
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ALESSANDRO BERTOLUZZA, SERGIO BONORA, MARIA
ANGELA BATTAGLIA

**Contributo allo studio sulle correlazioni fra struttura
e proprietà di composti di interesse biologico. Nota
IV. Struttura di soluzioni acquose concentrate di un
denaturante tipico delle proteine - clontrato di
guanidina — da misure spettroscopiche Raman e
ultrarosse**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 60 (1976), n.6, p. 839–852.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1976_8_60_6_839_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di
ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le
copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Chimica. — *Contributo allo studio sulle correlazioni fra struttura e proprietà di composti di interesse biologico. Nota IV. Struttura di soluzioni acquose concentrate di un denaturante tipico delle proteine — cloridrato di guanidina — da misure spettroscopiche Raman e ultrasuoni.* Nota di ALESSANDRO BERTOLUZZA (*,**), SERGIO BONORA (**) e MARIA ANGELA BATTAGLIA (**), presentata (***) dal Socio G. B. BONINO.

SUMMARY. — A structural model for the concentrated aqueous solutions of electrolytes is assigned by spectroscopical-vibrational data.

The model is then applied to the concentrated aqueous solutions of guanidinium hydrochloride, considering Raman, i.r. and near i.r. spectra.

Guanidinium hydrochloride has been chosen because it shows denaturing properties in regard to proteins in concentrated aqueous solutions.

The aim of this work is to give a first contribution to the study of the denaturing mechanism, considering the structural modifications of water in concentrated aqueous solutions of a typical protein denaturant such as guanidinium hydrochloride.

Da tempo è noto in letteratura [1] che alcune sostanze (quali ad esempio l'urea e derivati, i sali di guanidina, ecc.) possiedono una spiccata azione denaturante sulle soluzioni acquose delle proteine, nel senso che le proteine native disperse in acqua sotto forma di colloidali liofili subiscono, a seguito di diverse interazioni col loro intorno, un cambiamento di stato che è accompagnato da perdita di solubilità in acqua pura o in soluzione acquosa salina.

L'azione denaturante viene di solito collegata con un indebolimento delle interazioni che stabilizzano le conformazioni ripiegate delle proteine e interpretata in base allo studio della struttura e delle proprietà dell'acqua nei sistemi biologici e delle modificazioni della struttura dell'acqua comportate dalle sostanze denaturanti [2-14].

Occorre osservare, però, che l'azione denaturante di tali sostanze sulle soluzioni acquose delle proteine si verifica per concentrazioni molto elevate del denaturante (ad esempio $\sim 7M$ per l'urea, $\sim 5M$ per il cloridrato di guanidina, ecc.) e che in queste condizioni il rapporto molare acqua/denaturante (~ 5 per l'urea, ~ 7 per il cloridrato di guanidina) è tanto piccolo che perde di significato il modello di struttura proposto [15] e comunemente accettato per l'acqua nelle soluzioni acquose di soluti ionici o polari.

(*) Cattedra di Chimica della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Bologna. Centro Studi di Chimica e Chimica Fisica Applicata alle Caratteristiche di Impiego dei Materiali, Genova.

(**) Centro di Studio per la Spettroscopia Raman dell'Università di Bologna.

(***) Nella seduta del 10 giugno 1976.

Secondo questo modello si possono visualizzare le molecole d'acqua circonscritte ad uno ione o molecola polare di soluto in tre zone distinte, come appare in fig. 1 nel caso di uno ione di carica positiva.

La prima zona, più interna, è formata dalle molecole d'acqua interagenti direttamente con lo ione (o molecola polare) del soluto e che risentono pertanto dell'effetto orientante della specie coordinante. La terza zona, più esterna, è formata da quelle molecole d'acqua che non risentono dell'effetto orientante, neppure indirettamente, della specie coordinante e che assumono pertanto una distribuzione analoga a quella che si ha nell'acqua liquida.

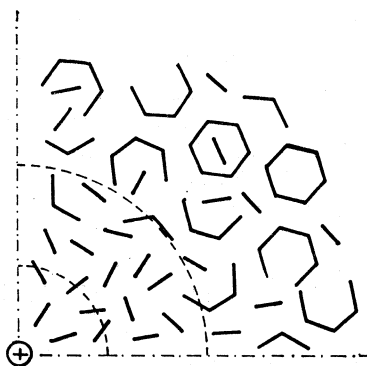


Fig. 1.

La seconda zona, intermedia, è tipica delle molecole d'acqua che non sono organizzate come quelle della I zona, nè disorganizzate come quelle della III, ma assumono una distribuzione che va gradualmente da uno stato più ordinato ad uno più disordinato.

La delimitazione fra le varie zone non è netta, ma dipende dal campo elettrostatico esercitato dalla specie orientante.

Soltanto nel caso di soluzioni acquose diluite ha significato parlare di struttura dell'acqua in quanto la maggior parte delle molecole d'acqua partecipa alle zone più esterne alla I, e le molecole sono caratterizzate da interazioni di legami di idrogeno $O-H \cdots O$ tipiche della struttura dell'acqua liquida.

Nel caso, invece, di soluzioni acquose concentrate la maggior parte delle molecole d'acqua si trova a far parte della I sfera di coordinazione, in cui predomina un diverso grado di interazione.

Ed è proprio dallo studio della « struttura » delle soluzioni acquose concentrate che riteniamo possa essere portato un nuovo contributo all'interpretazione del meccanismo di azione delle sostanze denaturanti sulle proteine.

Avvalora questa ipotesi il fatto che l'urea e i sali di guanidina non sono in sé denaturanti molto più effettivi di altre sostanze, se non perchè possono dare soluzioni acquose molto concentrate a causa della loro alta solubilità. In tal senso, anche LiBr, sale altamente solubile in soluzione acquosa, possiede

