



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

*ESTUDIOS DE LA HIDRÓLISIS BIOMIMÉTICA POR EL MECANISMO ÁCIDO
BASE DE SUSTRATOS MODELOS DEL ARN*

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

DAVID OCTAVIO CORONA MARTÍNEZ



TUTOR: ANATOLY YATSIMIRSKY

AÑO: 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

PRESIDENTE Dra. Silvia Elena Castillo Blum

VOCAL Dr. Ronan Marie Le Lagadec

VOCAL Dr. Felipe Medrano Valenzuela

VOCAL Dr. Julio César Aguilar Castillo

SECRETARIO Dr. José Ivan Castillo Pérez

Asesor

Dr. Anatoly Yatsimirsky

Sustentante

M. C. David Octavio Corona Martínez

Este trabajo se realizó en el laboratorio 213 de la Facultad de Química de la UNAM y se presentó en los siguientes congresos:

238th American Chemical Society National Meeting & Exposition, realizado del 16 al 20 de agosto de 2009 en la ciudad de Washington, DC.

240th American Chemical Society National Meeting & Exposition, realizado del 22 al 26 de agosto de 2010 en la ciudad de Boston, MA.

45° Congreso Mexicano de Química en la Riviera Maya, Quintana Roo del 18 al 22 de septiembre de 2010.

DEDICATORIA

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

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Químicas y a la UNAM.

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

Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado, número de becario: 205048.

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

A la DGAPA-UNAM por el financiamiento del proyecto IN 203408

CONTENIDO

	Página
Resumen	1
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Catálisis ácido-base	6
2.1.1 Análisis de Brønsted.	9
2.2 Efectos isotópicos Cinéticos	12
2.3 Estudios Biomiméticos	18
3. OBJETIVOS DEL TRABAJO	43
4. MATERIALES Y MÉTODOS	44
4.1 Reactivos	44
4.1.1 Disolventes	49
4.1.2 Sustrato	50
4.1.2.1 Reactivos usados en la síntesis del sustrato	50
4.1.2.2 Síntesis del sustrato	50
4.1.3 Bases	51
4.1.4 Sales	52
4.1.5 Ácidos	52
4.2 Equipo	52
4.3 Programas	53
4.4 Estudios potenciométricos	53
4.5 Estudios cinéticos	56
4.6 Titulaciones por RMN ³¹ P	59
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
5.1 Determinación de los valores de pK _a de los pares ácido-bases utilizados en DMSO acuoso	62
5.2 Estudios de transesterificación del HpNPP con los sistemas amortiguados benzamidina-benzamidinio y aminoguanidina-aminoguanidinio	66
5.3 Correlaciones de Brønsted para la transesterificación del	75

HpNPP en la mezcla de DMSO-agua 4:1 mediante una catálisis básica	
5.4 Análisis de la catálisis mediante el tratamiento de la asociación con el estado de transición	80
5.5 Efectos Isotópicos de disolvente para la transesterificación del HpNPP en la mezcla DMSO-agua a 37°C.	84
5.6 Estudios de transesterificación del HpNPP en la mezcla DMSO-agua a 37°C en sistemas amortiguados con varios tipos de cationes.	90
5.7 Estudios de transesterificación del HpNPP en agua a 37°C con varios tipos de cationes.	112
6. CONCLUSIONES	119
7. PERSPECTIVAS	121
8. BIBLIOGRAFÍA	122
9.1 Apéndice I	136
9.2 Apéndice II	137
9.3 Apéndice II	139
Artículo publicado	140

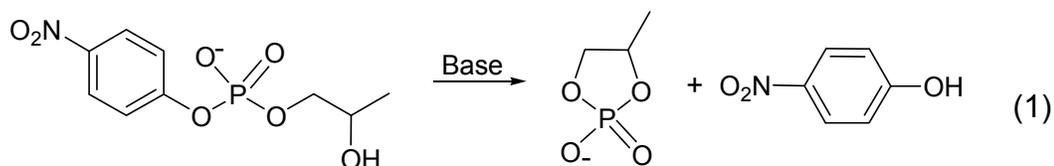
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ε	Absortividad molar
ϕ	Fracción de fraccionamiento
ΔG	Cambio en la Energía de Gibbs
A	Absorbancia
3',5'-ApA	Adenil (3'→5') adenina monofosfato
3',5'-UpU	Uridil (3'→5') uridina monofosfato
4-NFF	4-nitrofenilfosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGu	Aminoguanidina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNr	ARN ribosomal
ARNr 16S/23S	ARN ribosomal (16 Svedberg y de 23 Svedberg)
ARNt	ARN de transferencia
B	Base general
BISTRIS	2-[bis-(2-hidroxietil)-amino]-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
BNPP	Bis nitrofenilfosfato
d ₆ -DMSO	Dimetilsulfóxido deuterado completamente
DMSO	Dimetilsulfóxido
Gu	Guanidina
HAGu ⁺	Aminoguanidinio
HB ⁺	Forma protonada de una base general
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HGu ⁺	Guanidinio
Him ⁺	Imidazolio
His	Histidina
HpNPP	2-hidroxi-4-nitrofenilfosfato o 2-hidroxi- <i>p</i> -nitrofenilfosfato
I	Fuerza iónica
K	Constante de rapidez

k_{NC}	Constante de rapidez para la reacción no catalizada
K_m	Constante de Michaelis-Menten
k_{cat}	Constante de rapidez de la reacción catalizada
k_{OH}	Constante de rapidez para la hidrólisis alcalina
k_{Im}	Constante de rapidez para la hidrólisis catalizada por imidazol
k_{obs}	Constante de rapidez observada
K_a	Constante de acidez
K_w	Constante de ionización del agua
K^{\ddagger}_T	Constante de asociación con el estado de transición
k_D	Constante de rapidez en un medio deuterado
k_B	Constante de rapidez para la catálisis básica general
$k_{B,HB}$	Constante de rapidez para la catálisis básica general asistida por la ruta ácida general
k_M	Constante de rapidez para la catálisis con cationes
$k_{M,OH/B}$	Constante de rapidez para la catálisis con cationes asistida por la base específica/base general
MES	Ácido 2-(4-morfolin)etanosulfónico o ácido 2-(N-morfolin)-etanosulfónico
MOPS	Ácido 3-morfolinpropano-1-sulfónico o ácido 3-N-morfolinpropanosulfónico
pA	La p minúscula indica el cologaritmo de la función A
PIPES	Ácido 1,4-piperazindietanosulfónico
PPD	Piperidina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SDS	Dodecil sulfato de sodio o lauril sulfato de sódio
TRIS	2-amino-hidroximetil-propano-1,3-diol
TTUTT	Oligonucleótido conformado por 4-deoxitimidina y una uridina

RESUMEN

El trabajo presenta el estudio cinético de la reacción de transesterificación del fosfodiéster modelo del ARN 2-hidroxipropil-4-nitrofenilfosfato, HpNPP, (reacción 1) en DMSO acuoso al 80% (v/v) a 37°C en presencia de amortiguadores de basicidad variable. En una segunda etapa se estudió el efecto de algunos cationes metálicos del bloque s (calcio, magnesio, litio, sodio, potasio) sobre la catálisis con amortiguadores.



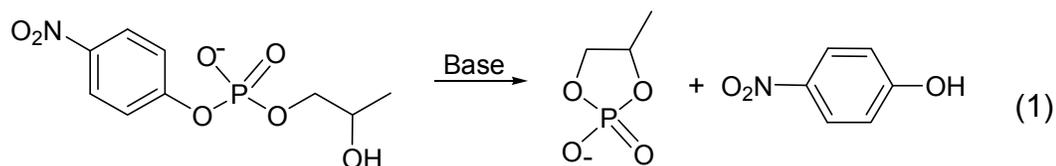
En este medio de reacción la catálisis básica específica se suprime bastante si se compara con su contribución en agua al mismo valor de pH gracias al desplazamiento del pK_w hasta 18.8, esto nos permitió observar la catálisis con amortiguadores muy básicos (guanidina, aminoguanidina y benzamidina) con una actividad catalítica alta. Lo anterior permitió emplear las bases en concentraciones bajas evitando así afectar las propiedades del medio (efecto de codisolvente) lo cual es un problema en los estudios cinéticos en agua. El análisis cinético arrojó la ley de rapidez $k_{obs} = k_1[B] + k_2[B][HB^+]$, donde B es la forma neutra y HB^+ la forma protonada del amortiguador, que corresponde a dos rutas para la reacción (1): la catálisis básica general (k_1) y una catálisis bifuncional que involucra la acción concertada de la forma neutra y protonada del amortiguador (k_2). Los logaritmos de las constantes de rapidez k_1 y k_2 en función del pK_a del amortiguador obedecen la ecuación de Brønsted, con pendientes de 0.77 y 0.69, respectivamente. En el inventario de protones (efecto isotópico) para la ruta k_2 de guanidina en las mezclas de D_2O/H_2O se obtuvieron dos factores de fraccionamiento $\phi_1 = 0.48$ y $\phi_2 = 1.26$, que indican un efecto isotópico normal y uno inverso, respectivamente. El primero corresponde a una transferencia de un protón a la base, mientras que el segundo

indica la unión del catión guanidinio con el grupo fosfato con un efecto isotópico inverso como se encontró en los estudios de asociación entre los cationes guanidinio y amidinio con un fosfodiéster. Los resultados cinéticos aunados al análisis de las energías de Gibbs para la estabilización del estado de transición para los cationes guanidinio y amidinio muestran que la forma protonada del amortiguador actúa mediante una estabilización electrostática del estado de transición en lugar de una posible transferencia de protones.

Los cationes metálicos estudiados en el sistema amortiguado con piperidina cooperan sólo con la catálisis básica específica con excepción de los cationes sodio y magnesio que además cooperan con la catálisis básica general. Adicionalmente se probó un mecanismo por esfera externa mediante la utilización de los cationes $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, $\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}^{2+}$, $\text{Co}(\text{en})_3^{3+}$, que no ha sido informado en sistemas modelos, además estos mostraron ser más eficientes que el catión guanidinio. El análisis de Brønsted con magnesio(II) en presencia de diferentes bases (3-metoxipropilamina, 2-metoxietilamina, morfolina, imidazol y 4-dimetilpiperidina) proporciona un valor de pendiente de 0.33, que indica la baja sensibilidad a la basicidad del catalizador y puede dar una explicación a la alta eficiencia de las ribozimas dependientes de magnesio que operan mediante un mecanismo con asistencia básica general de las nucleobases. Finalmente, los experimentos en agua para la catálisis con cationes metálicos y guanidinio junto con las mediciones de su afinidad a un monoéster fosfato (modelo del estado de transición) nos permitió mediante el empleo de datos relevantes de otros trabajos realizar un análisis extenso del tipo de interacciones responsables para la estabilización del estado de transición en la reacción (1) con catalizadores electrofílicos.

ABSTRACT

In this work we present a kinetic study of transesterification of an RNA model, 2-hydroxypropyl-*p*-nitrophenylphosphate (HpNPP) (reaction (1)) in 80% vol. aqueous DMSO in the presence of buffers of variable basicity. In the second stage, the effects of some s block metal ions (calcium, magnesium, lithium, sodium and potassium) on the buffer catalysis are investigated.



This medium strongly suppresses the contribution of specific base catalysis at a given pH due to pK_w shift to 18.8. This allows one to use highly basic buffers (guanidine, aminoguanidine and benzamidine) with a significant catalytic activity in the 0.01–0.1 M concentration range, avoiding the interference from medium effects (cosolvent effects) present in the kinetic studies in water. The rate law $k_{obs} = k_1[B] + k_2[B][HB^+]$ was established indicating contributions from both simple general base catalysis (k_1) and the reaction involving concerted action of neutral (B) and protonated (HB^+) forms of the buffer (k_2). Both k_1 and k_2 obey the Brønsted equation with slopes 0.77 and 0.69, respectively. The proton inventory for k_2 (B = guanidine) in D_2O/H_2O mixtures gives two fractionation factors $\phi_1 = 0.48$ and $\phi_2 = 1.26$ for normal and inverse isotope effects, respectively. The ϕ_1 factor corresponds to proton transfer to B and the ϕ_2 factor corresponds to binding of guanidinium cation to phosphate group as follows from observation of an inverse solvent isotope effect for the binding of guanidinium and amidinium cations to phosphodiester anion. The results of the kinetic studies together with analysis of transition state stabilization Gibbs energies for guanidinium and amidinium cations show that the protonated buffer component acts via electrostatic transition state stabilization rather than proton transfer.

The metal ions studied in the buffer system (B = piperidine) accelerate only the specific base catalysis, except for magnesium and sodium which cooperate with general base catalysis as well. Additionally, an outer-sphere mechanism was found through the use of $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, $\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}^{2+}$, $\text{Co}(\text{en})_3^{3+}$ cations, never reported before in model systems. These cations show a more efficient catalysis than the guanidinium cation does. The Brønsted analysis with magnesium(II) in the presence of different bases (3-methoxypropylamine, 2-methoxyethylamine, morpholine, imidazole and 4-N-dimethylpiperidine) gives a slope of 0.33. This value indicates a low sensibility towards catalyst basicity and could provide an explanation of high efficiency of magnesium-dependent ribozymes employing the mechanism of general base assistance of nucleobases. Finally, the kinetic and binding studies in water with the metal ions and guanidinium cation together with relevant literature data allowed us to analyze the types of interactions responsible for the transition state stabilization for reaction (1) with electrophilic catalysts.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los grupos funcionales más ubicuos en la naturaleza son los ésteres fosfato. Este grupo es muy importante desde el punto de vista bioquímico, ya que están involucrados en muchos procesos del metabolismo tales como la glucólisis, glucogenólisis (mediante las fosforilaciones y desfosforilaciones), la respiración celular, la transmisión de impulsos nerviosos y el almacenamiento de la información genética [1 y 2]. Los ésteres de fosfato son especies cinéticamente muy estables a la hidrólisis alcalina según el 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]. Los fosfodiésteres son poco reactivos debido a que la única carga negativa que se forma (la cual se comparte entre dos oxígenos) los hace menos electrofílicos en comparación con los triésteres (en el caso del monoéster, el mecanismo de ruptura es diferente). La reactividad de los diésteres dependerá significativamente del nucleófilo y del grupo saliente [5].

En sistemas biológicos 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 [6]. 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 puedan funcionar como agentes terapéuticos y tener otros usos potenciales [7, 8]. En estudios recientes se ha encontrado que el empleo de medios de reacción de polaridad reducida, respecto al agua, incrementa notablemente la eficiencia catalítica de iones, complejos metálicos y algunos sistemas que utilizan una catálisis ácido-base [9, 10]. En el presente trabajo, se estudió el efecto que tiene la catálisis con amortiguadores derivados de amidinios y algunos cationes sobre la reacción de transesterificación del sustrato modelo del ARN, 2-hidroxiopropil-*p*-nitrofenilfosfato en mezclas de DMSO acuoso, con el propósito de conocer el mecanismo de reacción.

2. ANTECEDENTES

2.1 Catálisis ácido-base

Mucha de la información acerca del mecanismo de una reacción puede obtenerse a partir del conocimiento de cuales sustancias catalizan la reacción, cual la inhibe o cual no modifica su rapidez [11]. La catálisis es un término utilizado para designar una reacción en donde participa un catalizador, es decir, es el proceso donde actúa el catalizador. Un catalizador es cualquier sustancia que puede acelerar la rapidez de una reacción sin modificar el cambio en la energía de Gibbs estándar total en la reacción [12]. El catalizador es tanto un reactivo como un producto de la reacción, en otras palabras no presenta un cambio durante la reacción. Sin embargo, en la actualidad se conocen múltiples ejemplos donde algunas sustancias clasificadas como catalizadores son destruidas como resultado del proceso que cataliza o debido a una subsecuente combinación con los productos. Es importante señalar que el término catalizador o catálisis no debe utilizarse cuando las sustancias añadidas disminuyen o retardan la rapidez de una reacción, ya que estas sustancias reciben el nombre de inhibidor [13].

Desde un punto de vista práctico, un catalizador es una sustancia que acelera una reacción sin considerar el destino de dicha sustancia. Un ejemplo de esto es la reacción de Friedel-Crafts, en donde el cloruro de aluminio no siempre puede recuperarse ya que puede formar un complejo con los productos, sobre todos en los productos de la acilación. Además, el cloruro de aluminio debe usarse en cantidades estequiométricas a los reactivos y no en cantidades “catalíticas” debido a la misma razón. El concepto de cantidades “catalíticas” depende de dos principales suposiciones: la no destrucción del catalizador y una alta eficiencia catalítica, por lo que en ocasiones el término cantidades catalíticas puede ser usado mejor en sustancias que son iniciadores (como los utilizados en las reacciones por radicales libres) o activadores [13,14].

Un criterio importante para identificar a un catalizador, es el hecho de que se presenta cambio en el mecanismo de la reacción original, induciendo a uno en donde la barrera energética general sea más baja, provocando de este modo un aumento en la rapidez de la reacción. El cambio en el mecanismo puede involucrar varios pasos extras cuyas barreras energéticas son menores que las de las reacciones sin catalizar (ver Figura 1). La catálisis puede clasificarse como catálisis homogénea (donde está involucrada una sola fase) y la heterogénea (en la cual la reacción ocurre en o cerca de la interfase de dos fases). También se conocen los términos autocatálisis (empleado cuando uno de los productos de la reacción es el que lleva a cabo la catálisis) y la catálisis intramolecular (utilizado si un grupo dentro de la molécula del reactivo cataliza alguna reacción sobre la misma) [11,13-17].

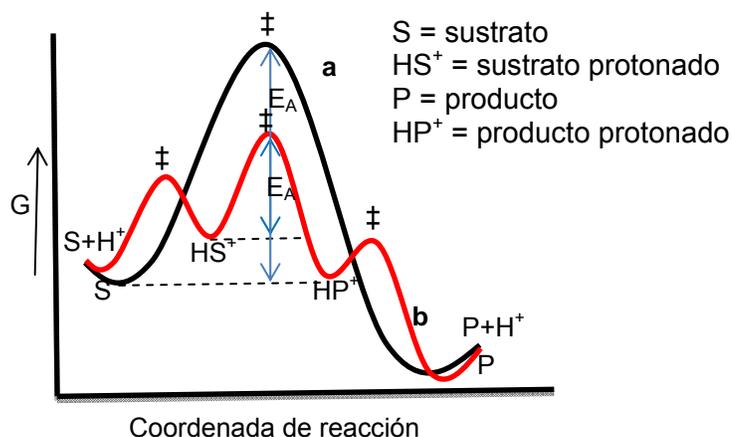


Figura 1. Perfil de Energía de Gibbs para una reacción sin catalizar (a) y una reacción catalizada por ácido (b).

Dentro de la catálisis homogénea existen diferentes tipos de catálisis, la organometálica, la biocatálisis, la catálisis covalente, la catálisis ácido-base, entre otras. En este trabajo nos enfocaremos en el estudio de la catálisis ácido-base por lo que se hará una revisión general de algunos conceptos que se usarán a lo largo del trabajo, como la catálisis ácido-base general y específica, además de las relaciones de Brønsted.

Muchas reacciones sólo pueden tener constantes de rapidez apreciables en condiciones estándar cuando tienen influencia de un ácido o una base añadida,

como la hidrólisis de ésteres y amidas que requieren de ácido o base para tener constantes detectables. La catálisis ácido base ocurre cuando el sustrato es más reactivo después de una protonación o desprotonación, respectivamente. Desde hace tiempo se conoce que en la catálisis ácido-base no sólo participan los iones hidronio e hidróxido, sino también otros ácidos o bases débiles [13,14,17]. La ecuación empírica para la rapidez de una reacción con este tipo de catálisis es:

$$v = [S](k_0 + k_{H^+}[H^+] + k_{OH^-}[OH^-] + k_{HA}[HA] + k_B[B]) \quad \text{Ec. 1}$$

En la ecuación anterior, HA representa a un ácido débil y B a una base débil y k_{HA} , k_B son sus respectivas constantes catalíticas. Cuando la catálisis se lleva a cabo por otras especies diferentes a los iones hidronio e hidróxido, se le conoce como catálisis ácido-base general. Mientras que la catálisis en donde participan los iones mencionados anteriormente (H^+ y OH^-) recibe el nombre de catálisis ácido-base específica. Ambos tipos de catálisis puede distinguirse experimentalmente mediante la observación de la dependencia de la rapidez de la reacción con la concentración del amortiguador.

Un modo de discriminar experimentalmente entre ambas rutas es realizar experimentos con una serie de soluciones amortiguadas. En una serie de experimentos variando la concentración total del amortiguador manteniendo constante la proporción de neutralización del mismo. Otro experimento podría hacerse manteniendo la concentración del amortiguador constante y variando la fracción de neutralización del amortiguador. Si en el primer experimento obtenemos una gráfica de la dependencia de la constante de rapidez con la concentración del amortiguador y observamos una dependencia lineal (o no lineal en algunos casos) con una pendiente mayor que cero, estaremos hablando de una catálisis ácido-base general. En este caso el segundo experimento ayudaría a discriminar si la dependencia es con la base, con la forma ácida o con ambas formas del amortiguador [7, 8].

Sin embargo, si en el primer experimento obtenemos una gráfica con pendiente de cero y en el segundo una gráfica en donde exista una dependencia de la constante

de rapidez con la fracción de neutralización (que está directamente relacionada con la concentración de los iones hidronio e hidróxido) con pendiente mayor a cero, estaremos en el caso de una reacción catalizada por la ruta ácido-base específica. Un modo de analizar la catálisis ácido-base general es mediante el empleo de las relaciones de Brønsted, las cuales se mencionan a continuación.

2.1.1 Análisis de Brønsted.

La eficiencia de los catalizadores ácido-base general se podría esperar que aumentara con la fuerza de los ácidos o bases [18,19]. La existencia de una relación lineal entre las constantes catalíticas k_{cat} y las constantes de acidez (K_a o K_b) expresada por las ecuaciones 2 y 3, es conocida como relación de Brønsted [18]. En la forma logarítmica de la ecuación de Brønsted, la pendiente es una medida de la sensibilidad de la reacción a la fuerza del catalizador. La relación de Brønsted es una relación lineal de energía libre, ya que es una correlación entre el logaritmo de la constante de rapidez de una serie de reacciones y el logaritmo de las constantes de equilibrio para una serie de reacciones relacionadas. Este nombre se da porque el logaritmo de una constante de equilibrio (a temperatura y presión constante) es proporcional al cambio en la energía libre estándar (Energía de Gibbs) y el logaritmo de una constante de rapidez es una función lineal de la energía libre (Energía de Gibbs) de activación [20].

$$k_{HA} = G_a(K_a)^\alpha \quad \Rightarrow \quad \log k_{HA} = \log G_a + \alpha \log(K_a) \quad \text{Ec. 2}$$

$$k_B = G_b(K_b)^\beta \quad \Rightarrow \quad \log k_B = \log G_b + \beta \log(K_b) \quad \text{Ec. 3}$$

La transferencia del protón de un ácido a una base, puede expresarse mediante el intersección de las curvas de energía potencial para dos enlaces B–H involucrados en una transferencia de protones, como se muestra en el esquema de la Figura 2. El cambio de una base con otra más fuerte disminuye la energía de activación para la transferencia de protones, la cual varía linealmente con el pK_a [20,21]. Las relaciones de Brønsted, son ampliamente usadas no sólo porque dan predicciones del

comportamiento de una reacción sino también son un indicador del mecanismo de la reacción. Incluso el exponente de Brønsted es un indicativo de la extensión del protón en el estado de transición [17, 21].

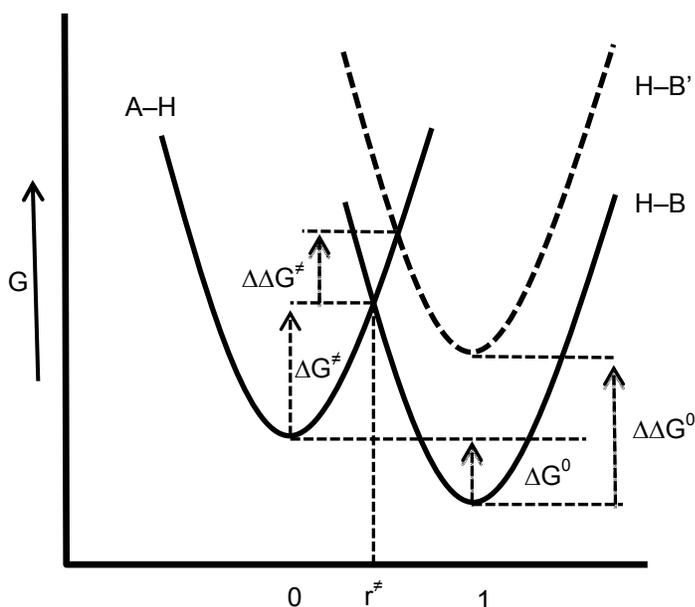


Figura 2. Esquema de un diagrama de energía en función de la distancia de enlace a lo largo de la reacción (coordenada de reacción) en una transferencia de protones.

Los coeficientes α y β de la ecuación de Brønsted son una medida de la sensibilidad de la reacción catalizada con la fuerza en agua de sus catalizadores (ácidos o bases). En las reacciones en las cuales la transferencia del protón es parte del paso de activación el valor de estos parámetros debe estar en el intervalo de 0 a 1. Una perturbación en el sistema reaccionante, como el cambiar un sustituyente en uno de los reactivos, cambiará la energía de Gibbs de su estado de transición en una cantidad intermedia entre las energías de Gibbs de los reactivos y los productos [17, 20] esto puede expresarse matemáticamente por la ecuación 4, donde δ_R es un operador que denota el efecto del cambio del sustituyente, G^\ddagger , G^0_R y G^0_P son las energías de Gibbs del estado de transición, los reactivos y los productos, respectivamente:

$$\delta_R G^\ddagger = \alpha \delta_R G_P^0 + (1-\alpha) \delta_R G_R^0 \quad \text{Ec. 4}$$

El parámetro α mide la posición del estado de transición en la coordenada de reacción y toma valores de 0 a 1. Para un valor de $\alpha = 0$, el efecto del sustituyente sobre la energía de Gibbs del estado de transición es similar a la energía de Gibbs de los reactivos. Esto indica que el estado de transición se parece a los reactivos y en el caso de la correlación de Brønsted el protón permanece en el ácido (o la base no ha desprotonado al sustrato). En tanto que para $\alpha = 1$ el efecto del sustituyente sobre la energía de Gibbs del estado de transición es similar a la energía de Gibbs de los productos, lo que implica que el estado de transición es más cercano estructuralmente a los productos, y para la ecuación de Brønsted implica que existe una gran separación del protón del sustrato por la base utilizada. Si reacomodamos la ecuación 4 con $\Delta G^\ddagger = (G^\ddagger - G_R^0)$ y $\Delta G^0 = (G_P^0 - G_R^0)$, obtenemos la ecuación 5, la cual indica que el valor de α es la pendiente de la recta que interseca las dos curvas del diagrama de energía potencial para la transferencia del protón [15,17, 18, 20, 21].

$$\alpha = \delta_R \Delta G^\ddagger / \delta_R \Delta G^0 \quad \text{Ec. 5}$$

La detección experimental de la catálisis ácida o básica general, depende del valor de la pendiente de la gráfica de Brønsted, α o β , la concentración del catalizador y de su fuerza. Lo anterior significa que el catalizador ácido general (o básico general, dependiendo del tipo de catálisis) estabiliza mejor al estado de transición que el protón solvatado, aun cuando el protón sea un ácido más fuerte. Esto se debe a la baja habilidad catalítica relativa del ácido débil se compensa con su mayor concentración respecto a la del protón solvatado a un valor de pH dado [16,17, 18]. Lo anterior es una manera cualitativa de decir que la catálisis ácida general, generalmente no puede ser observada si la pendiente de Brønsted, α , tiene un valor de uno, ya que la baja concentración del protón solvatado será compensada con su gran eficiencia catalítica, haciendo difícil detectar la catálisis por otro tipo de ácidos. De modo similar si $\alpha = 0$, la reacción no será sensible a la fuerza del catalizador ácido, por lo que la catálisis por los ácidos generales añadidos no será detectada por

que la reacción será catalizada de manera más eficiente por el disolvente, ya que estará en mayor concentración que cualquier catalizador añadido.

Lo anterior puede ser entendido de un mejor modo con la Tabla 1 propuesta por Bell, donde se muestra diferentes valores de la pendiente de Brønsted para el agua, el protón solvatado y un ácido general (débil) como el ácido acético 0.1 M (en la presencia de acetato de sodio 0.1 M). Es evidente que la catálisis ácida general por ácido acético será solamente detectable cuando los valores de α sean intermedios. Las mismas consideraciones son aplicadas para la catálisis básica general [16,18].

Tabla 1. Detección de la catálisis ácida general en la presencia de un amortiguador 0.1 M de ácido acético y 0.1 M de acetato de sodio

Brønsted α	Proporción de la catálisis (%) causada por		
	H ⁺	CH ₃ COOH	H ₂ O
0.1	0.002	2	98
0.5	3.6	96.4	0.01
1.0	99.8	0.2	5×10 ⁻²

Tomado de la referencia [16]

2.2 Efectos isotópicos Cinéticos

La sustitución de uno o más átomos en un sistema de reacción como sustituir deuterio (D) por hidrógeno (H) es una prueba elegante usada en la elucidación de los mecanismos. Este tipo de cambios se conocen como efectos isotópicos cinéticos. Los estudios de los efectos isotópicos de disolvente es una técnica muy importante para investigar el papel del disolvente en la reacción [15]. Cuando sustituimos H₂O por D₂O, es inevitable la existencia de muchos efectos de sustitución en diferentes sitios. Los efectos involucrados se pueden describir mediante la teoría de los factores de fraccionamiento [22].

Los efectos isotópicos no afectan las superficies de potencial de energía de una molécula ni perturba los niveles energéticos. Solamente aquellas propiedades que

dependen de la masa de los átomos son las que resultan afectadas. Para los propósitos químicos, la perturbación puede ser considerada en los límites de las frecuencias vibracionales. Cada átomo en una molécula puede moverse en tres dimensiones. Para una molécula no lineal que contiene N número de átomos, se pueden considerar $3N$ modos independientes de movimiento. Sin embargo, seis de esos modos de vibración involucran el movimiento de la molécula sobre ella misma (3 de translación y 3 de rotación), es decir no son vibraciones. Por lo que se presentarán $(3N-6)$ modos normales de vibración, cada uno asociado con una energía vibracional. Además, cada frecuencia de vibración (cada energía) depende de las masas de los átomos que estén vibrando por lo que variarán con las especies isotópicas. La energía vibracional, regularmente cambia durante el curso de una reacción o entre los reactivos y el estado de transición, ya que algunos enlaces se rompen y otros se forman, afectándose de este modo sus frecuencias. Entonces la sustitución isotópica altera la rapidez de las reacciones. La magnitud de estos cambios, es muy dependiente del cambio en las masas de los isótopos involucrados, siendo mayores cuando se cambian H (^1H) por D (^2H) o T (^3H). Por nomenclatura usaremos k_{H} y k_{D} para las constantes de rapidez cuando se usa protio y deuterio, respectivamente [17, 22-25]. Si $k_{\text{H}} \neq k_{\text{D}}$ existe un efecto cinético isotópico y se expresa como la relación $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$. Cuando esta relación toma un valor $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} > 1$ se habla de un efecto isotópico cinético normal. Por otro lado si $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} < 1$, nos referimos a un efecto isotópico cinético inverso. Los efectos isotópicos cinéticos se pueden agrupar en tres grandes grupos: primarios, secundarios y de disolvente.

Los efectos isotópicos cinéticos primarios son aquellos en los que el isótopo participa directamente en la reacción, ya que la ruptura o formación del enlace lo involucra [26]. En los efectos isotópicos secundarios cinéticos, el isótopo no participa directamente en la reacción, pero sí en el estado de transición. Sin embargo puede estar directamente unido al átomo que participa, lo que ocasiona que la rapidez de la reacción disminuya. Generalmente este tipo de efectos isotópicos son pequeños. Los efectos isotópicos de disolvente se presentan cuando un disolvente deuterado reemplaza al no deuterado, provocando un cambio en la rapidez de la reacción. Debido a que este tipo de efectos son los más útiles en el estudio de las reacciones

con catálisis ácido-base, se profundizará más en el origen de su presencia y las posibles interpretaciones, que no son siempre triviales [17,22, 28].

A menudo el disolvente se encuentra involucrado en el mecanismo de la reacción, en donde los efectos isotópicos pueden aparecer. Además, se pueden encontrar los efectos isotópicos de disolvente cuando la solvatación del estado de transición es diferente con el disolvente marcado y con el no marcado. Como es de esperarse, la ruptura del enlace del hidrógeno o el deuterio en el disolvente o una posición intercambiable en el paso determinante de la reacción llevará a un efecto isotópico primario. Algunos disolventes próticos pueden fácilmente intercambiar algunas posiciones específicas de los reactivos (por ejemplo en los grupos OH, NH, SH, los átomos de hidrógeno se pueden cambiar por átomos de deuterio mediante el uso de D₂O), generando compuestos marcados isotópicamente “*in situ*” en el medio de reacción. Las reacciones en las cuales los productos o los reactivos intercambian posiciones con el disolvente, son excelentes candidatos para observar este tipo de efectos isotópicos cinéticos, en particular cuando las posiciones intercambiables están involucradas en el paso determinante de la reacción. En otros casos, los efectos isotópicos cinéticos se presentan a partir de las diferencias entre los complejos activados con los reactivos. Asimismo, existe la posibilidad que el disolvente participe como un reactivo y se una covalentemente al sustrato en el paso determinante de la reacción [17, 22, 29].

Los efectos isotópicos en el equilibrio del intercambio de protones entre un disolvente y varios tipos de solutos son importantes en los estudios de la catálisis ácido-base. El efecto de cambiar el disolvente de H₂O a D₂O puede predecirse mediante el uso de factores de fraccionación isotópica [17, 22, 27, 29-31]. Si consideramos una molécula SH, con un hidrógeno intercambiable, que se pone en una mezcla de disolventes ROH y ROD, la cual alcanza el equilibrio:



Este equilibrio no necesariamente lleva a una distribución estadística para los protones intercambiables, ya que la constante de equilibrio es la diferencia entre los

efectos isotópicos primarios cinéticos para la reacción directa e inversa y estos no necesariamente son iguales. La constante de equilibrio para este proceso, ϕ , es conocido como factor de fraccionación y depende de la naturaleza de S:

$$\phi = \frac{[\text{SD}][\text{RO-H}]}{[\text{SH}][\text{RO-D}]} = \frac{[\text{SD}]/[\text{SH}]}{[\text{RO-D}]/[\text{RO-H}]} \quad \text{Ec. 6}$$

Estos factores son una medida de la preferencia del soluto, en relación al agua y agua deuterada. El valor para el valor de ϕ del grupo hidroxilo, $-\text{OH}$, es de la unidad (en promedio) debido a las similitudes en las frecuencias vibracionales con las del agua [33]; los centros como el $-\text{O}^-$, $-\text{O}^+$ y $-\text{S}^-$ muestran una marcada preferencia hacia isótopos más ligeros ($\phi < 1$). Los factores de fraccionación, podríamos decir, son la suma de todas las diferentes fuerzas constantes en el sitio intercambiable $[\text{X-H(D)}]$ en relación a la suma en el disolvente $[\text{RO-H(D)}]$ [17, 22, 27, 29-32, 34].

El producto de algunos factores de fraccionación conocidos, es una herramienta útil para predecir las constantes de equilibrio relativas en H_2O o D_2O , si consideramos la disociación de un ácido en H_2O o D_2O y la relación entre las constantes de equilibrio para una reacción en D_2O puro (K_D) y en agua pura (K_H), es igual a la relación de los productos de los factores de fraccionamiento de los productos (ϕ_i^P) y los reactivos (ϕ_j^R), la cual se expresa en la ecuación 7:

$$\frac{K_D}{K_H} = \frac{\prod_i^P \phi_i^P}{\prod_j^R \phi_j^R} \quad \text{Ec. 7}$$

Esta relación entre las constantes de equilibrio en estos dos disolventes refleja la habilidad relativa de los reactivos y los productos para aceptar el deuterio sobre el hidrógeno. Si ampliamos este concepto a los experimentos cinéticos aprovechando el tratamiento de la teoría del estado de transición, podemos escribir una ecuación análoga a la ecuación 7, utilizando las constantes de rapidez en lugar de las constantes de equilibrio.

$$\frac{k_D}{k_H} = \frac{\prod_i^{\neq} \phi_i^{\neq}}{\prod_j^r \phi_j^r} \quad \text{Ec. 8}$$

Algo interesante de esta expresión es que es el inverso de la expresión del efecto isotópico cinético. La expresión anterior podemos utilizarla para hacer experimentos en donde se vea el efecto que tiene el cambio de la composición del disolvente (en mezclas H₂O-D₂O) sobre la constante de rapidez. Este tipo de experimentos provee de información mecanística interesante. Las constantes de equilibrio y rapidez están relacionadas con la fracción atómica de deuterio, *n*, mediante la ecuación de Gross-Butler [34-38].

La constante de rapidez, *k_n*, de una reacción en la cual sólo se intercambia un hidrógeno en la mezcla H₂O-D₂O con una fracción atómica de D (*n*), depende de la siguiente forma

$$k_n = k_H(1-n) + k_D(n) \quad \text{Ec. 9}$$

y como $\phi = k_D/k_H$, al sustituir en la ecuación anterior tenemos

$$k_n = k_H(1-n) + \phi k_H(n) = k_H(1 - n + \phi n) \quad \text{Ec. 10}$$

Por lo que la ecuación 8 pueden reescribirse como:

$$\frac{k_D}{k_H} = \frac{\prod_i^{\neq} (1 - n + n\phi_i^{\neq})}{\prod_j^r (1 - n + n\phi_j^r)} \quad \text{Ec. 11}$$

Una gráfica de *k_n* en función de *n*, tomará una forma característica del número de protones involucrados en la reacción, como se muestra en la Figura 3.

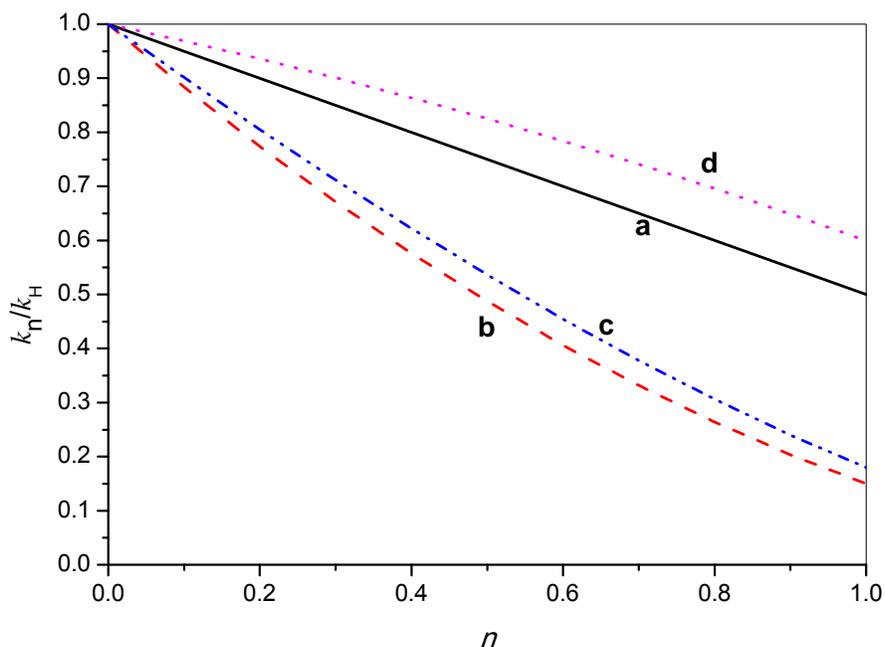


Figura 3. Formas generales de las curvas de la variación de las constantes de rapidez en función de la composición de la mezcla D₂O-H₂O para reacciones con diferente número de protones intercambiados. En (a) es uno, en (b) son dos, en (c) son tres y en (d) son dos, uno con un efecto isotópico cinético normal y otro inverso.

A menudo se supone que los factores de fraccionación para los sitios intercambiables en los reactivos son muy cercanos a la unidad debido a que las respectivas fuerzas relativas de enlace son muy similares a las del disolvente. Este razonamiento nos permite despreciar al denominador de la ecuación 11, dándonos la ecuación 12, donde cada término representa cada protón en movimiento en el estado de transición [22, 29, 32, 34].

$$k_n = k_H(1 - n + n\theta_1)(1 - n + n\theta_2)(1 - n + n\theta_3) \quad \text{Ec. 12}$$

Si en la gráfica de Figura 3 está involucrado un solo protón, obtendremos una recta. En caso de que haya dos, la gráfica será cuadrática en n , si son tres será cúbica en n , entre otros. A este procedimiento se le conoce como inventario de protones.

2.3 Estudios Biomiméticos

La forma en la que se llevan a cabo las reacciones químicas en un laboratorio difiere mucho respecto a la manera en la que suceden en los sistemas vivos. En general, en un laboratorio se permite que especies químicas con poca reactividad ataquen a un sustrato libre aleatoriamente en disolución. Cualquier selectividad lograda se debe a la reactividad particular de una sección del sustrato o por un impedimento estérico. En contraste, las reacciones que se llevan a cabo en un organismo vivo involucran enzimas, las cuales enlazan y orientan a los reactantes, lo cual se refleja en la selectividad que ofrecen para llevar a cabo dichas reacciones. Lo anterior se ve en la alta efectividad de las reacciones bioquímicas. Por un lado, estas reacciones son muy rápidas aún en condiciones fisiológicas, lo cual no es posible que ocurra para la mayoría de las reacciones que se llevan a cabo en el laboratorio; y por otro lado son tan selectivas que no hay producción de compuestos indeseables [39].

La selectividad bioquímica es el resultado de la geometría de los complejos enzima-sustrato, ya que únicamente ciertos sustratos pueden ajustarse a la enzima y sólo ciertos sitios son atacados. Por las razones mencionadas, en años anteriores se ha decidido imitar a las enzimas y a algunas proteínas (cuya función sea estructural o de transporte) a través de estudios biomiméticos. El término biomimético se refiere a cualquier procedimiento diseñado en un laboratorio para imitar a un proceso bioquímico. También hace referencia a cualquier compuesto que mimetiza a alguna especie bioquímica en su estructura, propiedades espectroscópicas y función [12, 39-42].

