN/AuNPs a diferentes concentraciones de sal (véase Figura 9).

Los valores de K obtenidos mediante titulaciones por CD aparecen en la Tabla 2.

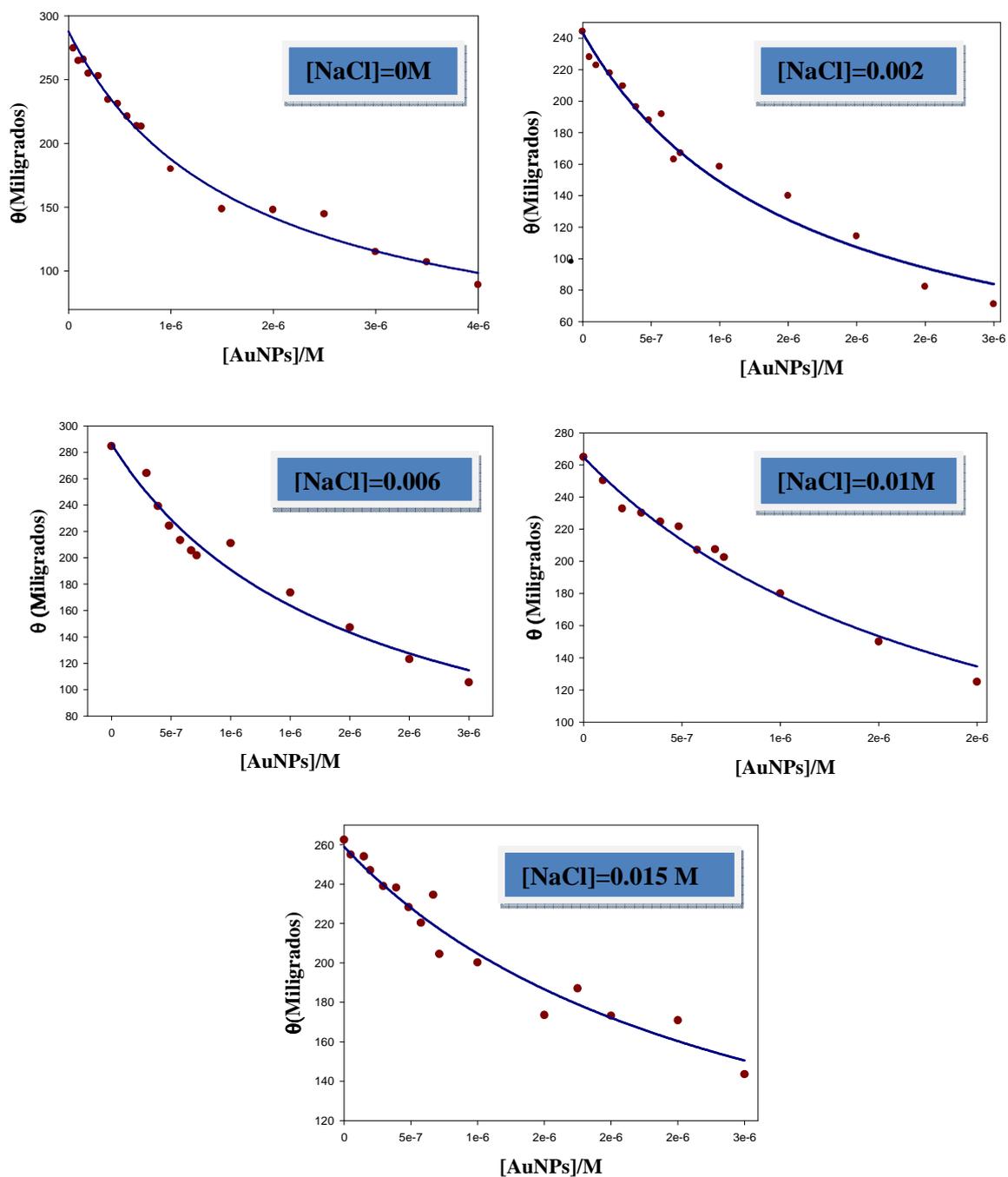


Figura 9. Titulación de CD para la interacción AuNPs /ADN a diferentes concentraciones de sal. ([ADN] = 1×10^{-4} M. Los símbolos (•) representan los datos experimentales y la línea es el mejor ajuste al modelo de dos estados, de acuerdo con la ecuación 1.

Tabla 2. Constantes de equilibrio de la asociación ADN/AuNPs a diferentes concentraciones de NaCl.

[NaCl]/M	$10^5 K^{\text{ADN/AuNPs}}/M$
0.000	6.40
0.002	6.34
0.006	4.98
0.010	3.88
0.015	3.34

A partir de los valores de las constantes de equilibrio a cada concentración de NaCl, puede obtenerse una estimación de las componentes electrostáticas y no-electrostáticas de la interacción ADN/AuNPs. Estas contribuciones pueden calcularse como sigue: $K^{\text{ADN/AuNPs}}$ puede expresarse en forma de energía libre del proceso ($\Delta G = -RT \ln K^{\text{ADN/AuNPs}}$). Esta energía libre, ΔG , puede describirse como la suma de dos contribuciones: (i) una contribución independiente del potencial electrostático, ΔG_{nel} (no-electrostática o intrínseca), y (ii) una contribución dependiente del potencial electrostático, ΔG_{el} (electrostática). Esta clase de separación se discute extensamente en las referencias 65-69:

$$\Delta G = \Delta G_{\text{nel}} + \Delta G_{\text{el}} \quad (4)$$

Por tanto, la energía libre de asociación ADN/AuNPs, ΔG puede describirse como la suma de dos contribuciones: una no-electrostática, ΔG_{nel} , y otra electrostática, ΔG_{el} , lo cual implica que:

$$K = K_{\text{nel}} K_{\text{el}} \quad (5)$$

Para separar estas dos contribuciones puede emplearse la ecuación de Lippard. De acuerdo con Howe-Grant y Lippard⁶⁹, $\log K_{cl}$ es proporcional a $-\log[Na^+]$, esto es:

$$\log K = \log K_{nel} - \beta \log[Na^+] \quad (6)$$

Esta expresión proporciona la dependencia de K con la fuerza iónica del medio, en función de la concentración de iones Na^+ . Record y colaboradores⁷⁰ describieron esta relación en términos del número de contraiones monovalentes, $\beta = m'\Psi$, eliminados del polinucleótido, debido a la asociación de un ligando (AuNPs) a un sitio del polímero caracterizado por la presencia de m' residuos fosfato. Ψ , representa el grado de asociación de los contraiones por residuo fosfato. El valor de Ψ es inversamente proporcional a la distancia entre residuos fosfato y posee un valor de 0.88 para una doble hebra normal de ADN. K_{nel} , es el valor de K a una concentración 1 M de Na^+ y se supone que está libre de componentes electrostáticas. Los valores de $\log K$ fueron representados frente al $\log [Na^+]$ (véase Figura 10). La pendiente de esta representación, proporciona información concerniente a la contribución electrostática de la asociación; mientras que la intercepción con el eje de ordenadas de la Figura 10, determina el grado en que las interacciones no-electrostáticas están presentes.

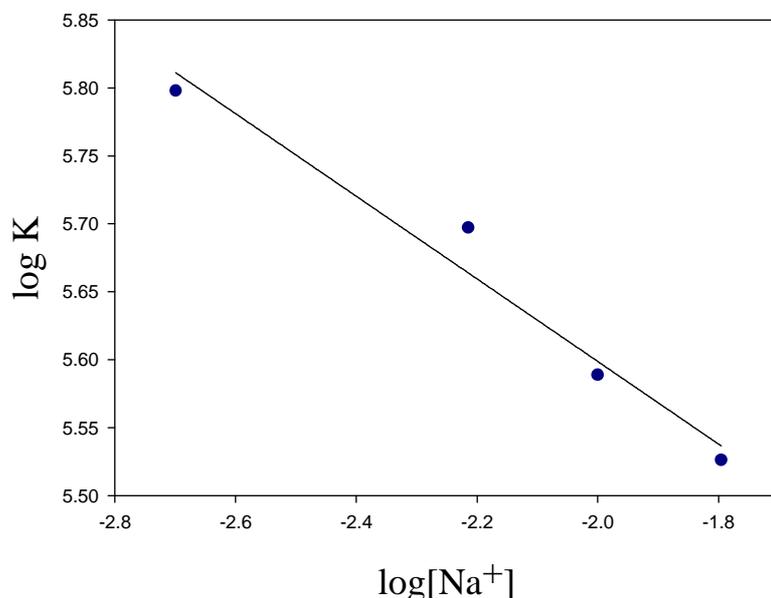


Figura 10. Ajuste de $\log K$ vs. $\log [Na^+]$ para el sistema ADN/AuNPs según la ecuación 6.

A partir del valor de la ordenada en el origen en la Figura 10, se obtuvo un valor de $\log K_{\text{nel}} = 4.98$, el cual proporciona un valor de $9.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ correspondiente a K_{nel} . Esto es, teniendo en cuenta los valores de K que aparecen en la Tabla 2, puede establecerse que la componente no-electrostática de la energía libre de asociación supone alrededor de un 88 % de la energía libre total. Este resultado está de acuerdo con el carácter prácticamente neutro de las nanopartículas. El tanto por ciento restante (12%), correspondiente a la interacción electrostática, refleja una asimetría aparente en la carga de los ligandos tiopronina unidos al centro de oro. De acuerdo con esta supuesta asimetría en la carga, podría suceder que ciertos ligandos tiopronina de la nanopartícula presentasen carga positiva, siendo estos últimos los responsables de la pequeña componente electrostática en la energía libre obtenida para la interacción ADN/nanopartícula. Nótese, además, que el pKa ha sido obtenido de la bibliografía y el valor corresponde en realidad a nanocluster de 1.8 nm. Por otro lado, dicho valor presenta una desviación estándar de ± 0.5 . Una segunda posible explicación para la pequeña variación de la constante de equilibrio con la concentración salina sería un posible efecto de salting-in.

Como conclusión a este estudio puede indicarse que la interacción del ADN con nanopartículas de oro de 1.4 nm, recubiertas con tiopronina, ha sido probada haciendo uso de diferentes técnicas: CD, UV-vis y espectroscopía de fluorescencia. La asociación de las nanopartículas de oro, AuNPs, con la doble hebra de ADN ha sido cuantificada en términos de energía libre. Para ello, se han empleado dos metodologías: una directa, basada en los cambios registrados en el espectro de CD intrínseco del ADN, y otra metodología indirecta, basada en los cambios de fluorescencia que experimenta una sonda fluorescente, el 1-PyCHO, en presencia de ADN y AuNPs. Ambos métodos han proporcionado resultados concordantes. Dichos resultados indicaron, además, que las nanopartículas de oro se unen al ADN promoviendo cambios conformacionales en el biopolímero. Finalmente, de acuerdo con el carácter prácticamente neutro de las AuNPs, un estudio termodinámico de la asociación de estas nanopartículas con ADN en presencia de NaCl reveló que la interacción, a $\text{pH} = 6$, es fundamentalmente de carácter no-electrostático.

3.3.2. Estudio cinético de la interacción no-covalente ADN/AuNPs.

En los últimos años, investigaciones acerca de la estructura microscópica de diferentes complejos compuestos por largas moléculas de ADN y agentes complejantes han resultado de interés particular.^{25a,26,28} Algunos de estos estudios han revelado que la forma de interaccionar largas cadenas semiflexibles de ADN y nanopartículas es fuertemente dependiente de la conformación del ADN, la rigidez de la cadena y el tamaño de la nanoesfera.^{25a,26} En particular, estudios estructurales de complejos ADN/AuNPs sugirieron la existencia de formación de ciertas estructuras ADN/AuNPs cuando el tamaño de la nanopartícula disminuye en relación con la longitud de la cadena de ADN: adsorción, envoltura (“wrapping”) y asociación simple (“collection”).^{25a} Estas estructuras fueron descritas en la introducción general de este capítulo de la tesis. Independientemente del modo de complejación, la asociación de las AuNPs con el ADN causa cambios conformacionales en la estructura de la biomolécula, llevando ésta hacia formas más compactas, como se ha demostrado mediante diferentes técnicas como: dicroísmo circular^{25a,b}, microscopía de transmisión^{25a,25b,26}, fluorescencia^{25b} y microscopía de fluorescencia.²⁶ Sin embargo, aunque los sistemas ADN/AuNPs han sido muy estudiados durante la última década^{10-14,25}, es claro que, para el desarrollo de aplicaciones en el campo de la nanotecnología y sistemas de detección de ADN, es necesario conocer el mecanismo que controla el comportamiento cinético de estos nanosistemas. Hasta la fecha, los estudios mecanísticos de interacción de ADN con nanopartículas de oro son muy escasos.^{54,71} En este sentido el objetivo de este último capítulo de la tesis es doble: por un lado demostrar la posibilidad de medir la cinética de asociación de ADN con nanopartículas de oro a través del estudio de los cambios conformacionales que tienen lugar en la molécula de ADN como resultado de la asociación con la nanopartícula, mediante la técnica de dicroísmo circular. Por otro, el establecimiento del mecanismo de asociación de los nanoclusters con el biopolímero. Este estudio es, naturalmente, una continuación al estudio termodinámico previo, utilizando pequeñas nanopartículas de oro (1.4 nm) y largas cadenas de ADN como modelo para el estudio mecanístico de la interacción en estos sistemas.

