



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**CATÁLISIS CON AMORTIGUADORES EN LA HIDRÓLISIS DE UN FOSFODIÉSTER MODELO  
DEL ARN EN MEZCLAS DMSO-AGUA**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. B. David Octavio Corona Martínez



TUTOR: Dr. Anatoly Yatsimirsky

AÑO: 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Jesús Valdés Martínez
<b>VOCAL</b>	Dra. Guadalupe Bárbara Gordillo Román
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Silvia Elena Castillo Blum
<b>PRIMER SUPLENTE</b>	Dr. Eugenio Octavio Reyes Salas
<b>SEGUNDO SUPLENTE</b>	Dr. Hugo Morales Rojas

**Asesor**

---

**Dr. Anatoly Yatsimirsky**

**Sustentante**

---

**Q. B. David Octavio Corona Martínez**

## DEDICATORIA

*Für Gott, für meine Mutter, für meine Großeltern, für meine Geschwister, für  
meine besten Freunde und für meine Freundin.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Anatoly Yatsimirsky por su apoyo, dedicación y enseñanzas durante la realización del presente trabajo.

Al Posgrado en Ciencias Químicas y a la UNAM.

Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

A los miembros de mi jurado, por la revisión de esta tesis y sus valiosas contribuciones para mejorarla.

A las Doctoras Karen Lilian Ochoa Lara e Hisila Santacruz Ortega por ayudarme durante la realización de los experimentos de RMN  $^{31}\text{P}$  en el Departamento de Investigación de Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora.

Al Dr. Felipe Medrano Valenzuela, a la Dra. Carolina Godoy Alcántar y a la Q. I. Yanet Fuentes Martínez por su ayuda durante los experimentos hechos en el Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM de RMN de  $^{31}\text{P}$ .

A la Dra. Carol Pérez Casas y a la Q. Irma Sánchez Lombardo, por su ayuda al inicio de la síntesis del sustrato y en los estudios en disolución.

## CONTENIDO

	Página
Jurado Asignado	v
Dedicatoria	vi
Agradecimientos	vii
Resumen	viii
Símbolos y abreviaturas	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Hidrólisis del enlace fosfodiéster por ribonucleasas	3
2.2 Ribozimas	4
2.3 Catálisis ácido-base general de la hidrólisis de enlaces fosfodiéster en ausencia de metales	6
2.3.1 Catálisis con amortiguadores	7
2.3.1.1 Imidazol y morfolina	7
2.3.1.2 Otros amortiguadores	10
2.3.2 Agentes hidrolizantes	13
2.3.2.1 Diaminas y poliaminas alifáticas	13
2.3.2.2 Derivados de imidazol	15
2.3.2.3 Derivados de guanidina	18
2.3.2.4 Otros tipos de agentes hidrolizantes	22
2.4 Estudios de hidrólisis de fosfodiésteres en solventes orgánicos	25
3. OBJETIVOS DEL TRABAJO	36
3.1 Metas	37
4. MATERIALES Y MÉTODOS	38
4.1 Reactivos	38
4.1.1 Disolventes	40
4.1.2 Sustrato	40
4.1.2.1 Reactivos usados en la síntesis del sustrato	41
4.1.2.2 Síntesis del sustrato	41
4.1.3 Bases	42

4.1.4 Sales	42
4.1.5 Ácidos	42
4.2 Equipo	43
4.3 Programas	43
4.4 Estudios potenciométricos	44
4.5 Estudios cinéticos	46
5. RESULTADOS	51
5.1 Efecto de la variación de la proporción de DMSO: agua sobre rapidez de la transesterificación de HPNPP en presencia del amortiguador	52
5.2 Determinación de los valores de $pK_a$ de los pares ácido-base utilizados en DMSO acuoso	55
5.3 Estudios de transesterificación con el hidróxido de tetrabutilamonio	58
5.4 Estudios de la cinética de transesterificación del HPNPP con el sistema amortiguador guanidina-guanidinio	63
5.4.1 Efecto salino en la transesterificación del HpNPP con guanidina	75
5.5 Estudios de transesterificación con el sistema amortiguador acetamidina-acetamidinio	76
5.6 Estudios de transesterificación con el sistema amortiguador piperidina-piperidinio	84
5.7 Estudios de transesterificación con el sistema amortiguador metilamina-metilamonio	90
5.8 Correlaciones de Brønsted para la catálisis ácido-base	94
6. CONCLUSIONES	101
7. PERSPECTIVAS	102
8. BIBLIOGRAFÍA	103
9.1 Apéndice I	111
9.2 Apéndice II	113

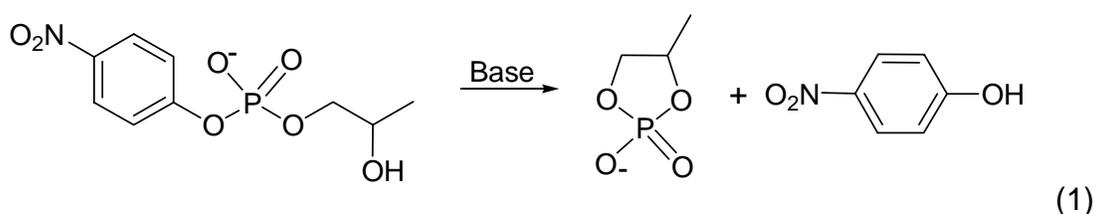
## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$\epsilon$	Absortividad molar
A	Absorbancia
3',5'-ApA	Adenil (3'→5') adenina monofosfato
3',5'-UpU	Uridil (3'→5') uridina monofosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMD	Acetamidina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNr	ARN ribosomal
ARNr 16S/23S	ARN ribosomal con dos unidades, una de 16 Svedberg y otra de 23 Svedberg
ARNt	ARN de transferencia
BISTRIS	2-[bis-(2-hidróxietil)-amino]-2-hidróximetil-propano-1,3-diol
Gu	Guanidina
HAMD <sup>+</sup>	Acetamidinio
HEPES	Ácido 4-(2-hidróxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HGu <sup>+</sup>	Guanidinio
Him <sup>+</sup>	Imidazolio
His	Histidina
HpNPP	2-hidroxi-4-nitrofenilfosfato o 2-hidroxi- <i>p</i> -nitrofenilfosfato
HPPD <sup>+</sup>	Piperidinio
<i>I</i>	Fuerza iónica
<i>k</i>	Constante de rapidez
<i>k<sub>NC</sub></i>	Constante de rapidez para la reacción no catalizada
<i>K<sub>m</sub></i>	Constante de Michaelis-Menten
<i>k<sub>cat</sub></i>	Constante de rapidez de la reacción catalizada
<i>k<sub>OH</sub></i>	Constante de rapidez para la hidrólisis alcalina
<i>k<sub>Im</sub></i>	Constante de rapidez para la hidrólisis catalizada por imidazol

$k_{obs}$	Constante de rapidez observada
MES	Ácido 2-(4-morfolin)etanosulfónico o ácido 2-(N-morfolin)-etanosulfónico
MOPS	Ácido 3-morfolinpropano-1-sulfónico o ácido 3-N-morfolinpropanosulfónico
PIPES	Ácido 1,4-piperazindietanosulfónico
PPD	Piperidina
SDS	Dodecil sulfato de sodio o lauril sulfato de sodio
TRIS	2-amino-hidroximetil-propano-1,3-diol
TTUTT	Oligonucleótido conformado por 4-deoxitimidina y una uridina

## RESUMEN

El presente trabajo presenta el estudio cinético de la reacción de transesterificación de un fosfodiéster (HpNPP) modelo del ARN (reacción 1) en la mezcla DMSO-agua a 37°C en presencia de amortiguadores, (mezclas de guanidina, acetamidina, piperidina y metilamina con sus formas protonadas) con el fin de proponer los posibles mecanismos involucrados en la catálisis con distintos pares ácido-base.



Para determinar el mecanismo se hicieron perfiles de la variación de la constante de rapidez observada con la concentración total de amortiguador (a varios grados de neutralización) y con el grado de neutralización (con concentración del amortiguador constante) y finalmente se analizaron relaciones de Brønsted para confirmar el mecanismo propuesto.

El trabajo mostró que la mezcla 4:1 (v/v) DMSO:agua presenta un máximo de actividad catalítica con el par guanidina/guanidinio a 37°C. Además, en la catálisis básica específica con hidróxido de tetrabutilamonio esta reacción presentó un efecto salino positivo mientras que la reacción catalizada por amortiguadores no lo hizo.

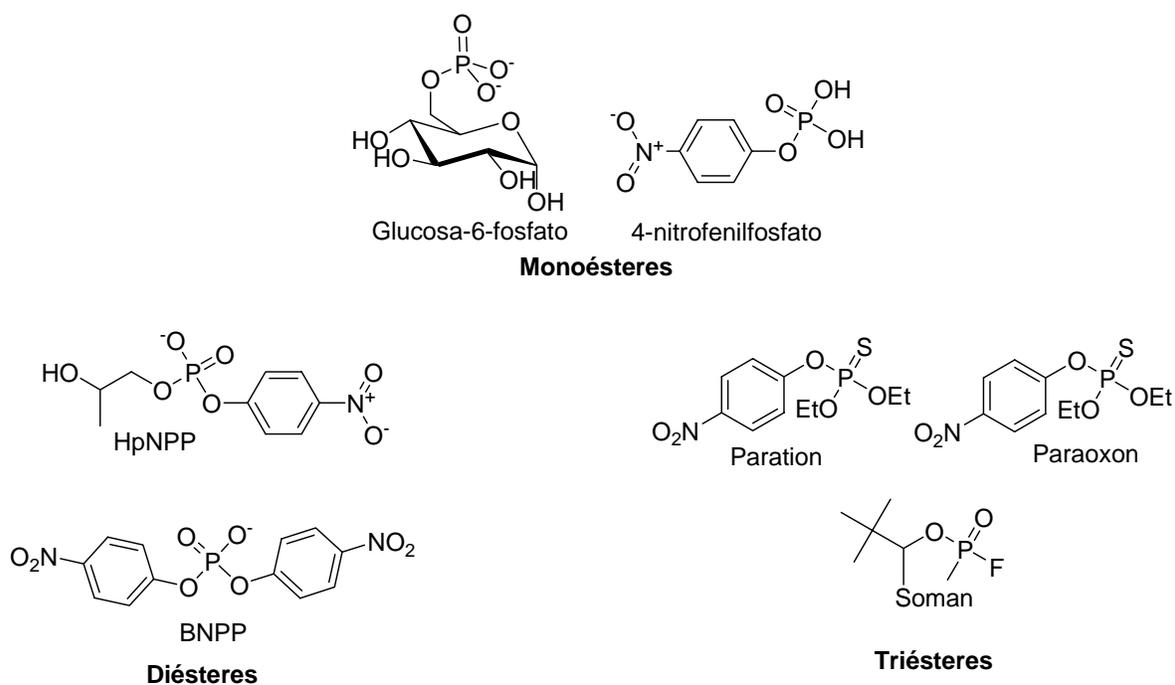
De los perfiles de la variación de la constante de rapidez con la concentración de amortiguador y el grado de neutralización se obtuvo una ley de rapidez para los diferentes pares ácido-base utilizados, que presenta la siguiente expresión (B es la forma neutra y  $HB^+$  la forma protonada de la base):

$$k_{obs} = k_1 [B] + k_2[B][HB^+]$$

De esta ley de velocidad se concluye que hay dos rutas de transesterificación del HpNPP en el medio estudiado: una implica una catálisis básica general bimolecular con constante de velocidad  $k_1$  y la otra un mecanismo trimolecular asistido por una activación electrofílica del fosfato por parte de la especie ácida del amortiguador de una manera que puede considerarse como una imitación del mecanismo enzimático de la ARNasa A. La pendiente de la gráfica de Brønsted para  $k_1$  es similar a la informada en otros trabajos en agua; mientras que para  $k_2$  la pendiente resultó ser más alta lo que indica una contribución específica de guanidinio y acetamidinio como receptores bifuncionales para el éster de fosfato.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los ésteres de fosfato son moléculas ampliamente distribuidas en la naturaleza tanto en sistemas biológicos como químicos. Por ejemplo, los monoésteres de fosfato están involucrados en las fosforilaciones y desfosforilaciones, además en la respiración, la glucólisis, la glucogenólisis, la transmisión de los impulsos nerviosos entre otros procesos metabólicos [1 y 2]. Mientras que los fosfodiésteres forman parte de la estructura de las moléculas del ADN y ARN, que son los encargados de almacenar la información genética de los seres vivos. Por otro lado, los fosfotriésteres son componentes de moléculas que resultan tóxicas, en su mayoría, a los seres vivos (por ejemplo algunos pesticidas y armas químicas). En la Figura 1 se muestran algunos ejemplos de mono, di y tri ésteres de fosfato.



**Figura 1.** Ejemplos de algunas moléculas mono, di y triésteres.

Los ésteres de fosfato son especies cinéticamente muy estables a la hidrólisis alcalina en un orden de reactividad relativa: triésteres > monoésteres >> diésteres,

además existe también diferencia si estos son aromáticos o alifáticos, siendo los últimos los menos reactivos [3 y 4]. La transferencia del ión fosfato es una de las reacciones biológicas más comunes e importantes, pero también es una de las más demandantes en cuanto a la energía de activación requerida. La naturaleza ha encontrado dos caminos principales para la hidrólisis de los ésteres fosfato. Uno es el uso de iones metálicos como cofactores en el interior de las enzimas y el otro es sólo mediante una catálisis general ácido-base [5].

La importancia de la comprensión del mecanismo de la hidrólisis de los ésteres fosfato, radica en que proveerá una base sólida para el diseño racional de fosfodiesterasas artificiales más eficientes que pueden funcionar como agentes terapéuticos y otros usos potenciales [6, 7]. Se conoce de informes científicos que la transesterificación catalítica de ésteres fosfato transcurre más rápido en disolventes orgánicos que en agua. Sin embargo, se conoce muy poco acerca del mecanismo mediante el cual se lleva a cabo esta transesterificación en ausencia de metales.

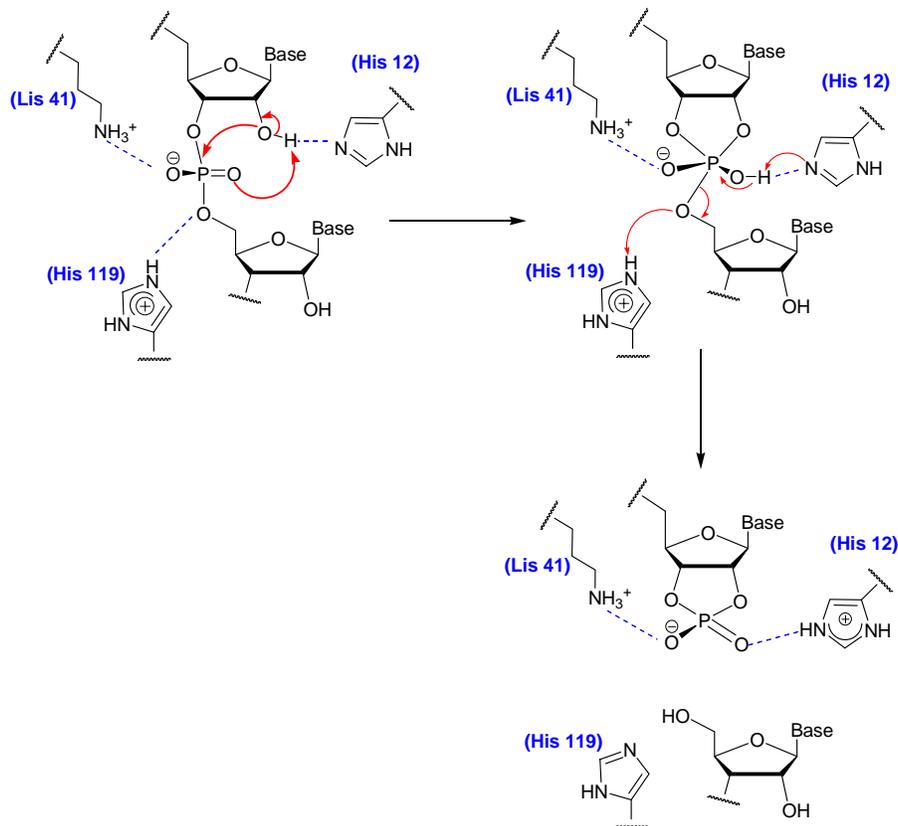
Por esta razón en el presente trabajo se estudió de manera sistemática la reacción de transesterificación de un sustrato modelo del ARN en ausencia de metales, mediante el uso de distintas bases con el fin de conocer el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo dicha reacción en DMSO acuoso.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Hidrólisis del enlace fosfodiéster por ribonucleasas

Los enlaces fosfodiéster son muy estables ante la hidrólisis. El tiempo de vida media para el rompimiento de estos enlaces en el ADN a 25°C y pH de 7 se ha estimado que es de  $10^{11}$  años, mientras que para el ARN el tiempo se reduce a sólo 100 años bajo las mismas condiciones, debido a la presencia del grupo 2'-hidroxilo adyacente al enlace fosfodiéster [8]. La naturaleza ha desarrollado dos estrategias generales para acelerar la ruptura de estos grupos, una de ellas es el uso de iones metálicos divalentes como cofactores en ciertos lugares específicos del sitio activo para facilitar el enlazamiento con el sustrato, proporcionar la activación del nucleófilo (por disminución del  $pK_a$ ) y/o del sustrato con una catálisis ácida de Lewis. Por otro lado, algunas enzimas que no usan iones metálicos como la ARNasa A aceleran de igual modo la ruptura del enlace fosfodiéster al formar puentes de hidrógeno y una catálisis del tipo ácido-base solamente [9].

Las ribonucleasas (ARNasas) son enzimas que catalizan la hidrólisis del ARN (endonucleasas o exonucleasas) comprenden varias subclases dentro de la clase de enzimas del grupo 3.1. Las ribonucleasas son de especial interés en el estudio de los mecanismos químicos de la acción enzimática [10]. El mecanismo aceptado para la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster por la ARNasa A, consiste en una catálisis del tipo ácido-base general en donde el imidazol desprotonado de la histidina 12 interviene como una base general, mientras que el grupo imidazol protonado de la histidina 119 funciona como un ácido general que interactúa con el grupo saliente y la lisina 41 actúa como catalizador electrostático (ver Figura 2) [6].



**Figura 2.** Mecanismo de hidrólisis del enlace fosfodiéster por la Ribonucleasa A. Adaptado de [60].

El acelerado progreso en la biología molecular, especialmente en la inhibición selectiva de la expresión de ciertos genes por la modificación estructural de oligonucleótidos, ha generado la necesidad de crear catalizadores artificiales que puedan hidrolizar selectivamente al ARN [21]. Para su diseño es necesario el conocimiento de varios aspectos de la acción de las ARNasas, como los microambientes de sus sitios activos para maximizar su capacidad catalítica [8].

## 2.2 Ribozimas

Hasta la década de los ochentas del siglo pasado se tuvo la creencia de que todas las enzimas eran sólo de origen proteico; después de todo las proteínas con su variedad de cadenas laterales son más adecuadas para la catálisis química que

otros biopolímeros. De aquí que el descubrimiento de que el ARN tuviera actividad catalítica y no sólo transfiera información genética fue algo sorprendente. El término que se acuñó para este tipo de ARN con actividad catalítica fue de “Ribozima” (proviene de la unión de dos palabras en inglés “*Ribonucleic acid*” y “*Enzyme*”). Desde entonces se han descubierto varios ejemplos de ribozimas: la cabeza de martillo (“*Hammerhead Rybozyme*”), la de forma de broche de cabello (“*Hairpin Rybozyme*”), las ribozimas del virus delta de la hepatitis, las ribozimas satélite de Varkud entre otras más [11].

El mayor objetivo en el estudio bioquímico de las ribozimas es la comprensión de su función en términos moleculares. La evidencia del uso de sus nucleobases directamente en la catálisis química en una variedad de formas ha ido en aumento, entre ellas se incluyen la formación de puentes de hidrógeno con el estado de transición que estabilizan la carga formada y transfiriendo protones en una catálisis ácido-base general. Las reacciones de las ribozimas pueden ser divididas en dos clases basadas en la forma en la que llevan a cabo la hidrólisis. Las ribozimas grandes requieren de nucleófilos externos mientras que las ribozimas pequeñas requieren de nucleófilos internos [9].

En el caso de las ribozimas pequeñas se han realizado varios estudios a partir de las estructuras cristalinas de algunas de éstas. A pesar de que son pequeñas el descifrar su mecanismo no ha resultado ser una tarea simple, ya que a diferencia de algunas ribozimas (principalmente las grandes) éstas no utilizan ningún ión metálico durante la hidrólisis. El grupo de Ferré-D'Amaré ha obtenido evidencia del mecanismo mediante el cuál estas ribozimas no metálicas llevan a cabo la hidrólisis de los ésteres fosfato mediante estudios cristalográficos [13]. Las estructuras cristalinas que se han obtenido son la ribozima del virus delta de la hepatitis y la de forma de broche de cabello. Los resultados muestran que las bases del ARN están involucradas en la hidrólisis. Los candidatos en el caso de la ribozima en forma de broche de cabello son la guanina-8 y las adeninas 9, 10 y 38. La razón por la que se proponen estas bases, las cuales son muy débiles, es por

su cercanía al enlace fosfodiéster. Además, por el posible cambio en los valores de  $pK_a$  debido al tipo de ambiente que se genera por el plegamiento del ARN. En las ribozimas que utilizan iones metálicos como cofactores, el  $pK_a$  de las bases puede verse perturbado por la formación de complejos, ya sea de coordinación o electrostáticos. Aunque en la actualidad no existe ningún reporte donde se mida el  $pK_a$  de las bases perturbado por los factores mencionados anteriormente, la evidencia que se tiene de las ribozimas no metálicas hacen factible la propuesta de los cambios de los valores de  $pK_a$  [11, 12, 13 y 14]

### **2.3 Catálisis ácido-base general de la hidrólisis de enlaces fosfodiéster en ausencia de metales**

La ruptura de los enlaces fosfodiéster es susceptible a la catálisis ácido-base general, esto ha ocasionado que haya más atención en este tipo de catálisis sobre la ácido-base específica. La mayoría de los estudios cinéticos se han realizado en amortiguadores de pH con imidazol para elucidar los mecanismos posibles para la catálisis de la ARNasa A, ya que en ésta los grupos imidazol de las dos cadenas laterales de histidina son parte clave en la hidrólisis.

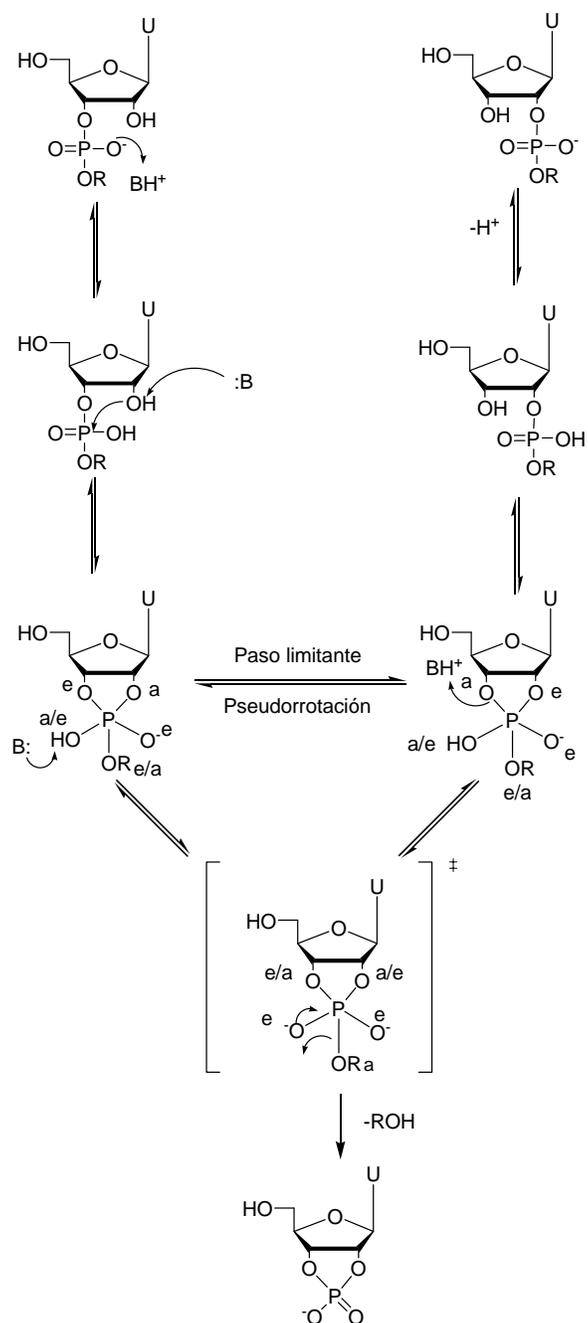
La catálisis con imidazol es modesta por lo que en las mediciones se requiere de soluciones concentradas en éste. Por ejemplo, si para la hidrólisis se usa una solución de 1 mol/L del amortiguador ( $[Im]/[HIm^+] = 1$ ), se obtiene una rapidez que es sólo tres veces mayor que cuando la concentración del amortiguador es cero [15]. Esto se puede explicar con los efectos del medio ocasionado por los constituyentes del amortiguador que son difíciles de eliminar en altas concentraciones y pueden provocar interpretaciones incorrectas de los resultados experimentales [15-18].

## 2.3.1 Catálisis con amortiguadores

### 2.3.1.1 Imidazol y morfolina

En el caso del imidazol y de la morfolina ambas especies, la ácida y la básica, funcionan como catalizadores. Esto ha sido sugerido varias veces por los perfiles obtenidos en forma de campana para las constantes de rapidez observadas contra la proporción de protonación del amortiguador en la hidrólisis del 3', 5'-UpU y 3', 5'-ApA. Un inconveniente de estos resultados es que no se realizaron con un control de la fuerza iónica, por lo que al ajustarla a un valor de 1.0 mol/L el perfil en forma de campana desaparece. La razón por la cual la forma del perfil de rapidez con el pH es sensible a la fuerza iónica es por la participación de especies cargadas en las reacciones de hidrólisis y se considera la existencia de dos rutas mecanísticas que están en competencia para la hidrólisis. Una ruta consiste en una catálisis bifuncional donde participan ambas formas del amortiguador (ácida y básica). La otra es sólo una ramificación de la anterior y consiste en una catálisis básica general. La importancia relativa de estas dos rutas depende de la acidez o basicidad del amortiguador utilizado [20, 21]. Con base en estas observaciones, aunadas a otros resultados de la catálisis con amortiguadores de la isomerización de los sustratos mencionados, Breslow propuso el mecanismo que se muestra en la Figura 3 para la ruptura e isomerización de los enlaces 3',5'-fosfodiéster con imidazol o morfolina [20].

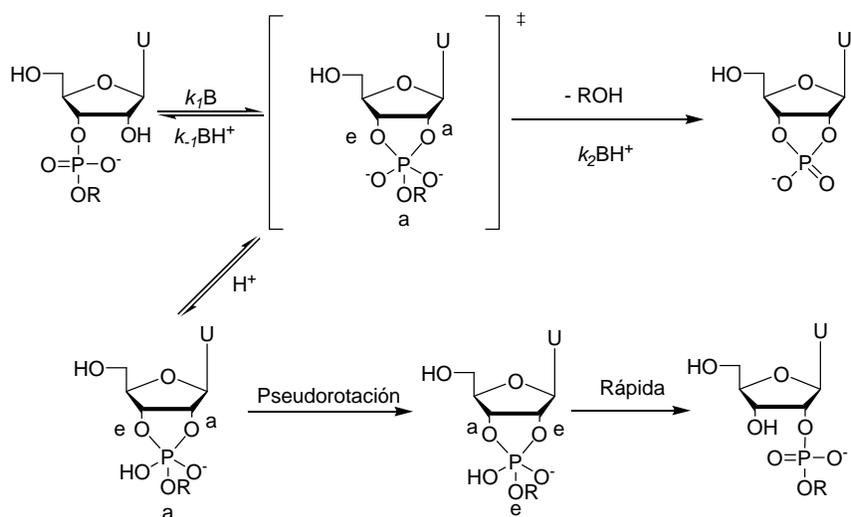
En este mecanismo se propone que los catalizadores ácido-base generales deben actuar en pasos distintos, donde uno cataliza la formación del intermediario y otro su ruptura. De aquí se puede concluir que la formación del intermediario la cataliza el ácido, mientras que su ruptura la hace la base. Este mecanismo ha sido muy criticado ya que la forma de campana del perfil de neutralización desaparece al mantener constante la fuerza iónica, también por la corrección de las constantes observadas para la reacción no catalizada con amortiguadores con las de la reacción catalizada.



**Figura 3.** Mecanismo de hidrólisis de 3', 5' UpU propuesto por Breslow. En la Figura "e" significa ecuatorial y "a" es axial [21].

Una alternativa al mecanismo anterior la propuso Perrin [22] al utilizar los datos obtenidos por Breslow. El mecanismo que propuso consiste en la formación del intermediario de manera concertada mediante una catálisis básica general junto con la desprotonación del grupo 2'-hidroxi por la base, la cual ataca el grupo

fosfodiéster monoaniónico. El fosforano dianiónico formado puede hidrolizarse mediante una catálisis ácida general o volver al estado anterior. Alternativamente, se puede protonar un oxígeno del fosforano dianiónico para formar la especie monoaniónica, la cual puede presentar una pseudorrotación como paso limitante para la isomerización. Este mecanismo se presenta en la Figura 4.

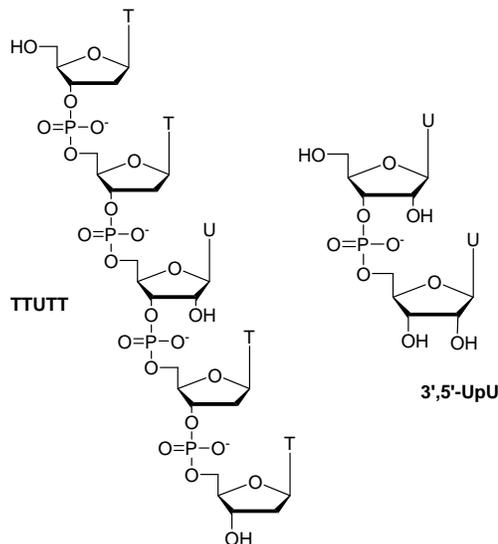


**Figura 4.** Mecanismo propuesto por Perrin a partir de los resultados del grupo de Breslow [22].

El mecanismo anterior es consistente con las observaciones cinéticas, excepto porque el fosforano dianiónico debe estar presente por un tiempo prolongado para poder ser protonado, lo cual es incongruente con los datos experimentales disponibles [15 y 22]. Además, este mecanismo no explica la catálisis con las especies ácidas de los amortiguadores.

Kirby y colaboradores también realizaron estudios con imidazol como amortiguador en concentraciones de 0.1 a 0.7 mol/L a 80°C en agua usando como sustratos modelos del ARN al 3',5'-UpU y el oligonucleótido TTUTT (las estructuras de ambos sustratos se muestran en la Figura 5). En el trabajo además de estudiar la hidrólisis de los sustratos, analizaron los efectos del medio (uso de codisolventes y fuerza iónica). En el caso del dinucleótido monofosfato 3', 5'-UpU

su hidrólisis es más efectiva con la forma neutra de imidazol que con la forma protonada. Además se observó que las constantes de primer orden son muy sensibles a la fuerza iónica. La hidrólisis de TTUTT también es catalizada por ambas formas del amortiguador, pero en este caso es más efectiva la forma protonada. A fuerza iónica constante no se observó el perfil en forma de campana que observó Breslow con poli U. Además en este trabajo se propone un mecanismo para la hidrólisis de 3',5'-UpU y TTUTT, el cual involucra dos rutas paralelas: una reacción catalizada por la base general de forma más o menos concertada y un proceso de dos etapas, que incluye el paso determinante de la catálisis ácida general, que es la ruptura del intermediario monoanión fosforano [10].

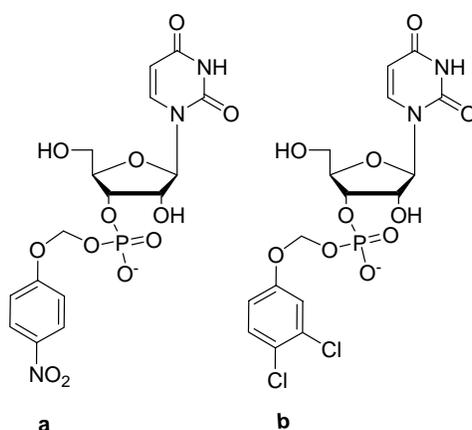


**Figura 5.** Estructura de los sustratos TTUTT y 3', 5'-UpU.

### 2.3.1.2 Otros amortiguadores

En un trabajo reciente Kirby estudió la hidrólisis de dos sustratos modelo del ARN el 4-nitrofenoximetil uridin 5'-fosfato y el 3,4-diclorofenoximetil uridina 5'-fosfato, los cuales se muestran en la Figura 6. Las mediciones cinéticas se hicieron con 6 distintos amortiguadores (4-metilimidazol, 1-metilimidazol, PIPES, TRIS, BISTRIS y morfolina) en soluciones acuosas a 70°C. Al igual que el trabajo mencionado anteriormente el mismo grupo realizó experimentos con codisolventes y variación

en la fuerza iónica. En este trabajo se obtuvieron perfiles en forma de campana para la variación de la constante de rapidez observada con la proporción de protonación, donde la desviación de la linealidad se atribuye a un efecto del disolvente sobre la reacción de hidrólisis espontánea por hidróxido. Lo anterior se determinó mediante los experimentos con los codisolventes. Los valores de las constantes observadas para los distintos amortiguadores fueron del orden de  $10^{-2}$  a  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . En cuanto al mecanismo para estos sustratos modelos es el clásico de una reacción con catálisis básica general [23].