Este tipo de estudios pueden tener varios objetivos. Uno es demostrar que el patrón de reactividad de una enzima específica puede ser logrado en una molécula de menor tamaño (respecto a la enzima) diseñada racionalmente, vía un mecanismo biológicamente relevante. Otro es utilizar las amplias relaciones estructura/actividad presentes en diversos sistemas enzimáticos para desarrollar catalizadores sintéticos más eficaces, los cuales pueden carecer de una similitud en términos estructurales o en el modo de operación del sitio enzimático a estructura o mecanismo con respecto al sitio enzimático [43, 44]. Además, otro objetivo es ayudarnos a entender la relación

estructura/actividad en el sitio enzimático estudiando la reactividad de un análogo biomimético estructuralmente similar. Para esto se requiere de un compuesto que reproduzca cabalmente la estructura y reactividad del sitio de acción [45]. También tiene como objetivo conocer las propiedades espectroscópicas, mediante modelos con estructura similar o en algunos casos diferente a la de las proteínas estudiadas e incluso conocer la forma de unión de algunos sustratos a las proteínas de transporte [46-52].

Una de las reacciones biológicas más importantes es la transferencia del ión fosfato, lo cual contrasta con la alta 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 utilizando las cadenas laterales de los aminoácidos de las proteínas [6, 53, 54].

La naturaleza, al usar uno o más cationes metálicos en los sitios activos de las enzimas que catalizan la ruptura de los diferentes ésteres de fosfato, creó metaloenzimas altamente eficientes. Se pueden nombrar una cantidad enorme de ejemplos en los que la cooperación de los centros metálicos y/o las diferentes cadenas laterales de los aminoácidos, hace que las reacciones catalizadas por estas enzimas se lleve a cabo en cuestión de fracciones de segundo y no en miles de años (como ocurriría sin ellas) [55, 56]. 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 [54].

En la actualidad existe un notable interés en el estudio de este tipo de enzimas, en particular en la determinación de los mecanismos de reacción, ya que el avance en los estudios de sistemas catalíticos proveerá bases fuertes para un fructífero desarrollo de catalizadores homogéneos más efectivos [57]. Los cationes metálicos que encontramos más comúnmente en los sistemas biológicos que llevan a cabo la ruptura del enlace fosfodiéster son Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} y Fe^{2+} . El papel que juegan estos iones en la aceleración de la reacción no está totalmente elucidado, ya que estos

iones son generalmente lábiles y espectroscópicamente silenciosos, lo que dificulta la identificación de la esfera de coordinación del ión metálico [53, 58, 59].

El ión Mg^{2+} es uno de los principales cationes involucrados en las reacciones de transferencia de fosfato en los sistemas biológicos, ya que se presenta tanto en fosfatasas, como ribonucleasas (como la H y la P), nucleasas y ribozimas [60-64]. Esto puede deberse a que tiene propiedades que lo hacen único dentro de los principales cationes biológicos (K^+ , Ca^{2+} y Na^+). Por ejemplo su radio iónico es de los más pequeños (65 pm), mientras que su radio hidratado es de los más grandes (476 pm). Además, su rapidez de intercambio de disolvente (H_2O , 10^5 , comparada con valores de 10^8 , incluso $10^9 s^{-1}$) es muy baja comparada con los demás cationes biológicos. Generalmente se encuentra unido a varios ligantes de las cadenas laterales de los aminoácidos que componen a las proteínas, dejando uno o dos sitios de coordinación vacantes para las moléculas de agua. Estas moléculas de agua pueden participar en el mecanismo catalítico de la enzima, mediante un mecanismo conocido como esfera externa, esto es por el que sustrato no se une directamente al catión metálico [65, 66]. Un mecanismo de esfera interna se presenta cuando el sustrato si se une directamente al metal. Ambos tipos de mecanismo se presentan en la siguiente Figura.

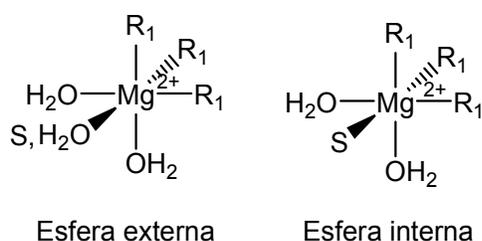


Figura 4. Comparación de los modos de activación por esfera externa y esfera interna (S es el sustrato) [65].

A diferencia de los cationes alcalinos y de los cationes de los metales de transición el ión Mg^{2+} , con su alta densidad carga, tiende a unirse a moléculas de agua en lugar de ligantes voluminosos en la esfera de coordinación interna. Muchos de los cationes magnesio unidos en los sitios activos de proteínas tienen sólo 3, 4 o aún menos uniones directas con las cadenas laterales de los aminoácidos de las proteínas.

Además, su alta densidad de carga asegura un excelente comportamiento de ácido de Lewis en las reacciones que involucran la transferencia e hidrólisis de grupos fosfato, ya sea activando un nucleófilo enlazado haciéndolo más reactivo en su forma aniónica o mediante la estabilización de un intermediario o del estado de transición [65-67].

Las ribonucleasas y nucleasas donde se encuentra el catión magnesio son la ribonucleasa H, la ARNasa III, la ribonucleasa P, la ribonucleasa E y en la nucleasa de *Serratia*. La función de esta enzima en general es la hidrólisis de los enlaces P–O de los ésteres de fosfato del ARN (ayudan en la degradación, digestión y maduración del ARN salvo por la nucleasa que hidroliza el ADN). La función del ión Mg^{2+} en este grupo de enzimas es estabilizar el estado de transición (como se muestra en el esquema del mecanismo de la nucleasa de *Serratia* de la Figura 5), o activar al nucleófilo. En un estudio del grupo de Gegenheimer se encontró evidencia que, en la ribonucleasa P, el ión metálico actúa mediante un mecanismo por esfera externa [61]. Además en las ribozimas (como la cabeza de martillo), la función de este catión es muy similar al descrito en las ribonucleasas (en la Figura 6 se muestra un esquema de estos). En estas biomoléculas con actividad catalítica se ha encontrado que los mecanismos ocurren vía esfera interna [60-64, 68-72]

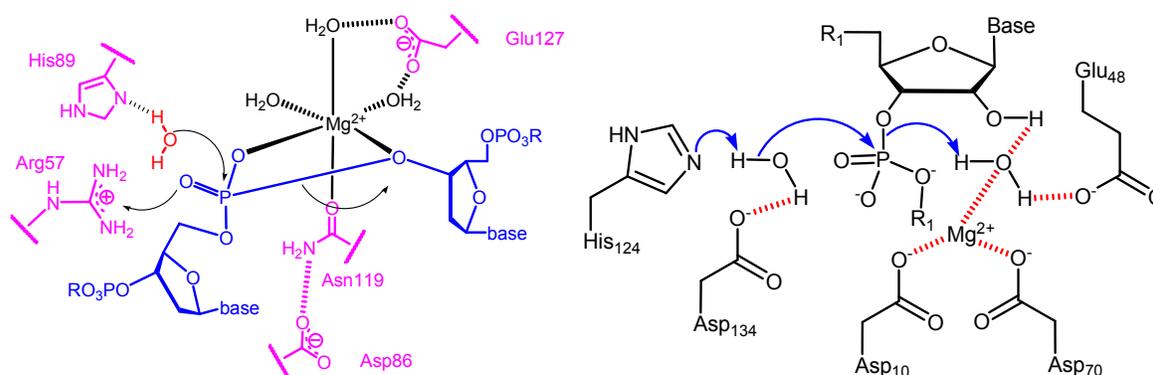


Figura 5. (a) Mecanismo concertado de la nucleasa de *Serratia*. (Adaptado de Pingoud, 2005) (b) Mecanismo para la ribonucleasa HI [68].

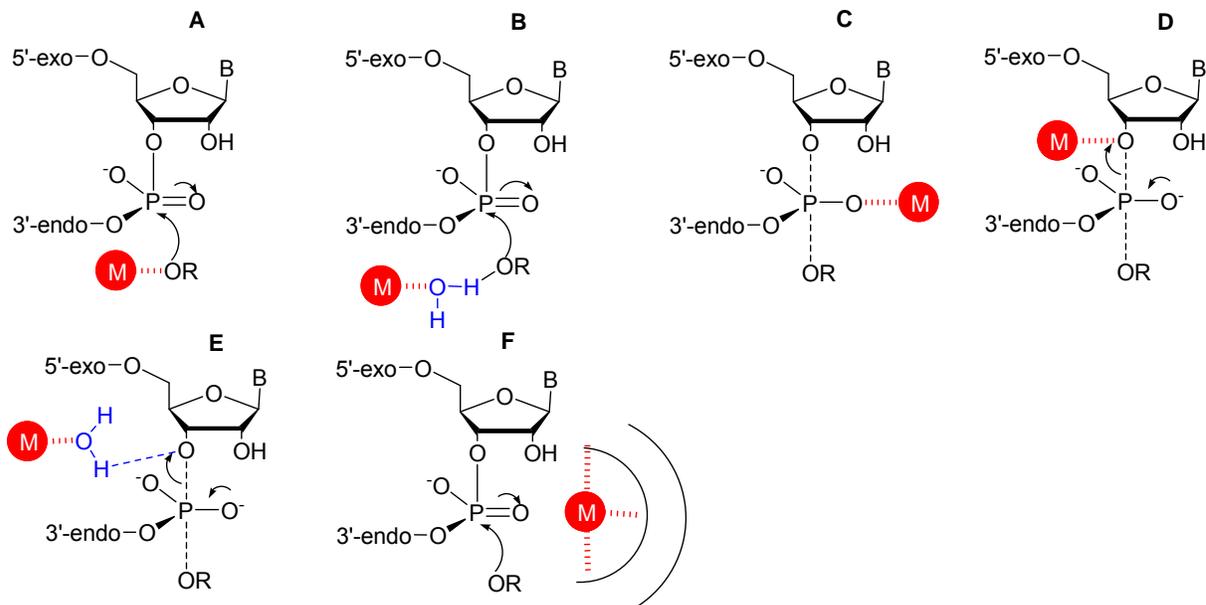


Figura 6. Papel del ión magnesio(II) en las ribozimas grandes [73].

Otro catión que tiene un papel importante en las nucleasas y ribozimas es Ca^{2+} . La fosfodiesterasa más conocida en donde participa este catión es la nucleasa del *Staphylococcus* (SNasa), la cual cataliza la ruptura del enlace fosfosdiéster en el ADN. En su sitio activo posee argininas que interactúan con los grupos fosforilo. En la Figura 7 se muestra un esquema del mecanismo de esta enzima [87, 88]. En esta figura se observa que el papel del ión calcio es estabilizar al grupo fosfato para hacerlo más sensible al ataque de un nucleófilo y de este modo se lleve a cabo la hidrólisis del ADN.

Como hasta ahora se ha descrito, los cationes metálicos juegan un papel muy importante en la ruptura del enlace P–O en la naturaleza, por lo que muchos grupos de investigación han tomado la tarea de mimetizarlos para diseñar catalizadores más eficientes. En la actualidad, existen muchos ejemplos de sistemas catalíticos que contienen diferentes cationes metálicos de zinc, cobre, hierro, lantánidos [9, 74-84], sin embargo, para los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} (que son de los más abundantes en la naturaleza) es muy poco lo que se ha estudiado con sistemas modelo de ribonucleasas (existen múltiples ejemplos en estudios con ribozimas para estos dos cationes [62-64, 69-72]). En este sentido, existe un informe en donde se utiliza el

sustrato modelo del ARN timidina-5'-*p*-nitrofenilfosfato (T5PNP) [85, 86]. Los estudios se hicieron en agua a 25 y 50°C utilizando los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} como catalizadores. A 25°C no hubo una diferencia catalítica notoria para ambos cationes a pesar de su diferente acidez de Lewis, los valores de las constantes de segundo orden para el ataque del T5PNP con hidróxido (k_{OH}) fueron de $4.1 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $3.7 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en la presencia de Mg^{2+} y Ca^{2+} 0.30 M, respectivamente. En la ausencia de los metales la k_{OH} fue de $8.3 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A 50°C se examinó la dependencia con la concentración del catión y se encontraron dos diferentes rutas.

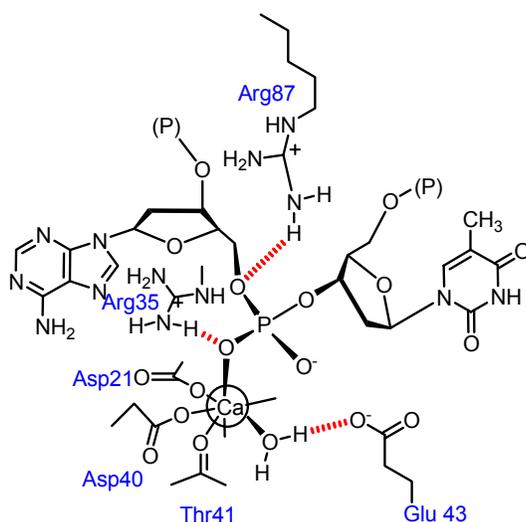


Figura 7. Mecanismo de reacción para la SNasa [81].

El catión magnesio emplea un mecanismo utilizando un solo ión, con una asociación entre Mg^{2+} y el fosfato modelo del ARN. Por otro lado el ión calcio(II) opera mediante un mecanismo paralelo que utiliza un solo ión y dos iones [86]. Además, Casano informa la determinación de efectos isotópicos del disolvente como nucleófilo (el agua es marcada con ^{18}O , es decir se usa H_2^{18}O), $^{18}k_{\text{NUC}}$, para la catálisis alcalina del T5PNP usando magnesio(II) como catalizador y ribozima. Los valores para $^{18}k_{\text{NUC}}$, resultaron ser normales, 1.027 y 1.030 respectivamente. Estos valores indican que el ataque nucleofílico ocurre en el paso limitante, lo cual es consistente con un mecanismo concertado. Sin embargo, estos valores son menores a los observados para el ataque nucleofílico con hidróxido (1.068) indicando un ambiente enlazante rígido para el nucleófilo en el estado de transición. La reacción catalizada con

magnesio indica que el complejo Mg^{2+} -hidróxido es la especie catalítica, de ahí sus bajos valores de $^{18}k_{nuc}$ que reflejan la coordinación del oxígeno nucleofílico al metal (ver Figura 8). El valor similar encontrado con la Ribozima da evidencia de la catálisis mediante una activación del nucleófilo por parte del ión metálico [86].

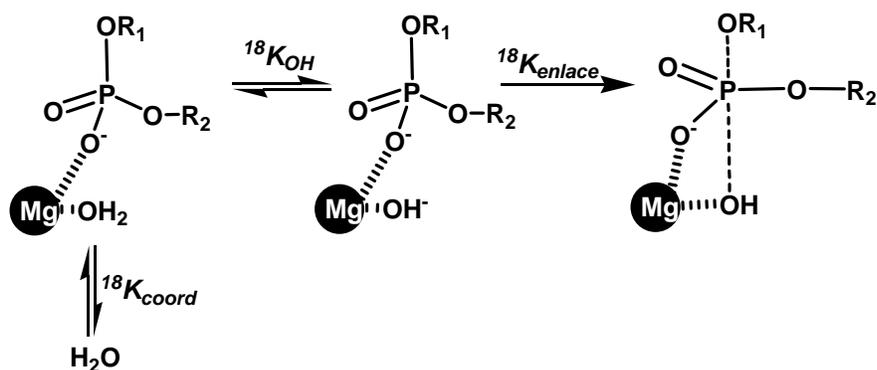


Figura 8. Posible mecanismo para la catálisis con magnesio de la hidrólisis alcalina del T5PNP [86].

En otro trabajo, Taran y Yatsimirsky estudiaron la catálisis alcalina del sustrato modelo del ADN bis(4-nitrofenil)fosfato (BNPP) y del sustrato modelo del ARN 2-hidroxipropil-4-nitrofenilfosfato (HpNPP) en la presencia de $Mg(II)$, $Ca(II)$ y $Sr(II)$ en DMSO acuoso al 90% a $37^\circ C$. En este estudio detectaron la formación de las especies $M_2(OH)^{3+}$, $M(OH)^+$, $M(OH)_2$ y $M_2(OH)_5^-$. Las constantes observadas de primer orden para la hidrólisis del BNPP y el HpNPP en presencia de 1-2 mM de Mg^{2+} o Ca^{2+} en las soluciones fueron de 10^8 a 10^{11} veces más altas que la hidrólisis espontánea en el mismo valor de pH. Los mecanismos para ambos sustratos fueron distintos. Para el HpNPP la evidencia muestra que la reacción ocurre mediante una catálisis básica general concertada, en donde el metal unido al hidróxido deberá asistir a la transesterificación intramolecular (el grupo 2-hidroxilo en la molécula) mediante una catálisis básica general. Un estudio de modelado con $Mg(II)$ de las posibles estructuras solvatadas por DMSO para los complejos catalizador-sustrato, sugiere que el incremento en la actividad catalítica en DMSO acuoso al 90% se debe a la preferencia de la solvatación por DMSO por estos cationes [9, 74].

El otro mecanismo importante que realizan las enzimas que rompen el enlace fosfodiéster es del tipo ácido-base, el cual lo llevan a cabo mediante el uso de las cadenas laterales de los aminoácidos. En este grupo encontramos a muchas ribonucleasas (ARNasas). El mecanismo aceptado para la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster por la ARNasa A, consiste en una catálisis ácido-base general, 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 9) [7, 8]. Este fue el primer mecanismo elucidado para una enzima en donde claramente se asignaron las funciones de las cadenas laterales en la enzima [88].

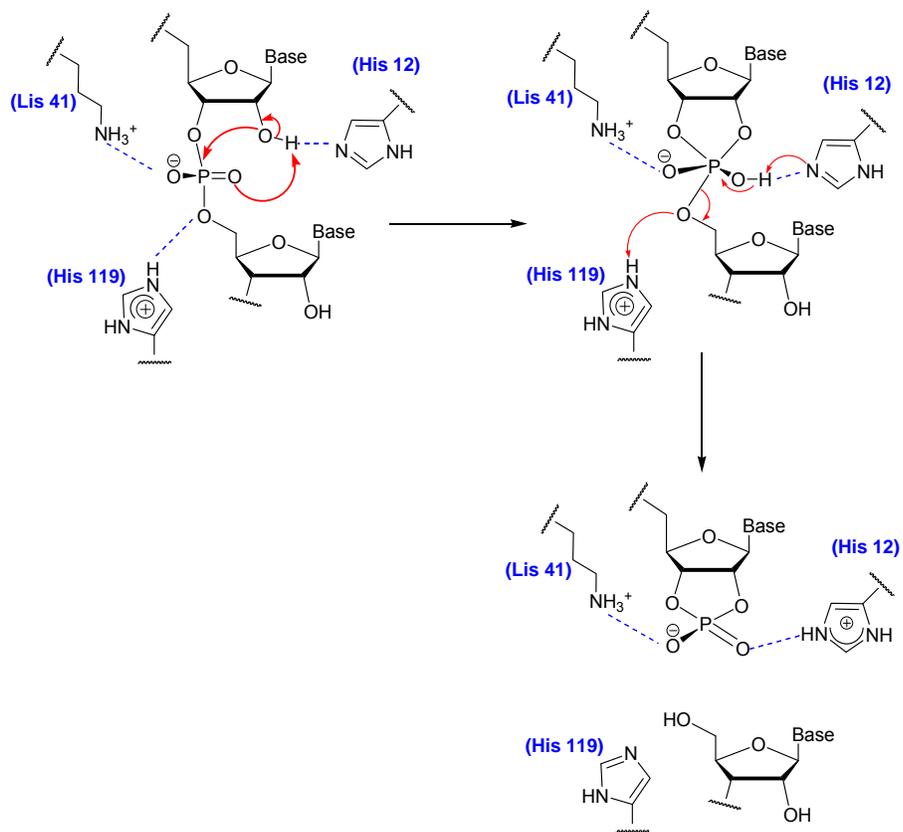


Figura 9. Mecanismo de hidrólisis del enlace fosfodiéster por la Ribonucleasa A. Adaptado de [90].

El aspecto clave del mecanismo de la ribonucleasa A es la acción cooperativa de la forma protonada y neutra de los grupos imidazol de las histidinas que participan en el sitio activo. Esto sugiere que este mecanismo puede reproducirse de una forma sencilla mediante la catálisis con la forma protonada (HB^+) y neutra de imidazol como amortiguador [91].

En este sentido se han realizado múltiples trabajos de la catálisis con amortiguadores con sustratos modelo del ARN. En un principio se informó acerca de trabajos usando imidazol como amortiguador, produciendo un perfil de neutralización en forma de campana, que indica la participación de la forma protonada y la desprotonada en la reacción. Estos estudios llevaron a conclusiones controversiales. Lo anterior se debió a la baja eficiencia de la catálisis que obligó el empleo de altas concentraciones del amortiguador (más de 1 mol/L), ocasionando perturbaciones en el sistema debido a efectos del medio, 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. [91-94].

Kirby y colaboradores también utilizaron imidazol como amortiguador para sus estudios 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 10). En el trabajo, además de estudiar la hidrólisis de los sustratos, analizaron los efectos del medio (uso de codisolventes y fuerza iónica). Los resultados del dinucleótido monofosfato 3', 5'-UpU muestran que 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 del oligonucleótido TTUTT también es catalizada por ambas formas del amortiguador, pero para este sustrato es más efectiva la forma protonada. Manteniendo el valor de fuerza iónica constante no se observó la aparición del perfil en forma de campana que observó Breslow con poli U. El mecanismo propuesto para la hidrólisis de 3',5'-UpU y TTUTT, 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 [94].

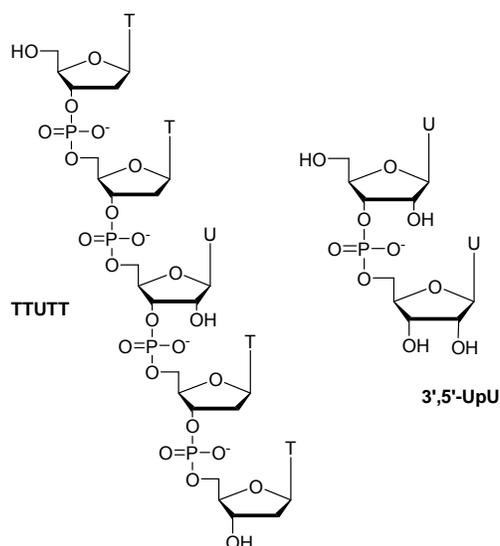


Figura 10. Estructura de los sustratos TTUTT y 3', 5'-UpU.

La idea básica de usar imidazol proliferó, por lo que se siguieron realizando estudios pero con derivados de imidazol. 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 [95].

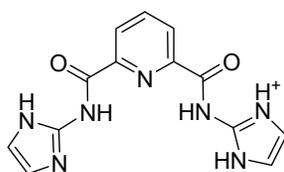


Figura 11. Estructura del derivado bisimidazol 2,6-carboxamidapiridina [Karube].

El grupo de Andrew Williams [96] estudió el efecto del pK_a del ácido conjugado del grupo saliente sobre la rapidez de hidrólisis de sustratos modelos de ARN catalizada por imidazol e iones OH^- . La Figura 12 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:

$$\log k_{imz} = (-0.59 \pm 0.08)pK^{ArOH} + 1.40 \pm 0.42 \quad \text{Ec. 13}$$

$$\log k_{OH} = (-0.54 \pm 0.05)pK^{ArOH} + 6.68 \pm 0.42 \quad \text{Ec. 14}$$

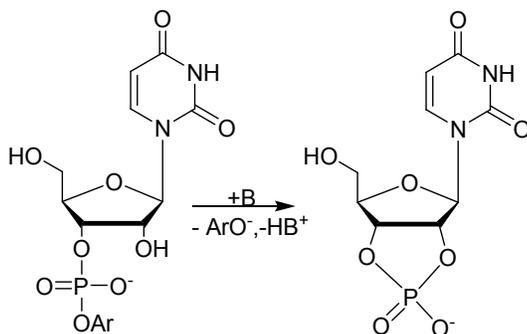


Figura 12. Esquema general de la reacción de hidrólisis de un ribonucleótido [96].

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 13 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 15.

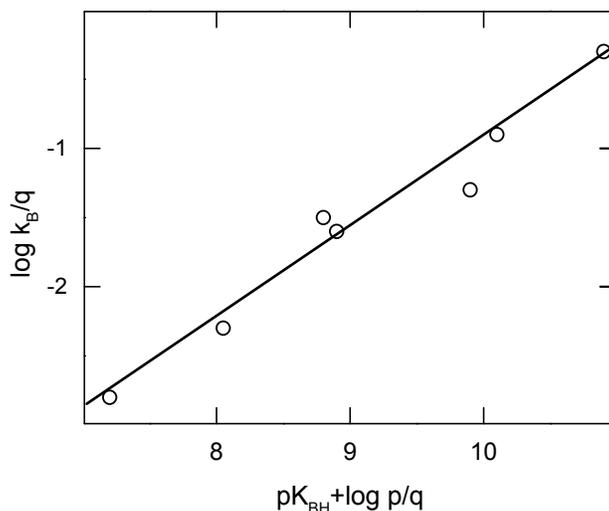


Figura 13. Dependencia de Brønsted para la hidrólisis del 4-nitrofeniluridina-3'-fosfato con una catálisis básica general [96].

$$\log k_B = (0.67 \pm 0.05)pK^{BH} - (7.50 \pm 0.42) \quad \text{Ec. 15}$$

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 [97,98], 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.

En un trabajo posterior, 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 14. En este estudio se probaron 6 amortiguadores distintos (4-metilimidazol, 1-metilimidazol, PIPES, TRIS, BISTRIS y morfolina) en

soluciones acuosas a 70°C. En este estudio se probaron los efectos de codisolventes y la variación en la fuerza iónica, sobre la reacción de ruptura de los sustratos. En este trabajo se obtuvieron perfiles en forma de campana para la variación de la constante de rapidez observada en función de la fracción de protonación de los amortiguadores. La desviación de la linealidad se atribuye a un efecto del disolvente sobre la reacción de hidrólisis espontánea por hidróxido, esto fue determinado mediante experimentos con codisolventes. Los valores de las constantes observadas para los distintos amortiguadores fueron del orden de 10^{-2} a 10^{-3} s⁻¹. El mecanismo de reacción para estos sustratos modelos es mediante una catálisis básica general [99].

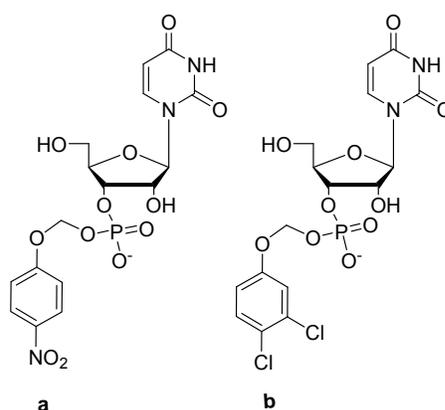


Figura 14. Estructura de los sustratos usados por el grupo de Kirby, el 4-nitrofenoximetil uridina 5'-fosfato (a) y el 3,4-diclorofenoximetil uridina 5'-fosfato (b).

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 [100, 101]. El grupo de Hamilton [102, 103], realizó estudios con los receptores bisguanidinio que se muestran en la Figura 15. El compuesto 15a 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)etilo actúan como bases desprotonando el grupo hidróxido del sustrato. El compuesto 15a mostró una eficiencia de 14 veces con respecto a la reacción sin catalizador ($k_{NC} = 3.8 \times 10^{-7}$

s⁻¹), mientras que el receptor 15b tuvo una eficiencia de 290 veces con respecto a la reacción sin catalizar.

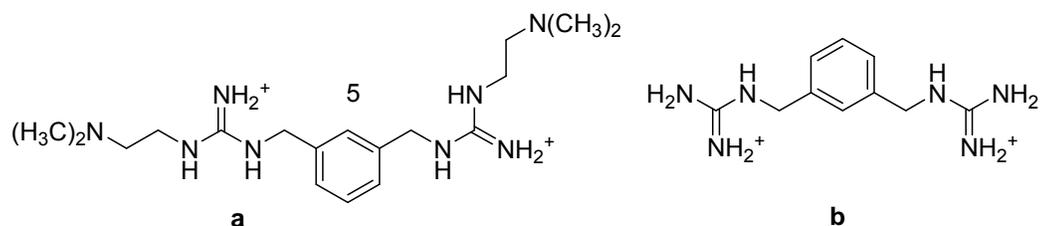


Figura 15. Estructura de los compuestos utilizados por Hamilton en la hidrólisis del HpNPP en acetonitrilo [102].

El grupo de Kalesse usó varios compuestos bis(guanidinio), los cuales se muestran en la Figura 16. El efecto de disolvente se analizó utilizando agua y acetonitrilo. Para las reacciones en agua, la concentración de los catalizadores fue de 10 mmol/L, 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, la temperatura fue de 55°C. En acetonitrilo la diferencia en los estudios cinéticos fue el uso de 2,6-lutidina como base en una concentración de 100 mmol/L [104].

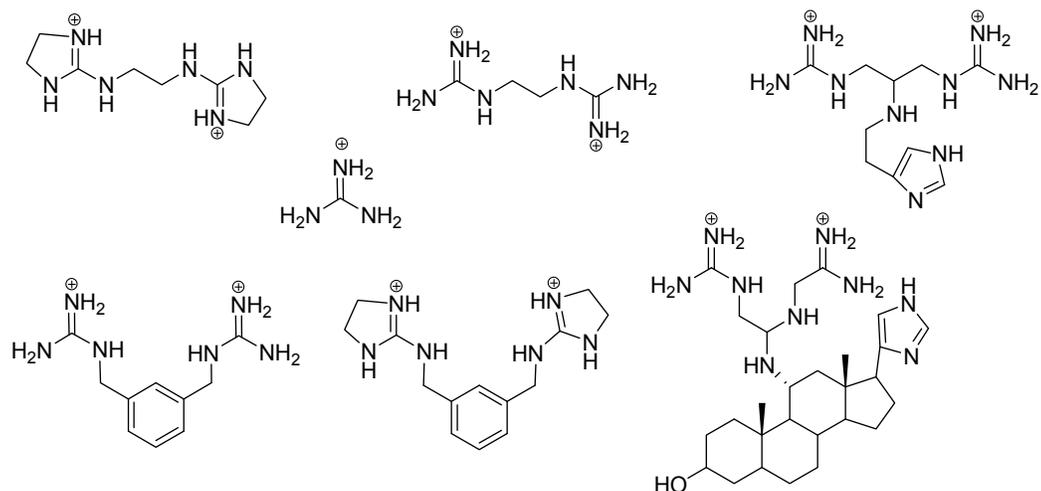


Figura 16. Estructuras de los compuestos usados en los estudios de Kalesse [104].

En acetonitrilo se observó que a medida que aumenta la longitud de 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 observó fue que al agregar más de 0.1% de agua, la contribución de la hidrólisis espontánea por hidróxido era mayor. 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 [104].

Zepic y Benner hicieron un estudio también con una serie de bis(guanidinius) para conocer la habilidad de asociarse y de hidrolizar al dinucleótido uridilil-3',5'-uridina (UpU) en agua. Las constantes observadas de primer orden obtenidas para los compuestos estuvieron en el orden de 10^{-6} s^{-1} , mientras que las constantes de asociación con UpU fueron del orden de 10 M^{-1} para los catalizadores. La Figura 17 presenta el esquema general de los catalizadores usados [105].

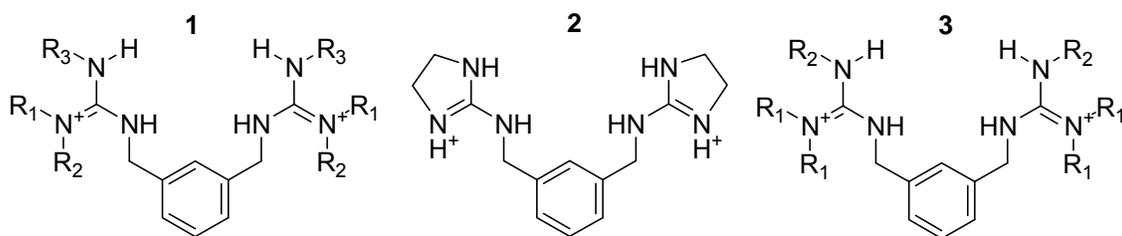


Figura 17. Compuestos usados en la hidrólisis del UpU [105].

El grupo de Göbel también ha trabajado con análogos sintéticos de guanidina [100, 106], 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 18 se muestran algunos de estos análogos). Los estudios cinéticos se hicieron con fragmentos de ARN marcados con compuestos fluorescentes para poder determinar el grado de hidrólisis en un secuenciador. Las concentraciones de los sustratos fueron de 120 a 140 nmol/L, y las de los catalizadores de $1 \mu\text{mol/L}$ a 10 mmol/L . El pH se mantuvo constante con 50 mmol/L de Tris y 0.01% de SDS (los derivados de 2-amino piridina 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. Los experimentos duraron de 16

a 20 horas. Los catalizadores 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.

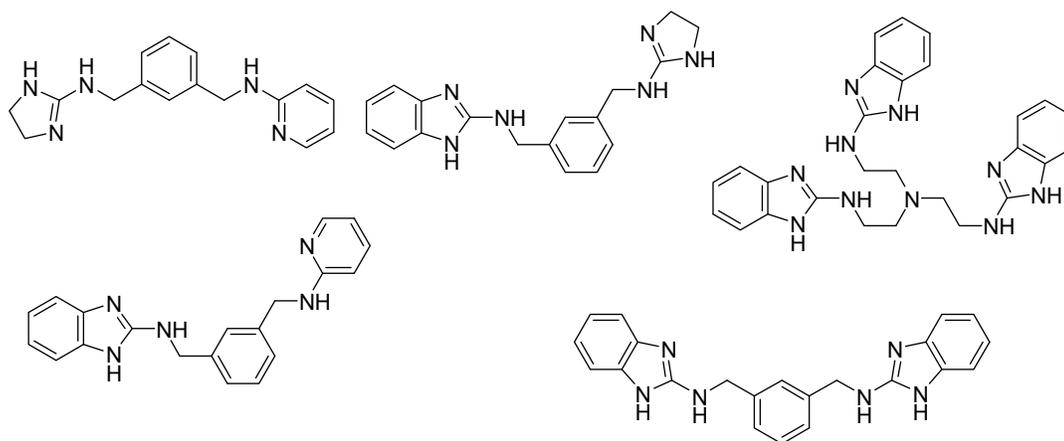


Figura 18. Estructuras de algunos de los derivados de la 2-aminopiridina y el 2-aminobencimidazol usados en el trabajo de Göbel [100].

Felden y colaboradores informaron el uso de poliaminas conjugadas con imidazoles en la hidrólisis de ARNt de una levadura sin el uso de imidazol libre. En este trabajo se encontró que los catalizadores utilizados son capaces de romper la cadena del ARN en sitios específicos; la selectividad en los lugares de ruptura se atribuye principalmente a la localización de los residuos de imidazol, el número de nitrógenos y la separación entre ellos. El derivado de noespermina usado reduce los sitios de hidrólisis a sólo una posición en el ARNt en el doblez del anticodón. Los resultados experimentales son consistentes con la participación cooperativa de un grupo amonio de la poliamina como fuente de protones (además de unirse al esqueleto del nucleótido) y la parte del imidazol como la base. Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo a pH fisiológico. En la Figura 19 se muestra uno de los compuestos utilizados [107].

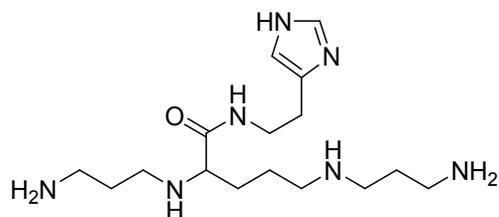


Figura 19. Estructura de una de las poliaminas conjugadas con imidazol [107].

Recientemente un estudio presenta una cooperación bifuncional del grupo guanidinio con imidazol en la misma molécula (1 en la Figura 20), espaciado por un *m*-xileno, que cataliza la reacción de transesterificación del 2-hidroxipropil-4-nitrofenilfosfato. Los catalizadores usados se muestran en la Figura 20, la segunda molécula en lugar de tener el grupo imidazol, presenta el grupo 1,4,7-triazaciclono-nano (TACN) (2), el cual es útil para formar complejos con cationes metálicos [108].

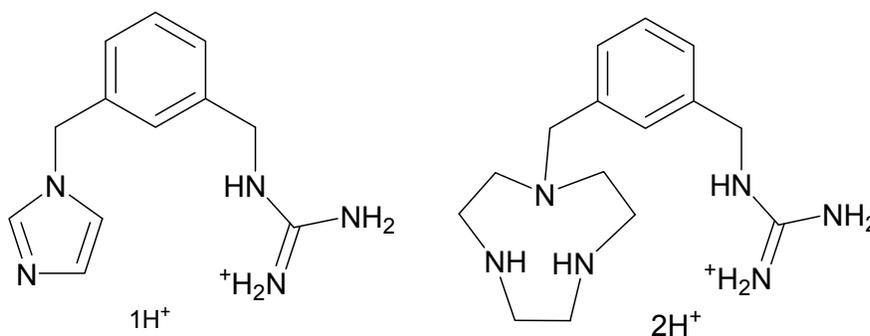


Figura 20. Compuestos utilizados como catalizadores en el estudio de Salvio [108].

El compuesto 1 muestra un factor de aceleración de 10 veces respecto a la reacción sin catalizar, a pH 7 y 50°C ($k_{\text{obs}} = 5.2 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$). Con el compuesto 2 se hicieron los estudios a pH 9 y 9.8 a 25°C, dependiendo del complejo usado. Los estudios con el compuesto 2 complejado con cobre se hicieron a pH 9, mientras que con zinc a pH 9.8. La aceleración fue de 4×10^4 ($k_{\text{obs}} = 5.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) y 1.3×10^4 ($k_{\text{obs}} = 1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), respectivamente, comparado con la reacción sin catalizar. El mecanismo propuesto para la acción del compuesto 2 complejado con un catión metálico se muestra en la Figura 21. En el mecanismo se muestra la estabilización electrostática mediante el ión guanidinio, mientras que el hidroxocomplejo es el que actúa como base general [108].

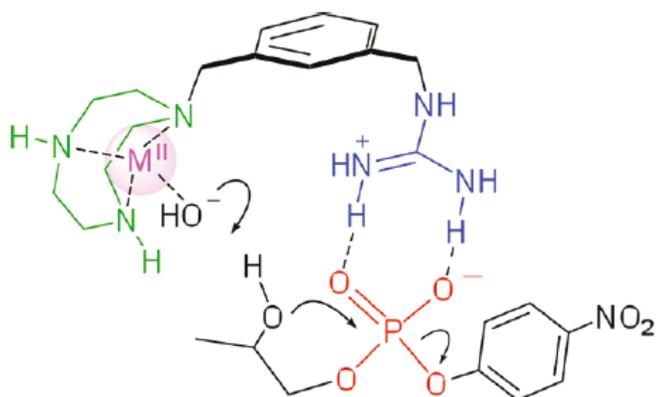


Figura 21. Mecanismo sugerido para la transesterificación del HpNPP catalizada por los complejos metálicos de 2 ($M^{II} = Cu^{II}, Zn^{II}$) [108].

Dentro de otro tipo de catalizadores 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 22 se muestra un esquema de uno de los fragmentos de la sinzima) [6]. El sustrato utilizado fue el HpNPP y las constantes de rapidez para la hidrólisis del sustrato fueron aproximadamente 10000 veces mayores que las obtenidas sin catalizador. Las mediciones cinéticas se hicieron en agua a $30^\circ C$ con un valor de pH de 8 (ajustado con HEPES). La concentración del sustrato fue 1 mmol/L mientras que la concentración del polímero fue $3 \mu mol/L$. La sinzima presenta una cinética de saturación del tipo de Michaelis-Menten ($K_m = 250 \mu mol/L$, $k_{cat} = 0.0085 s^{-1}$). El perfil de la variación de k_{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_{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 [6].

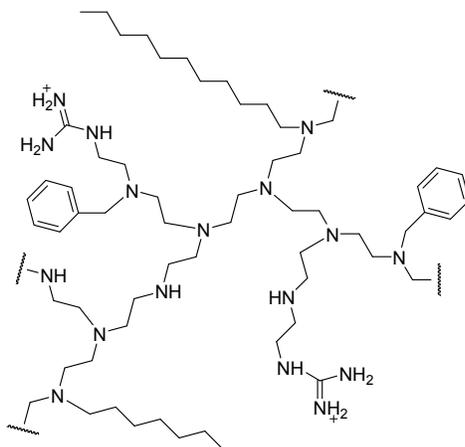
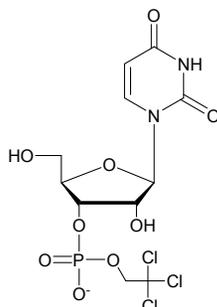


Figura 22. Esquema de uno de los fragmentos de la sinzima del trabajo de Hollfelder [6].

Existe también un trabajo donde se utilizó un péptido de 42 aminoácidos (la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 24, estructura 7) que forma dos hélices unidas por un pliegue (“*loop*”) [109]. 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 24 estructura 8) y el 2-hidroxiopropil-2,2,2-tricloroetilfosfato que tienen un grupo saliente ligeramente peor 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.

Ac-N-A.A.D-Nle-E-A-A-I-K-H¹¹-L-A-R¹⁴-R¹⁵-Nle-A-A-K-
 G-P-V-D-
 H₂N-G-A-R-A-F-A-E-F-R³⁴-R³³-A-L-H³⁰-E-A-Nle-Q-A-A-

7

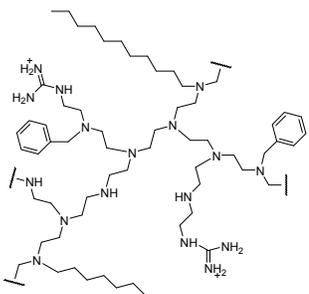
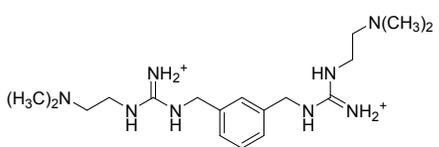
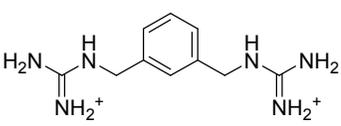
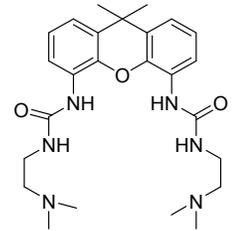


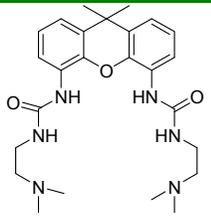
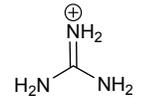
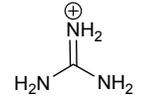
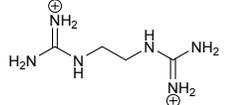
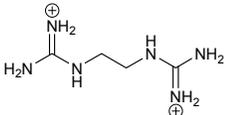
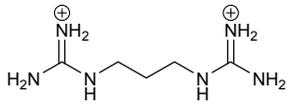
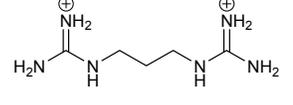
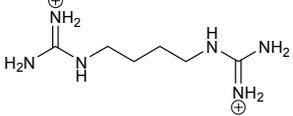
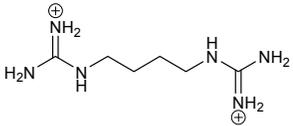
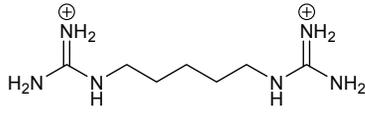
8

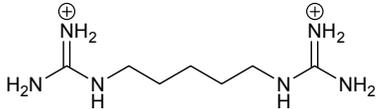
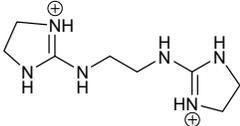
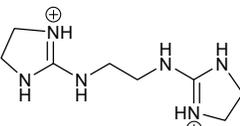
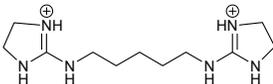
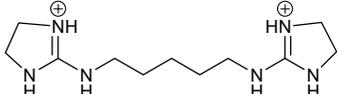
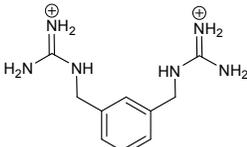
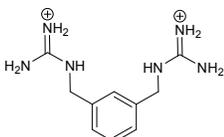
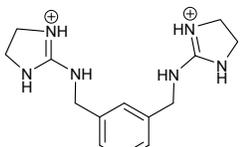
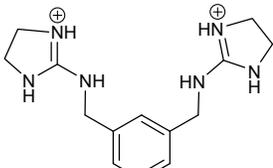
Figura 24. En esta Figura se muestra: (7) la secuencia de aminoácidos del polipéptido, en donde los aminoácidos que están en el sitio activo tienen un número que indica su posición, en el extremo del carboxilo terminal se formó una amida mientras que el extremo amino se acetiló; (8) estructura de la uridin 3'-2,2,2-tricloroetilfosfato [109].