Como se describió en el capítulo anterior, la interacción de las nanopartículas con el ADN, provoca cambios conformacionales reversibles en la estructura del ADN. Estos cambios pueden seguirse usando la técnica de dicroísmo circular (véase Figura 11).

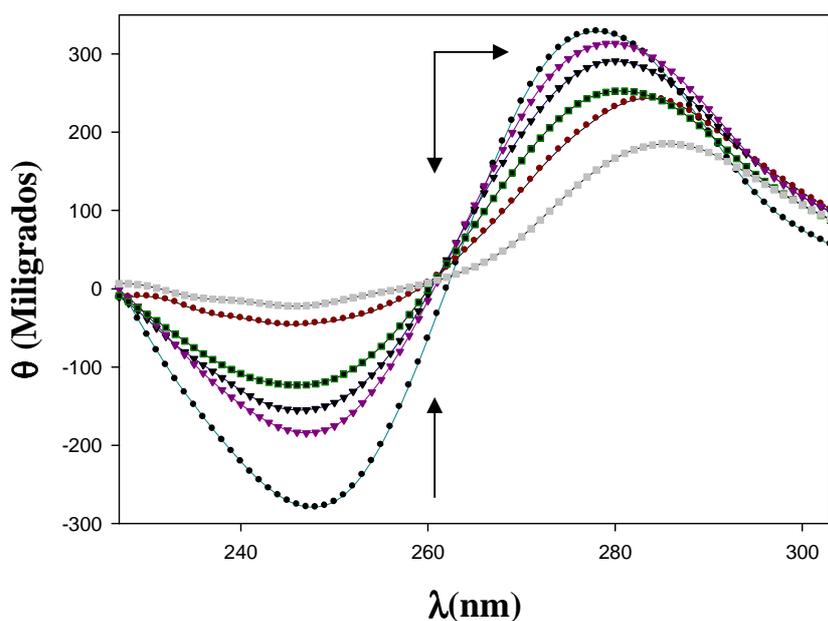
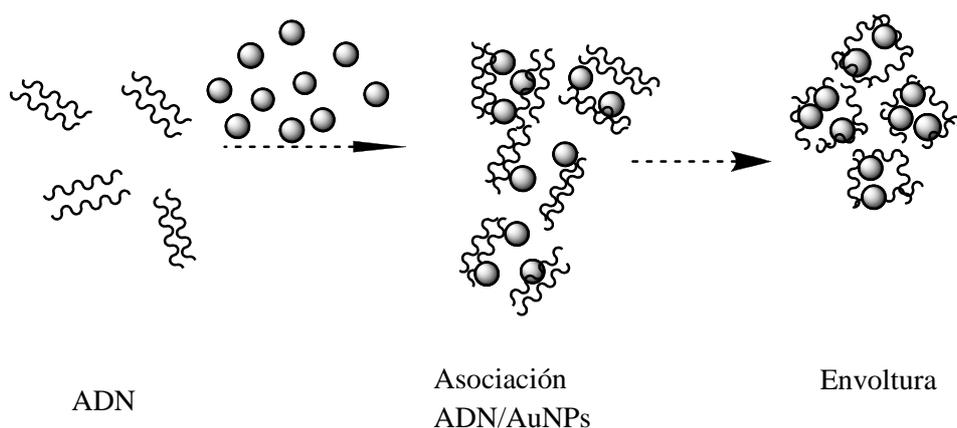


Figura 11. Titulación de CD para la interacción AuNPs/ADN en agua. ([ADN] = 1.5×10^{-4} M; [AuNPs] = (0 M - 2×10^{-6} M)).

En este sentido, de acuerdo con la existencia de cambios conformacionales inducidos por la interacción de la nanopartícula con el ADN, en principio, podría esperarse que la asociación ADN/AuNPs tuviera lugar en un primer paso, y en un segundo paso se produjera un enrollamiento más significativo del ADN en torno a la superficie de la nanopartícula.⁷² (véase esquema I).



Esquema I. Modelo de interacción AuNPs/ADN.

Basándonos en los cambios de CD, hemos estudiado los aspectos cinéticos de la asociación, ADN/AuNPs, en agua y en presencia de diferentes concentraciones de sal (NaCl) para tratar de averiguar las características cinéticas de la interacción. Los experimentos cinéticos se realizaron empleando la técnica de flujo detenido en el modo CD, trabajando en exceso de ADN. Las curvas cinéticas se ajustaron mediante dos exponenciales, cuyos tiempos de relajación, τ_1 , y τ_2 , difieren alrededor de un orden de magnitud. Un ejemplo típico de una experiencia cinética aparece en la Figura 12.

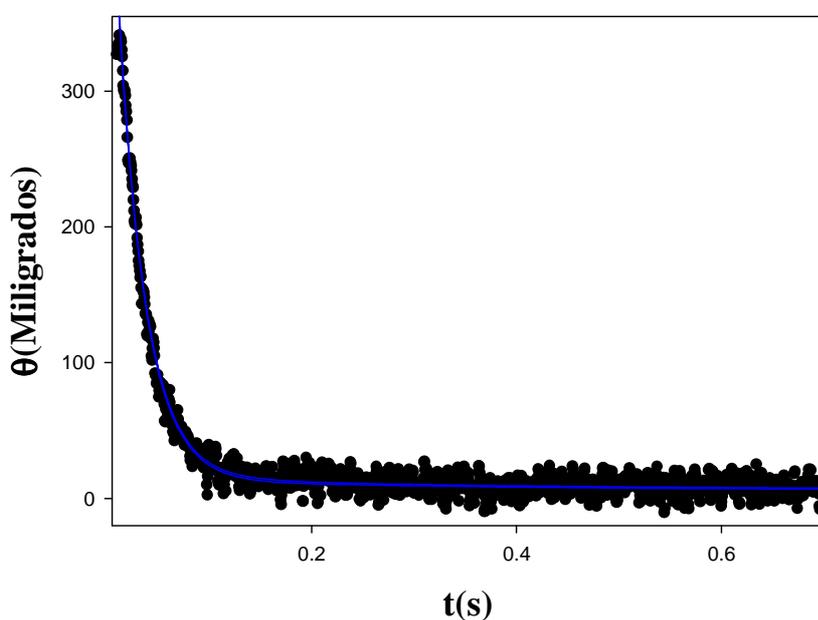


Figura 12. Ajuste de la elipticidad, θ , en función del tiempo, t , en un experimento cinético típico. La curva azul representa el mejor ajuste de los datos experimentales.

El análisis de los datos cinéticos fue llevado a cabo analizando los recíprocos de los tiempos de relajación corto y largo, $1/\tau_1$ y $1/\tau_2$, respectivamente, en función de la concentración de ADN. En contra de lo esperado, la curvatura que se observa en la representación del inverso del tiempo de relajación corto con la concentración de ADN (Figura 13 A), reveló que el mecanismo de reacción podría estar constituido por 3 pasos en serie, donde el primero de ellos, incluso si es demasiado rápido para observarse directamente como un efecto de relajación por separado, puede caracterizarse en

términos de una constante de equilibrio, K_0 .⁷³ De acuerdo con ello, la dependencia del tiempo de relajación corto con la concentración de ADN fue ajustada a la Ec. (1)⁷⁴:

$$\frac{1}{\tau_1} = \frac{K_0 k_1 [\text{ADN}]}{1 + K_0 [\text{ADN}]} + k_{-1} \quad (1)$$

donde K_0 , es la constante de equilibrio del paso más rápido, y k_1 y k_{-1} son, respectivamente, las constantes de velocidad directa e inversa del segundo paso (véase esquema II). Por tanto K_0 , k_1 y k_{-1} pueden obtenerse del ajuste de $1/\tau_1$ frente a la concentración de ADN, trabajando en condiciones de exceso de polímero, siendo $K_1 = k_1/k_{-1}$. Los valores de estos parámetros se recogen en la Tabla 3.

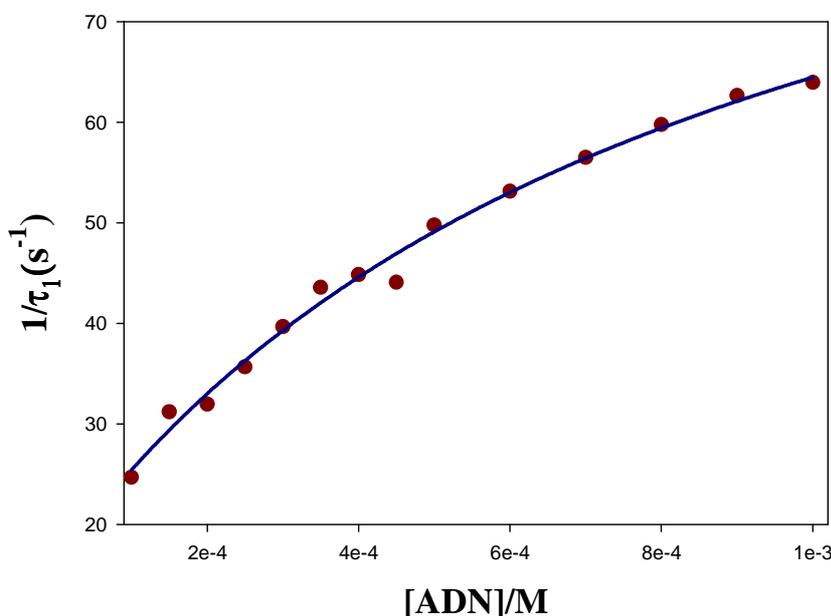


Figura 13 A. Recíproco del tiempo de relajación corto en función de la concentración de ADN, $[\text{NaCl}] = 0.002 \text{ M}$.

La dependencia con la concentración de ADN del recíproco del tiempo de relajación largo, $1/\tau_2$, produjo también una curva que tiende a plató a concentraciones elevadas de ADN, de acuerdo con la ecuación 2.⁷⁴ Esta curvatura da cuenta de la influencia de los efectos cinéticos precedentes sobre el tercer paso del mecanismo:

$$\frac{1}{\tau_2} = \frac{K_f k_2 [\text{ADN}]}{1 + K_f [\text{ADN}]} + k_{-2} \quad (2)$$

En esta expresión, k_2 y k_{-2} , son las constantes de velocidad directa e inversa que corresponden al tercer paso del mecanismo, y $K_f = K_0(1 + K_1)$. Consecuentemente k_2 y k_{-2} pueden obtenerse por ajuste de los valores de $1/\tau_2$ a la ecuación 2 (véase Figura 13 B), una vez que K_0 y K_1 han sido obtenidos a partir de la ecuación 1, de forma que K_f es un parámetro conocido. Los valores de las constantes cinéticas k_2 y k_{-2} se recogen en la Tabla 3.

