



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ACTIVIDAD TIPO AMIDASA DE α -NUCLEÓFILOS

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M.C. Baldomero Gómez Reyes



TUTOR: Dr. Anatoly K. Yatsimirsky

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por la beca otorgada, No. de registro 60227, para la realización de este trabajo de tesis doctoral.

Al jurado asignado, por el tiempo dedicado en la revisión de este trabajo, y cuyas sugerencias y observaciones permitieron una mejor versión de la tesis.

Al Departamento de Resonancia Magnética Nuclear de la Unidad de Servicios Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química UNAM, por su curso para el manejo del equipo Varian Unity INOVA de 300 MHz, así como el tiempo designado para la adquisición de los espectros y que representan una parte considerable de este trabajo.

El trabajo fue presentado en la 224th ACS National Meeting and Exposition celebrada en Boston, MA, Agosto 18-22, 2002.

Y en la XXXVIth International Conference on Coordination Chemistry realizada en Mérida Yucatán del 18 al 23 de julio de 2004.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 213 del Departamento de Química Inorgánica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Índice

Introducción.....	1
1. Antecedentes.....	8
Propiedades del enlace amídico.....	8
Coordinación de amidas.....	10
Mecanismos de hidrólisis en ausencia de iones metálicos (ácida, básica, general, específica)	14
Hidrólisis de amidas.....	16
Hidroxilaminólisis no catalítica de amidas.....	20
Catálisis con iones y complejos metálicos en la hidrólisis de amidas.....	24
El ion Zn(II) en la hidrólisis de amidas.	33
α -nucleófilos.....	49
Metaloenzimas.....	54
Carboxipeptidasa A.....	57
2 Objetivos.....	59
3 Parte experimental.....	61
Reactivos.....	61
Instrumentos y programa de análisis de datos.	61
Reacciones de hidroxilaminólisis.....	62
Reacciones de peroxidólisis.....	64
Modificación de amidas.....	66
Lista de sustratos usados y su estructura.....	67

4 Resultados y discusión	70
Hidroxilaminólisis sin iones metálicos.....	70
Cinéticas de la hidroxilaminólisis en la presencia de iones metálicos.....	81
Hidroxilaminólisis con iones metálicos coordinados.	90
Ensayos con otros péptidos.....	94
Análisis de productos por RMN.....	99
Hidroxilaminólisis de amidas modificadas.....	105
Peroxidólisis de amidas.....	109
5 Conclusiones.....	123
6 Apéndices.....	125
A.- Ecuación 4.2 (pág 75) propuesta por Jenck y Guilchrist para la hidroxilaminólisis de formamida.....	125
B.- Ecuación 4.3 (pág. 77) modelo propuesto en este trabajo para la hidroxilaminólisis de derivados de la glicina.	127
C.- Ecuación 4.4 (pág. 87), Michaelis-Menten, para la hidroxilaminólisis con iones metálicos.	129
D.- Ecuación 3.4 propuesta por Yatsimirsky A.K. y Mejía-Radillo Y. para la constante de desprotonación básica del peróxido de hidrógeno.....	131
E.- Ecuación modificada para la hidroxilaminólisis de la glicinamida en la forma ácida.	133
F.- Ecuación modificada para la hidroxilaminólisis de las formas neutras y aniónicas de los sustratos glicilglicina y triglicina.	135
7 Bibliografía.....	137
Artículos publicados.....	142

Introducción

Las amidas al igual que los ésteres y nitrilos, son considerados derivados de los ácidos carboxílicos, sus procesos de hidrólisis y de hidratación han atraído la atención debido a su importancia en los sistemas biológicos y en la industria. Así por ejemplo, la hidratación de acrilonitrilo es el proceso industrial más común para la preparación de acrilamida.^[1] Dentro de los sistemas biológicos, el grupo más importante donde podemos encontrar enlaces amídicos es el de las proteínas, su hidrólisis es una reacción usada para la producción de aminoácidos. A su vez éste mismo proceso puede servir como método analítico en la determinación de las secuencias de esas entidades fundamentales biológicas en proteínas y péptidos y para estudios de las interacciones de proteínas con otras moléculas biológicas.

No obstante, los métodos de análisis de proteínas generalmente requieren condiciones de reacción muy severas; por ejemplo en la determinación de la composición de una proteína (cantidades y tipos de aminoácidos que la constituyen) se emplean HCl 6N, temperatura de 110°C e incubación en un tubo sellado durante 24 h, es decir un medio de reacción energético y prolongado, el método tiene además la desventaja de destruir triptofano.^[2] La hidrólisis de péptidos puede realizarse también en medio alcalino usando para ello hidróxido de bario, sin embargo en éste sistema de reacción se destruyen algunos aminoácidos como son arginina, cisteína, serina y treonina.^[2]

El método más usado para la determinación de las secuencias de aminoácidos es el propuesto por Pehr Edman, el cual consiste en hacer reaccionar al péptido con fenilisotiocianato en un medio débilmente básico. El método requiere forzosamente que el sustrato tenga una amina terminal (terminal N) y sólo es usado para péptidos pequeños.^[2]

Puede verse que las amidas tienen una estabilidad muy grande, incluso en muchos de los casos su hidrólisis no catalizada a temperatura ambiente y pH cercano a 7 se lleva a cabo en decenas o hasta cientos de años o incluso en miles de años.^[3] Los dipéptidos N-acetilglicil-glicina

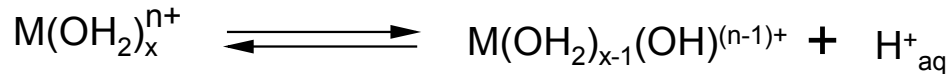
Un número creciente de estructuras cristalinas proteicas, han proporcionado evidencia sólida de que para muchas nucleasas y para algunas peptidasas los iones metálicos son cofactores esenciales y están directamente relacionadas con la hidrólisis de fosfodiésteres o enlaces amido respectivamente. Además, en la mayoría de las metalo-hidrolasas las cadenas laterales de aminoácidos están involucradas en la transformación del sustrato participando ya sea como ácidos generales, como bases o como nucleófilos. Consecuentemente, la gran eficiencia catalítica es, en parte, el resultado de una perfecta cooperación coordinada del ion metálico y uno o más grupos funcionales orgánicos.^[2]

El estudio estructural de las enzimas se realiza en estado sólido y difiere del medio líquido de los sistemas biológicos donde se encuentran realizando su tarea. Resulta complicado estudiar el funcionamiento de las enzimas bajo estas condiciones dado el tamaño de las mismas, de manera que el diseño y aplicación de enzimas artificiales de bajo peso molecular que funcionen como nucleasas y/o peptidasas es relevante desde varios puntos de vista. Primero, es más fácil el estudio de las propiedades mecanísticas sobre un sistema modelo simple que sobre la propia enzima. Los modelos pueden proporcionar invaluable información para el entendimiento de la química involucrada en el sitio activo. Segundo, en vista de las aplicaciones bioquímicas hay un interés sustancial en las peptidasas artificiales las cuales son más pequeñas y con mejor disponibilidad que las enzimas propias.^[6]

Debe considerarse también la aplicación de tales agentes químicos como fármacos para el control selectivo de la expresión genética, esto es por ejemplo que puedan servir como agentes que controlen algunas enfermedades, o puedan restringir el efecto de venenos o de toxinas, o que impidan el desarrollo de células anómalas. Así mismo, las peptidasas artificiales pueden ser útiles en la elucidación de la estructura de proteínas como también en la secuenciación de proteínas grandes.^[7]

Para la hidrólisis de amidas en condiciones suaves los iones y complejos metálicos son los reactivos más eficientes no enzimáticos disponibles. Sin embargo, ellos no alcanzan la eficiencia catalítica de las enzimas y en vista de las aplicaciones las grandes reactividades serian deseables. La funcionalización de complejos metálicos con grupos orgánicos auxiliares es una estrategia para generar peptidasas artificiales más eficientes.

Los cationes hidratados, especialmente aquellos iones de carga 4+, 3+, y 2+, actúan como ácidos de Lewis en disolución. A nivel elemental su comportamiento puede ser adscrito a la influencia de la carga positiva del ion metálico que facilita la pérdida del protón del agua coordinada. Aun en disolventes no acuosos los cationes hidratados pueden comportarse de manera similar.



El agua coordinada tiene un pK_a menor que el agua libre, donde el átomo de oxígeno dona un par de electrones al ion metálico adquiriendo éste carga positiva. Bajo estas condiciones un protón se libera fácilmente y como consecuencia, la nucleofilia del agua disminuye respecto del agua libre debido a la disminuida carga electrónica sobre el átomo de oxígeno, sin embargo, puede existir una considerable concentración de las especies M-OH en disolución neutra. Aunque el hidróxido coordinado no es tan buen nucleófilo como el propio ion HO^- libre, es mucho mejor que el agua.^[8]

Con base a cálculos de orbitales moleculares el orden de nucleofilia para las especies derivadas del disolvente se puede resumir como sigue:



Por lo tanto, a un pH neutro o ligeramente alcalino, la pequeña disminución en la eficiencia de los iones hidróxido coordinados, en comparación con los libres, está más que compensada por la mayor concentración de las especies reactivas disponibles.^[9]

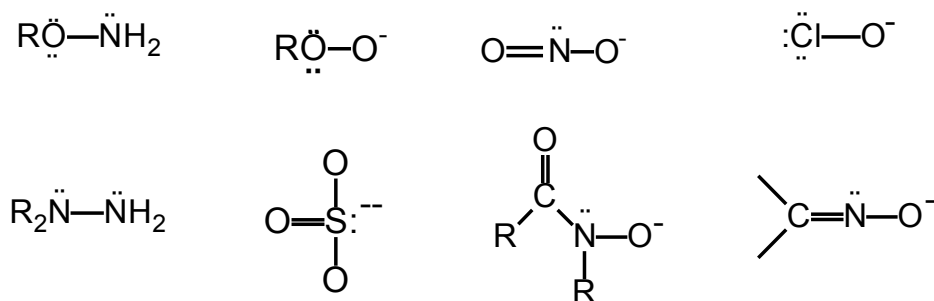
El pK_a del agua coordinada a complejos metálicos está controlada por el número de coordinación y por la carga total del complejo, en el sentido de que disminuye con la disminución del número de coordinación y con el incremento de la carga positiva, esto es, si el ion metálico tiene una carga positiva mayor atraerá hacia sí con mayor fuerza el par de electrones libres del oxígeno disminuyendo con ello el valor del pK_a .

El efecto de ligantes coordinados sobre la acidez de las moléculas de agua coordinada puede ser relacionado con el proceso de atracción o liberación de electrones, es decir se relaciona con la basicidad del ligando. Estos efectos pueden ser transmitidos hacia o a través del catión

metálico, en tanto, la facilidad de transmisión dependerá de las propiedades del catión como la configuración electrónica y la disponibilidad de orbitales apropiados.

Se sabe que el reemplazo de ligandos unidentados por análogos quelantes, especialmente macrociclos, permite una acidez más pronunciada para las moléculas de agua coordinada. La explicación se da en términos de los diferentes atributos de solvatación en las posiciones de puente de los ligandos, los cuales en general son hidrofóbicos, y de los efectos inductivos y de campo.^[10]

Otro aspecto a considerar en el proceso de ruptura de péptidos, es el tipo de nucleófilos usados. Todos los sistemas antes mencionados utilizan como nucleófilo agua o hidróxido. Por otro lado, para aplicaciones prácticas el tipo de nucleófilo no es importante. En éste aspecto llaman la atención los nucleófilos entre los que destacan por su reactividad los denominados α -nucleófilos. La característica principal de estas especies, es la existencia de un átomo con pares de electrones libres en posición adyacente al átomo donador, como lo muestran los siguientes dibujos:



Las reacciones de los α -nucleófilos tienen constantes de velocidad mayores que las esperadas para nucleófilos con valores de pK_a similares, de manera que en un gráfico del tipo de Brønsted se verán como desviaciones positivas de la ecuación lineal que relaciona a esas dos magnitudes. En otras palabras, los α -nucleófilos presentan una alta nucleofilia anormal relativa a sus basicidades.^[11]

Aprovechando las similitudes estructurales que tienen las amidas con los ésteres, estos últimos se han usado ampliamente en el estudio de la hidrólisis (en términos generales en el estudio de la sustitución nucleofílica) de los derivados carboxílicos. Sin embargo, las amidas son cientos de veces menos reactivas que los ésteres. A manera de ejemplo, tenemos que las constantes de velocidad a 25°C de temperatura para la hidrólisis alcalina de los reactivos metil-acetato, acetamida y N,N-dimetilformamida son: 1.5×10^{-1} , 7.4×10^{-5} y $1.8 \times 10^{-4} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

respectivamente. ^{[12], [3]} Alternativamente, para los estudios de hidrólisis se han usado amidas activadas, no obstante, cuando los mismos sistemas se aplican a especies de interés, esto es, sobre amidas no activadas, los resultados son nulos o poco alentadores.

Por lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se propuso imitar la actividad enzimática en procesos de ruptura de amidas no activadas y péptidos sencillos, haciendo uso de iones metálicos y algunos de sus complejos, junto con la colaboración de nucleófilos con efecto α en un medio de reacción acuoso.

Los estudios realizados comprendieron la medición de la cinética de las reacciones en función del pH, de la concentración del nucleófilo, de la concentración del ion metálico sin coordinar y coordinado a algunos ligantes aminados, así como estudios en función de la temperatura. En particular se usaron los nucleófilos hidroxilamina (NH_2OH) y peróxido de hidrógeno, y los iones metálicos usados tuvieron un estado de oxidación (II).

Nuestros estudios cinéticos para la reacción de hidroxilaminólisis, o reacción de sustitución usando hidroxilamina como nucleófilo, mostraron que existe una contribución catalítica ácido-específica, ácido-general y básico-general principalmente, siendo predominante la primera de las tres. El estudio en función del pH manteniendo constantes las concentraciones de los sustratos y la hidroxilamina, presenta un perfil en forma de campana con un máximo que corresponde al pK_a del nucleófilo, lo que representa una participación importante de la especie catiónica NH_3OH^+ .

Para las reacciones en las que se involucra algún ion metálico encontramos que el Zn(II) es el que presenta el efecto catalítico más significativo, así, en la presencia de 0.03M de Zn(II) y 1M de NH_2OH la ruptura de glicilglicina (GG) se lleva a cabo 10^4 veces más rápido que la hidrólisis no catalizada y 10^2 veces más rápido que la hidrólisis catalizada por Zn(II) y Cu(II). El mecanismo involucra la coordinación del ion metálico al grupo α amino del sustrato y el ataque nucleofílico de la NH_2OH asistida por OH^- sobre el enlace sustrato. El resultado final de la hidroxilaminólisis catalizada por Zn(II) es la *ruptura hidrolítica*, es decir la transformación del sustrato a ácido hidroxámico y de éste a ácido carboxílico.^[13]

Para las reacciones con H_2O_2 como nucleófilo ($\text{pK}_a=11.5$) en medio básico observamos que el anión hidroperóxido rompe amidas no activadas y péptidos a pesar de que

es completamente inactivo hacia éster etílico. La ruptura por HO_2^- procede más rápido que por OH^- e involucra rutas adicionales con asistencia de catálisis ácida-general por H_2O_2 , y asistencia básica-general por OH^- y HO_2^- .

Comparativamente hablando, la reactividad absoluta de HO_2^- asistida por H_2O_2 es substancialmente mayor que aquélla de NH_2OH asistida por NH_3OH^+ : la constante de velocidad de tercer orden para el último con el anión GG es de $2.9 \times 10^{-4} \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$ a 60°C , mientras que para el primero es $k_{\text{GA}} = 3.9 \times 10^{-4} \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$ a 37°C .^[14]

Debe subrayarse que en éste trabajo empleamos sustratos sencillos, tales como amidas de amino ácidos o péptidos, sin embargo no activados, con reactividad intrínseca baja y típica para los sistemas blanco biológicos. A pesar de una dificultad mucho mayor del trabajo experimental con estos sistemas comparando con los llamados sistemas modelo, los resultados obtenidos son mucho más relevantes para una posible aplicación práctica de los procesos desarrollados.

1 Antecedentes

Propiedades del enlace amídico

El enlace amídico o peptídico es la unidad estructural primaria de la cadena de polipéptidos de las proteínas. El enlace peptídico surge de la condensación de dos aminoácidos y el producto de tal condensación es referido como un dipéptido.

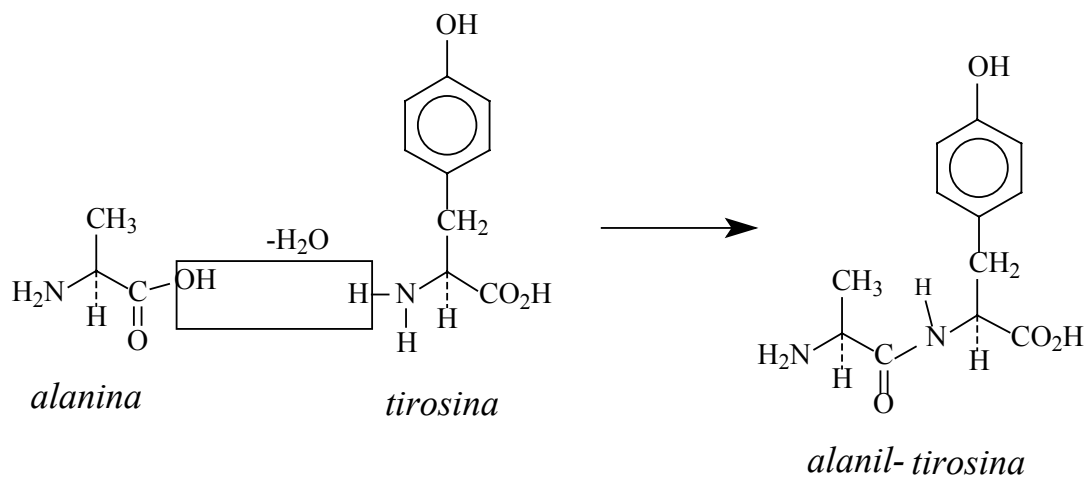


Figura 1.1 Formación de un dipéptido a partir de dos aminoácidos

Un tercer amino ácido puede condensarse con el dipéptido para formar un tripéptido, un cuarto para formar un tetrapéptido y así todas las demás combinaciones. El nitrógeno tetraédrico de la amina del aminoácido con $\text{pK}_a \approx 10$ pierde su basicidad ante la reacción de condensación en el enlace amido. ^[15]

Por difracción de rayos X, para la mayoría de las amidas se tiene que la longitud del enlace C-O es de 1.23-1.24 Å y para C-N es de 1.32-1.34 Å. Por comparación con cetonas análogas, las longitudes de enlace C-O están comprendidas entre 1.21 y 1.23 Å y las correspondientes a enlaces C-N para aminas alifáticas son 1.45 a 1.47 Å. Se puede ver que el enlace C-O de la amida es más

largo y el enlace C-N más corto respectivamente de lo esperado. Este fenómeno puede ser explicado mediante una estructura de resonancia donde el sistema π se encuentra deslocalizado entre los tres átomos O-C-N.

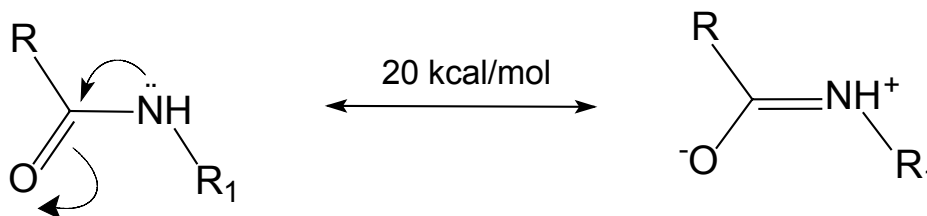


Figura 1.2 Estructuras de resonancia para el enlace amídico.

A partir de las longitudes de enlace observadas, se puede decir que el enlace peptídico tiene un 60% de carácter N-C=O y 40% de O-C=N, este último 40% resulta en aproximadamente 20 kcal/mol de energía de estabilización por resonancia del péptido. ^[16] Al mismo tiempo, esta característica impone una fuerte barrera energética a la rotación alrededor del eje C-N, de ahí que los 6 átomos asociados a la unidad peptídica presentan un arreglo plano. La estabilidad del enlace en amidas y péptidos está asociada a su geometría plana y ésta limita los posibles conformeros que la cadena del péptido pudiera adoptar. El porcentaje de desviación del mejor plano a través de los 6 átomos es de 0.02 Å, o menos.

En fase gaseosa las amidas tienen sus enlaces C-O más cortos (1.22 Å) y los enlaces C-N más largos (1.38 Å) que en la fase sólida, este es un fenómeno también consistente con una contribución sustancial de la separación de cargas de la forma resonante de la amida. Cuando la constante dieléctrica del medio se incrementa, la forma resonante con separación de cargas se vuelve más importante y el enlace C-O incrementa su carácter de sencillo, en tanto el enlace C-N gana más carácter de doble. ^[17]

El carácter parcialmente doble del enlace C-N es también responsable de la rigidez de la estructura plana de la amida. Además, para amidas terciarias, la suma de los ángulos de enlace alrededor del nitrógeno da un valor de 360°, consistente con una amida de estructura plana.

Para estructuras del tipo N-alquilacetamida, la gran barrera de rotación crea la posibilidad de dos rotámeros, donde el grupo alquilo se encuentra ya sea *cis* o *trans* al oxígeno, véase la fig.1.3.



Figura 1.3 Rotámeros para la N-metilacetamida

De un total de 107 estructuras examinadas, en todas se encontró que el grupo alquilo estaba en posición *cis* al oxígeno y nunca *trans*. A partir de cálculos de mecánica molecular (MM3) se ha encontrado que para la N-metilacetamida, la forma *cis* es 2.94 kcal/mol más estable que la estructura *trans*.^[18]

Coordinación de amidas

Como ya se mencionó, en la amidas ambos enlaces C-N y C-O poseen una cantidad comparable de carácter doble y sencillo, lo que resulta en una apreciable deslocalización de la carga negativa sobre el átomo de oxígeno del carbonilo de la amida. Así, se espera una interacción predominante de los iones metálicos y H^+ sobre el átomo de oxígeno en una amida neutra.^[19]

Para que el nitrógeno amídico pueda coordinarse a un ion metálico es necesario su desprotonación, lo cual sólo ocurre hasta una concentración de OH^- superior a 1M, pK_a 15.^[20] El grupo amídico también es una base muy débil llevando a cabo la protonación sólo en medio ácido 1M, p. Ej. La N-metilacetamida tiene un pK_a de -0.7. Se puede decir que las amidas son neutras en el intervalo de pH de 0 a 14.

La figura 1.4 resume el equilibrio de protonación de amidas ordinarias. Cerca de las flechas aparece el valor aproximado del logaritmo de la constante de equilibrio. Del lado izquierdo corresponde a un medio fuertemente básico, en el centro un medio neutro y de lado derecho un medio ácido.

El número 7 de la flecha descendente del lado derecho indica que la constante del equilibrio tautomérico favorece la protonación del O sobre el N de la amida en un factor de 10^7 , lo que significa una interacción predominante de los iones metálicos y protón sobre el átomo de oxígeno en una amida neutra. [21]

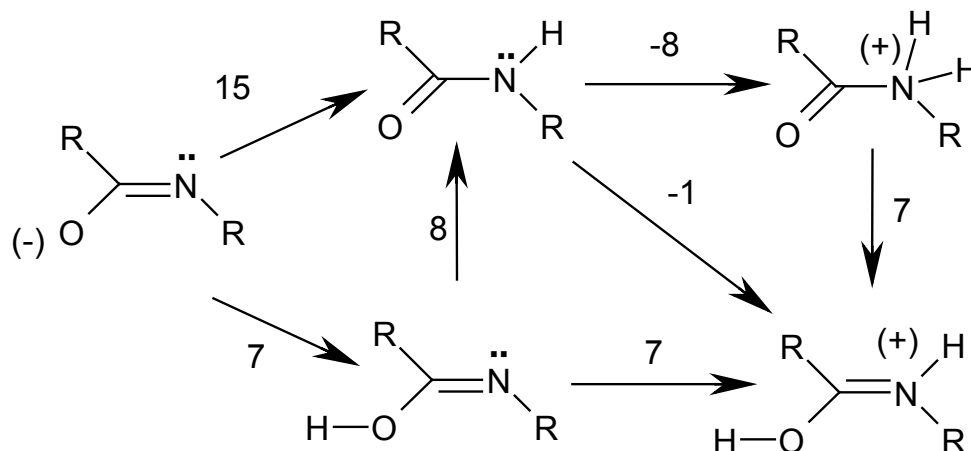


Figura 1.4.-Equilibrio protónico en el grupo amida con logaritmos de la constante de protonación representativos cerca de las dos flechas horizontales y las tres diagonales. Y logaritmo de las constantes de equilibrio tautomérico en la dirección favorecida en las dos flechas verticales. A la izquierda se encuentran las especies en medio fuertemente básico, arriba en el centro pH de 0 a 14, y disoluciones fuertemente ácidas abajo a la derecha.

La interacción del oxígeno del carbonilo de la amida con ácidos de Lewis es muy débil debido a que su basicidad es pequeña, el pK_a es de -1 . El intercambio de un protón de la amida por un ion metálico podría proporcionar un enlace más fuerte pero habría una fuerte competencia entre ambas especies positivas debido a la fuerte basicidad del nitrógeno desprotonado de la amida ($pK_a \approx 15$). Un ejemplo bien conocido es la reacción de Biuret donde un catión de Cu^{2+} intercambia un protón del nitrógeno de amida en pH fuertemente básico. [20] Las amidas simples en estado neutro forman aductos débiles entre el ion metálico y el oxígeno, mientras que la sustitución de un hidrógeno de amida y la coordinación en el nitrógeno de amida ocurre raramente en disoluciones neutras.

La extensión de las interacciones de los iones metálicos se puede incrementar mediante el aseguramiento inicial del ion metálico. El ion se puede anclar en aminas terminales formando un anillo quelato de cinco miembros con el primer oxígeno amídico. Después que el ion metálico se coordina a la amina terminal, existe la posibilidad de una interacción más

fuerte mediante la desprotonación del nitrógeno de la amida. Por ejemplo, la glicilglicina en presencia de Cu(II) presenta un perfil pH-velocidad en forma de campana con máximo a 4.2 - 4.4, pH que corresponde al punto medio de titulación para la generación del complejo de Cu tricoordinado que contiene amida desprotonada. ^{[22], [23]} En cambio con el mismo sustrato y en la presencia de Zn(II) no se observa la desprotonación del nitrógeno de la amida.