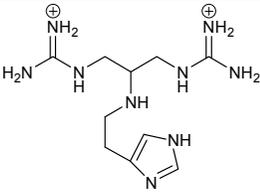
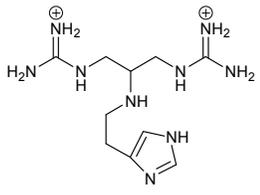
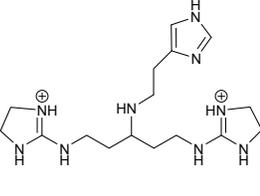
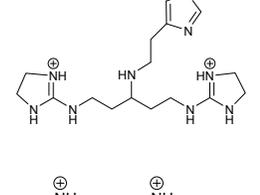
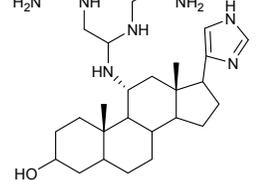
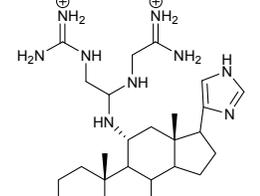
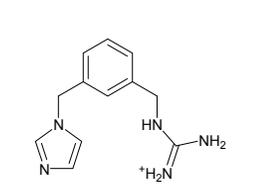
A continuación, en la Tabla 2 se muestran los valores obtenidos en las reacciones de transesterificación del HpNPP por otros grupos de investigación en diferentes medios y con distintos catalizadores.

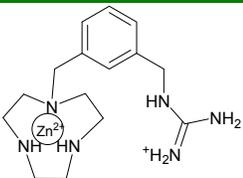
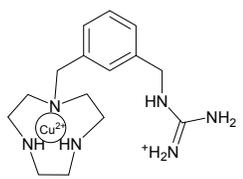
Tabla 2. Constantes de rapidez para la hidrólisis del 2-hidroxipropil-4-nitrofenilfosfato informados en otros estudios de hidrólisis.

Catalizador	Disolvente	Temp	pH	$k_{obs} \times 10^4, s^{-1}$	$k_2, M^{-1} s^{-1}$	Ref.
Ninguno	MeCN: H ₂ O 1:1	25°C	7	2.7×10^{-4}	N.D.	[43]
Ninguno	MeCN (0.01% H ₂ O)	25°C	7	3.8×10^{-4}	N.D.	[38]
Ninguno	MeOH	25°C	N.D.	7×10^{-4}	N.D.	[47]
	H ₂ O	30°C	7.85	85 ^a	33.8	[9]
Ac-N-A-A-D-Nle-E-A-A-I-K-H ¹¹ -L-A-R ¹⁴ -R ¹⁵ -Nle-A-A-K- G-P-V-D- H ₂ N-G-A-R-A-F-A-E-F-R ³⁴ -R ³³ -A-L-H ³⁰ -E-A-Nle-Q-A-A-	H ₂ O	30°C	7.0	ND	7.08×10^{-4} ^b	[42]
	MeCN	25°C	N.D.	1.1	0.069	[38]
	MeCN	25°C	N.D.	0.055 ^c	0.00044	[38]
	MeOH	25°C	N.D.	0.241	N.D.	[47]

	MeCN	25°C	N.D.	6.6	N.D.	[47]
	MeCN (0.1% H2O)	30°C	N.D.	0.13 ^d	N.D.	[48]
	H2O	55°C	7.55	<5×10 ⁻⁴ e	N.D.	[48]
	MeCN (0.1% H2O)	30°C	N.D.	1.76 ^d	N.D.	[48]
	H2O	55°C	7.55	0.0015 ^e	N.D.	[48]
	MeCN (0.1% H2O)	30°C	N.D.	1.74 ^d	N.D.	[48]
	H2O	55°C	7.55	0.0013 ^e	N.D.	[48]
	MeCN (0.1% H2O)	30°C	N.D.	1.02 ^d	N.D.	[48]
	H2O	55°C	7.55	<5×10 ⁻⁴ e	N.D.	[48]
	MeCN (0.1% H2O)	30°C	N.D.	1.22 ^d	N.D.	[48]

	H ₂ O	55°C	7.55	0.0012 ^e	N.D.	[48]
	MeCN (0.1% H ₂ O)	30°C	N.D.	0.99 ^d	N.D.	[48]
	H ₂ O	55°C	7.55	0.0018 ^e	N.D.	[48]
	MeCN (0.1% H ₂ O)	30°C	N.D.	1.12 ^d	N.D.	[48]
	H ₂ O	55°C	7.55	<5×10 ⁻⁴ e	N.D.	[48]
	MeCN (0.1% H ₂ O)	30°C	N.D.	1.22 ^d	N.D.	[48]
	H ₂ O	55°C	7.55	8×10 ⁻⁴ e	N.D.	[48]
	MeCN (0.1% H ₂ O)	30°C	N.D.	2.02 ^d	N.D.	[48]
	H ₂ O	55°C	7.55	0.0013 ^e	N.D.	[48]

	MeCN (0.1% H ₂ O)	30°C	N.D.	0.33 ^d	N.D.	[48]
	H ₂ O	55°C	7.55	0.0024 ^e	N.D.	[48]
	MeCN (0.1% H ₂ O)	30°C	N.D.	0.46 ^d	N.D.	[48]
	H ₂ O	55°C	7.55	<5×10 ⁻⁴ e	N.D.	[48]
	MeCN (0.1% H ₂ O)	30°C	N.D.	0.35 ^d	N.D.	[48]
	H ₂ O	55°C	7.55	0.0143 ^e	N.D.	[48]
	DMSO: H ₂ O (4:1)	50°C	7.0	5.2×10 ⁻³	N.D.	[108]

	DMSO: H ₂ O (4:1)	25°C	9.0	5.1	N.D.	[108]
	DMSO: H ₂ O (4:1)	25°C	9.8	10	N.D.	[108]

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

3. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Utilizar como medio de la reacción DMSO acuoso (4:1 en volumen) y emplear bases fuertes (guanidina, benzamidina, aminoguanidina) para observar la contribución de la catálisis básica general sin interferencia de la hidrólisis básica específica y evaluar el efecto que tiene el pK_a de los pares ácido-base sobre las constantes de rapidez de la transesterificación del HpNPP.

Determinar los valores de pK_a de los pares ácido-base utilizados en la mezcla DMSO-agua (4:1 en volumen) a 37°C, para poder hacer correlaciones entre estos y las constantes de rapidez de manera cuantitativa.

Estudiar el efecto isotópico del disolvente sobre los sistemas usados y proponer un mecanismo para la transesterificación del sustrato modelo del ARN (HpNPP).

Determinar las constantes de asociación entre algunos amidinios y modelos del HpNPP y del posible estado de transición de la reacción, en la mezcla de DMSO agua (4:1 en volumen).

Estudiar el efecto que tienen algunos cationes como los del grupo de los elementos alcalinos (litio, sodio y potasio), alcalinotérreos (magnesio y calcio), el catión guanidinio y cationes de algunos compuestos de coordinación inertes (hexaminacobalto(III), pentaminaclorocobalto(III) y trisetilendiaminacobalto(III)) sobre la catálisis básica general y la básica específica, en la transesterificación del HpNPP en DMSO acuoso (4:1 en volumen) y en agua a 37°C.

Caracterizar los mecanismos propuestos por un análisis de Brønsted.

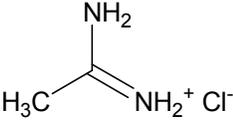
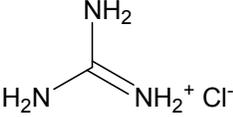
4. MATERIALES Y MÉTODOS

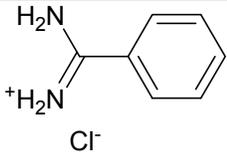
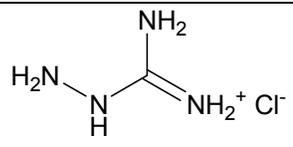
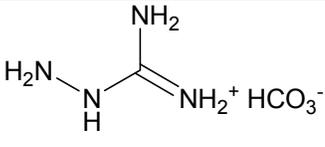
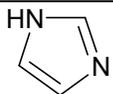
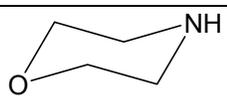
4.1 Reactivos

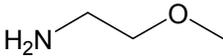
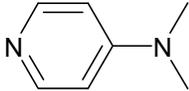
Para la realización de los estudios cinéticos se utilizó un sustrato modelo del ARN, el 2-hidroxi-*p*-nitrofenilfosfato (HpNPP), varias bases (piperidina, benzamidina, aminoguanidina, guanidina, acetamidina, 2-metoxietilamina, 3-metoxipropilamina, morfolina, imidazol, 4-dimetilaminopiridina e hidróxido de tetrametilamonio) para formar sistemas amortiguadores. Además, se usaron algunas sales de metales alcalinos, alcalinotérreos y algunos compuestos de coordinación de cobalto inertes.

A continuación se muestra una tabla en donde se encuentran los reactivos usados y sus datos más importantes.

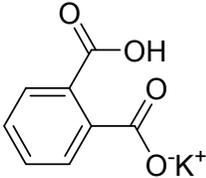
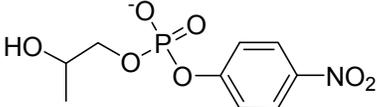
Tabla 3. Estructura y características principales de los reactivos usados.

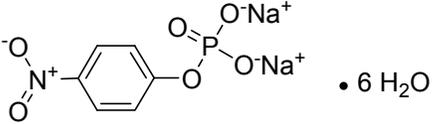
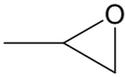
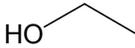
	Cloruro de piperidinio
	Aldrich, 99%
	Masa molar = 121.61
	Cloruro de acetimidinio
	Aldrich, 95%
	Masa molar = 94.54
	Cloruro de guanidinio
	Sigma, 99%
	Masa molar = 95.53

$\text{Me}_4\text{NOH} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Hidróxido de tetrametilamonio pentahidratado
	Sigma, 97%
	Masa molar = 181.23
	Cloruro de benzamidinio
	Sigma-Aldrich, 98%
	Masa molar = 156.61
	Cloruro de aminoguanidinio
	Masa molar = 110.55
	Bicarbonato de aminoguanidinio
	Sigma, 98.5%
	Masa molar = 136.11
	Imidazol
	Sigma, Reactivo ACS 99.8%
	Masa molar = 68.08
	Morfolina
	Aldrich, 95%
	Masa molar = 87.12
	3-metoxipropilamina
	Aldrich, 99%

	Masa molar = 89.14
	2-metoxietilamina Aldrich, 99% Masa molar = 75.11
	4-dimetilaminopiridina Aldrich, 99%. Reagent Plus Masa molar = 122.17
Me_4NCl	Cloruro de tetrametilamonio Fluka $\geq 99\%$ para cromatografía de intercambio iónico Masa molar = 109.6
$[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$	Cloruro de hexaminacobalto(III) Sigma-Aldrich, 99% Masa molar = 267.48
$[\text{Co}(\text{en})_3]\text{Cl}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de trisetilendiaminacobalto(III) dihidratado Masa molar = 381.62
$[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$	Cloruro de pentaminaclorocobalto(III) Masa molar = 250.44 (referencia)
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de magnesio hexahidratado Sigma-Aldrich, 99.0-102.0% Masa molar = 203.3

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de calcio dihidratado Reactivo ACS $\geq 99\%$ Masa molar = 147.01
LiCl	Cloruro de litio Mallinckrodt, reactivo analítico, 99.8% Masa molar = 42.39
NaCl	Cloruro de sodio J. T. Baker, Reactivo ACS, 99.5% Masa molar = 58.44
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Nitrato de cobalto(II) hexahidratado Mallinckrodt, reactivo analítico. 99.76% Masa molar = 291.03
D_2O	Óxido de deuterio Aldrich, 99.9 atom% D Masa molar = 20.03
HCl	Ácido clorhídrico J. T. Baker. Reactivo ACS, 36.5-38% Masa molar = 36.46
HClO_4	Ácido perclórico J. T. Baker, 69-72% (m/m), reactivo ACS, Masa molar = 100.46

$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	Carbonato de amonio
	Mallinckrodt, reactivo analítico
	Masa molar = 96.09
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
	Reactivos y productos químicos finos
	Reactivo analítico al 30%
	Masa molar = 34.01
Na_2CO_3	Carbonato de sodio
	Sigma-Aldrich, Reactivo ACS $\geq 99.5\%$
	Masa molar = 105.99
$\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	Hidróxido de bario, para análisis
	J.T. Baker, 98%
	Masa molar = 315.48
	Hidrógenoftalato de potasio
	ACS acidimetric standar, 99.95-100.05%
	Masa molar = 204.23
	2-hidroxipropil-p-nitrofenilfosfato
	Masa molar = 276.16
(HpNPP)	Sintetizado de acuerdo a Brown y Usher [110]

	<p>4-nitrofenilfosfato de sodio hexahidratado</p> <p>Sigma-Aldrich, 98%</p> <p>Masa molar =371.14</p>
<p>Resina de intercambio iónico Amberlite® IR-120 H</p>	<p>Sigma-Aldrich</p> <p>Capacidad de intercambio: 4.4 meq/g por peso seco y 1.9 meq/mL de resina hidratada</p>
	<p>Óxido de propileno, Sigma-Aldrich, 99%</p> <p>d = 0.83 g/mL, Masa molar = 58.08</p>
	<p>Etanol anhidro</p> <p>J. T. Baker, 99.9% (m/m), Reactivo ACS</p> <p>Masa molar = 46.07</p>
	<p>Acetona</p> <p>J. T. Baker, 99.6% , Reactivo ACS</p> <p>Masa molar = 58.08</p>

4.1.1 Disolventes

Para los experimentos se usó agua desionizada obtenida a partir de agua destilada con el equipo NANOPURE BARNSTEAD. El dimetil sulfóxido (DMSO) se adquirió de J. T. Baker y Sigma-Aldrich y se utilizó sin tratamiento previo. El agua deuterada fue adquirida de Sigma-Aldrich y se utilizó sin tratamiento previo.

4.1.2 Sustrato

Como sustrato modelo del ARN se utilizó el 2-hidroxiopropil-*p*-nitrofenilfosfato (HpNPP), el cual fue sintetizado mediante el método de Brown y Usher [110]. 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 3.

4.1.2.2 Síntesis del sustrato

Para la síntesis del HpNPP se hizo una disolución de la sal disódica del *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⁺). 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 volumen de filtrado se disminuyó 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 corresponde a la sal de bario del 2-hidroxiopropil-*p*-nitrofenilfosfato. El rendimiento obtenido fue del 42%. En esta síntesis se obtienen dos compuestos isoméricos, el 2-

hidroxipropil-4-nitrofenilfosfato y el 1-hidroxipropan-2-il-4-nitrofenilfosfato (su isómero). Mediante el procedimiento cinético que se menciona abajo, se determinó que la proporción del isómero respecto al sustrato es del 5%, además que la rapidez de su transesterificación es 10 veces mayor que el HpNPP.

Al precipitado se le tomó un espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H en D_2O para determinar su pureza. El espectro RMN ^1H 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 tetrametilamonio. 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 disolución acuosa. Después se preparó una disolución madre de *p*-nitrofenol y se tomaron varias alícuotas a las cuales se les agregó hidróxido de tetrametilamonio. 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 ϵ 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 90%. El otro 10% corresponde a un isómero del sustrato modelo.

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 Ba^{2+} por iones H^+ .

4.1.3 Bases

Las bases usadas para los estudios cinéticos fueron: hidróxido de tetrametilamonio, cloruro de piperidinio, cloruro de acetamidinio, cloruro de aminoguanidinio, cloruro de benzamidinio, cloruro de guanidinio, morfolina, imidazol, 2-metoxietilamina, 4-dimetilaminopiridina y 3-metoxipropilamina. Las características principales se muestran en la Tabla 3 (compañía de adquisición, pureza y masa molar). Todos se usaron sin tratamiento previo y en el caso de las disoluciones (morfolina, 2-

metoxietilamina y 3-metoxipropilamina) se midió su concentración mediante titulaciones potenciométricas, antes de utilizarse.

4.1.4 Sales

Se utilizó cloruro de tetrametilamonio para ajustar la fuerza iónica en los experimentos. Además se usaron las sales de los cationes utilizados como cloruro de magnesio, cloruro de calcio, cloruro de sodio, cloruro de potasio y cloruro de litio. También se hicieron estudios con los compuestos de coordinación cloruro de hexaminacobalto(III), cloruro de trisetilendiaminacobalto(III) y cloruro de pentaminaclorocobalto(III); las especificaciones principales de estos reactivos se muestran en la Tabla 3.

4.1.5 Ácidos

El ácido clorhídrico fue utilizado para neutralizar a tres de las bases (morfolina, 2-metoxietilamina y 3-metoxipropilamina) y formar los pares amortiguadores requeridos para los estudios cinéticos; además, se usó en las titulaciones potenciométricas para determinar el pK_w 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 3.

4.2 Equipo

Las mediciones espectrofotométricas se hicieron 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 < 0.5 nm) de arreglo de diodos. Las celdas utilizadas fueron de cuarzo con una longitud de paso óptico de 1 cm y un volumen de 3 mL. Los experimentos por potencimetría se realizaron usando un electrodo de vidrio Orion ROSS™ con un potenciómetro ORION 710A (para las mediciones en agua) y un electrodo de vidrio ecotrodo plus de metrohm (para las mediciones en la mezcla 4:1 en volumen de DMSO-agua) en una celda a temperatura constante (310 K), con agitación y flujo de nitrógeno constante. Los experimentos de resonancia magnética

nuclear de ^{31}P y ^1H 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 y con el programa Origin Pro 8 de Origin Lab. 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 disoluciones se hicieron titulaciones potenciométricas. Para esto se graficó el valor de pH contra el volumen de titulante añadido. La primer disolución en normalizarse fue la de ácido clorhídrico 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), mientras que para la disolución de hidróxido de tetrametilamonio se estandarizó con biftalato de potasio. Una vez estandarizado el ácido clorhídrico se normalizaron las disoluciones de hidróxido de tetrametilamonio, morfolina, 2-metoxietilamina y 3-metoxipropilamina

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 cloruro de tetrametilamonio para ajustar la fuerza iónica a una concentración 100 mM. La

concentración de las bases fue de 5 mM en soluciones con un 80% de DMSO y 20% de agua. El titulante también estaba en disoluciones al 80% de DMSO. Previo a estas titulaciones, se determinó el pK_w de la mezcla de DMSO-agua 80:20 a 37°C con la valoración de 25 mL de una solución 1 mM de ácido clorhídrico con una fuerza iónica de 100 mM de cloruro de tetrametilamonio con hidróxido de tetrametilamonio, se tomaron al menos 10 puntos antes y después del punto de equivalencia para poder realizar los ajustes.

La obtención de la constante de disociación del agua K_w en la mezcla DMSO-agua, usada para calibrar el electrodo, se determinó con un ajuste no lineal mediante la ecuación 16 de la gráfica de volumen de base añadido contra el pH [111].

$$V = \frac{V_0(C_A + 10^{(pH-pK_i)} - f10^{-pH})}{C_B + f10^{-pH} - 10^{(pH-pK_i)}} \quad \text{Ec. 16}$$

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, pH es el valor de pH medido, pK_w es el cologaritmo del producto iónico del agua en este medio (K_w) 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 16 se obtiene de despejar el volumen añadido (V) y agrupar términos de la ecuación 17 que es la ecuación para la titulación de un ácido fuerte con una base fuerte.

$$V + \frac{V_0 + V}{C_B} f[H^+] - \frac{(V_0 + V)K'_i}{[H^+]C_B} - V_e = 0 \quad \text{Ec. 17}$$

Además de despejar el volumen añadido y reacomodar los términos, se hizo la sustitución de $[H^+]'$ (que es la concentración de H^+ “aparente”, es decir, la calculada empleando el valor de pH medido directamente y no corregido) por 10^{-pH} , K'_w (que es el producto iónico del agua “aparente” sin considerar los coeficientes de actividad) por 10^{-pK_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 pH para cada adición eran conocidos, por lo que fue posible calcular el valor de pK_w y de f . Una vez obtenidos los valores de f , se corrigieron los valores de pH observados restándoles el logaritmo de f ($pH_{corr} = pH - \log f$). El valor promedio de pK_w de la mezcla DMSO-Agua 80:20 a 37.0°C fue de 18.8 ± 0.1 que está en acuerdo con los valores informados en literatura para condiciones semejantes (en 80% DMSO por peso a 25°C es 18.4 [112] y 18.84 en 80% DMSO por volumen a 30°C [111]). En la Figura 25 se muestra un ejemplo de las gráficas obtenidas y ajustadas por la ecuación 16.

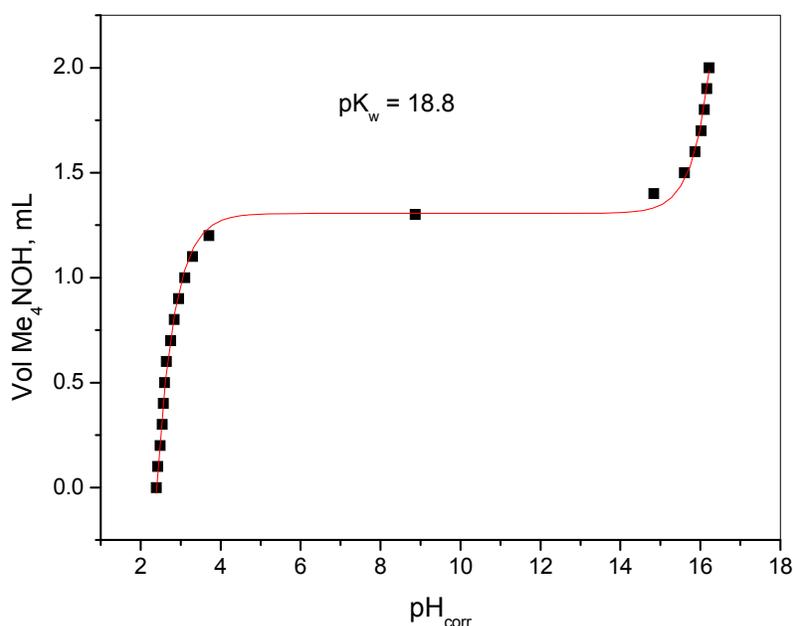


Figura 25. Gráfica de volumen de base añadida contra el pH corregido de la titulación de HCl 1 mM con una fuerza iónica 100 mM de Me₄NCl en 80% de DMSO a 37°C. La línea es el ajuste teórico realizado con la ecuación 17.

Para la medición de las constantes de asociación entre los amidinios y los cationes utilizados con la molécula modelo 4-nitrofenilfosfato, se hicieron titulaciones

potenciométricas. Estas se realizaron añadiendo una cantidad equimolar del amidinio y del 4-nitrofenilfosfato (este último se hizo pasar previamente por una columna de intercambio iónico para dejarlo en la forma protonada) con concentración 5 ó 10 mM en ambos casos. En estos experimentos la fuerza iónica fue de 100 mM, ajustada con Me_4NCl . En el caso de los estudios con cationes metálicos, la concentración del 4-nitrofenilfosfato fue la misma que con los amidinios pero la de los cationes fue de 33 mM, haciéndose el ajuste de la fuerza iónica con estos. Además de las titulaciones en la mezcla DMSO acuoso, también se hicieron las mismas titulaciones en condiciones similares en agua.

4.5 Estudios cinéticos

Los estudios cinéticos se realizaron en el espectrofotómetro mencionado anteriormente, equipado con un compartimento termorregulado a $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Las soluciones para las reacciones se prepararon mediante la combinación de las cantidades apropiadas de las disoluciones concentradas de los cloruros de las bases protonadas, cationes alcalinos, alcalinotérreos y compuestos de coordinación e hidróxido de tetrametilamonio, hasta obtener 2.5 mL con un 80% de DMSO.

Las reacciones se iniciaron mediante la adición de una alícuota de la disolución del HpNPP. La solución del sustrato se preparó en agua haciéndola pasar por una columna con la resina Amberlite IR-120H de intercambio iónico para eliminar el catión Ba^{2+} , que puede ocasionar interferencia con los estudios cinéticos. La concentración del HpNPP se determinó mediante la absorbancia del 4-nitrofenolato después de la hidrólisis con hidróxido de sodio 0.1 M. En los experimentos en DMSO acuoso se empleó espectrofotométricamente la banda de absorción de 420 nm del anión 4-nitrofenolato que se forma, para seguir el transcurso de la reacción (ver figura). En tanto que en agua se siguió la banda de 405 nm. La absorptividad molar en la mezcla de DMSO acuoso a 420 nm fue de $\varepsilon = 29000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, mientras que en agua es de $\varepsilon = 18000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Las constantes de primer orden observadas (k_{obs}) se calcularon por el método integral de las reacciones con al menos el 80% de conversión. Cuando las reacciones eran lentas se usó el método de las rapidezces iniciales. Todas las cinéticas se hicieron con un ajuste de la fuerza iónica con Me_4NCl a una concentración constante de 0.1 M (0.15-0.2 M en algunos casos con cationes metálicos).

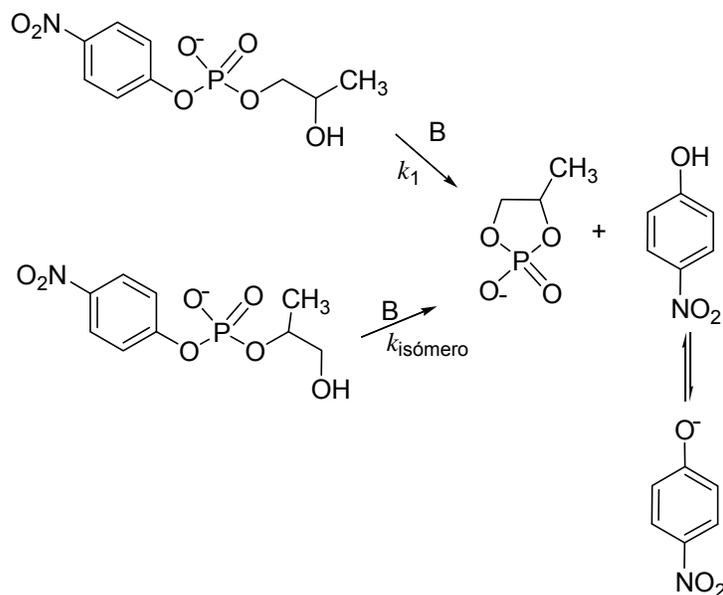


Figura 26. Esquema de la reacción de transesterificación del 2-hidroxipropil-*p*-nitrofenil fosfato.

En los experimentos en los que las constantes cumplieron el requisito $k > 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, las constantes observadas se obtuvieron mediante un ajuste no lineal de la ecuación 18, que corresponde a la formación de un producto mediante una cinética paralela de primer orden.

$$A = \Delta A_{\infty,1}(1 - e^{-k_1 t}) + \Delta A_{\infty,iso}(1 - e^{-k_{iso} t}) + A_0 \quad \text{Ec. 18}$$

A es la absorbancia en cualquier momento, ΔA_{∞} es la diferencia entre la absorbancia inicial y la infinita (1 indica que es el sustrato deseado e iso indica que es el isómero), A_0 es la absorbancia al inicio, k_1 y k_{iso} son las constantes de rapidez observada para el sustrato deseado y el isómero; y t es el tiempo. En la Figura 27a

se muestra un ejemplo de un ajuste con la ecuación 18, para la transesterificación del HpNPP con guanidinio neutralizado al 60% con Me₄NOH; mientras que en la 27b se muestra el comportamiento de los espectros de UV-vis del HpNPP y el 4-nitrofenol con el tiempo.

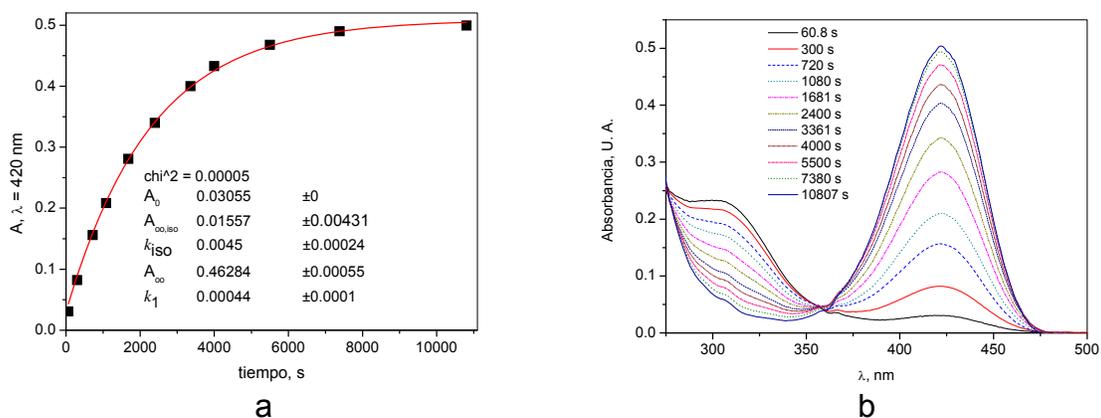


Figura 27. Ejemplo de: (a) un ajuste con la ecuación 6 para la transesterificación del HpNPP con guanidinio neutralizado al 60%; (b) del seguimiento de los espectros del HpNPP con el tiempo, los números que aparecen en la parte derecha superior son los tiempos a los que fueron tomados los espectros en segundos.

En las reacciones cuyas constantes de rapidez fueron $k < 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ los ajustes se hicieron mediante el método de las rapideces 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 19, la rapidez inicial se obtuvo 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. Para llevar a cabo estos experimentos, se tuvo que prehidrolizar la solución del sustrato mediante la adición de una base o dejándola por un tiempo, hasta que la absorbancia inicial fuese de al menos el 20% de la absorbancia final, con el fin de evitar la presencia del isómero del sustrato modelo.

$$V_0 = \left[\frac{dA_{NF}}{dt} \right]_{t \rightarrow 0} = k_{obs} \varepsilon_{NF} [HpNPP] = k_{obs} A_{\infty} \quad \text{Ec. 19}$$

Los estudios cinéticos que se hicieron para las bases fueron de perfiles de neutralización (a una concentración fija de amortiguador) y concentración (a una proporción de neutralización constante). Además, en el caso de los cationes metálicos se hicieron estudios de la variación de la concentración del metal a una concentración fija del amortiguador a una proporción de neutralización constante; perfiles de neutralización del amortiguador a una concentración fija del catión y del amortiguador; y perfiles de concentración de la base a un porcentaje de neutralización del amortiguador y concentración del catión metálico constante. Lo anterior para discriminar entre algunas rutas posibles.

Para tener más evidencias de los mecanismos propuestos, se hizo un estudio de efectos isotópicos de disolvente. Éste consistió en hacer perfiles de neutralización con las bases, mediante el método descrito arriba (DMSO:H₂O 4:1) y haciendo los mismo perfiles pero en lugar de usar agua normal, usar agua deuterada como disolvente. Para esto, todos los reactivos se disolvieron en D₂O. El límite de H₂O fue del 5% en volumen en la celda de reacción. También se hizo un estudio de “Inventario de protones”. Este estudio se realizó haciendo la reacción con el amortiguador con 40% de la base en la forma desprotonada, variando la fracción D₂O/H₂O de 0 a 0.95.

4.6 Titulaciones por RMN ³¹P

Para obtener las constantes de asociación entre un modelo del sustrato, el difenilfosfato (el cual es inerte en las condiciones de medición a la hidrólisis), y los amidinios, se llevaron a cabo titulaciones mediante la técnica de RMN ³¹P. Los experimentos se hicieron adquiriendo los espectros del difenilfosfato al inicio y después de cada adición de los amidinios usados. La concentración inicial del difenilfosfato fue de 10 mM, mientras que la de los amidinios fue de 0-0.5 M. Los

experimentos se hicieron en una mezcla de DMSO acuoso al 80%, usando DMSO-d₆ y agua o DMSO y D₂O. Para obtener los valores de las constantes de asociación se tomaron los desplazamientos químicos (δ) y se hizo el ajuste con la ecuación 20.

$$\delta = \frac{\delta_0 + \delta_\infty K_{as}[H]}{1 + K_{as}[H]} \quad \text{Ec. 20}$$

Donde δ es el desplazamiento químico en cualquier momento, δ_0 es el desplazamiento químico del difenilfosfato, δ_{∞} es el desplazamiento químico de saturación, K_{as} es la constante de asociación y $[H]$ es la concentración de los amidinios.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a los resultados previos en el mismo grupo de investigación de la catálisis de la transesterificación del HpNPP con sistemas amortiguadores (acetamida, piperidina y metilamina) en una mezcla de DMSO acuoso (4:1 en volumen), se decidió ampliar el trabajo con otros sistemas amortiguadores (guanidina, benzamida y aminoguanidina) [114]. Ya que de este modo se podrían resolver algunas dudas acerca del mecanismo propuesto, acerca de la transferencia de un protón o una estabilización electrostática en el estado de transición. Además, se hicieron efectos isotópicos de disolvente y el estudio de “inventario de protones”, para tener más evidencias acerca del mecanismo propuesto. También se determinaron los valores de pK_a de las formas ácidas de las bases empleadas como catalizadores, indispensables para poder correlacionar las constantes de rapidez de los procesos catalíticos con la fuerza de las bases. Aunado a esto, también se obtuvieron las constantes de asociación entre dos fosfatos, un modelo del sustrato usado (difenílfosfato) y un modelo del posible estado de transición (4-nitrofenílfosfato) [113] con algunos de los catalizadores usados, para poder establecer una comparación de las constantes de asociación con el estado de transición.

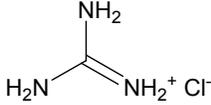
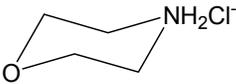
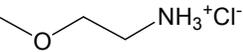
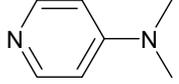
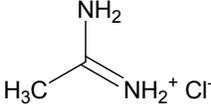
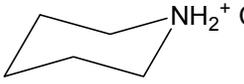
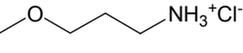
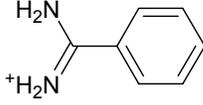
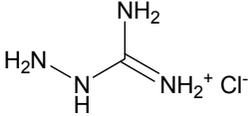
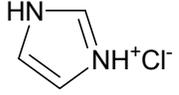
Una vez propuesto el mecanismo se decidió probar con cationes metálicos (Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , $Co(NH_3)_6^{3+}$, $Co(en)_3^{3+}$, $Co(NH_3)_5Cl^{2+}$) y guanidinio como catalizadores en sistemas amortiguados. En este caso se hicieron los estudios en la mezcla de DMSO acuoso y en agua (a $37^\circ C$). Asimismo, se obtuvo el valor de la constante básica específica en agua. Finalmente, se hicieron correlaciones de Brønsted para caracterizar los mecanismos.

5.1 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 en volumen de DMSO-agua los valores de pK_a determinados en agua no pueden utilizarse directamente, ya que dependen de la temperatura y del medio usado [111, 115]. Con base en lo anterior se decidió medirlas a partir de titulaciones potenciométricas en las mismas condiciones en las que se hicieron los experimentos cinéticos. Para mantener la fuerza iónica del medio constante se usó cloruro de tetrametilamonio como electrolito de soporte, para facilitar las mediciones de pH del electrodo en este medio.

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 18.8 ± 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 (en su forma de base libre o catiónica) y la del cloruro de tetrametilamonio en las mismas soluciones de 100 mM. En la Figura 28 se muestra las curvas de valoración de los cloruros de acetamidinio, benzamidinio y guanidinio, en donde se presenta el valor de pH corregido en función de la relación de los moles del titulante (hidróxido de tetrametilamonio en este caso) por los moles del analito (formas catiónicas de las bases). De este modo es más sencillo ubicar el punto de equivalencia y también aproximar el valor del pK_a . Esto último se hace ubicando el valor de pH obtenido cuando la relación molar del titulante y el analito toma un valor de 0.5, ya que en este punto el valor de pH es el mismo que el del pK_a . 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 de las formas protonadas de las bases se muestran en la Tabla 4 y se hace una comparación con los valores reportados en agua a 25°C. Con los datos de la Tabla 4 se elaboró una gráfica que se presenta en la Figura 29. La correlación muestra poca dispersión entre los puntos y tiene una pendiente de 1.23 ± 0.16 y un intercepto con la ordenada de -3 ± 1.5 .

Tabla 4. Comparación de los valores de pKa en agua y en la mezcla DMSO-agua 4:1 en volumen a 37°C*

Compuesto				
	Guanidinio	Morfolinio	2-metoxietilamonio	4-dimetilamino piridina
pKa H ₂ O	13.7	8.3	9.2	9.7
pKa DMSO	13.91(3)	8.03(1)	9.12(1)	7.46(3)
Compuesto				
	Acetamidinio	Piperidinio	3-metoxipropilamonio	Benzamidinio
pKa H ₂ O	12.4	11.1	10.15	11.6
pKa DMSO	12.2(1)	9.88(3)	9.65(1)	10.7(1)
Compuesto			MeNH ₃ ⁺ Cl ⁻	
	Aminoguanidinio	Imidazolio	Metilamonio	
pKa H ₂ O	11.4	7	10.7	
pKa DMSO	13.0(1)	5.4(2)	10.1(2)	

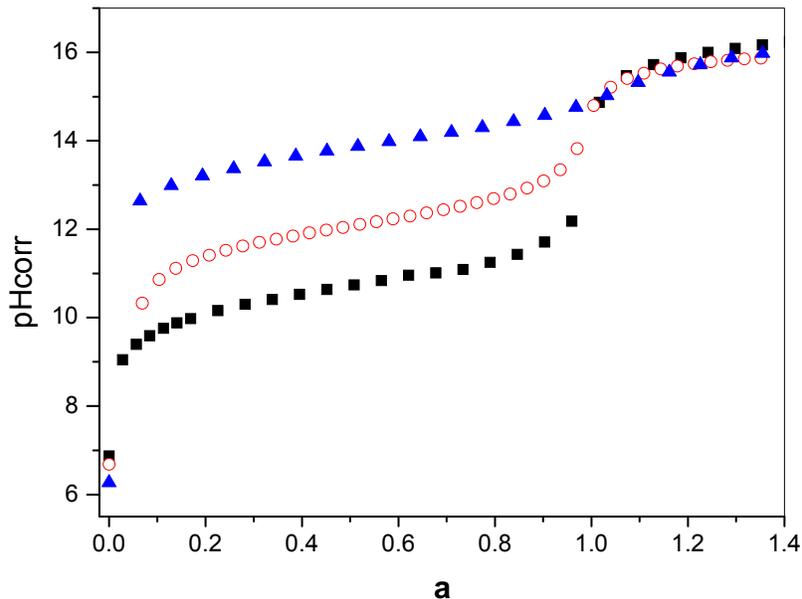


Figura 28. Curvas de titulación con hidróxido de tetrametilamonio a 37°C en 80% de dimetilsulfóxido, $I = 100$ mM de cloruro de tetrametilamonio de los cloruros de: benzamidinio (cuadros), acetamidinio (círculos abiertos) y guanidinio (triángulos). En la gráfica, “a” representa la relación de moles añadidos de Me_4NOH por cada mol de la forma catiónica de la base.

De los resultados mostrados en la Tabla 4, se observa que dos bases (guanidina y aminoguanidina) aumentan su valor de pK_a en la mezcla de disolventes, es decir su basicidad aumenta. Esto puede deberse a que disminuye la interacción con agua y exista una mayor estabilidad de la especie catiónica en la mezcla de disolvente, lo que ocasiona que disminuya su acidez ya que se los protones no se liberan tan fácilmente. Este proceso podría estar favorecido entálpicamente [17], ya que al disminuir su grado de disociación, el valor del cambio de entropía no es significativo.

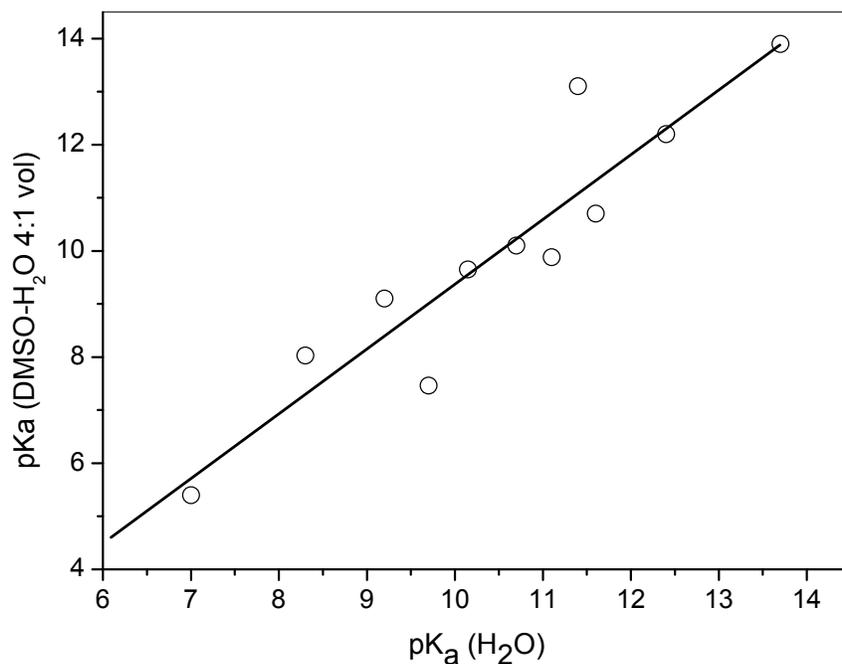
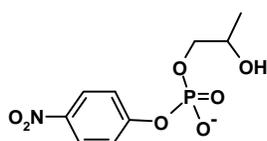


Figura 29. Relación entre los valores de pK_a determinados en la mezcla DMSO-agua 4:1 en volumen con los valores reportados en agua.