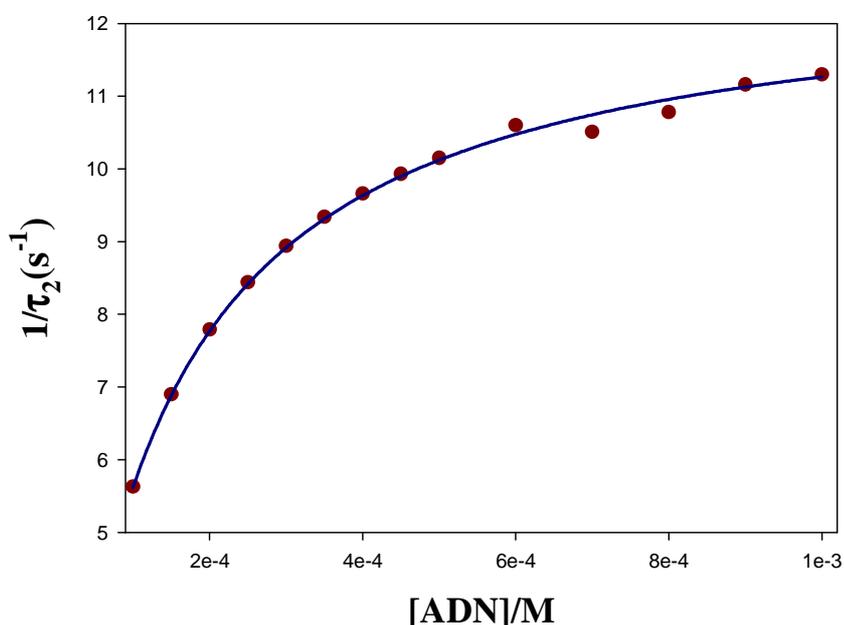
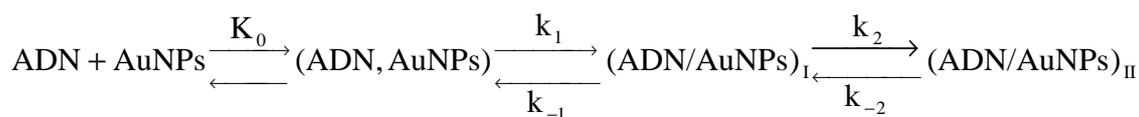


Figura 13 B. Recíproco del tiempo de relajación largo en función de la concentración de ADN, $[NaCl] = 0.002$ M.

Teniendo en cuenta la discusión precedente, el comportamiento cinético del sistema puede racionalizarse según un mecanismo en serie en tres pasos sucesivos. Este modelo se describe en el Esquema II. Los valores de las constantes de velocidad, así como los de las constantes de equilibrio individuales correspondientes al primero, segundo y tercer paso de la reacción, obtenidas a cada concentración de sal (NaCl), se recogen en las Tablas 3 y 4, respectivamente. Los inversos de los tiempos de relajación, $1/\tau_1$ y $1/\tau_2$, empleados para obtener los datos de la Tabla 3, a cada concentración de ADN y sal, se encuentran en el Apéndice VI de la tesis.



Esquema II. Modelo en tres pasos en serie para la interacción AuNPs/ADN. (ADN,AuNPs), (ADN/AuNPs)_I y (ADN/AuNPs)_{II} son complejos formados por el polímero y las nanopartículas (AuNPs), que difieren en su estructura.

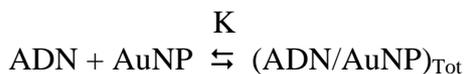
Tabla 3. Parámetros cinéticos para la interacción de nanopartículas, Au@Tiopronina, con ADN.

[NaCl]/M	k_1/s^{-1}	k_{-1}/s^{-1}	k_2/s^{-1}	k_{-2}/s^{-1}
0.000	123	17.5	12.9	0.15
0.002	91	16.0	12.6	0.15
0.006	79	13.9	9.4	0.12
0.010	67	13.9	9.2	0.12
0.015	54	13.0	7.9	0.11

Tabla 4. Parámetros termodinámicos derivados de los datos cinéticos para la interacción de nanopartículas Au@Tiopronina con ADN.

[NaCl]/M	$K_0 10^{-5} M^{-1}$	$K_1 10^{-2} M^{-1}$	$K_2 10^{-3} M^{-1}$	K_1	K_2
0.000	7.2	12.0	9.6	7.0	85
0.002	5.6	11.5	7.7	5.7	84
0.006	4.8	9.7	6.0	5.2	78
0.010	3.6	9.6	5.6	4.8	77
0.015	3.0	9.2	5.0	4.4	72

Es importante destacar la concordancia que existe entre las constantes de equilibrio globales, K , determinadas a partir de medidas puramente termodinámicas (sección anterior); y las calculadas a partir de la combinación de las constantes cinéticas correspondientes a los pasos individuales del mecanismo. Estos resultados apoyan el mecanismo propuesto (véase Figura 14). Las constantes K , corresponden al equilibrio:



Esquema III. Proceso global de la interacción AuNPs/ADN.

con $(\text{ADN/AuNP})_{\text{Tot}} = (\text{ADN,AuNP}) + (\text{ADN/AuNP})_{\text{I}} + (\text{ADN/AuNP})_{\text{II}}$. La constante de equilibrio del proceso global, K derivada del tratamiento cinético puede obtenerse a partir de la ecuación 3:

$$K = K_0 \frac{k_1}{k_{-1}} \left(1 + \frac{k_2}{k_{-2}} \right) \quad (3)$$

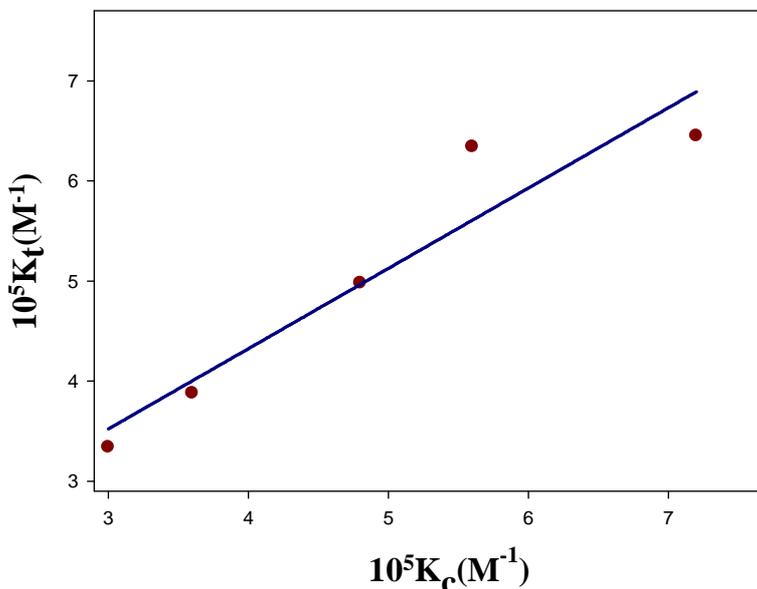


Figura 14. Constantes de equilibrio correspondientes al proceso global, obtenidas a partir de medidas estáticas (K_t), frente a las constantes de equilibrio derivadas del tratamiento de los datos cinéticos (K_c), (véase esquema II).

Como puede verse en la Tabla 3, las constantes de velocidad disminuyen al aumentar la concentración de sal en la disolución que contiene al ADN y las nanopartículas de oro. Considerando el carácter prácticamente neutro de las nanopartículas de oro, parece razonable que puedan operar en su asociación con el ADN, las interacciones hidrofóbicas existentes entre las colas hidrofóbicas de la tiopronina y los residuos hidrofóbicos de la molécula de ADN.⁷⁵ Estos residuos, presentes en la estructura del ADN, están constituidos por grupos no-polares entre los que se incluye el grupo metilo de la base timina y también otros grupos que componen el anillo del azúcar que se encuentran en las paredes de los surcos del ADN.⁷⁶ En relación con estos aspectos, otros autores han planteado la hipótesis de la existencia de este tipo de interacción entre nanopartículas de Au catiónicas y los surcos del ADN, basándose en la existencia de un punto isobéptico a 262 nm en la curva de titulación de CD del ADN con dichas nanopartículas catiónicas de oro, el cual aparece desplazado respecto a un segundo punto isobéptico a 255 nm. Este último, ha sido asociado a la formación de un par iónico simple entre las nanopartículas catiónicas y los grupos fosfato del ADN^{25b}, apoyándose en el hecho de que al ser este tipo de interacción de naturaleza electrostática, ésta sería más energética, y por tanto se correspondería con el punto isobéptico presente a valores de λ menores. Al igual que Goodman y colaboradores^{25b}, en el presente estudio sobre la interacción de ADN con nanopartículas Au@tiopronina, hemos encontrado un punto isobéptico a 262 nm en la curva de titulación por CD (véase Figura 11). Este resultado demuestra que la asociación de las AuNPs con los surcos del ADN es una hipótesis plausible, considerando el tamaño de los surcos principal y secundario y el pequeño tamaño de la nanopartícula (1.4 nm). Esta hipótesis también se ve apoyada por la relación lineal existente entre las constantes de velocidad del segundo paso de la reacción y la actividad del agua. Efectivamente, la hidratación de los surcos del ADN juega un papel fundamental en la asociación de pequeños ligandos a los surcos del ADN. Esto se ha demostrado en diferentes trabajos concernientes al estudio de la asociación de pequeños ligandos al ADN.⁷⁷ Por tanto, suponiendo que el segundo paso de esta reacción corresponde a la asociación de las nanopartículas a los surcos del ADN, parece razonable que los efectos de hidratación jueguen un papel predominante. En relación con esta hipótesis, hemos constatado algunas evidencias de la importancia de la hidratación en la cinética de la reacción. De acuerdo con la variación de las constantes de velocidad directa e inversa del segundo paso con la

concentración de sal, se ha encontrado una correlación lineal entre estas constantes y la actividad del agua correspondiente a cada concentración de electrolito (véase Figura 15).

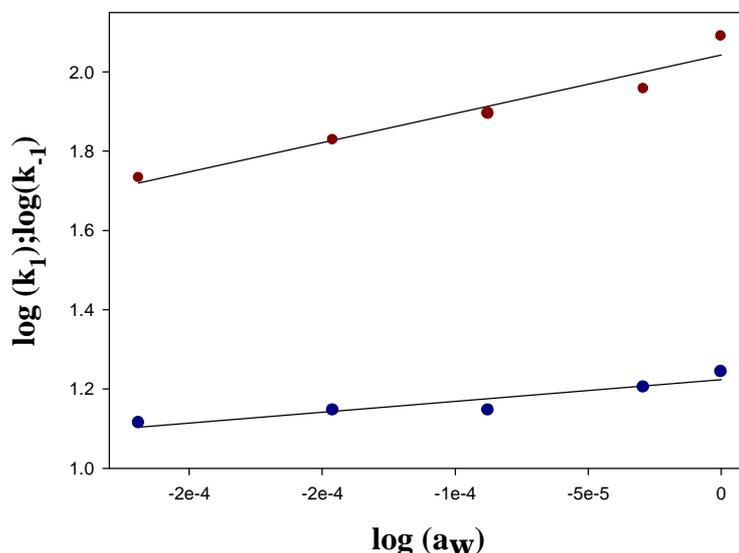


Figura 15. Ajuste del $\log(k)$ vs. $\log(a_w)$ correspondiente a diferentes disoluciones acuosas de NaCl: k_1 (●); k_{-1} (●). a_w representa la actividad del agua en la disolución.

Este comportamiento sugiere que la actividad del agua, o algún parámetro directamente relacionado con ésta, juega un papel importante en el segundo paso del mecanismo de esta reacción y, por tanto, en la formación del complejo (ADN/AuNP)₁.

El enrollamiento de la doble hélice del ADN (“wrapping”) forma parte de un proceso biológico fundamental como es la condensación de la doble hélice en la células eucariotas.⁷² En este sentido, la forma esférica de las nanopartículas de oro permite la interacción con el ADN, favoreciendo la curvatura y enrollamiento del ADN sobre su superficie. La compactación de las largas cadenas de ADN por las nanopartículas, induce un cambio estructural en el complejo ADN/AuNPs que permite que la tendencia a la auto-agregación de las nanopartículas (crecimiento del agregado) supere a las fuerzas de repulsión entre las partículas.⁷⁸ Estos procesos de asociación entre nanopartículas, se ven favorecidos cuando la concentración de ADN aumenta.⁴⁷ A partir de imágenes de microscopía electrónica de transmisión, TEM, hemos observado esta

mejora en la asociación de las nanopartículas Au@tiopronina, producida al aumentar la concentración de ADN.