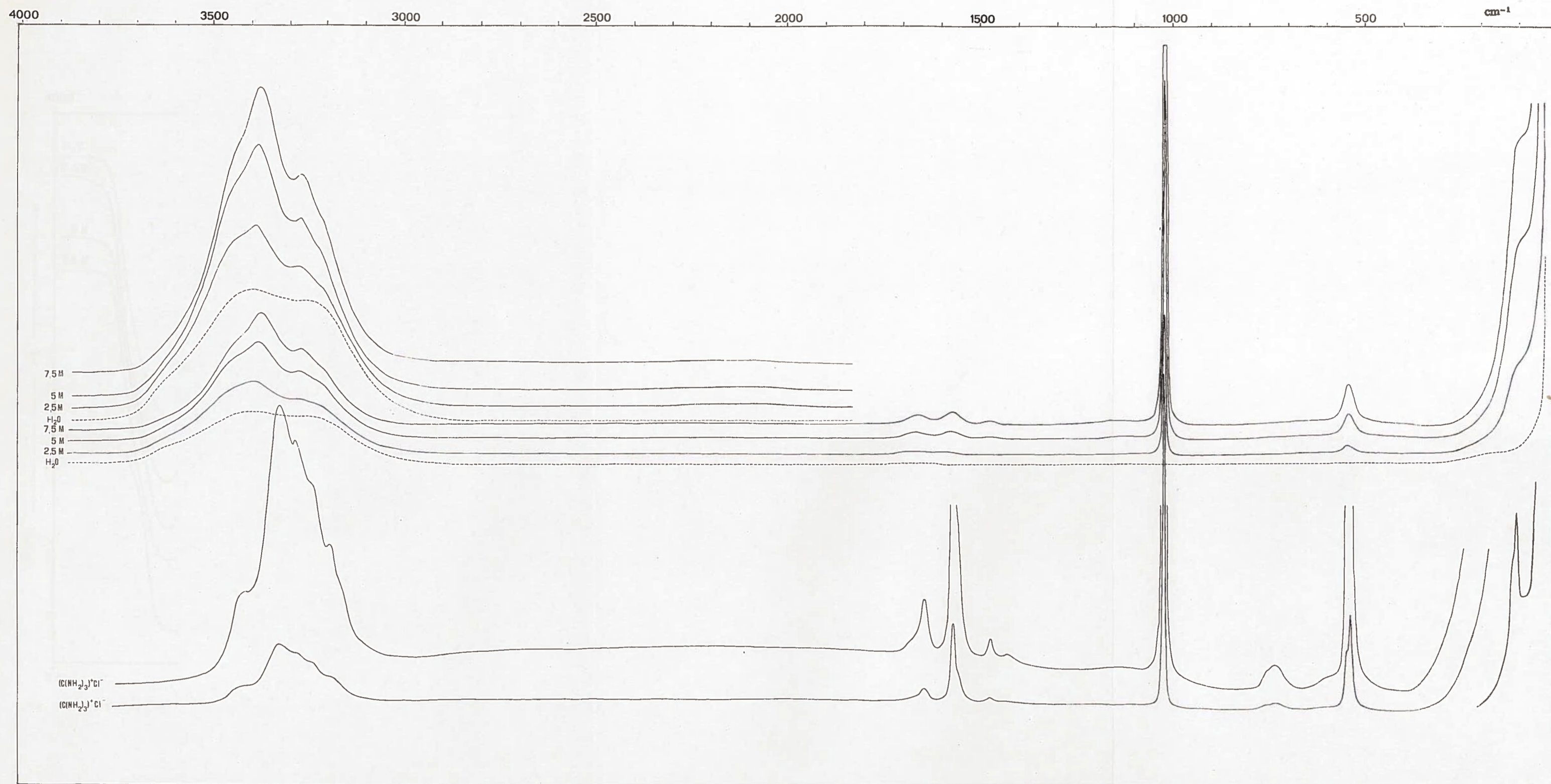


Fig. 2. - Spettri Raman di H_2O ; cloridrato di guanidina cristallino $\text{C}(\text{NH}_2)_3^+\text{Cl}^-$; soluzioni acquose del sale a diverse concentrazioni 2,5; 5 e 7,5 M, registrati con amplificazioni diverse.

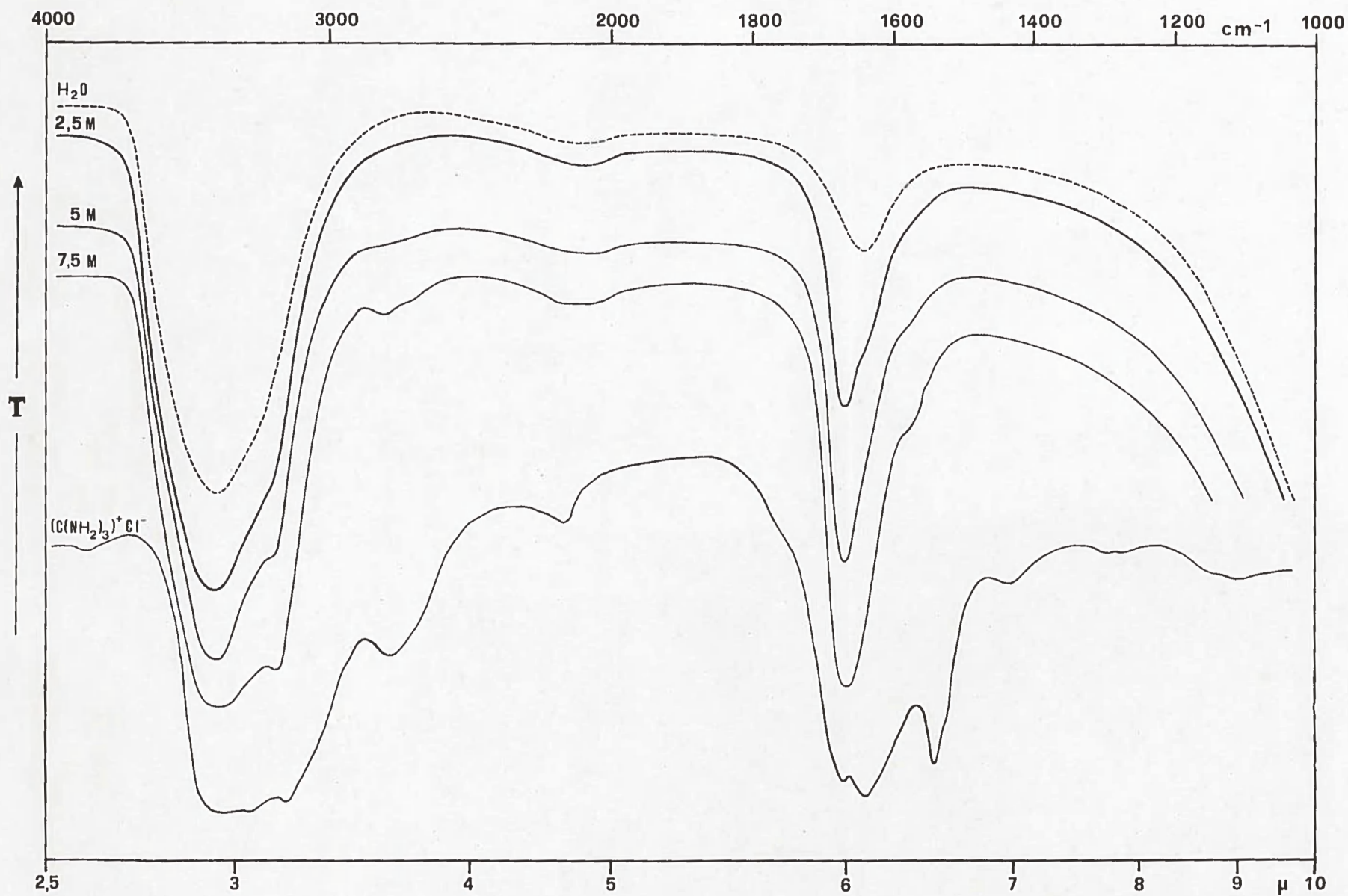


Fig. 3. - Spettri u.r. di H_2O ; cloridrato di guanidina cristallino $\text{C}(\text{NH}_2)_3^+\text{Cl}^-$ (emulsione in nujol e tripen); soluzioni acquose del sale a diverse concentrazioni (2,5; 5 e 7,5 M) usando finestre di CaF_2 .