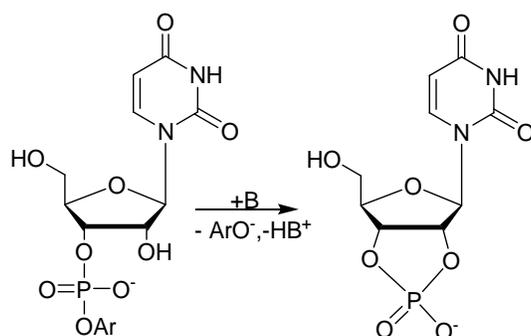


**Figura 6.** Estructura de los sustratos usados por el grupo de Kirby, el 4-nitrofenoximetil uridina 5'-fosfato (a) y el 3,4-diclorofenoximetil uridina 5'-fosfato (b).

El grupo de Andrew Williams [24] estudió el efecto del  $pK_a$  grupo saliente sobre la velocidad de hidrólisis de fosfodiésteres modelos de ARN catalizada por iones  $\text{OH}^-$  y por imidazol. La Figura 7 muestra un esquema general de la hidrólisis del ribonucleótido. Las ecuaciones de ajuste obtenidas para la hidrólisis con el ión hidróxido y con imidazol tuvieron valores de pendientes negativas cercanas entre ellas, lo cual indica un grado significativo del desarrollo de la carga negativa sobre el grupo saliente en el estado de transición. Las ecuaciones para los ajustes obtenidos en este trabajo son las siguientes:

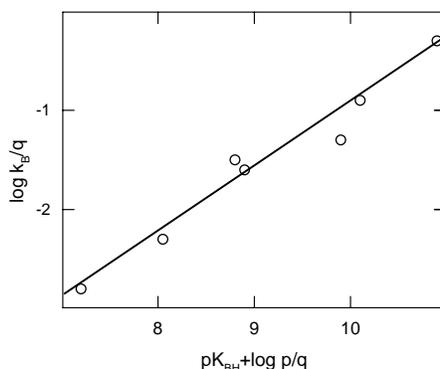
$$\log k_{imz} = (-0.59 \pm 0.08)pK^{ArOH} + 1.40 \pm 0.42 \quad \text{Ec. 1}$$

$$\log k_{OH} = (-0.54 \pm 0.05)pK^{ArOH} + 6.68 \pm 0.42 \quad \text{Ec.2}$$



**Figura 7.** Esquema general de la reacción de hidrólisis de un ribonucleótido [24].

Además para el sustrato con el grupo saliente 4-nitrofenol se obtuvo una gráfica de Brønsted para la catálisis básica general con diferentes amortiguadores, el valor de la pendiente de esta relación fue de 0.67. En la Figura 8 se muestra una gráfica de Brønsted para los datos obtenidos por los autores y la ecuación de la recta que ajustó estos datos experimentales se muestra en la ecuación 3.



**Figura 8.** Dependencia de Brønsted para la hidrólisis del 4-nitrofeniluridina-3'-fosfato con una catálisis básica general [24].

$$\log k_B = (0.67 \pm 0.05)pK^{BH} - (7.50 \pm 0.42) \quad \text{Ec. 3}$$

Aún con este sustrato muy activado ( $k_{OH} = 840 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) la eficiencia de catálisis con imidazol ( $k_{Im} = 2.3 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) es bastante baja ya que en una disolución de

imidazol 0.1 M a pH 7 la rapidez de hidrólisis observada solamente se duplica respecto a la de la hidrólisis espontánea.

En otro estudio semejante del mismo grupo con la misma serie de sustratos pero haciendo uso de la ribonucleasa A como catalizador [25], se observó una disminución significativa del valor absoluto de la pendiente de la correlación del  $pK_a$  del grupo saliente hasta -0.2 unidades, lo que refleja la contribución de la catálisis ácida general por parte de la enzima y así un menor grado de la formación de la carga negativa sobre el grupo saliente en la catálisis enzimática.

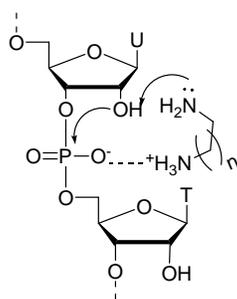
### **2.3.2 Agentes hidrolizantes**

El deseo de preparar ARNasas artificiales que rompan selectivamente secuencias que codifiquen para un gen específico y con esto inhiban su expresión ha sido el director principal hacia la creación de catalizadores polifuncionales que hidrolicen los enlaces fosfodiéster en el ARN. La mayoría de estos agentes utilizan iones metálicos, pero también existen catalizadores multifuncionales puramente orgánicos que son prometedores porque no sólo sirven como ARNasas artificiales sino también funcionan para mimetizar los procesos elementales que toman lugar en los centros catalíticos de algunas enzimas y ribozimas [21 y 26].

#### **2.3.2.1 Diaminas y poliaminas alifáticas**

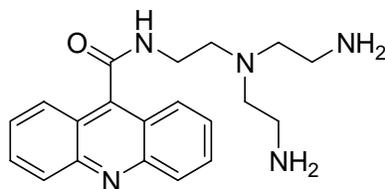
Las  $\alpha,\omega$ -alcanodiaminas son los más simples catalizadores bifuncionales que han probado tener actividad en la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster. La aceleración que presentan es de uno a dos órdenes de magnitud más eficiente que las correspondientes monoaminas en la hidrólisis de polinucleótidos (aunque esta actividad es sólo hacia los ácidos poliuridílico, policitidílico y poliadenílico), los cuales quedan en fragmentos menores que pentámeros.

El orden de actividad de las diaminas no sustituidas es el siguiente: N-2-N > N-3-N > N-1-N > N-4-N > N-5-N, donde el número indica el número de carbonos en la cadena de las diaminas. En el caso de las diaminas, tanto la forma neutra como la protonada de la amina (a pH = 7) funcionan como catalizadores, donde la especie neutra la más efectiva. El mecanismo propuesto para la amina monoprotonada se muestra en la Figura 9, este consiste en la formación de un puente de hidrógeno entre la parte de amonio de la diamina y un oxígeno con carga negativa del fosfato del enlace diéster, aunado a una catálisis básica general por la forma neutra que quita el protón del grupo 2-hidroxi. La idea de la formación del puente de hidrógeno se soporta en el hecho de que la trimetilación de un grupo amino reduce la eficiencia catalítica [27-29].



**Figura 9.** Mecanismo propuesto para la hidrólisis del ARN con diaminas [27-29].

Una manera de mejorar la actividad de las diaminas hacia el ARN es conjugarlas con un intercalador. Un caso particular es el uso de acridina; en la Figura 10 se muestra un derivado de este que hidroliza más del 40% del 16S/23S ARNr en una hora a 37°C (pH 7.4, [derivado de acridina] = 1 mmol dm<sup>-3</sup>) [21].

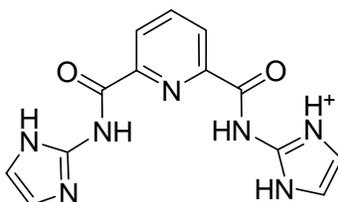


**Figura 10.** Estructura del derivado de la acridina utilizado en el estudio mencionado [21].

También se han realizado estudios cinéticos con polipéptidos que contienen lisina y/o arginina junto con cadenas laterales hidrofóbicas en la hidrólisis de un oligonucleótido constituido solamente por adeninas como bases. Uno de los polipéptidos más efectivos en la hidrólisis es poli(Leu-Lis) usado a un valor de pH de 7.5, con una concentración en lisina de 1 mmol/L [21].

### 2.3.2.2 Derivados de imidazol

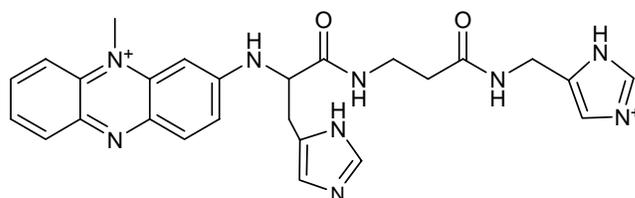
Existe varios ejemplos de la hidrólisis del enlace fosfodiéster en sustratos modelos del ARN con derivados de imidazol, debido a que se sabe que dos residuos de histidina de la ARNasa A tienen un papel importante en la acción catalítica. El compuesto de la Figura 11, un bisimidazol 2,6-carboxamidapiridina, cataliza la hidrólisis del 3', 5' ApA muy lentamente (aproximadamente el 30% de sustrato en 30 días) a un valor de pH de 7.5 y a 50°C con una concentración de catalizador de 10 mmol/L. La idea básica en el diseño de este compuesto es el uso de un residuo de imidazol protonado y otro desprotonado para efectuar la hidrólisis bifuncional. El perfil de la variación del grado de hidrólisis con respecto al pH de este compuesto fue de forma de campana con un máximo a un pH de 7.6 (se obtuvo 35% de degradación del 3', 5' ApA). Este tipo de perfil se obtiene también para la ribonucleasa A y confirma la hipótesis del diseño del catalizador [30].



**Figura 11.** Estructura del derivado bisimidazol 2,6-carboxamidapiridina [30].

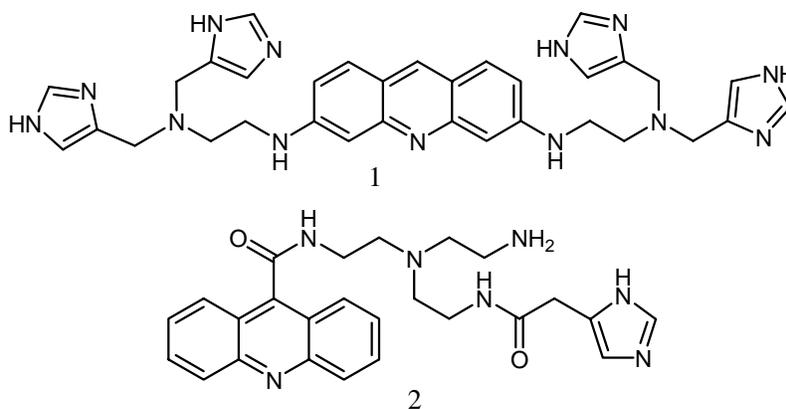
Otra alternativa que ha funcionado mejor como agentes hidrolizantes es el uso de intercaladores conjugados con imidazoles y/o grupos amino primarios. En estos compuestos el uso de los intercaladores permite unirse al ácido nucleico y con los sustituyentes llevar a cabo la catálisis. Un ejemplo es el uso de la fenacina como

intercalador (su estructura se muestra en la Figura 12) de la cual se ha informado que ocasiona que el tiempo de vida media de la hidrólisis del ARNt a pH de 7 y 37°C sea de 12 horas cuando se usa en una concentración de 1 mmol/L. El perfil de la hidrólisis con respecto al pH tiene una forma de campana lo que indica que existe mecanismo bifuncional [21].



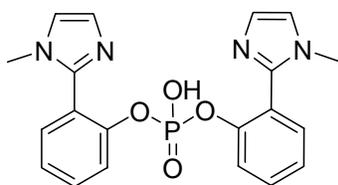
**Figura 12.** Estructura del derivado de fenacina [21].

Existen otros ejemplos del tipo de compuestos conjugados como los que se muestran en la Figura 13, en estos el intercalador es acridina. El compuesto **1** se utilizó en la hidrólisis del ARNr 16S/23S en concentraciones de 1 mmol/L a 37°C y un valor de pH de 7.4, hidrolizándose un 60% del ARNr en una hora. El compuesto **2**, a un valor de pH de 7 y una concentración de 0.1 mmol/L, hidrolizó completamente en 24 horas al ARNt. El mecanismo mediante el cual hidrolizan estos compuestos es difícil de elucidar, pero se cree que sigue el mismo que el de los compuestos mencionados anteriormente [21 y 31].



**Figura 13.** Estructura de los derivados de imidazol conjugados con Acridina.

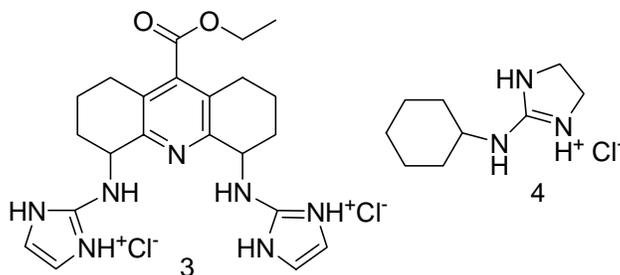




**Figura 15.** Estructura del BMIPP usado como sustrato modelo de ARN [6].

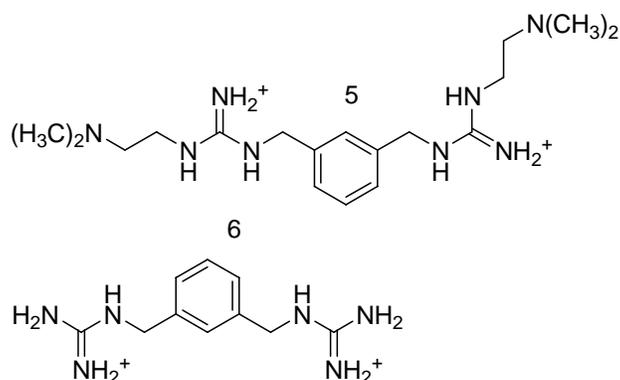
### 2.3.2.3 Derivados de guanidina

Otro tipo de compuestos que se han utilizado como agentes hidrolizantes son los derivados de guanidina ya que estos, al igual que los metales, pueden lograr una activación electrofílica [26 y 33]. En este sentido el grupo de Anslyn ha sintetizado varios compuestos. La estrategia que siguieron fue primero realizar estudios de reconocimiento con los derivados para ver si existía alguna asociación entre los derivados de imidazol (que en su estructura presentan el fragmento de guanidina) y un compuesto que contenía un enlace diéster de fosfato. Las constantes de asociación entre el dibencilfosfato y los compuestos 3 y 4 de la Figura 16 en DMSO acuoso estuvieron en el intervalo de  $10$  a  $10^3 \text{ M}^{-1}$ . Cada receptor formó los complejos 1:1 y 1:2 dependiendo de la cantidad de agua del DMSO (por debajo de 80% de DMSO sólo se formaron los complejos 1:1). El compuesto **3** mostró tener actividad hidrolizante hacia el ARNm en soluciones acuosas de pH neutro a  $37^\circ\text{C}$  en presencia de imidazol libre con concentración  $0.25 \text{ mol/L}$  como cocatalizador [34-36].



**Figura 16.** Estructuras de los compuestos derivados de guanidinio usados en los trabajos de Anslyn [34-36].

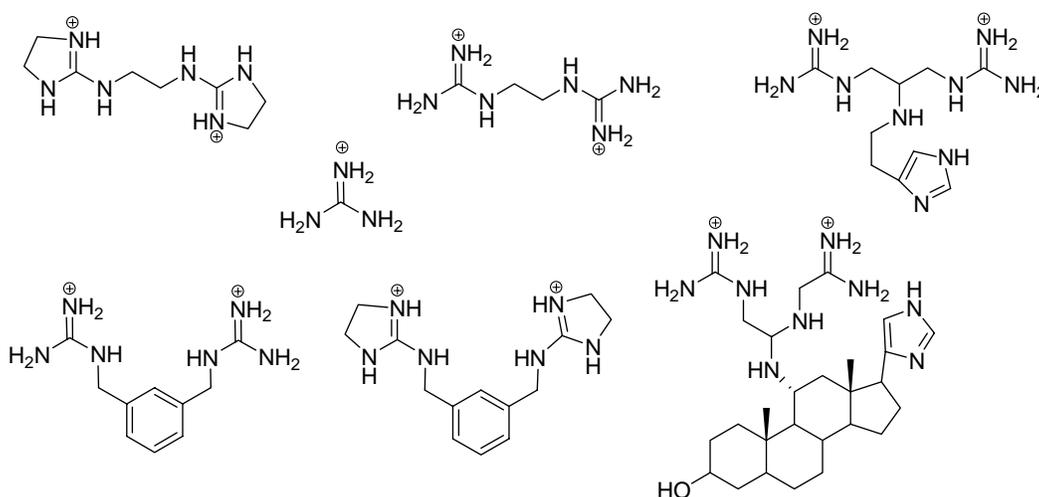
El grupo de Hamilton [37 y 38], realizó estudios con los receptores bisguanidinio que se muestran en la Figura 17. El compuesto 5 se usó en la hidrólisis del HpNPP en acetonitrilo. El mecanismo sugerido consiste en el reconocimiento por puentes de hidrógeno entre el fosfato del enlace diéster y los grupos guanidinio del receptor, mientras que los grupos (dimetilamino) etil actúan como bases desprotonando el grupo hidróxido del sustrato. En el caso del compuesto 6 se obtuvieron aceleraciones similares al compuesto 5, sólo en la presencia de lutidina y altas concentraciones de 6. El disolvente usado fue acetonitrilo, las condiciones de reacción fueron de pseudomonomolecularidad, con una concentración de HpNPP de 100  $\mu\text{mol/L}$  y una concentración del receptor de 3 a 30  $\text{mmol/L}$ . Sólo en algunos casos se utilizó la 2,6-lutidina en concentración de 0.0125 $\text{mol/L}$ , las sales de los catalizadores fueron en la forma de tetrafenilborato para poderlas solubilizar. El receptor 5 mostró una eficiencia de 14 veces con respecto a la reacción sin catalizador ( $k_{NC} = 3.8 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ), mientras que el receptor 6 tuvo una eficiencia de 290 veces con respecto a la reacción sin catalizar.



**Figura 17.** Estructura de los compuestos utilizados por Hamilton en la hidrólisis del HpNPP en acetonitrilo [37 y 38].

También el grupo de Kalesse utilizó el grupo guanidinio como agente hidrolizante [39], en el estudio observaron el efecto del cambio de estructura y los efectos de disolvente. Para ello se varió la cadena alifática de los compuestos bis(guanidinio), colocando una unidad aromática, entre otros grupos. En la Figura 18 se muestran algunos de los compuestos usados por este grupo en los estudios cinéticos. El

efecto de disolvente se analizó utilizando agua y acetonitrilo. Para las hidrólisis en agua, las sales de los compuestos bis(guanidinio) fueron sulfatos y su concentración fue de 10 mmol/L, la temperatura de los experimentos fue de 55°C, el pH se ajustó a un valor de 7.55 con HEPES 100 mmol/L, además la fuerza iónica se mantuvo constante a un valor de 0.5 mol/L con KCl. Las condiciones de la reacción fueron de pseudomonomolecularidad usando una concentración del sustrato HpNPP de 2 mmol/L. Para la hidrólisis en acetonitrilo las sales de los compuestos bis(guanidinio) fueron ditetrafenilborato en una concentración de 10 mmol/L, además se utilizó la 2,6-lutidina como base en una concentración de 100 mmol/L, al igual que la hidrólisis en agua las condiciones fueron de pseudomonomolecularidad utilizando una concentración de HpNPP de 0.1 mmol/L.

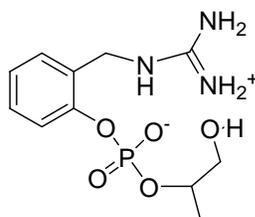


**Figura 18.** Estructuras de los compuestos usados en los estudios de Kalesse [39].

Para los estudios en acetonitrilo se observó que a medida que aumenta la cadena alifática en los grupos bis(guanidinio) baja la actividad del catalizador, mientras que al colocar grupos aromáticos como espaciadores aumentó la actividad lográndose un máximo con el compuesto que tiene un espaciador aromático y dos grupos aminoimidazolio. Algo que observaron fue que al agregar más de 0.1% de agua la contribución de la hidrólisis espontánea por hidróxido era mayor [39].

En el caso de la hidrólisis en agua el compuesto que contiene un anillo esteroideo fue el mejor catalizador ya que mostró una eficiencia diez veces mayor a la observada con los demás compuestos en agua. Los efectos estructurales anteriormente mencionados en acetonitrilo fueron los mismos que en agua [39].

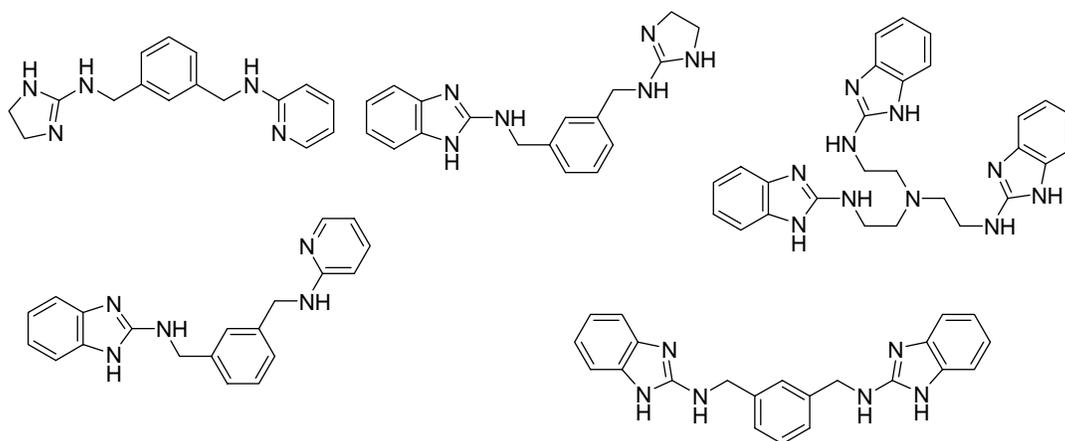
Recientemente Anslyn y colaboradores informaron un estudio de “*inventario de protones*” para un fosfodiéster con un grupo guanidinio unido intramolecularmente que se muestra en la Figura 19 [40]. En el estudio de “*inventario de protones*” se utilizó como control el sustrato modelo del ARN el HpNPP. Las concentraciones de los sustratos en el estudio fueron de 830  $\mu\text{mol/L}$  y 99.2  $\text{mmol/L}$  de N-metilpiperidina como base a pH de 10.4, las mediciones cinéticas se hicieron en mezclas  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{D}_2\text{O}$ . El estudio arrojó que la presencia del grupo guanidinio en la molécula del sustrato mejoró los valores de las constantes de rapidez de la ruptura del enlace fosfodiéster en 16 veces y que el grupo guanidinio actúa como un catalizador ácido general durante la hidrólisis/transesterificación y no sólo como un catalizador electrostático.



**Figura 19.** Diéster de fosfato con un grupo guanidinio intramolecular [40].

También el grupo de Göbel ha trabajado con análogos sintéticos de guanidina [33 y 41], los cuales son derivados de la 2-aminopiridina y del 2-aminobencimidazol con el fin de disminuir los valores de  $pK_a$  de 14 a 7 en el grupo guanidina (en la Figura 20 se muestran algunos de estos análogos). Los estudios cinéticos se hicieron con fragmentos de ARN etiquetados con compuestos fluorescentes para poder determinar el grado de hidrólisis en un secuenciador. Las concentraciones de los sustratos fue de 120 a 140  $\text{nmol/L}$ , la de los catalizadores fue de 1  $\mu\text{mol/L}$  a 10  $\text{mmol/L}$ . El pH se mantuvo constante con 50  $\text{mmol/L}$  de Tris y 0.01 % de SDS

(los derivados de 2-aminopiridina se mantuvieron a pH de 7.0, mientras los 2-aminobencimidazoles a pH de 6.0) la temperatura se ajustó a 37°C en agua y las corridas duraron de 16 a 20 horas. Por sorprendente que parezca, los derivados de 2-aminopiridina presentaron muy baja actividad catalítica, mientras que los derivados de 2-aminobencimidazoles fueron agentes hidrolizantes muy activos. Los catalizadores más activos fueron los tris (2-aminobencimidazoles), que a la concentración de 1 mmol/L hicieron que los tiempos de vida media para la hidrólisis de los fragmentos de ARN usados (alrededor de 300 minutos) fueran comparables con los que se han obtenido con nucleasas metalodependientes.

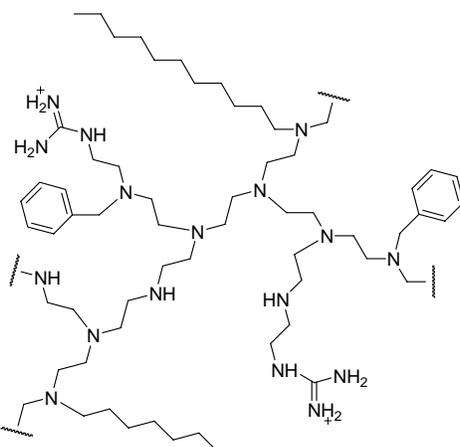


**Figura 20.** Estructuras de algunos de los derivados de la 2-aminopiridina y el 2-aminobencimidazol usados en el trabajo de Göbel [33 y 41].

#### 2.3.2.4 Otros tipos de agentes hidrolizantes

Dentro de otro grupo de agentes hidrolizantes que se han utilizado, está un polímero de polietilenimina derivatizado con grupos alquilo ( $C_2$ - $C_{12}$ ), bencilo y guanidinio conocido como “sinzima” (en la Figura 21 se muestra un esquema de uno de los fragmentos de la sinzima) [9]. Este compuesto se utilizó en la hidrólisis de un sustrato modelo del ARN, el HpNPP, obteniéndose constantes de rapidez para la hidrólisis aproximadamente 10000 veces mayores que las obtenidas sin catalizador. Las mediciones cinéticas se hicieron en agua a 30°C con un valor de pH de 8 (amortiguado con HEPES), la concentración del sustrato fue 1 mmol/L

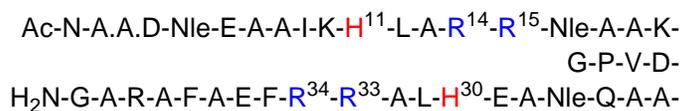
mientras que la concentración del polímero fue 3  $\mu\text{mol/L}$ . La sinzima presenta una cinética de saturación del tipo de Michaelis-Menten ( $K_m = 250 \mu\text{mol/L}$ ,  $k_{\text{cat}} = 0.0085 \text{ s}^{-1}$ ). El perfil de la variación de  $k_{\text{cat}}/K_m$  contra el pH es de forma de campana con un máximo (similar al de las enzimas) en 7.5. Lo anterior indica que el valor de  $K_m$  aumenta a valores altos de pH debido a la desprotonación de las aminas en el polímero que se unen con el sustrato aniónico y  $k_{\text{cat}}$  disminuye a bajos valores de pH por la disminución de la disponibilidad del hidróxido. El diseño de este catalizador se basa en el uso del ambiente hidrofóbico creado por las cadenas alifáticas del mismo polímero y los sustituyentes, que asemeja a los sitios activos de las enzimas. Además del uso de grupos funcionales como el guanidinio que hace aún más eficiente la catálisis [9].



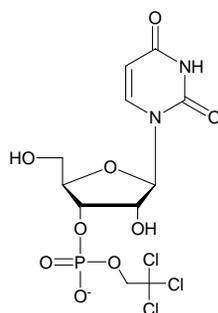
**Figura 21.** Esquema de uno de los fragmentos de la sinzima del trabajo de Hollfelder [9].

Existe también un trabajo donde se utilizó un péptido de 42 aminoácidos (la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 22, estructura 7) que forma dos hélices unidas por un pliegue (“loop”) [42]. Este péptido tiene la capacidad de dimerizarse en 4 cadenas enrolladas que pueden llevar a cabo la hidrólisis de fosfodiésteres. El sitio activo en la superficie plegada del catalizador presenta dos residuos de histidina y cuatro argininas que tienen la capacidad de presentar catálisis del tipo ácida general, básica general y nucleofílica, además puede estabilizar el estado de transición. Los sustratos modelos del ARN empleados

fueron el uridin 3'-2,2,2-tricloroetilfosfato (ver Figura 22 estructura 8) y el 2-hidroxiopropil-2,2,2-tricloroetilfosfato que tienen un grupo saliente no mejor que el HpNPP (en este el grupo saliente es el *p*-nitrofenolato). Las mediciones cinéticas se hicieron en agua a 40°C y a un valor de pH de 7 ajustados con MES, HEPES o acetato de sodio (50 mmol/L). La concentración del péptido fue de 1 mmol/L y la de los sustratos fue 2 mmol/L, para mantener constante la fuerza iónica se añadió cloruro de sodio. En todos los experimentos se hizo una corrida con imidazol como catalizador con concentración 50 mmol/L. Con uridin 3'-2,2,2-tricloroetilfosfato la relación entre las constantes de rapidez de segundo orden para la hidrólisis del sustrato con el péptido e imidazol ( $k_{\text{pep}}/k_{\text{Im}}$ ) fue de 252, en tanto que para el sustrato 2-hidroxiopropil-2,2,2-tricloroetilfosfato fue de 197.



7



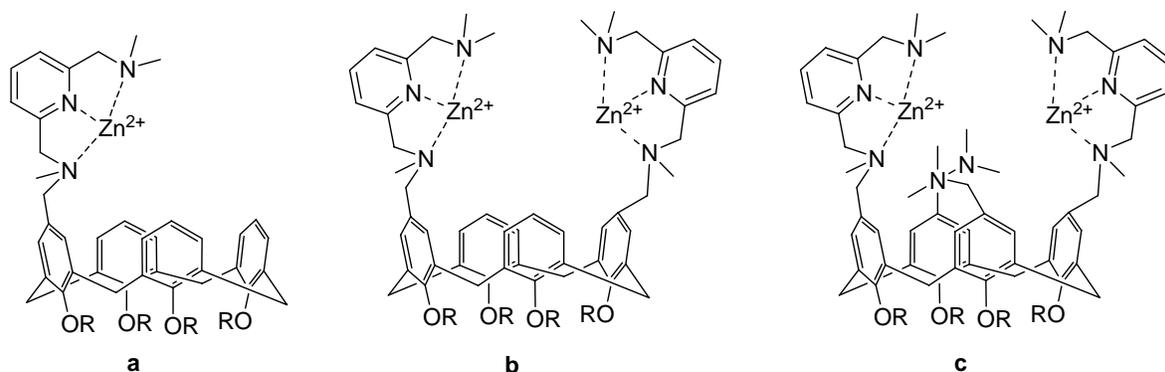
8

**Figura 22.** En esta Figura se muestra: (7) la secuencia de aminoácidos del polipéptido, en donde los aminoácidos que están en el sitio activo tienen un número que indica su posición, en el extremo del carboxilo terminal se formó una amida mientras que el extremo amino se acetiló; (8) estructura de la uridin 3'-2,2,2-tricloroetilfosfato [42].

## 2.4 Estudios de hidrólisis de fosfodiésteres en disolventes orgánicos

El ajuste de microambientes alrededor de los centros catalíticos en las enzimas artificiales es importante para mejorar la eficiencia catalítica. En el caso de la hidrólisis de los fosfodiésteres se conoce poco acerca de los efectos del disolvente. Esto es por las dificultades en las mediciones de cinéticas tan lentas para la hidrólisis de los ésteres de fosfato [8]. A continuación se enuncian algunos de los trabajos más sobresalientes en la catálisis de la ruptura de ésteres de fosfato en mezclas de disolventes orgánicos.

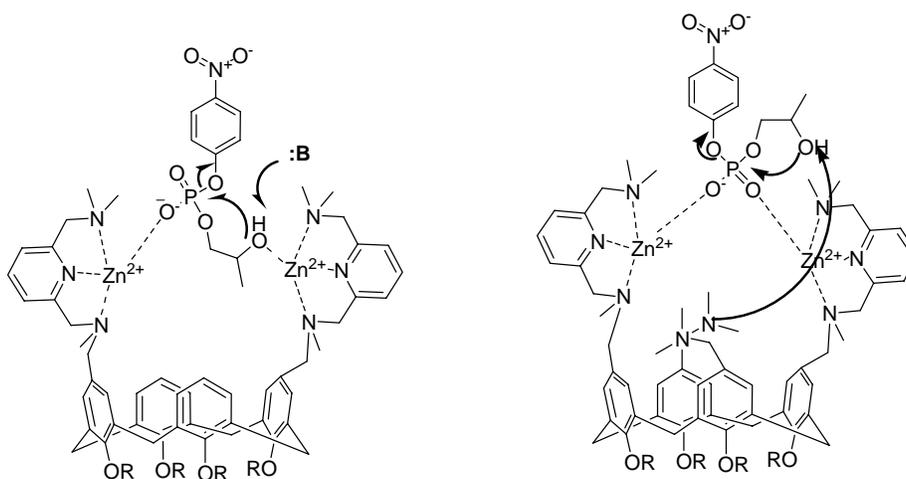
Uno de los primeros trabajos fue el del grupo de Hamilton, mencionado anteriormente. La hidrólisis del HpNPP con los compuestos de la Figura 23 se hicieron en acetonitrilo para poder facilitar la formación de puentes de hidrógeno entre el sustrato y el agente hidrolizante, además de mostrarse un aceleramiento en las constantes de rapidez. También en acetonitrilo, el grupo de Reinhoudt utilizó los complejos mono y dinucleares de zinc de tres calix [4] arenos bifuncionalizado en el anillo superior, la estructura de los calix [4] arenos usados como ligantes se muestra en la Figura 23 [43].