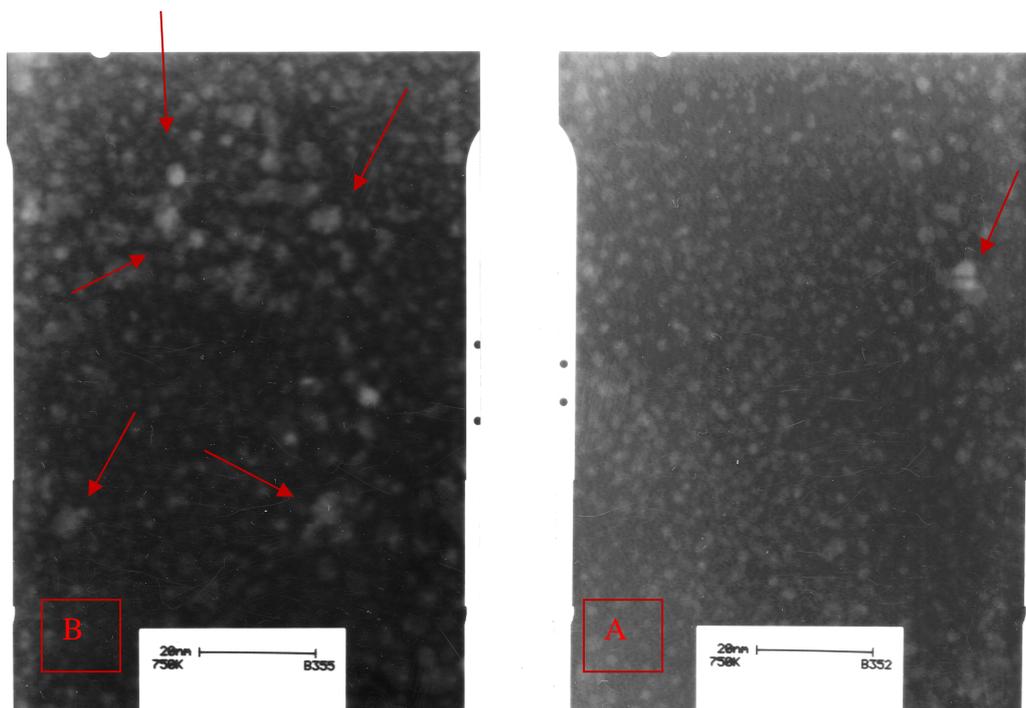


Figura 16. Imágenes de TEM haciendo uso de la técnica de campo oscuro de nanopartículas de oro en presencia de ADN. Las partículas aparecen iluminadas sobre el fondo oscuro. (A) $[ADN] = 1 \times 10^{-5}M$. (B) $[ADN] = 1 \times 10^{-4}M$.

La Figura 16 A muestra una imagen de las nanopartículas de oro en presencia de una concentración de ADN $1 \times 10^{-5}M$ realizada con la técnica de campo oscuro. La Figura 16 B muestra estas mismas nanopartículas, pero en presencia de una concentración más alta de ADN, $1 \times 10^{-4}M$. Como puede verse en ambas figuras, la auto-asociación de las nanopartículas aumenta al hacerlo la concentración de ADN. La agregación de las nanopartículas a medida que la concentración de ADN aumenta, es una prueba indirecta de los procesos de “wrapping” de la doble hélice en torno a la nanopartícula.

Centrándonos más a fondo en el fenómeno de la condensación del ADN, experimentos llevados a cabo según la técnica de microscopía de barrido electrónico, SEM, ponen de relieve el efecto de las nanopartículas de oro y de la sal, en el proceso de condensación del ADN. La Figura 17, muestra fibras de ADN en distintos estados de agregación (en ausencia y en presencia de nanopartículas de oro y sal) como

consecuencia de la agregación de las nanopartículas de oro enlazadas a la macromolécula a diferentes concentraciones de NaCl.

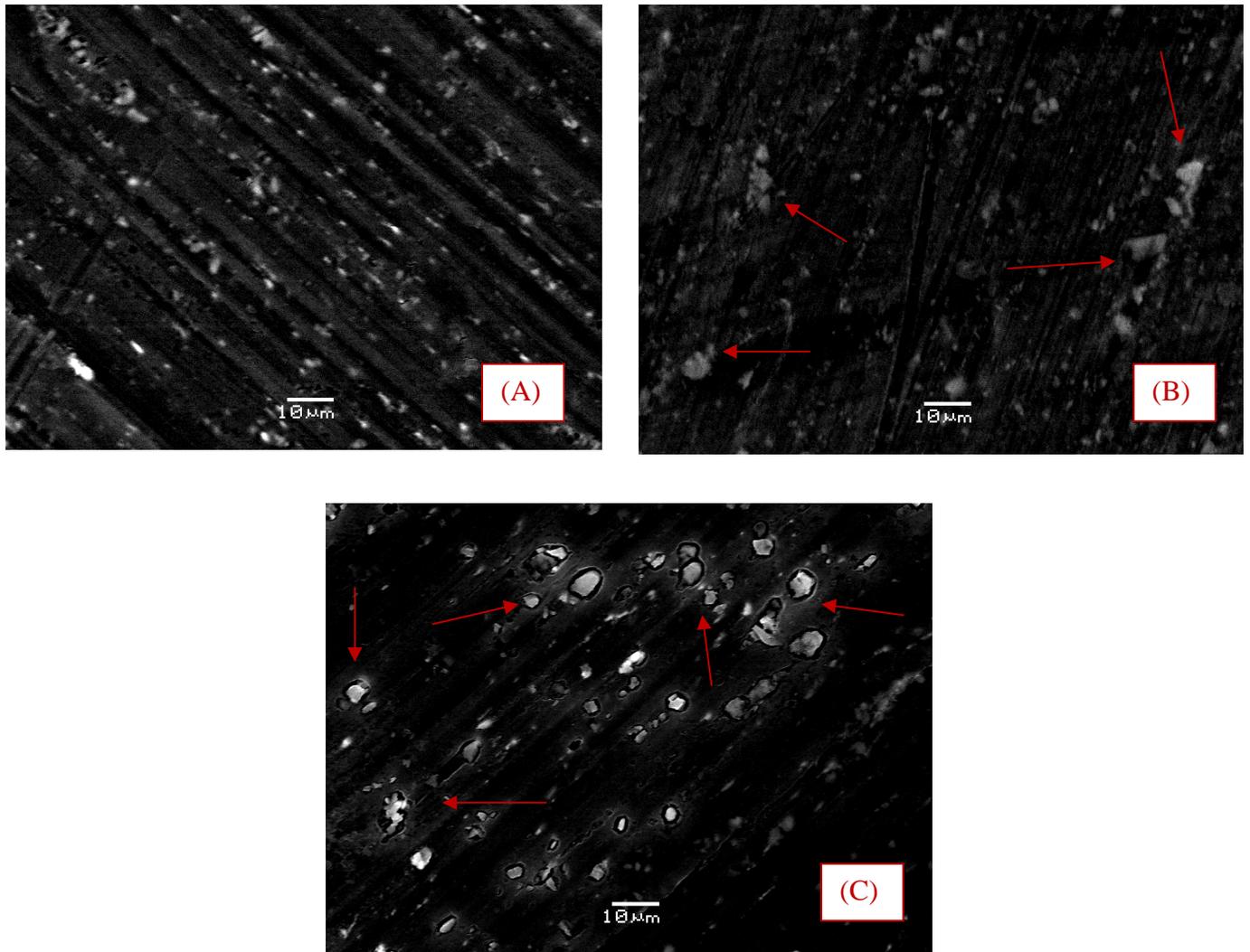


Figura 17 (A) Imagen SEM de ADN en ausencia de nanopartículas y sal, [ADN] = 100 μM (B) Imagen SEM del sistema ADN/AuNPs en presencia de nanopartículas de oro, en agua. [ADN] = 100 μM y [AuNPs] = 0.5 μM . (C) Imagen SEM que muestra agregados de ADN en forma globular en presencia de nanopartículas, en NaCl 0.015 M. [ADN] = 100 μM y [AuNPs] = 0.5 μM . (La barra muestra una escala de 10 μm en todas las fotos).

La Figura 17A, muestra el ADN en su conformación extendida, y corresponde a una disolución de ADN en ausencia de nanopartículas y sal. En la 17 B puede observarse como la adición de las nanopartículas a la disolución induce cambios morfológicos en la estructura del ADN, produciendo la compactación y agregación de algunas estructuras. Por otra parte, la Figura 17 C (0.15 M de NaCl), muestra como la eficiencia en la compactación del ADN se ve favorecida en presencia de sal, observándose más agregados de fibras de ADN en forma globular. Este hecho, junto con los cambios encontrados en el CD del ADN en presencia de nanopartículas y los experimentos de TEM, proporcionan claras evidencias de la existencia un proceso de enrollamiento del ADN y agregación del los nanoclusters, que dan lugar a una compactación del sistema AuNPs/ADN.

Puede discutirse ahora, la variación de las constantes de velocidad del paso más lento del mecanismo (tercer paso), que implica la variación en las constantes de velocidad k_2 y k_{-2} , asumiendo que estas constantes corresponden al proceso de agregación y cambio conformacional del sistema, desde el complejo formado en el segundo paso del mecanismo, $(\text{ADN}/\text{AuNPs})_I$, hacia una conformación más compacta $(\text{ADN}/\text{AuNP})_{II}$, y su proceso inverso, respectivamente.⁷⁹ Si los cambios micro-configuracionales implicados en este proceso están controlados por difusión, un aumento de la concentración de sal produciría un aumento de la viscosidad del sistema, lo cual haría el proceso directo e inverso, más difíciles.^{75b}

De acuerdo con el tratamiento de Smoluchowsky⁸⁰ para las constantes de velocidad controladas por difusión, las constantes de velocidad de esta clase de procesos serían inversamente proporcionales a la viscosidad del medio de reacción (η).⁸¹ Es importante destacar que, en principio, es difícil comprobar esta hipótesis, ya que las constantes de velocidad k_2 y k_{-2} deberían relacionarse con la *viscosidad local*, η_{loc} , al igual que sucedía en el caso de la interacción de los tensioactivos con el ADN. Sin embargo, según un tratamiento similar al expuesto en el segundo capítulo de la tesis, evaluando la concentración local de sal en la vecindad de la superficie del ADN, es posible hacer una estimación de las viscosidades locales (véase capítulo II, página 148).

Una vez que los valores de la viscosidad local fueron obtenidos, las constantes de velocidad k_2 y k_{-2} fueron ajustadas frente al inverso de la viscosidad local, $1/\eta_{loc}$, de acuerdo con la ecuación de Smoluchowsky. La correlación lineal encontrada para las constantes de velocidad k_2 y k_{-2} frente a $1/\eta_{loc}$ se presenta en las Figuras 18 A y 18 B, y da validez a la idea de que, tanto k_2 como k_{-2} , corresponden, muy probablemente, a procesos que implican cambios configuracionales controlados por difusión del complejo ADN/nanopartícula.^{75b}

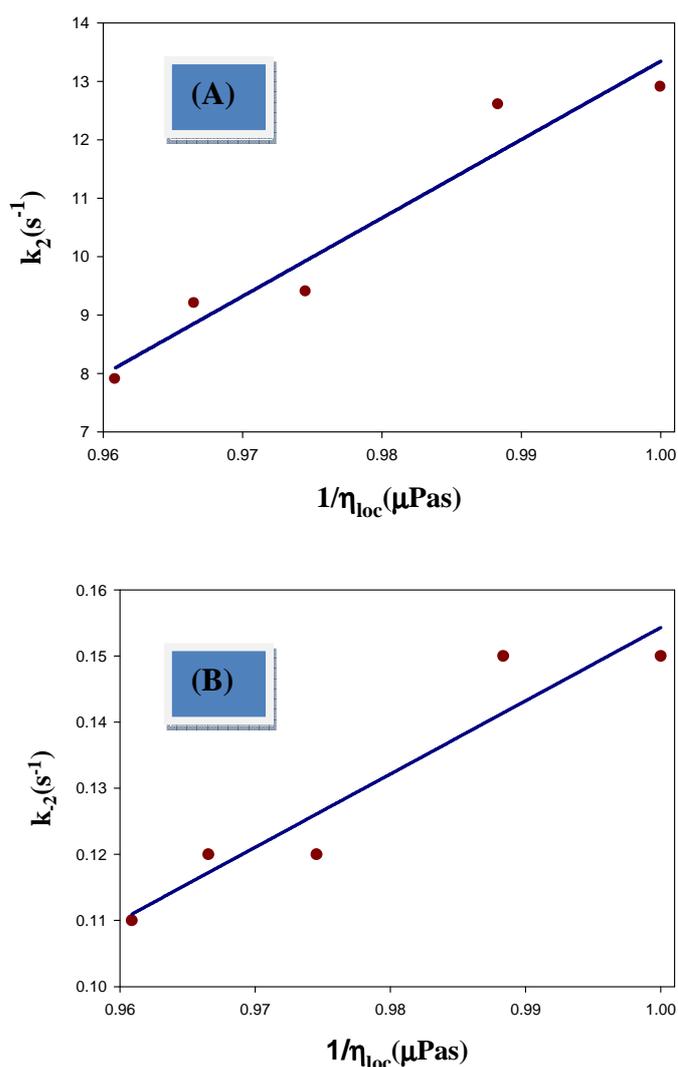


Figura 18. Constantes de velocidad directa e inversa, k_2 (s^{-1}) y k_{-2} (s^{-1}), correspondientes al tercer paso del mecanismo (esquema II) vs. $1/\eta_{loc}$. η_{loc} es la viscosidad local estimada como ha sido descrito en el texto. (A) Paso directo, k_2 (B) Paso inverso, k_{-2} .