un'azione denaturante sulle proteine, comparabile con quella dell'urea e dei sali di guanidina [4].

In questa prima Nota ci si è pertanto proposti di condurre uno studio spettroscopico di base, Raman laser e ultrarosso, sulle soluzioni acquose concentrate di un denaturante tipico, quale il cloridrato di guanidina.

PARTE SPERIMENTALE

Il cloridrato di guanidina usato era un prodotto Erba RP. Di esso sono state preparate soluzioni acquose a diversa e crescente concentrazione (2,5 M, 5 M e 7,5 M) usando acqua bidistillata.

Gli spettri Raman (fig. 2) sono stati registrati utilizzando uno spettrometro Raman laser Cary 81 ad Ar^+ (riga eccitatrice 4880 Å). Quelli nell'u.r. (fig. 3) sono stati ottenuti utilizzando uno spettrofotometro Perkin-Elmer Mod. 225 e usando, per le soluzioni, finestre di CaF_2 . Gli spettri nell'u.r. prossimo (fig. 4 a, 4 b) sono stati ottenuti utilizzando uno spettrofotometro Leitz a doppio raggio, dotato di opportuno reticolo, ed uno spettrofotometro Perkin-Elmer a doppio raggio, con rilevatore a PbS.

Tutte le esperienze sono state condotte alla temperatura di 25 °C.

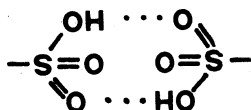
DISCUSSIONE

Gli spettri u.r. di soluzioni acquose diluite di elettroliti [16] e polielettroliti – sali dell'acido polistirolsolfonico – [17] forti non rivelano sostanziali spostamenti – rispetto all'acqua liquida – della frequenza della banda di vibrazione di allungamento OH.

Al contrario, gli spettri u.r. di soluzioni acquose concentrate degli stessi polielettroliti forti [17, 18] mostrano una certa diminuzione di tale frequenza, proporzionale al valore del campo elettrostatico del catione dissociato dal polielettrolita.

Nel caso poi di polielettroliti che in soluzione acquosa producono cationi che danno reazione di idrolisi si nota negli spettri u.r. la formazione di una larga banda a $\sim 2400 \text{ cm}^{-1}$, accompagnata da un debole assorbimento continuo verso le più basse frequenze [17].

Tale banda è stata attribuita [17] alle vibrazioni di allungamento OH dei legami di idrogeno di gruppi



presenti nella struttura dell'anione del polielettrolita (polistirolsolfato), mentre il debole assorbimento continuo è riferibile a vibrazioni di allungamento OH in legami di idrogeno di protoni idratati $\text{H}^+ (\text{H}_2\text{O})_n$.

Fig. 4 a. - Spettri u.r. (prossimo) di H_2O ; soluzioni acquose di cloridrato di guanidina $\text{C}(\text{NH}_2)_3^+\text{Cl}^-$ a diverse concentrazioni (2,5; 5 e 7,5 M); spessore 1 mm.

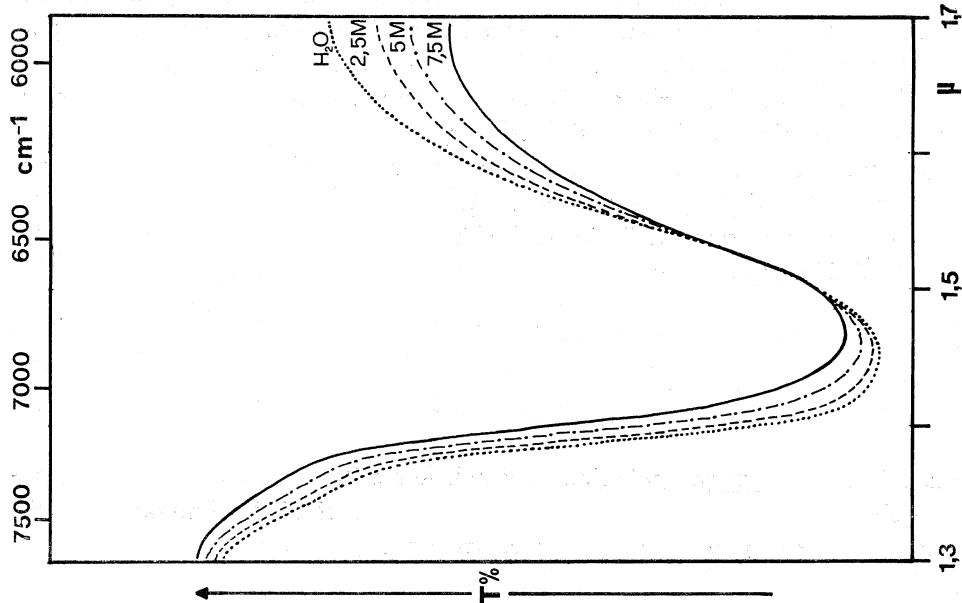
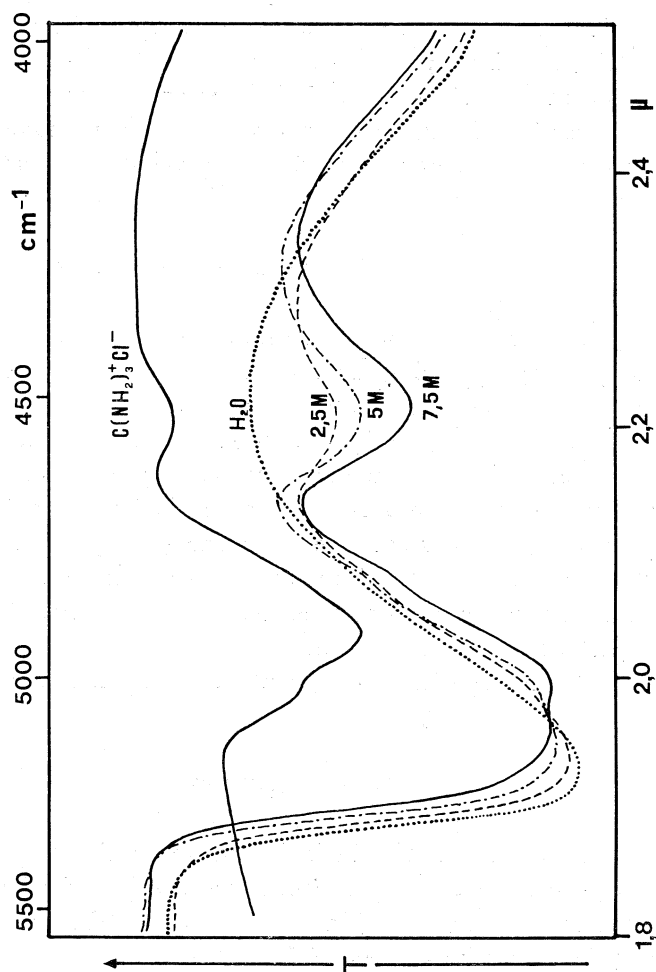