**Figura 23.** Estructura de los complejos de zinc de calix [4] arenos usados por el grupo de Reinhoudt [43].

Los estudios cinéticos se hicieron en una mezcla acetonitrilo-agua al 50%, con valores de pH entre 6.8 y 7 ajustado con HEPES 20 mmol/L, la temperatura

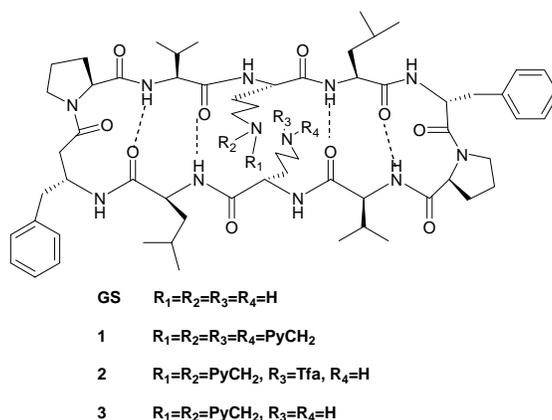
también se mantuvo constante a 25°C, la concentración de los complejos fue 0.48 mmol/L y la del sustrato 0.19 mmol/L. Los complejos se generaron *in situ* para usarlos inmediatamente como catalizadores. Los valores de las constantes de hidrólisis del HpNPP con el complejo dinuclear del ligante **c** fueron 7000 veces más rápidas que las de la reacción sin catalizar, mientras que para el ligante **b** fueron 19000 veces más rápidas. Lo anterior indicó que los grupos dimetilamino de **c** no ayudaron al mejoramiento de la catálisis. El mecanismo propuesto (ver Figura 24) consiste en la activación del grupo fosforilo del sustrato con los dos centros de zinc de manera cooperativa, en el caso de **b** una base externa actúa desprotonando el grupo hidroxilo del HpNPP; en el caso de **c** la base son los grupos dimetilamino de uno de los anillos.



**Figura 24.** Representación esquemática del posible mecanismo para la hidrólisis del HpNPP catalizada por los complejos dinucleares de zinc de **b** y **c** del trabajo de Reinhoudt [43].

Otro trabajo informado por el grupo de Hawaii en el que estudiaron la hidrólisis de un sustrato modelo del ARN (HpNPP) en una mezcla de acetonitrilo-agua mediante un complejo dinuclear de zinc con un ligante derivado del péptido gramicidina S. En la Figura 25 se muestran las estructuras de los ligantes usados para formar los complejos dinucleares con los cuales se hizo el estudio de hidrólisis. Todos los estudios se hicieron en 50% de acetonitrilo-agua en un pH ajustado con HEPES (20 mmol/L) a pH 7 (la única excepción fue el estudio hecho

con el complejo del ligante **2** que se hizo en 80% de acetonitrilo) en condiciones de pseudomonomolecularidad. De los tres complejos, el complejo uno mostró tener una aceleración drástica en la hidrólisis del HpNPP ( $k_{obs} = 3300 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{NC} = 0.51 \text{ s}^{-1}$ ) [44].

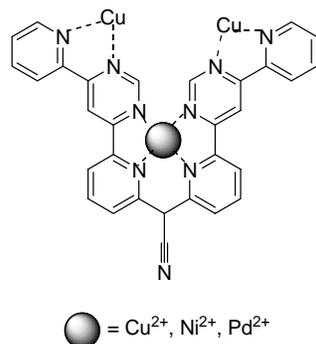


**Figura 25.** Estructura de la Gramicidina S y sus derivados 2-metilpiridina [44].

También el grupo de Kondo realizó trabajos en acetonitrilo, sólo que en este caso fue en acetonitrilo al 99.9% con 0.01% en volumen de agua. Los trabajos de estudios de hidrólisis se hicieron con el sustrato HpNPP usando cationes metálicos ( $Cu^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ ) como catalizadores. En su estudio cinético no utilizaron ningún ligante, ni tampoco ningún tipo de base sólo los cationes metálicos. La aceleración lograda en la reacción catalizada con los metales con respecto a la no catalizada (en acetonitrilo  $k_{NC} = 6.8 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{cCu^{2+}} = 0.126 \text{ s}^{-1}$  y  $k_{cZn^{2+}} = 2.55 \text{ s}^{-1}$ ) fue de alrededor de  $10^5$  a  $10^6$  veces mayor. Las mediciones cinéticas se hicieron a  $25^\circ C$  con una concentración de sustrato de  $50 \mu\text{mol/L}$ , la concentración de los metales fue  $0.25 \text{ mmol/L}$ . Para solubilizar el HpNPP en el acetonitrilo se utilizó el éter 18-corona-6, el cual se observó que disminuye un poco la aceleración pero la disminución es despreciable. Un efecto importante que arrojó este estudio fue que al agregar agua u otro disolvente (en este caso fue metanol y DMF) la constante de rapidez disminuye abruptamente debido al debilitamiento de la electrofilia de los iones metálicos. Por ejemplo la constante de rapidez de acetonitrilo con 0.01% de agua disminuye 1/250 al aumentar el contenido de agua a 2.01%. En el caso

de la hidrólisis en los otros disolventes la caída es aún mayor por un factor de  $10^3$  a  $10^4$  veces [45].

Por otro lado, el grupo de Krämer realizó la hidrólisis del HpNPP en mezclas agua-DMSO 3:1 con un complejo metálico ternario que puede funcionar como un catalizador alostérico [46], la estructura de este complejo se muestra en la Figura 26. Los metales alostéricos que se usaron en el estudio fueron cobre, níquel y paladio. Las mediciones cinéticas se hicieron a  $20^\circ\text{C}$  en la mezcla de disolventes anteriormente mencionada con un ajuste de pH de 7.0 a 7.5 con MOPS 5 mmol/L. Las concentraciones del sustrato y del complejo fueron 0.5 mmol/L y 0.1 mmol/L respectivamente.



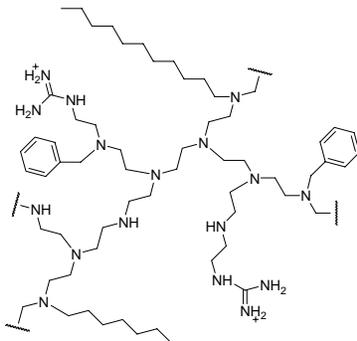
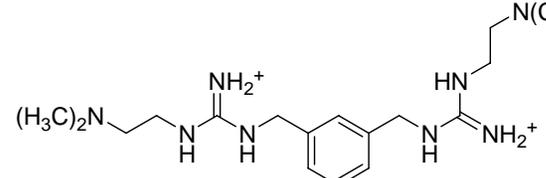
**Figura 26.** Estructura del complejo metálico con sitios alostéricos del trabajo de Krämer [45].

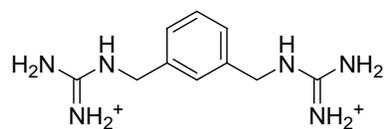
Las curvas cinéticas obtenidas fueron del tipo de Michaelis-Menten, los valores de  $K_m$  obtenidos fueron  $170 \text{ M}^{-1}$  para cobre,  $340 \text{ M}^{-1}$  para níquel y  $2600 \text{ M}^{-1}$  para paladio; mientras los valores de  $k_{cat} \times 10^3$  fueron  $17 \text{ s}^{-1}$  para cobre,  $3.1 \text{ s}^{-1}$  para níquel y  $0.22 \text{ s}^{-1}$  para paladio. Esto indica que la naturaleza y tamaño del metal afecta la afinidad y reactividad del catalizador hacia el sustrato [46]. Suh y Seok Hong, contribuyeron también en el estudio de la catálisis del HpNPP en algunos disolventes orgánicos. Ellos realizaron la catálisis ácida del HpNPP ( $50 \mu\text{mol/L}$ ) con HCl y  $\text{HClO}_4$  en acetonitrilo (MeCN), 1,4-dioxano, metanol (MeOH), dimetilsulfóxido (DMSO), etanol (EtOH) y N,N-dimetilformamida (DMF). La catálisis

con los ácidos de concentración 0.092 mol/L fue de 50 a 50000 veces más rápida en los disolventes orgánicos que en agua [8].

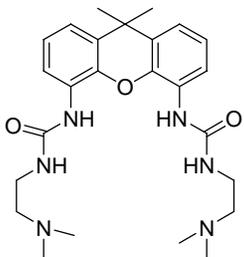
A continuación, en la tabla 1 se muestran los valores obtenidos en las reacciones de transesterificación del HpNPP por otros grupos de investigación en diferentes medios y con distintos catalizadores.

**Tabla 1.** Constantes de rapidez para la hidrólisis del 2-hidroxiopropil-4-nitrofenilfosfato informados en otros estudios de hidrólisis.

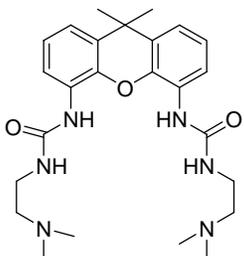
Catalizador	Disolvente	Temp.	pH	$k_{obs} \times 10^4, s^{-1}$	$k_2, M^{-1} s^{-1}$	Ref.
Ninguno	MeCN:H <sub>2</sub> O	25°C	7	$2.7 \times 10^{-4}$	N.D.	[43]
	1:1					
Ninguno	MeCN (0.01% H <sub>2</sub> O)	25°C	7	$3.8 \times 10^{-4}$	N.D.	[38]
Ninguno	MeOH	25°C	N.D.	$7 \times 10^{-4}$	N.D.	[47]
	H <sub>2</sub> O	30°C	7.85	85 <sup>a</sup>	33.8	[9]
 <p>Ac-N-A.A.D-Nle-E-A-A-I-K-H<sup>11</sup>-L-A-R<sup>14</sup>-R<sup>15</sup>-Nle-A-A-K-G-P-V-D-H<sub>2</sub>N-G-A-R-A-F-A-E-F-R<sup>34</sup>-R<sup>33</sup>-A-L-H<sup>30</sup>-E-A-Nle-Q-A-A-</p>	H <sub>2</sub> O	30°C	7.0	ND	$7.08 \times 10^{-4}$ <sup>b</sup>	[42]
 <p>(H<sub>3</sub>C)<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(=NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)-NH-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(=NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)-NH-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></p>	MeCN	25°C	N.D.	1.1	0.069	[38]



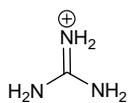
MeCN 25°C N.D. 0.055<sup>c</sup> 0.00044 [38]



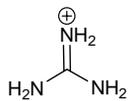
MeOH 25°C N.D. 0.241 N.D. [47]



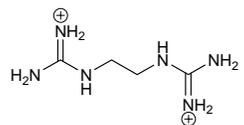
MeCN 25°C N.D. 6.6 N.D. [47]



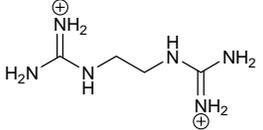
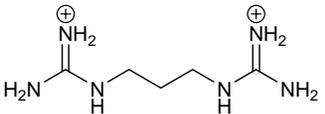
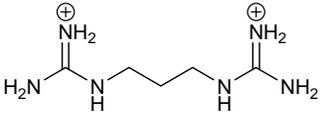
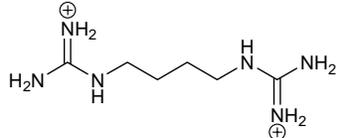
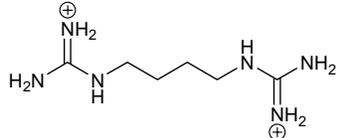
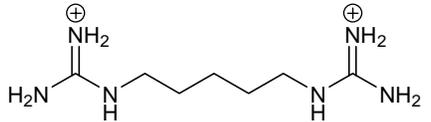
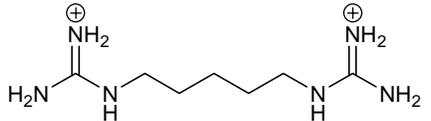
MeCN 30°C N.D. 0.13<sup>d</sup> N.D. [48]  
(0.1% H<sub>2</sub>O)

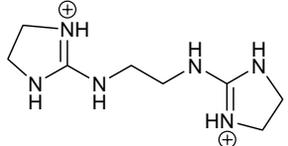
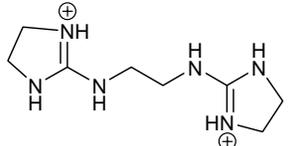
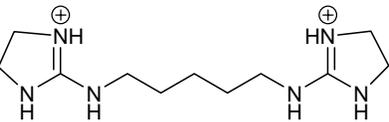
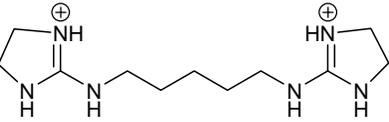
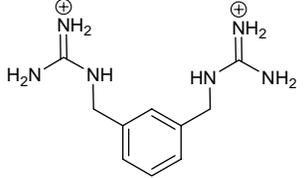
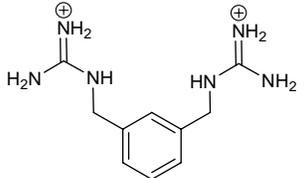


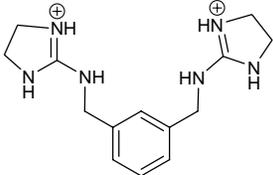
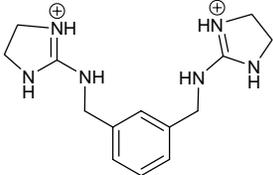
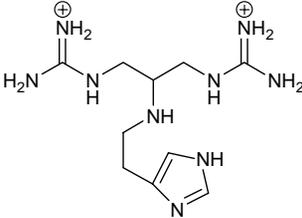
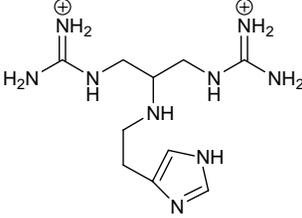
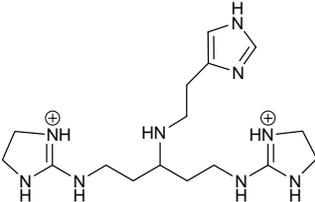
H<sub>2</sub>O 55°C 7.55 <5×10<sup>-4</sup><sup>e</sup> N.D. [48]

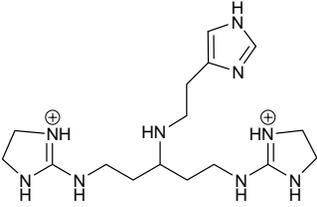
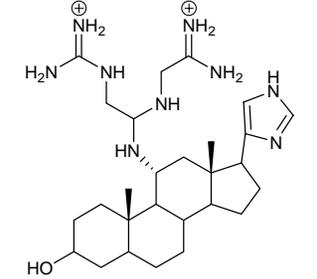
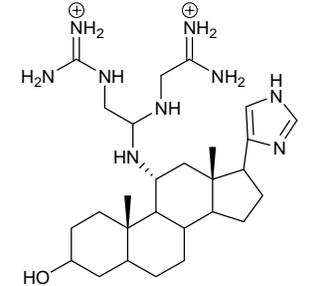


MeCN 30°C N.D. 1.76<sup>d</sup> N.D. [48]  
(0.1% H<sub>2</sub>O)

	H <sub>2</sub> O	55°C	7.55	0.0015 <sup>e</sup>	N.D.	[48]
	MeCN (0.1% H <sub>2</sub> O)	30°C	N.D.	1.74 <sup>d</sup>	N.D.	[48]
	H <sub>2</sub> O	55°C	7.55	0.0013 <sup>e</sup>	N.D.	[48]
	MeCN (0.1% H <sub>2</sub> O)	30°C	N.D.	1.02 <sup>d</sup>	N.D.	[48]
	H <sub>2</sub> O	55°C	7.55	<5×10 <sup>-4</sup> <sup>e</sup>	N.D.	[48]
	MeCN (0.1% H <sub>2</sub> O)	30°C	N.D.	1.22 <sup>d</sup>	N.D.	[48]
	H <sub>2</sub> O	55°C	7.55	0.0012 <sup>e</sup>	N.D.	[48]

	MeCN (0.1% H <sub>2</sub> O)	30°C	N.D.	0.99 <sup>d</sup>	N.D.	[48]
	H <sub>2</sub> O	55°C	7.55	0.0018 <sup>e</sup>	N.D.	[48]
	MeCN (0.1% H <sub>2</sub> O)	30°C	N.D.	1.12 <sup>d</sup>	N.D.	[48]
	H <sub>2</sub> O	55°C	7.55	<5×10 <sup>-4</sup> <sup>e</sup>	N.D.	[48]
	MeCN (0.1% H <sub>2</sub> O)	30°C	N.D.	1.22 <sup>d</sup>	N.D.	[48]
	H <sub>2</sub> O	55°C	7.55	8×10 <sup>-4</sup> <sup>e</sup>	N.D.	[48]

	MeCN (0.1% H <sub>2</sub> O)	30°C	N.D.	2.02 <sup>d</sup>	N.D.	[48]
	H <sub>2</sub> O	55°C	7.55	0.0013 <sup>e</sup>	N.D.	[48]
	MeCN (0.1% H <sub>2</sub> O)	30°C	N.D.	0.33 <sup>d</sup>	N.D.	[48]
	H <sub>2</sub> O	55°C	7.55	0.0024 <sup>e</sup>	N.D.	[48]
	MeCN (0.1% H <sub>2</sub> O)	30°C	N.D.	0.46 <sup>d</sup>	N.D.	[48]

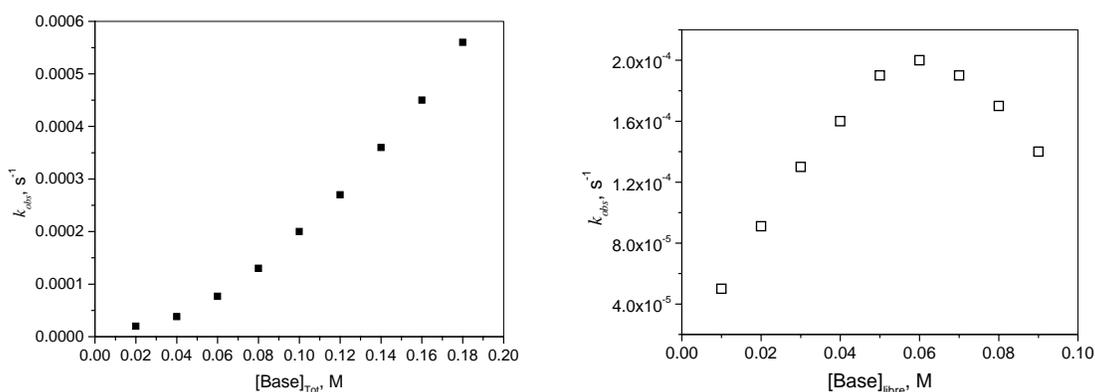
	H <sub>2</sub> O	55°C	7.55	<5×10 <sup>-4</sup> <sup>e</sup>	N.D.	[48]
	MeCN (0.1% H <sub>2</sub> O)	30°C	N.D.	0.35 <sup>d</sup>	N.D.	[48]
	H <sub>2</sub> O	55°C	7.55	0.0143 <sup>e</sup>	N.D.	[48]

<sup>a,b</sup> 50 mmol/L de HEPES, <sup>c</sup> con 2,6-lutidina (0.0125 mol/L), <sup>d</sup> con 2,6-lutidina (0.100 mol/L), <sup>e</sup> con HEPES (0.100 mol/L), I = 0.5 mol/L KCl, N.D. = No hay dato.

### 3. OBJETIVOS DEL TRABAJO

La catálisis con amortiguadores ha tomado mucha importancia en los últimos años, debido a la posibilidad de presentar un mecanismo bifuncional donde actúan ambas especies (la ácida y la básica). Además, como se mencionó en los antecedentes, el grupo guanidinio ha sido motivo de varios estudios en la hidrólisis de fosfodiésteres, en parte por estar presente en el sitio activo de la nucleasa del *Staphylococcus*, además de ser un activador de Lewis igual que los metales. Aunado a lo anterior se ha visto que en medios con bajo contenido de agua la transesterificación de compuestos del tipo fosfodiéster se mejora notablemente.

Con base en lo anterior y con el fin de estudiar la capacidad catalítica de distintos pares ácido-base (guanidina, acetamidina, piperidina y metilamina) capaces de formar amortiguadores en la hidrólisis de ésteres fosfato en medios con bajo contenido de agua para proponer un mecanismo para la transesterificación del HpNPP, extrapolándolo al llevado a cabo por las ribonucleasas no metálicas, se realizarán perfiles de la variación de las constantes de rapidez con la concentración total del amortiguador y el grado de neutralización del mismo (en el esquema I se muestra un ejemplo de estos perfiles).



**Esquema I.** Perfiles de la variación de la constante de rapidez observada en función de: la concentración total del amortiguador (izquierda) y el grado de neutralización del mismo (derecha).

### **3.1 Metas**

Determinar el porcentaje volumen/volumen de la mezcla de DMSO:agua (con menos del 40% de agua, [59]) en donde exista la mayor capacidad de transesterificación del sistema amortiguador hacia el HpNPP.

Realizar estudios cinéticos para la transesterificación del HpNPP en DMSO acuoso para observar los efectos de la concentración y el grado de neutralización de las bases (en los sistemas amortiguadores formados), en la constante de rapidez de la transesterificación del HpNPP.

Utilizar distintos pares ácido-base para ver el efecto que tiene el valor del  $pK_a$  de sus formas ácidas sobre las constantes de rapidez.

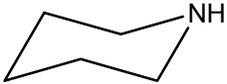
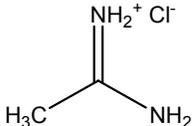
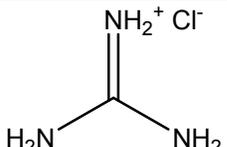
Determinar los valores de  $pK_a$  de los pares ácido-base utilizados en DMSO acuoso para poder hacer correlaciones entre estos y las constantes de rapidez de manera cuantitativa.

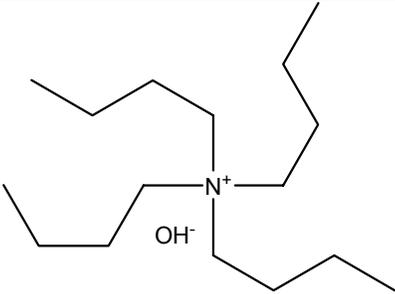
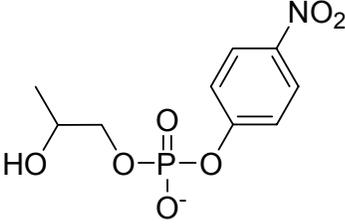
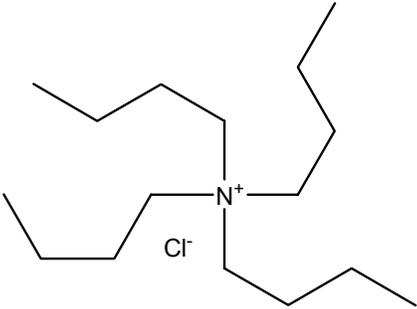
## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

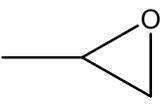
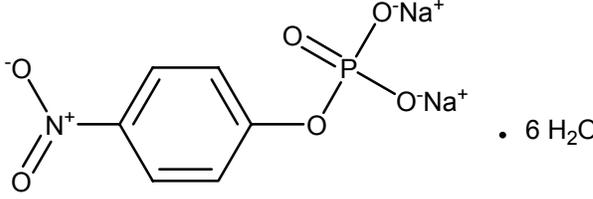
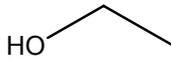
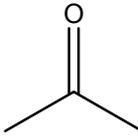
### 4.1 Reactivos

Para la realización de los estudios cinéticos se usó sólo un sustrato (HpNPP) y cuatro bases (guanidina, acetamidina, piperidina y metilamina), de las cuáles dos estaban en la forma de ácido, por lo que se requirió de una base extra para formar el sistema amortiguador de pH con estas últimas. Para las bases que venían en su forma básica se usó ácido perclórico para formar el amortiguador. Además para medir el  $pK_a$  de los pares ácido-base se usó un electrolito de soporte en titulaciones potenciométricas. A continuación se muestra una tabla en donde se encuentran los reactivos usados y sus datos más importantes, además más adelante se encuentra una breve descripción.

**Tabla 2.** Estructura y características principales de los reactivos usados.

$\text{CH}_3\text{NH}_2$ (MeNH <sub>2</sub> )	Metilamina Merck, 40% Masa molar = 31.06
 (PPD)	Piperidina Aldrich, 99% Masa molar = 85.15 , densidad a 25°C de 0.861 g/mL
 (HAMD <sup>+</sup> )	Cloruro de acetamidinio Aldrich, 95% Masa molar = 94.54
 (HGu <sup>+</sup> )	Cloruro de guanidinio Sigma, 99% Masa molar = 95.53

 <p>(Bu<sub>4</sub>NOH)</p>	<p>Hidróxido de tetrabutilamonio Sigma-Aldrich, 40% (m/m) en agua, densidad a 25°C de 0.995 g/mL Masa molar = 259.47</p>
 <p>(HpNPP)</p>	<p>2-hidroxipropil-<i>p</i>-nitrofenilfosfato Masa molar = 276.16 Sintetizado de acuerdo a Brown y Usher [49]</p>
 <p>(Bu<sub>4</sub>NCl)</p>	<p>Cloruro de tetrabutilamonio Fluka, ≥ 97%, pureza para intercambio iónico. Masa molar = 277.92</p>
<p>HClO<sub>4</sub></p>	<p>Ácido perclórico J. T. Baker, 69-72% (m/m), reactivo ACS densidad de 1.67 g/mL Masa molar = 100.46</p>
<p>Resina de intercambio iónico Amberlite® IR-120 H</p>	<p>Sigma-Aldrich Capacidad de intercambio: 4.4 meq/g por peso seco y 1.9 meq/mL de resina hidratada</p>
<p>Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O</p>	<p>Hidróxido de bario, para análisis J.T. Baker, 98% Masa molar = 315.48</p>

	<p>Óxido de propileno Sigma-Aldrich, 99% d = 0.83 g/mL Masa molar = 58.08</p>
	<p>4-nitrofenilfosfato de sodio hexahidratado Sigma-Aldrich, 98% Masa molar = 371.14</p>
	<p>Etanol anhidro J. T. Baker, 99.9% (m/m), Reactivo ACS Masa molar = 46.07</p>
	<p>Acetona J. T. Baker, 99.6% , Reactivo ACS Masa molar = 58.08</p>

#### 4.1.1 Disolventes

Para los experimentos se usó agua deionizada obtenida a partir de agua destilada con el equipo NANOPURE BARNSTEAD. En tanto que el dimetil sulfóxido (DMSO) se adquirió de J. T. Baker y se utilizó sin tratamiento previo.

#### 4.1.2 Sustrato

Como sustrato modelo del ARN se utilizó el 2-hidróxipropil-*p*-nitrofenilfosfato (HpNPP), el cual fue sintetizado mediante el método de Brown y Usher [49] y el procedimiento de la síntesis y los reactivos utilizados se describen a continuación:

#### 4.1.2.1 Reactivos usados en la síntesis del sustrato

Para la síntesis del HpNPP se requirió de óxido de propileno y el *p*-nitrofenilfosfato de sodio hexahidratado. Mientras que en la purificación se usó hidróxido de bario, etanol y acetona, además de la resina de intercambio iónico amberlite®. Las especificaciones de cada reactivo se muestran en la Tabla 2.

#### 4.1.2.2 Síntesis del sustrato

Para la síntesis del HpNPP se partió de una disolución de la sal disódica de *p*-nitrofenilfosfato (3.5 mmol) en agua (141 mmol), ésta se pasó por una columna empacada con la resina de intercambio iónico IR-120 (H<sup>+</sup>). El eluyente ácido se ajustó a un valor de pH aproximado de 8 con una disolución de amoníaco. A la solución básica resultante se le añadieron 20 mL de 1,2-epoxipropano y se mantuvieron a 35 °C por 35 horas. El epóxido sin reaccionar fue removido por destilación a presión reducida. La mezcla de reacción se pasó por la columna con la resina mencionada anteriormente. La disolución obtenida después de pasarla por la columna se neutralizó a un valor de pH entre 6 y 7 con una disolución de hidróxido de bario libre de carbonatos (la medición de pH se hizo con papel indicador de pH). Una vez neutralizada se concentró a aproximadamente un volumen de 10 mL a presión reducida y temperatura ambiente. Después se añadieron 2 volúmenes de etanol y el precipitado obtenido (*p*-nitrofenilfosfato sin reaccionar) se removió por filtración. El filtrado se disminuyó a un volumen cercano a 10 mL y se le añadió con agitación vigorosa una mezcla al 10% de etanol en 300 mL de acetona. Se obtuvo un precipitado que se filtró y éste corresponde a la sal de bario del 2-hidroxiopropil-*p*-nitrofenilfosfato. El rendimiento obtenido fue del 42%. Al precipitado se le tomó un espectro de Resonancia Magnética Nuclear para ver su pureza en D<sub>2</sub>O. El espectro RMN <sup>1</sup>H de la sal de bario del HpNPP se muestra en el apéndice 1. Como se observa en el espectro, el grado de pureza es alto, pero para conocer numéricamente la cantidad de HpNPP se hizo un estudio de transesterificación alcalina con hidróxido de tetrabutilamonio.

El experimento se llevó a cabo de la siguiente manera, se pesó una cantidad de la sal de bario tomando en consideración que se obtuvo el 100% de rendimiento y se preparó una solución acuosa. Después se preparó una solución madre de *p*-nitrofenol y se tomaron varias alícuotas a las cuales se les agregó hidróxido de tetrabutilamonio. Con la serie de 4-nitrofenol se determinó la absorptividad molar ( $\epsilon = 18000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) a 400 nm. Una vez conocido el valor de  $\epsilon$  se hicieron varias series de transesterificación al tomar alícuotas de la solución madre de la sal de bario del HpNPP y con estas se calculó que la cantidad real de HpNPP en la sal de bario fue >99%. Para los estudios cinéticos, se quitó el bario al pasar una solución del HpNPP a través de una columna con la resina mencionada, para intercambiar el ión  $\text{Ba}^{2+}$  por iones  $\text{H}^+$ .

#### **4.1.3 Bases**

Las bases usadas para los estudios cinéticos fueron: hidróxido de tetrabutilamonio, piperidina, metilamina, cloruro de acetamidinio y cloruro de guanidinio. Las características principales se muestran en la Tabla 2 (compañía de adquisición, pureza y masa molar). Todos se usaron sin tratamiento previo y en el caso de las soluciones (metilamina, piperidina e hidróxido de tetrabutilamonio) se midió su concentración mediante titulaciones potenciométricas, antes de utilizarse.

#### **4.1.4 Sales**

Se utilizó cloruro de tetrabutilamonio para ajustar la fuerza iónica en los experimentos, sus especificaciones principales se muestran en la Tabla 2.

#### **4.1.5 Ácidos**

El ácido perclórico fue utilizado para neutralizar a dos de las bases (piperidina y metilamina) y formar los pares amortiguadores requeridos para los estudios cinéticos; además, se usó en las titulaciones potenciométricas para determinar el

$pK_i$  de la mezcla de disolventes y para medir el  $pK_a$  de las bases mencionadas. La pureza y la compañía de adquisición se muestran en la Tabla 2.

#### **4.2 Equipo**

Las mediciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un equipo HP 8453 (con una ventana espectral de 190–1100 nm, una resolución de 1 nm y una precisión en la longitud de onda  $<\pm 0.5$  nm) de arreglo de diodos. Las celdas utilizadas fueron de cuarzo con una longitud de paso de 1 cm y un volumen de 3 mL. Los experimentos por potenciometría se realizaron usando un electrodo de vidrio Orion ROSS™ con un potenciómetro ORION 710A en una celda a temperatura constante (310 K), agitación y flujo de nitrógeno constante. Los experimentos de resonancia magnética nuclear de  $^{31}\text{P}$  se hicieron en un espectrómetro marca Bruker modelo Avance de 400 MHz en el Departamento de Investigación de Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora, en tanto que los experimentos de  $^1\text{H}$  se realizaron en un espectrómetro Varian Gemini de 300 MHz de la Unidad de Apoyo a la Investigación, Facultad de Química, UNAM. El control de la temperatura se logró mediante los baños de agua Fischer Scientific ISOTEMP 1006S, mientras que la medición de la misma se hizo con el termómetro digital QUARTZ digi-termo.

#### **4.3 Programas**

Los ajustes por regresión lineal y no lineal mediante el método de mínimos cuadrados se hicieron en el programa Microcal™ Origin™ versión 5.0 de Microcal Software, Inc. Los valores de  $pK_a$  fueron calculados utilizando el programa Hyperquad 2000 versión 2.1 NT. Los diagramas de distribución de especies fueron generados usando los valores de  $pK_a$  determinados en la mezcla 4:1 DMSO-agua en el programa Hyss Academic Software 1999 K. J. Powell.