Los iones metálicos capaces de desplazar un protón con un valor típico de pK_a para la pérdida del protón de amida en paréntesis y en orden decreciente de la fortaleza del enlace del nitrógeno de amida-ion metálico son: Pd^{2+} (<2)> Cu^{2+} (4)> Ni^{2+} (8) > Co^{2+} (10). Estos valores son significativamente menores al valor de $pK_a \approx 15$ para la desprotonación del nitrógeno peptídico en el ligando libre. ^{[20], [24]}

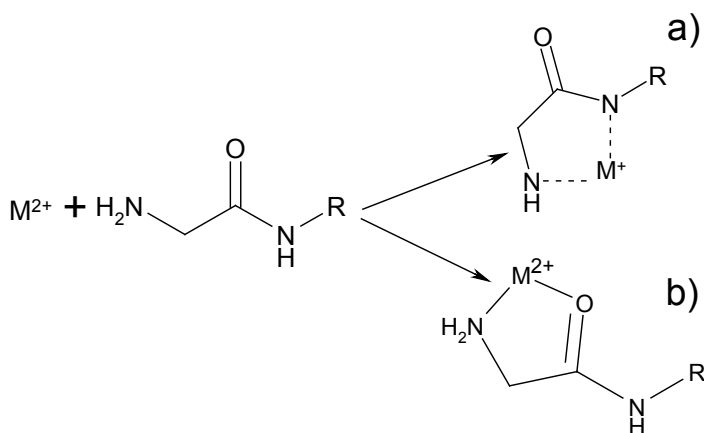
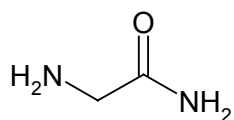


Figura 1.5 A valores de $pH \cong 10$ los iones metálicos Pd(II), Cu(II), Ni(II) y Co(II) son capaces de coordinarse al nitrógeno amídico por desplazamiento del protón, estructura a). En tanto que Zn(II) en las mismas condiciones de reacción se coordina con la amida como lo muestra la estructura b).

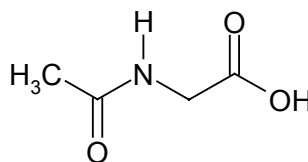
A pesar de que el Zn(II) no logra desprotonar a la amida de los oligopéptidos de glicina sino hasta un $pH > 10$ donde ya hay competencia por la formación del hidróxido metálico, si es capaz de provocar tal efecto en glicilhistidina a un pH de 7. ^{[25], [26]} Vemos entonces que con este ion metálico el proceso de desprotonación de amida sucede con sustratos con buenos grupos coordinantes como lo es el imidazol de la histidina.

Los péptidos pueden tener extremos con grupos amino o bien con grupos carboxilo, ambos grupos difieren marcadamente en su utilidad como grupos ligandos en la interacción de

iones metálicos y grupos amídicos. Los compuestos modelo más simples son glicinamida, amino terminal, y N-acetilglicina para la terminación en carboxilato.



glicinamida



N-acetilglicina

La N-acetilglicina actúa como ligando unidentado a través del grupo carboxilato. El ligando es un ácido débil con $pK_a = 3.4$, y la constante de estabilidad para su complejo con Cu(II) es pequeña $\log K_{CuL}^{Cu} = 1.3$. La constante de estabilidad es similar a aquella para formiato cuya basicidad también es comparable. [27]

La glicinamida quelata débilmente al ion metálico a través del grupo amino y el oxígeno del carbonilo, sin embargo como puede esperarse de lo dicho arriba ocurre una coordinación más fuerte cuando se sustituye el hidrógeno del nitrógeno de amida por algún ion metálico, en particular con Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pd^{+2} . La reacción anterior, cuando Cu^{2+} es el ion metálico, ocurre en disoluciones neutras ($pK_a = 7.0$) y cuando es Ni^{2+} en disoluciones más básicas. [28]

Se puede establecer que un péptido amino terminal formará un quelato de 5 miembros con algún ion metálico y que otro terminado en carboxilo sólo tendrá coordinación mediante el oxígeno de carboxilato donde además será difícil un enlace extra con el nitrógeno de la amida pues resultaría en un desfavorable quelato de 7 miembros.

Las diferentes capacidades de los iones metálicos para desplazar el protón de amida procuran diferentes estructuras y estequiometrías al momento de la coordinación. Por ejemplo, para el caso de Cu^{2+} y los diferentes oligómeros de la glicina encontramos estructuras tetragonales y estequiometría 1:1, p. Ej. para la diglicina el Cu^{2+} es coordinado por la amina, el nitrógeno de amida desprotonado y el carboxilato, la cuarta posición puede estar coordinada a algún nucleófilo. En cambio con Ni^{2+} y el mismo sustrato la estequiometría es 1:2 y el sólido es azul, paramagnético y hexacoordinado. [29]

Cuando el sustrato es triglicina, Cu^{2+} mantiene su estructura tetragonal y el complejo tiene un nitrógeno de amida más desprotonado y coordinado al ion metálico. Ni^{2+} en cambio presenta una estructura plana y el complejo es amarillo diamagnético y hexacoordinado.

El ion Zn^{2+} en pH mayor a 4, se coordina a los derivados de glicina a través de la amina y el carbonilo de la amida formando un anillo quelato pentagonal. La constante de estabilidad ($\log K = 3.1$) es considerablemente menor que aquéllas para Cu^{2+} y Ni^{2+} (5.55 y 4.0 para los complejos con diglicina, respectivamente), sin embargo es comparable a aquélla para Co^{2+} el cual si provoca la desprotonación de la amida a un pH cercano a 10. En el caso de Co^{2+} sucede la desprotonación debido a la estabilización del campo ligando. Además para los bis dipéptidos complejos hay una estabilización adicional para Co^{2+} debida a la conversión a un estado de bajo espín. ^[30]

Mecanismos de hidrólisis en ausencia de iones metálicos (ácida, básica, general, específica)

La hidrólisis de anhídridos, ésteres y amidas de ácidos carboxílicos directamente con moléculas de agua como nucleófilo (llamada hidrólisis “neutra” o “acuosa”), sucede con velocidad detectable a temperatura ambiente únicamente para sustratos muy activados, tanto por la parte acídica (por ejemplo, derivados del ácido trifluoroacético) como por parte del grupo saliente (anhídridos, ésteres nitrofenílicos).

La hidrólisis de sustratos menos activados puede llevarse a cabo con la participación de H^+ y/o con OH^- , a lo que se denomina *hidrólisis ácido-base específica*. También es posible que otras especies puedan participar como ácidos o como bases, esto es por ejemplo: iones metálicos, ambos componentes de las disoluciones amortiguadoras (buffer), ácidos y bases de Brønsted y en general ácidos y bases débiles; en tal caso se habla de una *hidrólisis ácido-base general*. ^[31]

Los ácidos y bases generales se pueden designar como BH^+ y B , si los términos $[BH^+]$ y $[B]$ están presentes en la ley de velocidad, entonces invariablemente se presentará también la hidrólisis catalizada por las especies H^+ y OH^- . Por consiguiente la constante de velocidad aparente queda expresada por la ecuación 1.1:

$$k = k_0 + k_H[H^+] + k_{OH}[OH^-] + k_{BH}[BH^+] + k_B[B] \quad (1.1)$$

en donde k_0 es el término debido al disolvente (hidrólisis acuosa). ^[32]

Los primeros términos también pueden representar catálisis ácida o básica general, en donde el disolvente, el ion H^+ y el ion hidróxido estén actuando como ácidos o como bases generales. Si este es el caso la expresión anterior se reduce a la forma:

$$k = \sum_i k_{BH_i^+} [BH_i^+] + \sum_j k_{B_j} [B_j] \quad (1.2)$$

Un concepto esencial en la catálisis ácido-básica es que tanto un ácido como una base deben hallarse presentes. No es suficiente la protonación de la molécula del sustrato para que tenga lugar una catálisis ácida efectiva. Además el protón debe eliminarse del intermediario de reacción en alguna etapa con una base (en muchos casos el disolvente).^[33]

Dentro de la catálisis ácido-base general el proceso de transferencia protónica puede llegar a ser importante en el estado de transición, como lo es en la enolización de la acetona. Sin embargo para los grupos acilo y carbonilo la transferencia del protón no es la mayor barrera de energía de la reacción. En estas reacciones el catalizador asiste a la reacción mediante la remoción de un protón de un grupo atacante o agregando un protón al grupo carbonilo o al grupo saliente, y la principal barrera de energía está dada por la formación o ruptura del enlace entre átomos pesados y el carbono, mejor que la propia transferencia del protón.^[33]

La eficiencia de la catálisis ácida o básica general es proporcional a la fortaleza del catalizador y la pendiente de un gráfico del logaritmo de la constante de velocidad contra pK_a de una serie de catalizadores es una medida de la sensibilidad de la reacción a la fortaleza del ácido o base que intervienen en la hidrólisis. Ambos logaritmos de las constantes están relacionadas linealmente con los cambios de energía libre, por lo tanto son relaciones lineales de energía libre (LFERs, del inglés “*linear free energy relationships*”).

$$k_A = G_A K_a^\alpha ; \quad \dots (1.3)$$

$$k_B = G_B (1/K_a)^\beta \quad \dots (1.4)$$

Las mismas ecuaciones escritas en forma linealizada:

$$\log k_A = \log G_A - \alpha pK_a; \quad \dots (1.5)$$

$$\log k_B = \log G_B + \beta pK_a \quad \dots (1.6)$$

Para una determinada reacción G_A y G_B son constantes.

Estas ecuaciones son las llamadas *relaciones de Brønsted* y los parámetros α y β son los *parámetros de Brønsted*.

Tomando como ejemplo el coeficiente α , se puede decir que la relación de Brønsted compara la energía libre de un equilibrio para la transferencia completa del protón con la energía libre de formación de un estado de transición el cual involucra la transferencia parcial del protón. Los límites para este proceso y por lo tanto para α y β quedan comprendidos entre 0 y 1.

Un valor negativo de α significa que con el incremento de la fuerza ácida resulta en una actividad catalítica decrecida, lo cual es inconsistente con la noción de que la catálisis ácida es un fenómeno de transferencia protónica. [34]

La desviación de la relación implica que diferentes efectos, los cuales afectan a las energías libres de las reacciones, no lo hacen en la misma proporción, es decir, la influencia de algún factor puede ser considerado anormal entre otras sobre el pK_a del catalizador o sobre el estado de transición de la reacción. Por ejemplo, la desviación negativa exhibida por los carbonos ácidos se debe al hecho de que la velocidad de transferencia del protón de los carbonos ácidos es generalmente lenta, mientras que la transferencia de los protones de oxígenos, nitrógenos y azufres ácidos en la dirección termodinámicamente favorable está generalmente limitada por la velocidad de difusión, así que la velocidad de transferencia del protón por si misma debe ser más grande que la velocidad controlada por la difusión. [32]

Hidrólisis de amidas

Los principales aspectos del mecanismo hidrolítico de amidas fueron establecidos en los trabajos de M. L. Bender y sus colaboradores. [35] En disolución neutra la hidrólisis no catalizada de amidas y péptidos es un proceso lento con una constante de velocidad tan baja como 10^{-11} s^{-1} a temperatura ambiente. La hidrólisis de amidas catalizada por ácidos es más rápida que aquella catalizada por bases. Mediante estudios de intercambio de O^{18} se ha demostrado que en la hidrólisis básica se forma un intermediario tetraédrico en el cual el intercambio es más rápido que la hidrólisis, debido principalmente a que el NH_2^- es un grupo saliente muy deficiente, véase la figura 1.6. [36],[37]

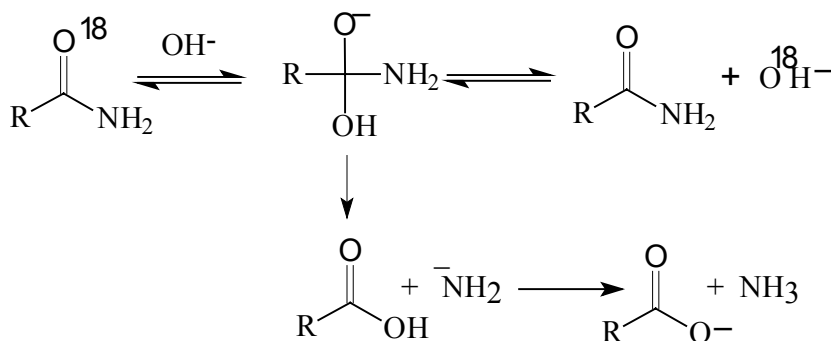


Figura 1.6 Hidrólisis básica de amidas con O^{18} , en donde la sustitución nucleofílica es más lenta que el intercambio.

La basicidad extrema del grupo saliente NH_2^- hace indispensable la participación de un ácido que done un protón al anión amido en el intermediario tetraédrico, o la participación del segundo anión hidroxilo que desprotona el grupo OH del intermediario y así incrementar la carga negativa total para empujar el grupo amido. La ley de velocidad para la hidrólisis alcalina de amidas contiene un término de segundo orden con respecto al ion hidróxido. El ataque del ion hidróxido catalizado por otro ion hidróxido es muy poco probable, por lo que la etapa determinante debe ser la salida del grupo NH_2^- (o NHR^- o NR_2^-) a partir de un intermediario de adición tetraédrico y aniónico. Un posible mecanismo se muestra en la figura 1.7 a).^[38]

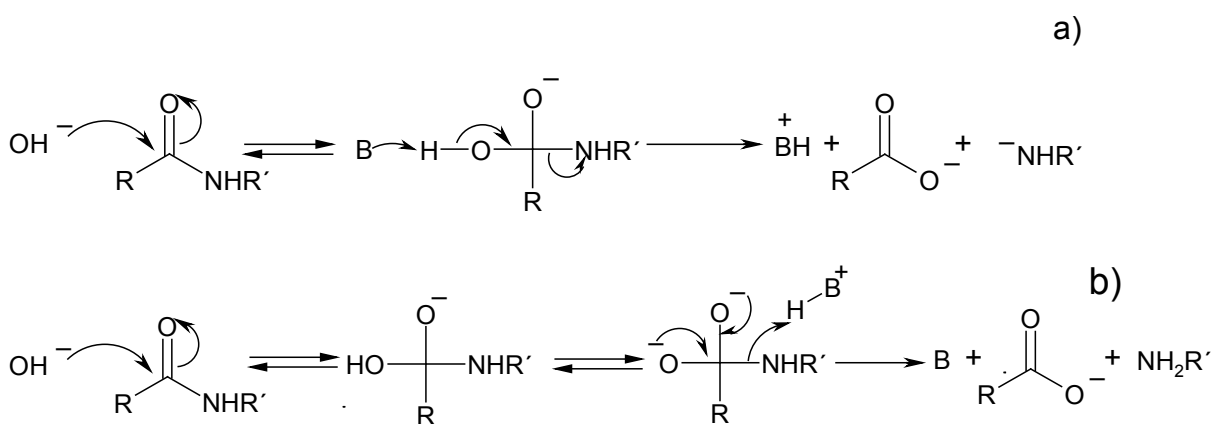


Figura 1.7 Hidrólisis alcalina de amidas, a) participación de una base B que desprotona al OH del intermediario (por ejemplo un segundo OH^- , reacción de segundo orden). b) Mecanismo cinéticamente equivalente al anterior, pudiendo ser B una base general.

También ha sido informado que la hidrólisis de anilidas está sujeta a la catálisis básica general, lo cual sugiere que en la ley de velocidad el término de segundo orden con respecto al ion hidróxido puede representar una catálisis básica general. La catálisis básica general puede ocurrir conforme al mecanismo de la figura 1.7a) o al mecanismo b) de la misma figura, los cuales son cinéticamente equivalentes. [39], [40], [41]

Este último mecanismo es más probable porque evita la formación del anión anilina (pKa ca. 27), el cual es tan inestable que al menos ciertamente no ocurre como un intermediario libre en disolución acuosa.

La hidrólisis alcalina puede ocurrir en una reacción con un término de primer orden respecto al ion hidróxido, esto bajo condiciones en las que la ruptura del intermediario es la etapa determinante. Para una reacción acuosa el agua es la especie que dona el protón solvatado al anión saliente NH_2^- . [37]

La hidrólisis ácida probablemente también se produce a través de un intermediario tetraédrico, pero en este caso no se encuentra intercambio de O^{18} en la amida recuperada porque en la reacción directa interviene un grupo saliente mucho mejor, el amoniaco, figura 1.8.

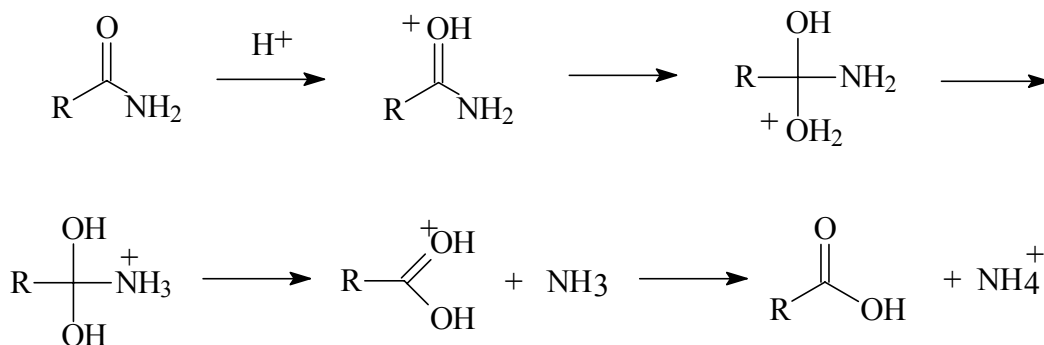
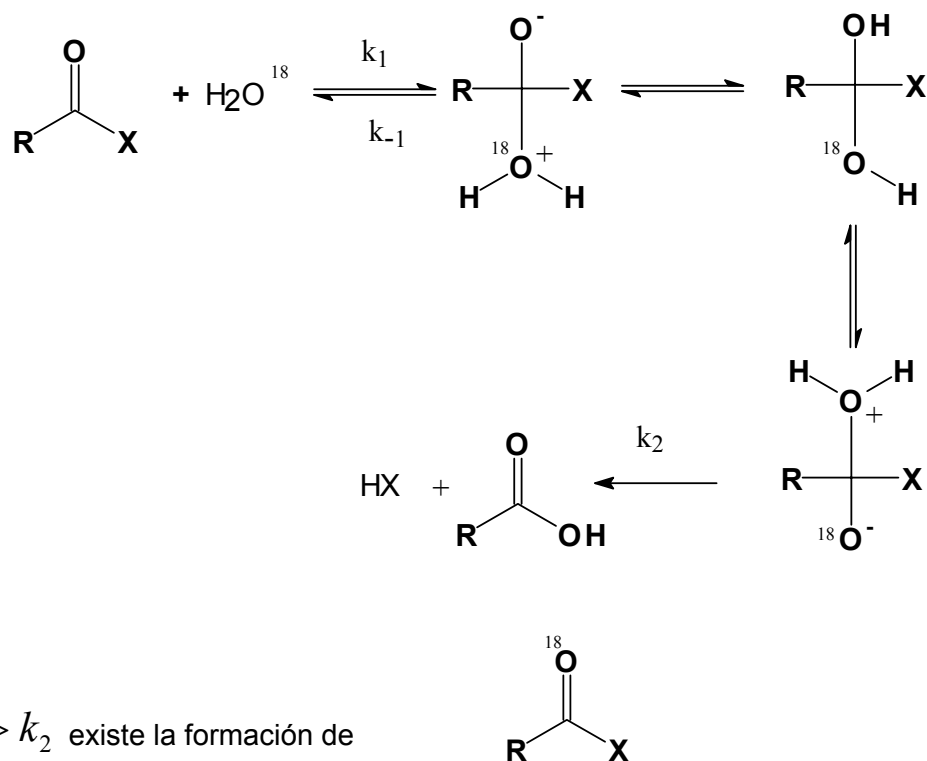


Figura 1.8. Hidrólisis ácida de amidas.

En la introducción se mencionó que los ésteres y las amidas tienen estructuras similares, razón por la cual los primeros se han usado en el lugar de las segundas. Sin embargo ambos tipos de compuestos no sólo difieren en sus velocidades de reacción de hidrólisis sino también en su mecanismo. Lo anteriormente dicho se resume en la figura 1.9.



Si $k_{-1} \gg k_2$ existe la formación de

Cuando X = halógenos, $k_2 \gg k_{-1}$

Cuando X = OR^- con R = Me, Et., $k_2 > k_{-1}$

Cuando X = NHR $k_2 \ll k_{-1}$

Figura 1.9. Mecanismo general de hidrólisis para derivados carboxílicos. ^[36]

La existencia o la ausencia de intercambio con el isótopo ^{18}O nos indica cuál es la etapa determinante de la reacción. Si no existe el intercambio de átomos de oxígeno significará que la formación del intermediario tetraédrico es la etapa determinante de la reacción puesto que k_{-1} es pequeña comparada con k_2 y ese es el caso para halogenuros y ésteres aromáticos. La presencia de ^{18}O en el compuesto de partida nos lleva a la situación en la que k_{-1} es grande, de ahí que la etapa descrita por k_2 sea la determinante, es decir, la descomposición del intermediario tetraédrico.

Para amidas $k_{-1} \gg k_2$, puesto que la salida del grupo NHR^- ($\text{pK}_a \approx 27$) se ve desfavorecida dado el carácter fuertemente básico de este grupo. ^[41]

Hidroxilaminólisis no catalítica de amidas

La reacción de hidroxilamina con los derivados de los ácidos carboxílicos, *hidroxilaminólisis*, es una reacción de sustitución nucleofílica en la que el nitrógeno actúa como átomo donador a través de su par de electrones libres, en tanto que el carbono de carbonilo del sustrato recibe la carga negativa comportándose de esta manera como el átomo aceptor, el producto formado es el *ácido hidroxámico* correspondiente.

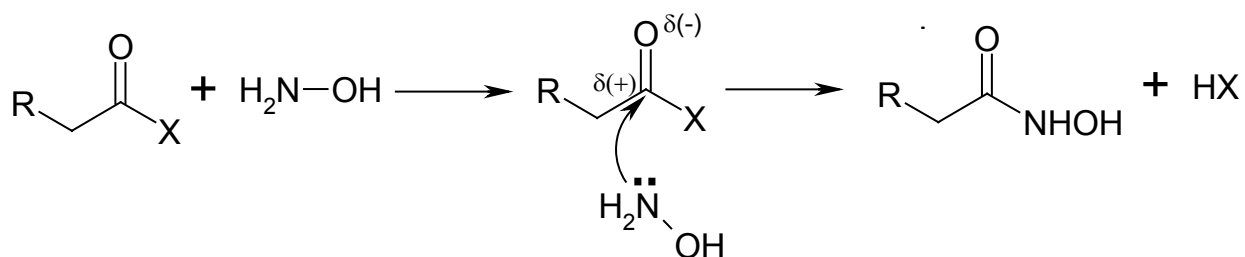


Figura 1.10 Formación de ácido hidroxámico a partir hidroxilamina y derivado carboxílico

La otra posibilidad de reacción entre el α nucleófilo y el sustrato es que el oxígeno de la hidroxilamina sea el átomo donador para dar como producto *O-acilhidroxilamina*.

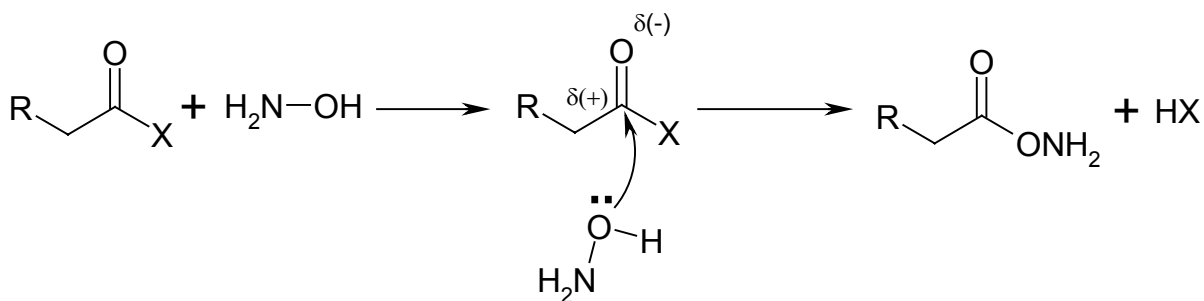


Figura 1.11 Formación de O-acilhidroxilamina, hidroxilamina más derivado carboxílico

Esta forma de reaccionar es un tanto inesperada dado que el átomo de nitrógeno es mucho mejor nucleófilo que el oxígeno, la reacción sucede favorablemente a pH cercano a la neutralidad y en disoluciones acuosas o alcohólicas de hidroxilamina diluida. No obstante el O-acilhidroxilamina es inestable y se transforma posteriormente en el ácido hidroxámico, sobre todo cuando la reacción se encuentra en medio básico, véase la figura 1.12. ^[42]

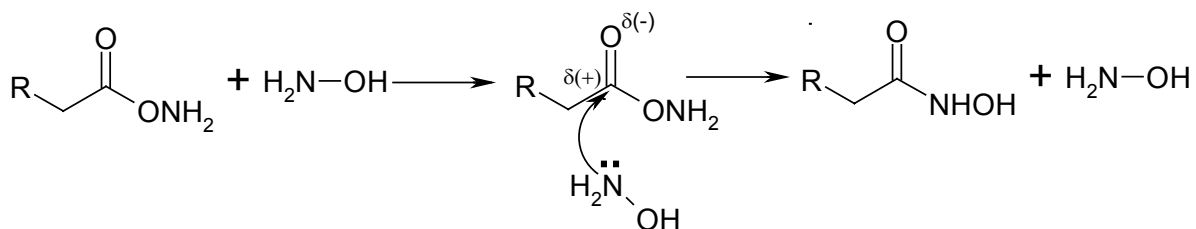


Figura 1.12 Conversión espontánea de O-acilhidroxilamina a ácido hidroxámico.

La hidroxilamina reacciona con amidas simples cerca de la neutralidad y a pH alcalino. En medio casi neutro los sustratos se transforman lentamente a productos, así que para propósitos analíticos es necesario llevar a cabo la reacción a temperaturas elevadas.

La velocidad de reacción de hidroxilamina con amidas simples en función del pH, pasa a través de un máximo alrededor de pH 6 debido a la catálisis ácida general realizada por el ion hidroxilamonio. El valor del pK_a de la hidroxilamina es cercano a 6 y a pH con el mismo valor, la concentración de las especies protonada y neutra es la misma, consecuentemente el pH al cual se encuentra el máximo del producto de concentraciones de hidroxilamina e hidroxilamonio es 6, y por lo tanto en este punto se tiene la máxima velocidad. Cabe mencionar que el propio nucleófilo actúa al mismo tiempo como un buffer en la reacción.

El hecho de que la velocidad de formación del ácido muestre una dependencia mayor a la de primer orden en función de la concentración de hidroxilamina, demuestra también la participación del catión del nucleófilo junto con su forma neutra, véase la figura 1.13. ^[43]

Para el caso de los sustratos formamida y acetamida, el gráfico de la constante de velocidad de segundo orden aparente ($k_2' = k_{\text{obs}}/[\text{NH}_2\text{OH}]$) contra la concentración total de hidroxilamina, muestra una disminución de la pendiente.

Una desviación positiva de este gráfico demandaría la adición de sólo un término a la ley de velocidad, pero una desviación negativa es evidencia de un cambio en la etapa determinante de la ley de velocidad, esto implica también la existencia de un intermediario de estabilidad apreciable en reacciones al grupo carbonilo. ^[44] En muchos casos la existencia de un intermediario de adición ha sido comprobada por evidencia independiente. ^[44]

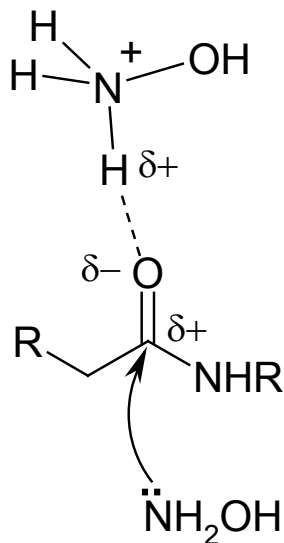


Figura 1.13 Acción catalítica del hidroxilamonio sobre derivados carboxílicos.