Fig. 4 b. - Spettri u.r. (prossimo) di H_2O ; cloridrato di guanidina cristallino $\text{C}(\text{NH}_2)_3^+\text{Cl}^-$ (emulsione in nujol); soluzioni acquose del sale a diverse concentrazioni (2,5; 5 e 7,5 M); spessore 0,3 mm.



Alla luce di queste osservazioni si può ipotizzare un modello di struttura per le soluzioni acquose concentrate di elettroliti, modello che si intende verificare in un futuro programma di ricerche spettroscopiche sull'argomento.

Se l'elettrolita si dissocia in ioni che non danno reazione di idrolisi (ioni a basso campo elettrostatico), l'interazione fra il catione C^{n+} o l'anione A^{n-} e le molecole d'acqua è del tipo prevalentemente elettrostatico, schematizzabile in fig. 5, e comporta valori piccoli di x , y e z , a seconda della concentrazione della soluzione.

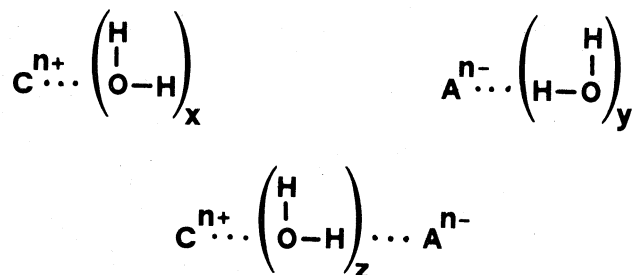


Fig. 5.

I legami di idrogeno OHO fra le molecole d'acqua interagenti con gli ioni dell'elettrolita sono caratterizzati da una funzione di potenziale a doppio minimo e alta barriera asimmetrica (fig. 6), la cui anarmonicità aumenta all'aumentare del campo elettrostatico degli ioni in soluzione.

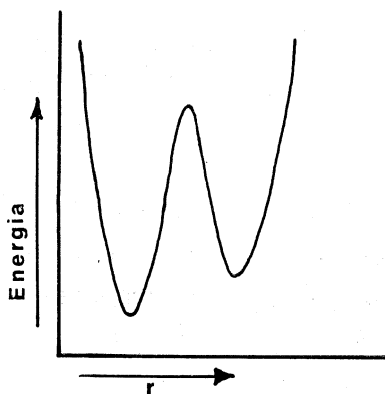


Fig. 6.

Contemporaneamente aumenta la polarizzabilità dei legami di idrogeno e anche lo spostamento, verso i valori più bassi, della frequenza di vibrazione di allungamento OH [19, 20].

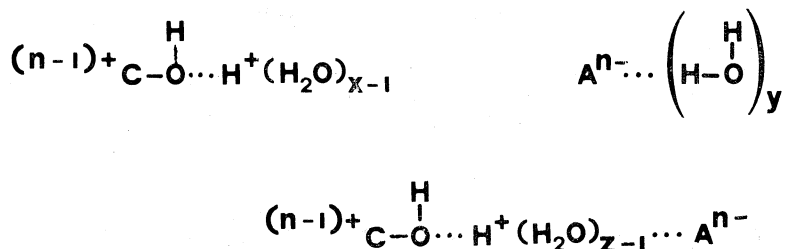
L'assenza di analoghi spostamenti della frequenza di vibrazione di allungamento OH nelle soluzioni acquose diluite degli stessi elettroliti può essere spiegata considerando che un maggior numero (x , y e z) di molecole d'acqua sono distribuite attorno agli ioni, o fra gli ioni, in soluzione. Il loro campo

elettrostatico risulta diffuso sopra un maggior numero di legami di idrogeno OHO, diventando ciascuno di essi meno perturbato e quindi meno polarizzabile.

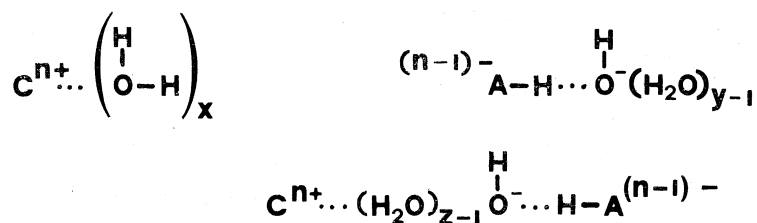
Nel caso di elettroliti che si dissociano in acqua in ioni con alto valore del campo elettrostatico (ioni che danno reazioni di idrolisi con l'acqua), si verifica una più forte perturbazione dei legami di idrogeno fra le molecole d'acqua direttamente coordinate al catione o all'anione, conseguente al carattere dativo del legame catione-acqua o anione-acqua.

Si possono presentare diversi casi (idrolisi del solo catione, idrolisi del solo anione, idrolisi di entrambi) schematizzabili in fig. 7

idrolisi del solo catione



idrolisi del solo anione



idrolisi del catione e dell'anione

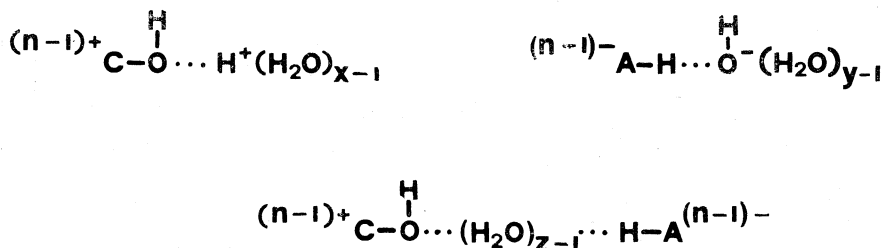


Fig. 7.