Como conclusión y resumen de este estudio cinético, puede indicarse que se ha propuesto un mecanismo reversible, en tres pasos sucesivos, para describir la interacción del ADN de doble hebra con nanopartículas neutras de oro recubiertas con tiopronina. El primer paso del mecanismo es muy rápido y corresponde a la formación de un aducto externo (ADN, AuNPs), que sólo puede observarse de forma indirecta. Los procesos directo e inverso del segundo paso del mecanismo propuesto implican la asociación de la nanopartícula a los surcos del ADN. Esta hipótesis se apoya en la correlación existente entre el logaritmo de las constantes k_1 y k_{-1} y la actividad del agua, a diferentes concentraciones de sal. El tercer paso del mecanismo, en dirección directa e inversa, corresponde a un cambio conformacional controlado por difusión del complejo (ADN/AuNP)_I hasta una conformación final más compacta, (ADN/AuNP)_{II}, como puede deducirse de las medidas de SEM, TEM y los cambios de CD intrínseco del ADN, así como de la correlación lineal encontrada para k_2 y k_{-2} con el inverso de la viscosidad local, de acuerdo con el tratamiento de Smoluchosky.

3.4. Referencias.

- (1) Khomutov, G. B.; Koksharov, Y. A. "Advances in Colloid and Interface Science". **2006**. 122 (1-3), 119.
- (2) Barrientos, A. G.; de la Fuente, J. M.; Rojas, T. C.; Fernandez, A.; Penades, S. *Chem.Eur. J.* **2003**, 9, 1909.
- (3) Akbulut, M.; Godfrey Alig, A. R.; Younjin, M.; Belman, N.; Reynolds, M.; Golan, Y.; Israelachvili, J. *Langmuir*. **2007**. 23(7), 3961.
- (4) Aslan, K.; Pérez-Luna, V. H. *Plasmonics*. **2006**. 1, 111.
- (5) Bi-Feng, P.; Feng, G.; Li-Mei, A. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, 293(1), 252.
- (6) Niemeyer, C. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 4128.
- (7) (a) Patil, S. D; Rhodes, D. G; Burgess, D. J. A. A. *P. S. J.* **2005**, 7, E61. (b) Jason, T. L. H; Koropatrik, J; Berg, R. W. *Toxicol. Appli. Pharm.* **2004**, 201, 66.
- (8) (a) Baptista, P. V; Koizol-Montewka, M; Paluch-Oles, J; Doria, G; Franco, R. *Clinical Chemistry*. **2006**. 52 (7), 1433. (b) Georganopoulou, D. G; Chang, L; Nam, J. M; Thaxton, C. S; Mufson, E. J; Klein, W. L; Mirkin, C. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**. 102, 2273.
- (9) Han, G; Ghush, P; Mrinmoy De; Rotello, V. M. *Nanobiotechnol.* **2007**, 3, 40.
- (10) (a) Zhang, Y; Zhang, K; Ma, H. *Am. J. Biomed. Sci.* **2009**. 1 (2), 115. (b) Li, C-Z; Male, K. B; Hrapovic, S; Luong, J. H. T. *Chem. Commun.* **2005**. 3924. (c) Hazarika, P; Ceyhan, B; Niemeyer, C. M. *Small*. **2005**. 1, No. 8-9, 844.
- (11) Zhou, J.; Ralston, J.; Sedev, R.; Beattie, D. A ; *J. Colloid. Interface. Science.* **2009**. 331, 251.
- (12) Cliffel, D. E.; Zamborini, F. P.; Gross, S. M.; Murray, R. W. *Langmuir* **2000**, 16, 9699.
- (13) Mirkin, C. A; Letsinger, R. L; Mucic, R. C; Storhoff, J. J. *Nature*. **1996**. 382, 607.
- (14) Jin, R; Wu, G; Li, Z; Mirkin, C. A; Schatz, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**. 125 (6), 1643.
- (15) John, D. M; Weeks, K. M. *Protein Science*. **2000**. 9, 1416.
- (16) Long, H; Kudlay, A; Schatz, G. C. *J. Phys. Chem. B.* **2006**. 110 (6), 2918.
- (17) Abigail, K.; Lytton-Jean, R; Mirkin, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12754.

- (18) Dulkeith, E; Morteani, A. C; Niedereichholz, T; Klar, T. A; Feldmann, J; Levi, S. A; van Veggel, F. C. J. M; Reinhoudt, D. N; Moller, M; Gittins, D. I. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, 89, 203002.
- (19) (a) Morrison, L. E; Stols, L. M. *Biochemistry* **1993**, 32, 3095. (b) Marky, L. A, Breslauer, K. J. *Biopolymers* **1987**, 26, 1601. (c) SantaLucia, J. J; Turner, D. H. *Biopolymers*. **1997**, 44, 309.
- (20) Storhoff, J. J; Lazarides, A. A; Mucic, R. C; Mirkin, C. A; Letsinger, R. L; Schatz, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4640.
- (21) Tinland, B; Pluen, A; Sturm, J; Weill, G. *Macromolecules*. **1997**, 30, 5763.
- (22) (a) Avrami, M. *J. Chem. Phys.* **1940**, 8, 212. (b) Rikvold, P. A; Tomika, H; Miyashita, S; Sides, S. W. *Phys. Rev. E*. **1994**, 49, 5080.
- (23) (a) Rubinstein, M; Colby, R. H. *Polymer Physics*; Oxford University Press: New York, 2003. (b) Rivetti, C; Walker, C; Bustamante, C. *J. Mol. Biol.* **1998**, 280, 41.
- (24) Maye, M. M; Nykypanchuk, D; Van der Lelie, D; Gang, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14020.
- (25) (a) Anatoly A. Zinchenko; Takahiro, Sakaue; Sumiko, Araki; Kenichi Yoshikawa; Damien, Baigl, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111, 3019. (b) Catherine M. Goodman; Nandini S. Chari; Gang Han; Rui Hong; Partha Ghosh; Vincent M. Rotello, *Chem. Biol. Drug. Des.* **2006**, 67, 297; (c) Wang, G; Zhang, J; Murray, R. W. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 4320.
- (26) Anatoly, A. Zinchenko; Kenichi Yoshikawa; Damien, Baigl, *Physical. Review. Letters*, **2005**, 95, 228101.
- (27) (a) Kornberg, R. D. *Science*, **1974**, 184, 868. (b) Luger, K; Mäder, A. W; Richmond, R. K; Sargent, F. D; Richmond, T. J. *Nature*. **1997**, 389, 251.
- (28) Keren, K; Soen, Y; Ben, Yoseph, G; Gilad, R; Braun, E; Sivan, U; Talmon, Y, *Phys. Rev. Lett*, **2002**, 89, 088103.
- (29) Cho, K; Lee, Y; Lee, C-H; Lee, K; Kim, Y; Choi, H; Ryu, P-D; Lee, S. Y; Joo, S-W. *J. Phys. Chem. C*. **2008**, 112, 8629.
- (30) Sato, K; Hosokawa, K; Maeda, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8102.
- (31) Uberbacher, E. C; Ramakrishnam, V; Olins, D. E; Bunick, G. J. *Biochemistry*. **1983**, 22, 4916.
- (32) Yager, T. D; McMurray, C. T; Van Holde, K. E. *Biochemistry*, **1989**, 28, 2271.
- (33) Mahtab, R; Rogers, J. P; Murphy, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9099.

- (34) (a) Weller, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 41. (b) Weller, H. *Adv. Mater.* **1993**, 5, 88. (c) Wang, Y; Herron, N. *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 525. (d) Steigerwald, M. L; Brus, L. E. *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 183.
- (35) Murphy, C. J; Lisensky, G. C, Leung, L. K; Kowach, G. R; Ellis, A. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 8344.
- (36) Simha, R; Frisch, H. L; Eirich, F. R. *J. Phys. Chem.* **1953**, 57, 584.
- (37) Mahtab, R; Rogers, J. P; Singleton, C. P; Murphy, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7028.
- (38) Winter, R. B; Berg, O. G; Von Hippel, P. H. *Biochemistry.* **1981**, 20, 6961.
- (39) Bigham, S; Coffer, J. L. *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, 10581.
- (40) (a) Nosaka, Y; Ohta, N; Fukuyama, T; Fuji, N. *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, 155, 23. (b) Sharp, K. A; Nicholls, A; Fine, R. F; Honig, B. *Science.* **1991**, 252, 106.
- (41) Spolar, R. S; Record, M. T. Jr, *Science.* **1994**, 263, 777.
- (42) Mahtab, R; Harden, H. H; Murphy, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 14-17.
- (43) (a) Anderson, C. F; Record, M. T; Jr. *Annual. Rev. Phys. Chem.* **1995**, 46, 657. (b) Record, M. T; Jr.; Spolar, R. S; In the Biology of Nonspecific DNA-Protein Interactions; Rezvin, A; Ed., CRC Press: Boca Raton, FL, 1990 (c) Haq, I; Lincoln, P; Suh, D; Norden, B; Chowdhry, B. Z; Chaires, J. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4788.
- (44) Mahtab, R; Sealey, S. M; Hunyadi, S. E; Kinard, B; Ray, T; Murphy, C. J. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2007**, 101, 559.
- (45) (a) Williams, L. D; Maher, L. J. III, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, 29, 497. (b) Egli, M. *Chem. Biol.* **2002**, 9, 277. (c) Okonogi, T. M; Alley, S. C, Reese, A. W; Hopkins, P. B; Robinson, B. H. *Biophys. J.* **2000**, 78, 2560.
- (46) (a) Bruckner, I; Susic, S; Dlakiic, M; Savic, A; Pongor, S. *J. Mol. Biol.* **1994**, 236, 26. (b) Han, W; Dlakic, M; Zhu, Y. J; Lindsay, S. M; Harrington, R. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. **1997**, 94, 10565. (c) Tchernachenko, V; Halvorson, H. R; Lutter, L. C. *J. Mol. Biol.* **2004**, 341, 55.
- (47) Lilley, D. M. J (Ed.), *Structural Interactions*, IRL/Oxford University Press, New York, 1995.
- (48) Gosh, P. S; Han, G; Erdogan, B; Rosado, O; Krovi, S. A; Rotello, V. M. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2007**, 70, 13.
- (49) Han, G; You, G. G, Kim, B. J; Turingan, R. S; Forbes, N. S; Martin, C. T; Rotello, V. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 3165.

- (50) You, C. C; De, M; Han, G; Rotello, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12873.
- (51) Atay, Z; Biver, T; Corti, A; Eltugal, N; Lorenzini, E; Masini, M; Paolicchi, A; Pucci, A; Ruggeri, G; Secco, F, Venturini, M. *J. Nanopart. Res.* **2010**, en prensa.
- (52) Biver, T; Pulzonetti, M; Secco, F; Venturini, M; Yarmoluk, S. *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, *451*, 103.
- (53) Biver, T; Venturini, M; Jares-Erijman E. A; Jovin T. M; Secco, F. *Biochemistry.* **2009**, *48*, 173.
- (54) Wang, G; Zhang, J; Murray, R. W. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4320.
- (55) Morgan, A. R; Lee, J. S; Pulleyblank, D. E; Murray, N. L; Evans, D. H. *Nucleic Acid. Res.* **1979**, *7*, 547.
- (56) Meyer-Almes, F. J; Porschke, D. *Biochemistry.* **1993**, *32*, 4346.
- (57) Templeton, A. C.; Chen, S.; Gross, S. M.; Murray, R. W. *Langmuir* **1999**, *15*, 66.
- (58) Felsendeld, G; Hirschaman. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 409.
- (59) Huang, T; Murria, R. W. *J. Phys. Chem. B.* **2001**, *105*, 12498.
- (60) Mohamed, M. B.; Volkov, V.; Link, S.; El-Sayed, M. A. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *317*, 517.
- (61) Link, S.; El-Sayed, M. A. *Intl. Rev. Phys. Chem.* **2000**, *19*, 409.
- (62) Long, Y. F; Liao, Q. G; ZhiHuang, C; Ling, J; Li, Y. F. *J. Phys. Chem. B*, **2008**, *12*, 1783.
- (63) Borreguero, M.; Prado-Gotor, R. *J. Phys. Chem. A.* **2008**, *112*, 2813.
- (64) (a) Muriel-Delgado, F.; Jiménez, R.; Gómez-Herrera, C.; Sánchez, F. *Langmuir* **1999**, *15*, 4334. (b) Davies, K; Hussam, A. *Langmuir.* **1993**, *9*, 3270.
- (65) Dolcet, C.; Rodenas, E. *Can. J. Chem.* **1990**, *68*, 932.
- (66) Ortega, F.; Rodenas, E. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91* 837.
- (67) Bunton, C. A.; Moffat, J. R. *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 538.
- (68) Al-Lohedan, H. A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1995**, *2*, 1707.
- (69) Howe-Grant, M.; Lippard, S. J. *Biochemistry* **1979**, *18*, 5762.
- (70) Record, M. T.; Jr. Lohman, T. M.; DeHaseth, P. *J. Mol. Biol.* **1976**, *107*, 145.
- (71) Maye, M. M; Nykypanchuk, D; Van der Lelie, D; Gang, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14020.
- (72) Alberts, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Watson, J. D. *Molecular Biology of the Cell*; Galland: New York. 1994.