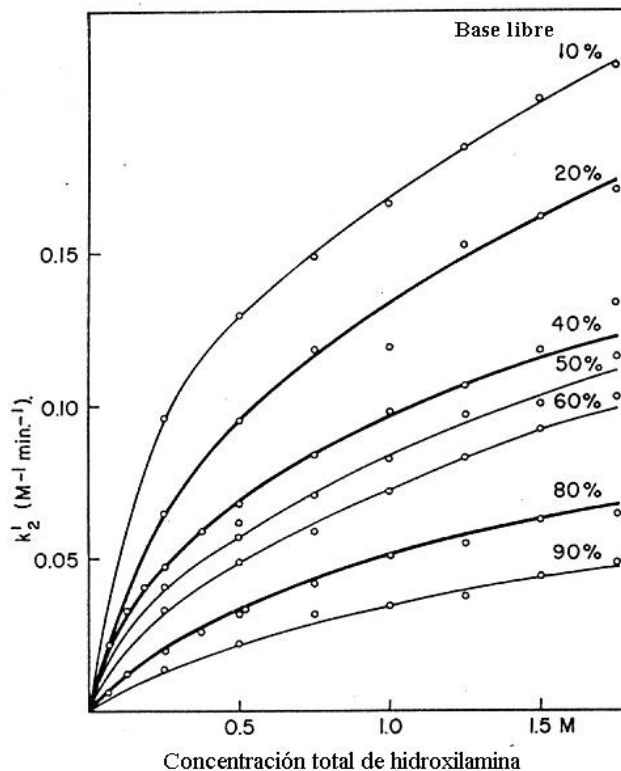


Figura 1.14 Dependencia de la constante de velocidad de segundo orden para la formación de ácido formohidroxámico ($k_2' = k_{\text{obs}}/[\text{NH}_2\text{OH}]$) en función de la concentración de hidroxilamina a diferentes fracciones de neutralización a 39°C, fuerza iónica 2.0. ^[43]

Las pendientes de las líneas en la figura 1.14 son las constantes de velocidad para la catálisis de la reacción por hidroxilamina o por hidroxilamonio. Las curvas se extrapolan hasta un punto cerca de cero, lo cual indica que la reacción no catalizada sólo hace una contribución menor a la velocidad observada. Los valores de k_2' son mayores en disoluciones más ácidas (por ejemplo 10% de base libre, véase la misma figura), lo cual indica que el ion hidroxilamonio es un catalizador más efectivo que la hidroxilamina libre. Las pendientes de las líneas y de ahí las constantes catalíticas, son mayores a concentraciones de hidroxilamina menores y decrece a concentraciones más altas de este nucleófilo. Esto es una evidencia para un cambio del paso determinante de la velocidad fuertemente dependiente de la concentración del catalizador a otro en el cual depende débilmente, es decir un cambio de la formación a la descomposición del intermediario de adición tetraédrico. ^[43]

El mecanismo para la hidroxilaminólisis de amidas propuesto por Jencks W.P. y Gilchrist M.,^[43] con formamida como sustrato se muestra en la figura 1.15.

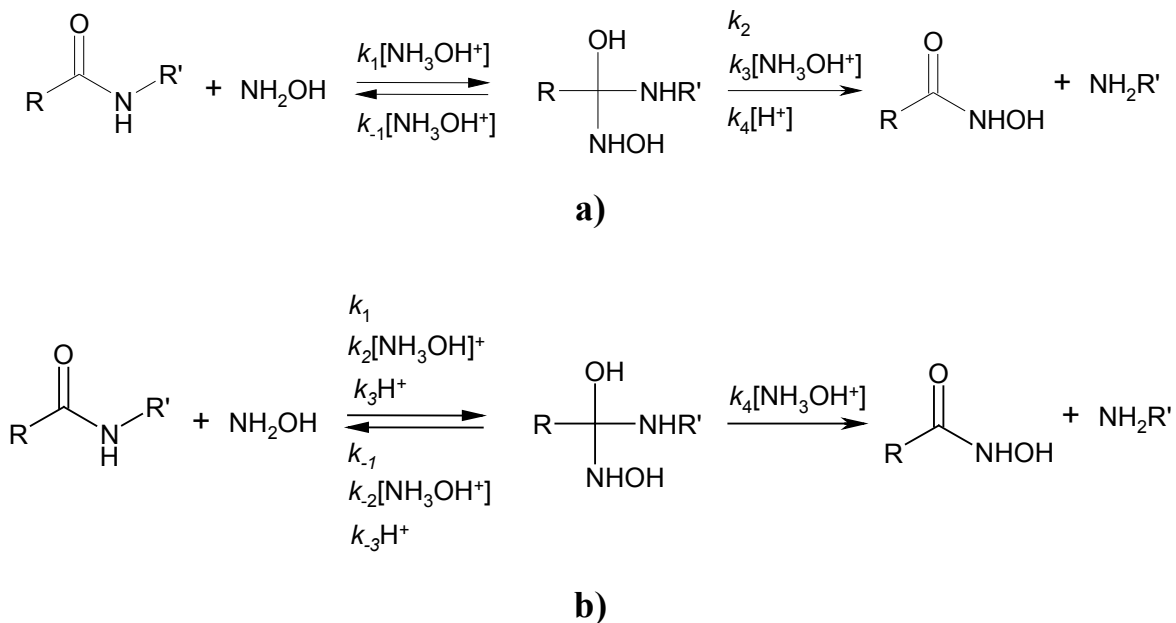


Figura 1.15 Mecanismos para la hidroxilaminólisis de formamida propuestos por Jencks W.P. y Gilchrist M.^[43]

La ecuación de velocidad que se desprende de la figura 1.15 a), es la ecuación (1.7)

$$k_{\text{obs}}/[\text{NH}_2\text{OH}] = k_1[\text{HA}](k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+]) / (k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+] + k_{-1}[\text{HA}]) \quad \dots (1.7)$$

y para el mecanismo alternativo b) de la misma figura, se obtiene la ecuación (1.8).

$$k_{\text{obs}}/[\text{NH}_2\text{OH}] = k_4[\text{HA}](k_1 + k_2[\text{HA}] + k_3[\text{H}^+]) / (k_{-1} + k_2[\text{HA}] + k_3[\text{H}^+] + k_4[\text{HA}]) \quad \dots (1.8)$$

de donde $[\text{HA}] = [\text{NH}_3\text{OH}^+]$, y k_{obs} es la constante de velocidad observada de primer orden de la reacción.

A partir de los datos cinéticos no es posible distinguir entre los mecanismos a) y b) del esquema de reacción propuesto por Jencks W.P.^[43]

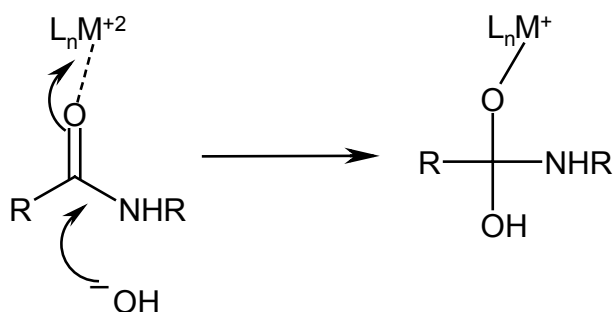
Catálisis con iones y complejos metálicos en la hidrólisis de amidas

Los iones metálicos o complejos de iones metálicos presentan eficiencia catalítica en la hidrólisis de amidas y péptidos. Un ion metálico es un ácido de Lewis capaz de polarizar efectivamente el enlace carbonílico mediante la coordinación metal-oxígeno. Además, el ion metálico puede coordinar a un grupo hidróxido de tal forma que puede haber una gran concentración de OH^- en disolución neutra o ligeramente alcalina. La coordinación de moléculas del disolvente y su desprotonación para funcionar como un nucleófilo es otra de las posibilidades.

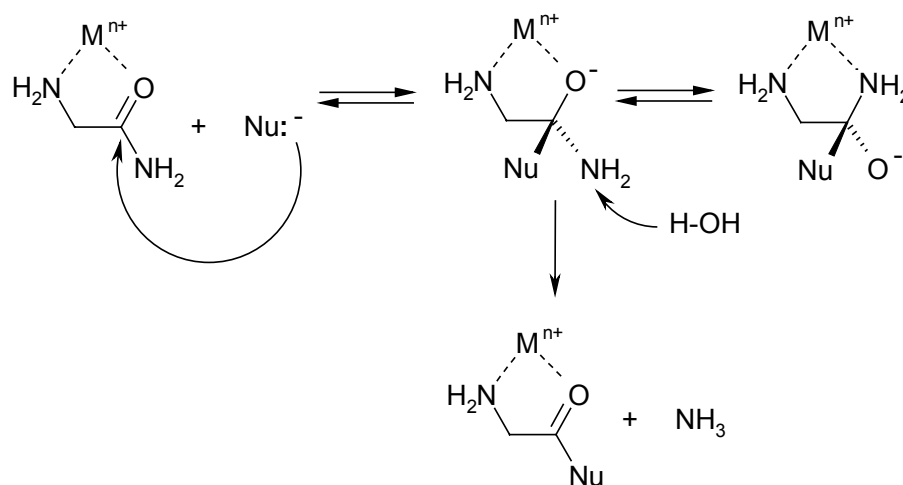
Una parte importante del trabajo en la hidrólisis de amidas se ha enfocado en el uso de metales y sus complejos, en un intento de proporcionar una versión a pequeña escala de una metalopeptidasa. Aunque los iones metálicos por si solos son efectivos en promover la hidrólisis de péptidos, éstos tienen limitaciones en su reactividad y solubilidad. Los complejos metálicos ofrecen soluciones a éstos problemas, además de brindarle al metal quelatado propiedades que pueden ser usadas en el control de su reactividad.^[45]

Los iones metálicos y grupos funcionales orgánicos pueden promover la hidrólisis de amidas en las siguientes formas:

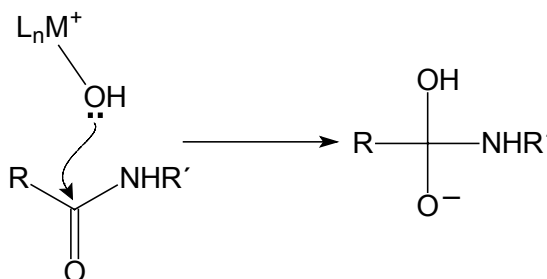
1. Activación del carbono de carbonilo mediante la coordinación del ion metálico al oxígeno del carbonilo.



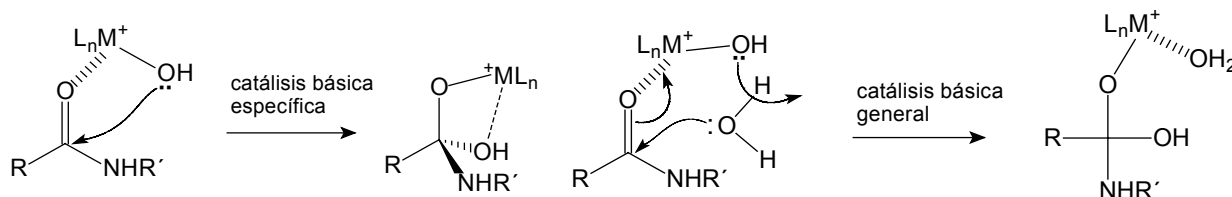
2. Activación intramolecular electrostática en el estado basal o estabilización del estado de transición por coordinación del ion metálico al oxígeno carbonílico y a un grupo donador adyacente.



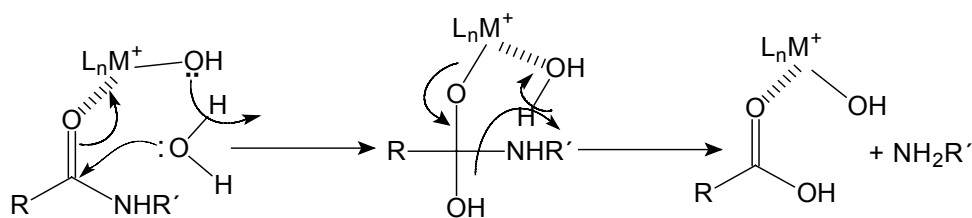
3. Ataque nucleofílico sobre el sustrato por un grupo funcional o por un OH metal-coordinado, el cual es generado a pH neutro mediante activación ácido-base del agua coordinada al ion metálico.



4. Mecanismo concertado con la participación de moléculas del disolvente para el caso de agua

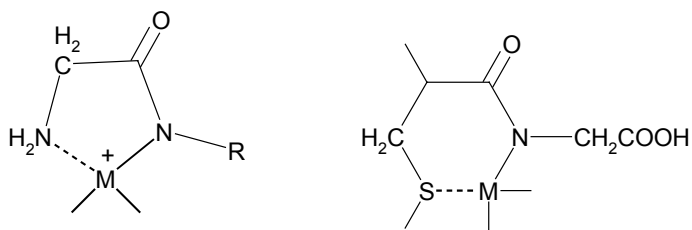


5. Estabilización del grupo saliente por coordinación del metal, o por transferencia de un protón.



Catálisis ácida general. [7], [8]

6. Coordinación del nitrógeno de la amida desprotonada por el propio ion metálico, situación en la que no se presenta la hidrólisis.



En todos los mecanismos excepto (3) se supone que el grupo amido puede ser coordinado con el ion metálico aun en el estado inicial. Tomando en cuenta la muy baja basicidad del grupo amido, su coordinación en disolución acuosa parece poco probable, sin embargo, hay ciertas evidencias de por lo menos una débil coordinación de amidas aun en medios acuosos. Así, la constante de estabilidad del complejo de formilmorfolina con Co(III) en agua es igual a 0.4 M^{-1} . [46] El mecanismo (2) opera en muchos sistemas modelo que tienen un grupo quelatante especialmente diseñado para aproximar el ion metálico al grupo amida. El mecanismo (3) es común para la ruptura de ésteres activados y no implica una activación del sustrato por parte del ion metálico. [47] El mecanismo (4) es probablemente más común para el caso de amidas.

Si bien existe investigación sobre la hidrólisis de amidas usando iones metálicos, muchos de éstos trabajos han sido realizados usando sustratos activados y además especialmente diseñados para coordinarse a los iones metálicos. Como ejemplos podemos mencionar las amidas **1** y **2** de la figura 1.16, la rapidez de la hidrólisis alcalina de estas aumenta 10^9 y 10^8 veces en presencia de Cu(II) y Ni(II) respectivamente. [48], [49]

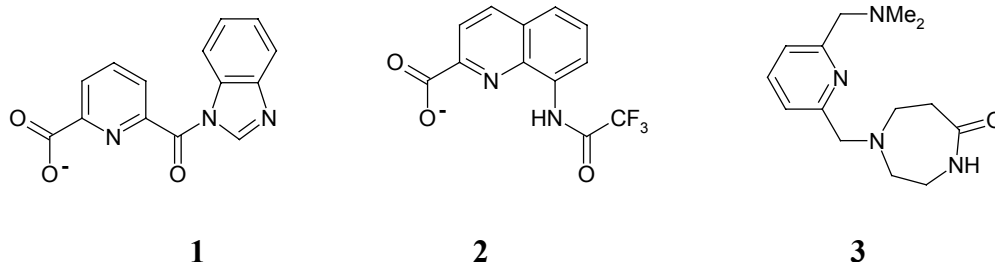


Figura 1.16 Ejemplos de amidas activadas

En el caso de las lactamas sintetizadas por Groves (estructura 3 de la figura anterior, 1-[(6-(dimetilamino)metil)-2-piridil]metilhexahidro-1,4-diacepín-5-ona) la amida no es activada pero coordina fuertemente al ion metálico, no sólo tiene un sitio conveniente de coordinación sino que además el enlace amido a ser hidrolizado queda muy próximo al ion metálico.^[50] Entre otras, el sitio de coordinación les permitió tener control en los modos de interacción entre el ion metálico y el carbonilo de la amida. Conforme a los mecanismos de la carboxipeptidasa A (CPA), existen tres modos probables de interacción metal-amida, A, B y C como se muestra en la figura 1.17.

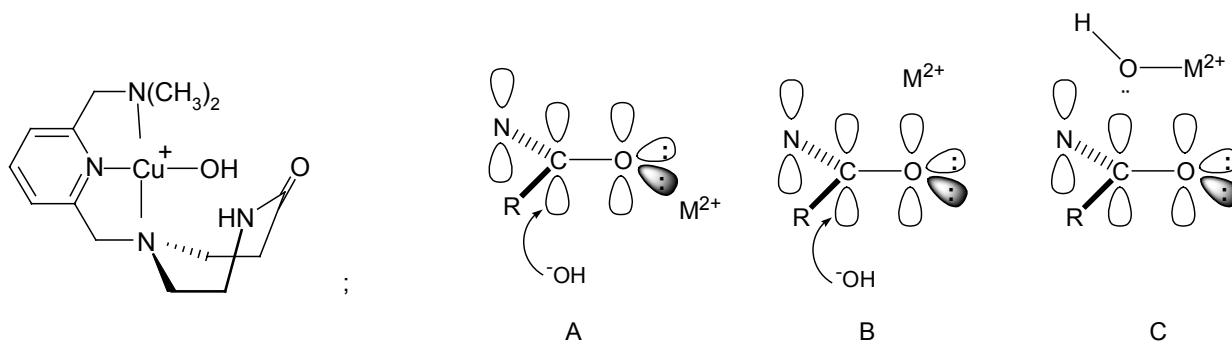


Figura 1.17 Modos de interacción para el complejo 1-[(6-(dimetilamino)metil)-2-piridil]metilhexahidro-1,4-diacepín-5-ona Cu(II).^[50]

Previamente se mostró que el primer tipo de interacción (estructura A de la misma figura anterior) sólo proporciona un pequeño incremento de la velocidad o incluso produce inhibición.^[51] Los modelos de “Space-Filling” para la lactama muestran que la configuración en forma de bote es la más favorecida, en esa forma estructural no es posible la interacción del tipo A puesto que el ion metálico queda por encima del plano de la amida siendo por lo tanto las interacciones B y C las más probables.

La hidrólisis del sustrato 3 en presencia de Cu^{2+} mostró un incremento en la velocidad de reacción de aproximadamente 10^6 veces, ($k_{\text{obs}} = 0.88 \times 10^{-11} \text{s}^{-1}$, sin ion metálico y $1.39 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ en la presencia de Cu^{2+}).

Los altos efectos catalíticos en esos sistemas son considerables y en todos los casos el nucleófilo (OH^-) funciona en forma coordinada al metal que lleva a, por lo menos, dos efectos: aproximación del nucleófilo al grupo amida y activación electrofílica de este grupo a través de la interacción del carbonilo con el metal. No obstante, los sustratos prácticamente importantes son no activados con una reactividad muy baja y sin sitios para una coordinación de metales eficiente. ^{[52], [53]}

Uno de los primeros estudios sobre amidas no activadas fue la hidrólisis de glicinamida y de éster etílico de glicina en presencia de cationes de Cu(II) , Zn(II) y Ni(II) . ^[54] En el caso del éster la velocidad de hidrólisis alcalina aumenta 10^4 - 10^5 veces, mientras que en el caso de amida el efecto es solamente de 10 veces. Según los autores la baja actividad para amidas se debe a la coordinación del grupo saliente al metal, lo que impide su protonación como se presenta en el mecanismo 3 descrito arriba. En ese mismo estudio se encontró que el Cu(II) fue sustancialmente más efectivo en la hidrólisis de amidas que el Ni(II) . Después de 24h 95% de glicilamida fue hidrolizada en la presencia de Cu(II) , y sólo el 60% en la presencia de Ni(II) . Cabe mencionar que el estudio se realizó a temperatura de 75°C y pH 7.9.

Posteriormente se reportó la velocidad de hidrólisis de diglicina en función del pH y en la presencia de Cu(II) , el estudio mostró que el proceso dependía en gran medida del pH pasando por un máximo alrededor de pH 4.5. La caída de la velocidad de reacción por encima de ese valor de pH se atribuye a la desprotonación del nitrógeno de la amida inducida por el ion metálico. ^[55] Con esta desprotonación, la coordinación al sustrato es más eficientemente, y como consecuencia, el mismo ion metálico no sólo inhibe la entrada de cualquier nucleófilo sino que también previene la salida de cualquier grupo, es decir la hidrólisis ya no se realiza.

Mucho trabajo sobre amidas no activadas y péptidos ha sido realizado usando para ello compuestos de coordinación en los que se involucra cobalto (III). ^[56] En esos estudios los complejos de cobalto tienen la forma general $[\text{CoN}_4(\text{OH})(\text{OH}_2)]^{2+}$ (con $\text{N}_4 = en_2$, α -trien, β -trien; donde en = etilendiamina y $trien$ = trietilentetraamina) la posición de los grupos

OH y H₂O dentro del complejo puede ser ambos en ecuatorial, ya sea *en cis* o *trans*, o bien que uno de los dos esté en posición ecuatorial (β_1) y el otro en posición apical (β_2). El mecanismo de la hidrólisis en éstos sistemas se propone que sea a través de la coordinación del sustrato que a su vez puede ser coordinado ya sea por el oxígeno de carbonilo y un grupo terminal amino, formando un quelato, o incluso puede desprotonarse la amida para dar un complejo inerte a la hidrólisis,^[56 b)] en otros casos un tanto especiales se observó la monocoordinación.^[57] Para el isómero (β_1, β_2) y sustratos terminados en amina se observó coordinación preferencial, glicina y glicil-ésteres sustituyen la posición β_1 , metilglicina y dipéptidos estéricamente más impedidos prefirieron el sitio β_2 .^[58]

Cuando en el complejo metálico N₄ = *trien* el sistema es menos reactivo, sin embargo presenta cierta selectividad para los residuos N-terminal.^[59]

El ion Co(III) tiene la desventaja de ser cinéticamente inerte, lo que limita su uso para propósitos de estudios mecanísticos^[60] y no tiene un uso catalítico práctico.

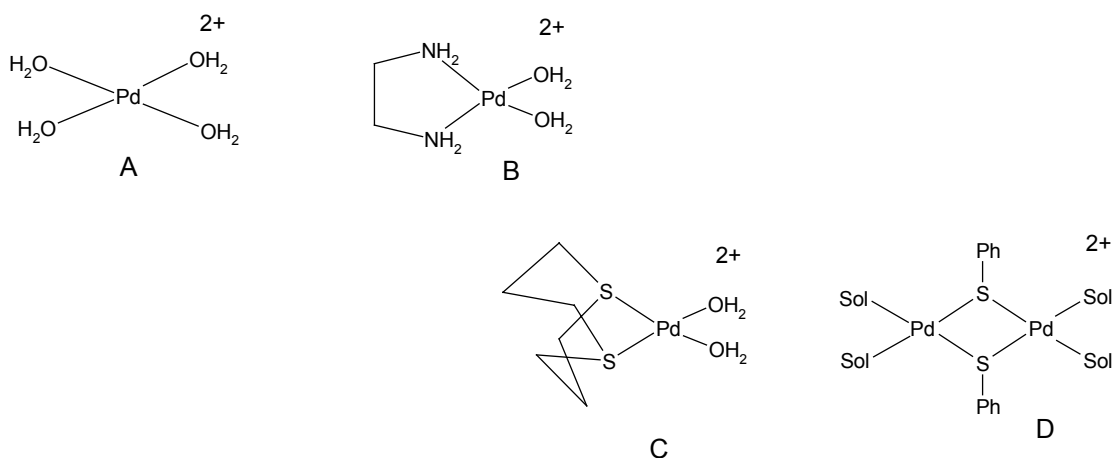


Figura 1.18 Catalizadores de Pd(II) con selectividad respecto del tipo de aminoácido, en particular realizan la ruptura de enlaces peptídicos que siguen a triptofano, o metionina o histidina.

Una serie de sistemas catalíticos incluye complejos de Pd(II) y Pt(II), tales como los propuestos por Kostić y mostrados en la figura 1.18.^[61] Éstos catalizadores tienen cierta selectividad respecto del tipo de aminoácido, por ejemplo, complejos de Pt(II) y Pd(II) rompen el enlace peptídico que sigue después del triptofano, o metionina o histidina, es decir ligandos blandos que se unen al ion metálico a través de grupos tiolato. Sin embargo estos complejos son

poco activos y requieren altas temperaturas (60-70 °C) y medios ácidos para prevenir la precipitación del hidróxido metálico.

Para que los complejos de estos iones metálicos sean eficaces en la hidrólisis de péptidos, al menos dos de las cuatro posiciones de coordinación deben estar libres o por lo menos coordinadas a ligandos lábiles como moléculas de agua. Las otras dos posiciones están ocupadas por ligandos bidentados.

El número de sustratos para los sistemas de Pt(II) y Pd(II) se ve limitado cuando se presentan grupos amino terminales dentro de la amida o el péptido, puesto que con este grupo junto con la cadena lateral de metionina, triptofano o histidina se puede generar un quelato que previene la flexibilidad del complejo metálico requerida para la ruptura del enlace sobre el lado C-terminal; aunque si bien, el problema puede ser evitado bloqueando la terminación N mediante la acetilación. Para Cisteina (Cys) y Metionina (Met) la formación de quelatos está favorecida por la presencia de un grupo amino que permite la formación de anillos de 5 miembros para la Cys y de 6 miembros para la Met.

Los mejores resultados del trabajo de Kostić son aquellos realizados con los complejos de Pd(II), esto podría ser esperado si se considera el hecho de que los compuestos de coordinación de Pd(II) son 10^5 veces más lábiles que los de Pt(II). De esta forma el compuesto $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{+2}$ resulta mucho más activo que el correspondiente de Pt(II), aunque tiene el problema de oligomerizar a través de puentes de OH^- por encima de pH 2. Para evitar la oligomerización es necesario mantener las disoluciones en medio muy ácido con HClO_4 no coordinante.^[62] En este último complejo la especie activa es un dímero (al igual que con el complejo D de la figura 1.18) donde los grupos tiolato de la amida se encuentran en los puentes, esta estructura tiene la doble ventaja de que las moléculas de agua en posición *cis* están muy cerca al enlace peptídico, y de que las moléculas de agua *trans* a los ligandos tioéter son labilizadas por efecto *trans*, es decir que hay dos contribuciones que favorecen la hidrólisis del sustrato, véase la figura 1.19 A.

Como consecuencia de la forma en que se coordinan estos complejos a los sustratos, los mecanismos de ruptura del enlace peptídico para estos sistemas son como los número 2 y 4 presentados al inicio de esta sección, con la coordinación de tiolatos en lugar de aminas, o bien puede suceder la inhibición como se mostró en 6.^[62]

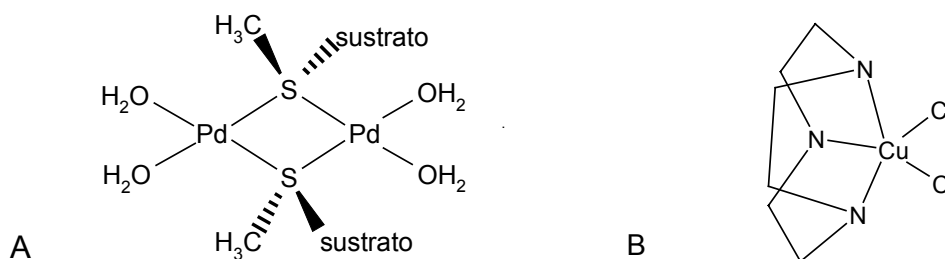


Figura 1.19 A Especie activa de los complejos de Pd(II). B Complejo $N_3[9]ona$ Cu(II).