Per parziale idrolisi, e a seconda del rapporto molare catione/acqua e anione/acqua, si possono formare gli ioni H_5O_2^+ , H_7O_3^+ , H_9O_4^+ , ecc., oppure H_3O_2^- , H_5O_3^- , H_7O_4^- , ecc. Questi ioni sono caratterizzati da legami di idrogeno OHO forti (cioè con distanze interatomiche $\text{O} \cdots \text{O}$ minori di $2,6 \text{ \AA}$), come è stato evidenziato sia da misure di diffrazione di raggi X su acidi idratati solidi ($\text{HCl} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ [21], $\text{HBr} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ [22], $\text{HClO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ [23], $\text{HCl} \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ [24], $\text{HBr} \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ [25], $\text{HBr} \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ [26]), sia da misure di raggi X su soluzioni acquose concentrate di HCl [27, 28], sia da misure di sezione d'urto per diffusione elastica di ioni $\text{H}^+(\text{H}_2\text{O})_n$ e $\text{OH}^-(\text{H}_2\text{O})_n$ [29, 30].

Inoltre, i legami di idrogeno forti OHO presenti negli ioni idratati sopra indicati sono caratterizzati da una funzione di potenziale a doppio minimo e bassa barriera (fig. 8), in cui un certo grado di asimmetria può essere comportata dalla perturbazione asimmetrica elettrostatica cui è sottoposto lo ione (protone o ossidrile) idratato. Questi legami di idrogeno sono fortemente polarizzabili, e la polarizzabilità varia sia con la distanza interatomica $\text{O} \cdots \text{O}$, sia con il campo elettrostatico al quale è sottoposto il legame di idrogeno [31].

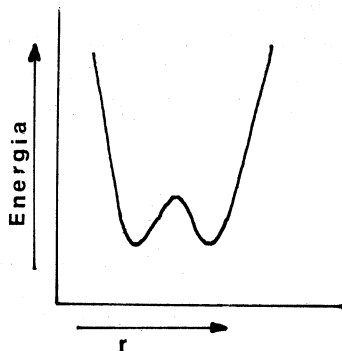


Fig. 8.

L'alto valore della polarizzabilità del protone di questi legami, nonché l'accoppiamento del movimento degli idrogeni nei vari legami di idrogeno forti OHO distribuiti nella soluzione, a seconda della concentrazione del protone, in un diverso intervallo di distanze e orientazioni, e la loro interazione con le molecole del solvente e l'accoppiamento con le vibrazioni reticolari, è all'origine della larga banda continua che inizia a 3000 cm^{-1} , estendendosi verso le più basse frequenze [17].

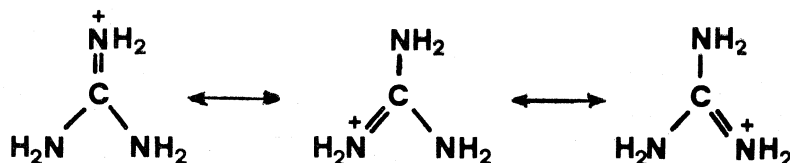
Tale banda, osservata per la prima volta da T. Ackermann [32] sugli spettri u.r. di soluzioni acquose concentrate di acidi e basi forti, successivamente da G. Zundel negli spettri u.r. di soluzioni acide e basiche di polielettroliti [17], da noi [33] su quelli Raman di soluzioni acquose concentrate di acidi e basi forti inorganici, e, più recentemente, anche da G. Zundel *et al.* [34] sugli spettri Raman di soluzioni acquose concentrate di HCl , aumenta all'aumentare della concentrazione protonica o ossidrilionica.

Prendendo ora in esame gli spettri Raman (fig. 2) e u.r. (fig. 3) delle soluzioni acquose di cloridrato di guanidina, non si osserva la larga banda continua, estendentesi da $\sim 3000 \text{ cm}^{-1}$ verso le più basse frequenze, tipica degli ioni $\text{H}^+(\text{H}_2\text{O})_n$ o $\text{OH}^-(\text{H}_2\text{O})_n$.

Questo comportamento, in accordo con il modello sopra esposto per le soluzioni acquose concentrate di elettroliti ⁽¹⁾, evidenzia una interazione fra l'acqua e gli ioni Cl^- e $\text{C}(\text{NH}_2)_3^+$ - in cui si dissocia il cloridrato di guanidina - di tipo prevalentemente elettrostatico.

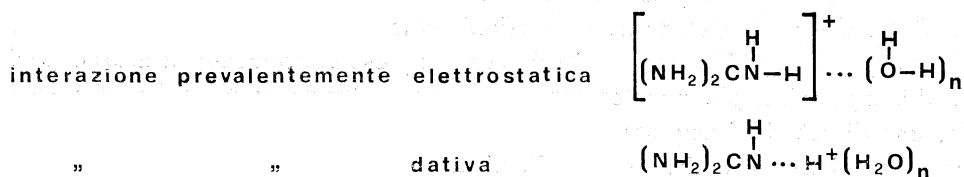
Il fatto che lo ione Cl^- formi con l'acqua ioni idratati $\text{Cl}^-(\text{H}_2\text{O})_n$ con legame di idrogeno $\text{O}-\text{H} \cdots \text{Cl}$ del tipo prevalentemente elettrostatico (schema fig. 5), è confermato da studi diffrattometrici di raggi X su soluzioni acquose di cloruri ionici, in cui si nota la formazione di legami di idrogeno $\text{O}-\text{H} \cdots \text{Cl}$ deboli, con distanza interatomica $\text{O} \cdots \text{Cl}$ di $3,2 \text{ \AA}$ [27, 35-38].

A sua volta il carattere prevalentemente elettrostatico dell'interazione ione guanidinio e acqua in $\text{C}(\text{NH}_2)_3^+(\text{H}_2\text{O})_n$ è confermato dalla piccola variazione, in numeri d'onda, delle bande tipiche dello ione guanidinio che si osserva sia negli spettri Raman che in quelli u.r. passando dal sale alle sue soluzioni acquose. In particolare, la vibrazione « breathing » di allungamento di legami CN cade a $\sim 1008 \text{ cm}^{-1}$ sia nello spettro Raman del cloridrato di guanidina solido, che in quelli delle sue soluzioni acquose concentrate. Considerando che la struttura dello ione guanidinio risuona fra le tre principali strutture



che conducono all'equivalenza dei legami carbonio-azoto, si può osservare che soltanto una interazione di tipo prevalentemente elettrostatico fra lo ione guanidinio e l'acqua non comporta una sostanziale modificazione della struttura dello ione, lasciando pressochè imperturbato l'ordine di legame carbonio-azoto e quindi il valore della frequenza della vibrazione « breathing » degli stessi legami.