También existen pares ácido-base cuyos valores de pK_a disminuyeron, es decir, se volvieron más ácidas. En este caso, podríamos atribuir esta disminución en la basicidad por una estabilización de la forma neutra de las bases, lo cual puede deberse a la hidrofobicidad de la parte carbonada de las bases. Este proceso puede favorecerse entrópicamente [17], ya que al ser más estable la forma neutra propicia la liberación del protón que es lo que ocasiona su aumento ligero en la acidez. Un estudio más detallado del proceso de afinidad protónica de las bases utilizadas (estudios calorimétricos) puede confirmar lo dicho anteriormente. Sin embargo, este estudio está fuera de los objetivos de este trabajo.

5.2 Estudios de transesterificación del HpNPP con los sistemas amortiguados benzamidina-benzamidinio y aminoguanidina-aminoguanidinio

En un estudio previo en nuestro grupo de investigación [114] para la transesterificación del 2-hidroxiopropil-*p*-nitrofenilfosfato, HpNPP (con acetamidina, piperidina y metilamina) (Esquema 1) se encontró la existencia de dos rutas mecanísticas: la catálisis básica general y una catálisis bifuncional (básica general asistida por la forma catiónica de la base). La ley de rapidez general obtenida para ambas rutas se encuentra en el Esquema 1. Para tener una mayor información de los mecanismos propuestos y hacer un análisis más detallado mediante relaciones lineales de energía libre (relación de Brønsted), se decidió ampliar el estudio con las bases guanidina, aminoguanidina y benzamidina. La elección de estas sustancias bases se fundamenta en la diferencia de los valores de pK_a respecto a las bases con las que ya se había trabajado para ampliar el intervalo de trabajo.



HpNPP

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

Esquema 1

Los estudios con estas bases consistieron en perfiles del efecto de la concentración de la base sobre la constante de rapidez a diferentes proporciones de neutralización constantes; y perfiles del efecto de la neutralización de la base sobre las constantes de rapidez a una concentración de amortiguador constante. Con este tipo de estudios se puede conocer si la reacción presenta un mecanismo bifuncional en donde participen ambas especies del amortiguador. Si el mecanismo presenta la ruta mencionada, seguirá la ley de rapidez propuesta en el Esquema 1, donde participan tanto la forma protonada como la desprotonada. En la Figura 30 se muestra el perfil de la variación de la k_{obs} para la transesterificación del HpNPP en función de la concentración total del amortiguador, aminoguanidina, a diferentes fracciones de

base libre. Todos los experimentos se hicieron manteniendo la fuerza iónica constante de 0.1 M con Me_4NCl .

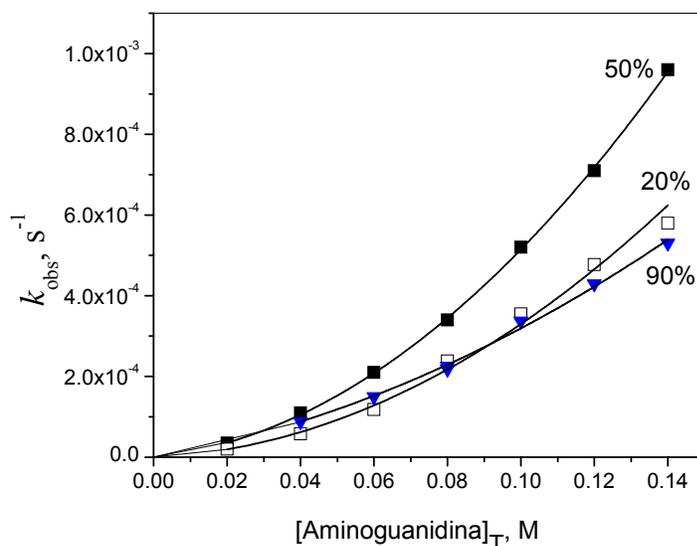


Figura 30. Catálisis de la transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO acuoso en función de la concentración total de aminoguanidina a diferentes fracciones de base libre. Las líneas se obtuvieron con la ecuación 22. El porcentaje de error promedio en los valores de las constantes fue del 0.5%.

Los perfiles de la Figura 30 son cuadráticos, lo que indica que hay un segundo orden respecto al amortiguador (este perfil no es concluyente, ya que puede presentarse en otro tipo de mecanismos alternativos, por lo que es necesario realizar un perfil de neutralización). También se observa que en una fracción de neutralización de 50% existe un máximo de actividad, lo que puede significar que existe un mecanismo del tipo bifuncional. Lo anterior es congruente con la ley de rapidez propuesta para este tipo de mecanismo (Esquema 1). Otra cuestión importante es que todos los perfiles tienden a cero a bajas concentraciones indicando que la rapidez de la hidrólisis espontánea es muy baja. La Figura 31A presenta el perfil de neutralización de aminoguanidina para la transesterificación del HpNPP. El perfil obtenido tiene una forma de campana, con una máxima actividad catalítica en 50% de neutralización de la base, esperado para una catálisis bifuncional en donde participan las dos especies

del amortiguador ácido-base. El perfil obtenido no es simétrico en la zona donde predomina la base libre. Esto es posible atribuirlo a una contribución de una ruta básica general de primer orden, además de la ruta bifuncional, tal como se muestra en la ley de rapidez del Esquema 1.

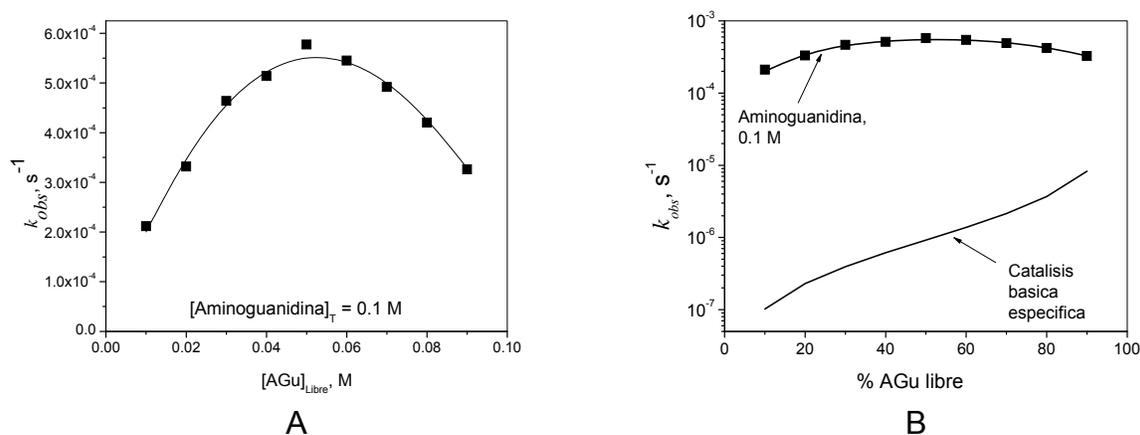


Figura 31. (A) Variación de k_{obs} para la transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO acuoso en función de la fracción de la forma básica del amortiguador a una concentración total de aminoguanidina constante de 0.1 M. Las líneas se obtuvieron con la ecuación 22, el porcentaje de error promedio en los valores de las constantes fue del 1%. (B) Comparación del perfil de neutralización con la catálisis básica específica.

Algo interesante a considerar en este perfil es el efecto que provee la base libre sobre la catálisis básica específica. Una aproximación del valor de la concentración del ión hidróxido en el máximo de actividad de aminoguanidina se presenta a continuación. En el máximo de actividad del catalizador, puede considerarse que el valor del pH es de 13 (que es el mismo valor del pK_a de AGu, ya que está 50% neutralizado). Considerando el valor de pK_w del H_2O en el medio de reacción es 18.8, tenemos que la $[OH^-] = 10^{-5.8} M$, tomando el valor obtenido para k_{OH} igual a $0.58 M^{-1} s^{-1}$, el valor para la catálisis básica específica calculado en estas condiciones es de $k = (0.58 M^{-1} s^{-1})(10^{-5.8} M) = 9.85 \times 10^{-7} s^{-1}$. El valor anterior es aproximadamente 10^3 menor al obtenido para la k_{obs} con aminoguanidina en una proporción de

neutralización del 50%. En la Figura 31B se muestra la comparación del perfil de neutralización en escala logarítmica con la catálisis básica específica calculada para las mismas condiciones. En este perfil se observa que existe un predominio de la catálisis por aminoguanidina respecto a la del ión OH^- en la transesterificación del HpNPP.

La diferencia tan grande entre la catálisis básica general y la específica simplifica mucho el análisis de los resultados cinéticos. Primero, no es necesario corregir la rapidez observada en presencia del catalizador por la rapidez de la reacción espontánea (catálisis básica específica). Segundo, esta diferencia se observa a una concentración relativamente baja del catalizador, que ayuda a que no se afecten de manera significativa las propiedades del medio; lo que representa la eliminación de un problema grave en el análisis de los datos obtenidos en medio acuoso [94 y 99] en donde ambas rutas pueden coexistir con valores muy similares en las constantes de rapidez.

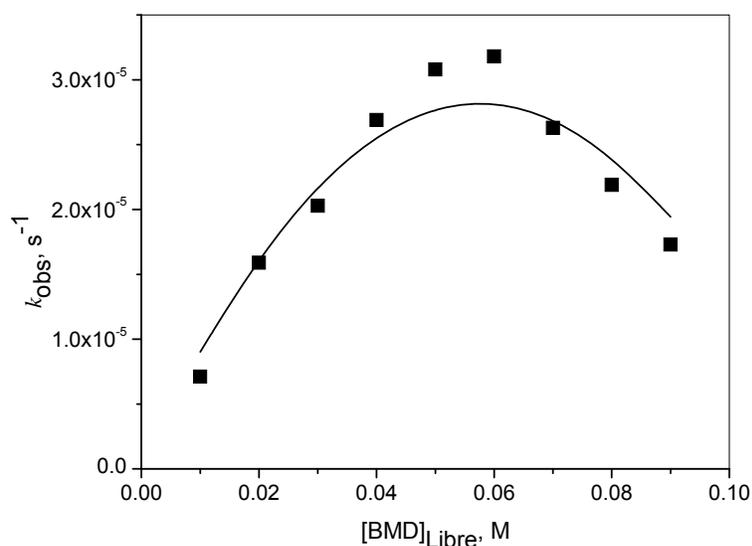


Figura 32. Efecto del grado de neutralización de benzamidina (concentración total 0.1 M) sobre la k_{obs} de la transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO: agua 4:1. El porcentaje de error promedio en los valores de las constantes fue del 0.71%.

En el caso de benzamidina, se hizo el mismo análisis que con aminoguanidina y en la Figura 32 se presenta el perfil de neutralización. En este perfil el máximo de actividad se encuentra desplazado a una fracción de base libre de 0.6, además del mismo modo que para aminoguanidina el perfil no es simétrico. Lo cual puede explicarse del mismo modo que para aminoguanidina, existe una contribución de primer orden de la catálisis básica general.

La explicación del por qué en un mecanismo bifuncional existe un máximo en un perfil de neutralización cuando tenemos una relación $[B]:[HB^+]$ 1:1, puede darse si consideremos el siguiente interludio matemático:

Para la ley de rapidez:

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

en condiciones de pseudomonomolecularidad, tenemos que

$$k_{obs} = k_1[B] + k_2[B][HB^+] \quad \text{Ec. 22}$$

si la concentración total del amortiguador es constante,

$$C_T = [B] + [HB^+] \quad \text{Ec. 23}$$

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

$$[HB^+] = C_T - [B] \quad \text{Ec. 24}$$

si sustituimos la ecuación 24 en 22, obtenemos

$$k_{obs} = k_1[B] + k_2[B](C_T - [B]); \quad k_{obs} = k_1[B] + k_2[B]C_T - k_2[B]^2 \quad \text{Ec. 25}$$

ahora, al derivar la ecuación 25 respecto a $[B]$ e igualar a cero para obtener el valor donde la función tenga un máximo, se obtiene lo siguiente:

$$\frac{dk_{obs}}{d[B]} = k_1 + k_2C_T - 2k_2[B] = 0 \quad \Rightarrow \quad [B] = \frac{k_1 + k_2C_T}{2k_2}$$

Entonces si $k_2C_T \gg k_1$ tenemos que en el máximo: $[B] = \frac{C_T}{2}$

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 bifuncional en donde participan ambas especies de un amortiguador, con una contribución de primer orden de la ruta básica general debe ser en la relación 1:1 de estos. Es decir cuando $[B] = [HB^+]$, siempre y cuando se cumpla con la condición de $k_2C_T \gg k_1[B]$. Sin embargo, cuando no se cumple esta condición el máximo puede mostrarse desplazado de este punto. Ambos casos se presentan en los perfiles obtenidos, en aminoguanidina se cumple la condición, mientras que con benzamidina no.

Los perfiles obtenidos tienen la forma de campana con máximos entre 0.5 y 0.6 que confirman que en el mecanismo participan ambas formas del amortiguador (la especie protonada y la desprotonada). En este tipo de perfil ha existido mucha controversia en algunos trabajos, como los de Breslow hechos en agua [91-93]. La crítica ha sido principalmente en dos sentidos: el primero es el efecto del codisolvente debido a las altas concentraciones de amortiguadores orgánicos 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, todos los experimentos cinéticos se realizaron 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.

Los resultados con los experimentos hechos con guanidina se muestran en el apéndice 3 ya que su análisis es muy similar al de aminoguanidina y benzamidina. Sólo el perfil de neutralización se presenta en la figura 43 como parte del análisis de los efectos isotópicos sobre el sistema de reacción. La razón de no colocar el análisis en esta sección es para evitar ser repetitivos. Los resultados obtenidos con todos los

catalizadores usados muestran que las rutas de transesterificación principales pueden llevarse a cabo por los mecanismos de la Figura 33. En la catálisis básica general la forma básica extrae el protón del grupo hidroxilo y de manera concertada éste ataca al fósforo del grupo fosfato. El mecanismo bifuncional es similar al anterior, sólo que la forma catiónica del amortiguador estabiliza la carga negativa del fosfato en lugar de llevar a cabo una transferencia del protón. Este mecanismo debe ser confirmado mediante efectos isotópicos y correlaciones de Brønsted. De acuerdo a lo anterior, podemos presentar la ley de rapidez general en la forma de la ecuación 22 donde la contribución de la catálisis básica general de la Figura 33 está expresada como $k_1[B]$ y la de la catálisis bifuncional es $k_2 [B][BH^+]$.

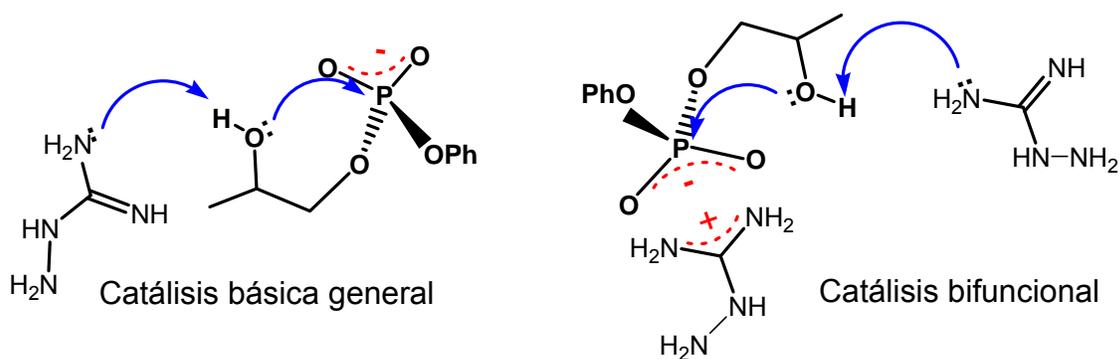


Figura 33. Esquema del mecanismo de una catálisis básica general y la catálisis bifuncional

Para realizar un análisis con la ecuación 23 es útil modificarla dividiendo ambos lados por $[B]$:

$$\frac{k_{obs}}{[B]} = k_1 + k_2 [BH^+] \quad \text{Ec. 26}$$

Tabla 5. Constantes de rapidez y equilibrio para la transesterificación del HpNPP catalizada por amortiguadores en DMSO acuoso al 80% a 37°C. ^{a)}

Base	pK _a	k ₁ , M ⁻¹ s ⁻¹	k ₂ , M ⁻² s ⁻¹	k ₂ ', M ⁻² s ⁻¹	K [‡] _T , M ⁻¹	
					k ₂ /k ₁	k ₂ '/k ₁
Guanidina	13.91(3)	0.025(2)	1.68(5)		67	
Aminoguanidina	13.0(1)	0.0018(1)	0.178(6)	0.21(2)	99	117
Acetamidina*	12.2(1)	0.0010(1)	0.055(3)	0.24(3)	55	240
Benzamidina	10.7(1)	1.3(1)×10 ⁻⁴	0.00858(7)		118	
Metilamina*	10.06(2)	1.5(2)×10 ⁻⁵	9.7(2)×10 ⁻⁵		6.5	
Piperidina*	9.88(3)	1.4(2)×10 ⁻⁵	1.7(2)×10 ⁻⁴	0.0017(2)	12.1	121

^{a)} Los valores en el paréntesis son los errores estándar en la última cifra significativa.

*[114]

De la ecuación anterior podemos ver que al hacer la gráfica de los resultados como $k_{\text{obs}}/[\text{B}]$ vs. $[\text{BH}^+]$ la intersección con la ordenada nos dará la constante de rapidez de la contribución del mecanismo básico general de la Figura 33 (k_1) a la constante de rapidez observada mientras que la pendiente dará la contribución del mecanismo bifuncional (k_2). El análisis cuantitativo en las coordenadas de la ecuación 26 de los resultados cinéticos con aminoguanidina y benzamidina, se muestran en las gráficas de las Figuras 34 y 35. Los valores obtenidos para k_1 y k_2 se encuentran en la Tabla 5 junto con los obtenidos en el trabajo previo para las otras bases (acetamidina, piperidina y metilamina).

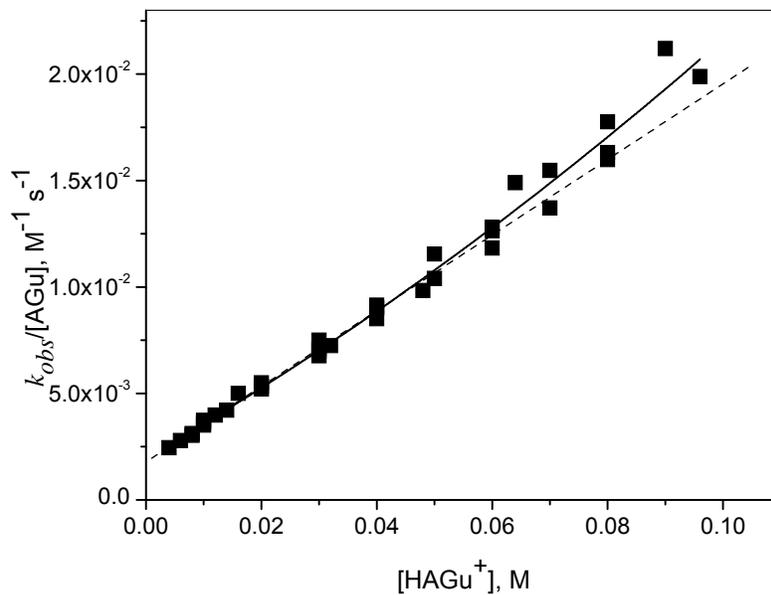


Figura 34. Gráfica de la catálisis de la transesterificación del HpNPP con aminoguanidina en coordenadas de la ecuación 26. El porcentaje de error promedio en los valores de las constantes fue del 1.3%.

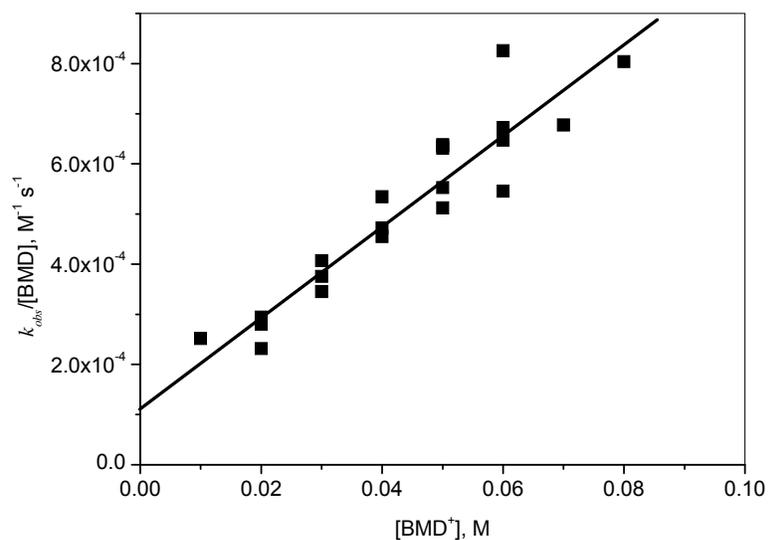


Figura 35. Gráfica de la catálisis de la transesterificación del HpNPP con benzamidina en coordenadas de la ecuación 26. El porcentaje de error promedio en los valores de las constantes fue del 3%.

Los resultados con aminoguanidina, guanidina y benzamidina confirman la ley de rapidez propuesta en el Esquema 1, además de la contribución de la ruta básica general que explica la asimetría de los perfiles de neutralización obtenidos. El perfil obtenido para aminoguanidina muestra una ligera desviación de la linealidad a altas concentraciones de la forma protonada, que se explica con la aparición de un término que es de segundo orden en la especie HB^+ en la ley de rapidez obtenida, el cual es apreciable sólo a altas concentraciones. 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 de aminoguanidina, guanidina y benzamidina sobre las constantes de rapidez observadas para la transesterificación del HpNPP en las condiciones ya mencionadas. Como vemos en las Figuras 34 y 35, la línea calculada producida por estos valores de constantes predice muy bien el comportamiento experimental de estos perfiles.

Los resultados anteriores nos permiten 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 mecanismo básico general de primer orden. Con esto podemos utilizar los datos obtenidos en el trabajo previo y analizar todos los resultados con una correlación de Brønsted.

5.3 Correlaciones de Brønsted para la transesterificación del HpNPP en la mezcla de DMSO-agua 4:1 mediante una catálisis básica

Con los resultados cinéticos obtenidos en este trabajo y los previos [114] para la reacción de transesterificación del HpNPP en las condiciones mencionadas con los sistemas amortiguadores, se llevó a cabo un análisis de Brønsted. Para esto se elaboró una gráfica con los valores de los logaritmos de las constantes de rapidez en función de los valores de pK_a obtenidos en la mezcla de DMSO acuoso a 37°C , la cual se muestra en la Figura 36. En este tipo de gráficas se obtiene una recta cuya ecuación es:

$$\log k = \beta \text{p}K_a + C \quad \text{Ec. 27}$$

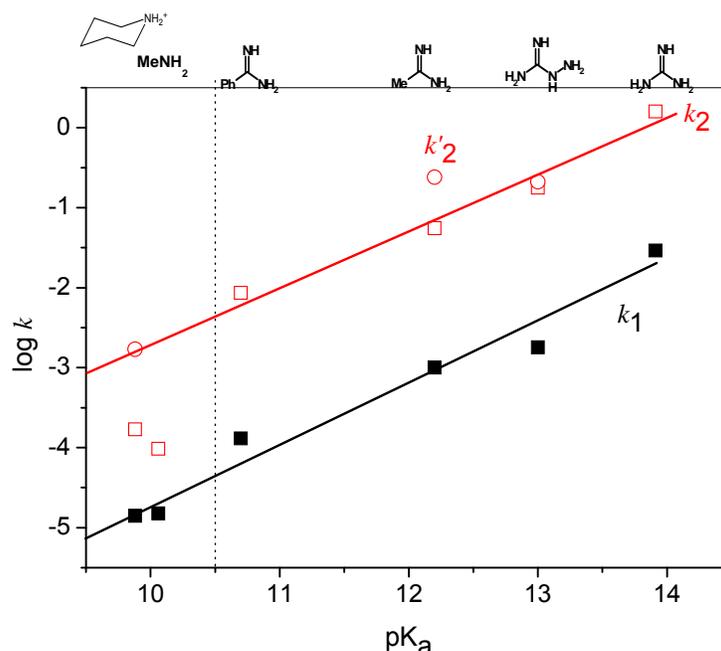


Figura 36. Correlación de Brønsted para k_1 (cuadros negros), k_2 (cuadros blancos) y k_2' (círculos blancos) para la transesterificación del HpNPP en diferentes soluciones amortiguadoras en DMSO acuoso al 80%.

Los valores de las pendientes de esta gráfica, β , tienen interpretaciones mecanísticas importantes. Las constantes de rapidez para la catálisis básica general (k_1) para las bases estudiadas, siguen la ecuación de Brønsted (ecuación 28), la cual se representa con los cuadros negros en la Figura 36. La pendiente obtenida en esta ecuación es ligeramente mayor a la informada para la hidrólisis básica general para el sustrato 4-nitrofeniluridina-3'-fosfato, que es aproximadamente 1000 más reactivo, en agua (0.67 ± 0.05) [96, 97].

$$\log k_1 = -12.4(9) + 0.77(7)\text{p}K_a \quad \text{Ec. 28}$$

El significado mecanístico de la pendiente obtenida es que al ser cercana a uno, nuestro estado de transición es tardío. Es decir, el estado de transición se parece más a los productos que a los reactivos, en donde la base desprotona al grupo 2-hidroxilo como se muestra la siguiente Figura.

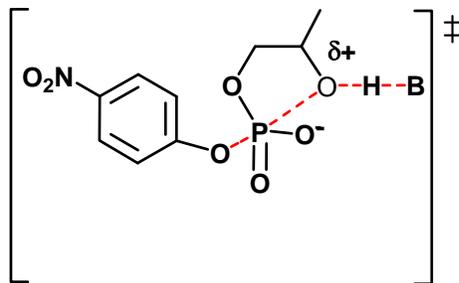


Figura 37. Esquema del posible estado de transición propuesto a partir del análisis de Brønsted.

En el sistema estudiado, una pendiente de la relación de Brønsted de cero indicaría que el enlace hidrógeno-oxígeno del grupo 2-hidroxi casi no se rompe y el enlace fósforo oxígeno casi no se forma. Esto es consecuencia de que el pK_a del estado de transición sea muy alto, con lo que el estado de transición se parecería más a los reactivos (estado de transición temprano). En el caso contrario, cuando el valor de β es 1, el enlace hidrógeno-oxígeno del grupo 2-hidroxi se encuentra muy debilitado y se desarrolla una carga parcial positiva y al mismo tiempo se comienza a formar el enlace fósforo-oxígeno. Esto trae como consecuencia que el pK_a del estado de transición disminuya. En este caso el estado de transición se parece más a los productos y se le conoce como tardío. Lo anterior es razonable si se considera que en el medio utilizado el pK_a del grupo 2-hidroxi del HpNPP es de 19.8 [76] 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.

Las constantes de rapidez para la catálisis bifuncional (k_2) para amidinas y guanidinas también obedecen la ecuación de Brønsted, pero los puntos para las aminas muestran una desviación negativa (Figura 36, cuadros rojos). Además, en los experimentos de co-catálisis (*vide infra*) usando guanidinio (k_2') con todas las bases (Figura 36, círculos blancos) las constantes de rapidez también caen en la línea de k_2 para los amidinios y guanidinos, descrito por la ecuación 29.

$$\log k_2 = -9.5(9) + 0.69(7)pK_a \quad \text{Ec. 29}$$

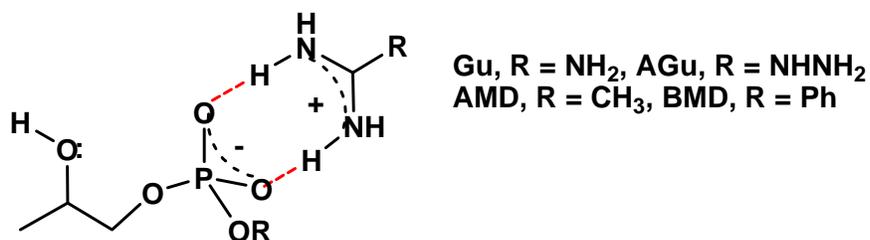


Figura 38. Esquema de la posible asociación bidentada entre un amidinio y el HpNPP

Los experimentos de co-catálisis consistieron en ver el efecto de la variación del catión guanidinio a diferentes fracciones de base libre en los diferentes amortiguadores mencionados (ver Figura 40). Los valores encontrados para k_2' después de hacer el análisis de los datos se encuentran en la Tabla 5 (página 81). Estos valores al ser usados en la gráfica de Brønsted, muestran una buena correlación con la pendiente de la catálisis bifuncional.

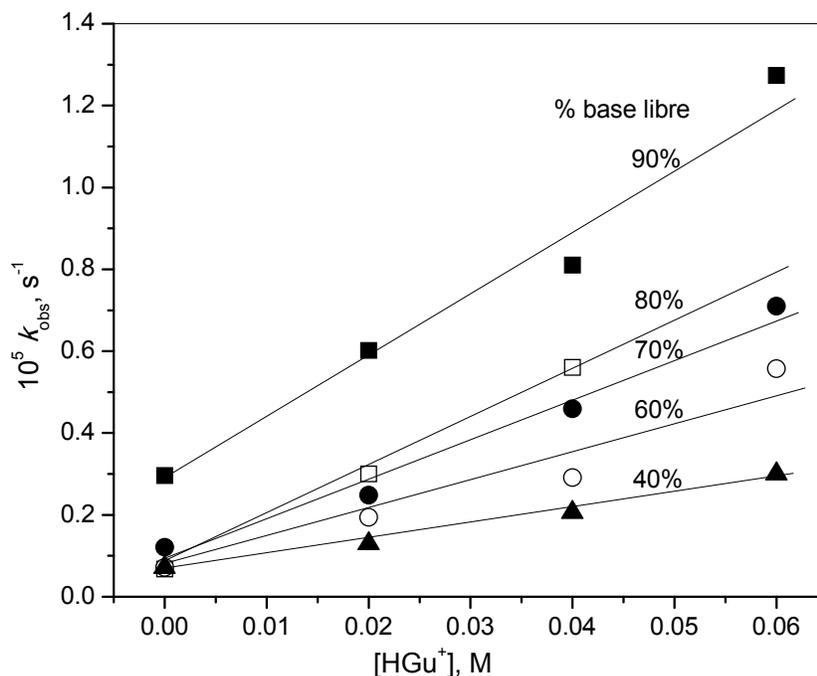


Figura 39. Perfiles de concentración de guanidinio a diferentes fracciones de base libre, en piperidina 0.1 M, para la reacción de transesterificación del HpNPP en DMSO acuoso al 80%

El análisis de la gráfica de Brønsted muestra que la catálisis con amidinios y guanidinos es más eficiente que la de los amonios. Para la reacción con piperidina como base, la actividad de guanidinio es un orden de magnitud mayor que en la forma ácida piperidinio. Con las otras bases el efecto es menor, pero sigue siendo más eficiente el catión guanidinio. Lo anterior puede atribuirse a la alta afinidad del guanidinio al fosfato observada en DMSO, debido a la habilidad de estos cationes de formar enlaces de hidrógeno bidentados (ver Figura 38), comparada con la forma de unión con los amonios (Figura 40). Cuando la comparación se hace con los amidinios, el catión guanidinio puede resultar mejor estabilizador de la carga debido a las tres formas de resonancia que presenta, ocasionando un mejor arreglo geométrico.

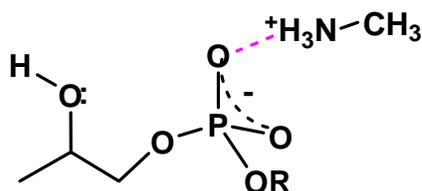


Figura 40. Esquema de la posible asociación entre metilamonio y el HpNPP.

La pendiente de la gráfica de Brønsted para la catálisis bifuncional debe ser menor que la de la catálisis básica general debido a que se espera que cationes más ácidos actúen de forma más eficiente en la catálisis. Compensando de este modo la baja actividad de sus bases conjugadas. La pendiente para la gráfica de k_2 (k_2') es un poco menor que la de k_1 , pero la diferencia está en los límites del error experimental. Lo anterior puede ser un indicativo de la existencia de una catálisis del tipo electrostático más que uno ácido general llevado a cabo por las bases protonadas, con una transferencia del protón del ácido general al estado de transición.

5.4 Análisis de la catálisis mediante el tratamiento de la asociación con el estado de transición

Otro modo de hacer el análisis de la naturaleza de la catálisis mediante las bases protonadas es en términos de una estabilización del estado de transición mediante una “asociación” con el catalizador. En esta aproximación la relación de las constantes k_2 o k_2' con k_1 es igual a la constante de asociación K_T^\ddagger para la unión de HB^+ con el estado de transición de la catálisis básica general [116], ecuación 30.

$$k_2/k_1 = K_T^\ddagger \quad \text{o} \quad k_2'/k_1 = K_T^\ddagger \quad \text{Ec. 30}$$

La demostración de la ecuación anterior se hace utilizando el tratamiento de la ecuación de rapidez de Eyring, con relación a la etapa de equilibrio entre los reactivos y el estado de transición (Apéndice 2). Los valores obtenidos para K_T^\ddagger se encuentran en la Tabla 5 (página 81). De estos valores se observa que no hay correlación con la basicidad de los amortiguadores. Al parecer las variaciones en K_T^\ddagger están relacionadas a algunos efectos estéricos o de solvatación, pero no a las propiedades ácido-base de los amortiguadores. La energía de Gibbs promedio para la estabilización del estado de transición de esos cationes es $\Delta^\ddagger G_T = -12 \pm 1$ kJ/mol. Para los iones amonio hay una diferencia de un orden de magnitud menor para los valores de K_T^\ddagger y el promedio de $\Delta^\ddagger G_T$ es -5.6 ± 0.8 kJ/mol.

Para tener una idea de la forma de unión de los amidinios con el fosfato, se midieron las constantes de asociación para guanidinio y acetamidinio con $(\text{PhO})_2\text{PO}_2^-$, un fosfodiéster estable para simular la unión con el HpNPP. La razón para no usar el sustrato empleado en las mediciones cinéticas es su posible hidrólisis durante la medición de las constantes de asociación. Además, se midieron las constantes de asociación con $p\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OPO}_3^{2-}$, un monoéster dianiónico empleado como modelo del estado de transición para la hidrólisis alcalina y la transesterificación de fosfodiésteres [123].

Para la asociación del $(\text{PhO})_2\text{PO}_2^-$ con los cloruros de acetamidinio y guanidinio se hicieron titulaciones por RMN de ^{31}P en una mezcla de 80% $\text{d}_6\text{-DMSO}/\text{H}_2\text{O}$. En la

Figura 41 se muestra las gráficas obtenidas de las titulaciones hechas. En esta gráfica se presenta el cambio del desplazamiento de fósforo contra la concentración de huésped añadido. Los cuadros negros representan la titulación del difenilfosfato con guanidinio y los triángulos blancos la titulación con acetamidinio. Los valores de las constantes obtenidas se encuentran en la Tabla 4 (página 71). En la Figura se observa que la asociación con el acetamidinio es mayor que con guanidinio, ya que la titulación con acetamidinio requiere menor concentración de éste para alcanzar la saturación, lo cual es congruente con los valores obtenidos. Göbel [117] informó un valor similar de asociación (14 M^{-1}) a los obtenidos en el presente trabajo en d_6 -DMSO para la asociación entre un amidinio sintetizado y un fosfato cíclico (2-hidroxi-1,3,2-benzodioxafosfol-2-óxido).

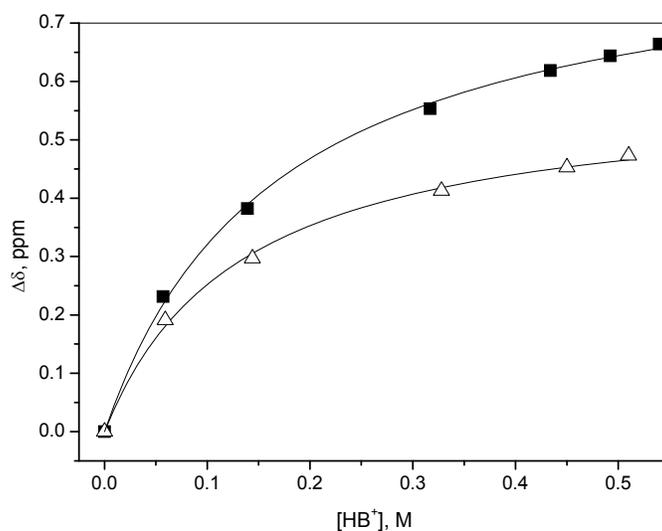


Figura 41. Titulación del difenilfosfato por RMN de ^{31}P en una mezcla de 80% DMSO- d_6 /H $_2$ O, con cloruro de acetamidinio (triángulos blancos), y con cloruro de guanidinio (cuadros negros). Las líneas de ajuste se obtuvieron mediante un modelo de asociación 1:1 con un exceso del huésped.

La asociación del $p\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OPO}_3^{2-}$ se midió por titulaciones potenciométricas, debido al mayor valor de sus constantes, como se muestra en la Figura 42 para guanidinio. Las titulaciones potenciométricas del $p\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OPO}_3\text{H}_2$ permitieron

determinar los valores de pK_a como $pK_{a1} = 3.1 \pm 0.1$ y $pK_{a2} = 10.59 \pm 0.08$. Para obtener las constantes de asociación de este compuesto con guanidinio, la titulación del $p\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OPO}_3\text{H}_2$ se repitió en la presencia de un equivalente de cloruro de guanidinio (cuadros grises). En la figura 42 se observa que la curva de titulación antes del primer punto de equivalencia no se afecta, lo que indica la débil interacción entre el guanidinio y en la forma monoaniónica del fosfato ($p\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OPO}_3\text{H}^-$). Sin embargo, la curva entre el primero y el segundo punto de equivalencia se desplazó a valores de pH menores debido a la unión con guanidinio, el cual compite por la protonación. La titulación subsecuente de guanidinio se desplazó a mayores valores de pH comparado con el guanidinio solo (círculos blancos) como resultado de la estabilización del catión con el dianión del monoéster de fosfato. Las constantes obtenidas se muestran en la Tabla 6. De estos valores se calcularon las energías de Gibbs promedio de -4.8 ± 0.4 y -16.2 ± 0.4 kJ/mol para la unión con el diéster (monoanión) y el monoéster (dianión) respectivamente.

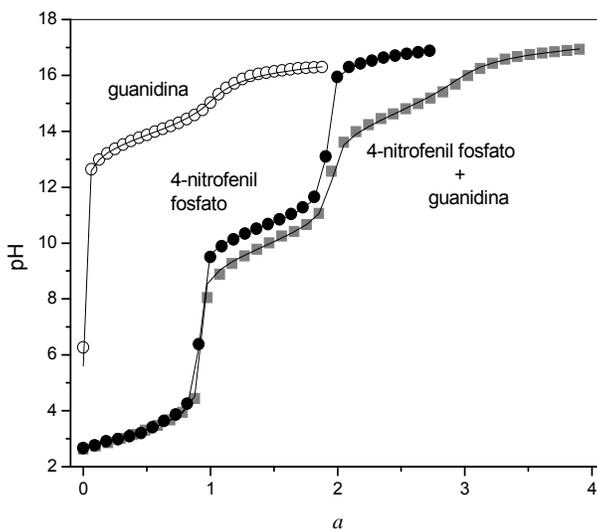
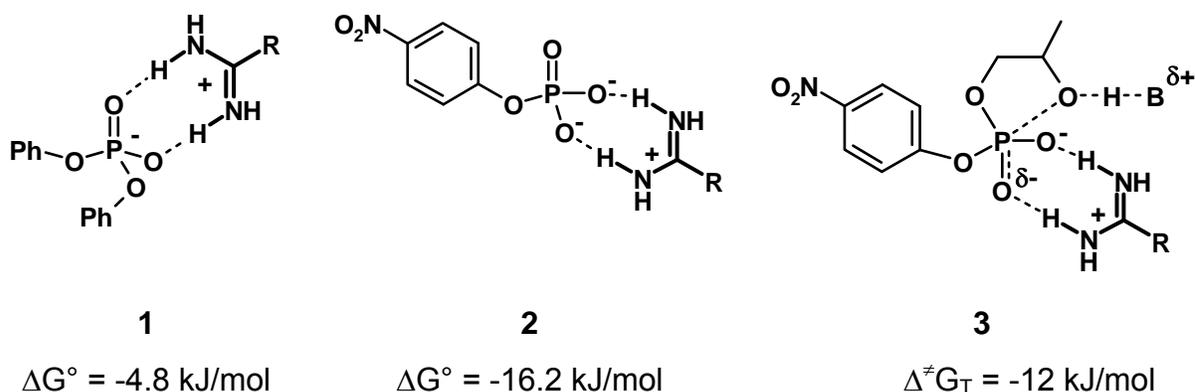


Figura 42. Curvas de titulación para el cloruro de guanidinio 10 mM (círculos abiertos), $p\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OPO}_3\text{H}_2$ (círculos negros) y la mezcla de ambos compuestos (cuadros grises) con $\text{Me}_4\text{N}(\text{OH})$ 0.1 M en DMSO al 80% en volumen; a es el número de moles de $\text{Me}_4\text{N}(\text{OH})$ añadidos por 1 mol de compuesto titulado. Las líneas corresponden a los ajustes obtenidos por Hyperquad.

Tabla 6. Constantes de asociación (M^{-1}) para la unión de guanidinio y acetamidinio con los ésteres de fosfato en DMSO acuoso al 80% vol.

	$(PhO)_2PO_2^-$		$p-O_2NC_6H_4OPO_3^{2-}$
	DMSO/H ₂ O	DMSO/D ₂ O	
$H_2NC(NH_2)=NH_2^+$	5.9 ± 0.3	7.8 ± 0.3	500 ± 50
$MeC(NH_2)=NH_2^+$	7.5 ± 0.6	13 ± 1	630 ± 70

De los experimentos anteriores se observa que los valores de K_T^\ddagger son mayores que las constantes de asociación para el diéster, pero menores que las del monoéster. Esta tendencia se muestra en los modos de unión del Esquema 2. Tanto el diéster como el monoéster pueden formar complejos bidentados con guanidinio y acetamidinio. La unión más fuerte con el monoéster puede atribuirse a la mayor carga negativa y la basicidad del dianión. El estado de transición de la catálisis básica general deberá tener una carga parcial negativa adicional en el grupo fosforano, probablemente entre -0.5 y -1 como se aprecia de la pendiente de Brønsted tan grande (ecuación 28), por lo que la carga total será entre -1.5 y -2 . El esquema de la interacción se muestra en **3**. Para tener más evidencia sobre el mecanismo por estabilización electrostática en el estado de transición, se estudiaron los efectos isotópicos de disolvente.