- (73) (a) Biver, T; De Biasi, A; Secco, F; Venturini, M; Yarmoluck, S. *Biophys. J.* **2005**, 89, 374. (b) Biver, T; Boggioni, A; Secco, F; Turriani, E; Venturini, M; Yarmoluck, S. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **2007**, 465, 90.
- (74) “Relaxation kinetics” Bernasconi, C. F.; Accademic Press: New York, 1976; p 21.
- (75) (a) Dias, R. S; Magno, L. M; Valente, A. J. M.; Das, D; Das, P. K; Maity, S; Miguel, M. G; Lindman, B. *J. Phys. Chem. B.* **2008**, 112, 14446. (b) Grueso, E; Roldan, E; Sanchez, F. *J. Phys. Chem. B.* **2009**, 113, 8319.
- (76) Neidle, S. (2002). *Nucleic. Acid. Structure and Recognition*. New York: Oxford University Press; p. 89-138.
- (77) (a) Nguyen, B; Neidle, S; Wilson, W. D. *Accounts of Chemical Research* **2009**, 42, 11. (b) Ihtshamul, Haq, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2002**, 403 (1), 1.
- (78) Ganguli, M; Babu, J. V; Maiti, S. *Langmuir*. **2004**, 20, 5165.
- (79) Strikland, J. A; Marzilli, L. G; Wilson, W. D. *Biopolymers*. **1990**, 29, 1307.
- (80) Smoluchowsky, M. V. *J. Phys. Chem.* **1917**, 92, 129.
- (81) Pradeep, L; Udgaonkar, J. B. *J. Mol. Biol.* **2007**, 366, 1016.

4. CONCLUSIONES.

4. CONCLUSIONES.

Los experimentos descritos en esta tesis proporcionan una importante información sobre los efectos del medio en la termodinámica y cinética de interacción de diversos ligandos, 1-pirenocarboxialdehído, tensioactivos catiónicos y nanopartículas de oro con ADN. Se han encontrado evidencias de los cambios conformacionales que inducen los distintos ligandos en su interacción con la macromolécula, en unos casos de manera indirecta (tensioactivos), y en otros también de forma directa, obtenidas a través de técnicas como el dicroísmo circular, microscopía electrónica y de barrido, que dan información de tipo estructural.

Algunas de las conclusiones sobre estos estudios son las siguientes:

1) El efecto del alcohol sobre la termodinámica de la interacción ADN/1-PyCHO, es en cierta forma, el resultado de una influencia indirecta, debida a las modificaciones que los alcoholes producen en la estructura del agua. Esta idea se sustenta en que las fracciones molares “mágicas” de los alcoholes, a las cuales las propiedades de las mezclas acuosas pasan a través de un máximo o un mínimo, son cercanas a las fracciones molares, X_m , para las que $\Delta G_{\max}^{\text{corr}}$ pasa a través de un máximo. Esta idea ha sido confirmada en el estudio cinético de este sistema en presencia de alcoholes: la variación de las constantes de velocidad correspondientes a la primera etapa del mecanismo no evidencian un efecto específico del tipo de alcohol sobre esta interacción. Sin embargo, los efectos específicos de cada alcohol se ponen de manifiesto en las variaciones, con la concentración molar de alcohol, de las constantes directas, k_2 , y más aún, en las inversas, k_{-2} , correspondientes a la segunda etapa del proceso de interacción 1-PyCHO/ADN. Cuantitativamente encontramos que, para una misma fracción molar de alcohol, las constantes de velocidad k_{-2} son mayores para el terc-butanol, seguido del 2-propanol, y por último para el etanol.

2) El comportamiento en las variaciones de $\Delta G_{\max}^{\text{corr}}$ correspondientes a la interacción del 1-PyCHO con el ADN en presencia de los alcoholes, es diferente, del observado en presencia de sales, urea, tensioactivos y nanopartículas, en el sentido de que no existen extremos, sino una variación monótona en la energía libre de asociación 1-PyCHO/ADN.

3) La interacción de sales, tensioactivos y nanopartículas, sobre el ADN, al contrario que la de los alcoholes, es de tipo directo. En este sentido las variaciones de ΔG^{corr} con la concentración de estos agentes (sales, tensioactivos y nanopartículas) se han explicado de acuerdo con un modelo de dos estados para la unión del ADN, según el cual estos agentes interactúan directamente con el ADN, causando un cambio estructural en la biomolécula. Este modelo nos ha permitido determinar la energía libre de interacción de las sales, tensioactivos y nanopartículas con el ADN.

4) La energía libre de asociación de las sales con el ADN, $\Delta G^{\text{sal}}_{\text{ADN}}$, disminuye linealmente, al variar la concentración de sal, y se hace más negativa al aumentar la carga del catión.

5) Se ha demostrado que las interacciones de los tensioactivos con $n < 4$ producen cambios estructurales en el ADN que lo hace menos eficiente para unirse a la sonda (ΔG^{corr} se hace menos negativa al aumentar la concentración de tensioactivo). Por el contrario, las interacciones de los tensioactivos con $n \geq 4$, producen cambios estructurales en el ADN que lo hace más eficiente para unirse al 1-PyCHO (ΔG^{corr} se hace más negativa al aumentar la concentración de tensioactivo).

6) En cuanto al caso de los alcoholes, pueden distinguirse dos tramos en la variación de la energía libre de interacción 1-PyCHO/ADN al variar la concentración de alcohol. A bajas concentraciones de alcohol, estos actúan como un soluto hidrofílico, es decir se comportan como las sales en su interacción con el ADN. En cambio, a altas concentraciones de alcohol, estos actúan como un soluto hidrofóbico, esto es, como los tensioactivos.

7) El efecto de la urea sobre la energía libre de asociación del 1-PyCHO/ADN es similar al de las cabezas de los tensioactivos y las sales, en el sentido de que la energía libre de interacción se hace menos negativa al aumentar la concentración de urea.

8) Se han determinado las constantes de equilibrio correspondientes a la interacción ADN/AuNPs.

9) Se ha establecido que las nanopartículas de oro funcionalizadas con tiopronina se unen al ADN provocando un desenrollamiento (“unwinding”) y una envoltura del

biopolímero (“wrapping”) sobre los nanoclusters, facilitándose la formación de agregados compactos ADN/AuNPs.

10) A partir de los resultados de las experiencias cinéticas se estableció que el mecanismo de reacción del sistema ADN/1-PyCHO consta de dos etapas en serie. El primer paso del mecanismo de interacción se atribuye a la formación de un complejo externo, $(\text{ADN/Py})_{\text{I}}$, mientras que el segundo corresponde a la intercalación de la sonda entre las bases del ADN, dando lugar al complejo final, $(\text{ADN/Py})_{\text{II}}$.

11) Se ha establecido el mecanismo de interacción del tensioactivo CTAB al ADN. Este mecanismo consta de dos pasos en serie. El primer paso corresponde a la formación de un complejo externo, resultado de la interacción electrostática entre las cabezas de los tensioactivos y los grupos fosfato del ADN, cargados negativamente. El segundo paso corresponde a un cambio conformacional controlado por difusión, inducido por la unión del tensioactivo al ADN.

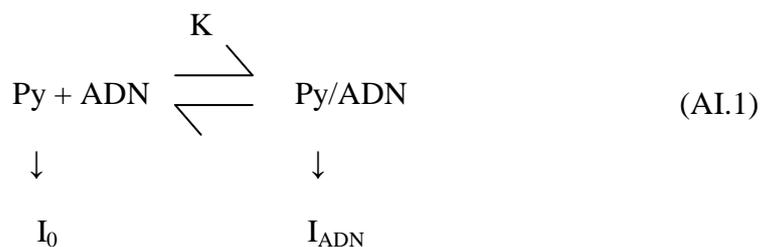
12) Se ha determinado que el mecanismo de reacción de las nanopartículas de oro con el ADN consta de tres pasos sucesivos. El primer paso del mecanismo es muy rápido y corresponde a la formación de un aducto externo (ADN, AuNPs) . El segundo ha sido interpretado como resultado de la unión de las nanopartículas a los surcos del ADN. Por último, el tercer paso del mecanismo corresponde a un cambio conformacional, controlado por difusión, del complejo $(\text{ADN/AuNP})_{\text{I}}$ hasta una conformación final más compacta, $(\text{ADN/AuNP})_{\text{II}}$.

5. APÉNDICES

5.1. Apéndice I. Procedimiento de ajuste de los datos termodinámicos al modelo de sigmoidea.

En nuestras experiencias, se observó una dependencia de la constante termodinámica correspondiente a la unión ADN/1-PyCHO con el cociente $[ADN/Py]/[ADN]$. Esta dependencia se debe a los efectos de interacción entre sitios de unión, que varía con el grado de saturación.

En presencia de ADN, el 1-PyCHO se enlaza parcialmente a éste, de forma que en disolución tendremos tanto 1-PyCHO libre, como 1-PyCHO enlazado al ADN:



donde K se define como:

$$K = \frac{[ADN/Py]}{[ADN][Py]} \quad (AI.2)$$

El 1-PyCHO libre emite a una intensidad I_0 , mientras que el 1-PyCHO enlazado lo hace con una intensidad I_{DNA} , de tal forma que la intensidad de emisión observada es el promedio dado por la ecuación AI.3:

$$I = \frac{I_0 + I_{ADN}K[ADN]}{1 + K[ADN]} \quad (AI.3)$$

En esta ecuación, $[ADN]$ representa la concentración total de polinucleótido expresada en grupos fosfato o nucleótidos. Como ya se ha indicado, K depende, para una concentración fija de pireno, de la concentración de ADN. Para describir esta dependencia se ensayó:

$$\begin{array}{ll}
 K = K_{\max} \frac{e^t}{1 + e^t} & (a) \\
 t = \frac{[ADN] - h}{j} & (b)
 \end{array} \quad (AI.4)$$

Esta dependencia corresponde a un comportamiento sigmoideal de K. En la ecuación anterior, K_{\max} representa el máximo valor de K, esto es, el valor de este parámetro cuando la concentración de ADN es lo bastante grande como para evitar que se noten los efectos de interacción entre sitios. Finalmente, en la ecuación AI.4.b, h es el valor de [ADN] para la cual $K = (1/2)K_{\max}$, y j es un parámetro ajustable.

Para el ajuste de los datos de intensidad a la ecuación AI.3, se empleó un proceso de ajuste iterativo, teniendo en cuenta la dependencia de K descrita por la ecuación AI.4.

Despejando K en la ecuación AI.3, podemos obtener la variación de K con la concentración de ADN:

$$K = \frac{(I_0 - I)}{(I - I_{\text{ADN}})} \frac{1}{[\text{ADN}]} \quad (\text{AI.5})$$

donde I_0 se toma como la intensidad de fluorescencia experimental de la sonda a $[\text{ADN}] = 0 \text{ M}$; I es la intensidad de fluorescencia experimental a cada concentración de ADN e I_{ADN} , es la intensidad límite correspondiente al pireno unido al ADN. La linealización de la ecuación AI.4 produce:

$$\ln\left(\frac{K_{\max}}{K} - 1\right) = \frac{h}{j} - \frac{[\text{ADN}]}{j} \quad (\text{AI.6})$$

Esta ecuación permite obtener K_{\max} , h y j mediante un ajuste de los datos experimentales. Dicho ajuste se realiza mediante un procedimiento iterativo en el que se fija un valor de I_{ADN} . Con este valor de I_{ADN} se intenta ajustar la ecuación variando K_{\max} , hasta linealizar la ecuación AI.6. La no linealización de la ecuación requerirá tomar otro valor de I_{ADN} y probar distintos valores de K_{\max} . Este proceso se repetirá hasta obtener el mejor ajuste de los datos experimentales a la recta $\ln(K_{\max}/K - 1)$ vs. [ADN], según el método de los mínimos cuadrados. Esta recta proporcionará, del valor de la pendiente, el valor del parámetro j; mientras que, a partir de este valor y el de la ordenada, podremos obtener el valor de h del mejor ajuste.