Otro conjunto de estudios de relevante importancia incluye al complejo de Cu(II) con el ligando macrocíclico *1, 4, 7-triazaciclonanona* ($N_3[9]ona$) cuya actividad es relativamente alta, pero también completamente no selectivo, figura 1.19 B. ^[63] La extensión de la hidrólisis depende del tiempo de reacción y de la concentración del metal, con una transformación de glicilglicina hacia productos del 15% en 7 días a la temperatura de 50°C y pH 8. A diferencia de los otros sistemas en este caso el complejo es un catalizador con un *número de ciclos* de 1.3 (*1.3 turnover number*) en 28 días.

La actividad más alta a la fecha fue informada por Takarada y Komiyama para la hidrólisis de péptidos en presencia de Ce(IV). ^[64] Con este catalizador ($[Ce(NH_4)_2(NO_3)_6]=10$ mM) la vida media de un péptido es del orden de 2 horas a 50°C y pH 7. Sin embargo el sistema es heterogéneo ya que en estas condiciones el Ce(IV) se encuentra en forma de un hidróxido gel. Esto lo hace poco reproducible, además la selectividad del proceso es baja lo cual se deja ver del mecanismo que los propios autores proponen. En dicho mecanismo está involucrada la coordinación tanto de la N-terminación como la C-terminación, es decir, no se espera que el compuesto de Ce(IV) pueda discriminar entre dos sustratos de diferente terminación, además en sustratos que tienen cadenas laterales la participación de los compuestos de Ce(IV) es inefectiva.

Debe mencionarse que por ejemplo, para la hidrólisis de Gly-Phe la k_{obs} aumenta linealmente con el aumento de la concentración del complejo, así que a $[Ce(NH_4)_2(NO_3)_6]=50$ mM el $t_{1/2}$ es de sólo media hora. Otra característica más que hay que resaltar es la existencia de un número de ciclos de 2.2 en dos días para el mismo sustrato Gly-Phe con las condiciones de 50°C y pH=7. ^[64]

Con base a estos resultados se esperaría que otros cationes altamente cargados, como Zr(IV) o Th(IV) pudieran tener alta actividad catalítica. Para estos cationes fueron reportados algunos ligandos, por ejemplo Tris, capaces de estabilizarlos en disoluciones acuosas. [65]

Tomando en cuenta esta observación, la alta actividad de Ce(IV), como la de otros lantánidos, puede explicarse por su baja afinidad a los átomos donadores de N y que prefiere coordinarse a O, de esta forma permiten la protonación del anión de la amina saliente, figura 1.20.

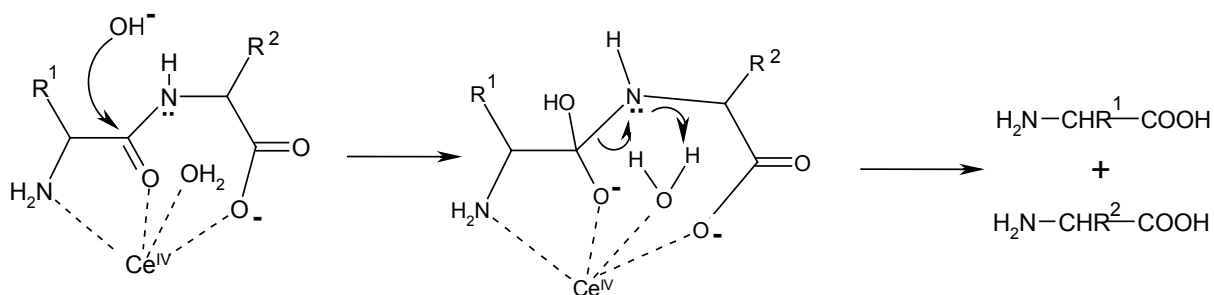


Figura 1.20 Mecanismo propuesto para la hidrólisis de péptidos catalizada por Ce(IV).

Otra de las estrategias aplicadas en la ruptura de enlaces peptídicos es la presentada por Meares y Rana. [66] En sus sistemas, de Albúmina de Suero Bovino(SAB), proponen la modificación de las proteínas en sitios específicos con grupos capaces de coordinar iones metálicos, para este propósito diseñaron el 1-(*p*-bromobencil)-EDTA. La sustitución se realiza en un grupo sulfhidrilo de una cisteína (cisteína-34 de la SAB) para finalmente integrar al sistema un ion de Fe(II). El nucleófilo usado es el H₂O₂ que puede reaccionar de manera hidrolítica con el sustrato como también de manera oxidativa tanto con el sustrato como con el ion metálico, para evitar la ruta oxidativa la fragmentación de SAB debe realizarse lo más cerca posible a condiciones fisiológicas y agregar ascorbato. [66]

La reacción realizada a 25°C y pH 7 muestra la presencia de tres fragmentos donde pueden distinguirse los componentes terminales tanto N como C y no se encuentran residuos de la degradación de aminoácidos. De esta forma identifican las zonas donde se llevó a cabo la ruptura de enlaces peptídicos que son en Ala150 y Ser190. En otras palabras, mediante tal modificación es posible indagar sobre la naturaleza tridimensional de la proteína aunque para ello se requiere un gran trabajo de síntesis en la modificación de la proteína.

El ion Zn(II) en la hidrólisis de amidas.

El zinc junto con cadmio y mercurio pertenecen al grupo IIB o 12 de la tabla periódica, y debido a que sus iones en el estado de oxidación más común $2+$, tienen su capa de orbitales d llena (d^{10}), se consideran que son de no transición.

En estos elementos el incremento de la carga nuclear efectiva produce un aumento notable de los potenciales de ionización y este efecto puede advertirse al comparar los potenciales de ionización de los grupos IIA y IIIA con aquellos de los grupos IIB y IIIB. Como consecuencia, las afinidades electrónicas de los metales de los subgrupos B se ven incrementadas pues son lo inverso del potencial de ionización.

La mayor afinidad electrónica de los cationes conduce a un mayor poder polarizante que el correspondiente a un catión de carga y tamaño similares de los metales pretransicionales. El resultado global de estos efectos es que los metales B, forman con más facilidad iones y compuestos con los iones más electronegativos. Por otra parte los iones tendrán una mayor tendencia a combinarse con aniones o ligantes polarizables. ^[67]

Existe una gran semejanza en las propiedades del zinc y del cadmio pero, en muchos casos, existe una notable discontinuidad entre las de cadmio y las del mercurio. Los iones Zn(II) y Cd(II) se asemejan en muchos aspectos al Mg(II) y tienen varias sales isomorfas. Su solubilidad también se parece a la del Mg(II) por el hecho de que los haluros, excepto el fluoruro son solubles y, en general, las sales de los oxianiones de ácidos fuertes son solubles, en tanto que los oxianiones de los ácidos débiles no lo son. A diferencia del ion de magnesio hidratado, el cual es débilmente ácido ($pK_a = 12$) los del zinc y los del cadmio son ácidos bastante fuertes. El aumento de acidez se debe a una mayor interacción de los cationes del grupo IIB con las moléculas de agua lo cual se manifiesta en los calores de hidratación del ion Ca^{2+} ($r = 0.099$ nm, $-\Delta H = 1580$ kJ mol⁻¹) y del ion Cd^{2+} ($r = 0.096$ nm, $-\Delta H = 1805$ kJ mol⁻¹) a pesar de que el tamaño de los iones es semejante. Para el Zn^{2+} el valor de la entalpía de hidratación es de $-\Delta H = 2056$ kJ mol⁻¹ con un radio iónico de $r = 0.072$ nm. ^[68]

Estos metales son considerados más blandos y tienen puntos de fusión más bajos y tanto el Zn como el Cd son más electropositivos que los grupos de transición vecinos. Sin embargo, su comportamiento recuerda a los elementos de los grupos *d* en su habilidad para formar complejos con aminas, amonio, iones haluro y cianuro. Debe decirse que el enlace $d\pi$ entre los metales y los ligantes (p. Ej. CN^-) es mucho más débil que con los elementos de transición, y por lo tanto compuestos con carbonilos o nitrosilos, olefinas y las demás no se forman con los elementos del grupo IIB.

En disolución acuosa el Zn(II) se hidroliza parcialmente en medio ácido para producir Zn(OH)^+ y $\text{Zn}_2(\text{OH})^{3+}$ antes de que comience la precipitación en medio neutro. En medio básico aparece Zn(OH)_2 , Zn(OH)_4^{2-} y tal vez $\text{Zn}_2(\text{OH})_6^{2-}$, [69] y el principal zincato parece ser $[\text{Zn(OH)}_3(\text{H}_2\text{O})]^-$ de acuerdo con espectros de Raman. [67]

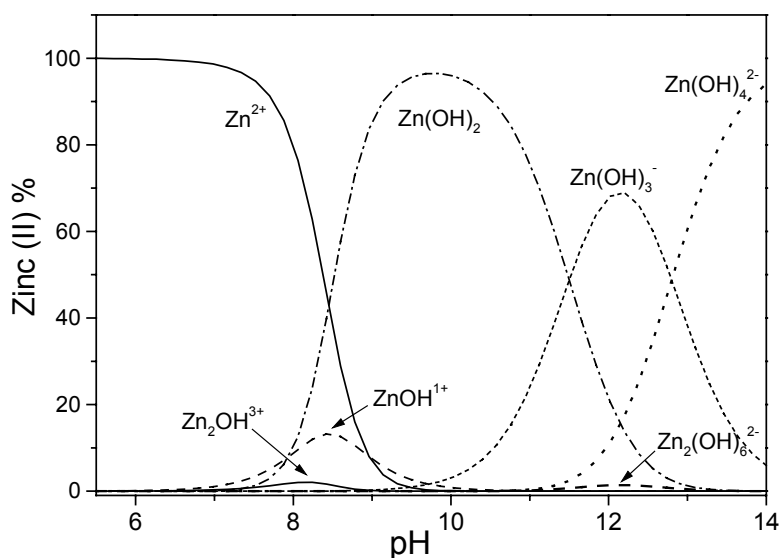
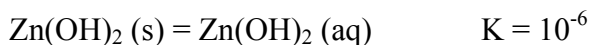


Figura 1.21 Diagrama de distribución de productos de hidrólisis para $[\text{Zn}] = 0.1\text{M}$, 25°C y $I = 1\text{M}$.

Las constantes de producto de solubilidad de Zn(OH)_2 y Cd(OH)_2 son $\sim 10^{-11}$ y 10^{-14} respectivamente, pero Zn(OH)_2 es más estable de lo que podría esperarse de esta constante debido al equilibrio:



El Zn(OH)_2 se disuelve en disoluciones acuosas básicas, pero el Cd(OH)_2 sólo se disuelve en disoluciones fuertemente básicas.

Las sales de los oxoácidos son todas solubles en agua. Aunque los iones hidratados son generalmente $[M(H_2O)_6]^{2+}$, el ion *tbp* $[Zn(H_2O)_5]^{2+}$ ha sido encontrado en un polímero iónico. [67]

Desde el punto de vista geoquímico el Zn se encuentra de manera natural como litófilo (óxido, sulfato, silicato, carbonato) y como calcófilo (sulfuro). Desde el punto de vista de ácidos y bases duros y blandos este elemento tiene una dureza intermedia y muestra una gran afinidad por compuestos que tengan átomos donadores como oxígeno o nitrógeno, como también por sulfuros o tiolatos. Por lo tanto al Zn(II) podemos encontrarlo en sistemas biológicos ligado a histidinas (His, N), glutamatos (Glu, O) o aspartatos (Asp, O), y cisteínas (Cys, S).

El Zn(II) participa en la superóxido-dismutasa (SOD), en la cual se encuentra coordinado a dos His y un Asp, la cuarta posición esta cubierta por un imidazol desprotonado que a su vez coordina a un Cu(II). Otro ejemplo interesante se da en la *aspartato-transcarbamilasa*, en la cual el Zn(II) unido a 4 azufres de residuos de Cys participa estabilizando la estructura cuaternaria.

El ion metálico Zn(II) juega un papel crucial en los sitios activos de más de 300 metaloenzimas. Su acción no se limita a la catálisis, sino además estabiliza la estructura de proteínas y de ácidos nucleicos, preserva la integridad de organelos subcelulares, se encuentra presente en procesos de transporte y tiene una importante participación en los fenómenos inmune y viral. [70] La función del Zn en metaloenzimas está dividida fundamentalmente en cuatro categorías: catalítica, estructural, reguladora (o moduladora) y no catalítica.

- Se dice que el Zn es *catalítico* cuando interviene directamente en la catálisis de una enzima, la remoción de este ion deja totalmente inactiva a la enzima.
- Es *estructural* si sólo es requerido para la estabilidad estructural de la proteína, y será esencial para la actividad sólo en la extensión de que la conformación total de la enzima afecte su acción.
- El Zn tiene un papel *regulatorio o modulador* cuando regula la actividad de la enzima pero no es esencial para el propósito de catálisis, la actividad de la enzima permanece aun en

la ausencia del metal. El Zn regulatorio puede actuar como un activador o como un inhibidor.

- Una cierta fracción de Zn en metaloenzimas tiene una función aun desconocida, es decir no es catalítico ni estructural ni regulatorio, en la ausencia del conocimiento específico sobre como actúa el metal es referido como *no catalítico*.^[71]

La geometría de coordinación del Zn catalítico difiere significativamente de los átomos de Zn estructural y no catalítico. El Zn catalítico está enlazado a tres ligandos de proteína y a una molécula de agua, mientras los otros dos tipos de Zn están coordinados a cuatro ligandos de proteína. La presencia de una molécula de agua coordinada al Zn catalítico significa un sitio de coordinación abierto y es considerado esencial en la función catalítica del zinc. Además la geometría de coordinación del zinc catalítico es altamente distorsionado y fluctúa entre las propiedades tetra y pentacoordinado, lo cual refleja su carácter *entático*, es decir que la geometría del sitio activo de la enzima se aproxima al estado de transición.^[72] En cambio, la geometría de coordinación del zinc estructural muestra ser más regular y por lo tanto *no entático*. El estado entático puede ser considerado la piedra angular de la catálisis de las metaloenzimas de zinc debido a que disminuye la barrera de energía para el estado de transición y de ahí la aceleración de la conversión de sustrato a productos.^[71]

El Zn(II) puede ser fácilmente tetra, penta y hexacoordinado, sin una marcada preferencia por la sexta coordinación. La configuración electrónica de Zn(II) es $3d^{10}$ con dos electrones por orbital y por lo tanto en compuestos de coordinación no hay energía de estabilización del campo-ligando, y el número de coordinación es determinado por un balance entre las energías de enlace (iónicas y/o covalentes), las repulsiones entre los ligantes (fuerzas electrostáticas) y por el tamaño.^[67]

Los complejos tetra-coordinados tetraédricos tienen distancias metal-donador más cortas que los complejos penta-coordinados, y estos últimos las tienen más cortas que los hexacoordinados, a su vez la repulsión electrónica y estérica se incrementa en el mismo orden. En las enzimas, el Zn(II) regularmente tiene un número de coordinación menor que 6, de tal forma que ellas tienen sitios disponibles en su esfera de coordinación, el sustrato puede coordinarse en

principio ya sea mediante la sustitución de una molécula de agua o por incremento en el número de coordinación.^[73]

El número de coordinación 6 de proteínas enlazadas a Zn no ha sido observada, en cambio en complejos de bajo peso molecular, de 490 estructuras cristalinas se encontró que el Zn tiene un número de coordinación de 4 en aproximadamente el 58% de las estructuras, y números de coordinación 5 y 6 en 13 y 27% respectivamente. Probablemente en disolución acuosa el número de coordinación 6 sea el más importante para el Zn(II) aunque depende de la concentración de la sal de Zn.^[74]

Si bien la geometría de coordinación más frecuente es la tetraédrica, se conocen otras geometrías, esto es en parte debido a la naturaleza de los ligandos, como en los casos de glutamato y aspartato que se coordinan de manera bidentada. Además de los sitios de Zn mononucleares, también hay sitios polinucleares como lo ilustran la *fosfatasa alcalina*, la *nucleasa P1*, *fosfolipasa C* y *aminopeptidasas*; los centros de zinc en tales enzimas a menudo están puenteados por moléculas de agua y un residuo de aspartato.^[75]

Una molécula de agua coordinada se intercambia rápidamente porque los ligandos en el Zn son cinéticamente lábiles. Esto otra vez puede ser a causa de la falta de preferencia por un número de coordinación determinado. Un complejo hexa-coordinado puede experimentar disociación de un ligando para dar lugar a un complejo pentacoordinado con una pérdida pequeña de energía y también una pequeña barrera energética. Por otro lado, un complejo tetra-coordinado puede admitir un quinto ligando de la misma forma con una pequeña barrera energética. Si la interconversión entre especies tetra, penta y hexa coordinadas es rápida entonces la catálisis también es rápida.^[76]

Por supuesto que el enlazado de Zn(II) (así como de otros iones metálicos), a menudo está determinado por factores entrópicos. Las moléculas de agua son liberadas cuando el ion metálico entra en la posición de enlace, proporcionando así un incremento en la entropía.^[77]

El Zn es el ácido de Lewis más común en la química bioinorgánica y sustituye así a los protones en la tarea de polarizar un enlace sustrato, p. Ej. al enlace carbonilo de los péptidos y ésteres mediante la aceptación de un átomo del sustrato (oxígeno). Con relación al protón un ion metálico con una posición de coordinación libre tiene la ventaja de ser un superácido en el

sentido de que puede existir a pH donde la concentración de H_3O^+ es muy baja. También con relación al protón, la doble carga positiva compensa parcialmente su pequeña electrofilia debido a la menor densidad de carga. [78]

Las moléculas de agua coordinadas a complejos de Zn pueden presentar la desprotonación con un pK_a que está controlada por el número de coordinación y por la carga total del complejo, disminuye con la disminución del número de coordinación y con el incremento de la carga positiva, esto es, si el ion metálico tiene una carga positiva mayor atraerá hacia sí con mayor fuerza el par de electrones libres del oxígeno disminuyendo con ello el valor del pK_a . [79] Ejemplos:

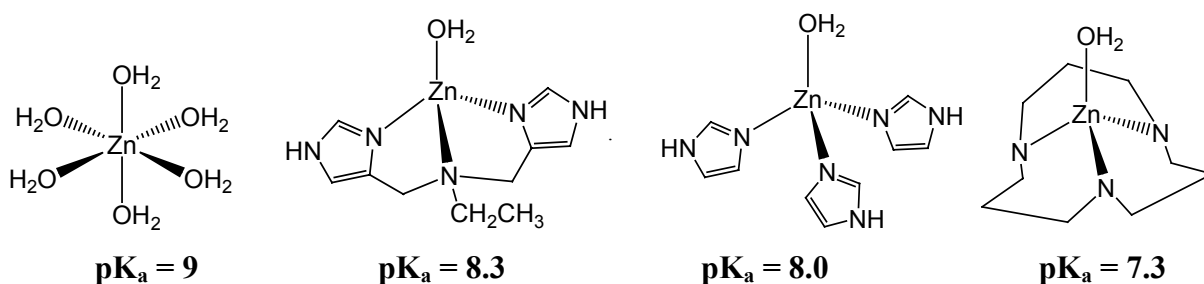


Figura 1.22 Complejos de Zn(II) con diferentes ligantes y valores de las constantes de desprotonación del agua coordinada.

Los valores de pK_a para las moléculas de agua coordinadas, en ciertas series de compuestos emparentados, pueden correlacionarse con la fortaleza básica de los otros ligantes coordinados al ion metálico, véase la figura 1.22.

En relación a la capacidad coordinativa de los ligantes, existe la impresión de que el reemplazo de ligantes unidentados por análogos quelantes, en especial macrocíclicos, genera moléculas de agua con una acidez más pronunciada. La explicación se da en términos de la diferencia de solvatación atribuida a las porciones de ligantes capaces de formar puentes, dichos ligantes además generalmente son hidrofóbicos. [80]

Al igual que los sistemas biológicos encargados de realizar la hidrólisis de enlaces peptídicos, también existen muchas metalohidrolasas para ésteres carboxílicos y para ésteres fosfóricos que son enzimas de Zn. Gran parte del trabajo realizado en esta área, ha estado encaminado hacia la simulación de los centros activos de las enzimas de Zn que realizan la

hidrólisis de esos tres grupos de sustratos; en particular sistemas del tipo ligante-M-OH que sean aislables y que permitan un estudio mecanístico. Se ha encontrado que determinados sistemas sirven para la transformación por ejemplo tanto de ésteres carboxílicos como para ésteres fosfóricos, o bien algún otro sistema para la transformación ésteres carboxílicos como para amidas, por lo anterior en los siguientes párrafos se citan algunos trabajos que involucran la hidrólisis de tales sustratos.

Nakata y Miyazawa realizaron la hidrólisis del péptido no activado glicilglicina (GG) en la presencia de Zn(II) y Cu(II).^[23] Aunque si bien no dan valores de las constantes de velocidad, de sus condiciones de trabajo (85°C y 100 horas de reacción) se pueden estimar. Si se asume que la reacción es de primer orden, entonces la constante de velocidad será del orden de 10^{-6} s^{-1} a 85°C. Para Cu(II) el porcentaje de hidrólisis como función del pH se comporta describiendo una curva en forma de campana con máximo aproximadamente en pH 4.4. En tanto que para Zn(II) se tiene una curva sigmoideal que aumenta indefinidamente al menos hasta pH 6, después del cual les resulta difícil mantener un pH fijo por falta de una disolución reguladora apropiada.

El mecanismo de hidrólisis es diferente para cada ion metálico, para Cu(II) éste se coordina al nitrógeno de la amida y al oxígeno del carbonilo, en tanto que Zn(II) se coordina a la amina terminal y al oxígeno del carbonilo. Como se mencionó más arriba, esto se debe fundamentalmente a que Cu(II) al valor de pH 4.4 es capaz de desprotonar a la amida, lo que al mismo tiempo explica el máximo de la constante de velocidad a dicho pH.

En otro trabajo Yamamura Y. también usa el Zn(II) sin ligantes para la hidrólisis de péptidos no activados, el medio de reacción es acuoso a temperatura de 70°C y pH = 7.0.^[81] En este caso aprovecha las propiedades estructurales de los dipéptidos los cuales poseen un grupo -OH unido a una cadena lateral adyacente al sitio de reacción, grupo que finalmente interviene como nucleófilo sobre el carbonilo activado a su vez por el ion metálico. Los sustratos hidrolizados fueron Gly-Ser, Gly-Thr y Ala-Ser, en contraste, los sustratos Gly-Asp, Gly-Ala y Gly-Gly no tienen el proceso autocatalítico. Puede pensarse que a pesar de haber logrado la hidrólisis de péptidos no activados, las reacciones de hidrólisis deben ser lentas pues la temperatura usada es de 70°C y que además los péptidos deben tener necesariamente el grupo -OH. Véase la figura 1.23.

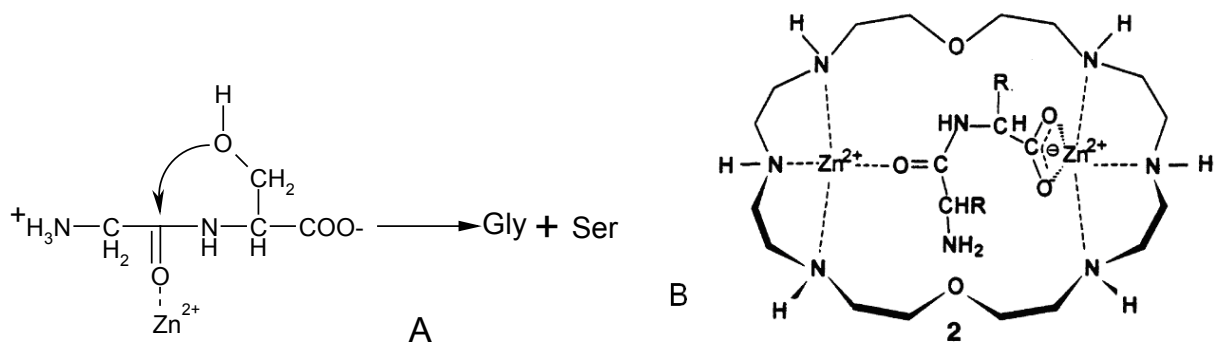


Figura 1.23 A Mecanismo de hidrólisis para dipéptidos con grupo OH en cadena lateral y Zn(II). B Mecanismo de hidrólisis para glicilglicina y $[Zn(II)_2OBISDIEN]^{4+}$.

Un estudio sobre la catálisis de deuteración y de hidrólisis del dipéptido glicilglicina con el complejo formado entre Zn(II) y la hexamina 1, 4, 7, 13, 16, 19-hexaaza-10, 22-dioxociclotetrasiloxano (OBISDIEN), fue realizado por Marilde y colaboradores. ^[82] El complejo es dinuclear y actúa sobre el sustrato coordinándolo a través del oxígeno de carbonilo a uno de los Zn(II), el segundo Zn(II) coordina a los oxígenos del ácido terminal, figura 1.23 B. En este complejo ternario el enlace peptídico es debilitado por activación del carbono de carbonilo el cual permite el ataque nucleofílico de un OD^- , ^[83] y que podría estar coordinado a uno de los dos Zn(II). En este momento puede suceder la deuteración del metilo de amina o la deuteración del nitrógeno de amida, en esta última forma tendría lugar la formación de 2 moléculas de glicina, es decir se llevaría a cabo la hidrólisis.

Tanto el proceso de deuteración como el de hidrólisis suceden con constantes de velocidad del orden de $10^{-7} s^{-1}$, podría considerarse que los procesos son lentos con tiempo de vida media de 80 días aproximadamente, sin embargo, habrá que decir que dados el tamaño de la cavidad y su estructura, se tiene el reconocimiento de determinados sustratos, esto es, el sistema presenta selectividad. Sin embargo el tamaño del ligante restringe el uso de sustratos pequeños, tal vez sólo a dipéptidos.

Un sistema muy parecido al anteriormente descrito, es el presentado por Koike T., se trata de un complejo de Zn(II) con el ligante octaazacriptando (26-hidroxi-1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22-octaazabicyclo[11.11.3]heptacosano, HL), Zn_2L , el cual es dinuclear al igual que en el caso de la fosfatasa alcalina. ^[84]

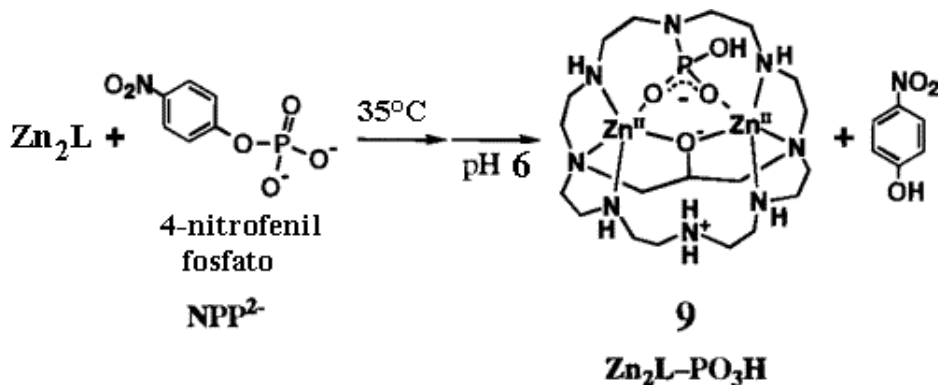


Figura 1.24 Mecanismo propuesto para la hidrólisis de NPP^{2-} con Zn_2 -octaazacriptando (Zn_2L)

La efectividad del complejo se presenta en la hidrólisis de fosfoésteres polianiónicos como el 4-nitrofenilfosfoéster con doble carga, NPP^{2-} y adenosin-trifosfato tetraaniónico ATP^{4-} , pero no con el monoanión bis(4-nitrofenilfosfodiéster), ni con el tris(4-nitrofenil)fosfotriéster, o con el acetato de 4-nitrofenilo.