Esquema 2

5.5 Efectos Isotópicos de disolvente para la transesterificación del HpNPP en la mezcla DMSO-agua a 37°C.

Para poder discriminar entre un mecanismo con una transferencia de protones o una estabilización electrostática por parte de la forma ácida del amortiguador, se llevaron a cabo estudios cinéticos del efecto isotópico de disolvente. Para esto se hicieron las cinéticas de las reacciones con guanidina, acetamidina y piperidina en la mezcla 4:1 DMSO/D₂O. Los experimentos se realizaron de igual modo que los hechos en agua, sólo que ahora todas las soluciones se prepararon en D₂O. En la Figura 43 se muestra la comparación de los perfiles de neutralización obtenidos con guanidina. En este perfil se observa que las reacciones son más lentas en agua deuterada que en agua normal. Lo anterior confirma la presencia de un efecto isotópico. Para conocer la magnitud de éste, se hizo un análisis de los datos experimentales en las coordenadas de la ecuación 26. La gráfica obtenida se muestra en la Figura 44.

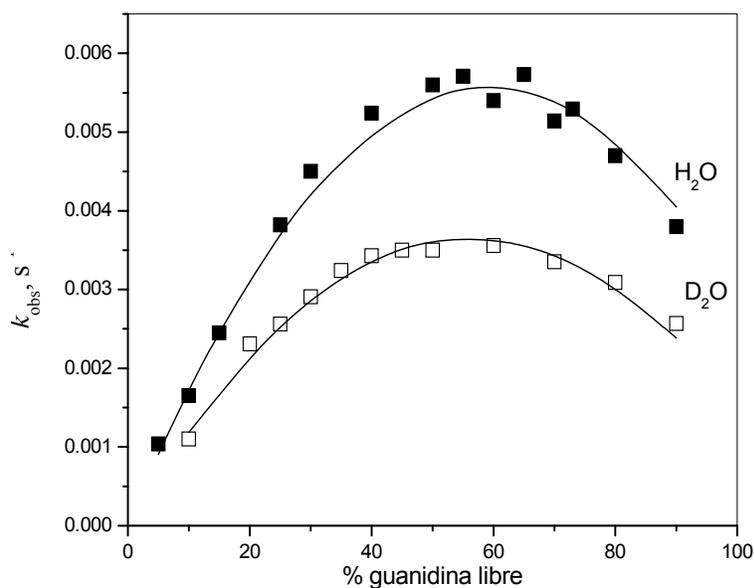


Figura 43. Catálisis de la transesterificación del HpNPP con guanidina en función de la fracción de base libre ($[Gu]_T = 0.1 \text{ mol/L}$) en DMSO acuoso al 80% a 37°C. Los cuadros negros son de los experimentos con agua, mientras que los blancos son de los hechos en D₂O. Las líneas se calcularon mediante la ecuación 22. El porcentaje de error promedio en los valores de las constantes fue del 0.9%.

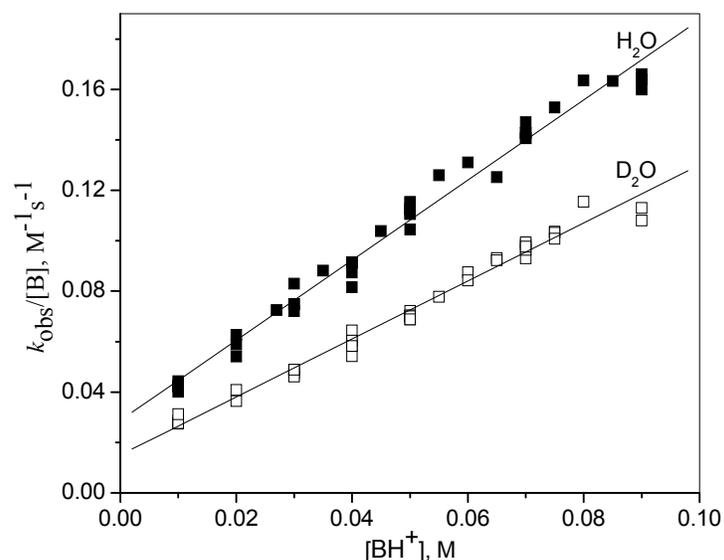


Figura 44. Gráfica de la catálisis de la transesterificación del HpNPP con aminoguanidina en coordenadas de la ecuación 26.

Las constantes de rapidez k_1 y k_2 obtenidas para guanidinio se muestran en la Tabla 7. El mismo análisis se aplicó para piperidina (Figura 45) y acetamidina (Figura 46), los resultados cinéticos se encuentran en la Tabla 7. El efecto cinético isotópico de disolvente (deuterio) obtenido es aproximadamente 1.5 para k_1 está dentro de los límites típicamente observados para la catálisis ácido-base general [118, 119]. Para la catálisis bifuncional se observaron valores menores de k_2^H/k_2^D lo cual dificulta una interpretación sencilla, por lo que se decidió hacer un “inventario de protones”.

Tabla 7. Constantes de rapidez para la reacción de transesterificación del HpNPP catalizada por amortiguadores en DMSO/D₂O 80% vol a 37°C. ^{a)}

	$k_1, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_2, \text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$	k_1^H/k_1^D	k_2^H/k_2^D
Guanidina	0.015(2)	1.10(5)	1.67	1.53
Acetamidina	$7.4(6)\times 10^{-4}$	0.037(2)	1.49	1.40
Piperidina	$9.7(8)\times 10^{-6}$	$1.4(1)\times 10^{-4}$	1.44	1.21

^{a)} Los valores en el paréntesis es la incertidumbre en la última cifra significativa.

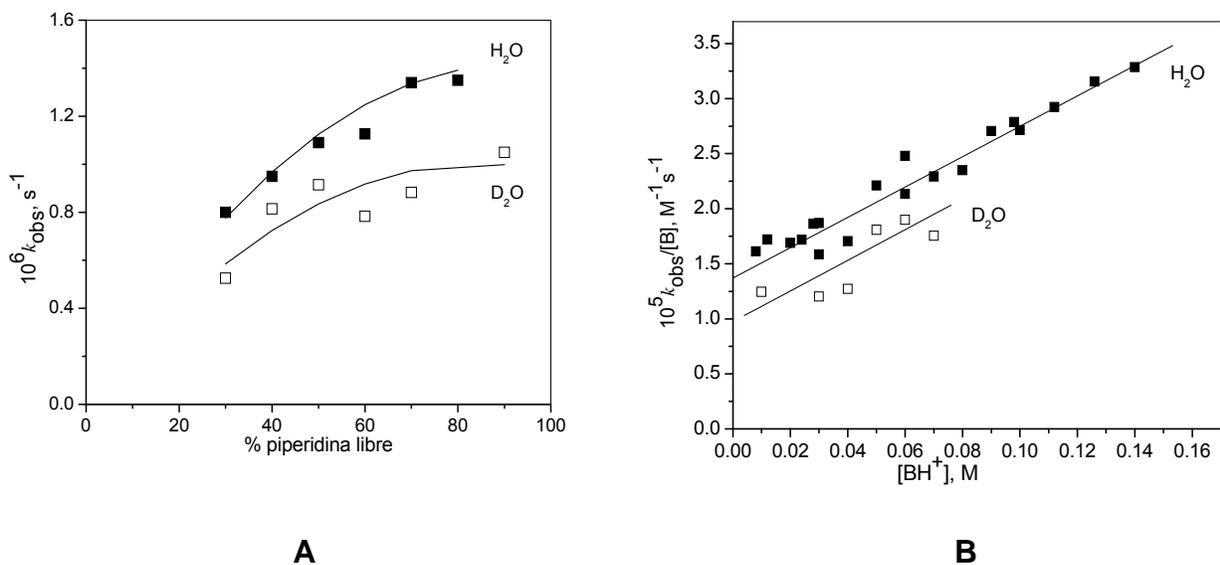


Figura 45. Catálisis de la transesterificación del HpNPP con piperidina 0.1 M (A) en función de la base libre, (B) en las coordenadas de la ecuación 26. Los cuadros negros son los resultados en agua y los blancos en agua deuterada.

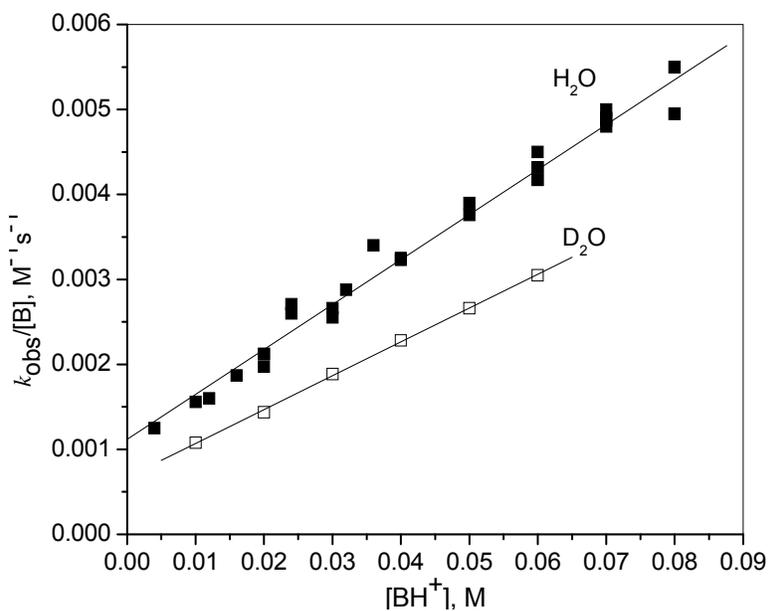


Figura 46. Catálisis de la transesterificación del HpNPP con acetamidine 0.1 M en las coordenadas de la ecuación 26. Los cuadros negros son los resultados en agua y los blancos en agua deuterada.

El método de “inventario de protones” se usa para conocer el número de protones transferidos en el estado de transición de reacción. Para poder estar seguros de la medición del efecto isotópico en la catálisis bifuncional, los experimentos se realizaron en una zona donde predominará ésta. El catalizador elegido fue guanidina, debido a la poca variación que tuvieron los datos experimentales, además de que tuvo un mayor efecto isotópico. Los experimentos de la transesterificación del HpNPP se hicieron con un porcentaje de guanidina libre del 40% con una concentración total de 0.1 M de la base. Para este experimento se midieron las constantes de rapidez a varias fracciones molares de D₂O/H₂O (*n*) en 80% de DMSO en volumen. Las constantes obtenidas se compararon con el valor obtenido en agua sin deuterar (*k_n/k₀*) y se obtuvo una gráfica de estos valores en función de la fracción molar del agua deuterada. La Figura 19 muestra la gráfica obtenida, la cual presenta una curva hacia arriba que puede deberse al intercambio de dos protones. Para confirmar lo anterior, se hizo el ajuste de la curva con la ecuación de Gross-Butler.

La ecuación de Gross-Butler para el intercambio de dos protones es:

$$(k_n/k_0) = (1 - n + n\phi_1) (1 - n + n\phi_2)$$

Donde *n* es la fracción molar de D₂O y *φ* es el factor fraccionario (ver antecedentes). El ajuste de la gráfica obtenida da dos factores de fraccionamiento $\phi_1 = 0.48 \pm 0.04$ y $\phi_2 = 1.26 \pm 0.07$. El factor ϕ_1 puede atribuirse a un efecto isotópico normal de 2.08 (los factores de fraccionamiento son el inverso de los efectos isotópicos) debida a la transferencia de un protón a la forma básica del amortiguador (B en la estructura 3 del esquema 2). Sin embargo, ϕ_2 corresponde a otra partición del protón con un efecto isotópico inverso de 0.76.

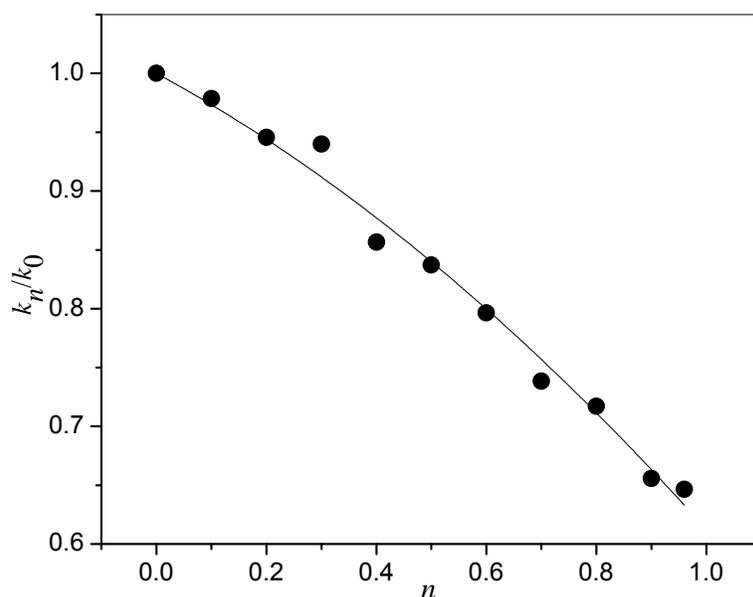


Figura 47. “Inventario de protones” para la transesterificación del HpNPP en guanidina 0.1 M con 40% de base libre.

Una posible explicación de este efecto inverso es la unión entre el guanidinio y el fosfato y no a la transferencia del protón del guanidinio al fosfato. Para probar esta hipótesis se determinaron las constantes de asociación de guanidinio y acetamidinio con $(\text{PhO})_2\text{PO}_2^-$ en DMSO/ D_2O al 80% y se compararon con los ya obtenidos en $\text{DMSO-d}_6/\text{H}_2\text{O}$. En la Figura 48, se presenta la gráfica de comparación entre los resultados obtenidos en agua normal y agua deuterada.

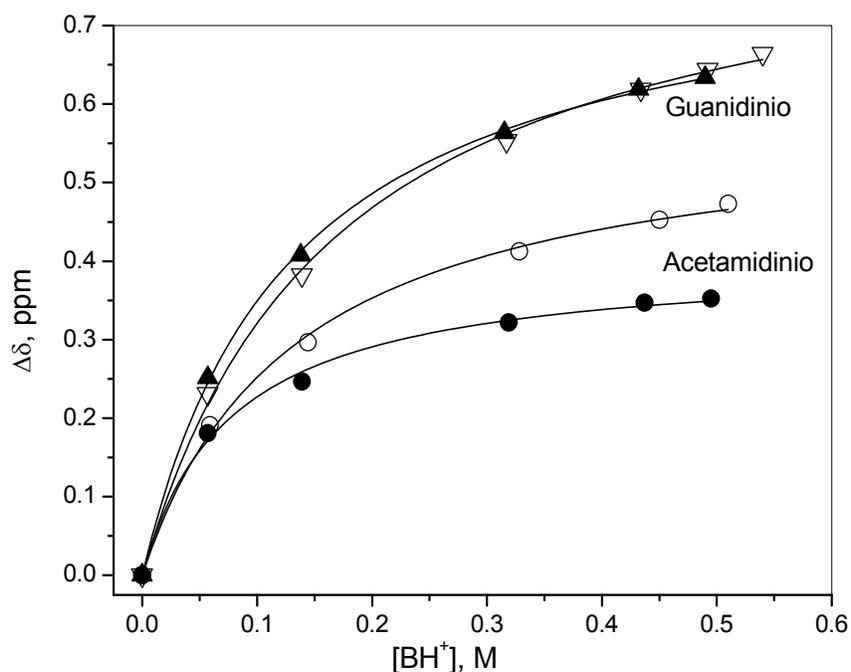


Figura 48. Titulaciones mediante RMN ^{31}P de difenilfosfato 0.01 M con los cloruros de guanidinio y acetamidinio en DMSO- d_6 /H $_2$ O (símbolos blancos) o en DMSO- d_6 /D $_2$ O (símbolos negros).

Los valores obtenidos son mayores a los encontrados en DMSO- d_6 /H $_2$ O, como se observa en la Tabla 6 (página 91), lo que indica la presencia de un efecto isotópico inverso en la constante de asociación entre el fosfato y el guanidinio. En particular, el efecto isotópico para guanidinio de $K_{as}^H/K_{as}^D = 0.76$ coincide con $1/\phi_2$, en los límites del error experimental. Con lo anterior, el “inventario de protones” confirma la ausencia de una transferencia de protones del guanidinio al estado de transición, que es requerido para una catálisis ácida general y da fuerza a la hipótesis de una estabilización del estado de transición por la asociación entre el fosfato y el guanidinio.

Normalmente los efectos isotópicos en las constantes de asociación son pequeños y por lo tanto despreciados. Sin embargo, recientemente se ha informado de efectos isotópicos inversos de disolvente (H/D) significativos para la unión entre diferentes huéspedes con aminociclodextrinas. Este efecto inverso se ha atribuido a cambios en

la hidratación de los componentes [120]. También existe un informe de que los enlaces de hidrógeno, como los formados en el par iónico guanidinio-fosfato, pueden tener efectos isotópicos normales e inverso H/D, como los que se dan entre el fenol y diferentes bases en CCl₄ [120]. Otro informe, en este sentido es el del grupo de Schramm, que determinó efectos isotópicos inversos en la asociación de glucosa con una hexocinasa [121].

Del análisis anterior se puede concluir que el papel del grupo guanidinio en la transesterificación de la molécula modelo del ARN (la cual tiene un buen grupo saliente), se lleva a cabo mediante una catálisis electrostática asistida mediante una base general. Sin embargo, cuando el fosfodiéster posea un mal grupo saliente la catálisis básica general deberá tener un estado de transición tardío con una carga negativa más desarrollada. Lo anterior puede hacer posible una transferencia de protón del guanidinio, además de la estabilización electrostática. Lo anterior ha sido propuesto en el sitio activo de la fosfolipasa C para el residuo 69 de arginina [122].

5.6 Estudios de transesterificación del HpNPP en la mezcla DMSO-agua a 37°C en sistemas amortiguados con varios tipos de cationes.

Los resultados anteriores dan una prueba de la importancia de la estabilización electrostática del estado de transición por parte de los guanidinos y los amidinos con el sustrato modelo del ARN. Por este motivo, se decidió utilizar catalizadores del tipo ácido de Lewis, como el caso de los cationes de algunos elementos alcalinos (Na⁺, K⁺ y Li⁺) y alcalinotérreos (Ca²⁺ y Mg²⁺) en presencia de un amortiguador de pH (piperidina). Este estudio nos permitirá comparar la eficiencia relativa de la estabilización del estado de transición de la ruta básica general por parte de un ácido prótico (HB⁺) o un ácido de Lewis (Mⁿ⁺). Además, estos cationes juegan un papel muy importante en el mecanismo de reacción de algunas enzimas que promueven la ruptura del enlace fosfodiéster estabilizando al estado de transición, activando al sustrato o al nucleófilo (ver antecedentes).

El estudio del mecanismo de reacción del HpNPP en presencia de cationes consistió en una serie de experimentos que abarcaron el uso de piperidina como amortiguador para obtener perfiles de la constante de rapidez de la reacción en función de la concentración total del catión a varias fracciones de neutralización del amortiguador (para conocer el orden respecto al catión metálico) y perfiles de neutralización a una concentración fija del catión. Lo anterior se lleva a cabo para facilitar el estudio mecanístico y poder descartar entre las posibles rutas que se pueden presentar en estas condiciones como los que se muestran en la ecuación 31.

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] + k_{\text{B}}[\text{B}] + k_{\text{B,HB}}[\text{B}][\text{BH}^+] + k_{\text{M,OH}}[\text{M}^{n+}][\text{OH}^-] + k_{\text{M,B}}[\text{M}^{n+}][\text{B}] \quad \text{Ec. 31}$$

En esta ley de rapidez aparece un nuevo termino con constante de rapidez $k_{\text{M,B}}$ que es análoga a la ruta con constante de rapidez $k_{\text{B,HB}}$ discutida en la primera parte del trabajo. En esta nueva ruta la asistencia electrofílica para la reacción básica general es por parte de un catión metálico. Además, la otra ruta con constante de rapidez $k_{\text{M,OH}}$ que corresponde a la asistencia electrofílica por parte de un ion metálico a la reacción básica específica. La ruta que corresponde a la participación de la forma protonada de la base, HB^+ , en conjunto con OH^- ($k_{\text{B,HB}}$) en principio es posible que exista, sin embargo es cinéticamente equivalente a la catálisis básica general con la forma neutra de la base, B, por lo que no puede ser discriminada experimentalmente.

En la Figura 49 se muestra una gráfica teórica obtenida de la variación de las constantes de rapidez observadas en función de la concentración del catión. En esta gráfica se observan tres perfiles distintos en donde la dependencia con el metal es lineal (lo que significa que el mecanismo es de primer orden respecto al metal). La pendiente obtenida de cada perfil corresponde a la constante de segundo orden k_{M} ,

$$k_{\text{M}} = dk_{\text{obs}}/d[\text{M}^{n+}] = k_{\text{M,OH}}[\text{OH}^-] + k_{\text{M,B}}[\text{B}] \quad \text{Ec. 32}$$

la cual al ser graficada en función de la concentración de la forma básica del amortiguador ([B]) o en función de la concentración del ión hidróxido (la cual puede expresarse en función de $[\text{B}]/[\text{HB}^+]$ ya que la $[\text{OH}^-] = (K_w/K_a)[\text{B}]/[\text{HB}^+]$) nos permite obtener $k_{\text{M,B}}$ o $k_{\text{M,OH}}$ respectivamente (ver Figura 50).

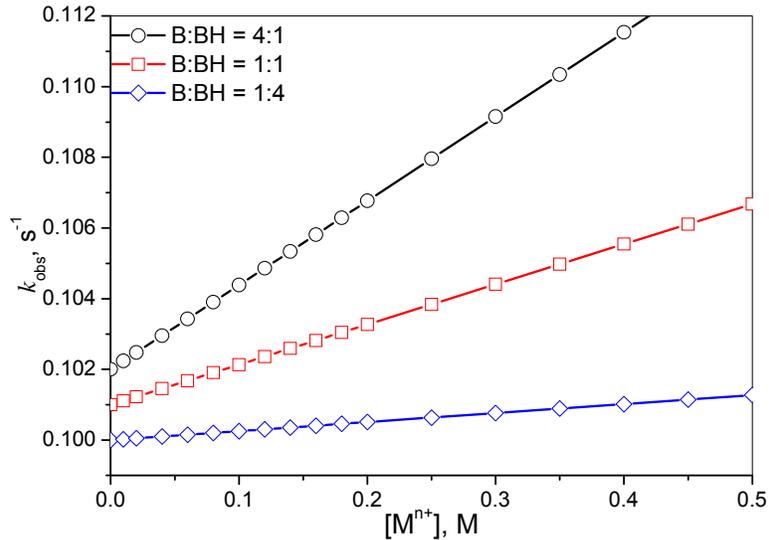


Figura 49. Perfiles teóricos de la variación de la constante de rapidez observada en función de la concentración del metal a diferentes fracciones de neutralización de la base.

En la Figura 50, la recta que tiene una flecha dirigida hacia la abscisa superior indica que la correlación es respecto a la concentración del ión hidróxido, por lo que la pendiente indicaría que obtuvimos el valor de $k_{M,OH}$. En el caso de la recta con la flecha dirigida a la abscisa inferior que corresponde a la concentración de la base libre, indicaría que la correlación es respecto a la base con lo que obtendríamos el valor de $k_{M,B}$.

Sin embargo, existe la posibilidad de que no haya linealidad en ninguna de las coordenadas mencionadas anteriormente, lo que puede significar la dependencia de k_M con ambas rutas. En este caso se hace necesario un análisis multiparamétrico para obtener ambos valores de constantes de rapidez, es decir se emplea la ecuación 32 usando a la $[OH^-]$ y la $[B]$ como dos variables independientes y se buscan los parámetros $k_{M,OH}$ y $k_{M,B}$ como coeficientes de proporcionalidad mediante una rutina de la regresión multiparamétrica lineal.

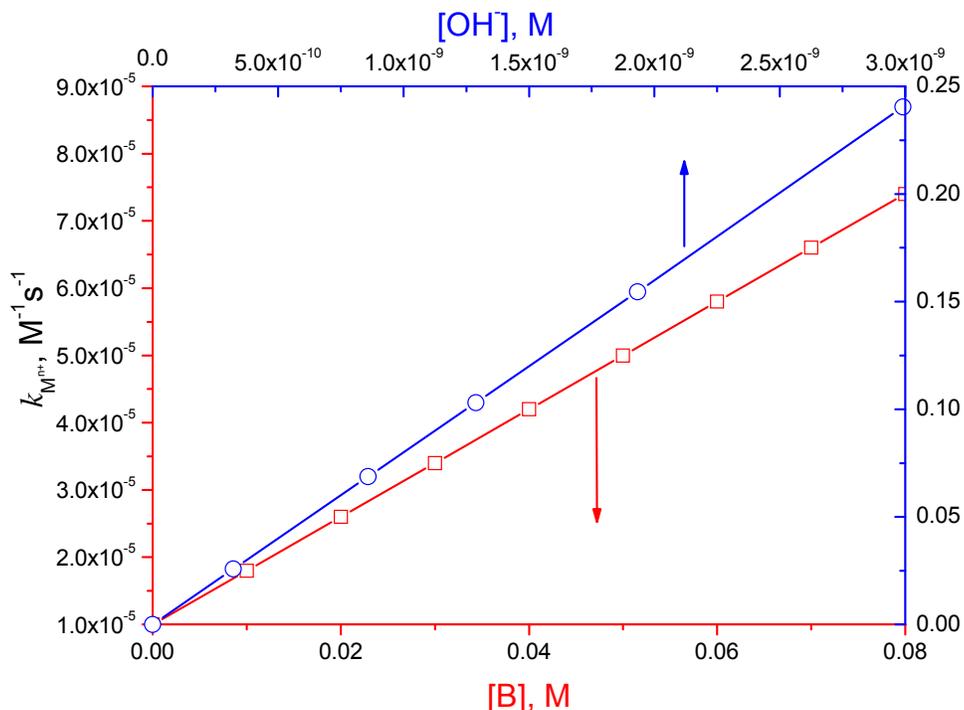


Figura 50. Perfiles teóricos de la variación de k_M en función de la concentración de la base libre (ordenada del lado izquierdo y abscisa inferior), y en función de la concentración del ión hidróxido (ordenada del lado derecho y abscisa superior).

Una alternativa para poder detectar la ruta $k_{M,B}$, es hacer perfiles de la concentración de la base a una proporción de neutralización constante (con lo que se fijaría la concentración de los iones OH^-) y una concentración del catión constante. En el caso de existir esta ruta podríamos obtener una gráfica con pendiente mayor a cero, en caso de no ser detectable la pendiente sería igual a cero.

Para comenzar con el estudio mecanístico con el objeto de ver el efecto de los cationes metálicos se utilizaron los cationes alcalinos Li^+ , Na^+ y K^+ . El estudio consistió en ver el efecto que tenía la variación en la concentración de los cationes a una fracción de neutralización del catión sobre la constante de rapidez de la transesterificación del HpNPP usando piperidina como amortiguador. En el caso del catión potasio, los perfiles no mostraron ninguna dependencia (las gráficas presentaban mucha dispersión y una pendiente de cero) con la concentración del catión. Esto significa que no existe una cooperación detectable entre el ión alcalino y

ninguna de las rutas catalíticas mencionadas en la ecuación 31, por lo que se concluyó que no había catálisis detectable por este catión.

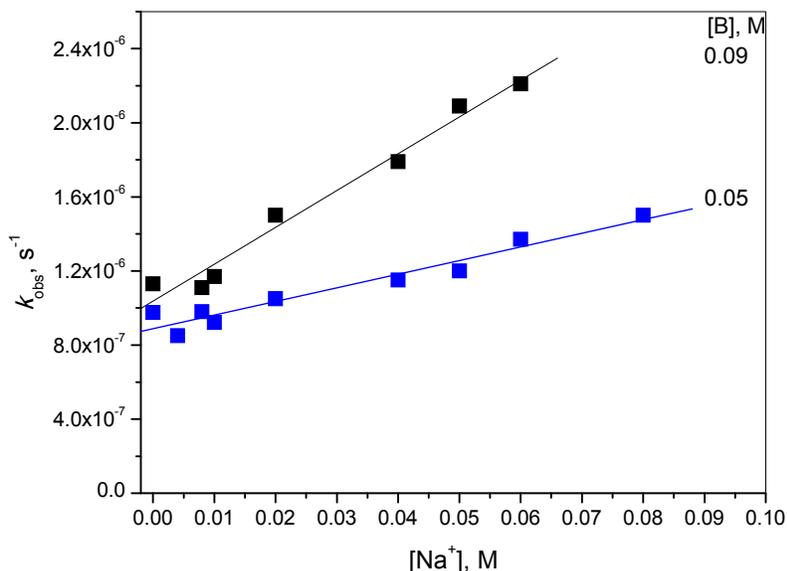


Figura 51. Efecto de la variación de la constante de rapidez para la transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO acuoso al 80% en función de la concentración del catión sodio a diferentes fracciones de neutralización del amortiguador piperidina 0.1 M. Los ajustes corresponden a los valores promedio.

En los estudios con sodio la catálisis fue pobre, pero detectable, como se muestra en la Figura 51. Los valores de k_M obtenidos son $7.7 \times 10^{-6} M^{-1} s^{-1}$ ($[B] = 0.05$ M, $[OH^-] = 1.26 \times 10^{-9}$ M) y $1.9 \times 10^{-5} M^{-1} s^{-1}$ ($[B] = 0.09$ M, $[OH^-] = 1.13 \times 10^{-8}$ M). En este caso no pudimos encontrar una proporcionalidad de k_M con la $[B]$ ni con la $[OH^-]$. Para obtener los valores de $k_{M,OH}$ y $k_{M,B}$ que aparecen en la Tabla 8 (página 105) fue necesario utilizar la ecuación 32.

Finalmente, al usar al catión litio se detectó únicamente una cooperación con la ruta básica específica. Los perfiles de concentración se muestran en la Figura 52, en donde se puede observar una dependencia lineal respecto al catión a distintas fracciones de neutralización del amortiguador (piperidina).

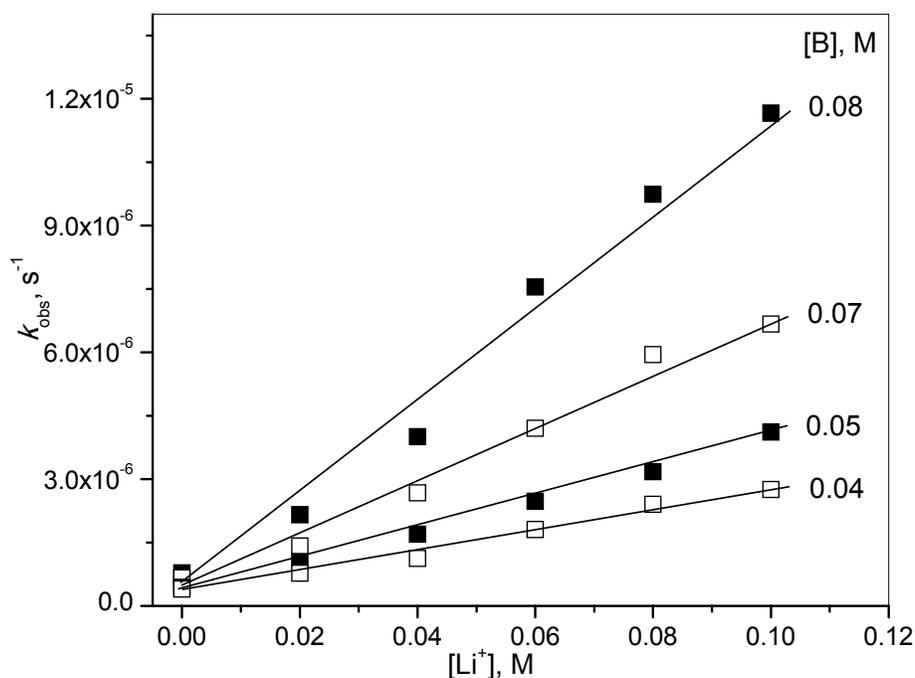


Figura 52. Efecto de la variación de la constante de rapidez para la transesterificación del HpNPP a 37°C en DMSO acuoso al 80% en función de la concentración del catión litio a diferentes fracciones de neutralización del amortiguador piperidina 0.1 M. El porcentaje de error promedio en los valores de las constantes fue del 1.1%.

Para cada uno de los perfiles de concentración de Li⁺ se obtuvo la pendiente (k_M) y se buscó la cooperación con la catálisis básica general (en función de la base libre) o la catálisis básica específica (en función de $[B]/[HB^+]$ que es directamente proporcional a $[OH^-]$). Lo anterior se hizo obteniendo la gráfica que se muestra en la Figura 53. En esta gráfica podemos observar una dependencia lineal con la $[OH^-]$ (cuadros blancos) y una dependencia no lineal con la $[B]$ (cuadros negros). Lo anterior nos permite obtener la constante de tercer orden para la cooperación entre el ión Li⁺ y la catálisis básica específica ($k_{M,OH}$) cuyo valor lo podemos encontrar en la Tabla 8 (página 105).

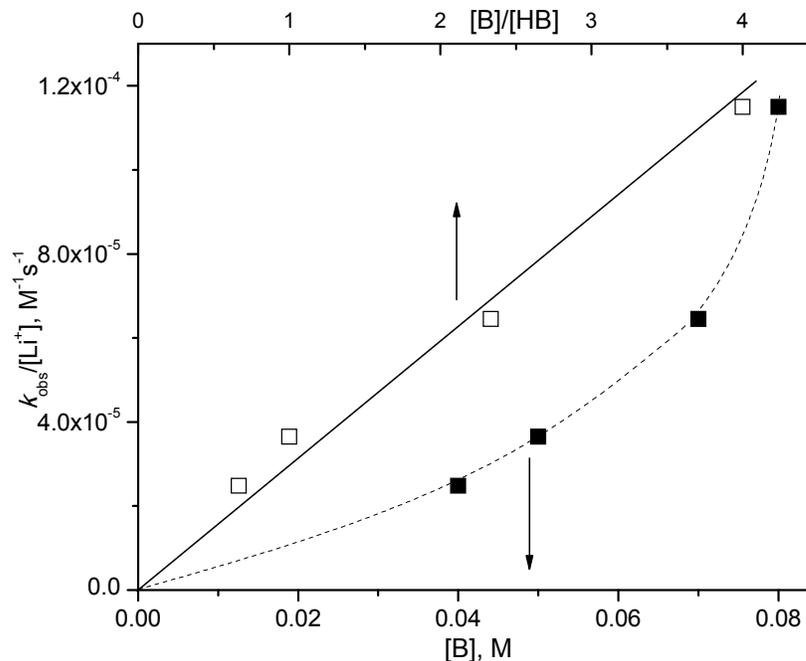


Figura 53. Análisis de k_M en función de la concentración de la base libre (cuadros negros) y en función de $[B]/[HB^+]$ (cuadros blancos) para la transesterificación del HpNPP en DMSO acuoso al 80% a 37°C con litio en piperidina.

Para continuar con el estudio del efecto de algunos cationes se utilizaron también los cationes alcalinotérreos calcio y magnesio, los cuales se comportaron de manera diferente a los metales alcalinos. De manera resumida se encontró que mientras el ión Ca^{2+} coopera sólo con la catálisis básica específica, el ión Mg^{2+} coopera tanto con la ruta básica específica como con la básica general. Se hará primero la descripción y análisis de los resultados obtenidos con calcio. Al igual que con el catión litio primero se realizaron perfiles de concentración, los cuales se muestran en la Figura 54.

Tabla 8. Constantes de rapidez y equilibrio para la transesterificación del HpNPP catalizada por diferentes cationes en piperidina como amortiguador en DMSO acuoso al 80% a 37°C.

Catalizador	$k_{M,B} (M^{-2} s^{-1})$	$k_{M,OH} (M^{-2} s^{-1})$	$\log K_B^\ddagger$	$\log K_{OH}^\ddagger$	z/r
HGu ⁺	0.0017±0.0002	(4.5 ± 1.7×10 ³) ^{a)}	2.0		0.35
Co(NH ₃) ₆ ³⁺		4.9 ± 0.3×10 ⁵		5.9	0.79
Co(NH ₃) ₅ Cl ²⁺	0.046±0.016	3.5 ± 1.3×10 ⁵	3.5	5.8	0.53
Co(en) ₃ ³⁺		8.4 ± 0.5×10 ⁵		6.2	0.79
Li ⁺		2.30 ± 0.06×10 ⁴		4.6	1.45
Na ⁺	1.4 ± 0.2×10 ⁻⁴	5.7 ± 0.6×10 ²	0.9	3.0	0.98
Mg ²⁺	0.46±0.05	5±1×10 ⁷	4.5	7.9	2.78
Ca ²⁺		8.13 ± 0.3×10 ⁶		7.14	2.0

Los perfiles de la Figura 54 muestran que la dependencia con la concentración del catión calcio es de primer orden. Para cada perfil se obtuvo el valor de la pendiente que corresponde al valor de k_M para graficarse en función de la concentración de la base libre y de la relación $[B]/[HB^+]$, esta gráfica se encuentra en la Figura 55. En esta figura se observa que la relación con la concentración de la base libre (eje inferior, cuadrados negros) no es lineal, mientras que con $[B]/[HB^+]$ (eje superior, cuadrados blancos) es lineal. Esto indica que el catión calcio coopera con la ruta básica específica y no con la básica general. El valor obtenido para la constante de rapidez de la cooperación del ión calcio se encuentra en la Tabla 8 y es dos órdenes de magnitud mayor que la obtenida para el catión litio y de 3 órdenes para el cálculo teórico de esa ruta con guanidinio (ver adelante).

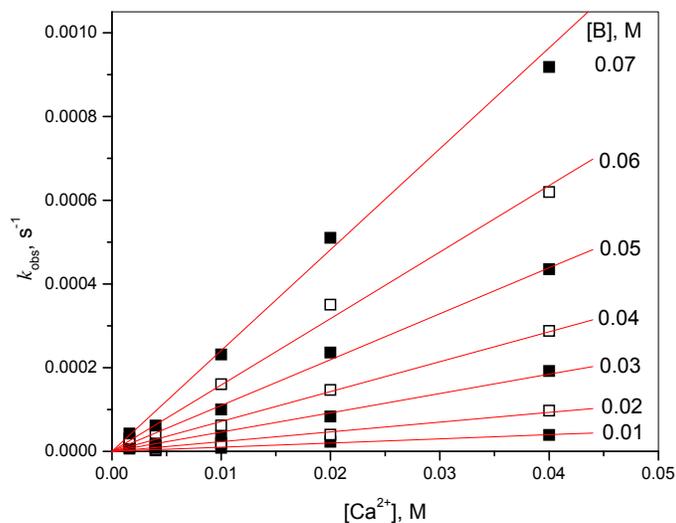


Figura 54. Catálisis de la transesterificación del HpNPP en función de la concentración total de Ca^{2+} en DMSO acuoso al 80% a 37°C a diferentes fracciones de base libre. El porcentaje de error promedio en los valores de las constantes fue del 0.5%.

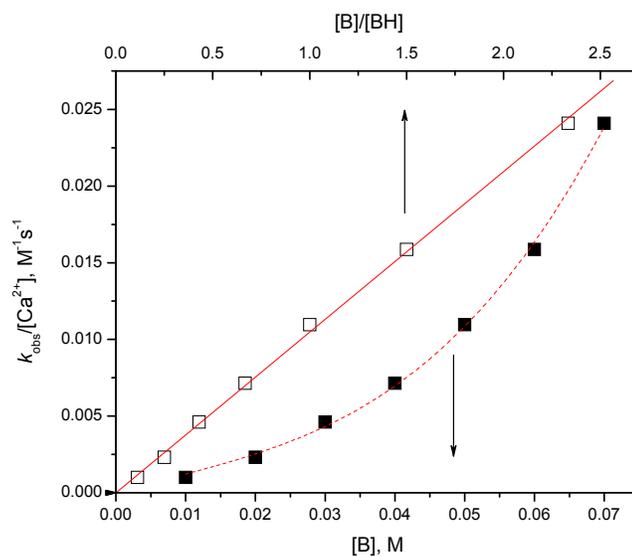


Figura 55. Análisis de k_M en función de la concentración de la base libre (cuadros negros) y en función de $[\text{B}]/[\text{HB}^+]$ (cuadros blancos) para la transesterificación del HpNPP en DMSO acuoso al 80% a 37°C con calcio en piperidina.

Esto resulta algo sorprendente ya que existen pocos informes de estudios con cationes de metales alcalinotérreos en sistemas artificiales [9, 74, 85] a pesar de que estos son muy comunes en los sistemas biológicos. La actividad elevada para los iones Ca(II) (comparado con los resultados en agua, *vide infra*) en las condiciones de reacción (DMSO acuoso al 80%) puede deberse al favorecimiento de un ambiente con una menor solvatación del sustrato y del estado de transición aniónicos en un medio menos “prótico” que en un medio acuoso, lo cual puede ser usado como analogía al sitio de reacción de una enzima en donde este catión es muy activo.

En el caso del catión magnesio se hicieron los mismos estudios preliminares que con los cationes litio y calcio. En la Figura 56 se muestran los perfiles de concentración obtenidos a baja concentración del metal y bajas concentraciones de la base ya que a mayores concentraciones de ambos ocurre la precipitación del magnesio. El precipitado formado es un gel que impide la homogeneidad del medio y por lo tanto podría ocasionar resultados erróneos al hacer el análisis de los datos obtenidos. De igual modo que en los perfiles anteriores, se obtuvo la pendiente de los perfiles que es el valor de k_M para ser utilizados en la gráfica en función de la concentración de la base libre (cuadros blancos) o del ión OH^- (cuadros negros), para de este modo conocer si existía cooperación con la catálisis básica general o con la básica específica que se muestra en la Figura 57. Al analizar esta gráfica observamos un comportamiento no lineal en ambas coordenadas. Ya que en los perfiles de la Figura 56, se encontró que la dependencia con la concentración del catión aumenta al aumentar la concentración de la base, una conclusión del comportamiento de la gráfica de la Figura 57 es que el ión Mg^{2+} coopera con ambas rutas. Para poder confirmar esta hipótesis, se hizo un análisis mediante una regresión multiparamétrica para también conocer la dependencia de las constantes observadas con la concentración de los iones OH^- y con la concentración de la base libre empleando la ecuación 32.