#### **4.4 Estudios potenciométricos**

Para la estandarización de las soluciones se hicieron titulaciones potenciométricas, y se graficó el pH contra el volumen de titulante añadido. La primer solución en normalizarse fue ácido perclórico con carbonato de sodio anhidro (para asegurarse de que no contuviera agua, se dejó en la estufa de vacío por 24 horas y después se pasó a un desecador). Se prepararon disoluciones de 25 mL de carbonato de sodio y se valoraron hasta pasar el primer punto de equivalencia el cual fue determinado mediante la derivada de la curva de titulación). Una vez estandarizado el ácido perclórico se normalizaron las soluciones de hidróxido de tetrabutilamonio, piperidina y metilamina.

Para determinar los valores de  $pK_a$  de los pares ácido-base, todas las titulaciones potenciométricas se hicieron en una celda de vidrio de 30 mL a temperatura constante de 37°C con burbujeo continuo de nitrógeno durante todo el experimento para evitar la presencia de  $CO_2$  en la disolución. Se utilizó como electrolito soporte cloruro de tetrabutilamonio para ajustar la fuerza iónica a una concentración 10 mM. La concentración de las bases fue de 5 mM en soluciones con un 80% de DMSO y 20% de agua. El titulante (el ácido perclórico o el hidróxido de tetrabutilamonio) también estaba en disoluciones al 80% de DMSO. Previo a estas titulaciones, se determinó el  $pK_i$  de la mezcla de DMSO-agua 80:20 a 37°C con la valoración de 25 mL de una solución 1 mM de ácido perclórico con una fuerza iónica de 10 mM de cloruro de tetrabutilamonio con hidróxido de tetrabutilamonio, se tomaron al menos 15 puntos antes y después del punto de equivalencia para poder realizar los ajustes.

La obtención de la constante de disociación del agua  $K_i$  en la mezcla DMSO-agua, usada para calibrar el electrodo, se determinó con un ajuste no lineal mediante la ecuación 4 de la gráfica de volumen de base añadido contra el pH [58].

$$V = \frac{V_0(C_A + 10^{(\text{pH}-\text{p}K_i)} - f10^{-\text{pH}})}{C_B + f10^{-\text{pH}} - 10^{(\text{pH}-\text{p}K_i)}} \quad \text{Ec. 4}$$

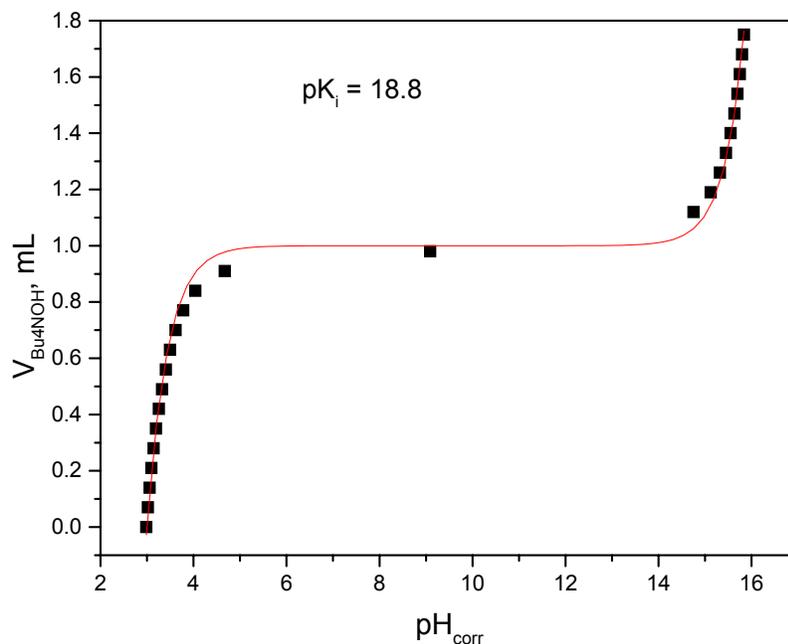
Donde  $V$  es el volumen añadido,  $C_B$  es la concentración de la base añadida,  $V_0$  es el volumen inicial del ácido,  $C_A$  es la concentración del ácido,  $\text{pH}$  es el valor de  $\text{pH}$  medido,  $\text{p}K_i$  es el menos logaritmo del producto iónico del agua en este medio ( $K_i$ ) y  $f$  es un factor de corrección que es una función de los coeficientes de actividad y la diferencia en el potencial de la interfase del electrodo (*potencial de unión*). La ecuación 4 se obtiene de despejar el volumen añadido ( $V$ ) y agrupar términos de la ecuación 5 que es la ecuación para la titulación de un ácido fuerte con una base fuerte.

$$V + \frac{V_0 + V}{C_B} f[\text{H}^+] - \frac{(V_0 + V)K'_i}{[\text{H}^+]C_B} - V_e = 0 \quad \text{Ec. 5}$$

Además de despejar el volumen añadido y reacomodar los términos, se hizo la sustitución de  $[\text{H}^+]$  (que es la concentración de  $\text{H}^+$  “aparente”, es decir, la calculada empleando el valor de  $\text{pH}$  medido directamente y no corregido) por  $10^{-\text{pH}}$ ,  $K'_i$  (que es el producto iónico del agua “aparente” sin considerar los coeficientes de actividad) por  $10^{-\text{p}K'_i}$  y finalmente  $V_e$ , el volumen de equivalencia, que al ser multiplicado por  $C_B$  es equivalente al producto de  $V_0$  y  $C_A$  ( $V_e C_B = V_0 C_A$ )

En las titulaciones hechas la concentración de la base añadida, el volumen inicial, los volúmenes adicionados, la concentración exacta del ácido fuerte a titular y los valores de  $\text{pH}$  para cada adición eran conocidos, por lo que fue posible calcular el valor de  $\text{p}K_i$  y de  $f$ . Una vez obtenidos los valores de  $f$ , se corrigieron los valores de  $\text{pH}$  observados restándoles el logaritmo de  $f$  ( $\text{pH}_{\text{corr}} = \text{pH} - \log f$ ). El valor promedio de  $\text{p}K_i$  de la mezcla DMSO-Agua 80:20 a  $37.0^\circ\text{C}$  fue de  $18.7 \pm 0.1$  que está en acuerdo con los valores informados en literatura para condiciones semejantes (en 80% DMSO por peso a  $25^\circ\text{C}$  es 18.4 [50] y 18.84 en 80% DMSO

por volumen a 30°C [51]). En la Figura 27 se muestra un ejemplo de las gráficas obtenidas y ajustadas por la ecuación 4.



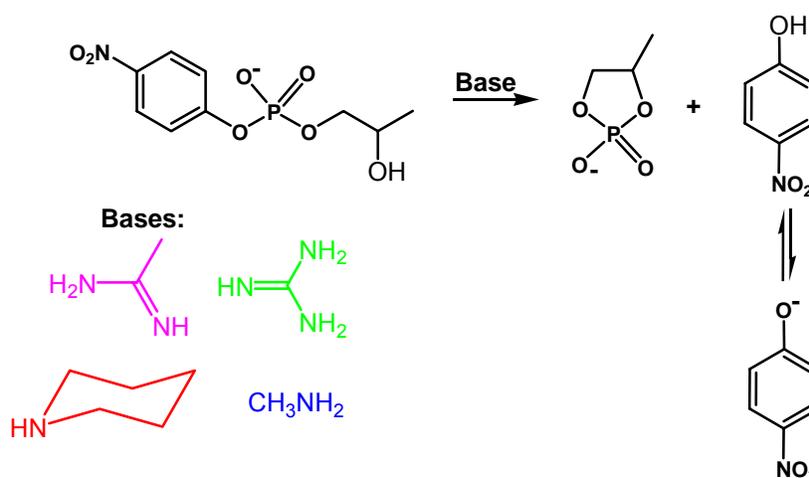
**Figura 27.** Gráfica de volumen de base añadida contra el pH corregido de la titulación de HClO<sub>4</sub> 1 mM con una fuerza iónica 10 mM de Bu<sub>4</sub>NCl en 80% de DMSO a 37°C. La línea es el ajuste teórico realizado con la ecuación 5.

#### 4.5 Estudios cinéticos

Para los estudios cinéticos se utilizaron soluciones madre de las cuales se tomaban alícuotas para tener la concentración deseada en las celdas. Las soluciones de las bases (metilamina, piperidina, guanidina y acetamidina) se prepararon en una mezcla 80:20 DMSO-agua, a menos que se especifique lo contrario, en una concentración 1 M y se almacenó en refrigeración. El tiempo de uso de cada solución preparada no fue mayor de una semana. La disolución de HClO<sub>4</sub> se elaboró sin DMSO y fue la misma que se utilizó en las titulaciones potenciométricas, en tanto que Bu<sub>4</sub>NOH se usó a partir de la disolución

concentrada, previamente estandarizada. La disolución del sustrato HpNPP se hizo sólo con agua y fue de una concentración 1 mM y se usaba por un tiempo máximo de 15 días. Para el experimento del efecto salino, la disolución de cloruro de tetrabutilamonio se hizo en una mezcla de DMSO-agua al 80% del primero, con concentración de 1 M. Todas las mediciones se llevaron a cabo en celdas de cuarzo de 1 cm de longitud de paso. El volumen dentro de las celdas fue de 2.5 mL y la temperatura de todos los experimentos fue de 37°C.

En estos experimentos se monitoreó la formación del producto de la transesterificación intramolecular del HpNPP, el 4-nitrofenol (que se encuentra en equilibrio con su forma desprotonada, el anión de 4-nitrofenolato de color amarillo, Figura 28). Para ello se obtuvo el valor de absortividad molar en las condiciones del experimento ( $\epsilon = 29000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) en la longitud de máxima absorción (en la mezcla al 80% de DMSO agua fue de 420 nm). En las cinéticas se tuvieron condiciones de reacción pseudomonomoleculares, es decir, el sustrato se mantuvo a una concentración mucho menor que la de las bases usadas (de 20 a 70  $\mu\text{M}$ ), para realizar ajustes de primer orden. En general debido a la rapidez de las cinéticas, las constantes de rapidez se obtuvieron mediante dos formas: en las lentas mediante ajustes de las rapidezces iniciales y en las rápidas mediante ajustes no lineales de las curvas obtenidas por el método integral.



**Figura 28.** Esquema de la reacción de transesterificación del 2-hidroxipropil-p-nitrofenil fosfato.

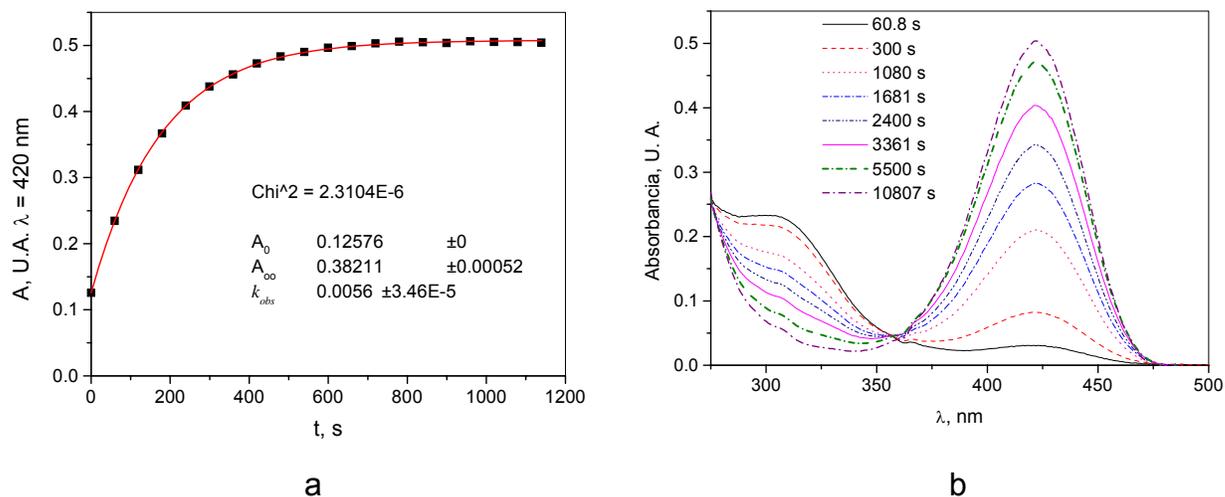
En la Figura 28 se muestran los productos principales de la reacción de transesterificación del HpNPP, el 4-nitrofenol y un fosfato cíclico. El fosfato cíclico es un indicativo de que no se lleva a cabo la ruptura por una sustitución nucleofílica sino una transesterificación intramolecular. Por esta razón se hicieron estudios de resonancia magnética nuclear de fósforo (RMN  $^{31}\text{P}$ ) con el fin de confirmar que en los estudios cinéticos se presenta una transesterificación y no una sustitución nucleofílica por la base. El experimento se hizo del siguiente modo; primero se obtuvo el espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  del HpNPP en DMSO al 80%, con 15% de  $\text{D}_2\text{O}$  sin la presencia de ninguna base, el desplazamiento químico del fósforo en el HpNPP en estas condiciones ( $\delta$ ) fue de  $-6.21$  ppm. Después se añadió a otra muestra guanidinio neutralizado al 90% con hidróxido de tetrabutilamonio, se dejaron pasar dos horas para asegurar que la transesterificación fuera completa, después se tomó su espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  y el desplazamiento del fósforo ahora fue de  $16.32$  ppm, lo que confirmó la formación del fosfato cíclico (en estudios en agua deuterada los desplazamientos del fósforo del HpNPP antes y después de la transesterificación son  $-4.07$  y  $18.60$  ppm), los espectros de RMN  $^{31}\text{P}$  obtenidos también se muestran en el apéndice 1.

En el caso de las cinéticas con guanidina y acetamidina la transesterificación fue completa y bastante rápida, de aquí que las constantes de rapidez observadas se obtuvieron mediante el ajuste no lineal de la ecuación 6, que corresponde a la formación de un producto mediante una cinética de primer orden.

$$A = \Delta A_{\infty} (1 - e^{-k_{obs}t}) + A_0 \quad \text{Ec. 6}$$

Donde  $A$  es la absorbancia en cualquier momento,  $\Delta A_{\infty}$  es la diferencia entre la absorbancia inicial y la infinita,  $A_0$  es la absorbancia al inicio,  $k_{obs}$  es la constante de rapidez observada y  $t$  es el tiempo. En la Figura 29a se muestra un ejemplo de un ajuste con la ecuación 6, para la transesterificación del HpNPP con guanidinio neutralizado al 60% con  $\text{Bu}_4\text{NOH}$ ; mientras que en la 29b se muestra un esquema

del comportamiento de los espectros de UV-vis del HpNPP y el 4-nitrofenol con el tiempo.



**Figura 29.** Ejemplo de: (a) un ajuste con la ecuación 6 para la transesterificación del HpNPP con guanidinio neutralizado al 60%; (b) del seguimiento de los espectros del HpNPP con el tiempo, los números que aparecen en la parte derecha superior son los tiempos a los que fueron tomados los espectros en segundos.

Las reacciones hechas con piperidina y metilamina fueron lentas, por lo que los ajustes se hicieron mediante el método de las rapidezces iniciales y al final de cada cinética se agregaba una alícuota de un estándar de 4-nitrofenolato para calcular la absorbancia final. El ajuste se realizó con la ecuación 7, la rapidez inicial se obtenía de la pendiente de la gráfica de absorbancia del producto contra el tiempo, al añadir el estándar de 4-nitrofenolato se observaba que la concentración máxima de *p*-nitrofenolato coincidía con la concentración inicial de HpNPP.

$$v_0 = \left[ \frac{dA_{NF}}{dt} \right]_{t \rightarrow 0} = k_{obs} \varepsilon_{NF} [HpNPP] = k_{obs} A_{\infty} \quad \text{Ec. 7}$$

Los experimentos cinéticos para conocer la proporción óptima de DMSO-agua se hicieron con guanidinio 50% desprotonado (la base usada para formar el par

amortiguador fue el hidróxido de tetrabutilamonio) en varias proporciones de DMSO-agua haciendo una variación de la concentración total de guanidina de 0.01 M a 0.16 M según las posibilidades de la mezcla.

Además, se llevaron a cabo perfiles con una proporción de neutralización de las bases constante, variando la concentración total de la base de 0.01 a 0.2 M dependiendo de cada base y rapidez. Para complementar este experimento se realizaron perfiles de protonación de cada base a una concentración total de base de 0.1 M. Finalmente se hicieron experimentos de cocatálisis, con la variación de la concentración de guanidinio a una concentración total 0.1 M de las bases.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para cumplir con los objetivos planteados, el trabajo experimental se dividió en varias etapas como se describe brevemente a continuación.

Primero se hizo un estudio del efecto de la composición en la mezcla DMSO-agua con un solo catalizador (guanidinio) y aplicando el siguiente criterio para encontrar el óptimo de actividad catalítica: el sistema óptimo debe contener una cantidad de agua máxima posible que aún permita una alta eficiencia de la catálisis (es decir, la velocidad de la reacción catalítica debe ser dominante comparándola con la de la reacción espontánea) en el intervalo de concentraciones del catalizador suficientemente bajas del orden de 0.01 a 0.2 M. La necesidad de este estudio se debe a que la eficiencia de la catálisis del tipo ácido-base es mayor en medios no acuosos, sin embargo, la caracterización cuantitativa de las propiedades ácido base en medios no acuosos es extremadamente difícil y además, estos medios favorecen la agregación de especies iónicas y esto puede llegar a complicar mucho el comportamiento cinético observado

Después fueron determinados los valores de  $pK_a$  de las formas ácidas de las bases empleadas como catalizadores en el medio óptimo de la reacción, indispensables para poder correlacionar las constantes de rapidez de procesos catalíticos con la fuerza de las bases. También fue necesario estudiar la cinética de la hidrólisis alcalina del HpNPP en el medio escogido para poder corregir las constantes de rapidez de la catálisis con los sistemas amortiguadores, por la contribución de este proceso en disoluciones más básicas.

Las tres etapas anteriores constituyen la parte preliminar del trabajo. La parte principal es el estudio de la cinética de transesterificación del HpNPP en la mezcla de disolventes óptima en un amplio intervalo de concentraciones de los diferentes pares de ácidos y bases conjugados para poder proponer la ley de rapidez y

determinar las constantes de rapidez de diferentes rutas catalíticas (a priori se esperarían contribuciones de catálisis ácido general, básico general y bifuncional). Además, se hicieron perfiles de rapidez de la reacción contra el grado de neutralización del catalizador para ver las proporciones de formas ácida y básica del catalizador en los cuales existía una mayor actividad catalítica. En la etapa final del trabajo se buscó la correlación de las constantes de rapidez con valores de  $pK_a$  en términos de la relación de Brønsted y así poder llegar a algunas conclusiones respecto del mecanismo de catálisis.

### **5.1 Efecto de la variación de la proporción de DMSO: agua sobre la rapidez de la transesterificación de HPNPP en presencia del amortiguador**

Este experimento se realizó con el fin de determinar la composición de la mezcla de disolventes en la que se observan las mayores constantes de rapidez y el efecto de catálisis con los componentes del amortiguador; de ahí que se eligieron sólo las mezclas de 70, 80 y 90% de DMSO con respecto a su mezcla con el agua, porque entre mayor sea la proporción de agua la contribución de la catálisis básica será más grande. Todas las mediciones cinéticas se hicieron a 37 °C ya que por debajo de los 30 °C el DMSO es demasiado viscoso y esto baja la reproducibilidad de los experimentos; además por ser la temperatura corporal. El amortiguador que se usó fue el sistema guanidina/guanidinio en proporción 1:1, en el intervalo de concentraciones de 0.02 M a 0.2 M dependiendo de la composición de la mezcla de disolventes.

Las constantes de rapidez obtenidas mediante los ajustes a las curvas a distintas proporciones de dimetil sulfóxido-agua al variar la concentración del amortiguador, se muestran en la Tabla 3, en donde los porcentajes indican las proporciones de DMSO y agua en las mezclas. Debido a que las soluciones madres de los reactivos que se usaron fueron acuosas, la concentración máxima a la que se llegó dependió del contenido de agua. Debido a que el contenido de agua fue

diferente en los tres experimentos, no se tienen los mismos valores de concentración en los tres experimentos para la mayoría de los casos.

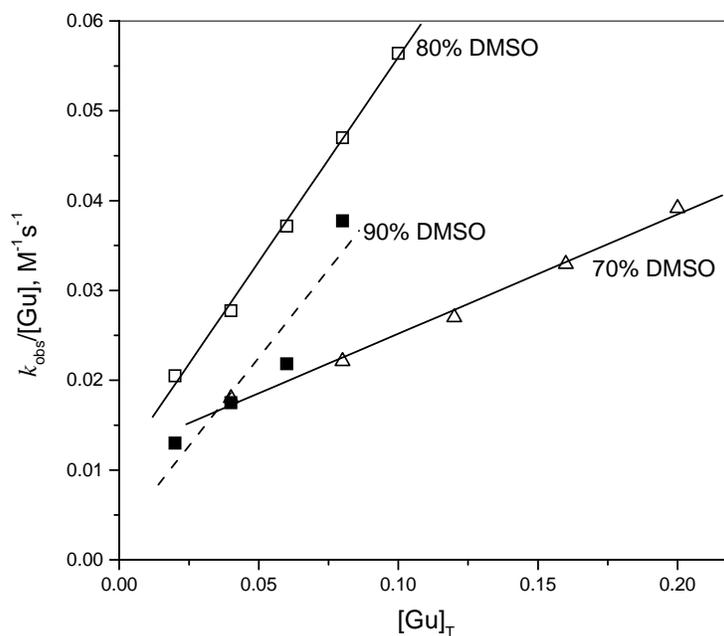
**Tabla 3.** Variación de las constantes de rapidez con la concentración a diferentes proporciones de DMSO a 37°C.

[Gu] <sub>T</sub> , M	70%	80%	90%
	$k_{obs} \times 10^3, s^{-1}$		
<b>0.02</b>	<i>N.D.</i>	0.42	0.26
<b>0.04</b>	0.72	1.12	0.7
<b>0.06</b>	<i>N.D.</i>	2.23	1.31
<b>0.08</b>	1.77	3.76	3.02
<b>0.10</b>	<i>N.D.</i>	5.64	<i>N.D.</i>
<b>0.12</b>	3.24	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
<b>0.16</b>	5.27	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
<b>0.20</b>	7.83	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>

*N.D.*: No determinado. El porcentaje de error promedio en las constantes fue del 0.2%

Al comparar los medios para ver en cual es en el que se tienen los mayores valores de constantes de rapidez. Sí observamos la Tabla 3 podremos notar que el mejor medio resultó ser el de 80% de dimetil sulfóxido. Cuando se graficó la constante observada contra la concentración total de base se observó que existía una dependencia que involucra contribuciones tanto cuadrática como lineal, por lo que se hizo otro gráfico del perfil de la variación de  $k_{obs}/[Gu]$  con la concentración total de la base, que se muestra en la Figura 30 (la justificación del uso de esta forma de tratamiento de los resultados se presentará en los siguientes capítulos). En la Figura 30 podemos observar la contribución lineal ( $k_1$ ) a partir de la intersección con la ordenada y el valor de  $k_2$  con la pendiente, los valores de los parámetros se exponen en la Tabla 4. Los valores de  $k_1$  y  $k_2$  nos indican que conforme disminuye la cantidad de agua del medio, comienza a aumentar el valor de la contribución lineal ( $k_1$ ), y es mucho mayor en 70% de DMSO y es

básicamente casi despreciable dentro de los límites del error en 90% de DMSO. Lo anterior es una prueba de que a mayor contenido de agua en el sistema, la dependencia de la constante observada será prácticamente lineal, aunque es importante señalar que la disminución de esta contribución no es muy grande de 70 a 80%, pero si de 80 a 90%. Por otro lado, si analizamos los valores de  $k_2$  notaremos que tenemos un valor máximo cuando el contenido de dimetil sulfóxido es del 80% y en 90% se vuelve prácticamente la única contribución a la constante. Esto confirma el hecho que a mayor contenido de DMSO es mayor la contribución cuadrática en la constante, sin embargo en nuestro sistema pasa por un máximo a 80% de DMSO, lo que resulta ser muy adecuado para este estudio por la dificultad de hacer mediciones arriba de este porcentaje de DMSO.



**Figura 30.** Perfil de la variación de  $k_2$ , con la variación de la concentración total del amortiguador en una mezcla con 80% de DMSO a 37°C.

**Tabla 4.** Valores de las contribuciones lineal y cuadrática en la constante observada en los distintos porcentajes de DMSO.

<b>% DMSO</b>	<b><math>k_1, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}</math></b>	<b><math>k_2, \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}</math></b>
<b>70</b>	$0.012 \pm 8.6 \times 10^{-4}$	$0.133 \pm 0.006$
<b>80</b>	$0.011 \pm 0.001$	$0.455 \pm 0.015$
<b>90</b>	$0.003 \pm 0.0054$	$0.393 \pm 0.099$

La dependencia cuadrática de la constante se puede deber a que es de segundo orden con respecto a una especie o existe la presencia de dos especies que están participando en el mecanismo de la reacción de la transesterificación. Lo anterior se determinará en los experimentos posteriores. Con los resultados expuestos, se tomó la decisión de realizar todos los estudios cinéticos de la transesterificación del HpNPP con una solución al 80% de dimetil sulfóxido acuoso, para obtener los mayores valores posibles de rapidez.

## **5.2 Determinación de los valores de $pK_a$ de los pares ácido-bases utilizados en DMSO acuoso**

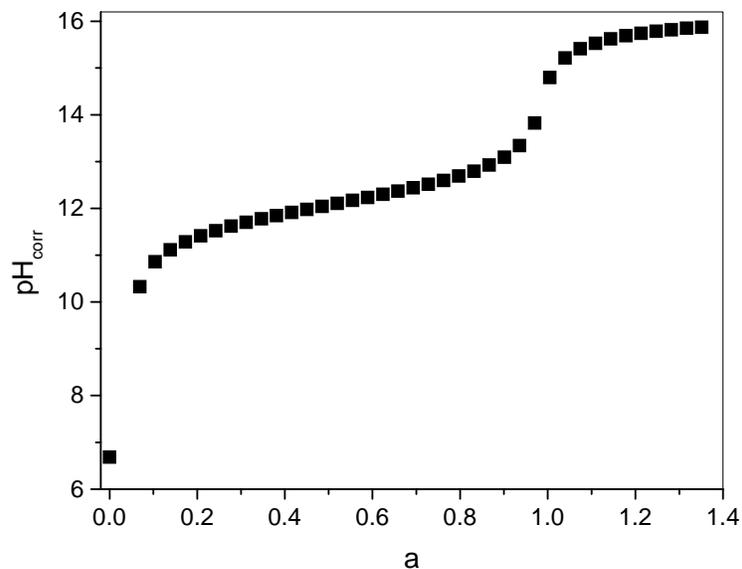
Como el presente trabajo se realizó a temperatura constante y de 37°C en un medio con una relación 4:1 DMSO-agua los valores de  $pK_a$  determinados en agua no pueden utilizarse directamente, ya que dependen de la temperatura y del medio usado [51 y 52]. Con base en lo anterior se decidió medirlas a partir de titulaciones potenciométricas en estas condiciones. Se utilizó cloruro de tetrabutilamonio como electrolito de soporte, para facilitar las mediciones de pH del electrodo en este medio, con bajo contenido de agua.

Antes de hacer la medición del  $pK_a$  se determinó la constante de ionización de la mezcla de disolventes en estas condiciones, que fue de  $18.7 \pm 0.1$ , y un factor para poder corregir las mediciones de pH del electrodo (ver Parte Experimental). La

concentración de las soluciones de las bases fue 5 mM y la del cloruro de tetrabutil amonio en las mismas soluciones de 10 mM.

Las titulaciones se realizaron agregando alícuotas de soluciones, en 80% de DMSO, de hidróxido de tetrabutilamonio (en el caso de cloruro de guanidinio y acetamidinio) o ácido perclórico (para piperidina y metilamina). Cada vez que se añadía una alícuota se anotaba el valor de pH medido por el potenciómetro. En la Figura 31 se muestra la curva de valoración del cloruro de acetamidinio obtenida mediante el procedimiento descrito anteriormente.

Una vez hechas todas las valoraciones potenciométricas (para cada base se hizo por duplicado) se analizaron las curvas obtenidas con el programa Hyperquad 2003 para obtener los valores de  $pK_a$ . Los valores promedio obtenido para los valores de  $pK_a$  de las formas protonadas de las bases se muestran en la Tabla 5, donde también se hace una comparación con los valores informados en agua.



**Figura 31.** Curva de titulación de cloruro de acetamidinio 5 mM con hidróxido de tetrabutil amonio a 37°C en 80% de dimetilsulfóxido,  $I = 10$  mM de cloruro de tetrabutilamonio. En la gráfica, “a” representa la relación de moles añadidos de  $Bu_4NOH$  por cada mol de acetamidinio.

**Tabla 5.** Valores de  $pK_a$  para los pares de bases usados en 80% de DMSO acuoso a 37°C.

Base	$pK_a$ en 80% de DMSO a 37°C	$pK_a$ en agua a 25°C*
<b>Guanidina</b>	13.80±0.012	13.7
<b>Acetamidina</b>	12.10±0.010	12.4
<b>Piperidina</b>	9.90±0.011	11.1
<b>Metilamina</b>	10.06±0.025	10.7

\*[53]

Como podemos observar en el caso de guanidina y acetamidina los valores obtenidos de  $pK_a$  son muy similares a los informados en agua, lo cual puede deberse a que las energías libres de transferencia de protón y de forma protonada del amortiguador entre el agua y el DMSO se compensan una a otra y la energía libre de transferencia de la forma neutra no es significativa. Por otro lado, si comparamos el  $pK_a$  de la forma protonada de metilamina y piperidina, estos presentan una variación con respecto a los valores en agua. El valor que más varía es el de piperidina, esto lo podemos adjudicar de manera cualitativa al hecho de que la piperidina es más hidrofóbica que la metilamina por su estructura química y como el DMSO ( $\epsilon_{293}$ = 47.24, [53]) es un disolvente menos polar que el agua estabiliza a la especie neutra por encima de la especie catiónica, lo que propicia que se vuelva ligeramente más ácida en este medio que en agua ( $\epsilon_{293}$ = 80.1, [53]). Cabe mencionar que la variación es de sólo una unidad aproximadamente, lo que implica que la estabilización de la especie neutra en DMSO tampoco es muy alta.

La metilamina al tener sólo un grupo metilo como sustituyente, ocasiona que la variación en el  $pK_a$  sea muy pequeña ya que la diferencia de las energías libres de transferencia entre el agua pura y la mezcla usada es pequeña. Es importante señalar que los valores obtenidos (sin tanta variación en los valores de  $pK_a$ ) son muy similares para las aminas en DMSO, ya que estos compuestos no presentan

variaciones tan notables en DMSO puro como el caso de los alcoholes y ácidos carboxílicos, entre otros [52].

En el apéndice 2 se muestran las curvas de titulación de cada una de las bases que no se muestran en este apartado, además de presentarse un ajuste por cada una de las bases mediante el programa hyperquad 2003. Finalmente, también se muestran los diagramas de distribución relativa de cada una de las bases con los valores de  $pK_a$  obtenidos en las mediciones potenciométricas.

### **5.3 Estudios de transesterificación con el hidróxido de tetrabutilamonio**

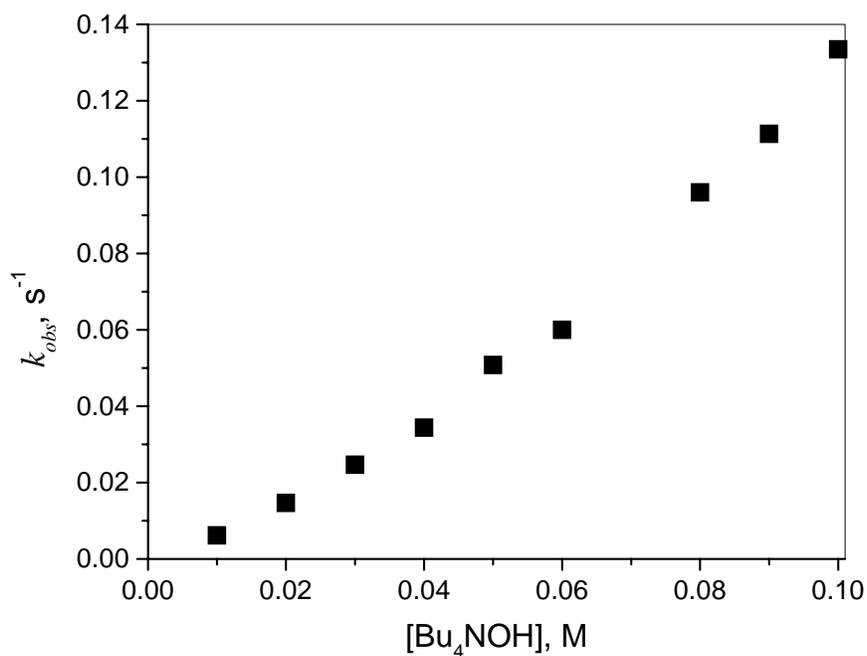
Antes de iniciar con los estudios cinéticos de los diferentes sistemas amortiguadores, se realizó un perfil de la dependencia de las constantes de rapidez con la concentración del hidróxido de tetrabutilamonio para confirmar o descartar una contribución de la catálisis básica específica en esos sistemas.