La variación de k_{obs} en función del pH para este sistema muestra comportamiento en forma de campana con pK_1 de 5.2 y pK_2 de 6.3 los cuales fueron asignados a las constantes de protonación para $\text{NPP}^{2-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HNPP}^-$ y $\text{NH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HNH}^+$, respectivamente; NH es un donador apical liberado en la reacción.

Neverov y colaboradores, realizaron la metanólisis de acetilimidazol (1) y el complejo $(\text{NH}_3)_5\text{Co}^{\text{III}}\text{AcIm}$ (2) catalizada por los iones metálicos Zn(II), Co(III) y La(III). Los estudios cinéticos fueron realizados en un intervalo de ^spH entre 1 y 14 (^spH es el $-\log[\text{H}]$ en metanol al 99.8%), los iones metálicos son solubles en el medio a través de la región de pH donde ocurre la ionización del $\text{M}^{x+}(\text{CH}_3\text{OH})_y$. Los iones Zn(II) y Co(II) actúan como ácidos de Lewis hacia el acetilimidazol, catalizando el ataque de un metóxido externo sobre el complejo acetilimidazol- M^{2+} ($1:\text{M}^{2+}$) a valores de sólo 100 veces menor que el límite de difusión. [85]

Neverov propone que el mecanismo más razonable involucra el ataque de un metóxido externo sobre el complejo transitorio formado $1:\text{M}^{2+}$, el valor para la metanólisis catalizada es de $k_{\text{OR}} = 5.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para Zn(II) y $2.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para Co(III).

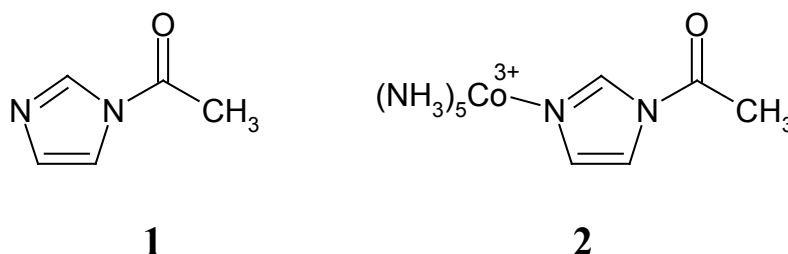


Figura 1.25 Amidas activadas acetilimidazol (1) y el complejo $(\text{NH}_3)_5\text{Co}^{\text{III}}\text{AcIm}$ (2) inerte al intercambio de ligante, en la metanólisis fuertemente catalizada por $\text{Zn}(\text{II})$ y $\text{Co}(\text{II})$.

De sus resultados se desprende que el metanol es un nucleófilo 10 veces menos reactivo que el agua, pero el metóxido en metanol es 26 veces más reactivo que el OH^- en agua. En agua el ataque del OH^- sobre **2**, figura 1.25, se incrementa sólo 24 veces en relación al ataque de OH^- sobre **1**, sin embargo el ataque de $^-\text{OCH}_3$ en metanol es acelerado 5900 veces.

El ataque acelerado de los aniones sobre el catión **2** en MeOH , relativo a aquél en H_2O , se puede anticipar sobre la base electrostática, esto, dado que las fuerzas atractivas entre iones de carga opuesta son inversamente proporcionales a la constante dieléctrica del medio.

Al igual que en el caso anterior, Koike T. usa como sustrato una amida activada, el anillo β -lactama de bencilpenicilina, y para su hidrólisis emplean como catalizador un complejo de $\text{Zn}(\text{II})$ y 1, 4, 7, 10-tetraazaciclododecano (cyclen). En este complejo se tiene a un $\text{Zn}(\text{II})$ tetracoordinado con una quinta posición ocupada con una molécula de H_2O que se desprotona a pH suficientemente cercano a la neutralidad, pK_a de 7.9. Al igual que en los otros casos, la variación de la constante de velocidad en función del pH describe una curva sigmoideal con un punto de inflexión que corresponde al pK_a de desprotonación del agua. La constante de velocidad de segundo orden tiene un valor de $4.1 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 25°C y fuerza iónica de 0.1 M. ^[86]

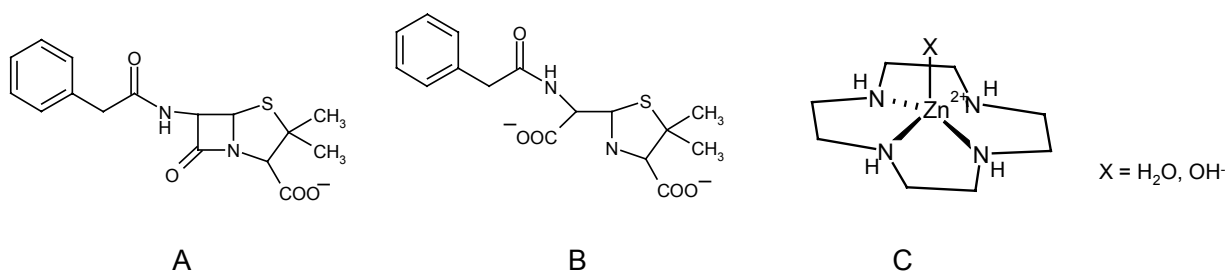


Figura 1.26 A bencilpenicilina (sustrato), B (5R)-bencilpeniciloato (producto), C Zn^{II} -cyclen (catalizador)

El mecanismo propuesto consiste en ataque al carbono de carbonilo de la lactama por parte del OH^- coordinado al Zn-cyclen para dar como producto el (5R)-bencilpeniciloato, véase la figura 1.26.

Dentro del mismo tipo de ligantes azacíclicos uno de los trabajos que sirven de referencia para otros autores, es el de Kimura E. y colaboradores, ^[87] donde realizan la síntesis y caracterización de varios ciclos tri y tetra-aza, además del cálculo de la constante de estabilidad para sus diferentes complejos con Zn(II).

Entre otras, también miden la constante de desprotonación del agua en dichos complejos, la cual tiene una relación con la constante de estabilidad. Encuentran que el complejo macrocíclico menos estable posee el menor de los valores de pK_a . Claro está que los N_4 tendrán las mayores estabilidades y los pK_a más altos, como en el caso de Chin J. abajo citado. ^[88]

El pK_a del agua coordinada al complejo del ligante ciclo-triaazadodecano ($\text{N}_3[12]$ ona) es de 7.3, *similar* a la presentada por la *anhidrasa carbónica (CA)*.

El complejo Zn^{2+} - $\text{N}_3[12]$ ona fue probado en las reacciones de hidratación de acetaldehído, y en la hidrólisis del acetato de metilo y 4-nitrofenil-acetato. Para el primer sustrato se observa una línea recta en un gráfico de absorbancia, señal a 280 nm del carbonilo, en función de la concentración del complejo de Zn (a un pH fijo). La constante catalítica en función del pH ($T=0^\circ\text{C}$) muestra una curva con punto de inflexión en $\text{pH}= 7.9\text{-}8.0$, que corresponde justamente al valor de la constante de desprotonación del agua coordinada al complejo (a 0°C). La constante de velocidad máxima para este sistema es de $200 \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1})$ muy similar a $196 \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1})$ reportada por Chin J. con macrociclo N_4 . ^[88]

La hidrólisis de acetato de metilo muestra un comportamiento similar al del sustrato anterior y la constante catalítica en función del pH presenta una curva con punto de inflexión en 7.3 que también corresponde al valor del pK_a calculado termodinámicamente.

Uno de los primeros trabajos con sistemas cíclicos y el ion Zn(II) lo presentó Chin J., ^[88] el autor informa la hidrólisis catalítica del trifluoacetato de metilo efectuada en medio acuoso a pH 8 y 25°C y cantidades variables del complejo que el llama ZOH, figura 1.27, la reacción es seguida por la técnica potenciométrica pHstat. ^[89]

Con 50 mM de ZOH la hidrólisis del trifluoacetato de metilo incrementó su velocidad de reacción 6 veces, en tanto que para el acetato no hubo cambios. Una disolución amortiguadora de boratos 10 mM o de imidazol no produce cambios en la reacción, lo que significa que una catálisis básica debe ser pequeña.

La catálisis nucleofílica para la hidrólisis de ésteres o de amidas donde el nucleófilo entrante es más débil que el grupo saliente no se ha observado, salvo el caso en el que dicho nucleófilo se encuentra enlazado al sustrato. ^[90]

En las condiciones de nucleófilo más débil que el saliente, puede suceder la reacción hacia productos si la velocidad de ruptura de los enlaces **a**, o **b** es más rápida que **c**, véase la figura 1.28. En otras palabras el intermediario T debe tener un tiempo de vida mayor al intermediario TZ. ^[88]

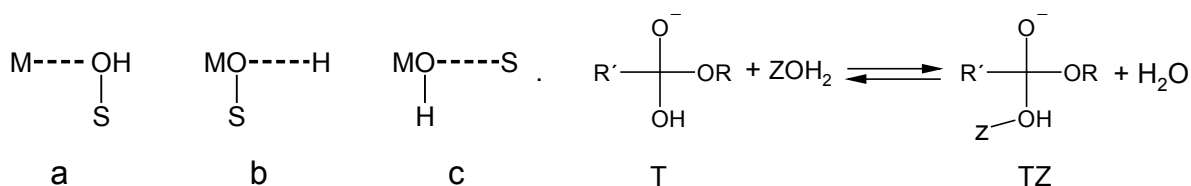


Figura 1.28 a, b y c posibles formas de ruptura de enlaces del intermediario de reacción

En la bibliografía encuentran que TZ/T es igual a ZOH_2/H_2O , y que a 10 mM de ZOH TZ/T es aproximadamente 10^{-4} . Si el tiempo de vida de T es de 10^{-1} s, entonces el tiempo de vida del enlace C-O en el intermediario TZ debe ser de 10^{-5} a 10^{-6} s. La basicidad del grupo saliente en T es mayor que aquella en TZ por un factor de 10^7 .

Es decir que el ZOH no sólo cataliza la formación de T sino también su ruptura hacia la formación de productos, de ahí que la expulsión del metóxido puede ser la etapa

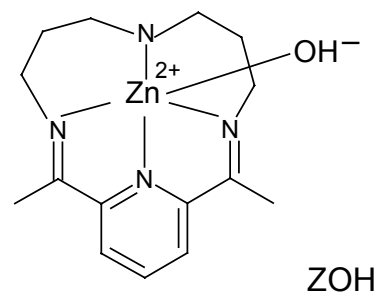


Figura 1.27 Complejo ZOH usado en la hidrólisis de la amida metiltrifluoroacetato. ^[77a]

determinante en la reacción no catalizada. La reacción catalizada con ZOH sigue siendo más lenta que aquella llevada a cabo con puro OH^- .

Una variante en los ligandos azacíclicos es la introducción de una cuarta o incluso quinta coordinación sobre el Zn(II) mediante la inserción de un grupo $-\text{R-OH}$. En el grupo de Xia Jiang ^[91] estudian la hidrólisis del 4-nitrofenil-acetato (NA) con el complejo formado entre Zn(II) y el ligante 2-[bis(2-aminoetil)amino]etanol, la temperatura fue de 25°C en mezcla $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (10%), y a los valores de pH de 8.09, 8.5, y 8.9, $I=0.10$ (90mM, NaNO_3), la reacción es seguida espectroscópicamente por la aparición de la señal de nitrofenol formado, a la longitud de onda de 400 nm.

La estructura monomérica del complejo presenta un grupo alcohol muy ácido con pK_a de 7.7 a 25°C , esto probablemente, le permite una constante de velocidad catalítica de segundo orden de $0.13 \pm 0.01 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ similar a la presentada por el complejo $[\text{12}]_{\text{aneN}_3}\text{-Zn}$, calculada a partir de la $k_{\text{obs}} = 0.12 \pm 0.01 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y el pK_{a1} de desprotonación del complejo. A diferencia del monómero la especie dinuclear no es activa en la hidrólisis de NA, figura 1.29.

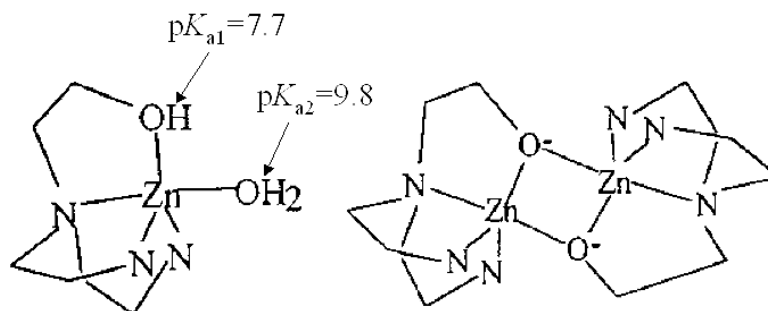


Figura 1.29 Complejos mononuclear y dinuclear formados a partir de Zn(II) y el ligante 2-[bis(2-aminoetil)amino]etanol, usados en la hidrólisis de 4-nitrofenil-acetato.

El mecanismo propuesto consiste en el ataque del complejo desprotonado ZnH_{-1}L al carbono del carbonilo con la liberación del *p*-nitrofenolato como la etapa determinante, seguido del ataque intramolecular de la molécula de agua desprotonada coordinada al Zn(II) con la subsiguiente liberación del ácido carboxílico.

De la misma forma que en el caso anterior, en otro trabajo, Koike T. utiliza el cyclen modificado con un alcohol (1-(2-hidroxi)etil)-1, 4, 7, 10-tetraazaciclododecano) que se puede

coordinar en la quinta posición al Zn(II) para la hidrólisis de 4-nitrofenilacetato, el medio de reacción es acetonitrilo al 10% (v/v), temperatura de 25°C, y fuerza iónica $I=0.1\text{M}$ (NaNO_3). Sin embargo, la especie activa en la hidrólisis es el complejo con el alcohol sin coordinarse al Zn(II) y en su lugar se encuentra una molécula de agua cuyo pK_a es de 7.6. ^[92]

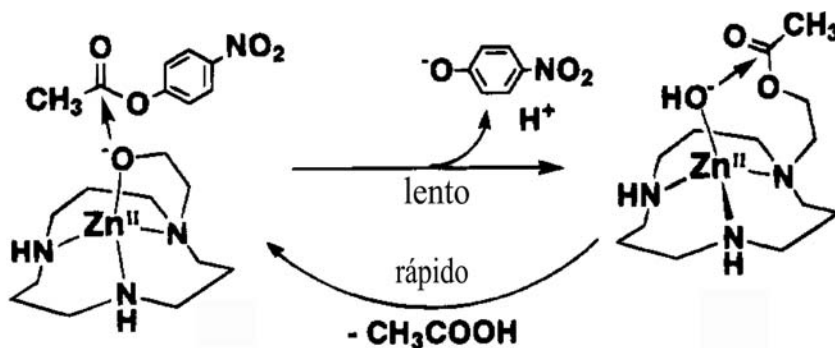


Figura 1.30 Hidrólisis del 4-nitrofenilacetato catalizada por el complejo Zn-(1-(2-hidroxietil)-1, 4, 7, 10-tetraazaciclododecano).

En el intervalo de pH comprendido entre 6.4 y 9.5 la velocidad de reacción mostró un comportamiento sigmoïdal con un punto de inflexión que corresponde al valor del pK_a mencionado. La constante de velocidad de segundo orden (de primer orden respecto de $[\text{ZnLOH}^-]$ y también de primer orden respecto de $[\text{NA}]$) es de $0.46 \pm 0.01 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. El mecanismo propuesto consiste en un doble desplazamiento del grupo acetilo. En el primer paso, que es determinante de la reacción, el nucleófilo es el OH alcohólico activado por el Zn-OH⁻ adyacente, el cual ataca al NA para dar un intermediario acilo y el nitrofenolato. En la segunda etapa se produce la hidrólisis a través de un ataque intramolecular.

En otro sistema propuesto por Ruf M. y Vahrenkamp H., se introduce una cavidad altamente hidrofóbica alrededor del ion zinc ($\text{HO-Zn(II)-Tp}^{\text{Cum,Me}}$, con $\text{Tp}^{\text{Cum,Me}}$ = tris(3-cumenil-5-metilpirazolil)hidroborato), aunque con esto se disminuye su solubilidad en agua, de hecho, las reacciones se realizan en benceno o en diclorometano y estuvieron completas en media y una hora a temperatura ambiente. ^[93]

Conforme a los autores, su compuesto es un fuerte nucleófilo y es capaz de incorporar sustratos lábiles tales como: *p*-nitrofenolato, β -lactona, y trifluoroacetato, y las amidas

altamente activadas trifluoroacetamida y propiolactama; no les fue posible trabajar con sustratos menos activados.

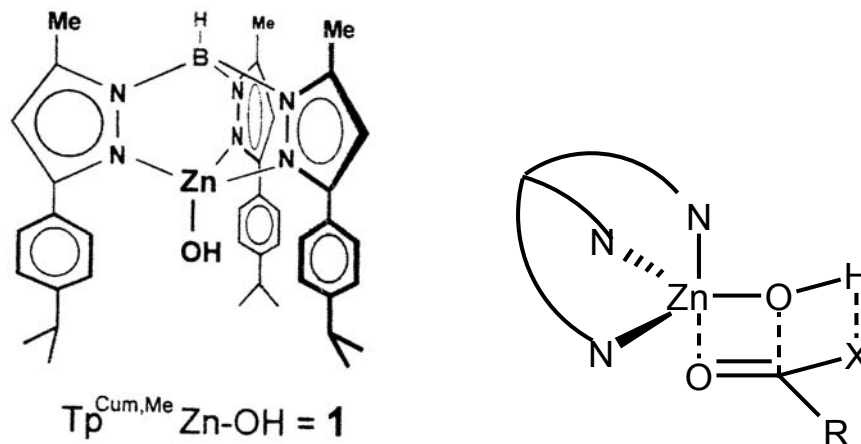


Figura 1.31 Estructura del complejo $(\text{HO-Zn(II)})\text{-Tp}^{\text{Cum,Me}}$ y su reacción con el sustrato

De sus resultados de difracción de rayos X se observa que el sustrato queda coordinado al Zn a través del oxígeno de carbonilo por lo que se activa el carbono para un ataque nucleofílico que corresponde al OH^- coordinado también al zinc. Además, el hidrógeno del OH^- queda cerca del grupo saliente, figura 1.31.

El hecho de que la cavidad sea hidrofóbica y que se usen disolventes no polares favorece la coordinación del ácido generado al Zn, como consecuencia la reacción es estequiométrica mejor que catalítica. Esas mismas características disminuyen la posibilidad de que existan otras moléculas de H_2O cerca del centro de reacción por lo que la concentración de OH^- debe ser pequeña.

A manera de guía, en la Tabla 1.1 se resumen los datos cinéticos para la hidrólisis de péptidos sencillos en presencia de iones y complejos metálicos encontrados en parte de la literatura.

Tabla 1.1 Resumen de sistemas catalíticos encontrados en la bibliografía aplicados a la hidrólisis de amidas y péptidos

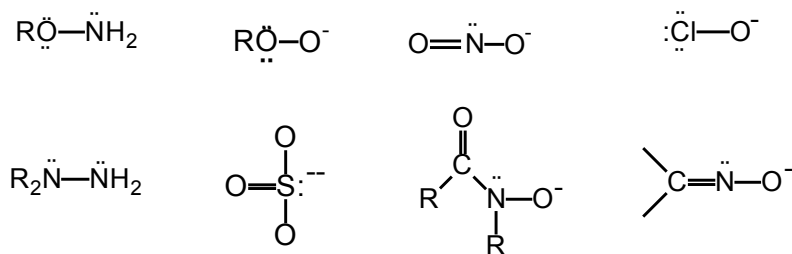
Substrato	Catalizador	T, °C	pH	k_{obs}, s^{-1}	Referencia
GNH ₂ ^{a)}	Cu(II)	66	9.35	2.45×10^{-5}	[54]
GG ^{b)}	[Co N ₄ (OH)(OH ₂) ²⁺	80	7.5	2.6×10^{-8}	[56]
GG	Zn(II)	93	6	1.2×10^{-5}	[94]
GG	Zn(OBISDIEN) ²⁺	70	8.5	4.6×10^{-7}	[82]
GG	Cu([9]aneN ₃) ²⁺	50	8.1	2.6×10^{-7}	[63]
H-G ^{c)}	[Pd(en)(H ₂ O) ₄] ²⁺	60	1.46	2.8×10^{-5}	[61a]
M-G ^{d)}	[Pd(OH)(H ₂ O) ₃] ⁺	40	0.53	1.4×10^{-3}	[61a]
GG	[Ce(NH ₄) ₂ (NO ₃) ₆]	50	7.0	7.8×10^{-5}	[64]
GG	Ninguno	60	7.0	3.6×10^{-9}	[4]
GG	Zn(II)	85	6.0	$\sim 10^{-6}$	[23]
G-S, A-S ^{e)}	Zn(II)	70	7.0	-	[81]
AcIm ^{f)}	Zn(II)/ metanol	25	9.5	$5.6 \times 10^{-7} M^{-1} s^{-1}$	[85]
Bencilpenicilina	Zn-cyclen	25	7.9	$4.1 \times 10^{-2} M^{-1} s^{-1}$	[86]
Trifluoroacetamida ^{g)}	(HO-Zn(II)-Tp ^{cum,Me} / benceno o diclorometano	25	-	-	[93]
Lactama ^{h)}	Cu(II)	50	7.0	3.3×10^{-5}	[50]
Lactama ^{h)}	Zn(II)	50	6.58	2.5×10^{-7}	[50]

a) GNH₂ glicinamida; b) G-G, glicilglicina; c) H-G; histidilglicina; d) M-G, Metionilglicina; e) G-S glicilsisteina, y AS alanilsisteina; f) ACIC, acetil-imidazol; h) Lactama, 1-[(6-(dimetilamino)metil)-2-piridil]metilhexahidro-1,4-diazeepin-5-ona.

Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en medio acuoso a excepción de f) y g) las cuales se realizaron en metanol y benceno respectivamente.

α -nucleófilos

Los α -nucleófilos o nucleófilos con *efecto alfa* se caracterizan por la existencia de un átomo con pares de electrones libres en posición adyacente (posición α) al átomo donador, como lo muestran los siguientes dibujos:



El efecto alfa se refiere al hecho de que las constantes de velocidad o de equilibrio de reacción de estos nucleófilos son mayores a las esperadas para nucleófilos con valores de pK_a similares, de manera que en un gráfico de $\log(k)$ en función del pK_a se verán como desviaciones positivas de la ecuación lineal (ecuación de Brønsted, $\log k_b = \log G_b + \beta(\text{pK}_a)$) que relaciona a esas dos magnitudes. En otras palabras, los α -nucleófilos presentan una alta nucleofilia anormal relativa a sus basicidades, ^[11] véase la figura 1.32.

El efecto alfa no se debe a una sola causa o propiedad distintiva de los nucleófilos, y existen muchos factores diferentes que influyen en su reactividad. Por ejemplo, la gran reactividad del anión hidropéroxido puede ser adscrita a su gran polarizabilidad. La reactividad del hipoclorito puede deberse a una catálisis ácida general por el átomo de cloruro, y muchos compuestos con efecto α presentan una inusual estabilidad termodinámica de enlace con carbono, aunque otros no. ^[95]

Sin embargo, es útil tener un término inclusivo que describe los efectos, estos no están completamente entendidos, y es probable que el átomo electronegativo con un par de electrones libres y en posición α contribuya directamente a la incrementada nucleofilia de algunos si es que no de todos estos compuestos.

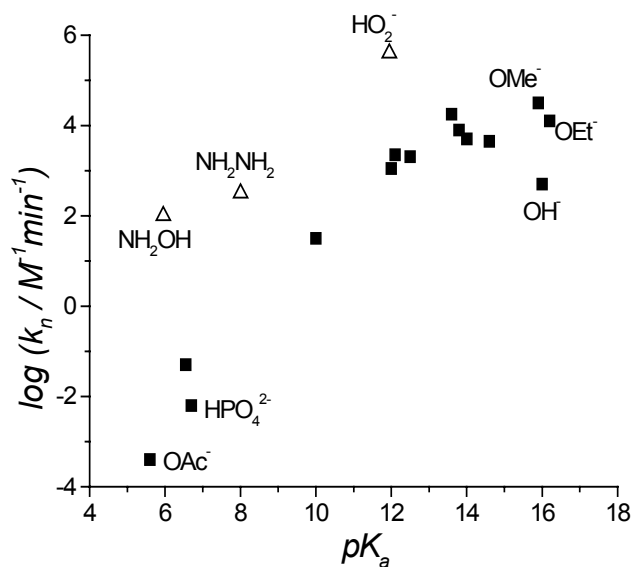


Figura 1.32 Gráfico del tipo Brønsted para la reacción nucleofílica del p-nitrofenil acetato, ■ oxígeno-aniones en agua a 25°C, Δ nucleófilos con efecto alfa.

El papel generalmente propuesto para este par de electrones es que incrementa la nucleofilia mediante un incremento en la densidad electrónica efectiva del centro de reacción.^[95] Una aparente dificultad con esta proposición, es que requiere la existencia de un átomo donador con más enlaces y electrones que lo normalmente posible sin ninguna expansión de su capa de valencia. De cualquier forma, el número de electrones no es excesivo comparado con el número de orbitales atómicos disponibles en cada sistema, y si los orbitales p para cada uno de los átomos involucrados se hibridan para dar orbitales moleculares involucrando al sistema completo, es posible obtener un sistema estable sin la utilización de orbitales d . Este es el mismo tipo de hibridación que es usado para explicar el carácter covalente del enlace de hidrógeno, el estado de transición para una simple sustitución (S_N2) sobre carbono, y la formación de complejos polihaluros tales como I-I-I^- sin la utilización de orbitales de alta energía, aunque cada una de estas situaciones involucre el enlace del átomo central a más átomos que lo usual. En estos sistemas el átomo central está enlazado a dos átomos externos mediante un solo enlace que involucra dos electrones. El otro par está en un orbital no-enlazante que involucra a los dos átomos externos, lo cual resulta en una alta densidad de carga sobre esos átomos.^[96]

Esta es una situación favorable para una reacción nucleofílica en la cual una alta densidad de carga sobre el sustrato ayuda a la expulsión del grupo saliente. Además, aun en el estado fundamental el peróxido de hidrógeno puede ser útilmente considerado como un sistema de dos átomos de oxígeno los cuales están conectados por enlaces múltiples similar a aquellos de la molécula de oxígeno, con los átomos de hidrógeno enlazados a cada uno de los electrones desapareados que a su vez están en orbitales antienlazantes.^[97]

Estos ejemplos sugieren que el alto número de enlace resultante de los átomos nucleofílicos en los compuestos con efecto α no excluye una participación energéticamente favorable del par de electrones sobre el átomo adyacente en el estado de transición.^[11] El orbital extra disponible en sustratos insaturados puede facilitar la formación de orbitales moleculares estables, y es justamente en reacciones de sustratos insaturados donde se han observado la mayoría de los ejemplos del efecto α .