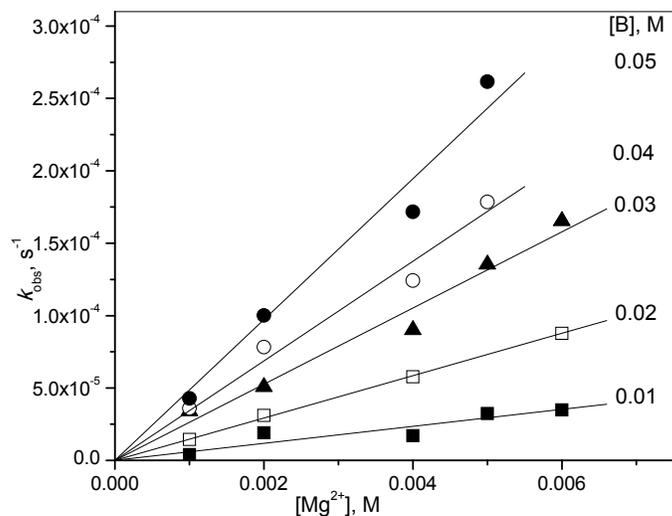


Figura 56. Catálisis de la transesterificación del HpNPP en función de la concentración total de Mg^{2+} en DMSO acuoso al 80% a $37^{\circ}C$ a diferentes fracciones de base libre. El porcentaje de error promedio en los valores de las constantes fue del 3%.

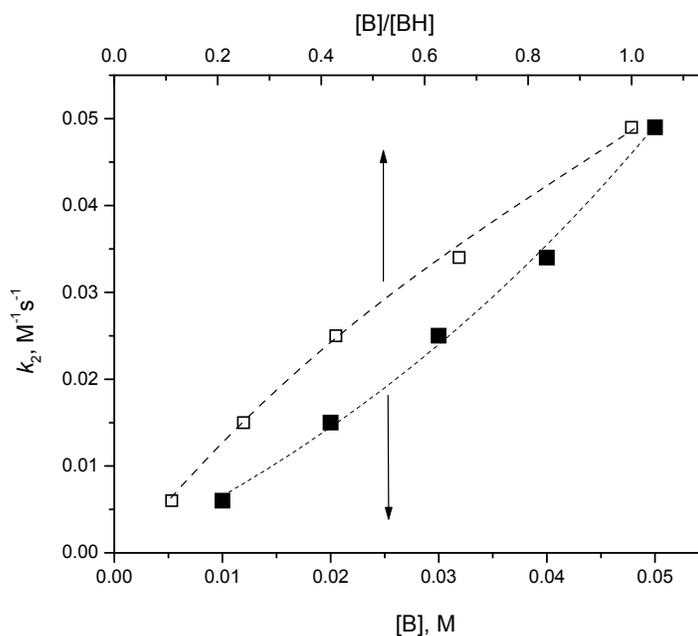


Figura 57. Análisis de k_M en función de la concentración de la base libre (cuadros negros) y en función de $[B]/[HB]$ (cuadros blancos) para la transesterificación del HpNPP en DMSO acuoso al 80% a $37^{\circ}C$ con magnesio en piperidina.

Además, para confirmar los resultados obtenidos en la regresión multiparamétrica se hizo un experimento variando la concentración total de piperidina a varias fracciones de neutralización del amortiguador manteniendo constante la concentración del catión. Lo anterior es para no tener un efecto del metal ni del ión OH^- (ya que al mantener la fracción de neutralización y variar la concentración de la base, la concentración del ión OH^- es constante). De este modo se asegura que la dependencia encontrada será sólo para la ruta básica general, si esta existe. En la Figura 58 se muestran los perfiles de concentración del amortiguador a dos fracciones de base libre distintas a una concentración de magnesio(II) constante.

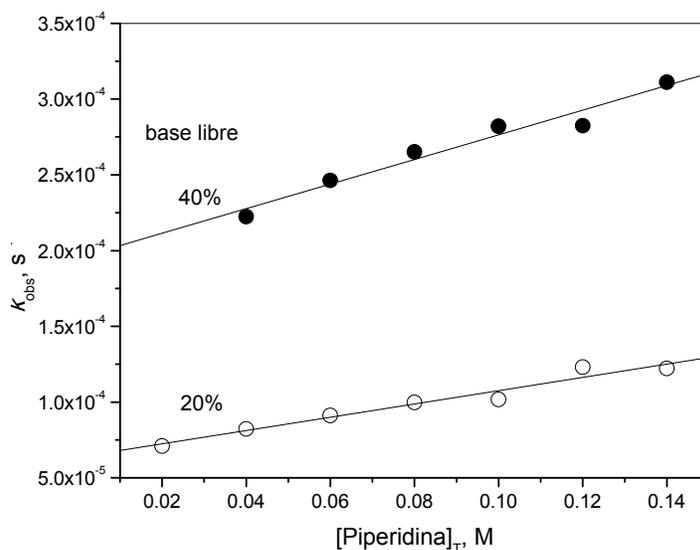


Figura 58. Catálisis de la transesterificación del HpNPP en función de la concentración total de la base libre a dos fracciones de neutralización y una concentración fija de Mg^{2+} 2 mM.

En los perfiles de la Figura 58 se observa que existe una dependencia lineal en cada fracción de neutralización con la concentración total del amortiguador, lo que indica que la ruta de cooperación del ión Mg^{2+} con la catálisis básica general predicha en los experimentos anteriores sí se presenta. Además, a mayor porcentaje de base libre la rapidez aumenta (observado en el ligero aumento en la pendiente de la recta de ajuste de los círculos negros, que corresponden a una fracción de neutralización mayor que la de los círculos blancos).

Los valores de las constantes de rapidez para la contribución del ión magnesio(II) con la catálisis básica general y la catálisis básica específica se obtuvieron a partir de los promedios del ajuste multiparamétrico y el análisis de los datos del efecto de la concentración del amortiguador a una fracción de neutralización constante y una concentración del catión constante. Estos valores se encuentran en la Tabla 8 (página 105). De nuevo, es sorprendente encontrar una actividad alta con un catión alcalinotérreo sobre la catálisis básica específica, pero es todavía más asombroso el haber encontrado que este catión coopera con la ruta básica general como en algunos sistemas biológicos [124, 129], aunado a esto el valor de su constante de rapidez es mayor al encontrado en los sistemas estudiados en este trabajo.

Una explicación posible para la existencia de la cooperación del magnesio (pero no del calcio) con la ruta básica general considera el hecho de que sólo el ion magnesio presenta, posiblemente, un mecanismo de esfera externa.

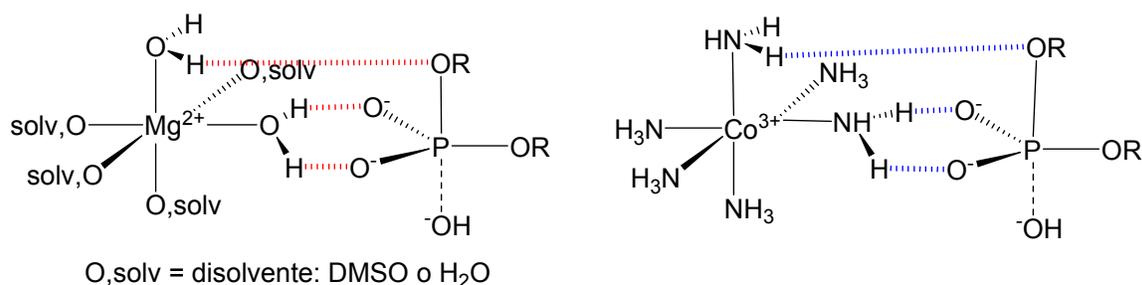


Figura 59. Ilustración esquemática de la estabilización del estado de transición por esfera externa con el hexaacuamagnesio(II) y el hexaminacobalto(III). (Elaborado a partir del esquema de Cowan, [65])

En este mecanismo podríamos considerar que las moléculas de agua en la esfera interna de solvatación pueden formar enlaces de hidrógeno con el estado de transición de la reacción y de este modo llevar a cabo la cooperación con la catálisis básica general (Ver Figura 59, ilustración izquierda).

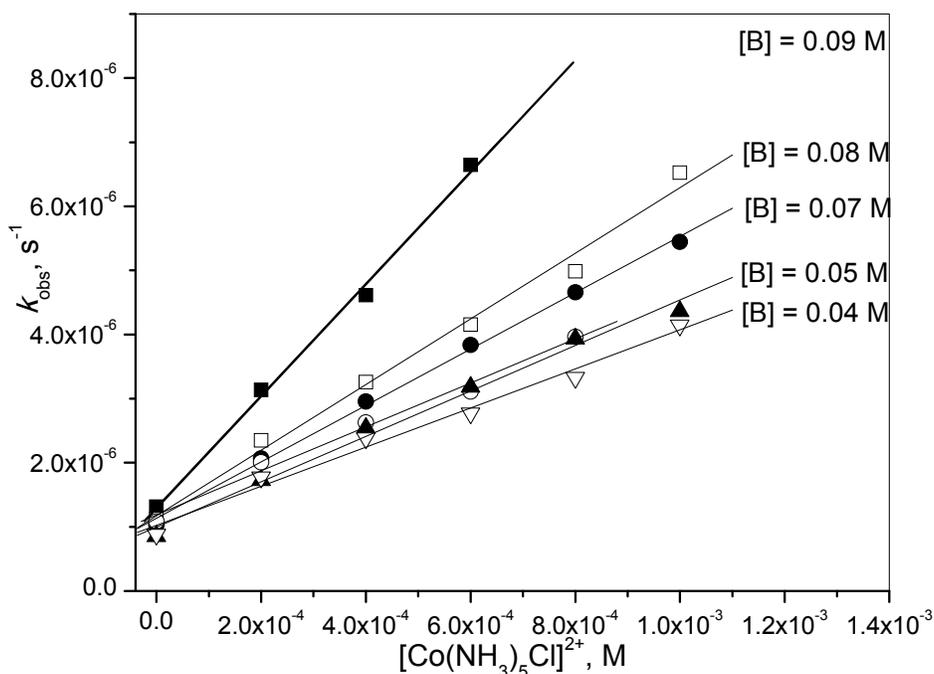


Figura 60. Efecto de la concentración de $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$ en piperidina 0.1 M en un 80% DMSO acuoso sobre la constante de rapidez del HpNPP a diferentes fracciones de neutralización de la base. El porcentaje de error promedio en los valores de las constantes fue del 1.5%.

Este tipo de mecanismo se ha encontrado en la Ribonucleasa H [128] y en un estudio teórico de la ADN polimerasa I [130]. Para probar la hipótesis de la existencia de este mecanismo con el catión magnesio en las condiciones de este trabajo, se decidió utilizar un complejo inerte como el $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ que ha sido utilizado para probar el mismo tipo de mecanismo (esfera externa) en la Ribonucleasa H de la *E. Coli* [128]. Algunas de las razones para el uso de este compuesto de coordinación es su tamaño (similar al del catión magnesio hidratado, $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$), es inerte y por ende el intercambio de los ligantes es muy lento y este complejo puede formar una red de enlaces de hidrógenos similar a la del catión magnesio hidratado (ver ilustración derecha de la Figura 59).

Para probar la hipótesis del mecanismo de esfera externa con magnesio realizamos un estudio del efecto catalítico de $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, con el cual esperábamos obtener

actividad y una cooperación con la catálisis básica general y la catálisis básica específica. Además, se utilizó el catión del compuesto de coordinación tris(etilendiamina)cobalto(III), ya que este puede tener una menor eficacia para formar enlaces de hidrógeno con el fosfato, por lo que la cooperación con la catálisis básica general será menor que con la catálisis básica específica y esto se pondría de manifiesto en la ley de rapidez obtenida. También se utilizó el cation del compuesto de coordinación pentaminaclorocobalto(III) con el fin de considerar o descartar un efecto de la carga de los cationes.

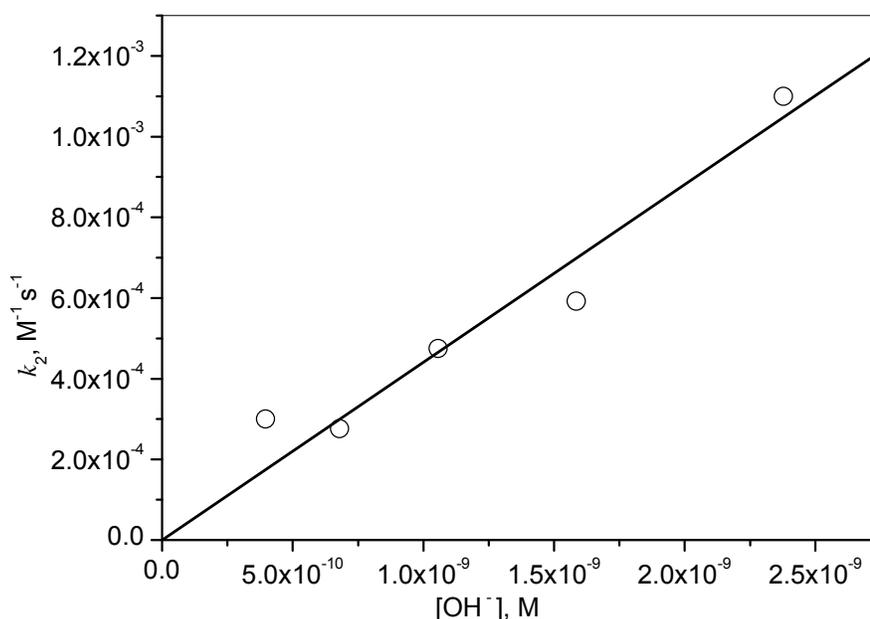


Figura 61. Efecto de la concentración del ión OH sobre la constante de segundo orden k_M de $Co(NH_3)_6^{3+}$ para la transesterificación del HpNPP.

Los estudios realizados con estos cationes de compuestos de coordinación fueron iguales a los hechos con los cationes anteriores. En la Figura 60 se encuentra el perfil de concentraciones a diferentes fracciones de neutralización para el catión pentaminaclorocobalto(III), de las rectas obtenidos se calcularon las pendientes que corresponden a k_M . A partir de las constantes de segundo orden obtenidas se hizo el análisis para obtener la colaboración de este catión con la catálisis básica general o

la catálisis básica específica. Los resultados de las constantes obtenidas se encuentran en la Tabla 8 (página 105). Para los estudios con hexaminacobalto(III) se muestra la Figura 61 que corresponde al perfil de las constantes de segundo orden en función de la concentración del ión hidróxido. En las Figuras 62 y 63 se encuentran los perfiles de concentración del catión a diferentes fracciones de base libre en el amortiguador y el perfil de la constante k_M en función de la concentración del ión hidróxido y de la base libre para encontrar la cooperación con alguna ruta de las posibles, respectivamente, para el catión tris(etilendiamina)cobalto(III).

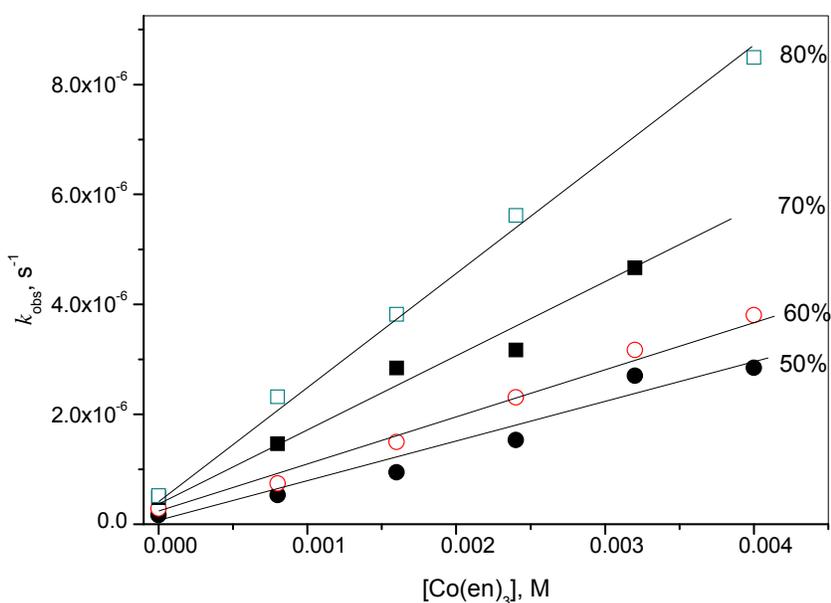


Figura 62. Efecto de la concentración de $[\text{Co}(\text{en})_3]\text{Cl}_3$ en piperidina 0.1 M en 80% DMSO acuoso sobre la constante de rapidez del HpNPP a diferentes fracciones de neutralización de la base. El porcentaje de error promedio en los valores de las constantes fue del 0.7%.

De las gráficas mencionadas anteriormente se hizo el análisis y los valores de las constantes de rapidez obtenidas se encuentran en la Tabla 8 (página 105). Los resultados muestran que los cationes de los compuestos de coordinación $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ y $\text{Co}(\text{en})_3^{3+}$ sólo cooperan con la catálisis básica específica, mientras que $\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}^{2+}$ coopera con ambas rutas. Estos resultados son novedosos ya que no

existen informes del uso de estos compuestos de coordinación como catalizadores en sistemas modelo del ARN y en nuestro caso encontramos que sí presentan actividad e incluso mucho mayor que guanidinio y los cationes de los metales alcalinos. Observamos que los complejos de cobalto(III) catalizan también la ruta de la hidrólisis alcalina. Esto, sin embargo, no comprueba que la cooperación con la catálisis básica general para el caso del ión magnesio(II) sea por el mecanismo de esfera externa, debido a que sólo se encontró una cooperación con la catálisis básica específica por parte de los cationes de los compuestos de coordinación a pesar de haber encontrado actividad por un mecanismo por esfera externa. Para poder elucidar este mecanismo es necesario hacer estudios de efectos isotópicos, que en este tipo de sistema resulta ser complicados y queda fuera del alcance de este trabajo.

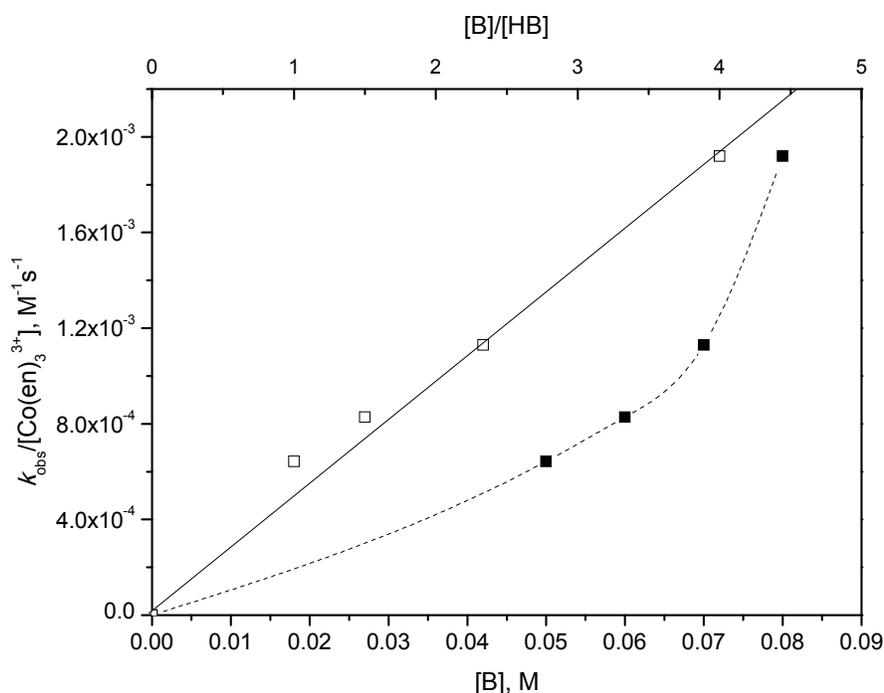


Figura 63. Análisis de k_M en función de la concentración de la base libre (cuadros negros) y en función de $[\text{B}]/[\text{HB}]$ (cuadros blancos) para la transesterificación del HpNPP en DMSO acuoso al 80% a 37°C con Co(en)_3^{3+} en piperidina.

Para poder comparar el efecto de los cationes metálicos con los estudios previos, se hicieron los estudios del efecto del catión guanidinio (el que presenta la mejor actividad de los sistemas amortiguados) sobre diferentes tipos de bases (aminoguanidina, acetamidina y piperidina) para obtener k_2' (experimentos de co-catálisis, *vide supra*). En el caso del estudio de cationes el amortiguador utilizado fue piperidina (ya que al ser la base con el menor valor de pK_a en DMSO acuoso, evitaría problemas de precipitación con algunos cationes) la comparación del catión guanidinio se hará con este amortiguador. Los valores para la cooperación con la catálisis básica general encontrada también y el valor calculado para la colaboración con la catálisis básica específica se muestran en la Tabla 8 (página 105). Los valores encontrados para las constantes de rapidez con este catión son menores a los encontrados con los cationes metálicos alcalinotérreos y litio, lo cual puede deberse a la deslocalización de la carga en guanidinio entre varios átomos, lo que no sucede con los cationes metálicos en donde la carga está localizada.

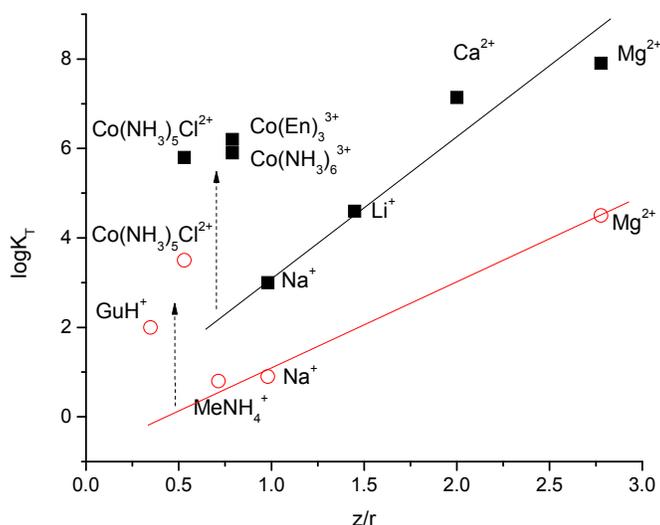


Figura 64. Correlación entre la energía de estabilización del estado de transición y la relación carga/radio (z/r) del catalizador en DMSO acuoso al 80% vol. Los cuadros negros son para la reacción básica específica, círculos blancos son para la catálisis básica general.

Para racionalizar los resultados de esta parte intentamos medir las constantes de asociación entre los cationes con un modelo del estado de transición (ver resultados en agua) sin embargo, esto resultó ser imposible por la precipitación de los compuestos de coordinación con el monoéster. Si la estabilización del estado de transición es del tipo electroestática, como lo observamos en el caso de la catálisis básica general asistida por la forma protonada del amortiguador, podríamos encontrar una correlación de $\log K_T^{\ddagger}$ con la relación z/r (donde z es el número de carga y r es el radio iónico de los cationes). En la Figura 64 se encuentra la gráfica de los resultados de la Tabla 8 (página 105) en las coordenadas mencionadas. Para la ruta básica específica (puntos negros) se observa una correlación satisfactoria para todos los cationes excepto con los complejos de cobalto(III), que muestran una fuerte desviación positiva. Para la ruta básica general con el estado de transición con carga -1 en lugar de -2 lógicamente la correlación tiene pendiente aproximadamente dos veces menor y también se observa una desviación positiva con los cationes de los compuestos de coordinación de Co^{3+} y no tan fuerte para guanidinio. Los cationes de ambos tipos estabilizan al estado de transición aniónico mediante la formación de enlaces de hidrógeno, una interacción más fuerte que una simple atracción coulombica.

Por el momento no podemos proponer ninguna explicación de la observación que Mg^{2+} es capaz cooperar tanto con la catálisis básica específica como con la catálisis básica general (mientras que Ca^{2+} únicamente con la última). Sin embargo, esta observación es interesante ya que muestra una mayor versatilidad de la catálisis con Mg^{2+} y esta puede ser una de las razones de porque algunas enzimas y sobre todo ribozimas emplean Mg^{2+} con mucho mayor frecuencia que Ca^{2+} . La cooperación entre Mg^{2+} y catálisis básica general es considerada como un posible mecanismo de autorruptura de las ribozimas (Figura 65) adicionalmente a la cooperación de Mg^{2+} con la catálisis básica específica que es en principio un mecanismo más común tanto en sistemas biológicos como en sistemas modelo [124]. Vale la pena mencionar que en sistemas modelo este tipo de mecanismo nunca había sido reportado anteriormente.

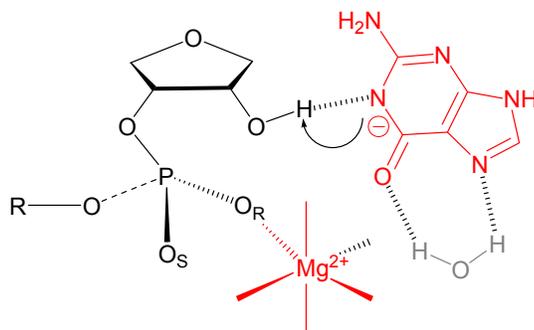


Figura 65. Posible mecanismo de autorruptura en ribozimas mediante una catálisis básica general [124].

Al existir la cooperación del catión magnesio con la catálisis básica general en la transesterificación del HpNPP en DMSO acuoso al 80%, se decidió utilizar otros amortiguadores menos básicos (cumpliendo el requisito de que sus formas básicas fuesen neutras) como 3-metoxipropilamina (3-MeOPA), 2-metoxietilamina (2-MeOEA), morfolina (MFL), 4-dimetilpiperidina (4-DAP) e imidazol (IMZ) para poder hacer un análisis de Brønsted. En la Figura 66, se encuentra las gráficas obtenidas al hacer perfiles de la concentración del amortiguador total a una fracción de neutralización y concentración del metal constantes. Para las bases cuyo valor de pK_a es mayor de 8.5 (3-MeOPA y 2-MeOEA), los perfiles se hicieron de tal modo que el valor de pH fuese mayor a 9. Para las bases cuyos valores de pK_a fueron menores a 8.5, los perfiles se hicieron variando la concentración de estas bases en la presencia de otro amortiguador como 3-MeOPA y 2-MeOEA, con el fin de tener un valor de pH aproximado mayor a 9. Lo anterior es con el fin de asegurar la desprotonación del 4-nitrofenol y no tener problemas en la cuantificación del producto (4-nitrofenolato) en las cinéticas. Los valores de las constantes obtenidas se encuentran en la Tabla 9.

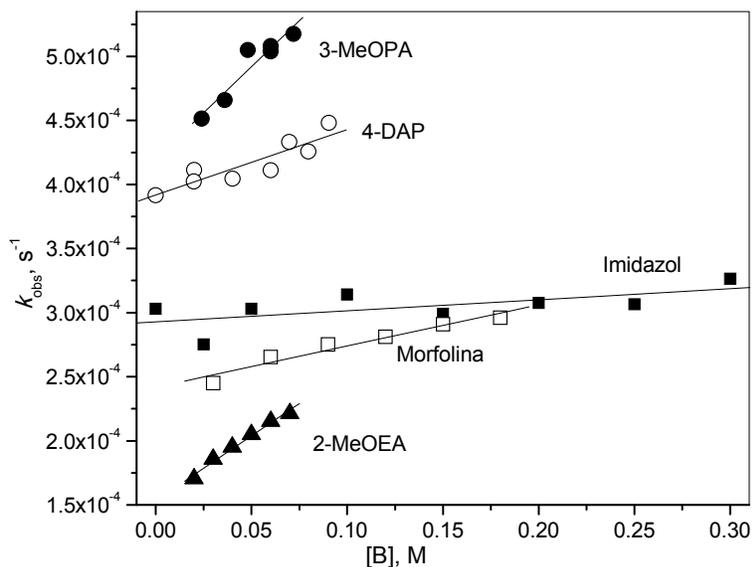


Figura 66. Perfiles de concentración total de los amortiguadores en la presencia de magnesio(II) 6 mM. El porcentaje de error promedio en los valores de las constantes fue del 4%.

Tabla 9. Constantes de rapidez para la transesterificación del HpNPP catalizada por diferentes bases en DMSO acuoso al 80% a 37°C y sus respectivos valores de pK_a .

	pK_a	$k_{M,B} (M^{-2} s^{-1})$
PPD	9.88(3)	0.46 (5)
3-MeOPA	9.65(2)	0.36(4)
2-MeOEA	9.1(1)	0.15(2)
Morfolina	8.03(2)	0.053(3)
DAP	7.46(3)	0.06(1)
Imidazol	5.4(1)	0.014(7)

Los valores en el paréntesis es la incertidumbre en la última cifra significativa.

De los valores de la Tabla 9 podemos ver que existe cierta dependencia de la constante de rapidez con los valores de pK_a , por lo que se hizo un análisis de Brønsted, para el cual la gráfica se encuentra en la Figura 67. La ecuación obtenida

para la recta de la gráfica de Brønsted es $\log k_{M,B} = 0.33(4) \text{ p}K_a - 3.7(3)$. El valor de pendiente de 0.33 es significativamente menor que para los casos de la catálisis básica general sola y en presencia de guanidinio, lo que es congruente debido a que el ión Mg^{2+} es un catión más ácido que los ácidos conjugados de las bases utilizadas, por lo que induce mayor grado de activación electrofílica del grupo fosfato. Respecto a la localización del estado de transición, el valor de la pendiente indica que es temprano, es decir, se parece más a los reactivos con el grado de desprotonación del grupo 2-hidroxi del sustrato modelo del ARN muy bajo.

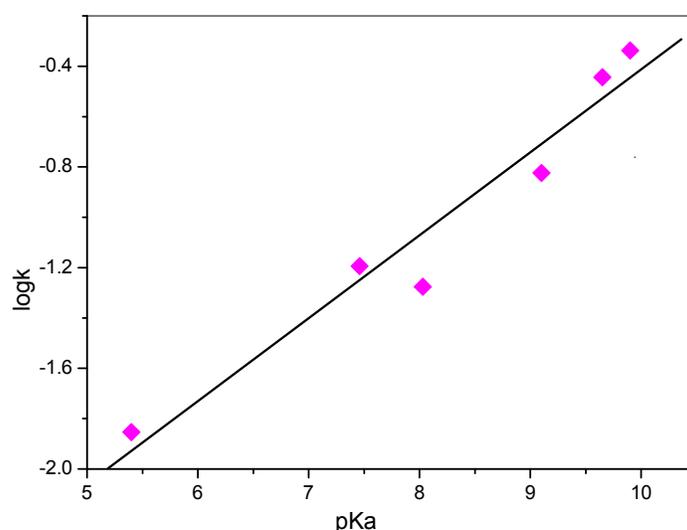


Figura 67. Gráfica del análisis de Brønsted para la transesterificación del HpNPP en DMSO acuoso en la presencia de magnesio(II) como catalizador en diferentes sistemas amortiguados.

En la Figura 68 se reúnen las tres gráficas de Brønsted obtenidas en este trabajo para poder visualizar la comparación. Como podemos ver la presencia de HGu^+ prácticamente no afecta el pendiente de Brønsted para la catálisis básica general, lo que está en acuerdo con un carácter puramente electroestático de la catálisis. Esto también fue corroborado por medición del efecto isotópico del disolvente. Sin embargo, el ión Mg^{2+} disminuye notablemente la sensibilidad de la velocidad de la reacción a la basicidad del catalizador básico general, probablemente mediante una

contribución entre la coordinación del ion metálico con el grupo OH del nucleófilo interno [18]. Este efecto es importante para dar una explicación de la alta eficiencia de las ribozimas dependientes de magnesio que operan mediante el mecanismo ilustrado en la Figura 65. En las ribozimas las nucleobases tienen muy baja basicidad y para poder explicar su acción como catalizadores básicos se proponen que por alguna razón muy poco clara pueden tener valores de pK_a anómalos que permiten su desprotonación en medios neutros. El valor bajo de la pendiente de Brønsted con los iones Mg^{2+} significa que la reactividad no cae fuertemente con la disminución de la basicidad del catalizador si este se encuentra cooperando con el catión Mg^{2+} . Con lo que aún bases muy débiles pueden tener una reactividad apreciable.

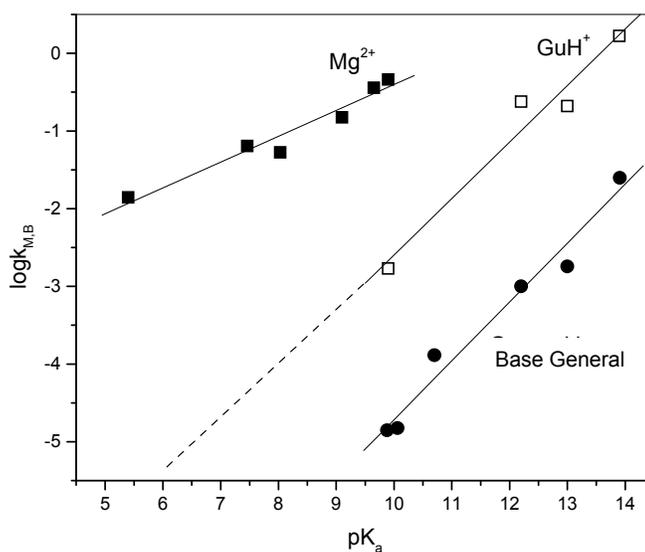


Figura 68. Comparación de las gráficas de Brønsted en DMSO acuoso al 80% para la reacción de transesterificación del HpNPP, catalizada por una base general, una asistida por los ácidos conjugados y otra asistida por iones magnesio(II).

5.7 Estudios de transesterificación del HpNPP en agua a 37°C con varios tipos de cationes.

Debido a los resultados obtenidos en los estudios con los cationes metálicos en la mezcla de DMSO acuoso a 37°C, se hicieron los mismos estudios cambiando la mezcla de DMSO acuoso por agua. Los primeros experimentos se hicieron utilizando

piperidina como amortiguador a diferentes fracciones de neutralización para obtener los valores de las constantes de rapidez para guanidinio y los cationes de los compuestos de coordinación. Debido a algunos problemas en agua con el amortiguador y a la no detección de la catálisis básica general, la cual puede existir pero debido a la alta contribución de la constante básica específica (debido a que en agua a valores de pH mayores que 10 la concentración del ión hidróxido es mayor que 10^{-4} M) no es detectable, se decidió utilizar directamente hidróxido de tetrametilamonio como fuente de iones OH^- . La única excepción fueron los estudios con magnesio, ya que este catión puede precipitar a concentraciones de ión hidróxido mayores de 10^{-4} M. Para poder hacer estos estudios se utilizó el amortiguador tris y se ajustó el pH a la temperatura de trabajo en sistema regulado y después se añadió el sustrato para hacer la reacción. En la Figura 69 se encuentran los perfiles de concentración del ión hidróxido a una concentración de metal fija (ya que los datos son las pendientes de las gráficas de los perfiles de concentración del metal) para los cationes estudiados.

En los perfiles de la Figura 69 podemos observar que de nuevo el catión que coopera mejor con la catálisis básica específica es el magnesio. Los valores obtenidos para la constante de rapidez de la contribución de los cationes con la catálisis básica específica se muestran en la Tabla 10. En esta tabla encontramos de nuevo la misma tendencia encontrada que los experimentos hechos en DMSO acuoso al 80%, donde guanidinio es el menos activo y el catión magnesio el más activo. Algunos resultados sorprendentes fueron los de guanidinio y los de los cationes de los complejos utilizados. En primer lugar, con guanidinio en DMSO acuoso no fue posible detectar la contribución con la catálisis básica específica y en agua sí (una discusión acerca de la posible razón se da más adelante). Además, de nuevo se detecta actividad con los cationes de los complejos hexaminacobalto(III) y tris(etilendiamina)cobalto(III), los cuales seguramente actúan mediante un mecanismo por esfera externa. La mayor actividad del compuesto de coordinación tris(etilendiamina)cobalto(III) sobre el hexaminacobalto(III), no es algo fácil de explicar ya que se requieren de experimentos como efectos isotópicos para poder tener más evidencia del mecanismo.

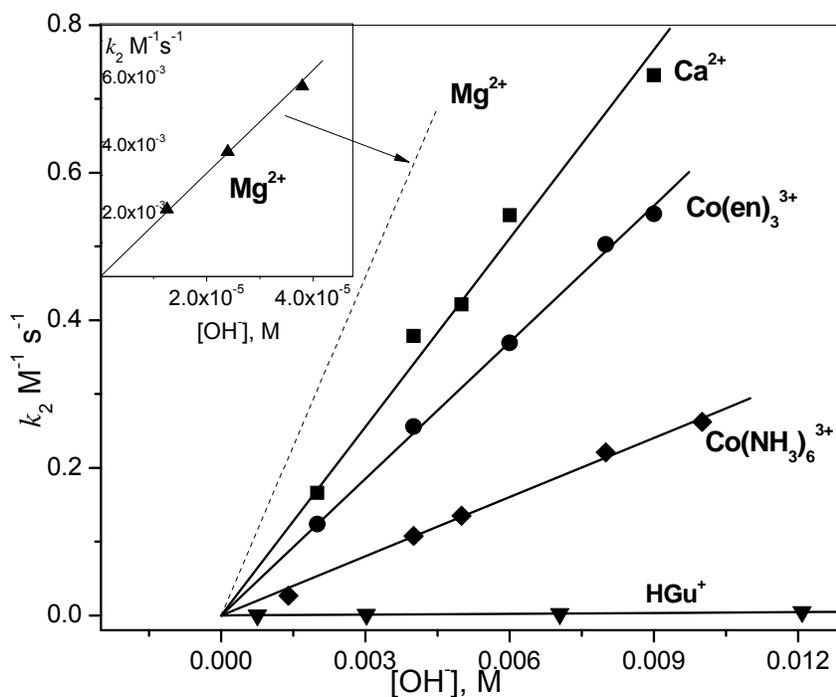


Figura 69. Efecto de la concentración del ión OH⁻ sobre la constante de segundo orden k_M para los diferentes cationes estudiados en la reacción de transesterificación del HpNPP en agua a 37°C. El porcentaje de error promedio en los valores de las constantes fue del 1.7%.

Los cationes alcalinos no presentan actividad en estas condiciones por lo que no fue posible obtener algún valor de constante. En el caso del catión complejo pentaminaclorocobalto(III), en los experimentos para observar si era inerte en las condiciones de reacción, este resultó ser muy lábil, ya que se hidroliza en las condiciones de reacción para formar el acuapentaminacobalto(III) [127], lo cual fue observado en los cambios del máximo de absorción en los espectros de UV-Vis tomados durante el transcurso de la reacción.

Tabla 10. Constantes de rapidez y equilibrio para la transesterificación del HpNPP para la cooperación de la catálisis básica específica con diferentes cationes en agua a 37°C.

Catalizador	$k_{M,OH} (M^{-2} s^{-1})$	$\log K_{T,OH}^{\neq}$	$\log K_{M-4NFF}$
HGu⁺	0.3 ± 0.03	0.36	0.54
Co(NH₃)₆³⁺	26.7 ± 0.5	2.31	1.97
Co(en)₃³⁺	61.7 ± 0.6	2.68	2.09
Ca²⁺	85.2 ± 2.4	2.82	1.51
Mg²⁺	153 ± 7	3.07	1.53
Zn²⁺ a)	6.7×10 ³	4.71	1.76

a) [125]

Para completar el estudio, se hizo el análisis de la “asociación” del estado de transición con el catalizador. Las constantes de asociación del estado de transición se calcularon mediante el cociente de las constantes de rapidez (*vide supra*) para la reacción catalizada dividida por la constante sin catalizar, que en este caso es la catálisis básica específica. Por esto fue necesario obtener el valor de la constante de rapidez en agua a 37°C. El valor obtenido a partir de los experimentos hechos fue 0.13 M⁻¹s⁻¹.

$$K_{T}^{\neq} = k_{3,OH}/k_{OH} \quad \text{Ec. 33}$$

Los valores calculados en agua para la constante de asociación entre el estado de transición y los cationes utilizados se encuentran en la Tabla 10. También, para poder hacer una comparación se midieron las constantes de asociación entre los cationes utilizados y el modelo del estado de transición 4-nitrofenilfosfato (4NFF), cuyos valores también se localizan en la Tabla 10. Para este conjunto de los datos no se observa una correlación entre $\log K_{T}^{\neq}$ y $\log K_{M-4NFF}$, tampoco hay correlación con z/r . Sin embargo, si comparamos los valores medidos con el modelo del estado de

transición y los valores calculados, para el estado de transición tenemos dos casos: $K^\ddagger \approx K_{M-4NFF}$, para los ácidos próticos (HGu^+ , $Co(NH_3)_6^{3+}$) y $K^\ddagger_T \gg K_{M-4NFF}$ para los ácidos de Lewis (Mg^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+}). Una posible explicación de estos valores elevados es que en el caso de los ácidos de Lewis (ver Figura 70) puede existir un enlace bidentado debido a la extensión del enlace P–O en el estado de transición [113].

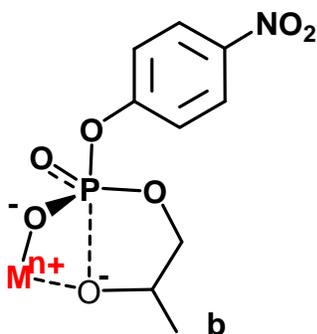
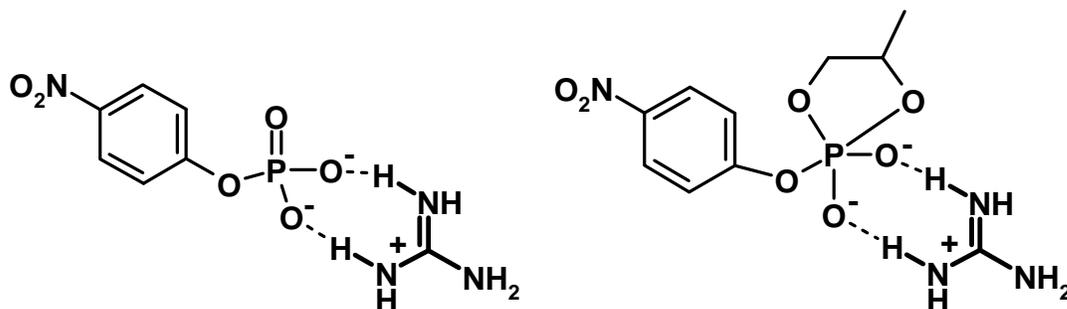


Figura 70. Esquema de la posible interacción entre los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} con el estado de transición.

La idea de usar el 4-NFF como un análogo del estado de transición se basa en la consideración de que la estabilización del estado de transición ocurre mediante la interacción con un grupo fosforano dianiónico. Esta misma interacción está involucrada en la complejación con el dianión de 4-NFF como se presenta abajo para el caso de guanidinio, en el Esquema 3.



Esquema 3.