(1) Gli schemi di interazione fra ione guanidinio e acqua, corrispondenti a quelli fra catione $\text{C}^{\text{H}+}$ e acqua di tipo elettrostatico (fig. 5) e dativo (fig. 7), sono:



Al contrario, se l'interazione ione guanidinio-acqua fosse del tipo prevalentemente dativo, cioè dovuta alla dissociazione del protone e alla conseguente interazione di quest'ultimo con le molecole d'acqua, si verrebbero a formare le specie guanidina $C(NH_2)_2NH$ e $H^+(H_2O)_n$. La formazione di tali specie dovrebbe essere evidenziata da una sostanziale modificazione, nello spettro Raman, della banda dovuta alla vibrazione « breathing » CN a $\sim 1008\text{ cm}^{-1}$ e dalla comparsa, sia nello spettro Raman che in quello u.r., della larga banda continua a partire da 3000 cm^{-1} tipica degli ioni $H^+(H_2O)_n$ ⁽²⁾.

Volendo ora entrare in merito delle perturbazioni comportate sulla struttura dell'acqua nelle soluzioni acquose a concentrazione crescente di cloridrato di guanidina, si procederà dapprima alla discussione degli spettri Raman e u.r., specialmente nella regione relativa alle oscillazioni νOH e νNH , e quindi alla discussione degli spettri nell'u.r. prossimo.

In fig. 2 vengono riportati gli spettri Raman del cloridrato di guanidina cristallino, dell'acqua e delle soluzioni acquose del sale a concentrazioni via via crescenti.

Lo spettro Raman del cloridrato di guanidina cristallino mostra a $3425 d$, $3322 m$, $3278 d, fl$, $3231 d, fl$, $3187 d, fl$ e a $3153 fl\text{ cm}^{-1}$ diverse componenti, delle quali le prime due sono attribuibili ad oscillazioni del gruppo NH_2 , rispettivamente antisimmetrica e simmetrica [41, 42].

Lo spettro Raman dell'acqua mostra, nella regione in discussione, tre principali bande, a $3635 fl$, a $3460 fl, l$ e a $3225 f, l\text{ cm}^{-1}$, attribuibili rispettivamente la prima ad oscillazioni di allungamento OH di molecole d'acqua libere o soggette ad una parziale interazione di legame di idrogeno, la seconda ad oscillazioni di allungamento OH di molecole d'acqua interagenti completamente con legami di idrogeno, e la terza all'armonica dell'oscillazione di deformazione OH_2 , in risonanza di Fermi con la precedente [43-46, 33].

Nello spettro Raman delle soluzioni acquose di cloridrato di guanidina si osserva, già nella soluzione acquosa 2,5 M del sale, una forte diminuzione dell'intensità della banda a 3635 cm^{-1} , e la sua scomparsa nello spettro delle soluzioni più concentrate.

L'assenza di tale banda – attribuibile come si è detto ad oscillazioni di allungamento OH di molecole d'acqua libere o parzialmente legate con legame di idrogeno, ma in ogni caso tipiche della struttura dell'acqua liquida – evidenzia come nelle soluzioni più concentrate di cloridrato di guanidina perda di significato il concetto di struttura dell'acqua liquida, in accordo con il mo-

(2) A questo proposito si può osservare che il carattere dativo dell'interazione ione guanidinio-acqua dovrebbe essere, per quanto detto sopra, conseguente al carattere acido dello ione, e quindi direttamente proporzionale alla costante di dissociazione K_a dello ione, ovvero inversamente proporzionale al pK_a . Questa considerazione è confermata da recenti misure u.r. di ammine protonate in soluzione acquosa [39], in cui si osserva la comparsa negli spettri dell'assorbimento continuo a partire da 3000 cm^{-1} soltanto per bassi valori di pK_a , comunque inferiori a 8. Poiché il pK_a dello ione guanidinio è 13,48 [40], ciò conferma ulteriormente il carattere prevalentemente elettrostatico dell'interazione ione guanidinio-acqua.

dello di struttura proposto che considera la maggior parte delle molecole d'acqua «strutturate» nella prima sfera di coordinazione dello ione.

Meno indicativo è, ai fini della discussione, il comportamento delle restanti bande Raman dell'acqua, che, come mostra la fig. 2, risultano ricoperte dalle più intense bande del sale. Ciò nonostante si può avere indicazione di un comportamento analogo a quello da noi osservato in una precedente Nota sugli spettri Raman delle soluzioni acquose concentrate di NaCl, in cui al variare della concentrazione del sale le frequenze delle bande restavano pressochè immutate, rafforzandosi in intensità quella a più alta frequenza, che dal valore di 3460 cm^{-1} nello spettro Raman dell'acqua veniva a cadere a 3450 cm^{-1} nello spettro Raman della soluzione acquosa 5,5 M di NaCl e indebolendosi notevolmente la componente a più bassa frequenza.

L'analogia osservata fra gli spettri Raman delle soluzioni acquose concentrate di NaCl e quelle di cloridrato di guanidina suggerisce che anche per quest'ultime valga l'ipotesi strutturale avanzata a suo tempo per le prime [33], e cioè che all'aumentare della concentrazione del sale in acqua si abbia una progressiva demolizione della struttura di legami di idrogeno dell'acqua liquida e una progressiva riorganizzazione delle molecole d'acqua nella sfera di coordinazione dello ione.

Conferma ulteriormente questa ipotesi la scomparsa nello spettro Raman delle soluzioni acquose concentrate di cloridrato di guanidina della debole banda a 175 cm^{-1} , presente nello spettro Raman dell'acqua liquida e attribuibile alla vibrazione di allungamento $\text{O}\cdots\text{O}$ della struttura di legami di idrogeno OH $\cdots$ O, e ciò in accordo con la «distribuzione» di tali legami all'aumentare della concentrazione salina della soluzione acquosa.

Assai meno indicativo è ai fini della discussione della struttura delle soluzioni acquose concentrate di cloridrato di guanidina, lo studio dello spettro u.r. nella regione tradizionale (fig. 3).

In questo caso non è possibile avere – in accordo con altri Autori [47] che hanno precedentemente esaminato lo stesso problema – alcuna indicazione di natura strutturale sulle soluzioni concentrate del sale, risultando la regione delle vibrazioni di allungamento e di deformazione dei legami OH dell'acqua ricoperta dalle più intense bande di assorbimento del sale (fig. 3).