Alternativamente el par de electrones libres del átomo α pudiera interactuar directamente con el sustrato, o tal vez el efecto α no tenga que ver nada con este par de electrones, pero en cambio el efecto es una consecuencia de la electronegatividad del átomo α .

Klopman ha explicado el efecto α a través de la *teoría de reacciones controladas por carga y orbitales frontera*. Para ello propone que el cambio de energía libre para la interacción de un nucleófilo y de un electrófilo en un disolvente dado, puede estar representado por una ecuación de dos términos:

$$\Delta G^\ddagger = (\text{término de interacción carga-carga}) + (\text{término de interacción covalente})$$

El primer término representa la interacción electrostática de dos átomos que reaccionan entre sí, y el segundo representa la formación del enlace covalente en el estado de transición. Si la diferencia de la energía orbital $E_m^* - E_s^*$ es muy grande entonces la energía de formación del estado de transición estará controlada por el primer término y será una reacción controlada por carga, véase la figura 1.33

Por el otro lado, si la diferencia de energía entre el orbital molecular más alto ocupado del donador y el más bajo desocupado del aceptor (orbitales frontera) es pequeña, entonces la velocidad de reacción será controlada por la transferencia de carga o covalencia del nuevo enlace, en otras palabras, la reacción está controlada por los orbitales frontera.

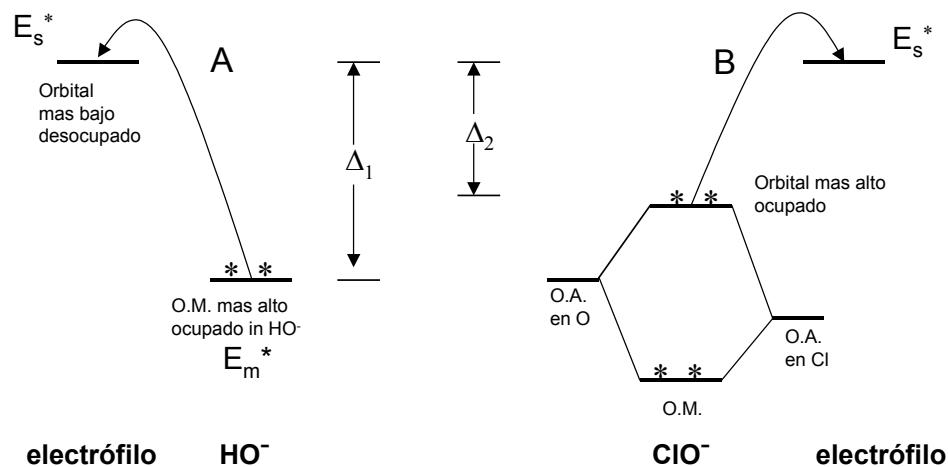


Figura 1.33 Diagrama de niveles de energía de los nucleófilos OH^- y ClO^- , en el ataque a un electrófilo.

En la figura 1.33 se comparan los niveles energéticos de los nucleófilos OH^- y el ClO^- , en el de tipo α existe una interacción entre los orbitales $p\pi$ de los átomos de oxígeno y de cloro que produce una separación de los niveles de energía, la gran reactividad de los nucleófilos α resulta de esta separación orbital que aumenta la energía del orbital más alto ocupado. La diferencia de energía entre los orbitales frontera es más pequeña para ClO^- y el electrófilo que para aquella que existe entre el mismo electrófilo y el OH^- , es decir que hay un incremento en la covalencia del nuevo enlace. De lo anterior se desprende que el efecto α será observado en aquellas reacciones en las cuales el ataque del nucleófilo sea la etapa determinante.^[98]

En otra interpretación, la reactividad del mismo hipoclorito puede ser el resultado de una asistencia ácido general concurrente al ataque nucleofílico, como se muestra en la figura 1.34.^[95]

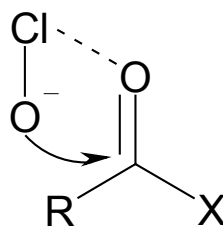


Figura 1.34 El mecanismo de la reacción entre hipoclorito y un sustrato carbonílico según Jencks.^[11]

Puede suceder que los factores que desestabilizan al material inicial, tales como una solvatación desfavorable o una interacción energéticamente desfavorable del par de electrones sobre el átomo adyacente, pudieran causar un incremento en la reactividad nucleofílica si la desestabilización fuera disminuida en el estado de transición. Por ejemplo, las diferencias en la solvatación de ácidos, bases y complejos activados son una importante causa de desviaciones de la relación de Brønsted y la dirección de tales desviaciones depende de la solvatación relativa de los reactivos y del complejo activado.^[99]

Un punto de vista inicial se enfocó sobre la desestabilización del nucleófilo α a través de la repulsión par-par y este tipo de explicación del estado fundamental recibió soporte en la representación de los orbitales moleculares. De cualquier manera, una variedad de evidencias apoyan la idea de que la estabilización del estado de transición (TS) podría contribuir al fenómeno del efecto α , así se han propuesto modelos tales como: TS tipo aromático, TS radicaloide y un TS en el cual la extensión del enlazado nucleofílico excede la partida del grupo saliente.^[100] La estabilización del producto también se ha propuesto. Pero tal vez la propuesta más aceptada sea que el efecto de la solvatación es la responsable parcial o total de la manifestación del efecto α .

Ejemplo de esto último lo muestran Ik-Hwan Um y Erwin Buncl, ^[101] ellos explican las diferencias de reactividad de los nucleófilos, el monoximato de butano-2,3 diona (nucleófilo α , Ox^-) y el *p*-clorofenóxido (nucleófilo normal, ClPhO^-), frente al sustrato S tioacetato de *p*-nitrofenilo (PNPTA), figura 1.35, en función de estudios calorimétricos y cinéticos en mezclas de disolución DMSO- H_2O .

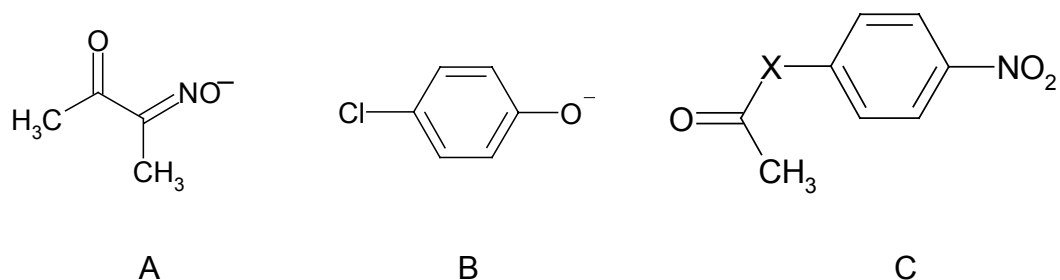


Figura 1.35 A, nucleófilo α Ox^- , B, ClPhO^- nucleófilo normal y C es el sustrato donde $\text{X} = \text{O}$ ó S .

La entalpía de disolución (ΔH_s) de Ox^- excede a aquella para ClPhO^- en todo el intervalo de la composición de la mezcla de disolventes. La diferencia de entalpía de disolución para Ox^- y ClPhO^- ($\Delta\Delta H_s$) se incrementa con el incremento en el contenido de DMSO hasta un 30% de este disolvente, a porcentajes mayores la $\Delta\Delta H_s$ permanece casi constante (hasta un 90% de DMSO).

Al mismo tiempo, la relación de las constantes de velocidad $k_{\text{Ox}^-}/k_{\text{ClPhO}^-}$ para el sustrato PNPTA en función de la composición del disolvente también presenta un incremento hasta un 30% de DMSO a partir del cual permanece casi constante con las subsiguientes adiciones del disolvente aprótico.

De lo anterior se desprende que la desolvatación diferencial en el estado fundamental entre Ox^- y ClPhO^- es la responsable del efecto α en todo el intervalo del medio estudiado. ^[101]

Metaloenzimas

Una enzima que contiene un catión metálico como grupo prostético, ^[102] y cuya participación es esencial par el proceso catalítico, recibe el nombre de **metaloenzima**. Habrá que distinguir dos tipos de estas enzimas: i) aquellas en las que el metal se encuentra fuertemente unido a la proteína, y que son en realidad las verdaderas metaloenzimas; ii) aquellas que contienen el metal fácilmente dissociable y que suelen llamarse enzimas activadas por metales.

Algunas enzimas dependen para su actividad solamente de su estructura proteica, mientras que otras necesitan la coparticipación de estructuras no proteicas o *cofactores*. En muchas enzimas el cofactor es el participante directo en el proceso catalítico y en otras actúa como transportador transitorio de algún grupo funcional específico. Aunque los cofactores aparecen en cantidades muy pequeñas en las células, son esenciales para la acción de muchas enzimas y desempeñan por lo tanto, un papel muy importante en el metabolismo celular.^[103]

En la naturaleza existe un gran número de enzimas que catalizan diferentes reacciones, y que de acuerdo con la *Enzyme Commission (EC) de la IUPAC* se clasifican en los siguientes grupos, Tabla 1.2.

Tabla 1.2 Clasificación de enzimas conforme a la EC de la IUPAC

1er.No.EC	Clases de enzimas	reacciones
1	Oxidorreductasas	oxidación-reducción
2	Transferasas	transferencia de grupos químicos
3	Hidrolasas	ruptura hidrolítica de enlace
4	Liasas	ruptura de enlace no hidrolítica
5	Isomerasas	cambia arreglo átomos en moléculas
6	Ligasas	une 2 ó más moléculas

La hidrólisis de enlaces peptídicos es catalizada por enzimas llamadas peptidasas que pertenecen a la clase de las hidrolasas. Dos peptidasas son bien conocidas la *carboxipeptidasa A (CPA)*, y la *termolisina*, ellas comparten muchas propiedades, entre otras el ion metálico Zn(II) que coordina al mismo tipo de residuos de proteína, estas enzimas son una sola cadena polipeptídica con peso molecular en el intervalo de 30 a 40 kDa.. Las metalohidrolasas de ésteres carboxílicos y ésteres fosfóricos también son enzimas de Zn.^[104]

Para las metaloenzimas de Zn se han propuesto de manera general dos mecanismos, a través de los cuales se plantea la forma en la cual el Zn efectúa la catálisis. El primero de ellos, el nombrado mecanismo *Zinc-Carbonilo*, propone que el sustrato se enlaza directamente al Zn y en el proceso, desplaza una molécula de agua enlazada al metal. El Zn actúa en este caso como un ácido de Lewis y polariza el enlace del sustrato, por lo tanto se facilita el ataque nucleofílico, figura 1.36(a). De acuerdo con esta hipótesis, la función del Zn es activar al electrófilo.

El segundo mecanismo es el conocido como *Zinc-Hidróxido*, propone que el sustrato no se une directamente al metal y que el Zn regula su función a través del par metal-agua, donde la molécula de agua no es desplazada sobre el enlace del sustrato. El Zn en este caso disminuye el pKa de la molécula enlazada desde un valor de ~ 14 hasta ~ 7 . La especie resultante es un ion metal-hidróxido que puede atacar al sustrato. De ahí que en esta hipótesis, la función de Zn es la de activar al nucleófilo, figura 1.36(b).^[71]

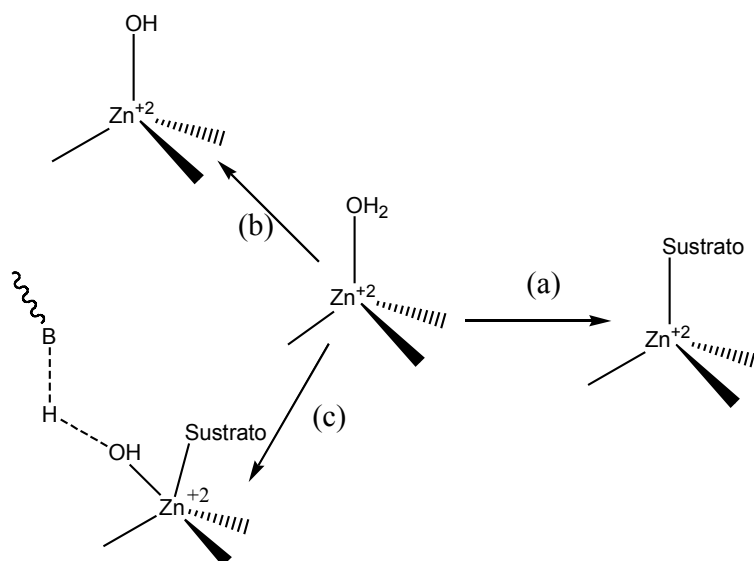


Figura 1.36 Posibles mecanismos para enzimas de Zn: (a) Activación del sustrato, (b) activación del nucleófilo, (c) realizando las dos funciones, mecanismo integrado, en donde B es una base.

Estas dos hipótesis no son necesaria y mutuamente excluyentes, por lo que se puede pensar en un tercer mecanismo que los integre. Para esta hipótesis integrada el sustrato se enlaza directamente al metal pero no desplaza a la molécula de agua, lo que resulta en un intermediario pentacoordinado, figura 1.36(c). Las funciones del Zn entonces pueden ser ambas, polarizar al sustrato y activar a la molécula de agua, la cual actúa como nucleófilo. Además, el metal, a través de su número de coordinación y geometría flexibles, puede actuar como una plantilla que acerca al sustrato y al nucleófilo; esta sugerencia es consistente con la naturaleza entáptica del metal. Este tercer mecanismo fue propuesto originalmente para la anhidrasa carbónica, y encuentra soporte en estudios cristalográficos recientes mostrando que CO₂ y H₂O están enlazadas simultáneamente al átomo de Zn catalítico en esta enzima.^[105]

Carboxipeptidasa A

La CPA cataliza la hidrólisis de los enlaces amídicos de los aminoácidos carboxi terminales en proteínas, también muestra una gran preferencia hacia sustratos con cadenas laterales aromáticas e hidroliza ésteres. ^[106] La figura 1.37 muestra en una forma esquemática las estructuras del complejo enzima-sustrato (a) y del estado de transición de hidrólisis (b).

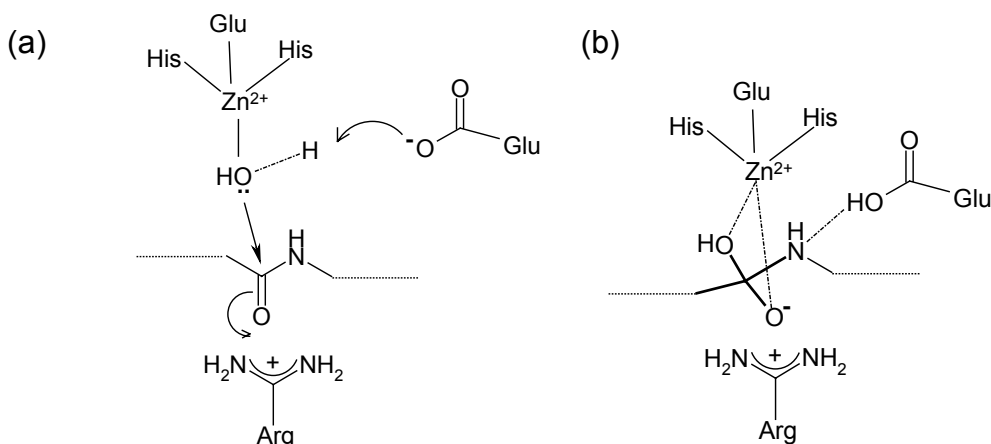


Figura 1.37 Esquema sobre el mecanismo catalítico de la enzima carboxipeptidasa A.

En el sitio activo hay un ion metálico coordinado a tres grupos donadores de la proteína, en tal forma que una de las posiciones de coordinación del metal queda libre para enlazar una molécula de agua $[(\text{His})_2(\text{Glu})\text{Zn}^{\text{II}}-\text{H}_2\text{O}]$, la estructura resulta en una geometría tetraédrica. Esta unión baja considerablemente el pK_a del agua coordinada, es decir facilita su desprotonación convirtiendo a un nucleófilo débil, H_2O , en uno fuerte OH^- , ($\text{pK}_a = 7$, ^[107]) esto significa tener iones hidróxido a pH neutro. La desprotonación del agua coordinada está favorecida por la formación del enlace de hidrógeno con un carboxilato de un glutamato vecino (Glu 270). En el estado de transición el carbonilo del grupo peptídico se transforma en un alcóxido estabilizado por coordinación con Zn^{2+} y por formación de un par iónico con un grupo arginina (Arg 127). El grupo carboxilo (Glu 270) realiza la transferencia de un protón al grupo amina saliente.

Es importante decir que en este modelo simplificado, no se habla del papel de la cavidad de la enzima, la cual juega un papel muy importante al reconocer y asegurar al sustrato.

De este mecanismo podemos concluir que los factores importantes son: (1) coordinación de nucleófilo, que induce su desprotonación, (2) estabilización del alcóxido en el estado de transición, (3) donación del protón al grupo saliente.

En relación al factor (1), en términos generales se sabe que la constante de acidez de los nucleófilos coordinados puede modificarse notablemente; como en el caso del agua cuyo pK_a se disminuye alrededor de 5 órdenes de magnitud cuando se coordina a Mn(II) y hasta 12 cuando lo hace a Hg(II).^[108] Sin embargo, es importante que la disminución de la basicidad del nucleófilo desprotonado no lleve a una disminución de su reactividad nucleofílica. Llevar a cabo los efectos (2) y (3) es más difícil y requiere un diseño especial del ligando unido al ion metálico.

A manera de resumen, diremos que la etapa crucial en todas las reacciones catalizadas por enzimas conteniendo Zn es la polarización de algún enlace importante del sustrato y esa polarización facilita la o las reacciones subsiguientes. Debemos mencionar que aun en los casos de la participación de Zn como elemento esencial en las óxido-reductasas su papel es básicamente el mismo, ya que en esos sistemas habitualmente es utilizado para posicionar adecuadamente al sustrato y de ninguna manera está involucrado en el proceso redox; el ion metálico presenta un único estado de oxidación estable.^[109]

2 Objetivos

Con base en lo visto anteriormente, es necesario un mayor esfuerzo para desarrollar un sistema de ruptura de péptidos, útil en disoluciones acuosas neutras. En este trabajo se propone realizar la sustitución nucleofílica de pequeños péptidos y amidas no activadas, empleando nucleófilos con *efecto α* , tal como lo presentan la hidroxilamina (*hidroxilaminólisis*) y el peróxido de hidrógeno (*peroxidólisis*) en lugar de realizar directamente la hidrólisis.

La hidroxilamina y el peróxido de hidrógeno son fuertes nucleófilos para el enlace amídico. Del estudio de hidroxilaminólisis de formamida realizado por Jencks,^[43] se muestra que la velocidad de reacción tiene un máximo cerca de pH 6 debido a la catálisis ácida general provocada por el catión de la hidroxilamina NH_3OH^+ . La constante observada de primer orden a 39°C para la reacción de formamida con hidroxilamina 1M a valores de pH óptimo, es solo 10 veces menor que aquella para la hidrólisis alcalina con NaOH 1M. Podría considerarse que la hidroxilamina es un nucleófilo conveniente para la ruptura de amidas en disoluciones neutras, la cual podría requerir una modesta catálisis para conseguir velocidades de reacción aceptables.

Los iones metálicos que participan en la hidrólisis de diferentes tipos de sustratos han mostrado su efectividad catalítica solos o coordinados, como fue mostrado en la sección de antecedentes para el caso de amidas, así que teniendo esto en consideración se propone el uso de iones metálicos en el estudio de la hidroxilaminólisis de nuestros sustratos.

Los intentos para observar la catálisis de iones metálicos en la hidroxilaminólisis de sustratos más reactivos como los anhídridos y ésteres, no han tenido éxito a pesar de que la hidrólisis de ambos sustratos fueron enormemente aceleradas por los mismos iones metálicos. La razón de este comportamiento diferente es que la hidrólisis catalítica involucra el ataque nucleofílico del anión hidróxido coordinado al metal sobre los sustratos, y tal mecanismo para

la hidroxilamina es imposible debido a que el nitrógeno de NH_2OH solo tiene un par de electrones desapareado, el cual puede ser usado ya sea para su coordinación con el metal o para el ataque nucleofílico al sustrato.

Para la peroxidólisis, el uso de iones metálicos resulta difícil, puesto que prácticamente todos producen la descomposición de tal nucleófilo. Sin embargo es posible buscar una catálisis ácido-básica con la especie neutra, H_2O_2 , y su anión HO_2^- (pK_a 12.5), la reacción requiere por lo tanto un medio básico.

El anion hidroperóxido es una base débil si se compara con los grupos salientes en las reacciones de sustitución nucleofílica de sustratos como etil-éster, donde el etóxido saliente tiene un pK_a de ~ 16 , o para nuestro objeto de estudio las amidas cuyo anión generado NH-R^- tiene un pK_a de ~ 35 . No obstante lo anterior, los nucleófilos presentes (H_2O_2 , HO_2^- , OH^- , incluso el disolvente, H_2O), producirían en conjunto un efecto catalítico a favor de la peroxidólisis.

En resumen se propone lo siguiente:

Desarrollar nuevos sistemas catalíticos para la ruptura de enlaces del tipo amida y péptido no activados.

En particular se propusieron los siguientes estudios:

1. Estudiar la cinética de sustitución de nucleófilos con *efecto* α sobre amidas no activadas y péptidos pequeños, variando para tal propósito las concentraciones de los reactivos, la temperatura y el pH.
2. Realizar un estudio cinético de la hidroxilaminólisis sobre amidas no activadas y péptidos, en la presencia de iones o complejos metálicos, y optimizar las condiciones de reacción.
3. Establecer el mecanismo de catálisis para la hidroxilaminólisis y para la peroxidólisis de dichos sustratos.

3 Parte experimental

Reactivos

Los compuestos estudiados como sustratos (acetamida, glicilglicina, N-acetilglicina, glicinamida y las demás, véase la lista de estructuras al final de esta sección) fueron conseguidos de la empresa *Sigma* y usados sin purificar, las sales inorgánicas son grado R.A. En todos los casos la preparación de disoluciones se hizo en agua destilada y desionizada con una resistividad de $18.2 \pm 0.1 \text{ M}\Omega\text{cm}$ obtenida mediante el sistema Barnstead Nanopure, o en D_2O de Aldrich para los estudios de RMN.

Instrumentos y programa de análisis de datos.

Los espectros en ultravioleta fueron obtenidos con un espectrofotómetro Hewlett-Packard 8452A con sistema de recirculación de agua termostatzado a 25°C , y los espectros de RMN protónicos fueron obtenidos de un equipo Varian Unity INOVA de 300 MHz de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM.

Las mediciones de volumen se realizaron con micropipetas Eppendorf Research serie 2000 con volúmenes variables. Las mediciones de pH se hicieron con un potenciómetro digital para investigación Orion modelo 710-A, y se usó un electrodo Orion de doble junta. Para calibrar el potenciómetro se usaron amortiguadores estándar de referencia frescos a 25°C , pH 4.00, 7.00 y 10.00 (Aldrich, precisión de ± 0.01).

Durante los experimentos se mantuvo constante la temperatura utilizando un baño de recirculación de agua marca Fischer Scientifics Isotemp 1016S ($\pm 0.1^\circ\text{C}$). La temperatura de las disoluciones fue verificada con un termómetro digital Digi-Thermo ($\pm 0.1^\circ\text{C}$).

Para el cálculo de la constante de velocidad observada (k_{obs}), los datos de absorbancia o de intensidades relativas de señales (para RMN) contra tiempo se graficaron y ajustaron con la ecuación de mínimos cuadrados no lineales, ecuación 3.1, empleando el programa Microcal™ Origin™ versión 5 de Microcal Software Inc., Northampton MA., USA, (1997). Los valores calculados por este método tienen en promedio una incertidumbre del 2%.

El mismo programa fue usado para ajustar todas las demás curvas con diferentes comportamientos cinéticos de los diferentes sistemas que aparecen en la sección de resultados y discusión. En este caso el error porcentual es del 10% para la mayoría de los casos.

$$A = A_o + A_\infty \left(1 - \exp^{-k_{obs}t} \right) \quad \text{ecuación (3.1)}$$

En la ecuación (3.1) A es la magnitud de la señal del producto (absorbancia o integral de la señal en el espectro de RMN) a tiempo t , A_o es la magnitud de la misma señal al tiempo 0 y A_∞ es el cambio de la magnitud de la señal producido por la transformación completa del sustrato al producto.

Los archivos de *Free Induction Decay* (FID) provenientes del equipo de RMN fueron resueltos e integrados con el programa NutsPro (NMR. Utility Transform Software-Professional) for Windows 95/NT, 2D Profesional Versión-20001128.

Reacciones de hidroxilaminólisis

Las disoluciones de amidas o péptidos tuvieron una concentración entre 0.02 a 0.05M, las sales metálicas de 0.01 a 0.1M y para hidroxilamina de 0.5 a 1.5M. Las mezclas de reacción fueron ajustadas a los valores de pH requeridos mediante la adición de disoluciones concentradas de NaOH o de HCl, y puestas en el termostato dentro de un tubo cerrado (vial).

Las cinéticas de las hidroxilaminólisis de glicinamida y péptidos fueron seguidas por reacción colorimétrica de alícuotas tomadas periódicamente de la mezcla de reacción, el complejo cromofórico es el que resulta de la coordinación entre el $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ en ácido nítrico 0.3M y el producto de la reacción, el ácido hidroxámico. ^{[110], [111]} La absorptividad molar a 540 nm producida por el ácido glicil-hidroxámico ($650 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) fue determinada usando una disolución estándar de ácido glicil-hidroxámico de concentración conocida. La reacción de hidroxilaminólisis de acetamida fue seguida espectrofotométricamente mediante la aparición del ácido aceto-hidroxámico a 215 nm (absorptividad molar de $744 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

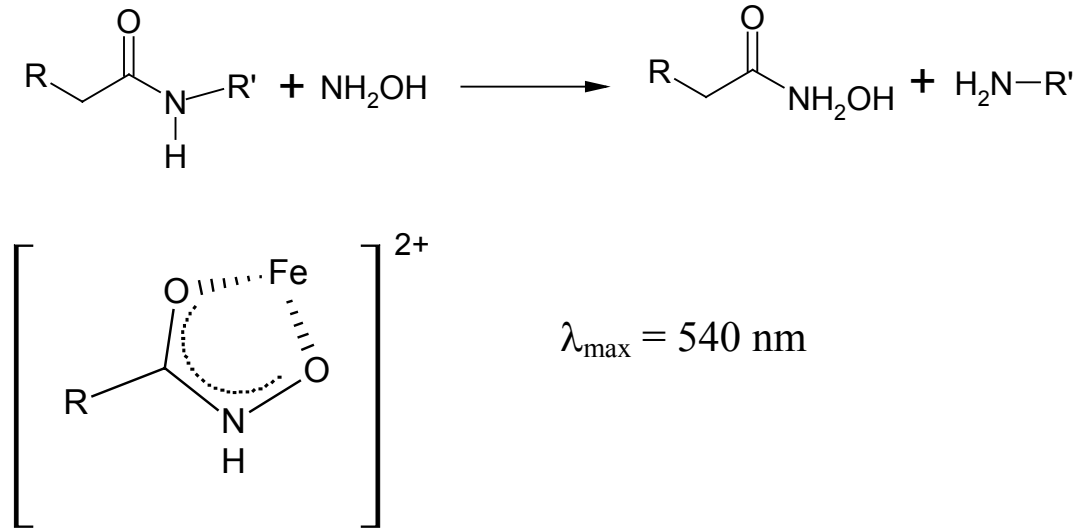
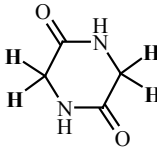


Figura 3.1 Reacción de hidroxilaminólisis y compuesto de coordinación entre Fe(III) y el ácido hidroxámico detectado en uv.-Vis.