Si consideramos un conjunto de datos más extenso, incluyendo datos de otros estudios como los de la Tabla 11, que permitan correlacionar K^\ddagger_T y K_{M-4NFF} en un

intervalo de valores más amplio se observa una correlación satisfactoria con valor de pendiente de 1.3. En la Figura 71 se muestra esta correlación.

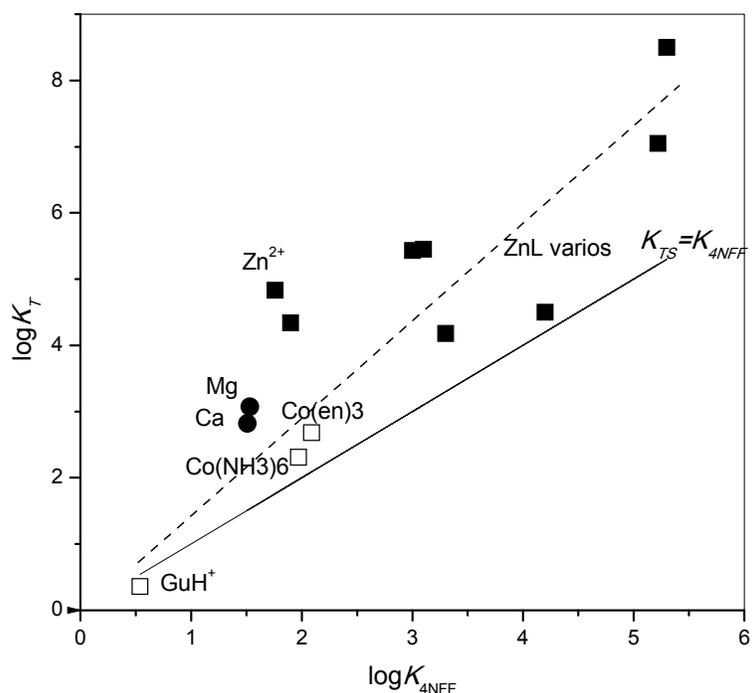
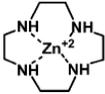
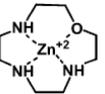
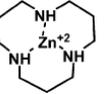
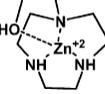
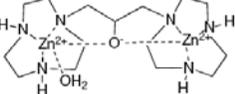
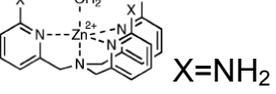
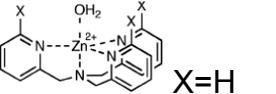


Figura 71. Correlación entre las constantes de asociación con el estado de transición y su modelo ($r^2 = 0.9$ para todos los puntos).

En la figura 71 la línea sólida es para el caso de $K_{TS} = K_{M-4NFF}$. Como puede verse, el guanidinio, los complejos de Co(III) y el complejo 13 de Zn(II) están en esta línea y probablemente la catálisis con estas especies es del tipo esperado. Sin embargo otros catalizadores muestran desviaciones positivas que significan una interacción más fuerte. Es interesante que este efecto adicional del orden de 3 unidades logarítmicas, es casi igual para el acuaión de Zn(II) y los complejos 11 y 12 ($\Delta\Delta G$ de activación -17 kJ/mol). Probablemente en todos los casos se trata de una interacción con el alcóxido entrante como se ilustra en la figura 70.

Tabla 11. Constantes de rapidez y de equilibrio para la transesterificación del HpNPP para la cooperación de la catálisis básica específica con diferentes cationes y complejos.*

	Catalizador	$k_{M,OH} (M^{-2} s^{-1})$	$\log K_T^{\neq}$	$\log K_{M-4NFF}$	Ref.
1	HGu ⁺	0.37 ± 0.03	0.36	0.54	Este
2	Co(NH ₃) ₆ ³⁺	26.7 ± 0.5	2.31	1.97	Trabajo
3	Co(en) ₃ ³⁺	61.7 ± 0.6	2.68	2.09	Este
4	Ca ²⁺	85.2 ± 2.4	2.82	1.51	Trabajo
5	Mg ²⁺	153 ± 7	3.07	1.53	Este trabajo
6	Zn ²⁺	6.7×10 ³	4.71	1.76	[125]
7		1.5×10 ³	4.18	3.29 ^{a)}	[125]
8		2.7×10 ⁴	5.43	3.0 ^{a)}	[125]
9		2.8×10 ⁴	5.45	3.11 ^{a)}	[125]
10		2.2×10 ³	4.34	1.89 ^{a)}	[125]
11		1.1×10 ⁶	7.04	5.22 ^{a)}	[123]
12		1.7×10 ⁷	8.24	5.30 ^{b)}	[127]
13		2.3×10 ³	4.37	4.22 ^{b)}	[127]

a) MeOPO₃²⁻ b) PhOPO₃²⁻

*Para calcular K[≠] de valores reportados fue empleado el valor de $k_{OH} = 0.1 M^{-1} s^{-1}$

CONCLUSIONES

1. Se reprodujo por primera vez un perfil en forma de campana junto con la observación de un segundo orden cinético respecto a la concentración total del catalizador para la cooperación ácido base en la ruptura de un fosfodiéster modelo de ARN, empleando un medio de reacción con un contenido de agua reducido. Además, debido al bajo contenido de agua se pudo suprimir la hidrólisis básica específica.
2. Se determinaron los valores de pK_a de diferentes pares ácido-base en la mezcla de DMSO acuoso al 80% a 37°C. Estos valores son cercanos a los reportados en agua.
3. Se hizo la caracterización del mecanismo de reacción mediante el análisis de Brønsted ($\beta = 0.69$) y efectos isotópicos. Los cuales dan evidencia de una catálisis básica general asistida por una estabilización electrofílica por parte del ácido conjugado.
3. Se obtuvieron las constantes de asociación entre guanidinio y acetamidinio con difenilfosfato ($K_{as} \approx 10$) y 4-nitrofenilfosfato ($K_{as} \approx 10^{2.5}$). Los valores encontrados dan evidencia de que la posible carga en el estado de transición es alrededor de -1.5.
4. Se demostró la capacidad de Mg^{2+} para cooperar tanto con la catálisis básica específica como con la general, en contraste con Ca^{2+} que coopera únicamente con la catálisis específica, además, el catión magnesio presenta una mayor actividad catalítica. Ambos resultados pueden explicarse con la densidad de carga de cada catión, ya que al ser mayor la del magnesio lo hace más ácido y por lo tanto más activo.
5. Fue caracterizada por primera vez la actividad catalítica de complejos inertes de

cobalto(III) por el mecanismo de esfera externa en sistemas modelo mediante la asistencia de la catálisis básica específica. La estabilización del estado de transición además de la carga puede deberse a la posible formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos amino de los ligantes del complejo y el fosforano aniónico que se forma.

6. Los experimentos en agua para la catálisis con cationes muestran la cooperación con la catálisis básica específica de los cationes alcalinotérreos además, de la existencia de la cooperación de los cationes de los compuestos de coordinación de cobalto(III) mediante un mecanismo por esfera externa. Los estudios en agua de las constantes de asociación con el 4-nitrofenilfosfato aunados al análisis de la asociación con el estado de transición, dan evidencia de una probable interacción con el alcóxido entrante por parte del catión, en el estado de transición.

7. Se encontró que la pendiente de la gráfica de Brønsted para la cooperación del catión Mg^{2+} con diferentes bases es notablemente más baja que el valor obtenido en la catálisis básica general no asistida, lo que está en acuerdo con un principio general de la disminución de la selectividad aunado a un aumento de la reactividad [18]. Así que aun cuando las bases sean débiles pueden tener una reactividad apreciable en presencia del cation de Mg^{2+} . Lo anterior puede dar una explicación a la alta eficiencia de las ribozimas dependientes de magnesio que operan mediante un mecanismo con asistencia básica general de las nucleobases.

PERSPECTIVAS

Con el fin de tener más evidencia y poder discriminar entre varias posibilidades mecánicas en el estudio del efecto de los cationes sobre la transesterificación del HpNPP en DMSO acuoso, se recomienda hacer experimentos de efectos cinéticos isotópicos, inventario de protones y de ser posible obtener las constantes de asociación con un modelo del estado de transición.

En el caso del estudio del efecto de los cationes sobre la transesterificación del HpNPP es recomendable tener los estudios de efectos isotópicos para tener más información del mecanismo de la reacción.

Debido a que los sistemas demostraron tener resultados muy interesantes, se recomienda hacer estudios con dinucleótidos ya que estos son sustratos más cercanos a la realidad y podrían dar información muy importante acerca del mecanismo de reacción en el ARN.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Voet D. & Voet J. G. Biochemistry. 3rd ed. John Wiley and Sons, inc. 2003.
- [2] Nelson D. L. & Cox M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. 4th ed. W. H. Freeman & Co. 2005.
- [3] Bruice T. C. & Benkovic S. J. Bioorganic Mechanisms. Vol.1. New York. W. A. Benjamin. 1966.
- [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. Netherlands. Marcel Dekker Inc. 2003.
- [5] Kirby A. J., Hollfelder F. From Enzyme Models to Model Enzymes. UK. RSC publishing. 2009.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Taran O., Medrano F., Yatsimirsky A. K. Rapid hydrolysis of model phosphate diesters by alkaline-earth cations in aqueous DMSO: speciation and kinetics. *Dalton Trans.* 2008. 6609–6618
- [10] Jagoda M., Warzeska H., Pritzkow H., Wadepohl H., Imhof P., Smith J. C., Kramer R. *J. Am. Chem. Soc.* 2005. 127. 15061.

- [11] Carey F. A., Sundberg R. J. *Advanced Organic Chemistry. Part A: Structure and mechanisms.* 5 ed. USA. 2006. 345-349.
- [12] IUPAC Compendium of chemical terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by McNaught and A Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML online corrected version: [http://goldbook.iupac.org\(2006-\)](http://goldbook.iupac.org(2006-)) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins.
- [13] Moore J. W., Pearson R. G., Frost A. A. *Kinetics and mechanism: A study of homogeneous chemical reactions.* 3 ed. USA. Wiley and sons. 1961.
- [14] Laidler K. J. *Chemical Kinetics.* 3 ed. Harper & Row. 1987. 379-397.
- [15] Anslyn E. V., Dougherty D. A. *Modern Physical Organic Chemistry.* USA. University Science Books. 2006. 507-515
- [16] March J., Smith M. B. *March advanced organic chemistry: Reactions, mechanisms and structure.* 6 Ed. USA. 2007. 356-375.
- [17] Isaacs N. *Physical Organic Chemistry.* UK. Longman Scientific & Technical. 1987. 255-279, 330-367.
- [18] Jencks W. P. *Catalysis in chemistry and enzymology.* Canadá. Dover Publications. 1969. 163-198.
- [19] Brønsted J. N. Acid and base catalysis. *Chem. Rev.* 1928. 5 (3): 231-338
- [20] Marcus R. A. Theoretical relations among rate constants, barriers, and Broensted slopes of chemical reactions. *J. Phys. Chem.* 1968. 72 (3): 891-899
- [21] Kresge A. J., Silverman D. N. Application of Marcus Rate Theory to Proton Transfer in Enzyme-Catalyzed Reactions. *Methods in enzymology.* 38: 276-297
- [22] Gold V., Caldin E. (eds). *Proton Transfer Reactions.* London Chapman and Hall. 1975. 179-199, 201-256, 263-312.
- [23] Wiberg K. B. The Deuterium Isotope Effect. *Chem. Rev.* 1955. 55 (4): 713-743

- [24] Klinman J. P. A new model for the origin of kinetic hydrogen isotope effects. *J. Phys. Org. Chem.* 2010. 23:606-612
- [25] Bigeleisen J. The relative reaction velocities of isotopic molecules. *J. Chem. Phys.* 1949. 17(8):675-678.
- [26] Westheimer F. H. The Magnitude of the Primary Kinetic Isotope Effect for Compounds of Hydrogen and Deuterium. *Chem. Rev.* 1961. 61 (3): 265–273
- [27] Gómez-Gallego M., Sierra M. A. Kinetic Isotope Effects in the Study of Organometallic Reaction Mechanisms. *Chem. Rev.* 2011. 111 (8): 4857–4963
- [28] Wade D. Deuterium isotope effects on noncovalent interactions between molecules. *Chemico-Biological Interactions.* 117 (1999): 191–217
- [29] Schowen R. L. Mechanistic deductions from solvent isotope effects. *Prog. In Phys. Org. Chem.* 1972. 9. 275-332.
- [30] Covington A. K., Robinson R. A., Bates R. G. The Ionization Constant of Deuterium Oxide from 5 to 50°. *J. Phys. Chem.* 1966. 70 (12): 3820–3824
- [31] Bunton C. A., Shiner Jr V. J. Isotope Effects in Deuterium Oxide Solution. I. Acid-Base Equilibria. *J. Am. Chem. Soc.* 1961. 83 (1): 42–47
- [32] Kresge A. J. Solvent isotope effects in H₂O-D₂O mixtures. *Pure Appl. Chem.* 1964(8): 243-258.
- [33] Kresge A. J. Fractionation Factor for L₃O⁺ in H₂O-D₂O mixtures. *J. Chem. Soc. Chem Comm.* 1974. 507-508
- [34] Krishtalik L. I. The mechanism of the proton transfer: an outline. *Biochimica et Biophysica Acta 1458. (BBA).* 2000: 6-27.
- [35] Bunton C. A., Shiner Jr V. J. Isotope Effects in Deuterium Oxide Solution. Part II. Reaction Rates in Acid, Alkaline and Neutral Solution, Involving only Secondary Solvent Effects. *J. Am. Chem. Soc.* 1961. 83 (15): 3207–3214

- [36] Batts B. D., Gold V. Rates of water-catalyzed reactions in water-deuterium oxide mixtures. *J. Chem. Soc. A.* 1969(0): 984-987
- [37] Gold V. The rates of acid-catalyzed reactions in water + deuterium oxide mixtures. *Trans. Faraday Soc.* 1960. 56: 255-261
- [38] Nelson W. E., Butler J. A. V. Experiments with heavy water on the acid hydrolysis of esters and the alkaline decomposition of diacetone alcohol. *J. Chem. Soc.* 1938. 957-962.
- [39] Breslow R. Biomimetic Chemistry: Biology as an Inspiration *J. Biol. Chem.* 2009, 284(3): 1337–1342
- [40] Bóka B., A. Myari, I. Sóvágó, N. Hadjiliadis. Copper(II) and zinc(II) complexes of the peptides Ac-HisValHis-NH₂ and Ac-HisValGlyAsp-NH₂ related to the active site of the enzyme CuZnSOD. *J. of Inor. Bioch.* 2004. 98: 113–122
- [41] Weinberger P., Schamschule R., Parusel A. B. J., Köhler G., Linert W. Enzyme-mimetic model compounds: conformational analysis and far-IR study of Cu(TAAB)²⁺. *J. Inor. Bioch.* 2000. 79: 53–57
- [42] Zhou L., Powell D., Nicholas K. M. Tripodal Bis(imidazole) Thioether Copper(I) Complexes: Mimics of the Cu(B) Site of Hydroxylase Enzymes. *Inorg. Chem.* 2006. 45. 3840-3842
- [43] Solomon E. I., Chen P., Metz M., Lee S., Palmer A. E. Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001. 40. 4570 - 4590
- [44] Pezeshka A., Torres J., Wilsonb M. T., Symons M. C. R. The EPR spectrum for Cu in cytochrome c oxidase. *J. Inor. Bioch.* 2001. 83. 115–119
- [45] Boulatov R. Understanding the reaction that powers this world: Biomimetic studies of respiratory O₂ reduction by cytochrome oxidase. *Pure Appl. Chem.* 2004. 76. 303–319.

- [46] Solomon E. I. Preface Forum: "Functional Insight from Physical Methods on Metalloenzymes" *Inorg. Chem.* 2005. 44. 723-726.
- [47] Solomon E. I. Geometric and Electronic Structure Contributions to Function in Bioinorganic Chemistry: Active Sites in Non-Heme Iron Enzymes. *Inorg. Chem.* 2001. 40. 3656-3666
- [48] Solomon E. I., Ginsbach J. W., Heppner D. E., Kieber-Emmons M. T., Kjaergaard C. H., Smeets P. J., Tian L., Woertink J. S. Copper dioxygen (bio)inorganic chemistry. *Faraday Discuss.* 2011. 148: 11
- [49] Solomon E. I., Ginsbach J. W., Heppner D. E., Kieber-Emmons M. T., Kjaergaard C. H., Smeets P. J., Tian L., Woertink J. S. Sulfur K-Edge X-ray absorption spectroscopy and density functional calculations on Mo(IV) and Mo(VI)=O Bis-dithiolenes: insights into the mechanism of oxo transfer in dmsO reductase and related functional analogues. *J. Am. Chem. Soc.* 2010. 132. 8359
- [50] Solomon E. I., Xie X., Dey A. Mixed valent sites in biological electron transfer. *Chem. Soc. Rev.* 2008. 37. 623–638
- [51] Solomon E. I., Augustine A. J., Yoon J. O₂ Reduction to H₂O by the multicopper oxidases. *Dalton Trans.* 2008. 3921–3932
- [52] Solomon E. I., Szilagyi R. K., George S. D., Basumallick L. electronic structures of metal sites in proteins and models: contributions to function in blue copper proteins. *Chem. Rev.* 2004. 104. 419–458
- [53] Wilcox D. Binuclear metallo- hydrolases. *Chem. Rev.* 1996. 96. 2435–2458
- [54] Bevilacqua P. C., Yajima R. Nucleobase catalysis in ribozyme mechanism. *Curr. Op. Chem. Biol.* 2006. 10: 455-464.
- [55] Mitić N., Smith S. J., Neves A., Guddat L. W., Gahan L. R., Schenk G. The catalytic mechanisms of binuclear metallohydrolases. *Chem. Rev.* 2006. 106. 3338-3363.

- [56] Trawick B. N., Daniher A. T., Bashkin J. K. Inorganic mimics of ribonucleases and ribozymes: from random cleavage to sequence-specific chemistry to catalytic antisense drugs. *Chem. Rev.* 1998. 98. 939-960
- [57] Toscano M. D., Woycechowsky K. J., Hilvert D. minimalist active-site redesign: teaching old enzymes new tricks. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. 46. 3212 – 3236.
- [58] Wulff G., Liu J., Design of biomimetic catalysts by molecular imprinting in synthetic polymers: the role of transition state stabilization. *Acc. Chem. Res.* ASAP
- [59] Silnikov V. N., Vlassov V. V.. Design of site-specific RNA-cleaving reagents. *Russ. Chem. Rev.* 2001. 70 (6): 491-508
- [60] Ho M., De Vivo M., Dal Peraro M., Klein M. L. Understanding the effect of magnesium ion concentration on the catalytic activity of ribonuclease H through computation: does a third metal binding site modulate endonuclease catalysis? *J. Am. Chem. Soc.* 2010. 132. 13702–13712
- [61] Chen Y., Li X., Gegenheimer P. Ribonuclease P catalysis requires Mg^{2+} coordinated to the pro-rp oxygen of the scissile bond. *Bioch.* 1997. 36. 2425-2438
- [62] Nakano S., Bevilacqua P. C. Mechanistic characterization of the HDV genomic ribozyme: a mutant of the C41 motif provides insight into the positioning and thermodynamic linkage of metal ions and protons. *Bioch.* 2007. 46. 3001-3012
- [63] Tzokov S. B., Murray I. A., Grasby J. A. The role of magnesium ions and 2'-hydroxyl groups in the vs ribozyme–substrate interaction. *J. Mol. Biol.* 2002. 324: 215–226
- [64] Canny M. D., Jucker F. M., Kellogg E., Khvorova A., Jayasena S. D., Pardi A. Fast cleavage kinetics of a natural hammerhead ribozyme. *J. Am. Chem. Soc.* 2004. 126. 10848-10849.
- [65] Cowan J. A. Metal activation of enzymes in nucleic acid biochemistry. *Chem. Rev.* 1998. 98. 1067-1088

- [66] Robert R. Crichton. *Biological Inorganic Chemistry: an introduction.*, Elsevier. Italia. 2008. 165-178
- [67] DeRose V. J.. Metal ion binding to catalytic RNA molecules. *Curr. Op. Str. Biol.* 2003. 13: 317–324
- [68] Kanaya S., Oobatake M., Liu Y.. Thermal stability of Escherichia coli ribonuclease HI and its active site mutants in the presence and absence of the Mg^{2+} ion. *J. Biol. Chem.* 1996. 271(51): 32729-32736
- [69] Gong B., Chen Y., Christian E. L., Chen J., Chase E., Chadalavada D. M., Yajima R., Golden B. L., Bevilacqua P. C., Carey P. R. Detection of innersphere interactions between magnesium hydrate and the phosphate backbone of the HDV ribozyme using raman crystallography. *J. Am. Chem. Soc.* 2008. 130. 9670–9672
- [70] Torres R. A., Himo F., Bruice T. C., Noodleman L., Lovell T. Theoretical examination of Mg^{2+} -mediated hydrolysis of a phosphodiester linkage as proposed for the hammerhead ribozyme. *J. Am. Chem. Soc.* 2003. 125. 9861-9867
- [71] Warashina M., Takagi Y., Stec W. J., Taira K. Differences among mechanisms of ribozyme-catalyzed reactions. *Curr. Op. Biotech.* 2000. 11: 354–362
- [72] Gong B., Chen J., Bevilacqua P. C., Golden B. L., Carey P. R. Competition between $Co(NH_3)_6^{3+}$ and inner sphere Mg^{2+} ions in the HDV ribozyme. *Bioch.* 2009. 48. 11961–11970
- [73] Lönnberg T. Understanding catalysis of phosphate-transfer reactions by the large ribozymes. *Chem. Eur. J.* 2011. 17: 7140 – 7153
- [74] Taran O., Yatsimirsky A. K. Phosphodiesterolytic activity of alkaline-earth cations in aqueous DMSO. *Chem. Commun.* 2004. 1228–1229
- [75] Aguilar-Pérez F., Gómez-Tagle P., Collado-Fregoso E., Yatsimirsky A. K. Phosphate ester hydrolysis by hydroxo complexes of trivalent lanthanides stabilized by 4-imidazolecarboxylate. *Inorg. Chem.* 2006. 45(23): 9502-9517

- [76] Sánchez-Lombardo I., Yatsimirsky A. K. Simplified speciation and improved phosphodiesterolytic activity of hydroxo complexes of trivalent lanthanides in aqueous DMSO. *Inorg. Chem.* 2008. 47. 2514-2525
- [77] Bunn S. E., Liu C. T., Lu Z., Neverov A. A., Brown R. S. The Dinuclear Zn^{II} complex catalyzed cyclization of a series of 2-hydroxypropyl aryl phosphate RNA models: progressive change in mechanism from rate-limiting p-o bond cleavage to substrate binding. *J. Am. Chem. Soc.* 2007. 129. 16238-16248
- [78] Lu Z., Liu C. T., Neverov A. A., Brown R. S.. Rapid three-step cleavage of RNA and DNA model systems promoted by a dinuclear Cu(II) complex in methanol. energetic origins of the catalytic efficacy. *J. Am. Chem. Soc.* 2007. 129. 11642-11652.
- [79] Liu C. T., Neverov A. A., Brown R. S. Biomimetic cleavage of RNA models promoted by a dinuclear Zn(II) complex in ethanol. greater than 30 kcal/mol stabilization of the transition state for cleavage of a phosphate diester. *J. Am. Chem. Soc.* 2008. 130(49): 16711-16720
- [80] Tsang W. Y., Edwards D. R., Melnychuk S. A., Liu C. T., Liu C., Neverov A. A., Williams N. H., Brown R. S.. Dinuclear Zn(II) complex promotes cleavage and isomerization of 2-hydroxypropyl alkyl phosphates by a common cyclic phosphate intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* 2009. 131(11): 4159-4166
- [81] Pingoud A., Meiss G. Ribonucleases. Wiley & sons. 2005.
- [82] Brown R. S., Luay Z., Liu C. T., Tsanga W. Y., Edwards D. R., Neverov A. A. Dinuclear Zn(II) catalysts as biomimics of RNA and DNA phosphoryl transfer enzymes: changing the medium from water to alcohol provides enzyme-like rate enhancements. *J. Phys. Org. Chem.* 2010. 23 1–15
- [83] Mohamed M. F., Brown R. S.. Cleavage of an RNA model catalyzed by dinuclear Zn(II) complexes containing rate-accelerating pendants. comparison of the catalytic benefits of h-bonding and hydrophobic substituents. *J. Org. Chem.* 2010. 75(24). 8471-8477

- [84] Edwards D. R., Tsang W., Neverov A. A., Brown R. S. On the question of stepwise vs. concerted cleavage of RNA models promoted by a synthetic dinuclear Zn(II) complex in methanol: implementation of a noncleavable phosphonate probe. *Org. Biomol. Chem.* 2010. 8: 822–827
- [85] Kirk B. A., Cusack C. L., Laager E., Rochlis E., Thomas T., Cassano A. G. Mononuclear and dinuclear mechanisms for catalysis of phosphodiester cleavage by alkaline earth metal ions in aqueous solution. *J. Inor. Bioch.* 104 (2010) 207–210
- [86] Cassano A. G., Anderson V. E., Harris M. E. Analysis of solvent nucleophile isotope effects: evidence for concerted mechanisms and nucleophilic activation by metal coordination in nonenzymatic and ribozyme-catalyzed phosphodiester hydrolysis. *Bioch.* 2004. 43. 10547-10559
- [87] Cleland W. W., Hengge A. C. Enzymatic mechanisms of phosphate and sulfate transfer. *Chem. Rev.* 2006. 106: 3252-3278
- [88] Cuchillo C. M., Nogués M. V., Raines R. T. Bovine Pancreatic Ribonuclease: Fifty Years of the First Enzymatic Reaction Mechanism. *Biochem.* 2011. 50(37): 7835-7841
- [89] 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
- [90] Gilliland G. L., Władkowski B. D., Svensson L. A., Sjölin 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.
- [91] 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.

[92] 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

[93] 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.

[94] 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

[95] Karube I., Kato T., Takeuchi T. Bis(imidazol) cleft-shaped mimic of the active site of ribonuclease A. *Chem. Comm.* 1996. 953-954.

[96] 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.

[97] 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

[98] Greig I. R. The analysis of enzymic free energy relationships using kinetic and computational models. *Chem. Soc. Rev.* 2010. 39. 2272-2301

[99] 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

[100] Göbel M. W. & Mücke 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.

- [101] Göbel M. W. Binuclear metal complexes as efficient intermediaries in biochemically relevant hydrolysis reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1994, 33:1141-1143.
- [102] 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.
- [103] 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
- [104] 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.
- [105] Zepik H. H., Benner S. A. Catalysts, anticatalysts, and receptors for unactivated phosphate diesters in water. *J. Org. Chem.* 1999. 64. 8080-8083
- [106] 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.
- [107] 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
- [108] Salvio R., Cacciapaglia R., Mandolini L. General baseguanidinium cooperation in bifunctional artificial phosphodiesterases. *J. Org. Chem.* 2011, 76, 5438–5443
- [109] 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.
- [110] Brown D. M., Usher D. A. Hydrolysis of hydroxyalkyl phosphate esters: effect of changing ester group. *J. Chem. Soc.* 1965. 6558-6564.

- [111] 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
- [112] Baughman E. H., Kreevoy M. M., Determination of acidity in 80% dimethyl sulfoxide-20% water. *J.Phys.Chem.* 1974. 78, 421-423.
- [113] Lopez X., Dejaegere A., Karplus M. Solvent effects on the reaction coordinate of the hydrolysis of phosphates and sulfates: application of hammond and anti-hammond postulates to understand hydrolysis in solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 11755-11763.
- [114] Corona-Martínez, D. O. Catálisis con amortiguadores en la hidrólisis de un fosfodiéster modelo del ARN en mezclas DMSO-Agua. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. 2008.
- [115] Bordwell F. G. Equilibrium acidities in dimethyl sulfoxide solution. *Acc. Chem. Res.* 1988. 21: 456-463.
- [116] Yatsimirsky A. K. Metal ion catalysis in acyl and phosphoryl transfer: Transition states as ligands. *Coord. Chem. Rev.* 249, 1997-2011 (2005)
- [117] 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.* 1992. 31 (2):207-209.
- [118] Schowen, K.B., Limbach H. H., Denisov G.S., Schowen R. L. Hydrogen bonds and proton transfer in general-catalytic transition-state stabilization in enzyme catalysis. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2000 1458, 43-62.
- [119] Bryan C. D., Schowen K. B., Schowen R. L. Solvent isotope effects as a probe of general catalysis and solvation in phosphoryl transfer. *Can. J. Chem.* 1996. 74. 931-938.
- [120] Singh S. Rao C. N. R. Deuterium isotope effects on hydrogen bonding. *Can. J. Chem.* 1966. 44. 2611- 2615.

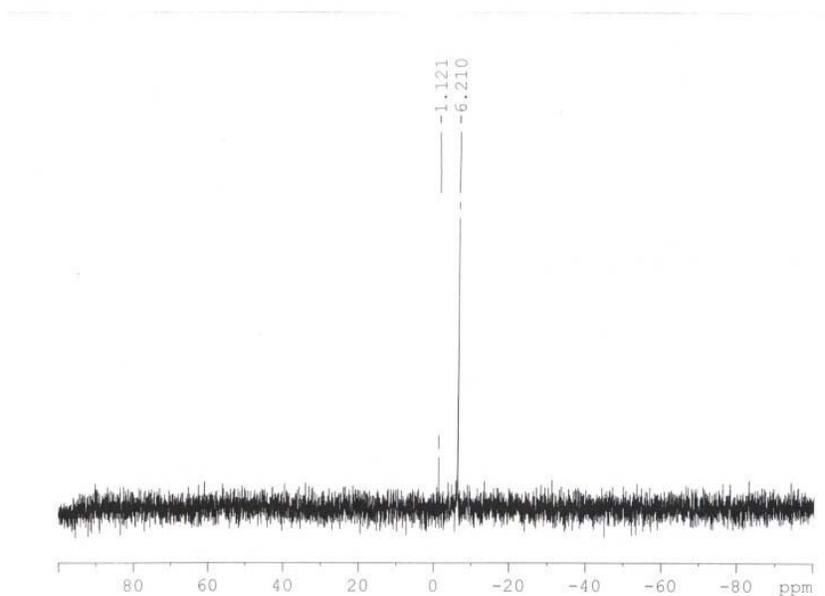
- [121] Lewis B. E., Schramm V. L. Binding Equilibrium Isotope Effects for Glucose at the Catalytic Domain of Human Brain Hexokinase. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 4785-4798
- [122] Kubiak R. J., Yue X., Hondal R. J., Mihai C., Tsai M. D., Bruzik K. S. Involvement of the Arg-Asp-His catalytic triad in enzymatic cleavage of the phosphodiester bond. *Bioch.* 2001. 40. 5422-5432
- [123] Yang, M. Y., Morrow, J. R., Richard, J. P. A Transition state analog for phosphate diester cleavage catalyzed by a metal ion complex. *Bioorg. Chem.* 2007. 35. 366-374.
- [124] Chval Z., Chvalova D., Leclerc F. Modeling the RNA 2'OH activation: possible roles of metal ion and nucleobase as catalysts in self-cleaving ribozymes. *J. Phys. Chem. B.* 2011. 115. 10943–10956.
- [125] Mathews R., Rossiter C., Richard J. P., Morrow J. R. A Minimalist Approach to Understanding the Efficiency of Mononuclear Zn(II) Complexes for Catalysis of Phosphodiester Cleavage. *Dalton Trans.* 2007, 3804-3811.
- [126] Basolo F., Pearson R. G. Mechanisms of inorganic reactions: a study of metal complexes in solution. Wiley. 1967.
- [127] Feng G., Mareque-Rivas J. C., Martín de Rosales R. T., Williams N. H. A Highly Reactive Mononuclear Zn(II) Complex for Phosphodiester Cleavage. *J. Am Chem. Soc.* 2005, 127, 13470-13471.
- [128] Huang H. W., Cowan, J. A. Metallobiochemistry of the magnesium ion. Characterization of the essential metal-binding site in Escherichia coli ribonuclease H. *Eur. J. Biochem.* 1994. 219. 253-260
- [129] Hampev A., Cowan J. A. A unique mechanism for RNA catalysis: the role of metal cofactors in hairpin ribozyme cleavage. *Chem. & Biol.* 1997. 4(7): 513-517
- [130] Schweins T., Warshel A. Mechanistic analysis of the observed linear free energy relationships in p21^{ras} and related systems. *Bioch* 1996. 35. 14232-14243

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

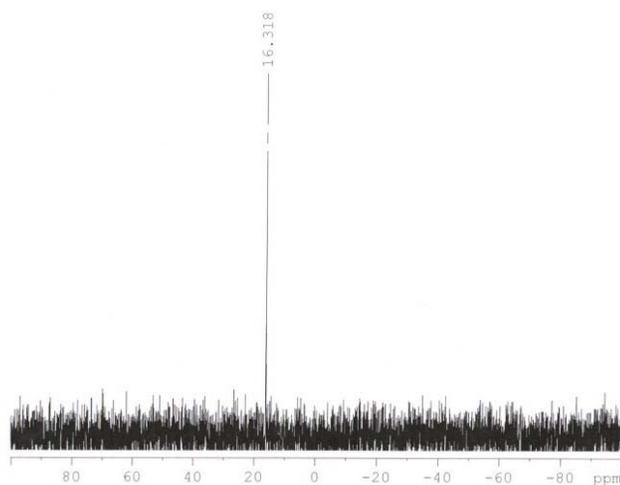
[132] Reinhoudt D. N., Engbersen J. F. J., Molenveld P. Synthesis of a dinuclear ZnII-calix[4]arene enzyme model with additional general base groups- catalytic activity in phosphate diester transesterification. *Eur. J. Org. Chem. 1999. 3269-3275.*

APÉNDICE I

Espectros de RMN ^{31}P para el HpNPP



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



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

APÉNDICE 2

Deducción de la constante de equilibrio para la asociación del catalizador con el estado de transición

Consideremos una reacción química entre dos sustancias A y B, la cual puede llevarse a cabo sin catalizador o con un catalizador "C", con sus respectivas constantes de rapidez.



Para ambas reacciones las constantes de rapidez pueden expresarse de acuerdo con la teoría del estado de transición de Eyring como:

$$k_2 = \left(\frac{k_B T}{h} \right) \left(\frac{[AB^\ddagger]}{[A][B]} \right) \quad (4)$$

$$k_3 = \left(\frac{k_B T}{h} \right) \left(\frac{[ABC^\ddagger]}{[A][B][C]} \right) \quad (5)$$

En donde $[AB^\ddagger]$ y $[ABC^\ddagger]$ son las concentraciones en el pseudoequilibrio de los estados de transición de las reacciones (1) y (2), respectivamente. Si consideramos el cociente k_3/k_2 , tenemos:

$$\frac{k_3}{k_2} = \left(\frac{[ABC^\ddagger]}{[AB^\ddagger][C]} \right) \quad (6)$$

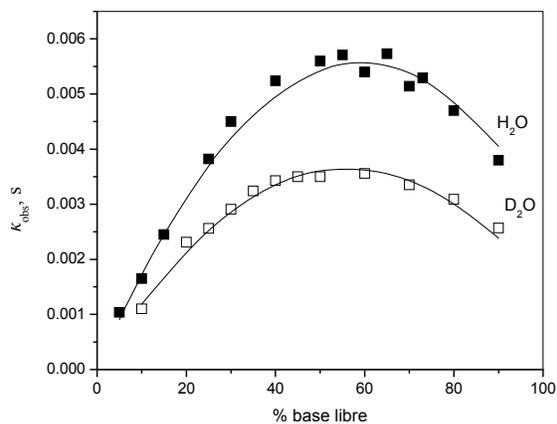
La ecuación anterior puede interpretarse como una constante de equilibrio para la unión entre el catalizador y el estado de transición de la reacción sin catalizar como:

$$K_T^\ddagger = \frac{k_3}{k_2} = \left(\frac{[ABC^\ddagger]}{[AB^\ddagger][C]} \right) = e^{\frac{-\Delta_T^\ddagger G}{RT}} \quad (7)$$

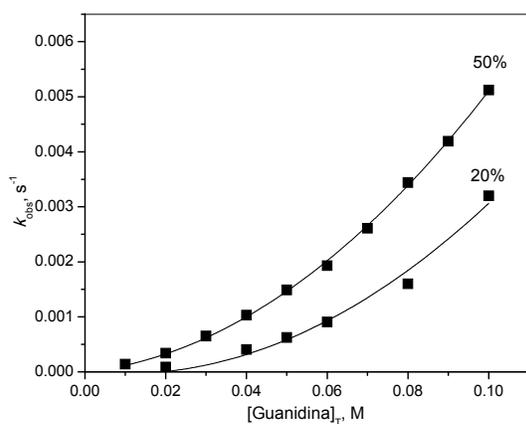
De la demostración anterior queda claro que si nosotros calculamos el cociente entre las constantes de rapidez para la reacción catalizada y la reacción catalizar, el valor que obtendremos será el de la constante de asociación aparente entre el catalizador y estado de transición de la reacción sin catalizar.

APÉNDICE 3

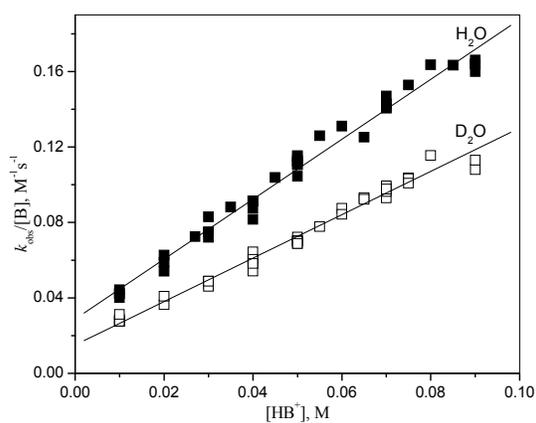
Gráficas de los experimentos con guanidina.



Perfil de neutralización de guanidina en DMSO acuoso (A) en agua, cuadros negros, (B) en D_2O cuadros blancos. La concentración de guanidina es 0.1 M



Perfil de concentración guanidina en DMSO acuoso a diferentes grados de neutralización



Gráfica en las coordenadas de la ecuación 26 para guanidina

Mechanism of general acid–base catalysis in transesterification of an RNA model phosphodiester studied with strongly basic catalysts†

David O. Corona-Martínez, Olga Taran and Anatoly K. Yatsimirsky*

Received 30th September 2009, Accepted 7th November 2009

First published as an Advance Article on the web 21st December 2009

DOI: 10.1039/b920398b

Using 80% vol aqueous DMSO as the reaction medium for transesterification of an RNA model substrate 2-hydroxypropyl 4-nitrophenyl phosphate allows one to observe catalysis in buffer mixtures composed of highly basic components such as guanidines, amidines or alkylamines, which provide up to 10^3 -fold accelerations over the background reaction in the 0.01–0.1 M concentration range. The rate law $k_{\text{obs}} = k_1[\text{B}] + k_2[\text{B}][\text{BH}^+]$ was established indicating contributions from both simple general base catalysis and the reaction involving concerted action of neutral (B) and protonated (BH⁺) forms of the buffer. The catalytic efficiency of guanidinium and amidinium cations is 10 times larger than that of more acidic ammonium cations. Rate constants k_1 and k_2 obey the Brønsted equations with the slopes 0.77 and 0.69 respectively. Proton inventory for k_2 (B = guanidine) in D₂O/H₂O mixtures gives two fractionation factors $\phi_1 = 0.48$ and $\phi_2 = 1.26$ for normal and inverse isotope effects respectively. The former results from the proton transfer to B and the latter from the binding of guanidinium cation to the phosphate group as follows from observation of an inverse solvent isotope effect for the binding of guanidinium and amidinium cations to a phosphodiester anion. The results of kinetic studies together with analysis of transition state stabilization free energies for guanidinium and amidinium cations show that the protonated buffer component acts *via* electrostatic transition state stabilization rather than proton transfer, which may be possible for a guanidinium assisted hydroxide catalyzed reaction.

Introduction

The cooperative action of neutral and protonated forms of imidazole groups of His12 and His119 in the active site of RNase A is a key aspect of the mechanism of RNA hydrolysis by this enzyme.¹ It was suggested that it can be reproduced in a very simple form as catalysis by a couple of neutral (B) and protonated (BH⁺) forms of imidazole or other buffer.² The respective rate law (1) for the catalytic reaction is distinguished by two characteristic kinetic features: a “bell-shaped” profile of k_{obs} vs. the fraction of the neutral form with a maximum at 50% neutralization when the total buffer concentration is kept constant and a second-order dependence of k_{obs} on the total buffer concentration when the neutralization fraction is kept constant.

$$k_{\text{obs}} = k_2[\text{B}][\text{BH}^+] \quad (1)$$

Earlier studies summarized in a review article³ led to controversial conclusions (see also ref. 4). A serious obstacle for an unambiguous interpretation of kinetic data was a very low efficiency of catalysis and consequently a necessity to employ buffers in very high concentrations (1 M or higher) creating significant medium effects, which disturbed the observed profiles in a complex and poorly accountable manner.⁵

In this paper we demonstrate that clean kinetics in accordance with the rate law (1) can be observed in sufficiently diluted 0.01–0.1 M buffers made from strongly basic components such as amidines, guanidines or aliphatic amines. These buffers cannot be employed in water because they create solutions with very high pH values where the alkaline hydrolysis strongly predominates. The problem can be solved however by changing the reaction medium from pure water to aqueous DMSO, which suppresses the auto-dissociation of water, but affects very little the protonation constants of nitrogen bases. For instance in 80% vol DMSO $\text{p}K_{\text{w}}$ rises to 18.4,⁶ but $\text{p}K_{\text{a}}$ values of aliphatic amines even decrease by *ca.* 0.5 units.⁷ As a result a solution with *e.g.* pH 13.5 ($\text{p}K_{\text{a}}$ of guanidinium) will contain a 1 : 1 mixture of protonated and neutral guanidine both in water and in 80% DMSO, but the concentration of free OH[−] will be 0.3 M in water and only 1.2×10^{-5} M in 80% DMSO (the same as at pH 9.1 in water). As is shown below, under such conditions the buffer-catalyzed reaction is *ca.* 10^3 times faster than the alkaline hydrolysis already in the presence of 0.1 M buffer.