Meglio rispondente risulta invece la discussione degli spettri ultrarossi della regione dell'u.r. prossimo, data anche la maggior correlazione fra dato spettroscopico e dato strutturale che si riscontra in letteratura sul problema della struttura dell'acqua da studi vibrazionali nell'u.r. prossimo.

Negli studi sull'u.r. prossimo di soluzioni acquose di elettroliti è diventato d'uso comune il concetto di «temperatura di struttura», nel senso che la presenza dell'elettrolita induce cambiamenti su bande particolari dell'acqua che sono equivalenti a quelli prodotti sull'acqua pura da una variazione di temperatura. In tal modo è possibile distinguere gli elettroliti in «disorganizzatori» e «organizzatori» della struttura dell'acqua.

A questa classificazione, che è la sola possibile data la complessità di interpretazione dello spettro nell'u.r. prossimo, è stato assegnato spesso un

significato che supera la formulazione iniziale del concetto data da J. D. Bernal e R. H. Fowler [48].

Nella interpretazione degli spettri dell'acqua nell'u.r. prossimo vi è, in letteratura, un generale accordo nel ritenere che le bande dovute a gruppi OH liberi sono di gran lunga più intense di quelle relative a gruppi OH interagenti fra loro tramite legami di idrogeno [49].

In base a questo criterio, e ad altre considerazioni di analogia di comportamento fra H_2O e HDO , alcuni Autori [50] attribuiscono la banda che compare a 7030 cm^{-1} nello spettro u.r. dell'acqua a 80°C a molecole d'acqua nelle quali almeno un gruppo OH è libero. La banda presente, meno intensa, a 6870 cm^{-1} nello spettro dell'acqua a 20°C , è dagli stessi attribuita a molecole d'acqua con gruppi OH associati, proprie di oligomeri e polimeri.

Con l'aiuto di questa assegnazione è possibile ora cercare di dare una interpretazione al comportamento da noi osservato sulla larga banda dell'acqua con massimo principale a $\sim 6900\text{ cm}^{-1}$.

Come mostra la fig. 4 a, passando dall'acqua pura alle soluzioni concentrate di cloridrato di guanidina si osserva una graduale diminuzione della intensità della banda verso i più alti numeri d'onda e un graduale spostamento del massimo che, nel caso della soluzione acquosa più concentrata in cloridrato di guanidina, viene a localizzarsi a 6820 cm^{-1} .

Questo andamento può essere interpretato, in accordo con i nostri sopra esposti risultati Raman, considerando una progressiva demolizione della struttura dell'acqua liquida al crescere della concentrazione del soluto, e una progressiva riorganizzazione delle molecole d'acqua nella I sfera di coordinazione degli ioni, in accordo col modello di struttura dell'acqua proposto in questa Nota per le soluzioni concentrate di elettroliti.

La progressiva diminuzione dell'intensità della banda a $\sim 6900\text{ cm}^{-1}$ dalla parte dei più alti numeri d'onda può infatti essere attribuita alla scomparsa di molecole d'acqua libere o parzialmente interagenti con legame di idrogeno che si verifica per aggiunta all'acqua del soluto, mentre il graduale spostamento del massimo verso i più bassi numeri d'onda può essere attribuito alle diverse perturbazioni cui sono sottoposte le molecole d'acqua, passando dalla struttura dell'acqua liquida (in cui interagiscono completamente con legami di idrogeno), alla struttura dell'acqua presente nella I sfera di coordinazione degli ioni.

Anche il comportamento della banda a 5195 cm^{-1} nello spettro u.r. prossimo dell'acqua liquida (che è stata attribuita alla vibrazione di combinazione $\nu_2 + \nu_3$ [51, 52]) è in accordo con quello della banda a $\sim 6900\text{ cm}^{-1}$, nel senso che si osserva una graduale diminuzione in intensità e in numeri d'onda del massimo della banda al crescere della concentrazione della soluzione (fig. 4 b).

In questo caso, però, vengono a sovrapporsi bande di assorbimento del soluto (il cui spettro u.r. è indicato nella stessa fig. 4 b), che diventano preponderanti nelle soluzioni più concentrate e non permettono di evidenziare il comportamento della banda propria dell'acqua.

A conclusione di questa Nota, si può osservare come il problema della struttura dell'acqua nelle soluzioni acquose concentrate di elettroliti si distingue nettamente sia da quello dell'acqua pura sia da quello delle soluzioni acquose diluite.

Nel caso delle soluzioni acquose concentrate di elettroliti, le molecole di acqua si trovano infatti prevalentemente legate agli ioni nella I sfera di coordinazione, e quindi perde di significato quel concetto di struttura dell'acqua liquida che è propria delle molecole d'acqua presenti nelle sfere di coordinazione più esterne.

Le misure spettroscopiche vibrazionali che abbiamo condotto su soluzioni acquose concentrate di cloridrato di guanidina, sia in Raman (laser) sia nell'u.r. prossimo, evidenziano il comportamento sopra esposto.

Attualmente si va ritenendo che le proprietà denaturanti di composti tipici come l'urea e derivati, i sali di guanidina, ecc., siano in parte riferibili al fatto che queste sostanze sono molto solubili in acqua e formano soluzioni altamente concentrate; infatti soluzioni acquose concentrate di LiBr, sale altrettanto solubile, presentano analoghe proprietà denaturanti.

Lo studio della struttura delle soluzioni acquose concentrate sia di elettroliti (ad esempio, sali di guanidina) sia di soluti polari (ad esempio, urea e derivati) diventa pertanto preminente nell'interpretazione del meccanismo di denaturazione operato da queste sostanze in soluzione acquosa.

Riteniamo sempre il problema della struttura dell'acqua liquida uno degli argomenti principali sul quale si deve centrare la discussione, però, alla luce delle considerazioni esposte in questa Nota, lo ristrutturiamo nel senso che nel passaggio da soluzioni acquose di proteine a soluzioni delle stesse in presenza di alte concentrazioni di un denaturante, la struttura dell'acqua liquida viene a cessare e pertanto i fenomeni che ad essa sottintendono (ad esempio il carattere cooperativo del legame di idrogeno) vengono ad essere completamente modificati. Pertanto, potrebbe essere l'assenza di tale struttura uno dei principali motivi della denaturazione delle proteine in soluzioni acquose fortemente concentrate di denaturanti tipici.

Abbiamo in corso e in programma su questo indirizzo altre indagini sulle quali ci proponiamo di riferire in Note successive.

Gli Autori ringraziano vivamente il prof. G. B. Bonino per i consigli e l'interesse mostrati alla presente ricerca e il prof. G. Semerano, Direttore dell'Istituto Chimico «G. Ciamician» e del Centro di Studio per la Spettroscopia Raman dell'Università di Bologna, per averla favorita mettendo a disposizione le apparecchiature necessarie.