Después de cada ajuste, para verificar que éste es correcto, se calculan los valores de intensidad teórica ($I_{\text{teórica}}$), teniendo en cuenta los parámetros K_{\max} , h, j, e I_{ADN} , obtenidos a partir de la ecuación AI. 6:

$$I_{\text{teórica}} = \frac{I_0 + I_{\text{ADN}} K_{\text{max}} \frac{\exp(([\text{ADN}] - h)/j)}{(1 + \exp(([\text{ADN}] - h)/j))} [\text{ADN}]}{1 + K_{\text{max}} \frac{\exp(([\text{ADN}] - h)/j)}{(1 + \exp(([\text{ADN}] - h)/j))} [\text{ADN}]} \quad (\text{AI.7})$$

Los valores de intensidad de fluorescencia teóricos ($I_{\text{teóricos}}$) así calculados, estuvieron en buen acuerdo con los valores de intensidad experimental ($I_{\text{experimental}}$), dentro de un intervalo de un 5% de error.

5.2. Apéndice II. Parámetros de ajuste al modelo de sigmoidea obtenidos en la determinación de las constantes termodinámicas de interacción ADN/1-PyCHO.

Alcoholes.

Etanol.

X_m	$10^{-3}K_{max}/M$	h/M^{-1}	j
0.0202	730	0.00045	0.00012
0.0264	315	0.00048	0.00013
0.0329	177	0.00054	0.00017
0.0693	13	0.00055	0.00026
0.1150	2	0.00089	0.00047

2-Propanol

X_m	$10^{-3}K_{max}/M$	h/M^{-1}	j
0.0220	157	0.00044	0.00021
0.0254	110	0.00040	0.00015
0.0291	77	0.00068	0.00030
0.0382	37	0.00069	0.00026
0.0566	13	0.00106	0.00037
0.0800	5	0.00138	0.00078

Terc-butanol

X_m	$10^{-3}K_{max}/M$	h/M^{-1}	j
0.0078	134	0.00021	0.00015
0.0126	90	0.00030	0.00016
0.0207	49	0.00034	0.00019
0.0362	18	0.00078	0.00029

Urea

[urea]/M	$10^{-3}K_{\max}/M$	h/M^{-1}	j
0.001	182	0.00028	0.00009
0.010	144	0.00026	0.00011
0.100	140	0.00046	0.00021
0.350	130	0.00053	0.00033

Tensioactivos y sales de amonio cuaternario.

$10^{-4}(\text{CH}_3)_4\text{NBr}/M$	$10^{-3}K_{\max}/M$	h/M^{-1}	j
0.1	170	0.00043	0.00015
1.0	158	0.00012	0.00013

$10^{-4}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{N}(\text{CH}_3)_3^+/M$	$10^{-3}K_{\max}/M$	h/M^{-1}	j
0.2	165	0.00032	0.000092
2.0	158	0.00019	0.000084

$10^{-4}(\text{C}_4\text{H}_9)\text{N}(\text{CH}_3)_3^+/M$	$10^{-3}K_{\max}/M$	h/M^{-1}	j
0.2	200	0.00087	0.00035
0.5	230	0.00054	0.00022
0.7	265	0.00066	0.00021
1.0	280	0.00066	0.00019

$10^{-4}(\text{C}_8\text{H}_{17})\text{N}(\text{CH}_3)_3^+/\text{M}$	$10^{-3}\text{Kmax}/\text{M}$	h/M^{-1}	j
0.2	208	0.00047	0.00016
0.5	245	0.00049	0.00018
0.7	260	0.00044	0.00015
1.0	280	0.00045	0.00014

$10^{-4}[\text{DTAB}]/\text{M}$	$10^{-3}\text{Kmax}/\text{M}$	h/M^{-1}	j
0.20	210	0.00046	0.00022
0.35	245	0.00064	0.00022
0.50	260	0.00051	0.00016
0.60	269	0.00042	0.00014
0.70	272	0.00046	0.00015

$10^{-4}[\text{TTAB}]/\text{M}$	$10^{-3}\text{Kmax}/\text{M}$	h/M^{-1}	j
0.10	216	0.00042	0.00017
0.20	233	0.00068	0.00023
0.30	253	0.00054	0.00023
0.40	265	0.00052	0.00020
0.50	270	0.00052	0.00021

$10^{-4}[\text{CTAB}]/\text{M}$	$10^{-3}K_{\text{max}}/\text{M}$	h/M^{-1}	j
0.11	215	0.00062	0.00028
0.17	235	0.00054	0.00025
0.22	255	0.00046	0.00020
0.35	265	0.00051	0.00022
0.50	275	0.00050	0.00019

Nanopartículas de oro (AuNPs)

$10^{-7}[\text{AuNPs}]/\text{M}$	$10^{-3}K_{\text{max}}/\text{M}$	h/M^{-1}	j
2.5	55.0	0.00031	0.000066
6.0	20.2	0.00033	0.000093

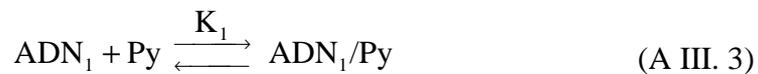
5.3. Apéndice III. El modelo de dos estados para la interacción ADN-ligando, en presencia de agentes que modifican la estructura del ADN: una simplificación.

Considérese una disolución que contiene ADN, 1-PyCHO, y un tercer agente (S) que actúa sobre el ADN modificando su capacidad para unirse a la sonda. En estas condiciones, existirán al menos 3 equilibrios implicados en la interacción. Uno de ellos corresponde a la asociación ADN/S: a medida que el agente S es añadido a la disolución que contiene la biomolécula y la sonda, el ADN cambia desde un estado 1 (ADN₁ no unido a S), a un estado 2 (ADN unido a S, ADN₂). Este cambio del ADN está representado por el siguiente equilibrio:



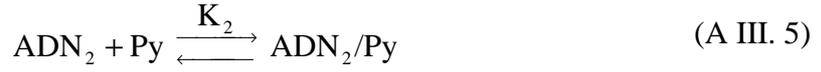
$$K_{\text{ADN}}^{\text{S}} = \frac{[\text{ADN}_2]}{[\text{ADN}_1][\text{S}]} \quad (\text{A III. 2})$$

Los otros dos equilibrios corresponden a la asociación de la sonda, 1-PyCHO, al ADN en las dos conformaciones que están presentes en el sistema. La asociación del 1-PyCHO a la biomolécula en el estado 1, donde el ADN se encuentra libre de sustrato, S viene dada por la ecuación AIII. 3 y A.III.4:



$$K_1 = \frac{[\text{ADN}_1/\text{Py}]}{[\text{ADN}_1][\text{Py}]} \quad (\text{A III. 4})$$

Y el equilibrio correspondiente a la asociación de la sonda al ADN en el estado 2 (unido al sustrato S) estaría representado por las siguientes ecuaciones:



$$K_2 = \frac{[\text{ADN}_2/\text{Py}]}{[\text{ADN}_2][\text{Py}]} \quad (\text{A III. 6})$$

En general, para cualquier propiedad de interés del sistema, P, el valor medido de esta propiedad ($\langle P \rangle$), es la suma de las fracciones de las contribuciones de cada estado:

$$\langle P \rangle = \sum X_i P_i \quad (\text{A III. 7})$$

Si el pireno se encuentra en tres estados: libre, unido al ADN₁ y unido al ADN₂:

$$\langle P \rangle = P_1 X_1 + P_2 X_2 + P_3 X_3 \quad (\text{A III. 8})$$

En condiciones en que la concentración de sustrato libre es muy pequeña:

$$X_1 = \frac{K_1 [\text{ADN}_1]}{1 + K_1 [\text{ADN}_1] + K_2 [\text{ADN}_2]} \quad (\text{A III. 9})$$

$$X_2 = \frac{K_2 [\text{DNA}_2]}{1 + K_1 [\text{ADN}_1] + K_2 [\text{ADN}_2]} \quad (\text{A III. 10})$$

$$X_1 + X_2 + X_3 (\approx 0) = 1 \quad (\text{A III. 11})$$

Sustituyendo las expresiones de la AIII.9 a la AIII.11 en la ecuación AIII.8 se tiene:

$$\langle P \rangle = \frac{P_1 K_1 [\text{ADN}_1] + P_2 K_2 [\text{ADN}_2]}{1 + K_1 [\text{ADN}_1] + K_2 [\text{ADN}_2]} \quad (\text{AIII. 12})$$

Las concentraciones de ADN_1 y ADN_2 vienen dadas por:

$$[ADN_1] = \frac{1}{1 + K[S]} [ADN] \quad (A III. 13)$$

$$[ADN_2] = \frac{K[S]}{1 + K[S]} [ADN] \quad (A III. 14)$$

Introduciendo estas concentraciones de ADN en la ecuación AIII.12, y reorganizando, llegamos a la expresión:

$$\langle P \rangle = \frac{P_1 + P_2 \frac{K_2}{K_1} K[S]}{1 + \frac{K_2}{K_1} K[S]} \quad (A III. 15)$$

Esta ecuación relaciona los cambios en cualquier propiedad del sistema con los cambios en la concentración de agente, S. Considerando las energías libres corregidas ADN/1-PyCHO a diferentes concentraciones de S, como propiedad de interés se obtiene:

$$\Delta G^{corr} = \frac{\Delta G_1^{corr} + \Delta G_2^{corr} \frac{K_2}{K_1} K_{ADN}^S [S]}{1 + \frac{K_2}{K_1} K_{ADN}^S [S]} \quad (A III. 16)$$

En esta ecuación, ΔG_1^{corr} es la energía libre corregida de asociación del 1-PyCHO al ADN en estado 1 (libre de S); ΔG_2^{corr} corresponde a la energía libre corregida para la unión del 1-PyCHO al ADN en estado 2, en el cual el ADN está unido al agente S. Finalmente, K_{ADN}^S , es la constante de equilibrio correspondiente a la asociación del

sustrato S al ADN. Nótese que esta ecuación puede simplificarse a la ecuación dada para el modelo de dos estados, en el caso particular de que la afinidad del 1-PyCHO por el ADN en el estado 1, representada por la constante de equilibrio K_1 , sea aproximadamente igual a la de la sonda por el estado 2, K_2 ($K_2/K_1 \sim 1$).

5.4. Apéndice IV. Inversos de los tiempos de relajación corto $1/\tau_1$ y largo, $1/\tau_2$, en función de la concentración de ADN y de alcohol, para el sistema 1-PyCHO/ADN.