En este caso las reacciones de la transesterificación del sustrato tuvieron constantes de rapidez del orden de  $0.005$  a  $0.2 \text{ s}^{-1}$ , por lo que el cálculo de las constantes se hizo mediante el método integral. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6 mientras que la gráfica se presenta en la Figura 32. Como podemos observar la variación de la constante de rapidez observada con la concentración de la base muestra una dependencia no lineal con una desviación al orden de reacción mayor de uno, lo que es inesperado por que implica que la transesterificación alcalina del HpNPP puede incluir la reacción con dos iones de hidróxido en una etapa elemental. Una posible explicación de este comportamiento es la presencia de un efecto salino ya que el experimento se realizó en condiciones de fuerza iónica creciente. Para comprobar esto, se hicieron estudios con la variación la fuerza iónica para así conocer si en realidad el efecto de curvatura se debe solamente a un efecto causado por la fuerza iónica (*vide infra*).

**Tabla 6.** Dependencia de las constantes de rapidez con la concentración del hidróxido de tetrabutilamonio.

$[\text{Bu}_4\text{NOH}]_T, \text{ M}$	$k_{obs} \times 10^3, \text{ s}^{-1}$
0.01	6.17
0.02	14.68
0.03	24.65
0.04	34.39
0.05	50.8
0.06	60.01
0.08	96.02
0.09	111.35
0.1	133.46

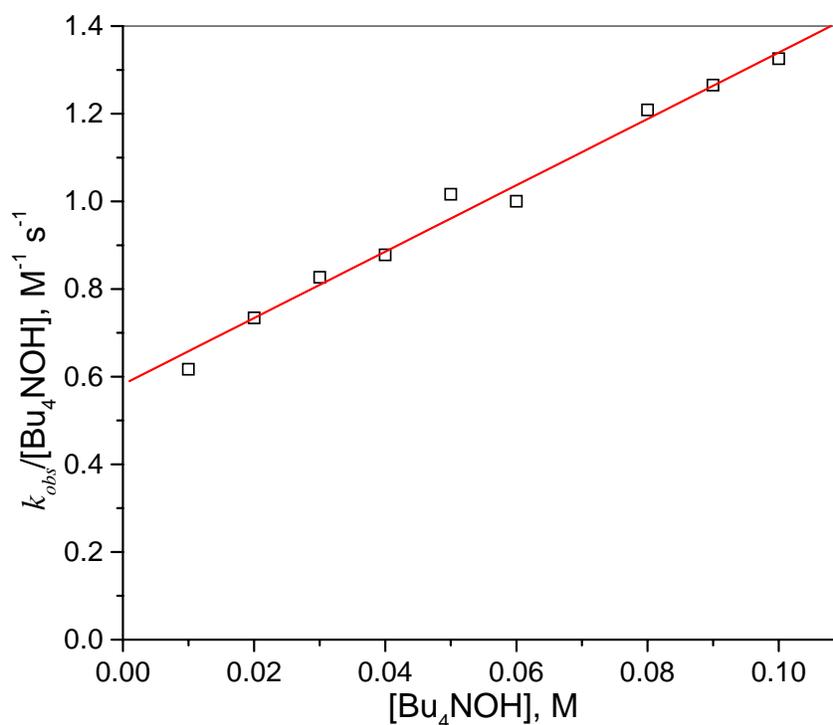
El porcentaje de error promedio en las constantes fue del 0.10%



**Figura 32.** Dependencia de las constantes de rapidez con la concentración del hidróxido de tetrabutilamonio.

Para obtener el valor de la constante de rapidez de la catálisis alcalina a dilución infinita; es decir, libre de cualquier influencia de exceso del reactivo, independientemente de su naturaleza se convirtieron las constantes observadas en constantes aparentes de segundo orden y se graficaron con respecto a la concentración de la base para poder extrapolar el valor de la constante de segundo orden bajo condiciones de dilución infinita del hidróxido.

En la Figura 33 podemos ver la gráfica obtenida después del tratamiento de los datos y la línea de ajuste con la cual se obtuvo la constante de rapidez a partir de la pendiente,  $k_{OH} = 0.58 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , que es razonable respecto a lo informado en agua a  $25^\circ\text{C}$  ( $k_{OH} = 0.1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), [50].



**Figura 33.** Datos de la  $k_{obs}$  convertidos en una constante aparente de segundo orden para obtener el valor de la constante de la catálisis alcalina espontánea.

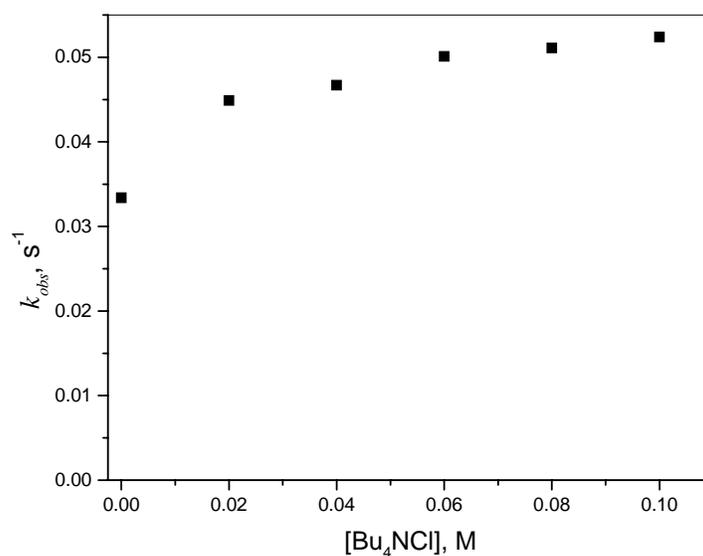
Una vez obtenido el valor de la constante de rapidez de la catálisis básica espontánea se hicieron experimentos del efecto salino sobre ésta para encontrar

la explicación a la curvatura del perfil de concentración. Las mediciones cinéticas se hicieron con una variación en la concentración del cloruro de tetrabutilamonio desde 0 a 0.10 M, manteniendo la concentración de hidróxido de tetrabutilamonio constante (e igual a 0.04 M), la temperatura, la proporción de la mezcla de disolventes y concentración del HpNPP fueron las mismas que en los experimentos anteriores. Los valores obtenidos para las constantes de rapidez al cambiar la concentración de la sal (y por lo tanto la fuerza iónica) se muestran en la Tabla 7 y la gráfica de la variación de las constantes de rapidez con la fuerza iónica en la Figura 34. En la gráfica podemos ver cómo al comenzar a aumentar la concentración de la sal comienzan a incrementarse los valores de las constantes de rapidez, lo que nos indica la existencia de un efecto salino en la reacción.

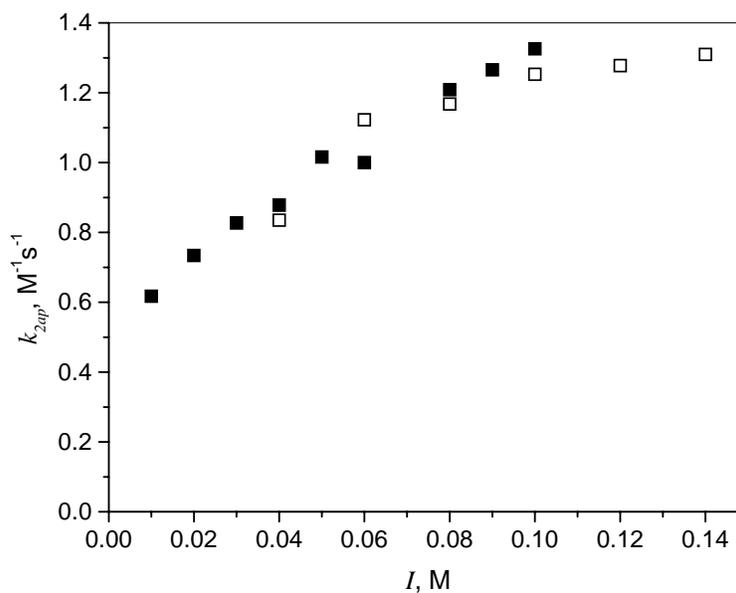
**Tabla 7.** Dependencia de las constantes de rapidez con la concentración de cloruro de tetrabutilamonio, la concentración del hidróxido de tetrabutilamonio fue de 0.04 M.

$[\text{Bu}_4\text{NCl}]_{\text{T}}, \text{ M}$	$k_{\text{obs}} \times 10^3, \text{ s}^{-1}$
0	33.4
0.02	44.9
0.04	46.7
0.06	50.1
0.08	51.1
0.1	52.4

El promedio del porcentaje de error en las constantes fue del 0.10%



**Figura 34.** Efecto salino en la catálisis básica específica con hidróxido de tetrabutilamonio 0.04 M.



**Figura 35.** Variación de las constantes aparentes de segundo orden con la fuerza iónica. Los cuadros sólidos representan a los puntos del experimento con la variación de la fuerza iónica con una concentración de Bu<sub>4</sub>NOH constante en tanto que los sólidos representan a los puntos de la variación de la concentración de Bu<sub>4</sub>NOH sin control de la fuerza iónica.

Para comprobar que la desviación positiva de la linealidad en la gráfica de la Figura 32 se debe al mismo efecto salino (datos de ambas series de experimentos, Tablas 6 y 7), se graficó la dependencia de la constante de rapidez del segundo orden contra la fuerza iónica calculada como la suma de concentraciones de  $\text{Bu}_4\text{NOH}$  y  $\text{Bu}_4\text{NCl}$ , Figura 35. Al examinar la Figura 35, vemos como las constantes de rapidez obtenidas en presencia del hidróxido de tetrabutilamonio (cuadros negros) siguen el mismo comportamiento que las del experimento del efecto salino (cuadros blancos). De este modo se obtiene la explicación de la curvatura en el perfil de concentración, el cual es un simple efecto de la fuerza iónica sobre las constantes de rapidez.

La explicación dada anteriormente es bastante lógica, ya que en la reacción participan dos especies cargadas negativamente, el sustrato HPNPP e hidróxido, que con base en la ecuación de Debye-Hückel predice que las constantes de rapidez aumentarán al incrementar la fuerza iónica, ya que el producto de las cargas  $Z_A Z_B$  es positivo.

#### **5.4 Estudios de la cinética de transesterificación del HPNPP con el sistema amortiguador guanidina-guanidinio**

Mediante los experimentos previos de la variación de la proporción de dimetilsulfóxido en la mezcla de disolventes se eligió la que contiene el 20% de agua, ya que en esta mezcla de disolventes se observaron las constantes de rapidez para la transesterificación del HpNPP más altas (*vide supra*). Las condiciones en todos los experimentos de esta sección con guanidina son de pseudomonomolecularidad, ya que se mantiene constante y en pequeñas concentraciones al sustrato HpNPP (20  $\mu\text{M}$ ). El hidróxido de tetrabutilamonio se utilizó como base para formar el sistema amortiguador con el guanidinio.

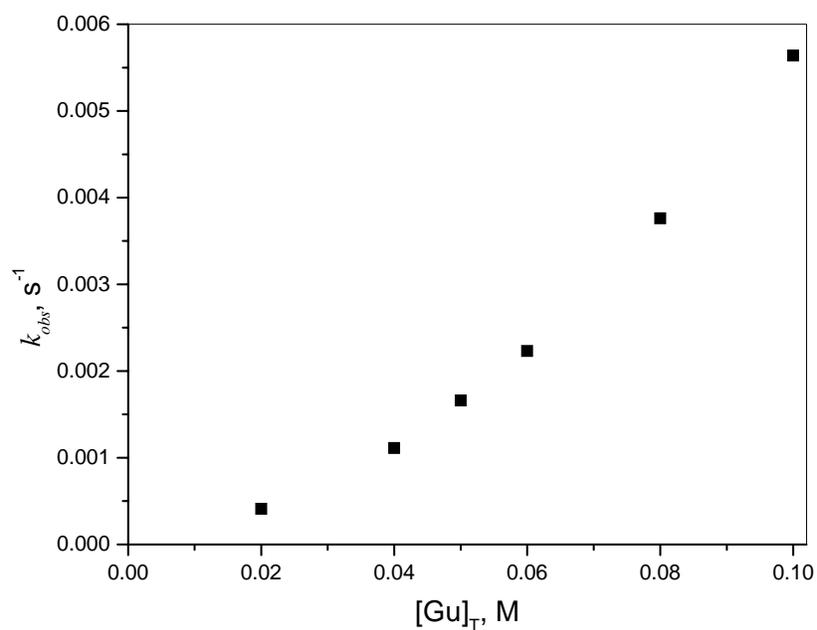
Una vez establecidas las condiciones de reacción, primero se hicieron los estudios cinéticos para observar el efecto que se presenta al variar la concentración total del sistema amortiguador de guanidina/guanidinio en diferentes grados de desprotonación; es decir, se hicieron los perfiles de variación de la constante de rapidez observada para la transesterificación del HpNPP cuando se varía la concentración total del amortiguador en una proporción  $[\text{Gu}/\text{HGu}^+]$  constante. Los grados de desprotonación del guanidinio en los que se realizaron los perfiles fueron de 20%, 50% y 73%. La concentración total del amortiguador varió de 0.02 M a 0.10 M. Los valores de las constantes de rapidez se calcularon mediante un ajuste no lineal con la ayuda de la ecuación 6 que se muestra en la sección de metodología, dado que el sistema catalítico hidroliza el enlace fosfodiéster del HpNPP en menos de dos horas lo que permite el uso de la ecuación integral.

Los valores obtenidos para las constantes de rapidez en los diferentes perfiles de concentración del amortiguador en diferentes grados de protonación se pueden analizar en la Tabla 8. Por otro lado, las gráficas de dichos perfiles se presentan en las Figuras 36, 37 y 38.

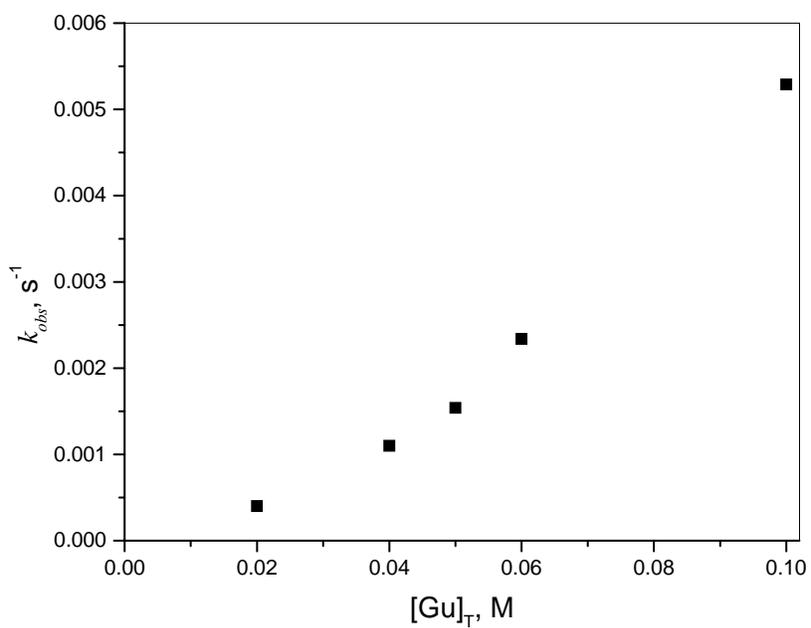
**Tabla 8.** Variación de las constantes de rapidez con la concentración del amortiguador total a diferentes grados de protonación a 37°C en DMSO: agua 4:1.

[Gu] <sub>T</sub> , M	Porcentaje de base libre		
	20%	50%	73%
	$k_{obs} \times 10^3, \text{s}^{-1}$		
0.02	0.23	0.42	0.4
0.04	0.51	1.12	1.1
0.05	0.78	1.66	1.54
0.06	1.13	2.23	2.34
0.08	2	3.76	N.D.
0.10	4	5.64	5.29

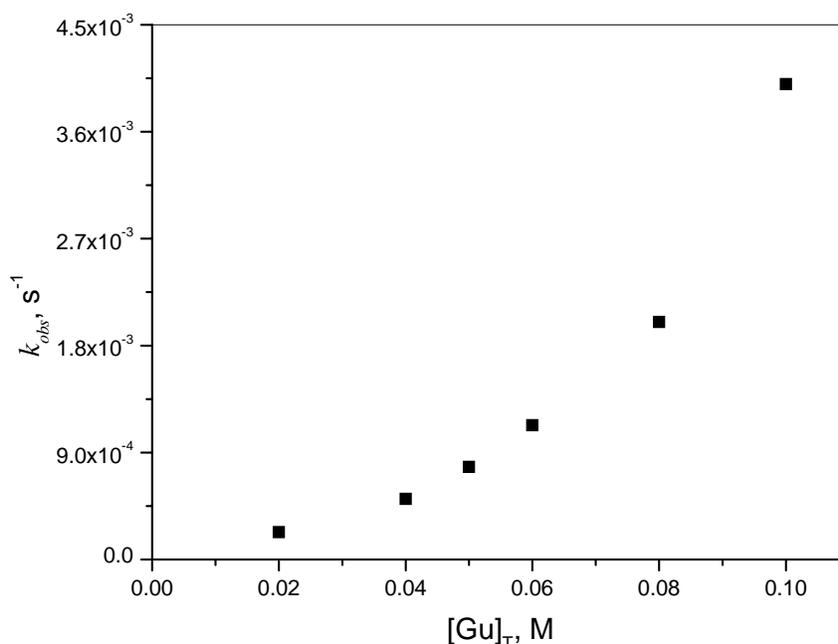
N.D.: No determinado. Los promedios del porcentaje de error en las constantes para 20, 50 y 73% de base libre fueron 0.63%, 0.39% y 0.75% respectivamente.



**Figura 36.** Dependencia de la constante de rapidez con respecto a la concentración total de guanidinio neutralizado al 50%.



**Figura 37.** Variación de la constante de rapidez de la transesterificación del HpNPP con la concentración total de guanidinio neutralizado al 73%.



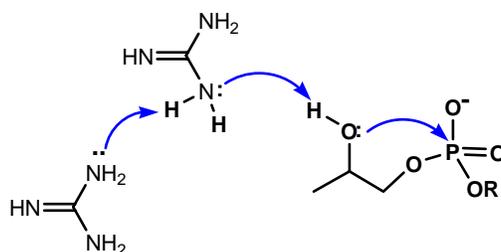
**Figura 38.** Efecto de la concentración total de guanidinio (20% neutralizado), sobre la transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO:H<sub>2</sub>O 4:1.

Los resultados obtenidos en este sistema presentan un efecto muy alto de catálisis sobre la transesterificación del HPNPP nunca informado anteriormente con catalizadores orgánicos. Para una estimación del efecto catalítico vamos a utilizar los resultados obtenidos en la mezcla de guanidino/guanidinio 1:1. El valor de pH en esta mezcla es igual al  $pK_a$  del guanidinio es decir 13.8 (ver Tabla 5). Con el valor de  $pK_i = 18.7$  esto significa que la concentración del OH<sup>-</sup> libre en estas condiciones es igual a  $[OH^-] = 10^{-4.9} = 1.2 \times 10^{-5}$  M. Así la constante de rapidez de la reacción espontánea al mismo pH es igual a  $k_{obs} = k_{OH}[OH^-] = 7.3 \times 10^{-6}$  s<sup>-1</sup>. Como podemos ver de la Tabla 6 en presencia de 0.1 M guanidino/guanidinio 1:1  $k_{obs} = 5.64 \times 10^{-3}$  s<sup>-1</sup> que corresponde a un efecto catalítico de aproximadamente 10<sup>3</sup> veces. Un efecto tan grande simplifica mucho el análisis de los resultados cinéticos. Primero, no es necesario corregir la velocidad observada en presencia del catalizador por la velocidad de la reacción espontánea. Segundo, este efecto se observa a una concentración relativamente baja del catalizador, que no afecta

de manera significativa las propiedades del medio; lo que representa la eliminación de un problema grave en análisis de los datos obtenidos en medio acuosos (ver referencias 10 y 23).

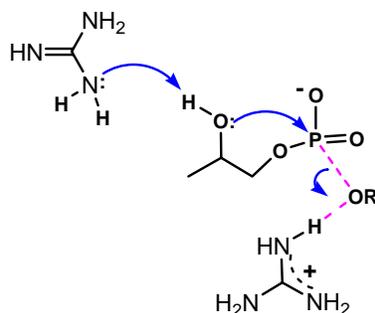
De las gráficas de los perfiles podemos ver que el comportamiento no es lineal sino que tiene una alta contribución cuadrática en los tres casos. Esto refleja la participación de dos especies del amortiguador en la transesterificación catalítica del sustrato. De acuerdo con los mecanismos generales conocidos para la catálisis con amortiguadores [54] podemos plantear tres posibles mecanismos, los cuales se presentan a continuación:

1. Catálisis básica general asistida con una segunda especie básica; en este mecanismo una base actúa desprotonando al grupo 2-hidroxilo del sustrato, el cuál ataca posteriormente al fósforo; mientras otra base lo asiste como se puede ver en la siguiente Figura, y de este modo se presenta una cinética de segundo orden.



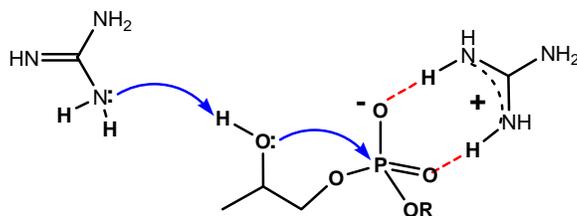
**Figura 39.** Catálisis básica general asistida.

2.1 Catálisis bifuncional con la donación de un protón al oxígeno del grupo saliente: este mecanismo consiste en el ataque de la base al hidrógeno del grupo 2-hidroxilo, el cual atacará al fósforo del fosfato, ayudado por una mayor activación del sustrato mediante la donación de un protón de la especie ácida del amortiguador al grupo saliente. El esquema de este ataque se muestra en la Figura 40.



**Figura 40.** Mecanismo de la catálisis bifuncional asistida con la activación del grupo saliente.

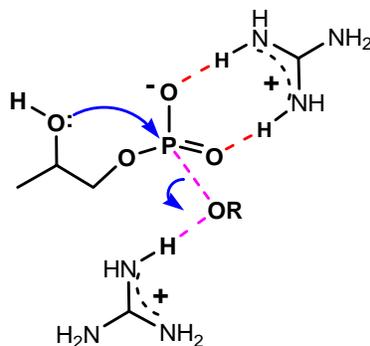
2.2 Catálisis bifuncional con asistencia electrofílica por parte del guanidinio al grupo fosfato: de igual modo que en los mecanismos anteriores la catálisis se da mediante el ataque de la guanidina al grupo 2-hidroxi desprotonándolo y de manera concertada este ataca al fósforo del grupo fosfato que está activado por la interacción electrostática con el guanidinio.



**Figura 41.** Esquema del mecanismo de la catálisis bifuncional con asistencia electrofílica.

Para los datos obtenidos con guanidina, esta opción se ve más probable ya que tenemos un grupo saliente, el nitrofenolato, de baja basicidad que posiblemente no necesita la protonación en el estado de transición para salir.

3. Catálisis ácida general con asistencia de una segunda especie ácida: en este caso se tiene un caso específico de la catálisis ácida general, en donde una especie dona un protón al grupo saliente del sustrato mientras la otra estabiliza el fosfato con carga negativa haciendo más fácil la salida del grupo saliente. El esquema que representa esto se muestra a continuación:



**Figura 42.** Esquema del mecanismo ácido general con la asistencia de una segunda especie ácida.

Es importante señalar que en este tipo de sistemas se observó por primera vez la cinética de segundo orden respecto a la concentración del amortiguador, la cual es la que se lleva a cabo en el mecanismo bifuncional establecido para RNAsa A. Además, es probable que esta contribución cuadrática de verdad corresponde al mecanismo polifuncional ya que cuando tenemos una relación  $[Gu]:[HGu^+]$  1:1 las constantes de rapidez observadas son más altas que en las otras relaciones. Lo cual es esperado si consideramos un mecanismo donde participan ambas especies, para esto consideremos el siguiente interludio matemático:

*Si consideramos que la ley de rapidez para este proceso es:*

$$v = k[S][B][HB^+] \quad \text{Ec. 8}$$

*y en las condiciones de pseudomonomolecularidad, tenemos que*

$$k_{obs} = k[B][HB^+] \quad \text{Ec. 9}$$

*si se sustituye 9 en 8 nos da*

$$v = k_{obs}[S] \quad \text{Ec. 10}$$

*luego si la concentración total del amortiguador es constante,*

$$C_T = [B] + [HB^+] \quad \text{Ec. 11}$$

*al despejar  $[HB^+]$  de la ecuación anterior nos queda*

$$[HB^+] = C_T - [B] \quad \text{Ec. 12}$$

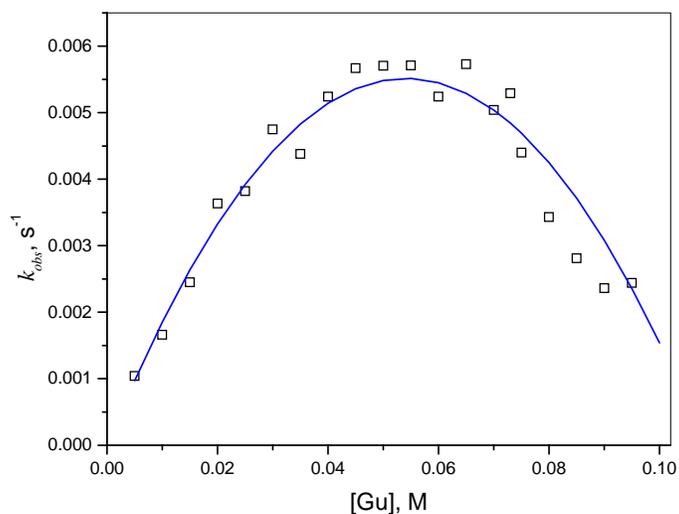
*si sustituimos la ecuación 12 en 9, obtenemos*

$$k_{obs} = k[B](C_T - [B]); k_{obs} = k[B]C_T - k[B]^2 \quad \text{Ec. 13}$$

ahora, si derivamos la ecuación 13 con respecto a  $[B]$  y se iguala a cero para obtener el valor donde la función tenga un máximo, se obtiene lo siguiente:

$$\frac{dk_{obs}}{d[B]} = k C_T - 2k[B] = 0 \quad \Rightarrow \quad C_T = 2[B] \quad \therefore [B] = \frac{C_T}{2}$$

Del interludio matemático anterior podemos ver que cuando se hace una gráfica de la  $k_{obs}$  en función de  $[B]$ , el máximo en un mecanismo de segundo orden en donde participan ambas especies de un amortiguador debe ser en la relación 1:1 de estos, es decir cuando  $[B] = [HB^+]$ . Con base en lo anterior, para confirmar que la reacción se lleva a cabo con un mecanismo bifuncional se realizó un perfil de la variación de las constantes de rapidez con respecto a la proporción de desprotonación del guanidinio con la concentración total de guanidinio fija de 0.1 M. Las concentraciones del hidróxido de tetrabutilamonio en la celda variaron de 0.005 a 0.095 M. En la Figura 43 se encuentra la gráfica obtenida para el perfil de variación de la constante de rapidez respecto a la desprotonación de guanidinio y en la Tabla 9 los valores de las constantes observadas.



**Figura 43.** Perfil de la variación de las constantes de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio en la transesterificación del HpNPP a 37°C en 80% DMSO acuoso. Los cuadros representan los valores promedio de los puntos experimentales, mientras la línea es el ajuste calculado.

**Tabla 9.** Variación de las constantes de rapidez con el porcentaje de desprotonación del guanidinio a 37°C en DMSO: agua 4:1.

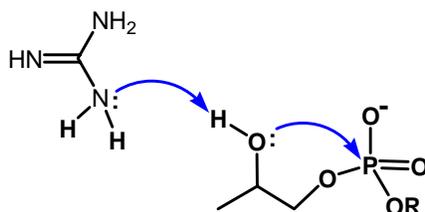
<b>[Gu]<sub>libre</sub>, M</b>	<b><math>k_{obs} \times 10^3, s^{-1}</math></b>	<b>[Gu]<sub>libre</sub>, M</b>	<b><math>k_{obs} \times 10^3, s^{-1}</math></b>
<b>0.005</b>	1.04	<b>0.055</b>	5.71
<b>0.01</b>	1.66	<b>0.06</b>	5.24
<b>0.015</b>	2.45	<b>0.065</b>	5.73
<b>0.02</b>	3.64	<b>0.07</b>	5.04
<b>0.025</b>	3.82	<b>0.073</b>	5.29
<b>0.03</b>	4.75	<b>0.075</b>	4.4
<b>0.035</b>	4.38	<b>0.08</b>	3.43
<b>0.04</b>	5.24	<b>0.085</b>	2.81
<b>0.045</b>	5.67	<b>0.09</b>	2.36
<b>0.05</b>	5.71	<b>0.095</b>	2.44

El porcentaje de error promedio en los valores de las constantes fue del 1%.

El perfil que se obtuvo, como se puede observar en la Figura 43, tiene la forma de campana con un máximo entre 0.5 y 0.6 que confirma que en el mecanismo participan ambas formas del amortiguador (la especie protonada y la desprotonada). En los perfiles en forma de campana ha existido mucha controversia en algunos trabajos, como los de Breslow [15-20]. La crítica ha sido principalmente en dos sentidos, el primero es el efecto del codisolvente debido a que todos los experimentos se realizan en agua, y se puede observar este efecto por utilizar amortiguadores orgánicos a muy altas concentraciones hasta 2-3 M que afectan la constante dieléctrica del agua; el segundo es el efecto de la fuerza iónica, que ocasionó en algunos de los casos ya informados que la forma de campana desapareciera al mantener constante la fuerza iónica. En nuestro caso, debido a que realizamos los experimentos cinéticos en concentraciones del amortiguador menores de 0.1 M, que corresponden a menos del 1% de la cantidad del amortiguador en masa, el efecto del codisolvente puede considerarse despreciable al afectarse muy poco la constante dieléctrica. Otro aspecto que también resulta importante es la fuerza iónica, para esto se realizaron mediciones

cinéticas con variación de la fuerza iónica. Estos estudios se analizan más adelante (*vide infra*), pero como se verá la fuerza iónica no juega un papel importante.

Es importante mencionar que en nuestro caso, el perfil en forma de campana obtenido no es simétrico, ya que en la zona de mayor desprotonación los valores de las constantes de rapidez son ligeramente más altas que el equivalente en la forma protonada (por ejemplo, cuando tenemos la fracción de 0.8 de la forma desprotonada se compara con la de 0.8 de la protonada que equivale a 0.2 de la desprotonada). Una posible explicación es la contribución de la transesterificación básica espontánea ya que junto con el crecimiento de la concentración de la forma básica crece el pH, pero la corrección fue mínima por lo que se concluyó que la contribución alcalina es despreciable. Así la mayor reactividad en la parte básica indica una contribución de la catálisis básica general a través del mecanismo trimolecular que se muestra en la Figura 41 o el bimolecular de la Figura 44. Por otro lado, la reactividad en la parte ácida de la gráfica tiende al cero, lo que muestra una contribución despreciable por parte de la catálisis ácida general por un mecanismo como el que se muestra en la Figura 42 o su análogo bimolecular.