Protonated forms of strong bases are weak acids and they may be unable to provide the general acid assistance. However, it was argued that even such a weak acid as guanidinium ion can act as a proton donor in the transition state because of high basicity of the intermediate/transition state phosphorane.^{8,9} Alternatively, cationic protonated bases may act as electrostatic catalysts.⁸

We chose for this study 80% vol DMSO as a reaction medium because it is still rather “aqueous” (50% mole fraction of water) with a dielectric constant of 72, non-hygroscopic and is suitable for reliable potentiometric titrations¹⁰ necessary for determination of required $\text{p}K_{\text{a}}$ values of buffer components. A simple model

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México. E-mail: anatoli@servidor.unam.mx

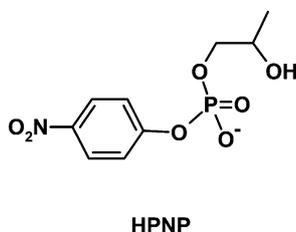
† Electronic supplementary information (ESI) available: Kinetic data for HPNP cleavage in acetamidine and benzamidine buffers, ³¹P NMR titrations of diphenylphosphate by guanidinium and acetamidinium chlorides. See DOI: 10.1039/b920398b

Table 1 Rate and equilibrium constants for buffer catalyzed transesterification of HPNP in 80% vol DMSO at 37 °C^a

Base	pK _a	k ₁ /M ⁻¹ s ⁻¹	k ₂ /M ⁻² s ⁻¹	k ₂ '/M ⁻² s ⁻¹	K _T ^a /M ⁻¹	
					k ₂ /k ₁	k ₂ '/k ₁
Guanidine	13.91(3)	0.025(2)	1.68(5)		67	
Aminoguanidine	13.0(1)	0.0018(1)	0.178(6)	0.21(2)	99	117
Acetamidine	12.2(1)	0.0010(1)	0.055(3)	0.24(3)	55	240
Benzamidine	10.7(1)	1.3(1) × 10 ⁻⁴	0.00858(7)		118	
Methylamine	10.06(2)	1.5(2) × 10 ⁻⁵	9.7(2) × 10 ⁻⁵		6.5	
Piperidine	9.88(3)	1.4(2) × 10 ⁻⁵	1.7(2) × 10 ⁻⁴	0.0017(2)	12.1	121

^a Values in parentheses are standard errors in the last significant digit.

phosphodiester HPNP often employed in kinetic studies with chemical catalysts was used as a substrate.¹¹



Results and discussion

Acid dissociation constants of protonated bases were determined by standard potentiometric titrations of their chlorides by Me₄NOH in 80% DMSO. The pK_a values are collected in Table 1. The value of pK_w = 18.77 ± 0.08 (37 °C, 0.01 M Bu₄NCl) was obtained from titration of diluted HClO₄.

Fig. 1A shows the profile of *k*_{obs} for the HPNP cleavage in guanidine/guanidinium chloride buffer vs. the fraction of guanidine free base from 10 to 90% at constant 0.1 M total buffer and Fig. 1B shows the plots of *k*_{obs} vs. total buffer concentration at different fractions of free base. The experiments were performed at a constant total 0.1 M ionic strength kept by additions of Me₄NCl, but in fact the reaction rate was not affected by additions of Me₄NCl or Bu₄NCl up to 0.2 M.

Guanidine solutions containing more than 50% free base were unstable in aqueous DMSO. Solutions became slightly turbid after ca. 5 min and an unidentified compound started to precipitate after 15 min. In these solutions only measurements at the first 5–6 min corresponding to ca. 2 half-lives were used in the calculation of the rate constants. The plots in Fig. 1B go to zero at low buffer concentrations indicating a very low rate of the background hydrolysis. To be able to estimate the rate of background reaction, the rate constant for alkaline hydrolysis of HPNP *k*_{OH} = 0.58 ± 0.05 M⁻¹ s⁻¹ was measured in 80% DMSO at 37 °C. The observed rate constant of the alkaline hydrolysis of HPNP calculated for pH 13.91 (pOH 4.86) corresponding to 50% buffer neutralization equals therefore 9.4 × 10⁻⁶ s⁻¹. Thus the buffer catalysis provides approximately 10⁵ rate enhancement in 0.1 M half-protonated guanidine. The formation of the cyclic phosphate ester as the sole reaction product in the presence of 0.1 M guanidine buffer was confirmed by ¹H and ³¹P NMR spectra of the reaction mixture recorded after complete release of 4-nitrophenolate measured spectrophotometrically. This excludes

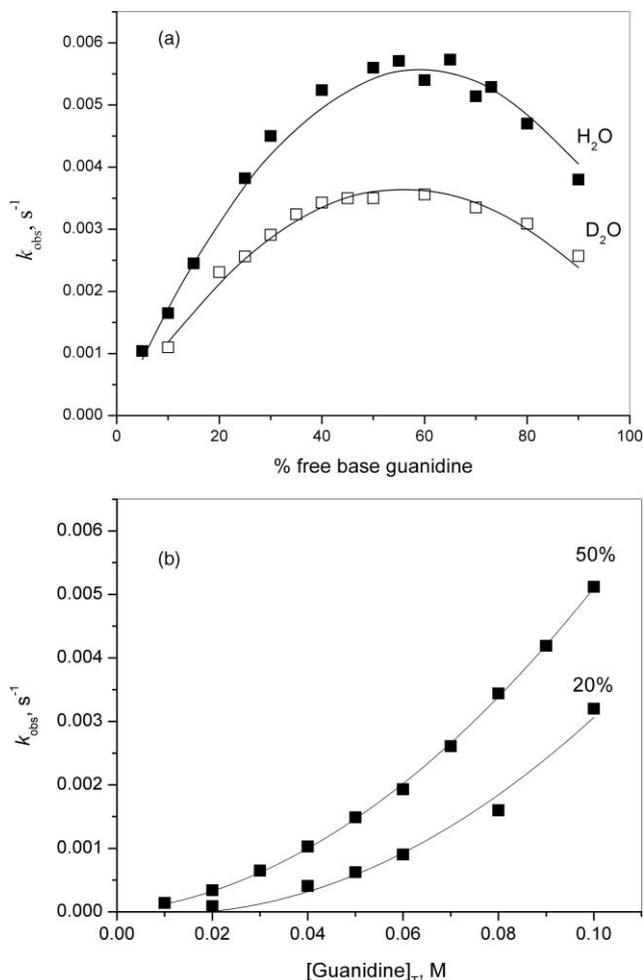


Fig. 1 Catalysis of the hydrolysis of HPNP by guanidine as a function of the fraction of free base at total 0.1 M guanidine (A) and as a function of total guanidine at different fractions of free base indicated on the plot (B) in 80% vol DMSO, 37 °C. Solid symbols: results in DMSO/H₂O, open symbols: results in DMSO/D₂O. Lines are calculated in accordance with eqn (2).

the possibility of nucleophilic cleavage of HPNP by a strong guanidine base instead of transesterification.

The profiles shown in Fig. 1A,B are of the type expected for the rate law (1). The quantitative analysis of kinetic results demonstrates that there is also a first-order contribution from the general base catalysis by neutral guanidine, which explains the

asymmetric shape of the profile in Fig. 1A. The complete rate law takes the form of eqn (2), which can be rearranged into eqn (3). The last equation predicts that the plot of k_{obs} divided by the concentration of free base must be a linear function of the concentration of the protonated form with the slope and intercept equal to k_2 and k_1 respectively.

$$k_{\text{obs}} = k_1[\text{B}] + k_2[\text{B}][\text{BH}^+] \quad (2)$$

$$k_{\text{obs}}/[\text{B}] = k_1 + k_2[\text{BH}^+] \quad (3)$$

Fig. 2 shows all the results obtained in both types of experiments (at fixed total buffer and variable degree of neutralization and at fixed degrees of neutralization and variable total buffer) in the coordinates of eqn (3), which confirms the rate law (2). The calculated rate constants are given in Table 1.

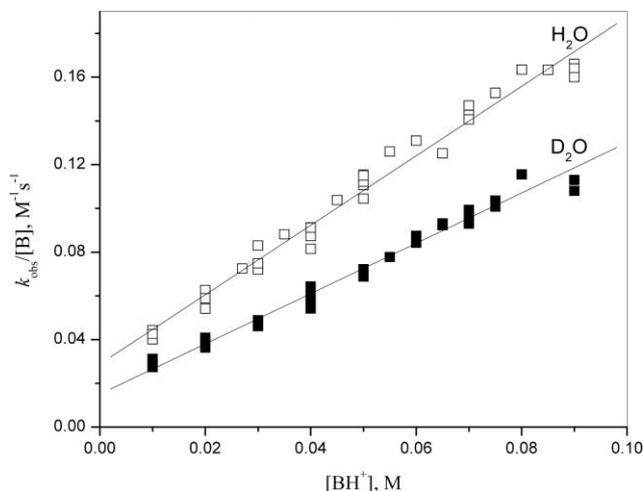


Fig. 2 Results for catalysis of the cleavage of HPNP in guanidine buffer in coordinates of eqn (3).

Similar results were obtained with aminoguanidine (Fig. 3A,B), acetamidine and benzamidine buffers (Fig. S1 and S2, Supplementary Information). Fig. S3 (Supplementary Information) shows all data for these buffers in coordinates of eqn (3) and the calculated rate constants are given in Table 1. The profile for aminoguanidine (Fig. S3A) shows a small deviation from linearity at high concentrations of the protonated form, probably due to the contribution of a second BH^+ species in the catalysis (see below).

The contribution of the reaction assisted by the protonated form of the buffer to the overall reaction rate was much smaller for piperidine and methylamine buffers. Results for piperidine are shown in Fig. 4. Data at less than 30% free base were too scattered and were excluded. Profiles of k_{obs} vs. total buffer concentration (not shown) were non-linear and analysis of all data in terms of the eqn (3) (Fig. 4B) shows that in spite of the absence of the optimum in the plot of k_{obs} vs. fraction of the free base, the contribution of the second-order catalytic reaction does exist in this case.

In methylamine buffer the profile of k_{obs} vs. fraction of the free base was too scattered over the whole range of free base fractions and analysis was based only on the profiles of k_{obs} vs. buffer concentration obtained at different base fractions. These profiles were still non-linear (Fig. 5) and the analysis in terms of

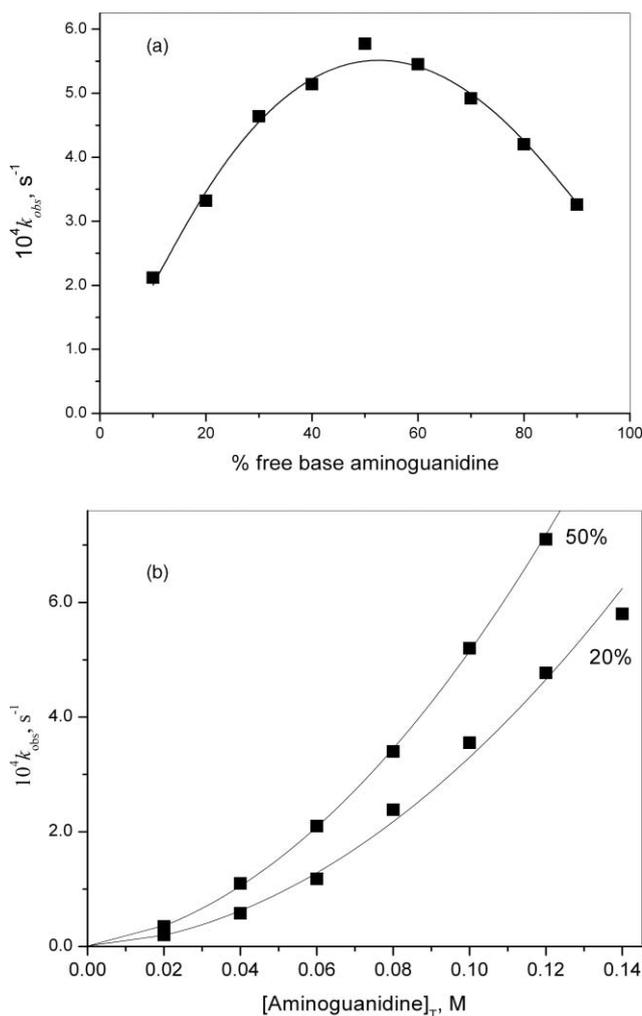


Fig. 3 Catalysis of the hydrolysis of HPNP by aminoguanidine as a function of the fraction of free base at total 0.1 M aminoguanidine (A) and as a function of total aminoguanidine at different fractions of free base indicated on the plot (B). Lines are calculated in accordance with eqn (2).

eqn (3) allowed us to estimate the contribution of the reaction second-order in catalyst also for this buffer (Fig. 5, inset).

Interestingly, Brown and Usher did not observe any catalytic effect of 0.2 M piperidine at pH 11.37 ($\text{p}K_{\text{a}}$ of piperidine) in water and concluded that the cleavage of HPNP is not a subject of general base catalysis.¹² Assuming that k_1 in water is approximately the same as in 80% DMSO one obtains the expected contribution from the piperidine catalysis to the observed rate constant of HPNP cleavage under these conditions $2.8 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. At the same time the contribution from the hydroxide catalyzed reaction at this pH is $k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] = 0.1 \times 0.0023 = 2.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Obviously an increase in the reaction rate by just 1% is within the limits of usual experimental errors and the general base catalysis in water most probably does exist, but is completely masked by the much faster hydroxide catalyzed reaction. This masking effect is eliminated in 80% DMSO where $\text{p}K_{\text{a}}$ of piperidine decreases to 9.88, the concentration of free hydroxide at 50% free base decreases to $1.3 \times 10^{-9} \text{ M}$ and the contribution from the hydroxide catalyzed reaction becomes equal to $7.5 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$, which is less than 0.1% of k_{obs} measured with 0.1 M piperidine (see Fig. 4A).

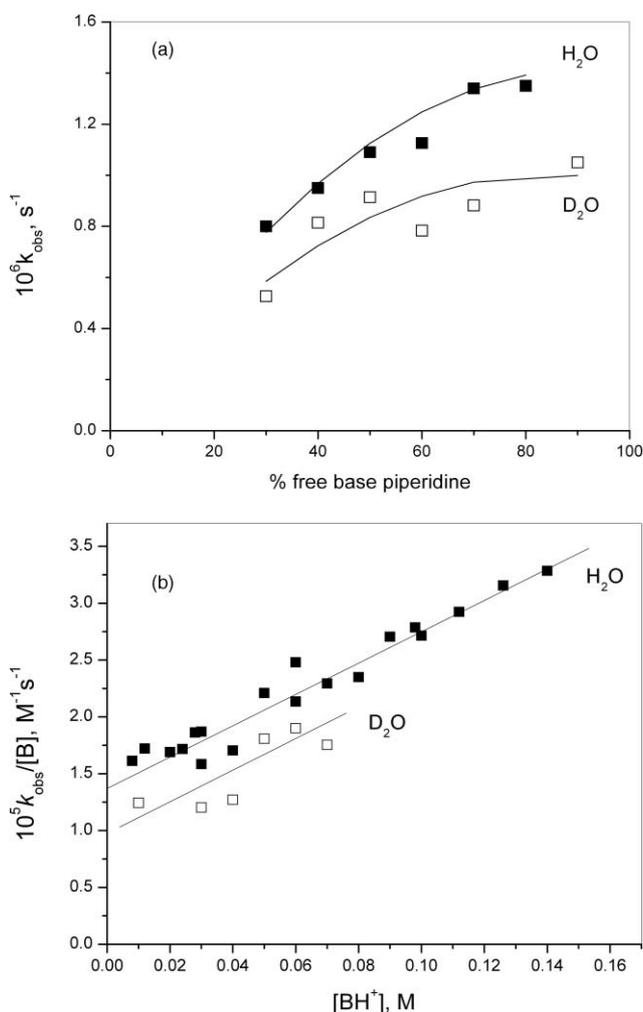


Fig. 4 (A) Catalysis of the hydrolysis of HPNP by piperidine as a function of the fraction of free base at total 0.1 M piperidine. (B) Results for all experiments in coordinates of eqn (3). Solid squares: results in DMSO/H₂O, open squares: results in DMSO/D₂O.

The catalytic effect of guanidinium ion can be observed also with weaker bases. Fig. 6 shows the effect of guanidinium chloride on the rate of HPNP cleavage in the presence of three other bases. In the reaction with aminoguanidine the dependence is non-linear with a contribution from the second guanidinium cation in catalysis in line with a positive deviation from a linear plot in Fig. S3. The results follow the rate eqn (4) where k_0 is the rate constant in the absence of added guanidinium and GH^+ stands for guanidinium cation. The term with the rate constant $k_3 = 2.6 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$ is significant only when B is aminoguanidine. The rate constants k_2' similar in their meaning to k_2 are given in Table 1. The reason why the reaction with aminoguanidine has a second-order contribution in the protonated base is not clear.

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_2'[\text{B}][\text{GH}^+] + k_3[\text{B}][\text{GH}^+]^2 \quad (4)$$

Rate constants for general base catalysis (k_1) for all types of bases obey the Brønsted eqn (5) (Fig. 7, open circles) with the slope slightly larger than that reported for the base-catalyzed cleavage of more reactive 4-nitrophenyl uridine-3'-phosphate in water (0.67 ± 0.05).¹³

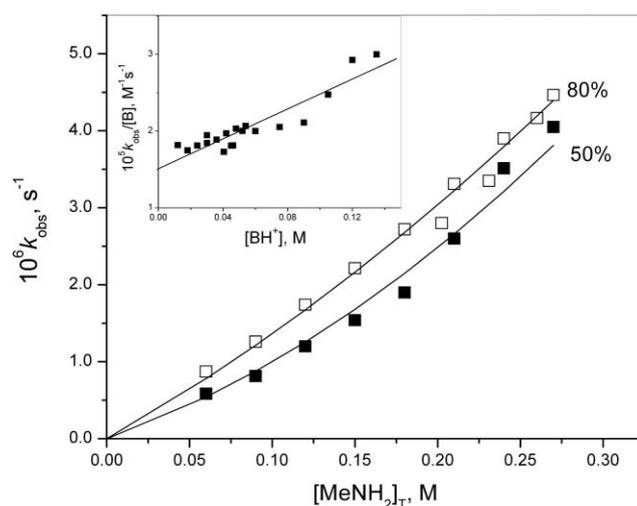


Fig. 5 Catalysis of the hydrolysis of HPNP by methylamine as a function of total buffer concentration at different fractions of free base indicated on the plot. Inset: results for all experiments in the coordinates of eqn (3).

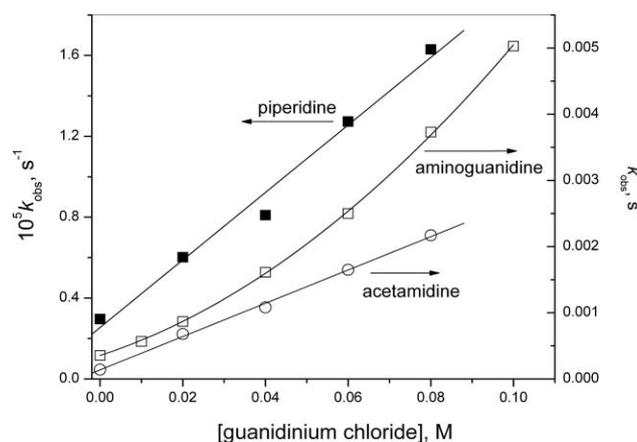


Fig. 6 Effect of guanidinium chloride on the rate of HPNP cleavage in the presence of 0.1 M total piperidine (solid squares), acetamidine (open circles) and aminoguanidine (open squares) containing 90% free base.

$$\log k_1 = -12.4 \pm 0.9 + (0.77 \pm 0.07)\text{p}K_{\text{a}} \quad (5)$$

Rate constants for catalysis assisted by protonated base (k_2) for amidines and guanidines also follow the Brønsted equation, but points for amines show strong negative deviations (Fig. 7, solid circles). Rate constants for guanidinium catalysis (k_2') for all types of bases (Fig. 7, grey triangles) fall on the line with k_2 for amidines and guanidines, described by eqn (6).

$$\log k_2 = -9.5 \pm 0.9 + (0.69 \pm 0.07)\text{p}K_{\text{a}} \quad (6)$$

The Brønsted analysis clearly shows that catalysis by amidinium and guanidinium cations is much more efficient than by ammonium cations. In particular, for a reaction with piperidine as a base the catalytic activity of the guanidinium cation is one order of magnitude larger than that of the much more acidic piperidinium cation. This can be attributed to reported earlier high affinity of guanidinium cations to phosphate anions observed even in aqueous DMSO due to the ability of these cations to undergo bidentate hydrogen bonding.¹⁴ The Brønsted slope for the catalysis assisted by the protonated base should be smaller than that for

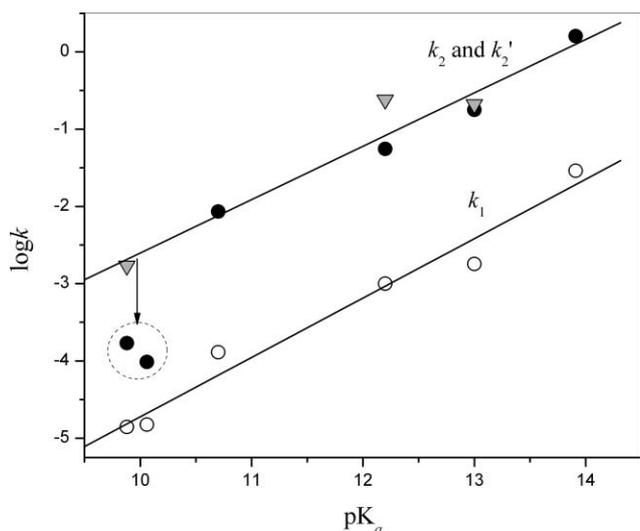


Fig. 7 Brønsted dependencies of k_1 (open circles), k_2 (solid circles) and k_2' (grey triangles) for HPNP cleavage in different buffer solutions in 80% DMSO. Lines are calculated in accordance with eqn (5) and (6).

general base catalysis because more acidic cations are expected to act as more efficient catalysts compensating for the lower catalytic activity of their conjugated bases. The slope of the plot for k_2 (k_2') indeed is somewhat smaller than that for k_1 , but the difference is within the limits of experimental errors. This fact speaks in favor of electrostatic rather than general acid catalysis by protonated bases.

Another way of analysing the nature of catalysis by protonated bases is to view it in terms of transition state stabilization by “association” with the catalyst. According to this approach the ratio of k_2 or k_2' to k_1 equals the association constant K^*_{T} for the binding of BH^+ to the transition state of the general base catalyzed reaction, eqn (7).¹⁵

$$k_2/k_1 = K^*_{\text{T}} \text{ or } k_2'/k_1 = K^*_{\text{T}} \quad (7)$$

The respective K^*_{T} values are given in Table 1. All K^*_{T} calculated from k_2'/k_1 and the value calculated from k_2/k_1 in guanidine/guanidinium buffer correspond to binding of the guanidinium cation to the transition states of HPNP transesterification catalyzed by different bases. No correlation is observed with basicity of buffers. The K^*_{T} values for amidinium and aminoguanidinium cations also vary non-systematically and all constants fall in the range from 55 to 240 M^{-1} . It seems that variations in K^*_{T} are related to some steric and/or solvation effects, but not to acid–base properties of the buffers. On average the transition state stabilization free energy by these cations is $\Delta G^*_{\text{T}} = -12 \pm 1 \text{ kJ mol}^{-1}$. For ammonium cations one obtains a one order of magnitude smaller K^*_{T} values and the average $\Delta G^*_{\text{T}} = -5.6 \pm 0.8 \text{ kJ mol}^{-1}$.

In order to find the reference points for these numbers we measured the binding constants of guanidinium and acetamidinium cations to $(\text{PhO})_2\text{PO}_2^-$, a stable phosphodiester anion similar to the HPNP ground state, and to $p\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OPO}_3^{2-}$, a monoester dianion earlier employed as a transition state model for the alkaline hydrolysis¹⁶ and transesterification¹⁷ of phosphodiesters. The former were measured by ³¹P NMR titrations of $(\text{PhO})_2\text{PO}_2^-$ by chloride salts of the cations (Fig. S4,

Table 2 Association constants (M^{-1}) for binding of guanidinium and acetamidinium cations to phosphate esters in 80% vol DMSO

	$(\text{PhO})_2\text{PO}_2^-$		$p\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OPO}_3^{2-}$
	DMSO/ H_2O	DMSO/ D_2O	
$\text{H}_2\text{NC}(\text{NH}_2)=\text{NH}_2^+$	5.9 ± 0.3	7.8 ± 0.3	500 ± 50
$\text{MeC}(\text{NH}_2)=\text{NH}_2^+$	7.5 ± 0.6	13 ± 1	630 ± 70

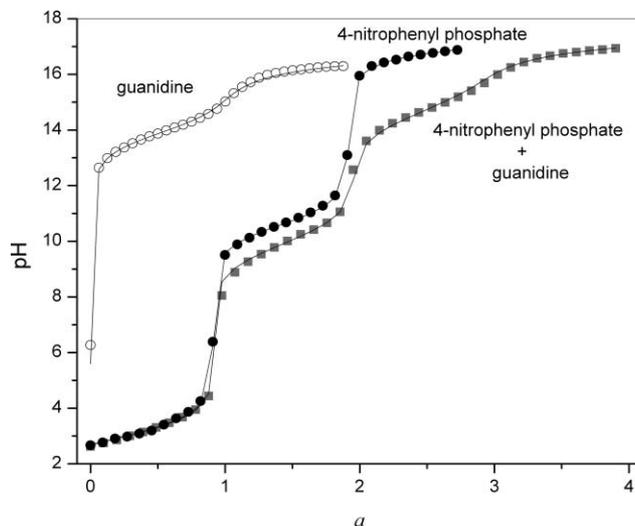


Fig. 8 Titration curves for 10 mM guanidinium chloride (open circles), $p\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OPO}_3\text{H}_2$ (solid circles) and the mixture of both compounds (grey squares) with 0.1 M $\text{Me}_4\text{N}(\text{OH})$ in 80% vol DMSO; a is the number of moles of $\text{Me}_4\text{N}(\text{OH})$ added per 1 mol of the titrated compound. Solid lines are the fitting curves generated by Hyperquad.

Supporting Information) in 80% DMSO- $\text{d}_6/\text{H}_2\text{O}$. Much stronger binding to $p\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OPO}_3^{2-}$ was studied by potentiometric titrations as illustrated for guanidinium in Fig. 8. Titration of $p\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OPO}_3\text{H}_2$ allowed us to determine $\text{p}K_{\text{a}1} = 3.1 \pm 0.1$ and $\text{p}K_{\text{a}2} = 10.59 \pm 0.08$. Then titration of $p\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OPO}_3\text{H}_2$ was repeated, but in the presence of 1 equivalent of guanidinium chloride (grey squares). Titration of the first proton remained unaffected indicating insignificant interaction of guanidinium cation with the monoanion ($p\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OPO}_3\text{H}^-$), but points for titration of the second proton were shifted to lower pH due to binding of the dianion to guanidinium, which competes with protonation, and subsequent titration of the guanidinium cation was shifted to higher pH values as compared with guanidinium alone (open circles) as a result of stabilization of the cation by binding to the dianion of the phosphate monoester. The binding constants obtained from these results are collected in Table 2. They correspond to average binding free energies of -4.8 ± 0.4 and $-16.2 \pm 0.4 \text{ kJ mol}^{-1}$ for diester (monoanion) and monoester (dianion) respectively.

Thus the values of K^*_{T} are higher than the binding constants for diester, but smaller than those for monoester. The trend can be rationalized in terms of the binding modes shown in Chart 1. Both diester and monoester can form bidentate complexes with guanidinium and acetamidinium cations of structures like **1** and **2**.⁸ Stronger binding to the monoester can be attributed to the higher negative charge and basicity of the dianion. The transition state of the general base catalyzed reaction should have

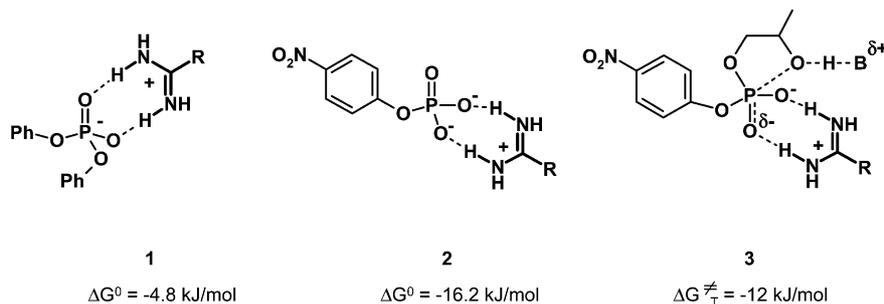


Chart 1

Table 3 Rate constants for buffer catalyzed transesterification of HPNP in 80% vol DMSO/D₂O at 37 °C^a

	$k_1/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_2/\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$	$k_1^{\text{H}}/k_1^{\text{D}}$	$k_2^{\text{H}}/k_2^{\text{D}}$
Guanidine	0.015(1)	1.10(5)	1.7(1)	1.5(1)
Acetamidine	$7.4(6) \times 10^{-4}$	0.037(2)	1.5(2)	1.4(1)
Piperidine	$9.7(8) \times 10^{-6}$	$1.4(1) \times 10^{-4}$	1.4(3)	1.2(2)

^a Values in parentheses are standard errors in the last significant digit.

a partially developed additional negative charge on the phosphoryl group, probably between -0.5 and -1 as follows from rather large Brønsted slope (eqn (5)), and so the total negative charge between -1.5 and -2 . Accordingly, its interaction with cations, schematically shown as **3**, should provide an intermediate binding free energy closer to that for **2**.

The question of possible proton transfer in the transition state can be addressed most properly by measuring the solvent isotope effect. For this reason the reaction kinetics with guanidine, acetamidine and piperidine were studied also in DMSO/D₂O (Fig. 1A, 4A and S1A). Rate constants k_1 and k_2 collected in Table 3 were calculated in the same way as in DMSO/H₂O (see Fig. 2; 4B and S3B). The solvent deuterium isotope effect about 1.5 for k_1 is within the limits typically observed for general acid–base catalyzed reactions.¹⁸ For the catalysis assisted by the protonated base somewhat smaller values of $k_2^{\text{H}}/k_2^{\text{D}}$ are observed, which are difficult to interpret. More definite conclusions were obtained by a proton inventory study.

The reaction in guanidine buffer was studied by the proton inventory method under conditions where the predominant reaction path is the reaction second-order in catalyst and an upward curved plot was obtained (Fig. 9). The fitting to the Gross–Butler equation $(k_n/k_0) = (1 - n + n\phi_1)(1 - n + n\phi_2)$, where n is the molar fraction of D₂O, gives two fractionation factors $\phi_1 = 0.48 \pm 0.04$ and $\phi_2 = 1.26 \pm 0.07$. The ϕ_1 can be attributed to the normal isotope effect of 2.08 due to the proton transfer to the base form of the buffer (B in the structure **3**), but the ϕ_2 corresponds to another proton partitioning with an inverse isotope effect. A possible source of it may be the isotope effect in guanidinium–phosphate binding. To test this hypothesis the association constants of guanidinium and acetamidinium cations with $(\text{PhO})_2\text{PO}_2^-$ were measured in 80% DMSO-d₆/D₂O (Fig. S4, Supporting Information) and their values indeed appeared to be larger than in DMSO-d₆/H₂O, Table 2. In particular, the isotope

effect for guanidinium $K_{\text{assoc}}^{\text{H}}/K_{\text{assoc}}^{\text{D}} = 0.76$ coincides in limits of errors with $1/\phi_2$.

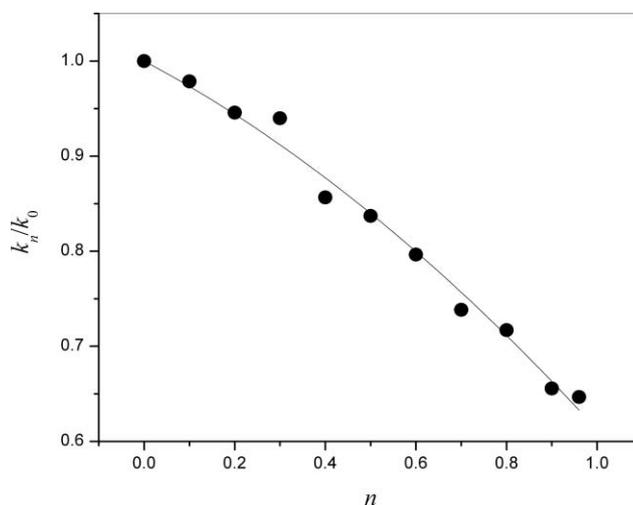
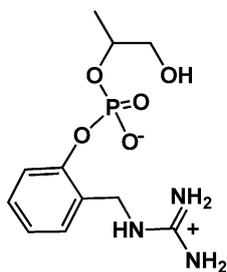


Fig. 9 The proton inventory for HPNP cleavage in 0.1 M guanidine buffer containing 40% free base.

Binding isotope effects are usually small and often neglected, however, recently significant inverse H₂O/D₂O solvent isotope effects were reported for binding of different guests to native and aminocyclodextrins attributed to changes in the hydration of components.¹⁹ The hydrogen bonding, which should contribute to guanidinium–phosphate ion pairing, can have both normal and inverse H/D isotope effects as was demonstrated for associations between phenol and different bases in CCl₄.²⁰ Independently of the nature of this binding isotope effect, the proton inventory confirms the absence of proton donation from guanidinium group to the transition state required for the true general acid catalysis. At the same time the proton inventory reported for a model substrate **4** with an intramolecularly acting guanidinium group showed the “bowl-shaped” profile of k_n/k_0 vs. n indicating two normal isotope effects for the transfer of two protons in the transition state.⁹ The authors have made a correction to the original paper stating that the reaction mechanism “is not well accepted to involve general-base catalysis”.²¹ Indeed, the cleavage of **4** was studied in water where the contribution of general base catalysis is negligible (see above) and the reaction should proceed as the alkaline hydrolysis through a mechanism involving a pre-equilibrium formation of the

neighboring alkoxide anion, which then attacks the phosphoryl group nucleophilically.^{12,22}



4

In this case the transition state will be dianionic and probably sufficiently basic to allow the proton transfer from guanidinium group. The second “proton transfer” for this mechanism will be actually a normal isotope effect in the acid dissociation constant of the alcohol group in **4** observed because the isotope effect was studied at constant pH/pD. It should be noted that this mechanism kinetically is indistinguishable from a mechanism involving a pre-equilibrium deprotonation of the guanidinium group with subsequent intramolecular general-base catalyzed reaction, although geometrically such a mechanism looks less probable.

It seems from the above analysis that the role of the guanidinium group in the transesterification of a phosphodiester with a good leaving group is the electrostatic catalysis when the reaction proceeds with general base assistance, but may be changed to proton transfer in the case of the hydroxide catalyzed reaction. For a phosphodiester with a poor leaving group the general base assisted reaction should involve a later transition state with a more developed negative charge making possible the proton transfer from the guanidinium group in addition to electrostatic catalysis. Such a dual role was proposed for Arg69 in the active site of phospholipase C, an enzyme mechanistically close to RNAase A.²³

Conclusion

A large number of bis(guanidinium) compounds and their analogs were described as transesterification catalysts for phosphodiesters with large effects observed mostly in anhydrous organic solvents.^{8,24} The results of this study demonstrate fairly efficient catalysis by simple monofunctional guanidinium and amidinium cations in a mixed highly polar medium of aqueous DMSO. Clean classical second-order “bell-shaped” kinetics of buffer catalysis are observed for the first time in the *trans*-esterification of an RNA model substrate. The catalysis is due to electrostatic stabilization of the anionic transition state rather than to the proton transfer because of insufficient basicity of the transition state of the general base assisted reaction. Interestingly, the inverse H/D solvent isotope effect is observed for the guanidinium–phosphate association. The situation may be different for substrates with non-activated leaving groups, which are currently under investigation in our laboratory. It is worth mentioning that aqueous DMSO appeared to be a convenient medium for study of reactivity of strongly basic catalysts without interference from alkaline hydrolysis.

Experimental

Materials

2-Hydroxypropyl 4-nitrophenyl phosphate (HPNP) was prepared as the barium salt according to the literature procedure.¹² Guanidinium, acetamidinium, benzamidinium and piperidinium chlorides, Me₄N(OH)·5H₂O, Bu₄N(OH) (1 M aqueous solution), Me₄NCl, D₂O (99.9% D), *p*-O₂NC₆H₄OPO₃Na₂ all from Aldrich, were used as supplied. DMSO (Baker) was purified by distillation over CaO. Aminoguanidine bicarbonate (Aldrich) was converted into chloride by treatment with concentrated HCl and subsequent re-crystallization from ethanol. Methylamine (40% in water) was converted in MeNH₃Cl *in situ* by addition of one equivalent HCl.

Potentiometry

Potentiometric titrations were performed in a 30 mL thermostatted cell kept under nitrogen at 37 ± 0.1 °C with 0.01 M Me₄NCl as background electrolyte. Experimental details and procedure for the electrode calibration were the same as in ref. 25 The program Hyperquad 2003²⁶ was used to calculate all equilibrium constants. Determinations of pK_a of buffer components were performed by titrating 5–10 mM solutions of protonated forms taken as chlorides. Determinations of association constants with *p*-O₂NC₆H₄OPO₃²⁻ were performed by titrations of 10 mM *p*-O₂NC₆H₄OPO₃H₂ (obtained by passing the sodium salt through a column with Amberlite IR-120H ion-exchange resin) alone and in the presence of 10 mM of guanidinium or acetamidinium chlorides.

Kinetics

Kinetic measurements were performed on a Hewlett-Packard 8453 diode array spectrophotometer equipped with a thermostatted cell compartment at 37 ± 0.1 °C. Reaction solutions were prepared by combining appropriate amounts of the chloride salt of protonated buffer component and tetraalkylammonium hydroxide stock solutions to the desired volume in 80% vol DMSO. Reactions were initiated by adding an aliquot of the substrate solution. Stock solutions of HPNP were freshly prepared in water and passed through Amberlite IR-120H ion-exchange resin to remove Ba²⁺ cation, which causes interference in aqueous DMSO.²⁷ The exact concentration of HPNP was determined from absorbance of *para*-nitrophenolate anion after complete hydrolysis by 0.1 M NaOH of an aliquot taken from the stock solution. The course of transesterification of HPNP was monitored spectrophotometrically by the appearance of 4-nitrophenolate anion at 420 nm. The observed first-order rate constants (*k*_{obs}) were calculated by the integral method from at least 90% conversion or, for slow reactions, from initial rates. No measurable salt effects with R₄NCl (R = Me, *n*-Bu) as electrolyte were observed in buffer catalyzed reactions, but as a precaution kinetic profiles were obtained at a constant 0.1 M ionic strength (0.15 M for methylamine).

NMR spectroscopy

³¹P NMR spectra were recorded on a Varian Gemini 300 NMR spectrometer.

Acknowledgements

Financial support by DGAPA-UNAM (project IN 203408) is gratefully acknowledged.

References and notes

- (a) R. T. Raines, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 1045–1065; (b) M. Oivanen, S. Kuusela and H. Lönnberg, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 961; (c) W. W. Cleland and A. C. Hengge, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 3252–3278.
- (a) R. Breslow and M. LaBelle, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 2655–2659; (b) E. Anslyn and R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 4473–4482; (c) R. Breslow, *Acc. Chem. Res.*, 1991, **24**, 317–324.
- D. M. Perreault and E. V. Anslyn, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1997, **36**, 432–450.
- M. Kosonen, E. Yousefi-Salakdeh, R. Strömberg and H. Lönnberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1998, 1589–1595.
- (a) A. J. Kirby and R. E. Marriott, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2002, 422–427; (b) C. Beckmann, A. J. Kirby, S. Kuusela and D. C. Tickle, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1998, 573–581.
- M. M. Kreevoy and E. H. Baughman, *J. Phys. Chem.*, 1974, **78**, 421–423.
- Z. Pawlak and R. G. Bates, *J. Solution Chem.*, 1975, **4**, 817–829.
- D. M. Perreault, L. A. Cabell and E. V. Anslyn, *Bioorg. Med. Chem.*, 1997, **5**, 1209–1220.
- A. M. Piatek, M. Gray and E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 9878–9879.
- C. J. Fahrni and T. V. O'Halloran, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 11448–11458.
- (a) F. Avenier, J. B. Domingos, L. D. Van Vlie and F. Hollfelder, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 7611–7619; (b) E. R. Farquhar, J. P. Richard and J. R. Morrow, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 7169–7177; (c) S. E. Bunn, C. T. Liu, Z.-L. Lu, A. A. Neverov and R. S. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 16238–16248; (d) S. Takebayashi, S. Shinkai, M. Ikeda and M. Takeuchi, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 493–499.
- D. M. Brown and D. A. Usher, *J. Chem. Soc.*, 1965, 6558–6564.
- A. M. Davis, A. D. Hall and A. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 5105–5108.
- (a) D. M. Kneeland, K. Ariga, V. M. Lynch, C. Huang and E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 10042–10055; (b) K. Ariga and E. V. Anslyn, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 417–419.
- (a) J. L. Kurz, *Acc. Chem. Res.*, 1972, **5**, 1; (b) J. L. Kurz, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 987.
- P. Gómez-Tagle, I. Vargas-Zúñiga, O. Taran and A. K. Yatsimirsky, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 9713–9722.
- (a) M.-Y. Yang, J. R. Morrow and J. P. Richard, *Bioorg. Chem.*, 2007, **35**, 366–374; (b) G. Feng, J. C. Mareque-Rivas, R. Torres Martin de Rosales and N. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 13470.
- (a) K. B. Schowen, H.-H. Limbach, G. S. Denisov and R. L. Schowen, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, **1458**, 43–62; (b) C. D. Bryan, K. B. Schowen and R. L. Schowen, *Can. J. Chem.*, 1996, **74**, 931–938.
- M. V. Rekharsky and Y. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 12361–12371.
- S. Singh and C. N. R. Rao, *Can. J. Chem.*, 1966, **44**, 2611–2615.
- A. M. Piatek, M. Gray and E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 4551–4551.
- D. A. Usher, D. I. Richardson and D. G. Oakenfull, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**, 4699–4712.
- (a) R. J. Kubiak, X. Yue, R. J. Hondal, C. Mihai, M.-D. Tsai and K. S. Bruzik, *Biochemistry*, 2001, **40**, 5422–5432; (b) C. Mihai, A. V. Kravchuk, M.-D. Tsai and K. S. Bruzik, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 3236–3242.
- (a) V. Jubian, R. P. Dixon and A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 1120–1121; (b) V. Jubian, A. Veronese, R. P. Dixon and A. D. Hamilton, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1995, **34**, 1237–1239; (c) Joseph Smith, Katsuhiko Ariga and Eric V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 362–364; (d) T. Oost, A. Filippazzi and M. Kalesse, *Liebigs Ann. Recl.*, 1997, 1005–1011; (e) H. H. Zepik and S. A. Benner, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 8080–8083; (f) U. Scheffer, A. Strick, V. Ludwig, V. S. Peter, E. Kalden and M. W. Göbel, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 2211–2217 (and references therein).
- I. Sánchez-Lombardo and A. K. Yatsimirsky, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 2514–2525.
- P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, *Talanta*, 1996, **43**, 1739–1753.
- O. Taran, F. Medrano and A. K. Yatsimirsky, *Dalton Trans.*, 2008, 6609–6618.