Etanol

X_{Etanol} = 0.0202			X_{Etanol} = 0.0329			X_{Etanol} = 0.0534		
10⁴[ADN]/M	1/τ₁(s⁻¹)	1/τ₂(s⁻¹)	10⁴[ADN]/M	1/τ₁(s⁻¹)	1/τ₂(s⁻¹)	10⁴[ADN]/M	1/τ₁(s⁻¹)	1/τ₂(s⁻¹)
0.50	110	6.5	0.50	86	2.7	0.50	53	3.5
1.00	123	12.0	1.00	96	6.0	0.75	65	4.0
1.50	126	14.3	1.50	100	10.0	1.00	56	4.0
2.00	133	19.3	2.00	104	12.0	1.50	65	4.8
2.50	149	20.9	2.50	107	15.5	2.00	80	6.0
3.00	159	24.5	3.00	114	14.0	3.00	80	8.0
4.00	180	27.1	4.00	123	19.0	4.00	85	9.2
5.00	188	33.0	6.00	139	23.0	5.00	95	11.0
6.00	215	36.4	8.00	167	25.0	6.00	104	11.6
7.00	226	38.0	10.00	189	27.5	8.00	111	15.5
8.00	240	41.8				10.00	117	17.0
10.00	265	45.0						
X_{Etanol} = 0.0693			X_{Etanol} = 0.0891			X_{Etanol} = 0.1150		
10⁴[ADN]/M	1/τ₁(s⁻¹)	1/τ₂(s⁻¹)	10⁴[ADN]/M	1/τ₁(s⁻¹)	1/τ₂(s⁻¹)	10⁴[ADN]/M	1/τ₁(s⁻¹)	1/τ₂(s⁻¹)
0.50	40	2.0	0.50	23	0.8	1.00	15	1.1
0.75	41	1.8	1.00	28	1.7	1.50	16	1.5
1.00	41	2.5	1.50	27	2.5	2.00	19	1.7
1.50	43	3.3	2.00	30	3.0	2.50	22	2.0
2.00	45	4.0	2.50	32	2.7	3.00	21	1.9
2.50	50	4.0	3.00	44	3.7	4.00	29	2.0
3.00	55	6.5	4.00	43	4.1	5.00	29	2.4
4.00	60	6.9	6.00	50	3.8	6.00	28	3.0
5.00	62	8.0	8.00	51	5.5	7.00	32	2.9
6.00	68	7.9	10.00	60	5.3	8.00	35	2.7
8.00	78	8.5				10.00	39	3.0
10.00	83	9.2						

2-Propanol

X_{2-Propanol} = 0.0220			X_{2-Propanol} = 0.0291			X_{2-Propanol} = 0.0382		
10⁴[ADN]/M	1/τ₁(s⁻¹)	1/τ₂(s⁻¹)	10⁴[ADN]/M	1/τ₁(s⁻¹)	1/τ₂(s⁻¹)	10⁴[ADN]/M	1/τ₁(s⁻¹)	1/τ₂(s⁻¹)
0.75	132	10.0	0.75	102	4.0	1.00	96	6.0
1.00	130	14.5	1.00	104	6.0	1.50	102	11.0
1.50	133	15.5	1.50	109	11.0	2.00	120	14.9
2.00	153	21.0	2.00	120	14.9	2.50	136	17.8
2.50	158	20.3	2.50	136	17.8	3.00	141	19.0
3.00	171	29.0	3.00	141	19.0	4.00	139	20.7
4.00	177	34.0	4.00	139	20.7	5.00	145	28.0
5.00	197	36.0	5.00	145	28.0	6.00	165	26.0
6.00	200	43.0	6.00	165	26.0	7.00	171	30.0
7.00	216	47.0	7.00	171	30.0	8.00	183	32.0
8.00	233	50.0	8.00	183	32.0	9.00	189	31.0
10.00	250	56.0	9.00	189	31.0	10.00	202	35.0
			10.00	202	35.0			
X_{2-Propanol} = 0.0566			X_{2-Propanol} = 0.0717					
10⁴[ADN]/M	1/τ₁(s⁻¹)	1/τ₂(s⁻¹)	10⁴[ADN]/M	1/τ₁(s⁻¹)	1/τ₂(s⁻¹)			
1.00	46	2.6	1.00	25	1.5			
1.50	47	3.1	1.50	27	1.9			
2.00	53	3.9	2.00	32	2.4			
2.50	60	4.6	2.50	41	2.4			
3.00	63	5.1	3.00	44	2.5			
4.00	67	5.5	4.00	45	2.8			
5.00	71	6.7	5.00	55	3.1			
6.00	81	7.7	6.00	52	3.2			
7.00	86	7.9	8.00	65	3.7			
8.00	91	8.3	10.00	70	4.0			
9.00	95	8.9						
10.00	103	8.9						

Terc-butanol

X_{Terc-butanol} = 0.0126			X_{Terc-butanol} = 0.0207			X_{Terc-butanol} = 0.0271		
10⁴[ADN]/M	1/τ₁(s⁻¹)	1/τ₂(s⁻¹)	10⁴[ADN]/M	1/τ₁(s⁻¹)	1/τ₂(s⁻¹)	10⁴[ADN]/M	1/τ₁(s⁻¹)	1/τ₂(s⁻¹)
1.00	134	14.0	0.75	114	5.5	1.00	95	5.5
1.50	140	19.5	1.00	116	11.0	1.50	107	9.0
2.00	145	23.0	1.50	123	14.0	2.00	115	15.4
2.50	172	29.0	2.00	125	18.0	2.50	116	18.6
3.00	180	35.0	2.50	134	21.0	3.00	130	20.8
4.00	188	40.0	3.00	140	27.0	4.00	130	23.8
5.00	212	43.0	4.00	162	29.4	5.00	150	26.6
6.00	232	47.0	5.00	170	34.0	6.00	154	26.0
7.00	236	52.0	6.00	179	36.2	7.00	164	30.0
8.00	265	55.0	7.00	187	37.0	8.00	172	30.3
10.00	282	58.0	8.00	200	38.0	9.00	176	33.0
			10.00	221	42.0	10.00	186	34.0
X_{Ter-butanol} = 0.0362			X_{Terc-butanol} = 0.0526					
10⁴[ADN]/M	1/τ₁(s⁻¹)	1/τ₂(s⁻¹)	10⁴[ADN]/M	1/τ₁(s⁻¹)	1/τ₂(s⁻¹)			
1.00	75	5.0	1.00	54	4.7			
1.25	86	7.5	1.50	55	4.8			
1.50	88	9.0	2.00	60	5.0			
2.00	100	11.0	2.50	61	5.5			
2.50	95	13.0	3.00	63	5.7			
3.00	103	14.0	4.00	67	7.1			
4.00	110	16.9	5.00	74	8.0			
5.00	115	18.0	6.00	82	8.5			
6.00	125	20.0	7.00	88	8.5			
7.00	135	21.6	8.00	90	9.1			
8.00	137	22.4	10.00	102	9.3			
10.00	147	24.0						

5.5. Apéndice V. Valores de los inversos de los tiempos de relajación corto, $1/\tau_1$, y largo, $1/\tau_2$ en función de la concentración de ADN, para cada concentración de sal, correspondientes al sistema ADN/CTAB.

[NaCl] = 0 M			[NaCl] = 0.001 M		
$10^4[\text{ADN}]/\text{M}$	$1/\tau_1(\text{s}^{-1})$	$1/\tau_2(\text{s}^{-1})$	$10^4[\text{ADN}]/\text{M}$	$1/\tau_1(\text{s}^{-1})$	$1/\tau_2(\text{s}^{-1})$
0.50	0.191	0.041	0.50	0.148	0.0310
0.75	0.205	0.047	0.75	0.150	0.0361
1.00	0.240	0.055	1.00	0.225	0.0486
2.00	0.328	0.065	2.00	0.200	0.0450
3.00	0.400	0.077	2.50	0.320	0.0568
4.00	0.520	0.083	3.00	0.314	0.0660
5.00	0.620	0.087	4.00	0.426	0.0640
6.00	0.700	0.089	5.00	0.500	0.0640
7.00	0.798	0.090	6.00	0.600	0.0700
8.00	0.888	0.091	7.00	0.590	0.0723
			8.00	0.752	0.0760
			10.00	0.800	0.0811
[NaCl] = 0.003 M			[NaCl] = 0.010 M		
$10^4[\text{ADN}]/\text{M}$	$1/\tau_1(\text{s}^{-1})$	$1/\tau_2(\text{s}^{-1})$	$10^4[\text{ADN}]/\text{M}$	$1/\tau_1(\text{s}^{-1})$	$1/\tau_2(\text{s}^{-1})$
0.50	0.093	0.022	0.50	0.129	0.0162
0.75	0.157	0.033	0.75	0.134	0.0153
1.00	0.130	0.041	1.00	0.150	0.0180
2.00	0.200	0.041	2.00	0.145	0.0250
2.50	0.295	0.053	2.50	0.180	0.0290
3.00	0.301	0.045	4.00	0.247	0.0301
4.00	0.324	0.047	5.00	0.356	0.0350
5.00	0.416	0.055	6.00	0.317	0.0370
6.00	0.500	0.060	7.00	0.421	0.0370
7.00	0.534	0.063	8.00	0.450	0.0387
10.00	0.650	0.066	10.00	0.532	0.0417

[NaCl] = 0.02 M			[NaCl] = 0.05 M		
10⁴[ADN]/M	1/τ_1(s⁻¹)	1/τ_2(s⁻¹)	10⁴[ADN]/M	1/τ_1(s⁻¹)	1/τ_2(s⁻¹)
0.50	0.1890	0.00155	0.50	0.0220	0.00012
0.75	0.0190	0.0017	0.75	0.0230	0.00025
1.00	0.0240	0.0023	1.00	0.0250	0.00036
2.00	0.0250	0.0032	2.00	0.0300	0.00050
2.50	0.0269	0.0028	2.50	0.0304	0.00067
3.00	0.0306	0.0033	3.00	0.0326	0.00073
4.00	0.0330	0.0048	4.00	0.0030	0.00100
5.00	0.0360	0.0058	5.00	0.0345	0.00103
6.00	0.0380	0.0060	6.00	0.0385	0.00110
7.00	0.0390	0.0050	7.00	0.0430	0.00112
8.00	0.045	0.0064	8.00	0.0450	0.00108
10.00	0.0530	0.0070	10.00	0.0515	0.00112
[NaCl] = 0.1 M					
10⁴[ADN]/M	1/τ_1(s⁻¹)	1/τ_2(s⁻¹)			
1.00	0.0190	0.000102			
2.00	0.0214	0.00018			
2.50	0.0225	0.00021			
3.00	0.0215	0.00030			
4.00	0.0237	0.00035			
5.00	0.0230	0.00038			
7.00	0.0250	0.00046			
8.00	0.0254	0.00050			
10.00	0.0275	0.00055			

5.6. Apéndice VI. Valores de los inversos de los tiempos de relajación corto, $1/\tau_1$ y largo, $1/\tau_2$, para cada concentración de ADN, correspondientes al sistema ADN/AuNPs.

[NaCl] = 0 M			[NaCl] = 0.002 M		
10^4 [ADN]/M	$1/\tau_1$ (s ⁻¹)	$1/\tau_2$ (s ⁻¹)	10^4 [ADN]/M	$1/\tau_1$ (s ⁻¹)	$1/\tau_2$ (s ⁻¹)
1.00	30.7	7.20	1.00	24.7	5.63
1.50	37.1	7.76	1.50	31.2	6.90
2.00	41.2	7.23	2.00	32.0	7.79
3.00	52.0	9.08	2.50	35.7	8.44
3.50	53.9	10.15	3.00	39.7	8.94
4.00	57.2	9.28	3.50	43.6	9.34
4.50	61.3	9.50	4.00	44.8	9.66
5.00	63.3	11.60	4.50	44.1	9.93
6.00	69.5	11.80	5.00	49.8	10.15
7.00	73.3	12.10	6.00	53.1	10.60
8.00	79.4	12.00	7.00	56.5	10.51
9.00	81.2	12.04	8.00	59.8	10.78
10.00	84.3	13.60	9.00	62.6	11.16
			10.00	63.9	11.30
[NaCl] = 0.006 M			[NaCl] = 0.010 M		
10^4 [ADN]/M	$1/\tau_1$ (s ⁻¹)	$1/\tau_2$ (s ⁻¹)	10^4 [ADN]/M	$1/\tau_1$ (s ⁻¹)	$1/\tau_2$ (s ⁻¹)
0.75	19.4	2.78	1.00	19.1	3.45
1.00	21.0	3.82	1.50	22.2	4.42
1.50	24.2	4.79	2.00	25.9	5.00
2.00	25.7	5.52	2.50	27.3	5.50
2.50	28.1	5.88	3.00	30.4	5.80
3.00	32.3	6.44	3.50	31.9	6.20
3.50	32.2	6.69	4.00	30.8	6.50
4.00	32.6	6.63	4.50	33.8	6.70
4.50	38.4	7.24	5.00	36.7	6.90
5.00	41.9	7.74	6.00	37.7	7.20
6.00	42.5	7.54	7.00	41.0	7.50
7.00	46.0	7.86	8.00	42.6	7.60
8.00	45.7	7.85	9.00	45.7	7.80
9.00	49.3	7.98	10.00	47.0	7.98
10.00	52.5	8.49			

[NaCl] = 0.015 M		
10⁴[ADN]/M	1/τ_1(s⁻¹)	1/τ_2(s⁻¹)
1.00	17.7	2.74
1.50	19.8	3.46
2.00	21.7	4.06
2.50	23.5	4.50
3.00	25.4	4.85
3.50	26.6	5.14
4.00	28.0	5.38
4.50	29.3	5.50
5.00	30.5	6.23
6.00	32.7	6.80
7.00	34.7	6.80
8.00	36.5	7.50
9.00	38.0	7.50
10.00	39.4	8.00