**Figura 44.** Esquema del mecanismo de una catálisis básica general bimolecular.

Los resultados anteriores muestran que las rutas de transesterificación principales pueden llevarse a cabo por alguno de los mecanismos de las Figuras 39, 41 y 44. De acuerdo con esto, podemos presentar la ley de rapidez general en la forma de la ecuación 14 donde la contribución del mecanismo de la Figura 44 está expresada como  $k_1[B]$ , la del mecanismo de la Figura 41 es  $k_2 [B][BH^+]$  y la del mecanismo de la Figura 39 del modo de  $k_3 [B]^2$ .

$$k_{obs} = k_1[B] + k_2[B][BH^+] + k_3[B]^2 \quad \text{Ec. 14}$$

Para realizar un análisis con la ecuación 14 es útil modificarla dividiendo ambos lados por [B]:

$$\frac{k_{obs}}{[B]} = k_1 + k_2 [BH^+] + k_3 [B] \quad \text{Ec. 15}$$

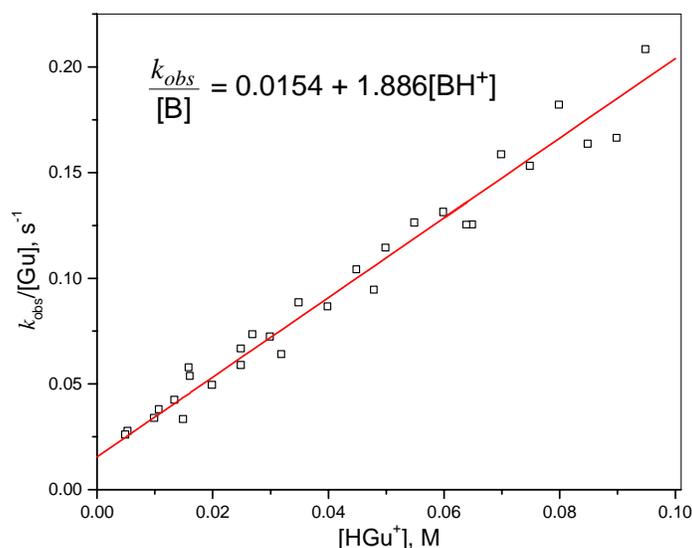
Al emplear una regresión lineal múltiple a los resultados de todas series de experimentos cinéticos con guanidinio (36 valores de  $k_{obs}$ ) con las variables independientes  $[BH^+]$  y  $[B]$  obtenemos para el coeficiente de  $k_3$  un valor negativo que no tiene sentido físico y además es estadísticamente no significativo ( $\text{prob}>t = 0.72$ ). Este nos permite excluir la contribución cuadrática en  $[B]$  de la ecuación 14 y así llegamos a la siguiente ecuación análoga a la 15 pero simplificada:

$$\frac{k_{obs}}{[B]} = k_1 + k_2[BH^+] \quad \text{Ec. 16}$$

De la ecuación anterior podemos ver que si se grafican los resultados como  $k_{obs}/[B]$  vs.  $[BH^+]$  la intersección con la ordenada nos dará la constante de rapidez de la contribución del mecanismo de la Figura 44 ( $k_1$ ) a la constante de rapidez observada mientras que la pendiente dará la contribución del mecanismo de la Figura 41 ( $k_2$ ). Para todos los valores de constantes de rapidez observadas en los experimentos de guanidinio se calculó el cociente mencionado y se elaboró el gráfico que se muestra en la Figura 45, el cual presenta poca dispersión en los datos experimentales (el coeficiente de correlación fue de 0.985). En Tabla 10 se encuentran los valores del ajuste y los respectivos valores de las constantes de rapidez de cada contribución.

**Tabla 10.** Valores de las constantes de rapidez para la catálisis con guanidina, obtenidas con el ajuste de la ecuación 16.

$k_1, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$k_2, \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$
$0.0154 \pm 0.0032$	$1.886 \pm 0.065$



**Figura 45.** Gráfica de las constantes observadas convertidas en constantes aparentes de segundo orden y graficadas en función de la forma ácida del amortiguador para hacer el ajuste con la ecuación 16.

Los valores obtenidos para las constantes de rapidez de cada una de las contribuciones se utilizaron para generar un perfil teórico para el efecto del grado de neutralización del guanidinio sobre las constantes de rapidez observadas para la transesterificación del HpNPP en las condiciones ya mencionadas. Como vemos en la Figura 43, la línea calculada producida por estos valores de constantes predice muy bien el comportamiento experimental del perfil.

Esto nos permite concluir que la transesterificación del sustrato modelo del ARN en las condiciones experimentales usadas en este trabajo se lleva a cabo principalmente mediante un mecanismo bifuncional, en donde participan al mismo tiempo la especie ácida como la especie básica del amortiguador, además del HpNPP. Para conocer más detalles acerca del mecanismo se deben utilizar otras bases para ver el efecto del  $pK_a$  sobre la actividad catalítica y poder explicar los valores encontrados en esta sección.

#### 5.4.1 Efecto salino en la transesterificación del HpNPP con guanidina

Para ver si existía un efecto salino sobre la rapidez de transesterificación del HpNPP en 80% de dimetil sulfóxido con guanidina, se hicieron mediciones cinéticas con una concentración constante del amortiguador de 0.04, con un 50% de la especie protonada y desprotonada, al añadir alícuotas de una solución madre de cloruro de tetrabutil amonio para observar qué efecto tiene sobre la constante de rapidez. Las concentraciones en la celda de la sal se variaron desde 0 hasta 0.1 M, en la Tabla 11 se exhiben los resultados obtenidos durante este experimento.

**Tabla 11.** Efecto de la concentración de cloruro de tetrabutil amonio sobre las constantes de rapidez observadas.

[Bu <sub>4</sub> NCl], M	$k_{obs} \times 10^3, s^{-1}$
0	1.10
0.025	1.08
0.05	1.12
0.075	1.11
0.1	1.11

El porcentaje de error promedio fue del 0.2%.

Al analizar estos resultados podemos ver que no existe ningún efecto salino sobre las constantes, ya que las variaciones están en el límite de error de las mediciones, este resultado puede deberse a que el modelo de Debye-Hückel considera cargas puntuales localizadas, y en nuestro caso a pesar de tener una especie con carga positiva (el guanidinio, la forma protonada de la base) que ocasionaría un efecto salino negativo sobre la constante de rapidez de transesterificación, su carga se encuentra deslocalizada entre dos átomos de nitrógeno por efecto de resonancia.

Lo anterior puede explicar porque no tenemos tal efecto y atribuirle únicamente a la transesterificación con el amortiguador la forma de campana obtenida en el

perfil de la variación de la constante con la protonación de la base y no al efecto de la fuerza iónica, como suele ser el caso en otros estudios con otros amortiguadores en agua.

### **5.5 Estudios de transesterificación con el sistema amortiguador acetamidina-acetamidinio**

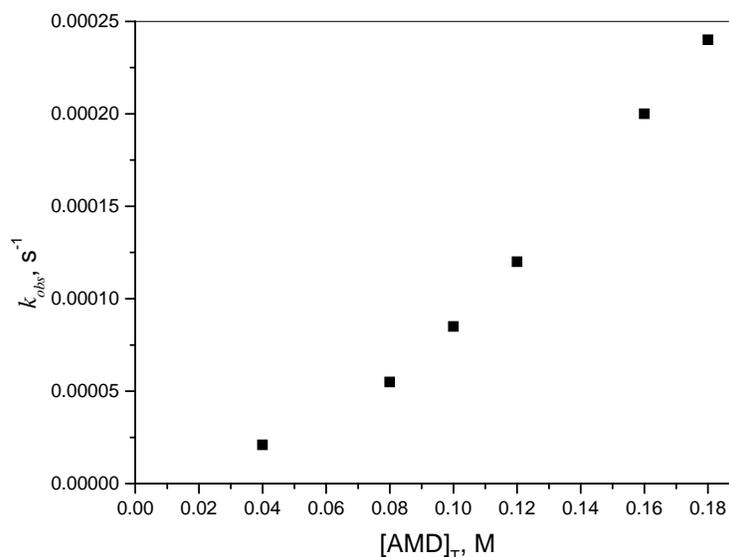
El primer experimento que se hizo con este sistema fue el efecto de la concentración total del amortiguador sobre las constantes de rapidez de la transesterificación del HpNPP en diferentes grados de neutralización del acetamidinio, los cuales fueron 20, 50 y 80%. Una característica de este sistema es que sus cinéticas son menos rápidas que la del guanidinio y esto se puede ver claramente en los valores de las constantes obtenidas que se muestran en la Tabla 12, pero a pesar de esto las cinéticas se siguieron por al menos tres tiempos de vida media, con lo que se logra hacer los ajustes mediante el método integral. Los perfiles de concentración para las constantes de rapidez obtenidas al 20, 50 y 80% de neutralización, se ilustran en las Figuras 46, 47 y 48 respectivamente. Las concentraciones del amortiguador variaron entre 0.02 y 0.18 M.

En estos perfiles podemos observar de nuevo que el que corresponde al 50% de neutralización del acetamidinio es el que presenta las constantes más altas, además de tener una curvatura que nos indica que el orden de reacción con respecto a la concentración del sistema amortiguador es mayor que uno, el mismo caso se presentó en los otros dos perfiles lo que nos muestra que al igual que en el caso de guanidinio participan dos especies del amortiguador en la catálisis, y se presentan las mismas posibilidades para el mecanismo.

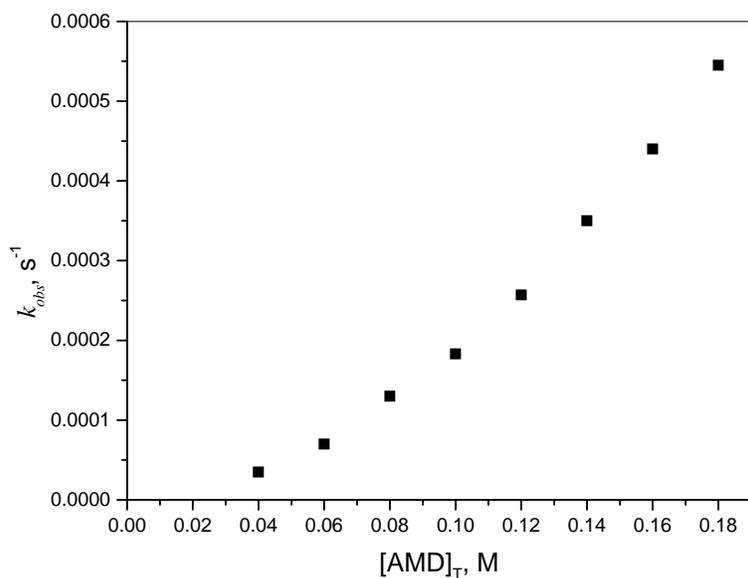
**Tabla 12.** Efecto de la concentración total de acetamidinio en diferentes grados de neutralización sobre las constantes de rapidez de transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO: agua 4:1.

[AMD] <sub>T</sub> , M	Porcentaje de neutralización del acetamidinio		
	20%	50%	80%
	$k_{obs} \times 10^3, s^{-1}$		
<b>0.02</b>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	0.020
<b>0.04</b>	0.021	0.0348	0.038
<b>0.06</b>	<i>N.D.</i>	0.070	0.077
<b>0.08</b>	0.055	0.130	0.120
<b>0.10</b>	0.085	0.183	0.170
<b>0.12</b>	0.120	0.257	0.260
<b>0.14</b>	<i>N.D.</i>	0.350	0.360
<b>0.16</b>	0.200	0.440	0.425
<b>0.18</b>	0.240	0.545	0.490

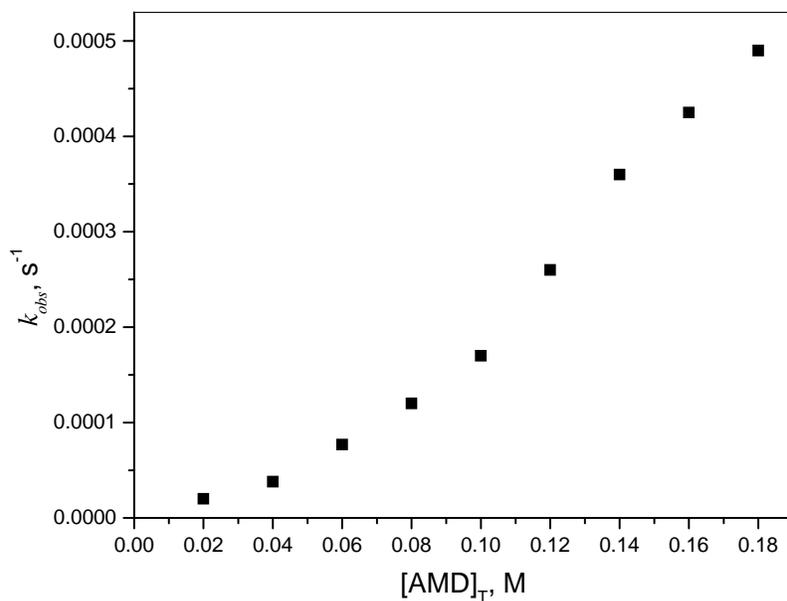
*N.D.*: No determinado. Los promedios del porcentaje de error en las constantes para 20, 50 y 80% de base libre fueron 0.69%, 0.23% y 0.24% respectivamente.



**Figura 46.** Efecto de la concentración total de acetamidinio neutralizado al 20% sobre la transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO:H<sub>2</sub>O 4:1.

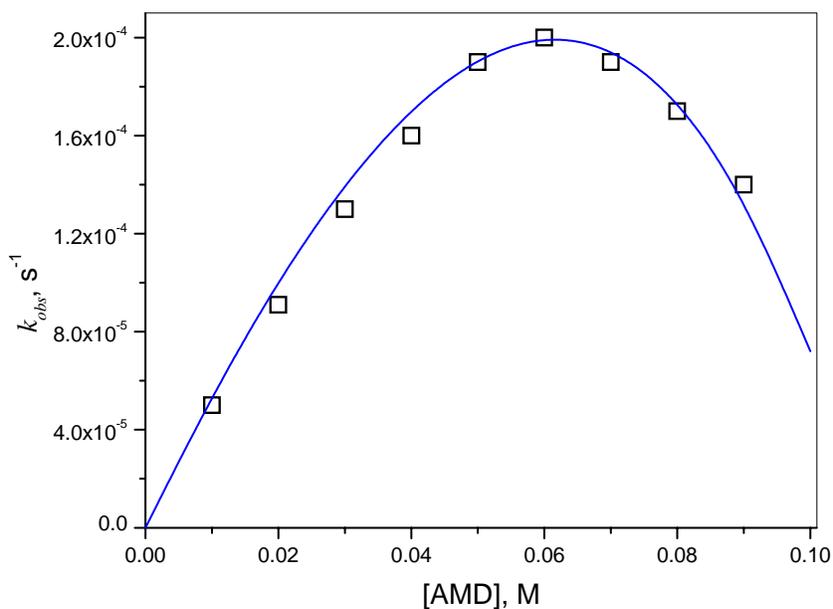


**Figura 47.** Perfil de las constantes de rapidez de la transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO:H<sub>2</sub>O 4:1 con la concentración total de acetamidinio neutralizado al 50%.



**Figura 48.** Efecto de la concentración total de acetamidinio neutralizado al 80% sobre la transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO:H<sub>2</sub>O 80:20.

Para confirmar las observaciones del efecto de la concentración se realizó un perfil del grado de desprotonación del acetamidinio sobre las constantes de rapidez de transesterificación del sustrato. Este perfil se muestra en la Figura 49 y en él podemos observar de nuevo la forma de campana. En este caso el máximo se encuentra un poco desplazado hacia la forma básica del amortiguador, lo cual es una señal de que haya mayor actividad de la forma básica. De nuevo nos encontramos con un perfil que no es simétrico debido, en donde la parte ácida tiende a cero que indica que la contribución del mecanismo de catálisis ácida general es despreciable. Mientras, en la parte alcalina el perfil no va a cero lo que nos da la posibilidad de una contribución adicional. Como se mencionó en la sección anterior, para la catálisis básica espontánea (o específica) su contribución es despreciable, por lo que de nuevo se considerará una catálisis básica general bimolecular.

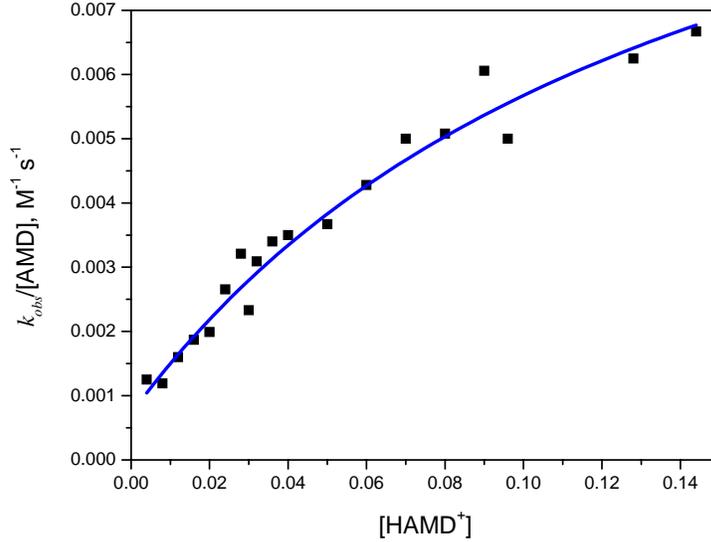


**Figura 49.** Perfil del grado de neutralización del acetamidinio sobre las constantes de rapidez de transesterificación del HpNPP a 37°C en una mezcla del 20% de agua en dimetilsulfóxido. Los cuadros representan los puntos experimentales, mientras la línea el ajuste calculado.

Por analogía, se hace uso de la ecuación 16 y el tratamiento de los datos descrito para el caso de guanidinio para poder ajustar el perfil de neutralización [calculando una constante aparente de segundo orden mediante el cociente de la constante de rapidez observada y la concentración de acetamidina (forma desprotonada) y graficándola contra la concentración del acetamidinio (forma protonada)]. La gráfica obtenida de este modo se ilustra en la Figura 50 y en ella podemos observar un efecto de saturación conforme se incrementa la concentración de la forma ácida del amortiguador. Este efecto en el perfil nos indica que posiblemente existe una interacción entre el acetamidinio y el sustrato antes de llevarse a cabo la transesterificación (así como en el caso de una cinética del tipo de Michaelis-Menten, sólo que en nuestro caso se obtuvo de una gráfica diferente). Este tipo de interacciones entre grupos guanidinio (o similares en nuestro caso) en DMSO ya ha sido observado por varios grupos [34 y 55]. Entonces siguiendo un modelo de saturación que se muestra a continuación se hizo el ajuste de los datos cinéticos mediante la ecuación 17 que se reduce a la ecuación (16) en condiciones de baja concentración de HAMD cuando  $K_{as}[HAMD^+] \ll 1$ .

$$\frac{k_{obs}}{[AMD]} = \frac{k_1 + K_{as}k_2[HAMD^+]}{1 + K_{as}[HAMD^+]} \quad \text{Ec. 17}$$

En la ecuación 17,  $k_{obs}$  es la constante de rapidez observada,  $[AMD]$  es la concentración del amortiguador en la forma de acetamidina,  $[HAMD^+]$  es la concentración del amortiguador en la forma de acetamidinio,  $k_1$  es el valor de la constante de rapidez de segundo orden de la reacción catalizada por acetamidina como base libre,  $k_2$  es el valor de la constante de rapidez de segundo orden de la reacción entre AMD y el complejo  $HAMD^+$  con el sustrato y  $K_{as}$  es la constante de asociación entre el sustrato y la forma protonada del amortiguador.



**Figura 50.** Efecto de la concentración de la forma protonada del amortiguador sobre la constante de rapidez aparente de segundo orden para la transesterificación del HpNPP a 37°C en una mezcla del 20% de agua en dimetilsulfóxido.

Para derivar la ecuación 17 hay que considerar el siguiente mecanismo formal:



donde  $S^-$  es el anión del sustrato HpNPP, B es una base cualquiera,  $HB^+$  es la forma protonada de la base y P son los productos de la transesterificación. De este mecanismo resulta que la expresión de la ley de rapidez de la reacción tiene la forma de la ecuación 21.

$$v = k_1[S^-][B] + k_2[SBH][B] \quad \text{Ec. 21}$$

Si se considera el balance de masa para el sustrato  $S^-$  (no es necesario tomar en cuenta el balance de materia para los componentes del amortiguador ya que fue empleado en un exceso sobre el sustrato):

$$[S^-]_T = [S^-] + [SBH] \quad \text{Ec. 22}$$

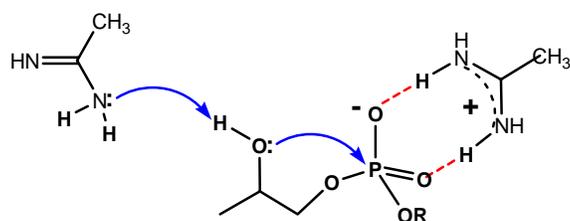
al utilizar el balance de masa y la expresión de la constante de asociación de la ecuación 22 tenemos que las expresiones para las concentraciones del sustrato libre y acomplejado son:

$$[S^-] = \frac{[S^-]_T}{1 + K_{as}[BH^+]}, [SBH] = \frac{K_{as}[HB^+][S^-]_T}{1 + K_{as}[HB^+]} \quad \text{Ec. 23}$$

Uniendo las ecuaciones 21 y 23 obtenemos la ecuación 24, de la cual se obtiene la ecuación 17 para  $k_{obs}$ .

$$v = \frac{(k_1[B] + K_{as}k_2[HB^+][B])[S^-]_T}{1 + K_{as}[HB^+]} \quad \text{Ec. 24}$$

Los valores para las constantes obtenidas mediante el ajuste con la ecuación 17 se muestran en la Tabla 13 y el ajuste que se hizo es la línea entre los puntos que se muestra en la Figura 50. El ajuste hecho muestra que los datos experimentales se ajustan bien al modelo propuesto, por lo que la asociación entre la forma protonada de acetamidina y el sustrato es factible. Este hallazgo puede indicarnos que la forma ácida del amortiguador funciona por un mecanismo de activación electrofílica mientras que la forma desprotonada actúa facilitando el proceso de transesterificación ya que acepta un protón del grupo hidroxilo en el estado de transición, que proporciona otra prueba más para confirmar que el mecanismo de la Figura 51 es el principal en la transesterificación del HpNPP en nuestro medio.

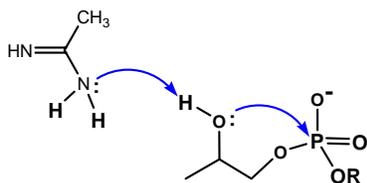


**Figura 51.** Esquema del mecanismo de la catálisis bifuncional con asistencia electrofílica para el acetamidinio.

**Tabla 13.** Valores obtenidos en el ajuste de la gráfica de la Figura 49 con la ecuación 17, para las constantes de rapidez y asociación.

Parámetro	$k_1, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_2, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$K_{as}, \text{M}^{-1}$
Valor	$0.00072 \pm 0.0003$	$0.0129 \pm 0.003$	$6.9 \pm 2.7$

El mecanismo de la catálisis básica general en este caso tiene forma presentada en la Figura 52.



**Figura 52.** Esquema del mecanismo de la catálisis básica general bimolecular para acetamidina.

Al examinar los valores obtenidos mediante el ajuste, encontramos de nuevo una contribución de segundo orden a la constante de rapidez observada bastante alta, que demuestra la existencia de un mecanismo del tipo bifuncional que explica la forma de campana encontrada. Sin embargo, haciendo una comparación con los trabajos del grupo de Göbel [52] podemos ver que el valor obtenido en este trabajo para la constante de asociación es muy cercano al informado cuando se utilizó un receptor del tipo amidinio con un fosfato en DMSO puro a 30°C,  $K_{as} = 14 \text{ M}^{-1}$ .

Al comparar los valores obtenidos para las constantes de rapidez entre los sistemas amortiguadores formados por acetamidina y guanidina, podemos concluir que el sistema de guanidina presenta los valores más altos. Siendo razonables para la contribución del mecanismo bimolecular con respecto a los valores de  $pK_a$  de estos, pero no para la contribución trimolecular. Un análisis más detallado se hará en la última sección de este capítulo, en donde se harán las comparaciones entre todos los sistemas.

### **5.6 Estudios de transesterificación con el sistema amortiguador piperidina-piperidinio**

Del mismo modo que en los casos anteriores, las condiciones de reacción fueron las mismas (temperatura constante de 37°C, mezcla DMSO:H<sub>2</sub>O 4:1 y condiciones de pseudomolecularidad con una concentración de HpNPP de 67  $\mu$ M) excepto por el uso de ácido perclórico, ya que en este caso la forma en la que se usó la piperidina fue en la forma básica y por ello se utilizó un ácido para neutralizarla. Para ser constantes con la forma en la que se informaron anteriormente los resultados, los porcentajes de neutralización serán de la especie ácida, es decir, del ión piperidinio para el caso de los perfiles de concentración y de neutralización.

De nuevo, primero se realizaron los perfiles de la variación de las constantes de rapidez con la concentración total del amortiguador en diferentes fracciones de neutralización. Las fracciones de neutralización del piperidinio utilizadas fueron 0.3, 0.5 y 0.8. Los valores de las constantes de rapidez obtenidas para este sistema fueron muy pequeños, por lo que se obtuvieron por el método de las rapidezces iniciales utilizando al final de cada corrida cinética la adición de un estándar de *p*-nitrofenol para de este modo cuantificar la absorbancia final de sustrato hidrolizado. Los valores obtenidos por este método para las constantes de rapidez se encuentran en la Tabla 14 y las gráficas de los perfiles obtenidos están en las

Figuras 53, 54 y 55 respectivamente para los porcentajes de neutralización de 80, 50 y 30%.

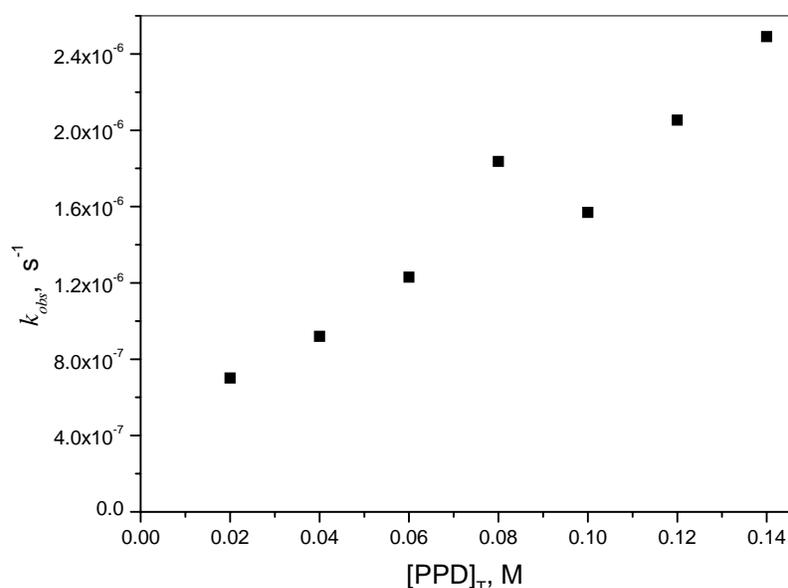
Debido a la lentitud de la transesterificación con este sistema, los valores de las constantes son menos exactos, por lo que la dispersión entre los datos obtenidos es mayor que para los dos sistemas anteriores. De los tres sistemas estudiados, sólo que el que tiene una proporción 1:1 de piperidina-piperidinio presenta poca dispersión entre los puntos y una forma parabólica para el perfil, que se vuelve a repetir como en los casos anteriores.

**Tabla 14.** Efecto de la concentración total de piperidina en diferentes grados de neutralización sobre las constantes de rapidez de transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO: agua 4:1.

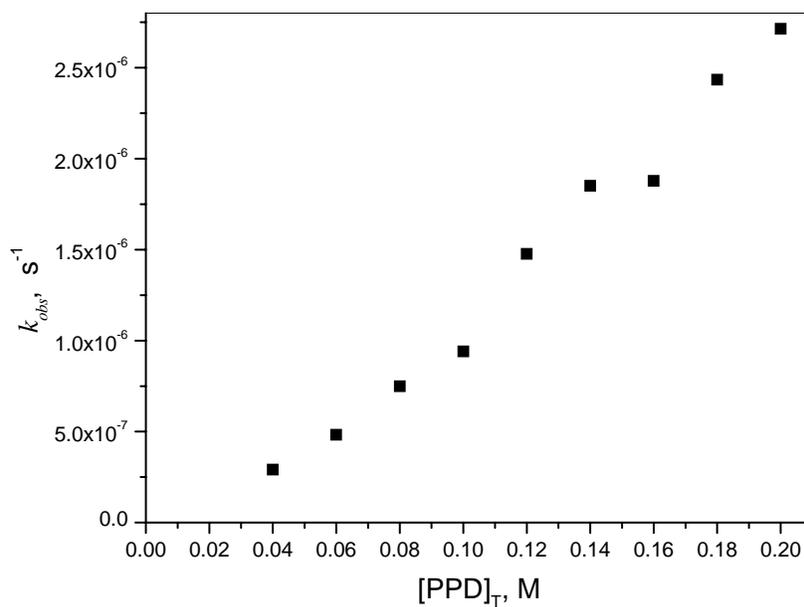
[PPD] <sub>T</sub> , M	Porcentaje de neutralización del ión piperidinio		
	30%	50%	80%
$k_{obs} \times 10^6, s^{-1}$			
0.02	N.D.	N.D.	0.7014
0.04	N.D.	0.291	0.92015
0.06	N.D.	0.482	1.2303
0.08	N.D.	0.749	1.83679
0.10	0.68212	0.941	1.56885
0.12	1.0845	1.476	2.05302
0.14	1.171	1.851	2.49057
0.16	1.4035	1.878	N.D.
0.18	1.70434	2.434	N.D.
0.20	1.971	2.714	N.D.
0.22	2.03733	N.D.	N.D.

N.D.: No determinado. Los promedios del porcentaje de error en las constantes para 20, 50 y 80% de base libre fueron 1.95%, 0.80% y 1.34% respectivamente.

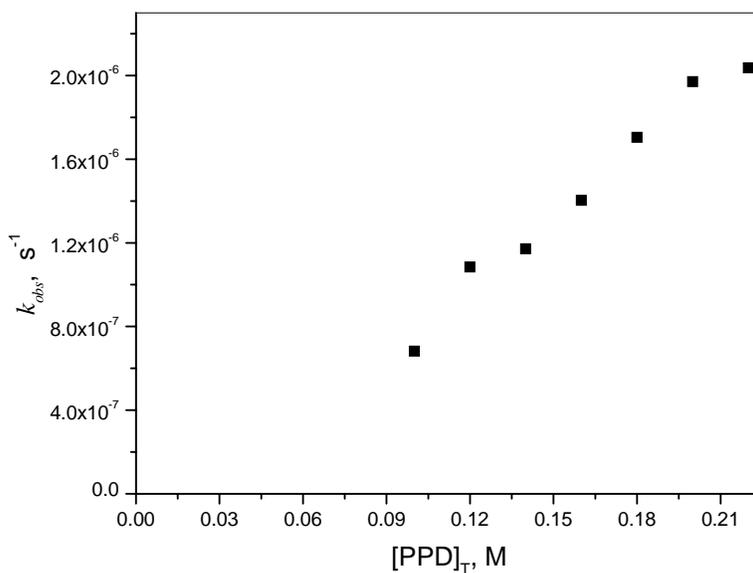
Para el perfil en el que tenemos una proporción de 4:1 piperidina:piperidinio se observa un comportamiento casi lineal, lo que se puede explicar si consideramos que para este sistema amortiguador la contribución de la catálisis básica es mayor que la bifuncional. Por otro lado, el perfil que tiene una fracción de 0.70 del ión piperidinio tiene una curvatura muy grande pero con valores de constantes de rapidez muy pequeños, lo que corroborará al menos de manera cualitativa la baja contribución de la constante de rapidez de segundo orden, a la constante observada para este catalizador. No obstante la curvatura observada en los perfiles nos señala que están participando dos especies del amortiguador en la reacción de transesterificación, que señala la existencia de tres mecanismos como en los casos anteriores.



**Figura 53.** Efecto de la concentración total de piperidinio neutralizado al 80% sobre la transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO:H<sub>2</sub>O 4:1.



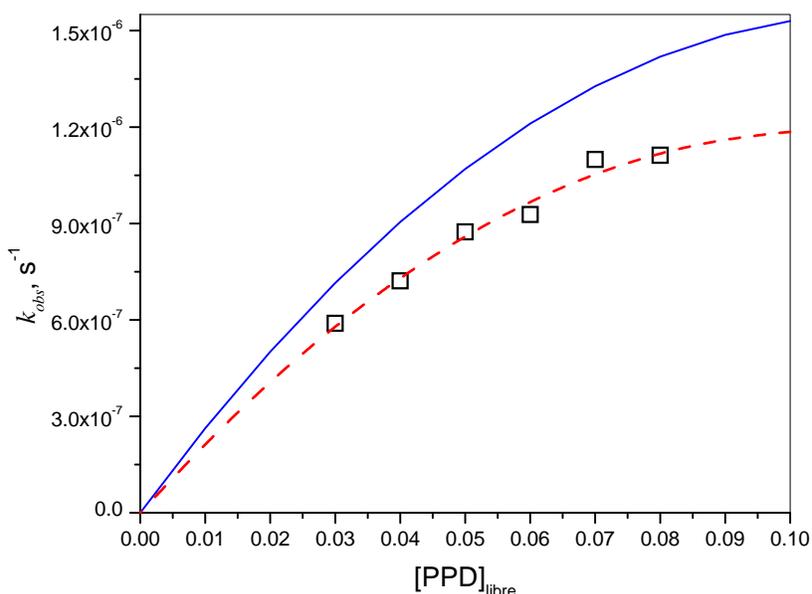
**Figura 54.** Perfil de las constantes de rapidez de la transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO:H<sub>2</sub>O 4:1, con la concentración total de piperidinio neutralizado al 50%.



**Figura 55.** Efecto de la concentración total de piperidinio neutralizado al 30% sobre la transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO:H<sub>2</sub>O 80:20.

También se hizo un experimento más, para determinar el efecto del grado de neutralización del ión piperidinio cuya gráfica se ilustra en la Figura 56. Para este caso podemos ver que el perfil es muy similar al de la catálisis básica general como único mecanismo, pero por las curvas obtenidas en los perfiles de concentraciones, se debe a que en este caso hay una contribución de un mecanismo de catálisis bifuncional.