BIBLIOGRAFIA

- [1] F. G. HOPKINS (1930) - «Nature», 126, 328.
- [2] A. SZENT-GIORGI (1957) - *Bioenergetics* (Academic Press, N. Y.).
- [3] J. CLIFFORD, J. OAKES e G. J. T. TIDY (1970) - «Spec. Disc. Faraday Soc.», 175.
- [4] G. NEMENTHY (1970) - «Ann. Ist. Super. Sanità», 6, 491.
- [5] G. N. LING (1972) - *Water and Aqueous Solutions*, ed. R. A. Moore (Wiley, N. Y.), 663.
- [6] H. J. C. BERENDSEN (1972) - «Fed. Eur. Biochem. Soc. Meet.», 29, 19.
- [7] (1973) - *Physicochemical State of Ions and Water in Living Tissues and Model Systems*, ed. C. F. Harlewood, «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 204.
- [8] G. N. LING (1973) - «Biophys. J.», 13, 807.
- [9] G. N. LING (1973) - In *Physicochemical State of Ions and Water in Living Tissues and Model Systems*, ed. C. F. Harlewood, «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 204.
- [10] J. CLIFFORD (1974) - *Water-A Comprehensive Treatise*, ed. F. Franks (Plenum, N. Y.), vol. V, cap. 2.
- [11] N. UEMITSU, H. OHASHI e H. MATSUMIJA (1975) - «J. Biochem. (Tokio)», 78, 229.
- [12] A. HVIDT (1975) - «Theor. Biol.», 50, 245.
- [13] J. OAKES (1976) - «J. Chem. Soc. Faraday Trans.», I, 72, 216.
- [14] J. OAKES (1976) - «J. Chem. Soc. Faraday Trans.», I, 72, 228.
- [15] H. S. FRANK e W. Y. WEN (1957) - «Discussion Faraday Soc.», 24, 133.
- [16] R. D. WALDRON (1957) - «J. Chem. Phys.», 26, 809.
- [17] G. ZUNDEL (1969) - *Hydration and Intermolecular Interaction*, Academic Press, N.Y.
- [18] G. ZUNDEL e A. MURR (1967) - «Z. Physik. Chem. Neue Folge», 54, 49.
- [19] R. JANOSCHEK, E. G. WEIDEMANN, H. PFEIFFER e G. ZUNDEL (1972) - «J. Amer. Chem. Soc.», 94, 2387.
- [20] G. ZUNDEL e E. G. WEIDEMANN (1973) - «Z. Physik. Chem. Neue Folge», 83, 327.
- [21] J. O. LUNDGREN e I. OLOVSSON (1967) - «Acta Cryst.», 23, 966.
- [22] J. O. LUNDGREN (1970) - «Acta Cryst.», 26 B, 1893.
- [23] I. OLOVSSON (1968) - «J. Chem. Phys.», 49, 1603.
- [24] J. O. LUNDGREN e I. OLOVSSON (1967) - «Acta Cryst.», 23, 971.
- [25] J. O. LUNDGREN (1970) - «Acta Cryst.», 26 B, 1893.
- [26] J. O. LUNDGREN e I. OLOVSSON (1968) - «J. Chem. Phys.», 49, 1068.
- [27] S. C. LEE e R. KAPLOW (1970) - «Science», 169, 477.
- [28] D. L. WERTZ (1972) - «J. Solution Chem.», 1, 489.
- [29] M. DE PAZ, J. J. LOSENTHAL e L. FRIEDMAN (1969) - «J. Chem. Phys.», 51, 3748.
- [30] M. DE PAZ, A. GUIDONI GIARDINI e L. FRIEDMAN (1970) - «J. Chem. Phys.», 52, 687.
- [31] R. JANOSCHEK, E. G. WEIDEMANN e G. ZUNDEL (1973) - «J. Chem. Soc. Faraday Trans.», II, 69, 505.
- [32] T. ACKERMANN (1961) - «Z. Physik. Chem. Neue Folge», 27, 253.
- [33] A. BERTOLUZZA, M. A. MORELLI e C. FAGNANO (1974) - «Rend. Accad. Naz. Lincei», 56, 1.
- [34] I. PERNOLL, U. MAIER, R. JANOSCHEK e G. ZUNDEL (1975) - «J. Chem. Soc. Faraday Trans.», II, 71, 201.
- [35] G. W. BRADY e J. T. KRANZE (1957) - «J. Chem. Phys.», 27, 304.
- [36] G. W. BRADY (1958) - «J. Chem. Phys.», 28, 464.
- [37] G. W. BRADY (1958) - «J. Chem. Phys.», 29, 1371.
- [38] G. W. BRADY (1960) - «J. Chem. Phys.», 33, 1079.
- [39] W. SESSLER e G. ZUNDEL (1972) - «Z. Physik. Chem. Neue Folge», 79, 180.
- [40] A. F. CLIFFORD (1961) - *Inorganic Chemistry of Qualitative Analysis*, Prentice-Hall.
- [41] C. L. ANGELL, N. SHEPPARD, A. YAMAGUCHI, T. SHIMANOUCI, T. MIYARAWA e S. MI-ZUSHIMA (1957) - «Trans. Faraday Soc.», 53, 589.

-
- [42] R. MECKE e W. KUTZELNIGG (1960) - « Spectr. Acta », *16*, 1225.
[43] G. E. WALRAFEN (1962) - « J. Chem. Phys. », *36*, 1035.
[44] G. E. WALRAFEN (1964) - « J. Chem. Phys. », *40*, 3249.
[45] G. E. WALRAFEN (1967) - « J. Chem. Phys. », *47*, 1114.
[46] W. F. MURPHY e H. J. BERNSTEIN (1972) - « J. Phys. Chem. », *76*, 1147.
[47] R. F. GREENE e C. N. PACE (1974) - « J. Biol. Chem. », *249*, 5388.
[48] J. D. BERNAL e R. H. FOWLER (1933) - « J. Chem. Phys. », *1*, 516.
[49] L. N. KLEISS, H. A. STROBEL e M. C. R. SYMONS (1973) - « Spectr. Acta », *29 A*, 829
e bibliografia ivi riportata.
[50] J. J. PERON, C. BOURDERON e C. SANDORFY (1971) - « Canadian J. Chem. », *49*, 3901.
[51] K. BUIJS e G. R. CHOPPIN (1963) - « J. Chem. Phys. », *39*, 2035.
[52] H. YAMATERA, B. FITZPATRICK e G. GORDON (1964) - « J. Mol. Spectroscopy », *14*, 268.