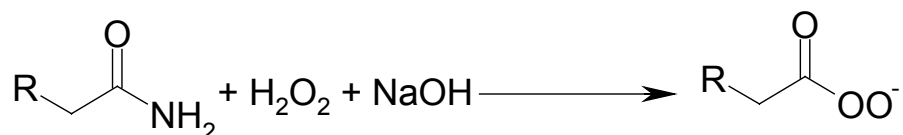
Los productos de la hidroxilaminólisis de los derivados de la glicina fueron identificados por RMN ^1H . Los desplazamientos químicos de los materiales de partida y los productos de reacción en D_2O a pH 7 están dados en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. RMN protónica, desplazamientos químicos en D_2O a pH 7 en ausencia y en presencia de 0.085 M ZnSO_4 .

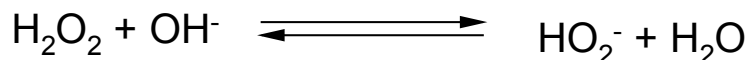
<i>sustancia</i>	<i>Desplazamiento químico</i>	
	<i>sola</i>	con ZnSO_4
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONH}_2$	3.65	3.55
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONHCH}_2\text{COOH}$	3.63	3.65
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONHCH}_2\text{COOH}$	3.69	3.71
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONHCH}_2\text{CONHCH}_2\text{COOH}$	3.67	3.66
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONHCH}_2\text{CONHCH}_2\text{COOH}$	3.92	3.93
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONHCH}_2\text{CONHCH}_2\text{COOH}$	3.64	3.64
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$	3.32	3.28
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONHOH}$	3.50	3.51
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONHCH}_2\text{CONHOH}$	3.91	3.91
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONHCH}_2\text{CONHOH}$	3.61	3.61
	4.08	3.91

Reacciones de peroxidólisis

La reacción de sustitución nucleofílica de amidas y péptidos en presencia de H_2O_2 se realiza en medio básico, como es mostrado en la ecuación 3.2, la cual además involucra un equilibrio entre el H_2O_2 y el OH^- de la ecuación 3.3:



ecuación (3.2)



ecuación (3.3)

La constante para dicho equilibrio a las temperaturas de 50 y 37°C, se determinó por titulación espectrofotométrica uv.-Vis de H_2O_2 a concentración fija con diferentes cantidades de sosa, conforme al método propuesto por Mejía-Radillo.^[112] El equilibrio es seguido por absorción de luz en el intervalo de λ de 240 a 290 nm y los valores promedio encontrados son de $\mathbf{K} = [\text{HO}_2^-]/[\text{H}_2\text{O}_2][\text{OH}^-] = 118 \pm 3 \text{ M}^{-1}$ para 50°C y $\mathbf{K} = 179 \pm 3 \text{ M}^{-1}$ para 37°C. Un ejemplo de titulación se muestra en la figura 3.2. Los resultados fueron ajustados a la ecuación (3.4). Estos valores concuerdan con aquellos reportados por la literatura para sistemas acuosos; p.Ej. $\mathbf{K} = 200 \pm 20 \text{ l mol}^{-1}$ (pK_a de 11.7)^[3] a 25°C, y $\text{pK}_a = 11.6$ a 30°C.^[113]

$$A = A_0 + 0.5 \Delta \varepsilon (K^{-1} + [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{T}} + [\text{NaOH}]_{\text{T}} - \{(K^{-1} + [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{T}} + [\text{NaOH}]_{\text{T}})^2 - 4[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{T}}[\text{NaOH}]_{\text{T}}\}^{0.5})$$

....ecuación (3.4)

La constante de equilibrio también fue determinada mediante el mismo método a 37°C con NaOD en D_2O . El valor de $\mathbf{K} = 276 \pm 2 \text{ M}^{-1}$ ($\text{pK}_a = 11.55$) indica un pequeño efecto isotópico de aproximadamente 1.5 debido al disolvente.

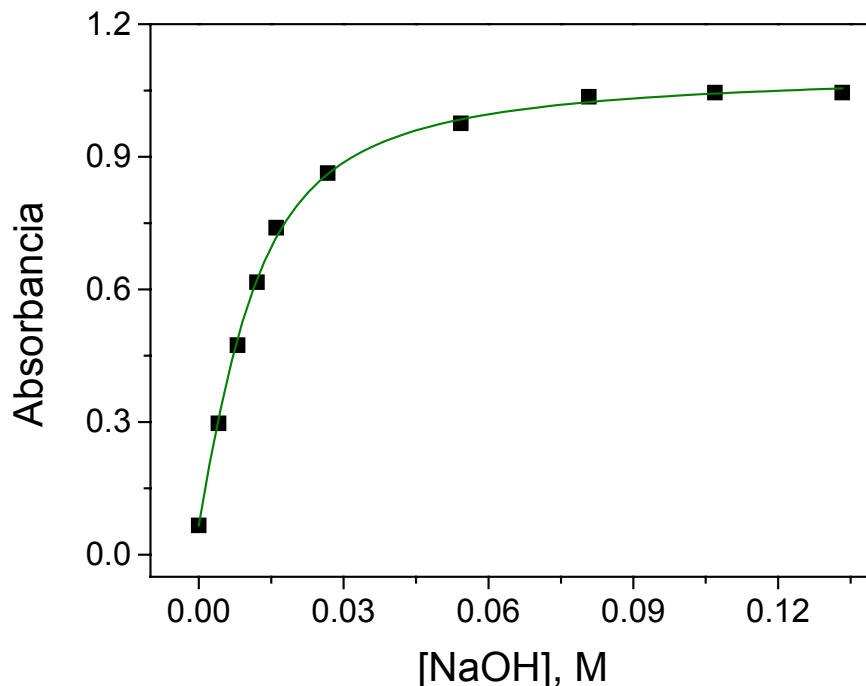
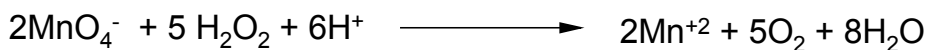
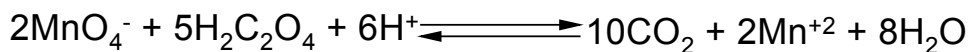


Figura 3.2. Cálculo de la constante del equilibrio presentado entre el H_2O_2 y NaOH , conforme al método de Mejía-Radillo Y., $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.010\text{M}$ y $[\text{NaOH}]$ variable a $T=37^\circ\text{C}$ en H_2O , absorbancia medida a la $\lambda = 275\text{ nm}$. $\chi^2 = 1.6 \times 10^{-5}$

El peróxido de hidrógeno de la marca Aldrich fue usado tal y como se adquirió y su concentración fue determinada al momento de usarlo. La técnica que se usó para determinar la concentración de H_2O_2 fue la de valoración con una disolución de permanganato de potasio, que a su vez fue hervida y filtrada,^[114] y estandarizada con una disolución de oxalato de sodio previamente secado,^[115] la concentración encontrada fue de 30.3%.



Las cinéticas de las reacciones de ruptura de enlaces amídicos fueron seguidas por RMN ^1H a 37°C en D_2O conteniendo de 0.3 a 3% de H_2O introducida con la disolución de H_2O_2 . Las disoluciones de amidas o péptidos fueron de 0.02 a 0.05 M, las de peróxido de hidrógeno tuvieron las concentraciones de 0.1 a 1.0 M.

Modificación de amidas

Para la modificación de amidas con grupos coordinantes adicionales, se realizó la alquilación reductiva de grupos amino, conforme a la siguiente técnica:

La amida a modificar se disolvió en agua y se ajustó el pH a un valor de 10, el sistema se pone en un baño de hielo con agitación y se agrega lentamente piridin-aldehído, este último en un exceso respecto de la amida (0.38M de la amida y 0.76M del aldehído). A continuación se agregó borohidruro de sodio en porciones de 4 mg por cada mL de disolución, a intervalos de tiempo de un minuto, el esquema de la reacción se muestra en la figura 3.3. ^[116]

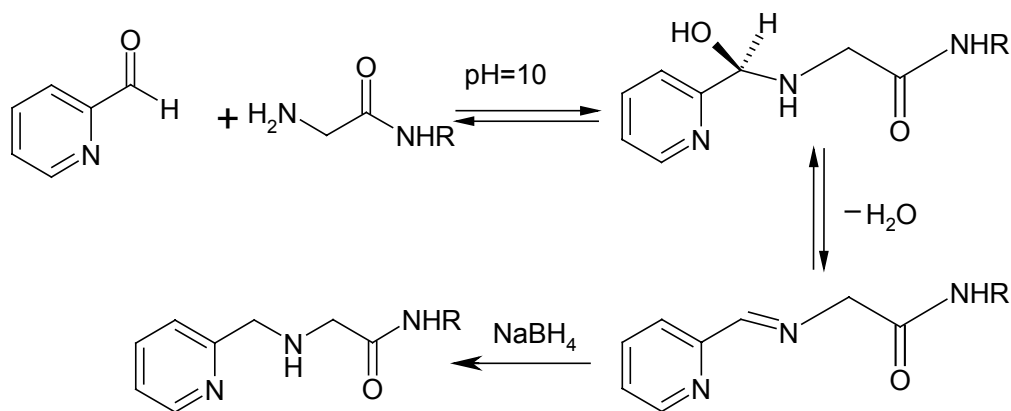


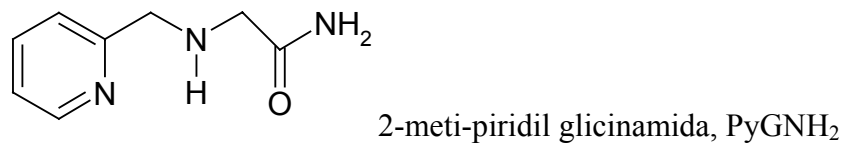
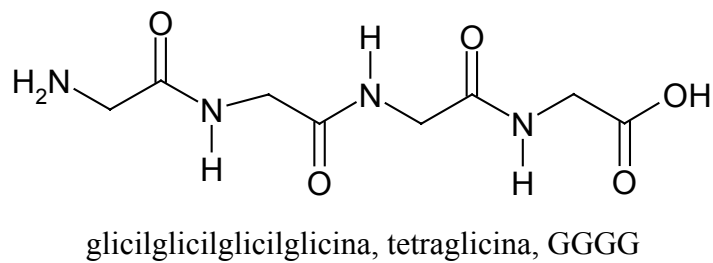
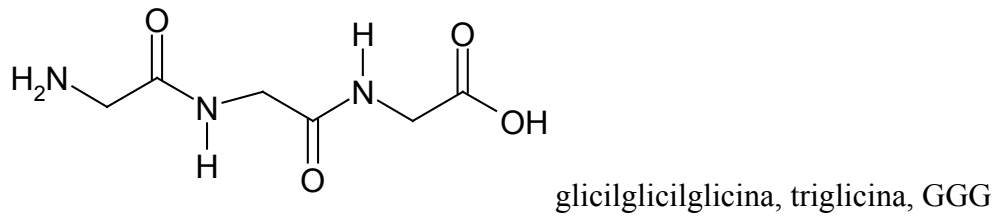
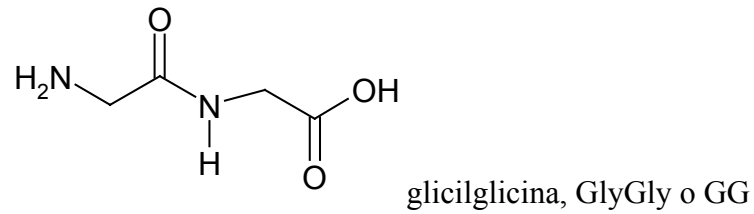
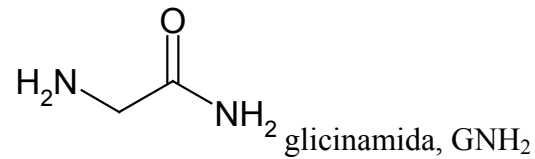
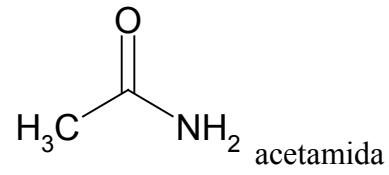
Figura 3.3 Modificación de amidas mediante la adición de un grupo piridilo.

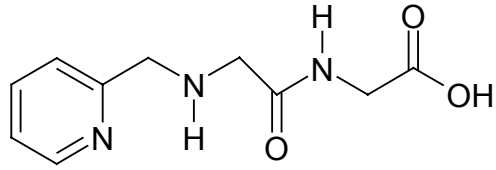
Después de 10 minutos de terminada la reacción se ajustó el pH a 4 con HCl para eliminar el exceso de NaBH₄ después se llevó a pH neutro. El siguiente paso fue agregar etanol en un volumen equivalente al de la mezcla de reacción y se concentró en rotavapor. Los primeros precipitados fueron las sales inorgánicas. Al evaporar casi la totalidad del agua y agregando más etanol se obtienen cristales nacarados del producto con un rendimiento aproximado del 85%.

La recristalización se hizo, disolviendo en un mínimo de agua donde se precipita con una mezcla de etanol y eter (50/50).

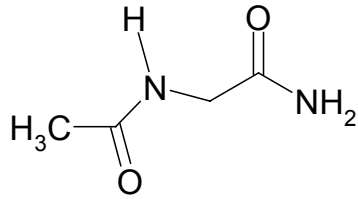
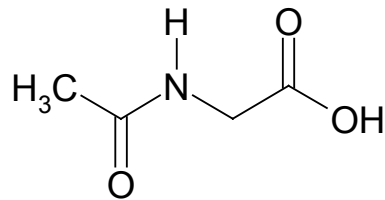
El análisis elemental y la RNM ¹H concuerdan para productos en forma de hidrocloreto.

Lista de sustratos usados aquí y su estructura

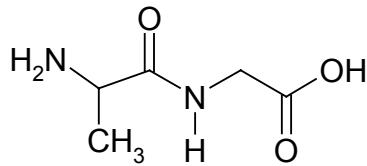




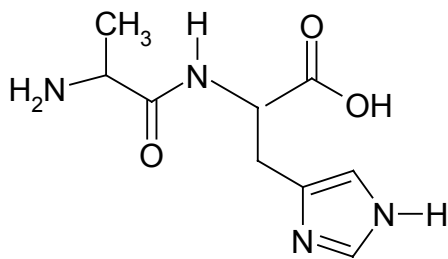
2-metil-piridil glicilglicina, PyGG

N-acetil glicinamida, NacGNH₂

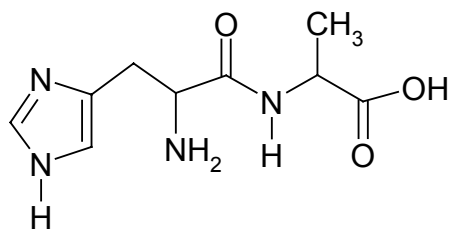
N-acetil glicina, NacG



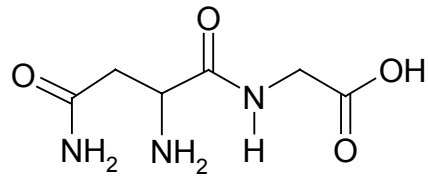
Alanil-Glicina, Ala-Gly o A-G



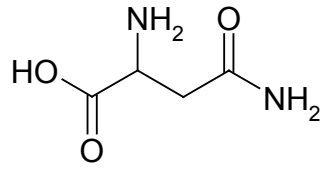
Alanil-Histidina, Ala-His o A-H



Histidil-Alanina, His-Ala o H-A



Asparagil-Glicina, N-G

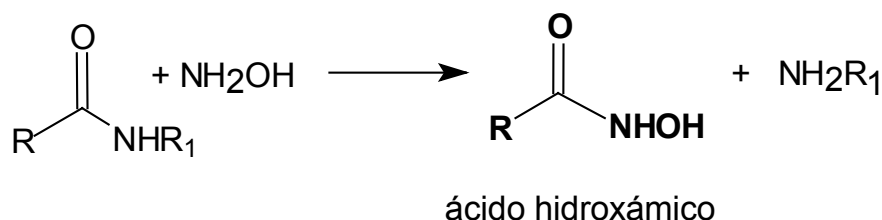


Asparagina, Asn o N

4 Resultados y discusión

Hidroxilaminólisis sin iones metálicos

Los ensayos de sustitución nucleofílica de amidas no activadas usando como nucleófilo la hidroxilamina conforme a la reacción general:



muestran los siguientes resultados.

Para acetamida la constante observada se calculó por métodos espectroscópicos, siguiendo la formación del producto en función del tiempo. Lo anterior se hizo de dos formas, ya sea midiendo la absorbancia propia del ácido acetohidroxámico a 215 nm, ($\epsilon = 744 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) o bien a través de la formación del compuesto de coordinación entre dicho compuesto y el ion Fe(III) en ácido nítrico, ver parte experimental.

La figura 4.1 muestra el comportamiento de la absorbancia debida al producto en función del tiempo, y esta gráfica es representativa de todas las cinéticas que se describen en este trabajo.

La constante de velocidad se calculó por el método de mínimos cuadrados no lineales. En la gráfica de la figura 4.1 la línea continua representa el ajuste de los datos mediante la ecuación 3.1 presentada en la sección experimental.

En dicha ecuación los valores de A , A_0 y tiempo t son valores conocidos y solo faltaría el valor de A_∞ para calcular la constante observada k_{obs} . Nuestros sustratos fueron acetamida y derivados de la glicina, así que los productos de las reacciones son el ácido acetohidroxámico y

el ácido glicilhidroxámico. En nuestros ensayos puesto que seguimos la formación de los productos, nos bastó calcular los coeficientes de absorptividad de los ácidos hidroxámicos mencionados, a partir de disoluciones estándar, para calcular los valores de A_{∞} .

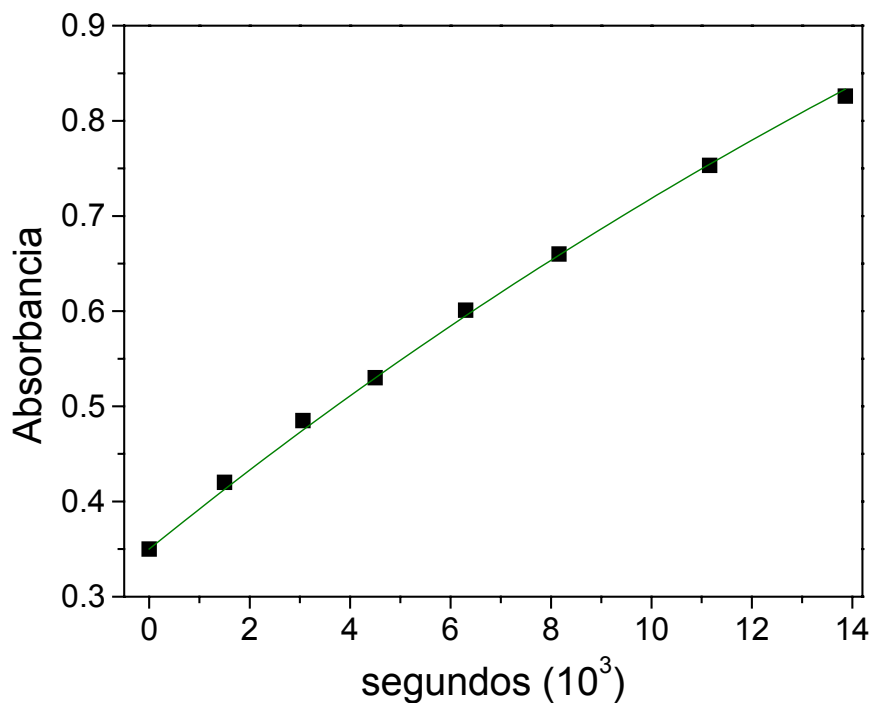


Figura 4.1. Cinética de hidroxilaminólisis para la acetamida, la constante de velocidad de primer orden calculada en este caso es de $k_{\text{obs}} = 2.16 \times 10^{-5} \pm 3.4 \times 10^{-8}$ a 37°C , $\text{pH} = 6.5$, $\square = 215\text{nm}$, 0.035M de acetamida y 1M de NH_2OH . $\chi^2 = 3.02 \times 10^{-5}$.

La variación de la constante de velocidad en función del pH para la acetamida como sustrato se muestra en la figura 4.2.

En esta gráfica se aprecia una dependencia en forma de campana con máximo alrededor de pH 6, y por arriba de 13 la velocidad aumenta drásticamente. Bergmann encontró que para la nicotinamida y la acetamida la velocidad de reacción crece mucho al mismo valor de pH 13 y explica que esto es debido a la hidrólisis por OH^- la cual en esas condiciones es más rápida que la sustitución nucleofílica por NH_2OH .^[110] Sin embargo, en nuestro caso seguimos la formación del ácido hidroxámico y no la desaparición del sustrato inicial, razón por la que esta explicación no se aplica.

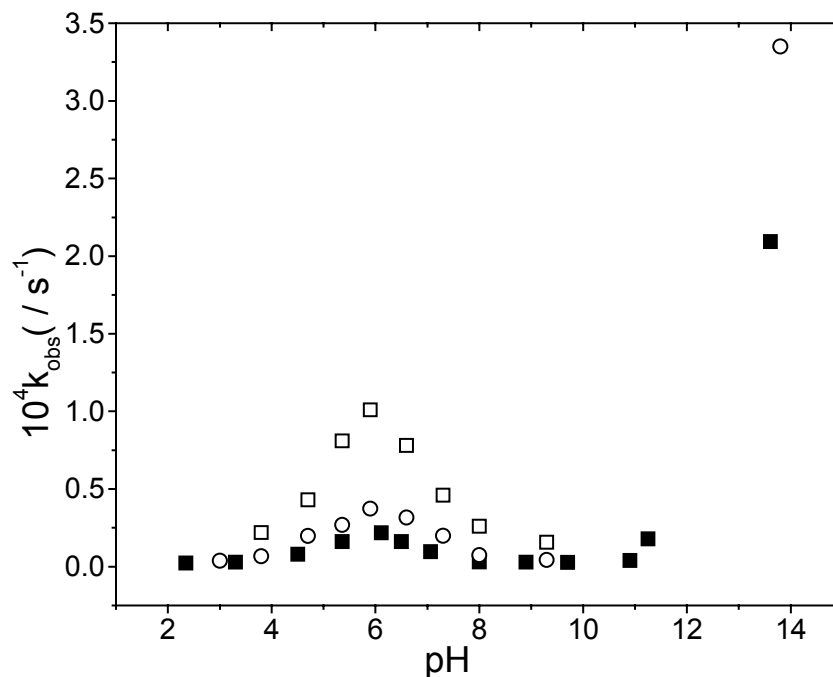


Figura 4.2. Constante de velocidad de primer orden observada (k_{obs}) para la hidroxilaminólisis de acetamida 0.035M y NH_2OH 1M, en función del pH, a las temperaturas de 37 (■), 45 (○) y 60°C (□).

La hidroxilaminólisis para la formamida estudiada por Jencks, también presenta un máximo alrededor de pH 6, con una dependencia cuadrática respecto a la concentración del nucleófilo. ^[43]

El pK_a de la hidroxilamina es de 5.9 a 25°C, así que a un pH cercano a 6 el producto $[\text{NH}_3\text{OH}^+]\cdot[\text{NH}_2\text{OH}]$ alcanza su máximo, al cambiar a un pH menor aumenta el valor de $[\text{NH}_3\text{OH}^+]$ pero disminuye el de $[\text{NH}_2\text{OH}]$, al mismo tiempo la k_{obs} disminuye. Para valores de pH más altos que 6 sucede lo contrario, $[\text{NH}_2\text{OH}]$ aumenta, $[\text{NH}_3\text{OH}^+]$ disminuye y la k_{obs} sigue disminuyendo. Este hecho junto con la dependencia del pH de la reacción, sugiere que el ion hidroxilamonio actúa como un catalizador para la reacción de hidroxilaminólisis. La acción concertada de ambas especies sobre el sustrato puede verse en la figura 4.3

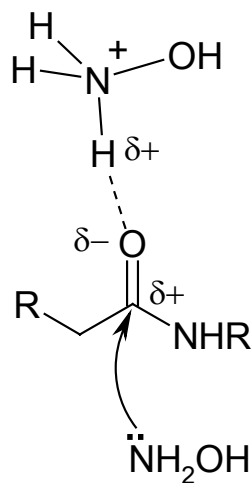


Figura 4.3. Activación del sustrato por el catión del nucleófilo y ataque al grupo carbonilo por parte de la especie neutra.

Para nuestro estudio con acetamida tenemos la misma dependencia cuadrática de la constante de velocidad observada respecto de la concentración total del nucleófilo, esto es ejemplificado en la figura 4.4.

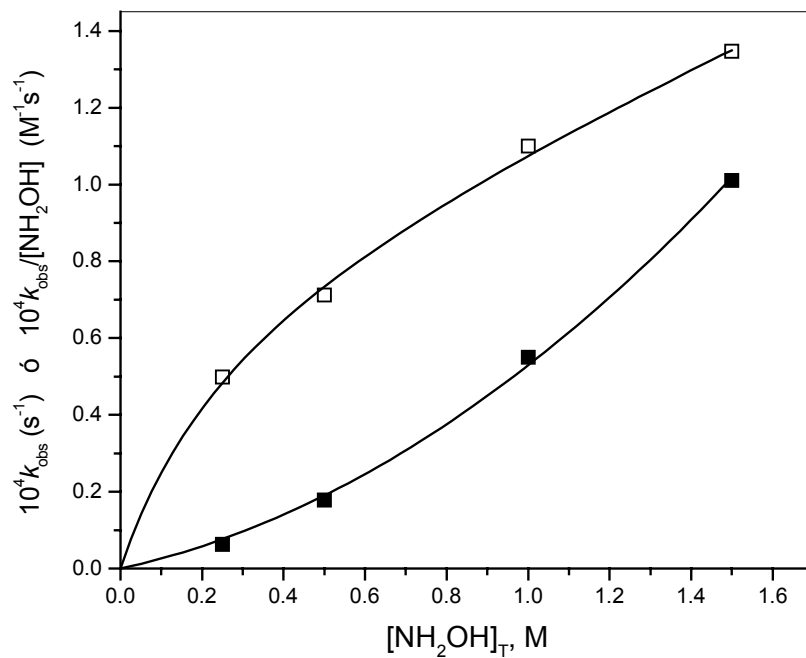
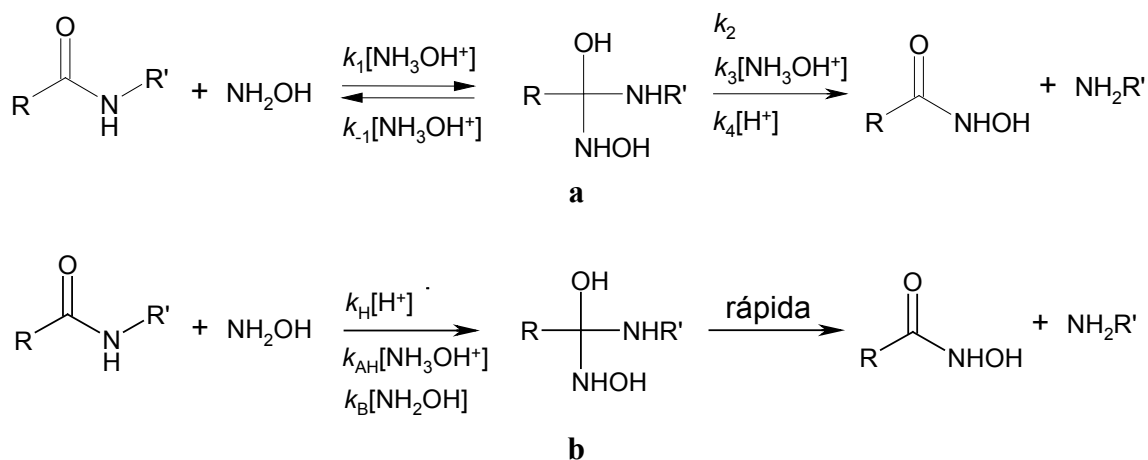


Figura 4.4. Constante observada de primer (■) y segundo orden (□), para la hidroxilaminólisis de acetamida a pH 6 y 50°C, como función de la concentración total de hidroxilamina. $\chi^2 = 4.3 \times 10^{-12}$ ó $\rho^2 = 0.9996$.