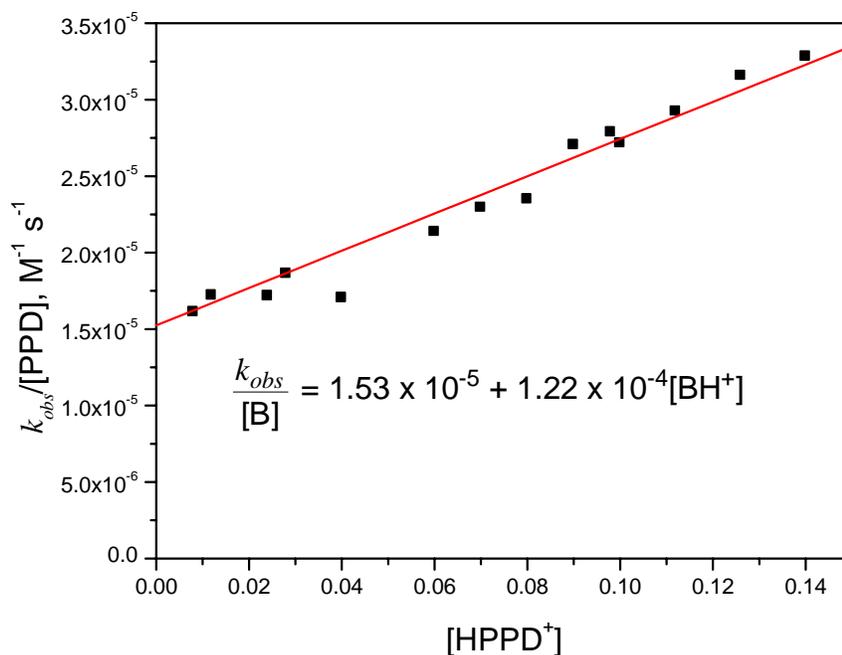
Finalmente para poder ajustar el perfil del grado de neutralización, se hizo un ajuste de todos los datos a una constante aparente de segundo orden por división de la constante observada por la concentración de la piperidina y al ajustar con la ecuación 16. La gráfica se muestra en la Figura 57 y sus parámetros de ajuste se resumen en la Tabla 15.



**Figura 56.** Perfil del grado de neutralización del ión piperidinio sobre las constantes de rapidez de transesterificación del HpNPP a 37°C en una mezcla del 20% de agua en dimetilsulfóxido. Los cuadros representan los puntos experimentales, la línea continua el ajuste calculado con todos los datos y la segmentada el ajuste que considera únicamente los datos de ese experimento.

**Tabla 15.** Valores de las constantes de rapidez para catálisis con piperidina.

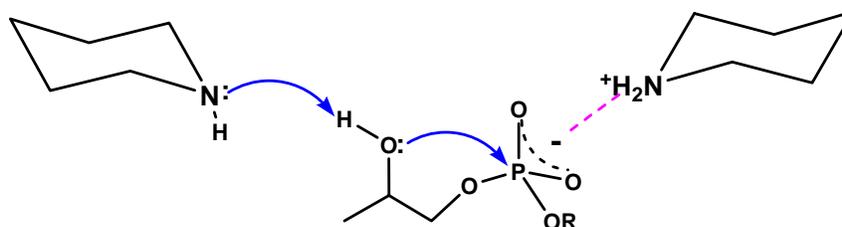
$k_1, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$k_2, \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$
$1.53 \times 10^{-5} \pm 9 \times 10^{-7}$	$1.22 \times 10^{-4} \pm 1.2 \times 10^{-5}$



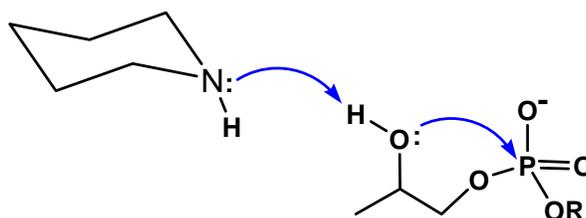
**Figura 57.** Gráfica de la variación de las constantes aparentes de segundo orden con la forma ácida del amortiguador en la transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO acuoso al 80%.

En el perfil de la Figura 56 se puede observar que la curva teórica (la línea continua) predice correctamente el comportamiento, sin embargo no pasa por los puntos experimentales. Esto se debe a la menor precisión de las mediciones con este amortiguador si lo comparamos con guanidina y acetamidina. Si se emplean para los cálculos de  $k_1$  y  $k_2$  solamente los puntos de la Figura 57, se obtienen las constantes de rapidez  $1.514 \times 10^{-5} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  y  $1.99 \times 10^{-4} \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$  respectivamente los cuales difieren poco de los valores en la Tabla 15. Con estas constantes se obtiene la línea segmentada en la Figura 56. Finalmente, las Figuras 58 y 59 son

ilustraciones de los mecanismos bifuncional y básico general para el caso de la catálisis con piperidina.



**Figura 58.** Esquema del mecanismo de la catálisis bifuncional con asistencia electrofílica.



**Figura 59.** Esquema del mecanismo de la catálisis básica general bimolecular que presenta la mayor contribución en la catálisis de la transesterificación del HpNPP.

### **5.7 Estudios de transesterificación con el sistema amortiguador metilamina-metilamonio**

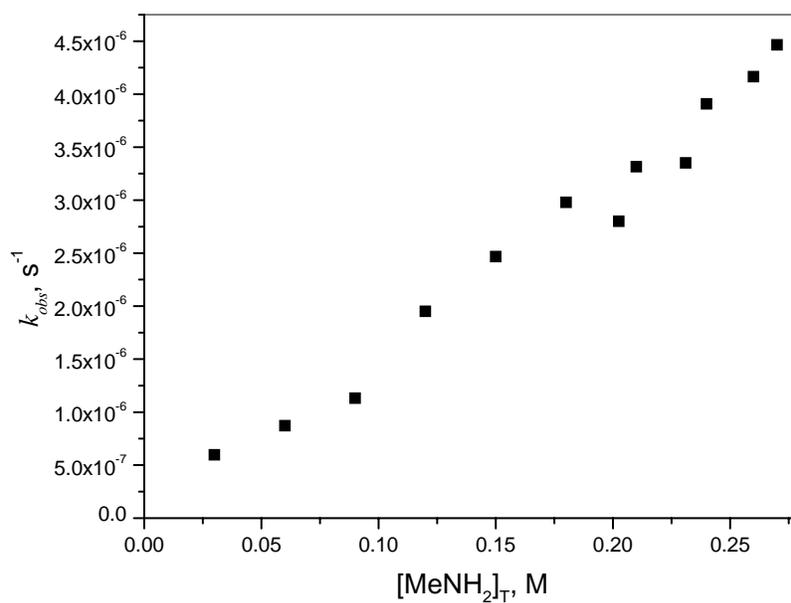
Para ver el efecto que tienen el valor del  $pK_a$  de los pares ácido-base se utilizó metilamina cuyo valor de  $pK_a$  en este medio es de 10.06, el cual es intermedio entre el de piperidina (9.9) y el de acetamidinio (12.1). Es importante señalar que este sistema presenta muy baja reproducibilidad debido posiblemente a que la metilamina es volátil. Aunado a esto las constantes de rapidez son muy pequeñas, por lo que sus valores se obtuvieron mediante el método de las rapidezces iniciales como se describe en la sección de metodología.

Los estudios del efecto de la concentración total del sistema amortiguador neutralizado en diferentes proporciones sobre la rapidez de la transesterificación del sustrato sólo pudieron realizarse en dos fracciones, 0.5 y 0.8 (al tomar como punto de partida la forma ácida). Los valores de las constantes de rapidez que se obtuvieron en estos perfiles de concentración se encuentran en la Tabla 16 mientras que las gráficas en las Figuras 60 y 61.

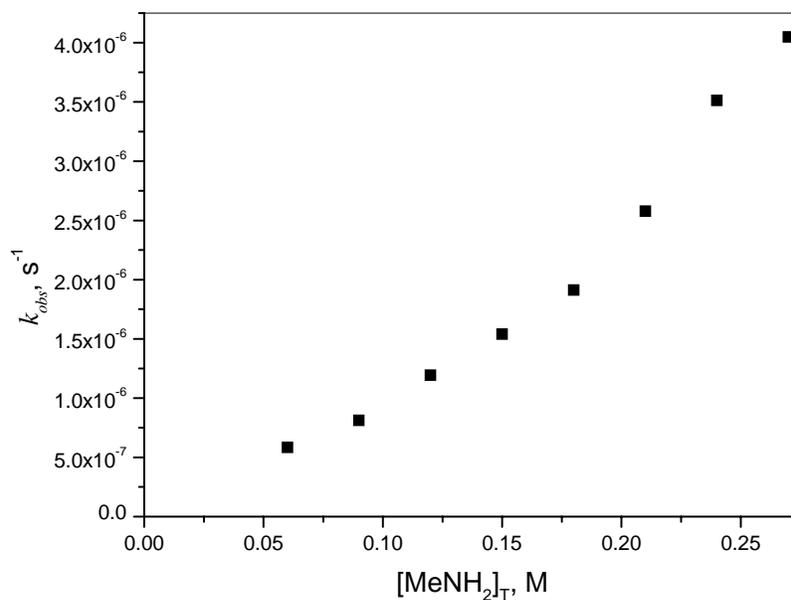
**Tabla 16.** Efecto de la concentración total de acetamidinio en diferentes grados de neutralización sobre las constantes de rapidez de transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO: agua 4:1 con el sistema metilamina/metilamonio.

[MeNH <sub>2</sub> ] <sub>T</sub> , M	Porcentaje de neutralización del ión amonio	
	50%	80%
<i>k<sub>obs</sub></i> × 10 <sup>6</sup> , s <sup>-1</sup>		
0.03	<i>N.D.</i>	0.5960
0.06	0.5840	0.8726
0.09	0.8120	1.1309
0.12	1.1941	1.9507
0.15	1.5411	2.4674
0.18	1.9121	2.9784
0.2025	<i>N.D.</i>	2.8011
0.21	2.578	3.3149
0.231	<i>N.D.</i>	3.3510
0.24	3.5126	3.9068
0.26	<i>N.D.</i>	4.1652
0.27	4.0488	4.4649

*N.D.*: No determinado. Los promedios del porcentaje de error en las constantes para 50 y 80% de base libre fueron 1.15% y 1.75% respectivamente.

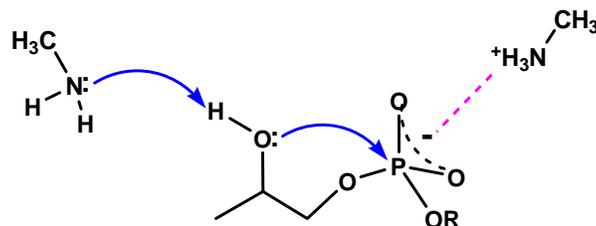


**Figura 60.** Efecto de la concentración total de metilamonio neutralizado al 80% sobre la transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO:H<sub>2</sub>O 4:1.



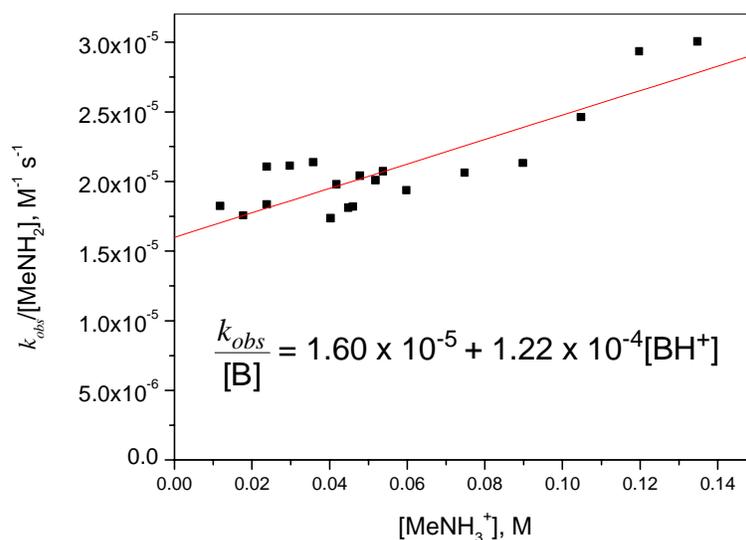
**Figura 61.** Perfil de las constantes de la variación de la rapidez de la transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO:H<sub>2</sub>O 4:1 con la concentración total de metilamonio neutralizado al 50%.

Los perfiles obtenidos muestran una desviación de la linealidad mayor para el caso de neutralización a 50%.



**Figura 62.** Esquema del mecanismo de la catálisis bifuncional con asistencia electrofílica en el caso de metilamina.

Al igual que en los casos anteriores, y con base en los datos experimentales obtenidos el mecanismo de una catálisis básica asistida con una activación electrofílica (Figura 62) debe contribuir parcialmente. Para confirmar lo anterior, se hizo un perfil del grado de neutralización, sin embargo estos resultados resultaron ser muy desviados del resto de las mediciones con metilamina y no se tomaron en cuenta. Un análisis de los resultados de la Tabla 16 mediante ecuación 16 se presenta en la Figura 63.



**Figura 63.** Gráfica de la variación de las constantes aparentes de segundo orden con la forma ácida del amortiguador en la transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO acuoso al 80% con el amortiguador formado por metilamina.

Los valores obtenidos del ajuste de la gráfica de la Figura 63 se presentan en la Tabla 17. Como podemos observar, nuevamente la contribución de segundo orden presenta mayor peso en el perfil.

**Tabla 17.** Valores de los parámetros de ajuste y los correspondientes valores de las constantes de rapidez.

$k_1, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$k_2, \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$
$1.60 \times 10^{-5} \pm 8.4 \times 10^{-7}$	$8.776 \times 10^{-5} \pm 1.3 \times 10^{-5}$

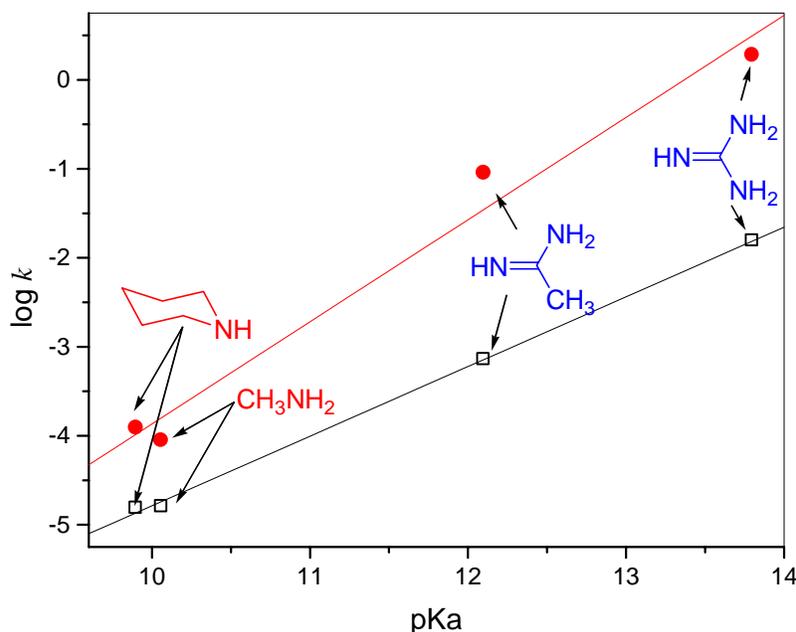
En la siguiente sección se analizarán a fondo las correlaciones entre los valores de  $pK_a$  de los pares ácido-base utilizados y los valores de las constantes de rapidez, para obtener mayor información acerca del mecanismo por el cual se lleva a cabo la transesterificación del HpNPP.

### **5.8 Correlaciones de Brønsted para la catálisis ácido-base**

Con base en los estudios cinéticos anteriores, para analizar los mecanismos propuestos se hicieron las relaciones de Brønsted para los sistemas catalíticos utilizados. En la Tabla 18 se muestran los valores de las constantes de rapidez y los valores de  $pK_a$  de la forma protonada de cada base. En el caso de acetamidinio el valor de  $k_2$  de tercer orden se calculó a partir del producto de la constante de asociación ( $K_{as}$ ) y la constante de rapidez  $k_2$  de segundo orden, ambas ajustadas mediante la ecuación 17 y que se muestran en la Tabla 13. Para la gráfica de la relación de Brønsted se obtuvieron los valores de los logaritmos y se graficaron respecto al  $pK_a$ , como se muestra en la Figura 64.

**Tabla 18.** Valores de las constantes de rapidez para cada uno de los sistemas amortiguadores usados en la reacción de transesterificación del HpNPP y los valores de  $pK_a$  de los pares ácido-base utilizados en DMSO acuoso al 80% a 37°C.

Base	$k_1, M^{-1}s^{-1}$	$k_2, M^{-2}s^{-1}$	$pK_a$
Guanidina	$0.0154 \pm 0.0032$	$1.886 \pm 0.065$	$13.80 \pm 0.012$
Acetamidina	$0.00072 \pm 0.0003$	$0.089 \pm 0.038$	$12.10 \pm 0.010$
Metilamina	$1.60 \times 10^{-5} \pm 8.37 \times 10^{-7}$	$8.776 \times 10^{-5} \pm 1.29 \times 10^{-5}$	$10.06 \pm 0.025$
Piperidina	$1.53 \times 10^{-5} \pm 8.96 \times 10^{-7}$	$1.22 \times 10^{-4} \pm 1.17 \times 10^{-5}$	$9.90 \pm 0.011$



**Figura 64.** Relación de Brønsted para la transesterificación del HpNPP en 80% de DMSO acuoso a 37°C. Los puntos en forma de cuadro son para  $\log k_1$  y los puntos circulares para  $\log k_2$ .

De la gráfica de la relación de Brønsted se calcularon las pendientes para de este modo conocer los valores de  $\beta$  en la relación que se muestra en la ecuación 25:

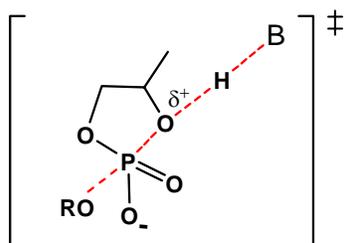
$$\log k = \beta pK_a + C \quad \text{Ec. 25}$$

donde  $k$  es la constante de rapidez,  $\beta$  es la pendiente de la gráfica que tiene interpretaciones mecanísticas importantes (*vide infra*) y  $C$  es la ordenada al origen y no presenta ningún significado físico.

Los valores obtenidos para  $\beta$  en los ajustes de los experimentos hechos para la transesterificación del HpNPP se muestran en la siguiente Tabla:

**Tabla 19.** Valores de  $\beta$  obtenidos a partir de la relación de Brønsted para la transesterificación del HpNPP en 80% de DMSO acuoso a 37°C.

Correlación	$\beta$	$C$	$R^2$
$\log k_1$	$0.78 \pm 0.02$	$-12.62 \pm 0.19$	0.9991
$\log k_2$	$1.14 \pm 0.11$	$-15.35 \pm 1.36$	0.9794



**Figura 65.** Esquema del estado de transición con base en la correlación de Brønsted.

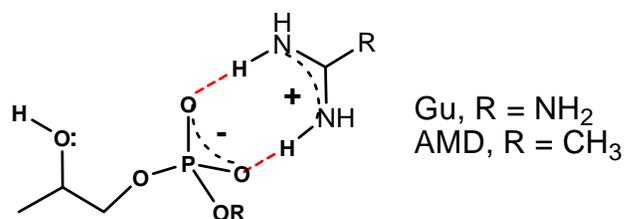
El valor de  $\beta$  para la contribución del mecanismo bifuncional es inesperadamente más alto que el de la contribución del mecanismo de catálisis básica general. Primero analizaremos el valor de  $\beta$  para la catálisis básica general. El valor obtenido en este trabajo es un poco más grande que el obtenido por el grupo de Andrew Williams para una catálisis ácido-base general en la transesterificación de un nucleótido que contiene el 4-nitrofenol como grupo saliente (el valor obtenido por ellos para  $\beta$  fue de 0.67, ver referencias 24 y 25) y que es un sustrato aproximadamente 1000 veces más reactivo que el HpNPP. El significado de este

valor es la formación de un estado de transición tardío, es decir, que se parece más a los productos que a los reactivos, en donde la base desprotona al grupo 2-hidroxi tal como se muestra en el esquema la Figura 65.

Una explicación sencilla de lo anterior se logra si consideramos los dos valores extremos para  $\beta$ , es decir, cero y uno. Para un valor de cero en la pendiente de la relación de Brønsted para una catálisis ácido-base nos indica que el enlace hidrógeno-oxígeno del grupo 2-hidroxi (en nuestro caso en particular) casi no se desprotona en el estado de transición ya que no se forma el enlace fósforo-oxígeno, por lo que su  $pK_a$  en el estado de transición es muy alto y nos muestra que se parece más a los reactivos que a los productos (estado de transición temprano). En el caso contrario, cuando  $\beta$  es 1 el enlace hidrógeno-oxígeno del grupo 2-hidroxi se encuentra muy debilitado y se desarrolla una carga parcial positiva con lo que baja el  $pK_a$  (es decir, se vuelve más ácido) ya que al mismo tiempo se comienza a formar el enlace entre el fósforo y el oxígeno, sugiriendo que el estado de transición se parece más al producto que a los reactivos (estado de transición tardío). Con base en esto, por el valor obtenido en la pendiente de la relación de Brønsted en nuestros estudios (0.78) podemos afirmar de manera cualitativa que el estado de transición es tardío.

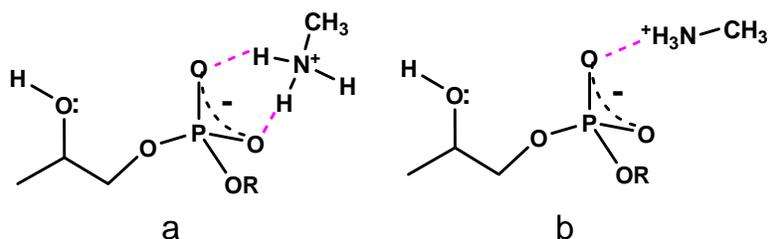
El valor anterior es razonable si se considera que en el medio utilizado el  $pK_a$  del grupo 2-hidroxi del HpNPP es de 19.8 [56] mientras que los valores de  $pK_a$  de las bases utilizadas no superan el valor de 13.8, por lo que es poco probable llegar a la desprotonación total de este grupo.

Para el caso de la relación de Brønsted para el mecanismo bifuncional, el valor se puede explicar si tomamos en cuenta los mecanismos propuestos. Con guanidina y acetamidina la estabilización electrofílica se da posiblemente por un arreglo complementario de enlaces de hidrógeno como se muestra en la siguiente Figura:



**Figura 66.** Esquema de la interacción entre los amidinios y el fosfato considerada en el mecanismo de la transesterificación del HpNPP en DMSO acuoso al 80%.

En cambio para piperidina y metilamina la interacción podría ser como uno de los dos tipos que se encuentran en la Figura que se muestra a continuación:



**Figura 67.** Esquema de la interacción entre los iones amonio y el fosfato considerada en el mecanismo de la transesterificación del HpNPP en DMSO acuoso al 80%.

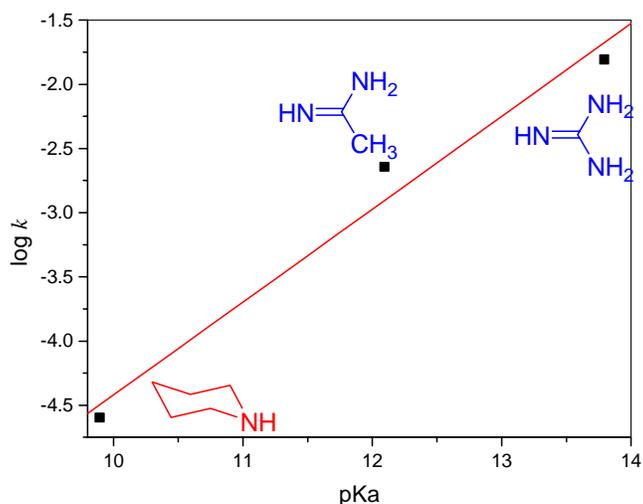
Como podemos ver ambas interacciones son distintas, para los amidinios (acetamidinio y guanidinio) la interacción se puede deber a una complementariedad favorecida por una deslocalización de la carga en ambas especies. Mientras en los iones amonio (piperidinio y metilamonio) si se da por el tipo “a” que se muestra en la Figura 67 no es favorecida por el arreglo no lineal que se presenta, entre tanto el tipo de interacción “b” de la Figura tampoco es más favorecida la de los amidinios, ya que esta interacción se da sólo entre un átomo de cada especie. Por lo tanto, se puede suponer que son dos tipos diferentes de activación electrofílica y en la relación de Brønsted en realidad la recta que observamos es una intersección entre dos rectas distintas que se cruzan.

Para confirmar esta hipótesis se realizaron experimentos de cocatálisis. Estos experimentos consisten en el uso de dos especies distintas en una catálisis del tipo ácido-base. En nuestro caso se hizo del siguiente modo, se varió la concentración de guanidinio en relación a la concentración de las bases utilizadas (las bases estaban protonadas al 10%), con el fin de tener el guanidinio como la especie ácida en todos los casos y sólo variar la base. En este experimento sólo se realizó con acetamidina y piperidina (metilamina no se utilizó por la baja reproducibilidad que presenta) mientras que para el sistema guanidina-guanidinio los datos ya se conocen. Las condiciones experimentales fueron las mismas que para los estudios cinéticos anteriores y los valores de las contribuciones de primer y segundo orden en la constante de rapidez observada se muestran en la siguiente Tabla.

**Tabla 20.** Valores obtenidos para las constantes de rapidez de la transesterificación bifuncional del HpNPP usando como especie ácida al ión guanidinio.

<b>Base</b>	$k_2, M^{-2}s^{-1}$	$pK_a$
<b>Guanidina</b>	$1.886 \pm 0.065$	$13.80 \pm 0.012$
<b>Acetamidina</b>	$0.24 \pm 0.014$	$12.10 \pm 0.010$
<b>Piperidina</b>	$1.7 \times 10^{-3} \pm 1.17 \times 10^{-4}$	$9.90 \pm 0.011$

Con los valores de la Tabla 20 se hizo otra gráfica de la correlación de Brønsted para ver si la hipótesis propuesta era correcta (ver Figura 68), en caso de serlo el valor de la pendiente de esta curva sería el mismo que el de la anterior sólo que paralela. Y en efecto, el valor de  $\beta$  fue de 0.78 también. Esto sugiere que el valor de 1.14 para la contribución de segundo orden se puede descomponer en dos partes, una la de la catálisis básica (ya que al hacer el experimento se mantuvo constante la forma ácida) y otra contribución por la parte ácida. Lo anterior también apoya los mecanismos propuestos para la reacción de transesterificación del HpNPP en donde el grupo fosfato se activa por medio de un par iónico con la forma ácida del amortiguador.



**Figura 68.** Relación de Brønsted para la transesterificación del HpNPP en 80% de DMSO acuoso a 37°C cuando se usa al ión guanidinio como la especie ácida.

Otra manera de ver esto es al examinar los valores de las constantes, en la contribución de primer orden (que involucra una catálisis básica general bimolecular solamente) varían de manera monótona con el  $pK_a$ . Mientras que en la contribución de segundo orden (la catálisis bifuncional) el comportamiento es muy distinto, ya que la variación entre el acetamidinio y guanidinio no es muy alta y de acetamidinio a piperidinio se incrementa enormemente, lo que confirma la activación electrofílica mencionada anteriormente.

Es importante mencionar que por primera vez se informa un perfil de neutralización en forma de campana, que surge de manera natural y sin ninguna manipulación matemática en estos medios; y que además es de segundo orden respecto al amortiguador. Este tipo de perfiles son muy importantes en los estudios biomiméticos ya que son los que se obtienen en la reacciones de hidrólisis enzimáticas, por lo que obtenerlos sugiere que el sistema usado puede imitar a las enzimas.

## 6. CONCLUSIONES

La reacción de transesterificación del 2-hidroxiopropil-4-nitrofenilfosfato en mezclas dimetilsulfóxido-agua a 37°C con el sistema amortiguador guanidina-guanidinio, tiene una rapidez óptima en la proporción 4:1 DMSO:H<sub>2</sub>O volumen/volumen.

En la transesterificación básica específica del HpNPP con hidróxido de tetrabutilamonio en la mezcla 4:1 DMSO a 37°C, se presenta un efecto salino positivo, debido a que los reactivos son iones de carga similar.

En el mecanismo para la transesterificación del HpNPP con los sistemas amortiguadores formados por acetamida y guanidina participan de manera bifuncional las especies protonada y desprotonada del amortiguador. Además, existe una contribución de un mecanismo básico general bimolecular.

En los sistemas amortiguadores formados con metilamina y piperidina, el mecanismo más importante fue el de la catálisis básica general bimolecular, existiendo una contribución del mecanismo bifuncional de menor eficiencia.

Las reacciones de transesterificación del HpNPP con los sistemas amortiguadores no presentan un efecto salino.

Las rutas de transesterificación del HpNPP en el medio estudiado son dos: una es por una catálisis básica general bimolecular del sustrato y la otra por un mecanismo similar al anterior con la diferencia que es asistido por una activación electrofílica del fosfato por parte de la especie ácida del amortiguador de una manera que puede considerarse como una imitación del mecanismo enzimático de la ARNasa A. Este comportamiento se analizó en términos de las relaciones de Brønsted.

## 7. PERSPECTIVAS

Con el fin de obtener una serie más completa y realizar relaciones de Brønsted se recomienda sintetizar diferentes sustratos modelos del ARN. Además de llevar a cabo los mismos estudios cinéticos para la hidrólisis de sustratos modelos del ARN en distintos medios con bajo contenido de agua.

Para tener mayor evidencia del mecanismo se recomienda hacer el estudio del efecto isotópico sobre los sistemas usados y determinar un mecanismo para la hidrólisis de los distintos sustratos modelo del ARN.

Finalmente, se recomienda estudiar la hidrólisis de cadenas de ARN en diferentes disolventes y con distintas bases para determinar su mecanismo en estos medios, aunado al estudio del efecto isotópico.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Voet D., Voet J. G. Biochemistry. 3<sup>rd</sup> ed. 2003. John Wiley and Sons, inc.
- [2] Nelson D. L., Cox M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. 4<sup>th</sup> ed. 2005. W. H. Freeman & Co.
- [3] Bruice T. C., Benkovic S. J. Bioorganic Mechanisms. Vol.1. 1966. W. A. Benjamin. New York.
- [4] Yatsimirsky A., Schneider H-J. Lanthanide-catalyzed hydrolysis of phosphate esters and nucleic acids in Metal Ions in Biological Systems. Vol. 40. Edited by Sigel A. & Sigel H. 2003. Marcel Dekker Inc. Netherlands.
- [5] Hollfelder F., Avenier F., Domingos J. B., Van Vliet L. D. Polyethylene imine derivatives ('synsymes') accelerate phosphate transfer in the absence of metal. *J. Am. Chem. Soc.* 2007. 129. 7611-7619.
- [6] Nome F., Orth E. S., Brandão T. A. S., Milagre M. S., Eberlin M. N. Intramolecular acid-base catalysis of a phosphate diester: modeling the ribonuclease mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 2008. 130. 2436-2437.
- [7] Anslyn E. V., Perreault D. M. Unifying the current data on the mechanism of cleavage - transesterification of RNA. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1997, 36: 432-450.
- [8] Suh J., Seok Hong I. Acceleration of acid-catalyzed transesterification of 2-hydroxypropyl-p-nitriphenyl phosphate by organic solvents. *Org. Lett.* 2000. 2(3): 377-380.

- [9] Bevilacqua P. C., Yajima R. Nucleobase catalysis in ribozyme mechanism. *Curr. Op. Chem. Biol.* 2006. 10: 455-464.
- [10] Kirby A. J., Beckmann C., Kuusela S., Tickle D. C. Mechanism of catalysis by imidazole buffer of the hydrolysis and isomerization of RNA models. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2.* 1998. 573-581
- [11] Takagi Y., Ikeda Y., Taira K. Ribozyme mechanisms. *Top. Curr Chem.* 2004. 232: 213-251.
- [12] Ferré-D'Amaré A. R., Zhou K., Doudna J. A. Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. *Nature.* 1998. 395: 567-574.
- [13] Strobel S. A., Ryder S. P. The hairpin's turn. *Nature.* 2001, 410: 761-763
- [14] Ferré-D'Amaré A., Rupert P. B. Crystal structure of a hairpin ribozyme-inhibitor complex with implications for catalysis. *Nature.* 2001, 410: 780-786.
- [15] Breslow R., Anslyn. On the mechanism of catalysis by ribonuclease: Cleavage and isomerization of the dinucleotide UpU catalyzed by imidazole buffers. *J. Am. Chem. Soc.* 1989. 111: 4473-4482.
- [16] Breslow R., Schmuck C. Goodness of fit in complexes between substrates and ribonuclease mimics: Effects on binding, catalytic rate constants, and regiochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* 1996. 118: 6601-6605
- [17] Breslow R., Xu R. Quantitative evidence for the mechanism of RNA cleavage by enzyme mimics. Cleavage and isomerization of UpU by morpholine buffers. *J. Am. Chem. Soc.* 1993. 115: 10705-10713

[18] Breslow R., Huang D. L. A Negative catalytic term requires a common intermediate in the imidazole buffer catalyzed cleavage and rearrangement of ribodinucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* 1990. 112:9621-9623.

[19] Breslow R., Labelle. Sequential general base-acid catalysis in the hydrolysis of RNA by imidazole. *J. Am. Chem. Soc.* 1994. 108: 2655-2659.

[20] Breslow R., Dong S. D., Webb Y., Xu R. Further studies on the buffer-catalyzed cleavage and isomerization of uridyluridine. Medium and ionic strength effects on catalysis by morpholine, imidazole, and acetate buffers help clarify the mechanisms involved and their relationship to the mechanism used by the enzyme ribonuclease and by a ribonuclease mimic. *J. Am. Chem. Soc.* 1996. 118: 6588-660.

[21] Lönnberg H., Oivanen M., Kuusela S. Kinetics and mechanisms for the cleavage and isomerization of the phosphodiester bonds of RNA by Brønsted acids and bases. *Chem. Rev.* 1998: 961-990

[22] Perrin C. L. On the mechanism of buffer-catalyzed hydrolysis of RNA models. *J. Org. Chem.* 1995. 60: 1239-1243

[23] Kirby A. J., Marriot R. E. General base catalysis vs. medium effects in the hydrolysis of an RNA model. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2.* 2002. 422-427

[24] Williams A., Davis A. M., Hall A. D. Charge description of base-catalyzed alcoholysis of aryl phosphodiester: A ribonuclease model. *J. Am. Chem. Soc.* 1988. 110: 5105-5108.

[25] Williams A., Davis A. M., Regan A. C. Experimental charge measurement at leaving oxygen in the bovine ribonuclease a catalyzed cyclization of uridine 3'-phosphate aryl esters. *Biochem.* 1988. 27: 9042-9047

- [26] Göbel M. W. Binuclear metal complexes as efficient intermediaries in biochemically relevant hydrolysis reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1994, 33:1141-1143.
- [27] Yoshinari K., Komiyama M., Yamazaki K. Oligoamines as simple and efficient catalysts for RNA hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* 1991. 113(15): 5989-5901.
- [28] Yoshinari K., Komiyama M. Hydrolysis of adenosine 2', 3'-cyclic phosphate and adenylyl (3', 5') adenosine catalyzed by alkylenediamines. *Chem. Lett.* 1990. 519-522.
- [29] Yoshinari K., Komiyama M. Kinetic analysis of diamine-catalyzed RNA hydrolysis. *J. org. Chem.* 1997. 62:2155
- [30] Karube I., Kato T., Takeuchi T. Bis(imidazol) cleft-shaped mimic of the active site of ribonuclease A. *Chem. Comm.* 1996. 953-954.
- [31] Lorente A., Espinosa J. F., Fernandez-Saiz M., Lehn J. M., Wilson W. D. Zhong Y. Y. Syntheses of imidazole-acridine conjugates as ribonuclease A mimics. *Tetrahedron Lett.* 1996. 37: 4417-4420.
- [32] Felden B., Fouace S., Gaudin C., Picard S., Corvaisier S., Renault J., Carboni B. Polyamine derivatives as selective RNase A mimics. *Nucl. Ac. Res.* 2004. 32(1): 151-157
- [33] Göbel M. W., Muche M-S. Bis(guanidinium) alcohols as models of staphylococcal nuclease: substrate binding through ion pair complexes and fast phosphoryl transfer reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996, 35:2126-2129.

[34] Anslyn. E. V., Ariga K. Manipulating the stoichiometry and strength of phosphodiester binding to a bisguanidine cleft in DMSO/Water solutions. *J. org. Chem.* 1992. 57: 417

[35] Kneeland D. M., Ariga K., Lynch V. M., Huang C.-Y., Anslyn E. V. Bis(alkylguanidinium) receptors for phosphodiester: Effect of counterions, solvent mixtures, and cavity flexibility on complexation. *J. Am. Chem. Soc.* 1993. 115: 10042-10055

[36] Smith J., Ariga K., Anslyn E. V. Enhanced imidazole-catalyzed RNA cleavage induced by a bis-alkylguanidinium receptor. *J. Am. Chem. Soc.* 1993. 115: 362-364.

[37] Jubian V., Dixon R. P., Hamilton A. D. Molecular recognition and catalysis. Acceleration of phosphodiester cleavage by a simple hydrogen-bonding receptor. *J. Am. Chem. Soc.* 1992. 114: 1120-1121.

[38] Hamilton A. D., Jubian V., Dixon R. P. Acceleration of a phosphate diester transesterification reaction by bis(alkylguanidinium) receptors containing an appended general base. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995. 34(1): 1237-1239

[39] Kalesse M., Filipazzi A., Oost T. Bis(guanidinium) receptors as ribonuclease active-site model system: structural changes and solvent effects. *Liebigs. Ann.* 1997. 1005-1010.

[40] Anslyn E. V., Gray M., Piątek A. M. Guanidinium groups act as general-acid catalysts in phosphoryl transfer reactions: A two-proton inventory on a model system. *J. Am. Chem. Soc.* 2004. 126: 9878-9879.

[41] Göbel M. W., Scheffer U., Strick A., Ludwig V., Peter S., Kalden E. Metal-free catalysis for the hydrolysis of RNA derived from guanidines, 2-aminopyridines, and 2-aminobenzimidazoles. *J. Am. Chem. Soc.* 2005. 127: 2211-2217.

[42] Baltzer L., Nilsson H., Razkin J. Catalysis of the cleavage of uridine 3'-2,2,2-trichloroethylphosphate by a designed helix-loop-helix motif peptide. *J. Am. Chem. Soc.* 2007. 129: 7611-7619.

[43] Reinhoudt D. N., Engbersen J. F. J., Molenveld P. Synthesis of a dinuclear ZnII- calyx[4]areno enzyme model with additional general base groups- catalytic activity in phosphate diester transesterification. *Eur. J. Org. Chem.* 1999. 3269-3275.

[44] Kawai M., Yamada K., Takashi Y., Yamamura H., Araki S., Saito K. Phosphodiester bond cleavage mediated by a cyclic  $\beta$ -sheet peptide-based dinuclear zinc (II) complex. *Chem. Commun.* 2000. 1315–1316.

[45] Kondo S., Yoshida K., Yano Y. A remarkable rate-accelerating metal ion effect on the intramolecular transesterification reaction of a phosphodiester in acetonitrile. *J. Chem. Research (S)*. 1999, 106-107.

[46] Krämer R., Fritsky I. O., Ott R., Pritzkow H. An Allosteric Synthetic Catalyst: Metal Ions Tune the Activity of an Artificial Phosphodiesterase. *Chem. Eur. J.* 2001, 7(6): 1221-1231

[47] Hamann B. Ureas in molecular recognition: complexation and encapsulation. *Ph. D. Thesis. Massachusetts Institute Technology.* 1996.

[48] Kalesse M., Filippazzi A., Oost T. Bis(guanidinium) receptors as ribonuclease active-site metal system: structural changes and solvent effects. *Liebigs Ann./Recueil* 1997. 1005-1011.

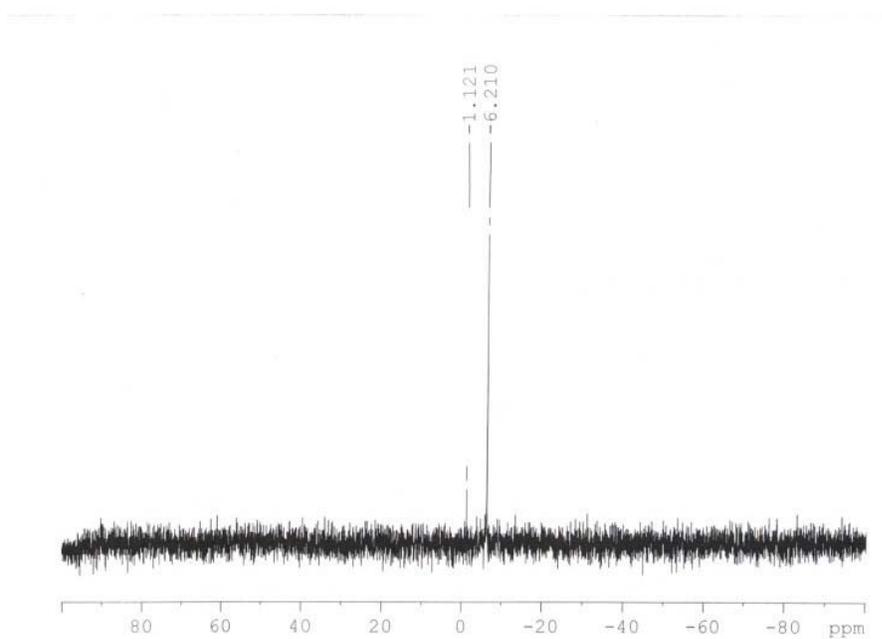
[49] Brown D. M., Usher D. A. Hydrolysis of hydroxyalkyl phosphate esters: effect of changing ester group. *J. Chem. Soc.* 1965. 6558-6564.

- [50] E.H.Baughman, M. M. Kreevoy, Determination of acidity in 80% dimethyl sulfoxide-20% water. *J.Phys.Chem.* 1974. 78, 421-423.
- [51] Fiordiponti P., Rallo F., Rodante F. Potentiometric determination of the autoprotolysis constants of water-dimethylsulfoxide mixtures at different temperatures and related thermodynamic quantities. *Z.Phys.Chem.N.F.* 1994. 88:149
- [52] Bordwell F. G. Equilibrium acidities in dimethyl sulfoxide solution. *Acc. Chem. Res.* 1988. 21: 456-463.
- [53] Lide D. R. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 84<sup>TH</sup> edition. 2003-2004. CRC Press
- [54] Jencks W.P. Catalysis in Chemistry and Enzimology. 1987. Dover Publications Inc. New York, USA.
- [55] Göbel M. W., Bats J. W., Dürner G. En route to synthetic phosphodiesterases: supramolecular phosphoryl-transfer mediated by amidinium-phosphate contact ion-pairs. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1992. 31: 207-209.
- [56] Sánchez-Lombardo I., Yatsimirsky A. Simplified speciation and improved phosphodiesterolytic activity of hydroxo complexes of trivalent lanthanides in aqueous DMSO. *Inorg. Chem.* 2008. 47: 2514-2525.
- [57] Gilliland G. L., Wladkowski B. D., Svensson L. A., Sjolín L., Ladner J. E. Structure (1.3 Å) and charge states of a ribonuclease A-uridine vanadate complex: implications for the phosphate ester hydrolysis mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 1998. 120:5488-5498.

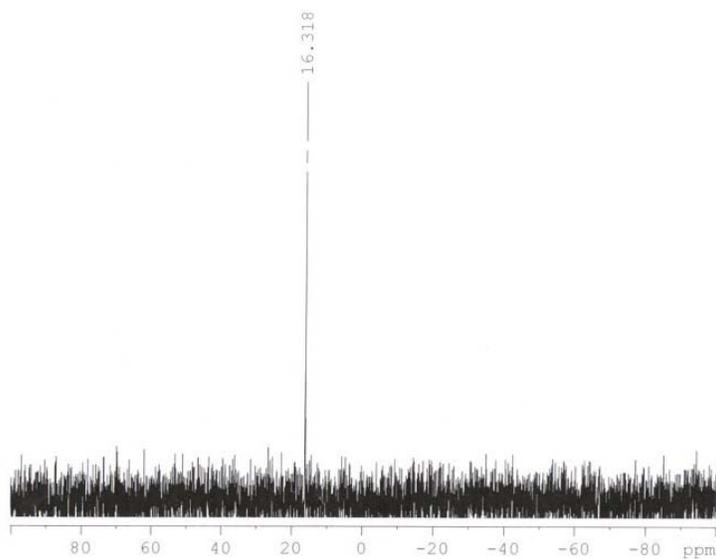
[58] Johansson A., Johansson S. Automatic titration by stepwise addition of equal volumes of titrant. *The Analyst*. 1978. 103(1225):305-316.

[59] Taran O. Catálisis con metales alcalinotérreos en hidrólisis con esters de fosfato. *Tesis de maestría. UNAM. 2006.*

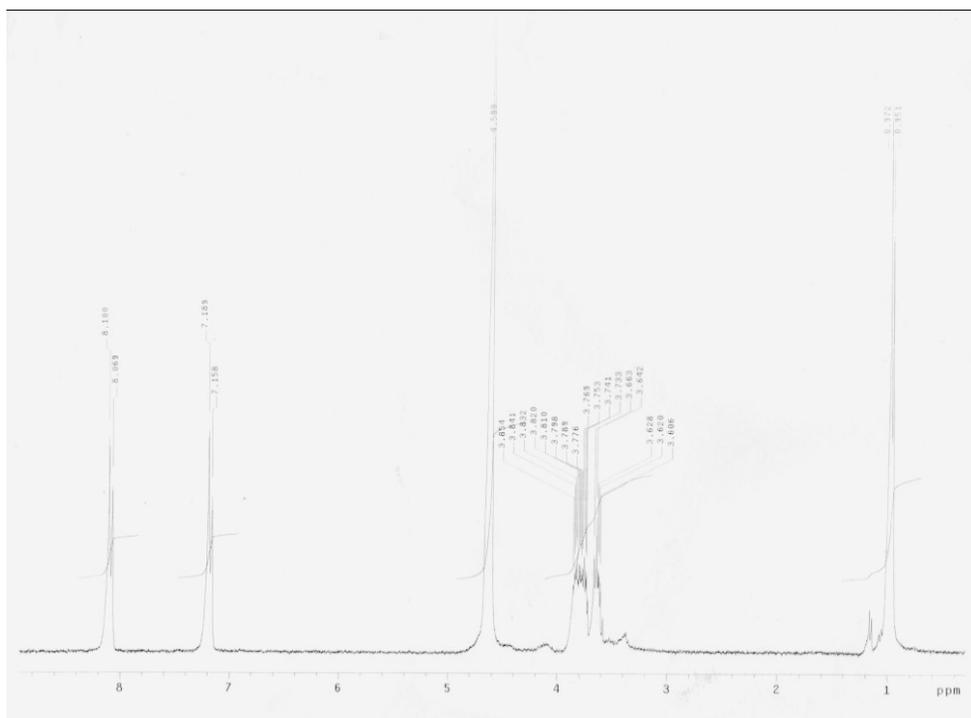
## APÉNDICE I



Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  del HpNPP antes de la reacción de transesterificación con guanidina neutralizada al 50% en DMSO acuoso al 80%.



Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  del HpNPP después de la reacción de transesterificación con guanidina neutralizada al 50% en DMSO acuoso al 80%.



Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del HpNPP

## APÉNDICE II

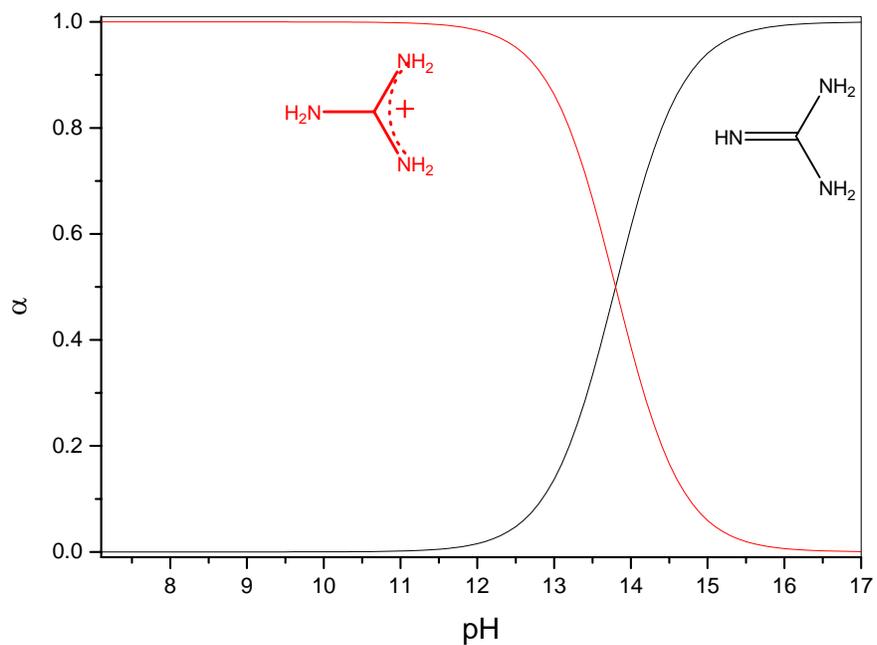


Diagrama de distribución de especies de guanidina

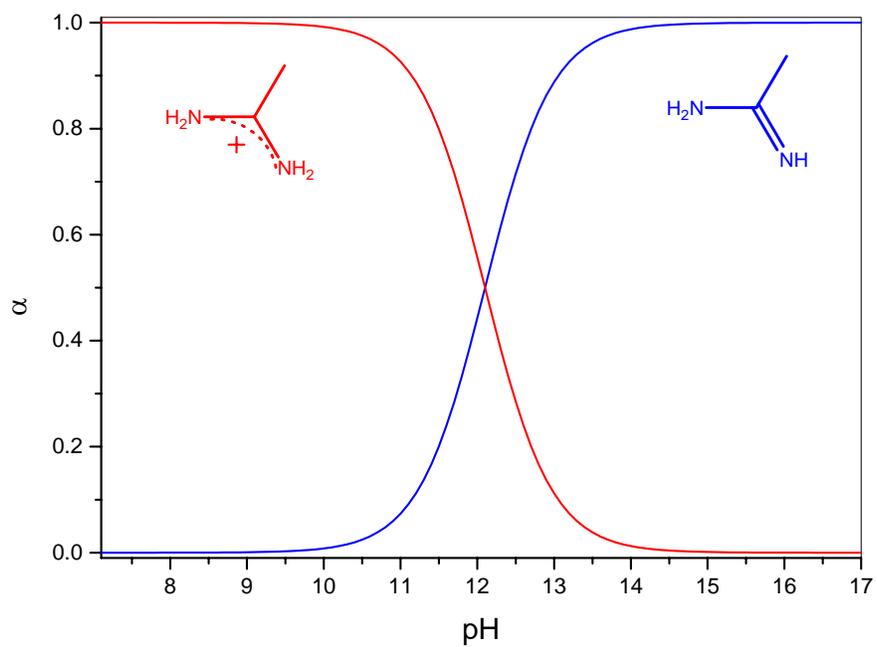


Diagrama de distribución de especies de la acetamidina

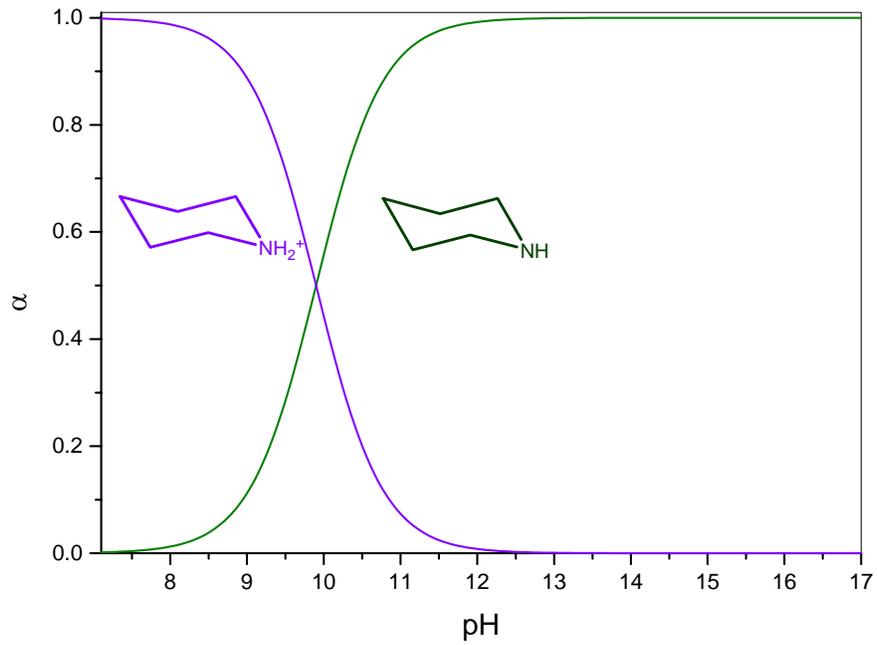


Diagrama de distribución de especies de la piperidina

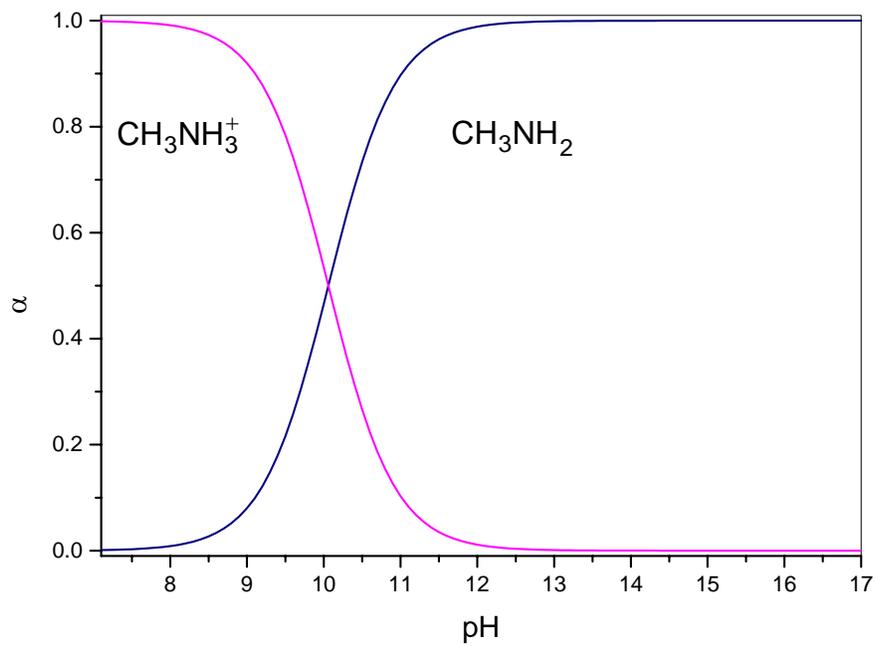
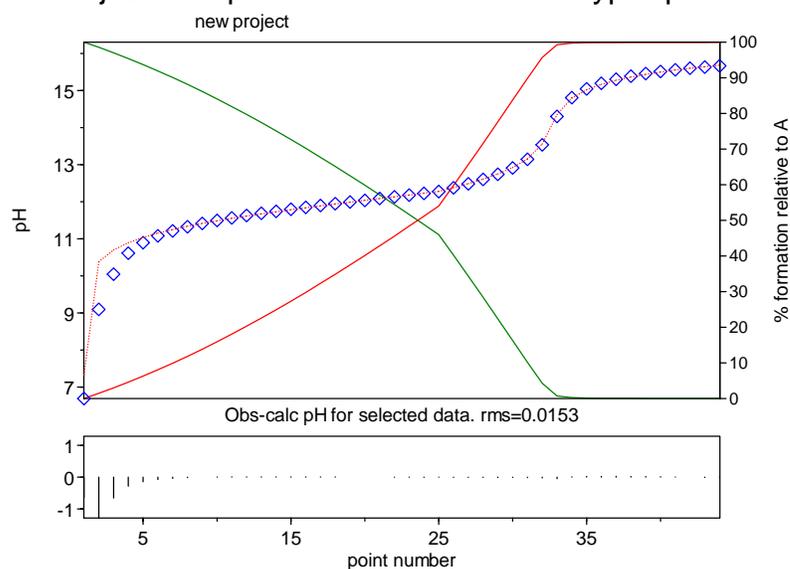


Diagrama de distribución de especies de la metilamina

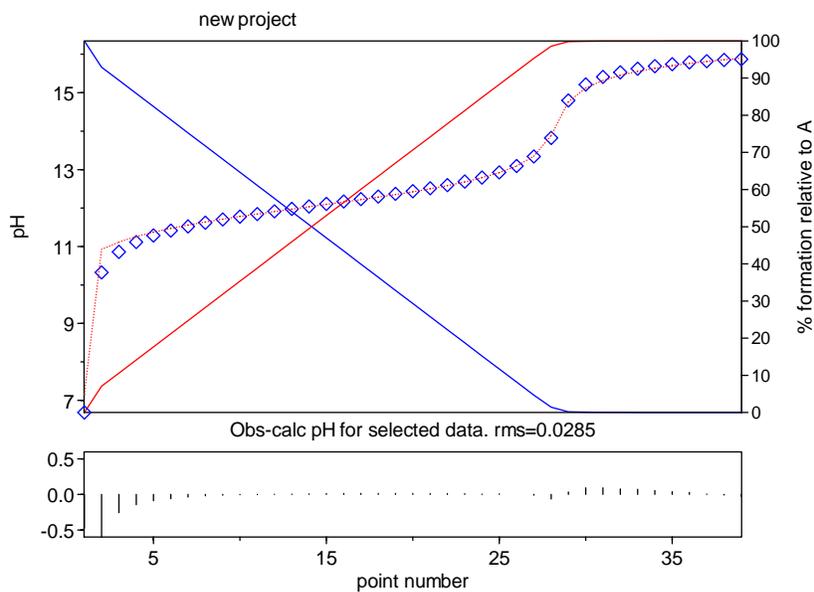
### Ajuste del pKa de acetamidinio en Hyperquad



sigma = 49.7612

AMD	H	Valor	Desv. Estándar rel.	log $\beta$	Desv. estándar
1	1	$1.1032 \times 10^{12}$	0.0190	12.0427	0.0083

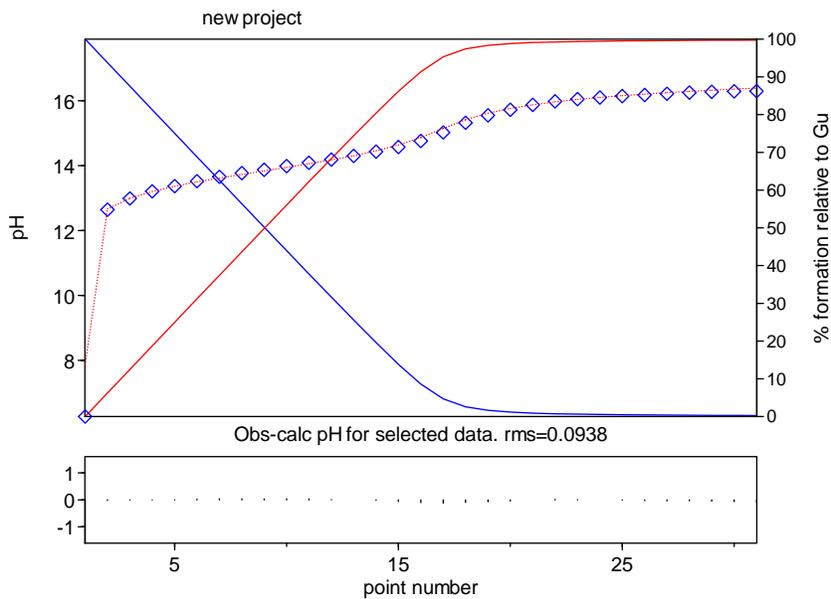
### Ajuste del pKa de acetamidinio en Hyperquad



sigma = 19.5011

AMD	H	Valor	Desv. Estándar rel.	log $\beta$	Desv. estándar
1	1	$1.6170 \times 10^{12}$	0.0289	12.2087	0.0126

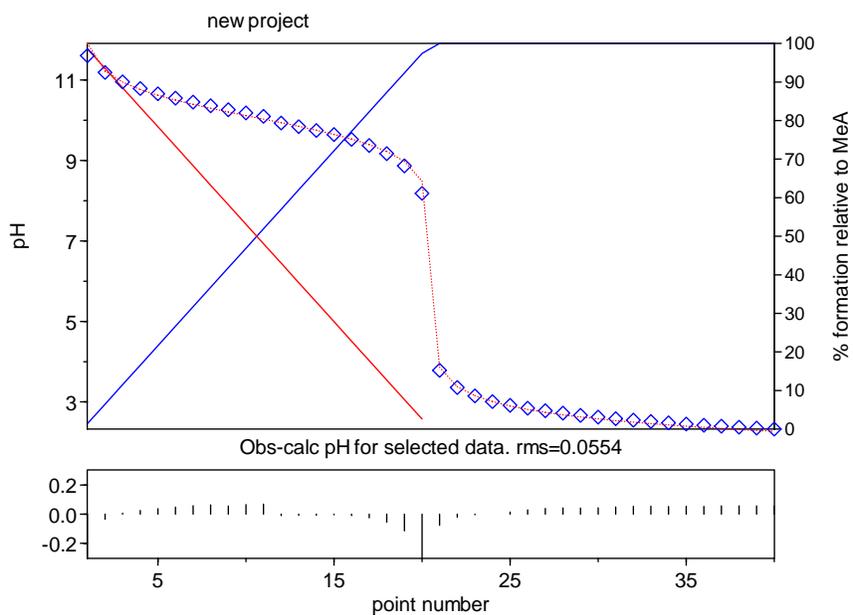
### Ajuste del pKa de guanidinio en Hyperquad



sigma = 31.5463

Gu	H	Valor	Desv. Estándar rel.	log $\beta$	Desv. estándar
1	1	$6.9410 \times 10^{13}$	0.2627	13.8414	0.1141

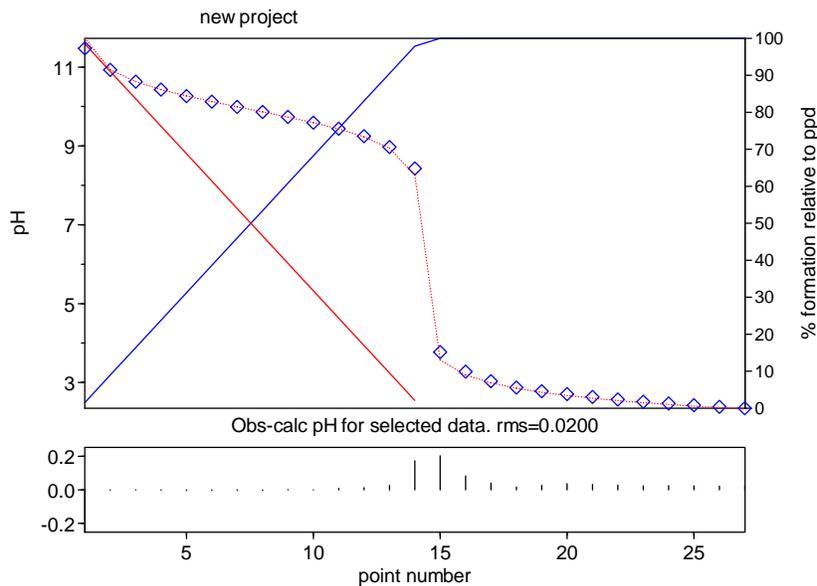
### Ajuste del pKa de metilamonio en Hyperquad



sigma = 32.9033

MeNH <sub>2</sub>	H	valor	Desv. Estándar rel.	log $\beta$	Desv. estándar
1	1	$1.1566 \times 10^{10}$	0.0574	10.0632	0.0249

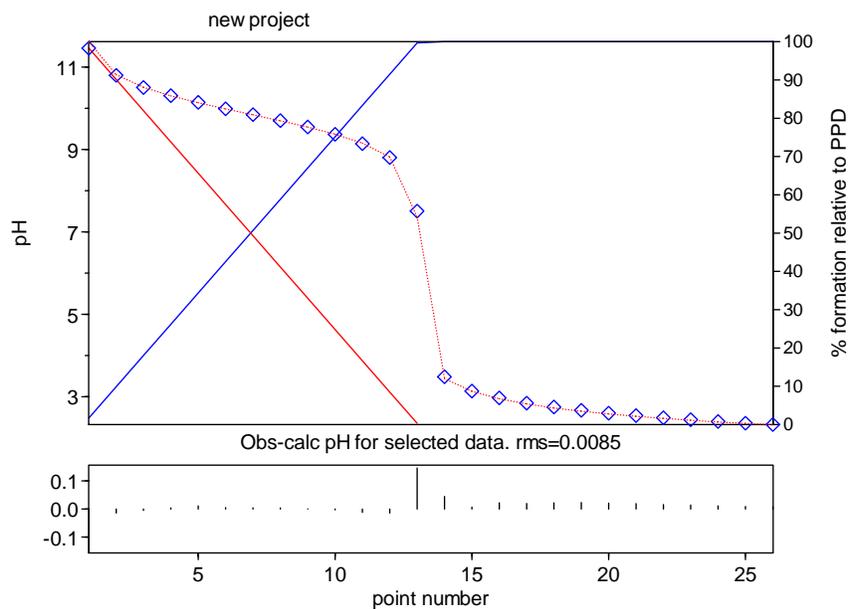
### Ajuste del pKa de piperidinio en Hyperquad



sigma = 12.7299

PPD	H	valor	Desv. Estándar rel.	log $\beta$	Desv. estándar
1	1	$8.3762 \times 10^9$	0.0321	9.9230	0.0139

### Ajuste del pKa de acetamidinio en Hyperquad



sigma = 7.6518

PPD	H	valor	Desv. Estándar rel.	log $\beta$	Desv. estándar
1	1	$7.1013 \times 10^9$	0.0218	9.8513	0.0095