En la misma figura también se ha graficado la constante aparente de segundo orden ($k_{obs}/[\text{NH}_2\text{OH}]$), puede verse que no hay un comportamiento lineal y que, de acuerdo con Jencks en su trabajo con formamida, ^[43] esto indica un cambio en la etapa limitante de la reacción, de la formación a la descomposición del intermediario de adición tetraédrico en la medida que se incremente la concentración del catión hidroxilamonio.^[43]

El esquema **1a** ilustra el mecanismo de hidroxilaminólisis propuesto por Jencks y Gilchrist para la formamida:



Esquema 1

La ecuación de velocidad que sigue el esquema **1a** tiene la forma:

$$k_{obs}/[\text{NH}_2\text{OH}] = k_1[\text{HA}](k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+]) / (k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+] + k_{-1}[\text{HA}]) \quad (4.2)$$

en donde k_{obs} es la constante observada de primer orden para la reacción, y HA es NH_3OH^+ .

Nuestros datos de $k_{obs}/[\text{NH}_2\text{OH}]$ de la acetamida se ajustan a la ecuación (4.2), datos (\square) de la figura 4.4, con $k_1 = 6.4 \times 10^{-4} \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $(k_2 + k_4[\text{H}^+])/k_{-1} = 0.17 \text{ M}$ y $k_3/k_{-1} = 0.16$ a 50°C y pH 6.0.

Sin embargo, al ajustar los datos del perfil de pH con la ecuación **4.2** para k_{obs} , el resultado solo es satisfactorio alrededor de pH 6, pero a pH mayores y menores la ecuación requiere que k_{obs} se aproxime a cero, línea punteada de la figura 4.5.

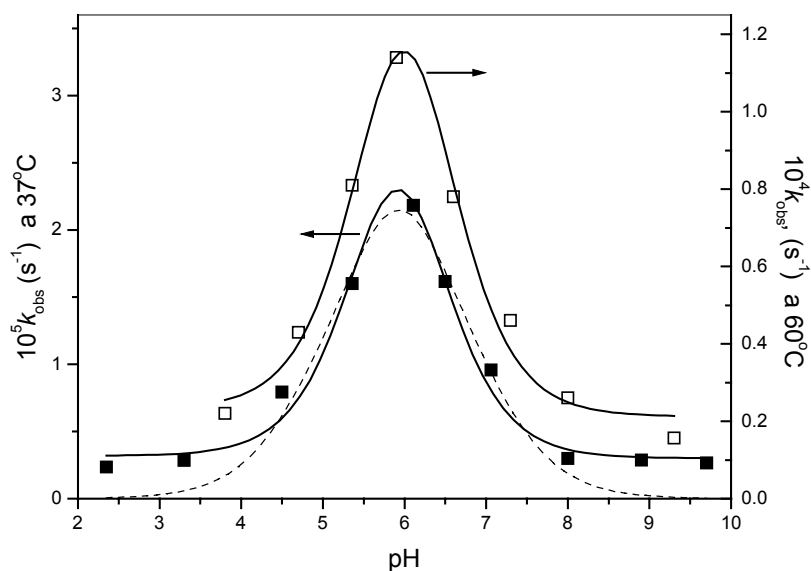


Figura 4.5. Gráfica para acetamida a las temperaturas de 37 y 60°C en el intervalo donde aparece el máximo. Las líneas sólidas son los perfiles teóricos conforme a la ecuación (4.3). La línea punteada corresponde al ajuste de los datos con la ecuación (4.2). $\chi^2 = 6.99 \times 10^{-9}$.

Aparentemente la adición de hidroxilamina catalizada por el ácido general, conforme al esquema **1a**, es predominante solo a un pH cercano al pK_a del hidroxilamonio, pero en disoluciones más ácidas o más básicas la catálisis ácido-específica y la básico-general respectivamente resultan ser las trayectorias predominantes.

Ajustando los datos en el intervalo de pH comprendido entre 5 y 7 a la ecuación 4.2, se tienen los siguientes parámetros para la acetamida: $k_1 = 2.2 \times 10^{-4} \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $k_2/k_{-1} = 0.08 \text{ M}$, $k_3/k_{-1} = 0.36$ y $k_4/k_{-1} = 6.2 \times 10^4$ a 37°C. Si se comparan con los resultados obtenidos para la formamida; $k_1 = 8.5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $k_2/k_{-1} = 0.18 \text{ M}$, $k_3/k_{-1} = 0.09$ y $k_4/k_{-1} = 4 \times 10^4$ a 39°C, resulta que esta última es 40 veces más reactiva que la acetamida, debido a la formación más rápida de su intermediario de adición.

Los resultados antes mencionados nos permiten estimar la relación de las velocidades de descomposición del intermediario tetraédrico, en la dirección de la formación del producto (r_+) y en la dirección de los compuestos de partida (r_-): $r_+/r_- = (k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+]) / (k_{-1}[\text{HA}])$. A pH 6 y 37°C $r_+/r_- = 0.65$ (de k_{obs} en función del pH), y a 50°C $r_+/r_- = 0.44$ (de k_{obs} en función de la concentración de NH_2OH). Así, a pH 6 las velocidades de descomposición en ambas direcciones son similares. Se puede ver que un incremento o una disminución en el pH, dará un

incremento en r_+/r_- debido a la disminución en $[HA]$ y al incremento en $[H^+]$ respectivamente.^[117]

Los valores de r_+/r_- considerablemente mayores que 1, indican que el paso determinante de la reacción es la formación del intermediario de adición. Por lo tanto, para el intervalo completo de pH de la velocidad de hidroxilaminólisis de acetamida, se hizo el análisis de los resultados bajo un esquema simplificado, el cual asume que la etapa determinante de formación del intermediario sucede a través de tres trayectorias, a saber: catálisis ácido-específica, ácido-general y básico-general por hidroxilamina, véase el esquema **1b**. La ecuación de velocidad correspondiente es la **4.3**:

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{H}}[H^+][\text{NH}_2\text{OH}]_{\text{T}}/(1+[H^+]/K_a) + (k_{\text{AH}}[H^+]/K_a + k_{\text{B}})[\text{NH}_2\text{OH}]_{\text{T}}^2/(1+[H^+]/K_a)^2 \quad (4.3)$$

en donde $[\text{NH}_2\text{OH}]_{\text{T}}$ es la concentración total de hidroxilamina y K_a es la constante de disociación ácida de NH_3OH^+ . El ajuste de los datos con esta ecuación se muestra como líneas continuas en la figura 4.5.^[118]

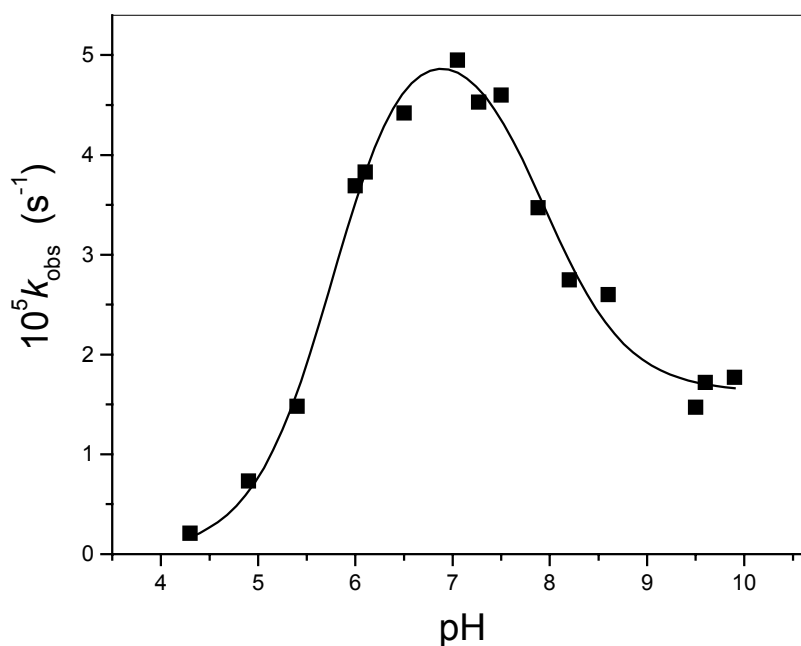


Figura 4.6. Constante de velocidad observada de primer orden para la ruptura de glicinamida (GNH_2) por hidroxilamina como función del pH a la temperatura de 50°C . La línea que pasa a través de los puntos corresponde al perfil teórico de acuerdo al esquema 2. $\chi^2 = 4.23 \times 10^{-8}$.

La constante de velocidad observada para la hidroxilaminólisis de la glicinamida (GNH_2) es similar a la de acetamida a la misma temperatura y al mismo valor de pH óptimo, sin embargo, su máximo está desplazado hacia pH 7, y la curva es más ancha. Además, en disoluciones ácidas la velocidad de reacción tiende a cero con la disminución del pH, véase la figura 4.6.

Al igual que con acetamida, se graficó la constante de segundo orden aparente contra la concentración total de hidroxilamina, figura 4.7, los datos se comportan linealmente hasta una $[\text{NH}_2\text{OH}]$ de 1.2M. En la ecuación 4.2 esto se cumple cuando el término $k_1[\text{HA}]$ en el denominador es pequeño, es decir si $k_1[\text{HA}] \ll (k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+])$.

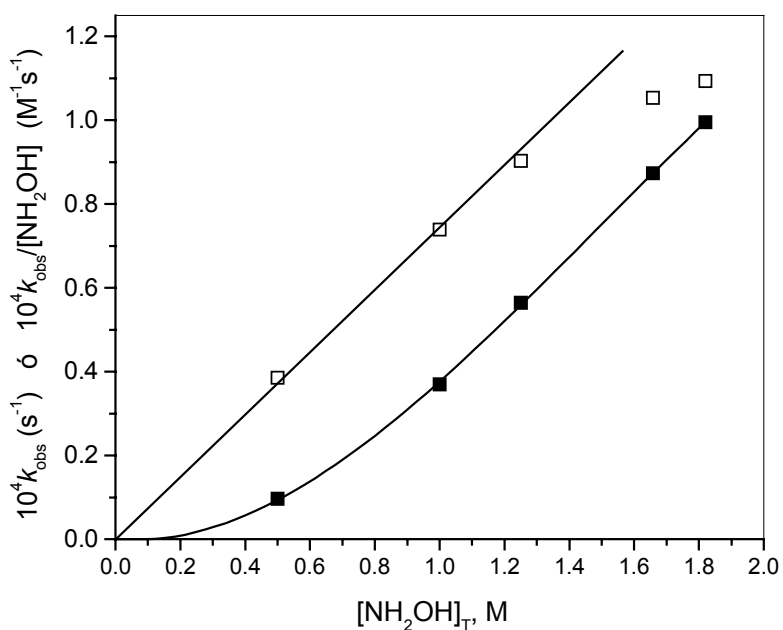
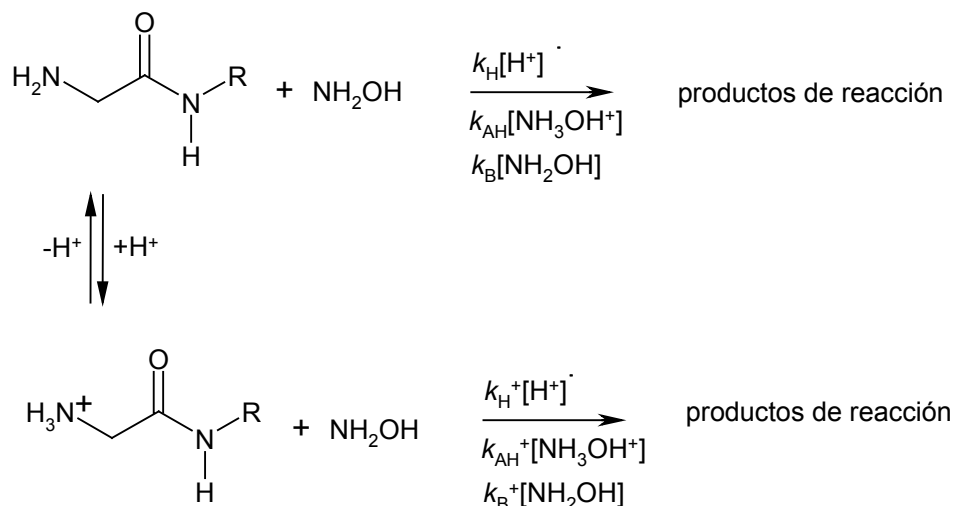


Figura 4.7. Constante de velocidad observada de primero (■) y de segundo orden (□) para la hidroxilaminólisis de glicinamida a pH 6 y 50°C como función de la concentración de hidroxilamina. $\chi^2 = 7.43 \times 10^{-11}$ para el comportamiento cuadrático.

El significado de esta desigualdad es que la reacción de descomposición del intermediario de adición en la dirección de reactivos, es mucho más lenta que la correspondiente en dirección hacia productos, por lo tanto, la adición es la etapa determinante de la reacción.

Volviendo a la figura 4.6, el desplazamiento del máximo a un pH más básico y el ensanchamiento del perfil, pueden explicarse considerando las diferentes reactividades de las especies protonada y neutra de la glicinamida, $\text{pK}_a = 7.93$.^[119]

Los datos de la figura 4.6 fueron ajustados con la ecuación 4.3 modificada de acuerdo con el esquema 2, esto se muestra como una línea continua en la misma figura.



Esquema 2

El resultado del cálculo para las constantes de velocidad de las dos rutas de reacción, formas protonada y neutra, se muestran en la tabla 4.1 junto con otros resultados para la acetamida y los péptidos glicilglicina (GG) y glicilglicilglicina (GGG).

Tabla 4.1. Parámetros de velocidad para la hidroxilaminólisis no catalizada de acetamida y algunos derivados de glicina en diferentes formas de protonación.

Especies sustrato	T, °C	$k_{\text{H}}, \text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{AH}}, \text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{B}}, \text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$
CH ₃ CONH ₂	37	2.9±0.5	(8.3±0.7)×10 ^{-5a}	(2.9±0.6)×10 ⁻⁶
	45	7.1±3.3	(1.4±0.2)×10 ^{-4a}	(8.3±3.0)×10 ⁻⁶
	60	23±4	(4.0±0.2)×10 ^{-4a}	(2.1±0.3)×10 ⁻⁵
$E_{\text{a}}, \text{kJ/mol:}$		76.4±5.8	54.8±0.5	71.4±14.1
⁺ H ₃ NCH ₂ CONH ₂ (GNH₃⁺)	50	0	(8.7±0.5)×10 ⁻⁵	0
H ₂ NCH ₂ CONH ₂ (GNH₂)	50	0	(4.6±0.1)×10 ⁻⁴	(1.6±0.1)×10 ⁻⁵
⁺ H ₃ NCH ₂ CONHCH ₂ COO ⁻ (GG)	60	2.1±0.4	(6.7±1.6)×10 ⁻⁶	0
H ₂ NCH ₂ CONHCH ₂ COO ⁻ (GGH₁⁻)	60	0	(2.9±0.2)×10 ⁻⁴	(1.6±0.1)×10 ⁻⁶
⁺ H ₃ NCH ₂ CONHCH ₂ CONHCH ₂ COO ⁻ (GGG)	60	3.2±0.2	(1.5±0.2)×10 ⁻⁵	0
H ₂ NCH ₂ CONHCH ₂ CONHCH ₂ COO ⁻ (GGGH₁⁻)	60	0	(2.3±0.3)×10 ⁻⁴	0

^a $k_1 = 2.3 \times 10^{-4}$, 3.7×10^{-4} y $1.05 \times 10^{-3} \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a 37, 45 y 60°C respectivamente, estimadas mediante el uso de la ecuación 4.2 de los resultados alrededor del máximo, pH = 6.

En este caso de la glicinamida, la catálisis ácida específica no opera probablemente debido a la repulsión entre el catión hidroxilamonio y el catión del sustrato. Por esa misma razón, la constante de velocidad para la catálisis ácida general (k_{AH}) por hidroxilamonio es más pequeña para la forma protonada del sustrato que para la neutra. Aunque el sustrato protonado puede ser más reactivo, debido al efecto inductivo del grupo amonio, tal como es observado en la hidrólisis alcalina en el éster etílico de la glicina. ^[120]

La catálisis ácida-específica podría ser eficiente para la reacción de la forma neutra de glicinamida, pero no es posible estimar las constantes de velocidad respectivas, debido probablemente a la muy pequeña fracción de la forma neutra en disoluciones ácidas.

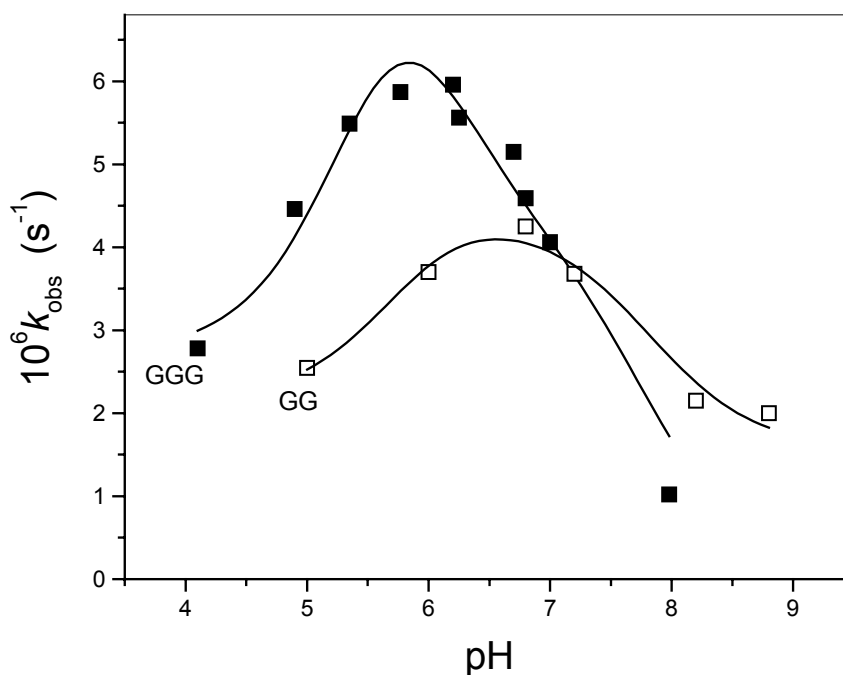


Figura 4.8 Constante de velocidad observada de primer orden para la ruptura de glicilglicina (GG) y triglicina (GGG) como función del pH a 60°C y 1M de hidroxilamina. Las líneas sobre los puntos representan el perfil teórico de acuerdo con el esquema 2, los parámetros correspondientes se encuentran incluidos en la tabla 4.1. . $\chi^2_{GG} = 7.71 \times 10^{-13}$, . $\chi^2_{GGG} = 6.91 \times 10^{-13}$

La hidroxilaminólisis para otros derivados de la glicina, los péptidos GG y GGG, sucede más lentamente que en el caso de la glicinamida, por lo que sus cinéticas fueron estudiadas a una temperatura más alta, figura 4.8.

El pH óptimo para la GG se encuentra cerca de 7 como en el caso de la GNH_2 , y para la GGG se encuentra cerca de 6, como sucede con la acetamida. Para la triglicina existen dos enlaces peptídicos a romper, uno de estos enlaces se encuentra distante respecto del grupo amino terminal y es probable que su ruptura sea insensible a la protonación. Al igual que en los dos primeros sustratos, tienen un orden de reacción de 2 para su dependencia respecto de la $[\text{NH}_2\text{OH}]$ total, figura 4.9.

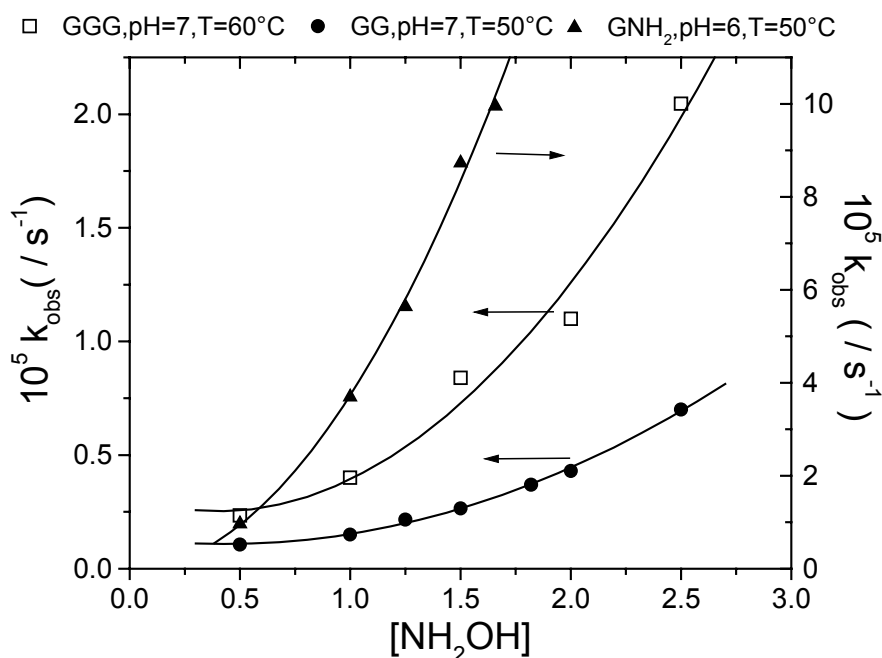
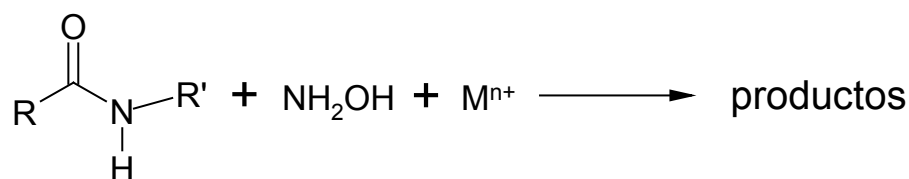


Figura 4.9. Constante de velocidad observada de primer orden para la hidroxilaminólisis de GNH_2 (▲) a pH 6 y 50°C , GG (●) a pH 7 y $T=50^\circ\text{C}$, y de GGG (□) a pH 7 y $T=60^\circ\text{C}$, como función de la concentración de hidroxilamina. $\chi^2_{\text{GG}} = 1.71 \times 10^{-14}$, $\chi^2_{\text{GGG}} = 2.1 \times 10^{-12}$.

En la tabla 4.1 puede verse que en la hidroxilaminólisis de las formas protonadas de GG y de GGG, existe una considerable contribución de la catálisis ácida específica. Esas especies en realidad son zwitteriones, a diferencia de la glicinamida protonada que es un catión. La reacción catalizada por un sistema ácido-general es más rápida para péptidos desprotonados que para los zwitteriones. Lo anterior puede ser debido a la atracción electrostática entre el catión hidroxilamonio y el sustrato aniónico.

Cinéticas de la hidroxilaminólisis en la presencia de iones metálicos.

Tanto en la introducción como en los antecedentes se ha visto que la participación de iones metálicos en sistemas vivos es enormemente importante. De la misma forma su uso, ya sea coordinados o solos en sistemas más simples, ha producido algunos resultados alentadores en la hidrólisis de amidas. Por lo anterior, resultó forzoso su estudio en las reacciones de hidroxilaminólisis de este trabajo, esto bajo la idea de que los iones metálicos participarían de manera catalítica a través de cualquiera de los mecanismos también citados en la parte de antecedentes.



En ese sentido, inicialmente se propusieron varios cationes divalentes que podrían participar catalíticamente en la reacción de sustitución nucleofílica de las amidas, estos fueron: Cu(II), Ni(II), Cd(II), Zn(II), Pb(II), Mn(II), Co(II) y Fe(II). La participación de iones metálicos con mayor carga quedó excluida de este trabajo dado que su acidez es mayor y la formación del hidróxido metálico sucede a valores de pH más bajos, es decir sería difícil lograr reacciones en medios neutros o cercanos a la neutralidad sin la presencia de precipitados. La tabla 4.2 muestra algunas constantes observadas medidas (k_{obs}) para la glicinamida (GNH_2) en la presencia de cationes divalentes.

Dentro de esos resultados puede verse que el ion Mn(II) no ofrece ningún efecto catalítico positivo y en caso dado tal vez una pequeña inhibición de la reacción. Para Fe(II) y Pb(II) no es posible medir la constante de velocidad pues existe la aparición de precipitado desde un inicio, aun a pesar de que se trabajó con disoluciones diluidas de cada ion metálico. Con Co(II) es posible medir la constante de velocidad pero paulatinamente aparece el precipitado en poco tiempo, 3 horas aproximadamente. La presencia de precipitado en la disolución complica el análisis al ser un sistema heterogéneo, donde podrían existir muchas especies actuando en el proceso, además existe incertidumbre de cual es la naturaleza de las especies y cual(es) de ellas es la de mayor contribución a la velocidad de la reacción.

Tabla 4.2. k_{obs} medidas por espectrofotometría ($\lambda=540\text{nm}$), para 0.03M de GNH_2 y 1M de hidroxilamina a 50 °C y pH 7.2.

Ion metálico	k, s^{-1}	Ion metálico	k, s^{-1}
0	4.5×10^{-5}	Mn(II), 0.025M	3.72×10^{-5}
Ni(II), 0.03M	8.6×10^{-5}	Co(II), 0.025M	7.27×10^{-5} ppdo
Ni(II), 0.06M	8.0×10^{-5}	Cu(II), 0.025M	1.72×10^{-5}
Zn(II), 0.01M	1.0×10^{-4}	Pb(II), 0.025M	ppdo
Zn(II), 0.03M	2.13×10^{-4}	Fe(II), 0.025M	ppdo.
Cd(II), 0.025M	7.3×10^{-5}	Mn(II), 0.025M	3.72×10^{-5}

El Cu(II) fue el primer ion metálico probado en este estudio y que no mostró la formación de precipitado al menos en un lapso de tiempo de 24 horas. La figura 4.10 es un ejemplo de los resultados obtenidos cuando Cu(II) se encuentra presente en la reacción, aquí se muestra la aparición del producto de hidroxilaminólisis en función del tiempo. Como se mencionó en la parte experimental, la especie absorbente es el complejo formado entre el producto, el ácido hidroxámico, y Fe(III).

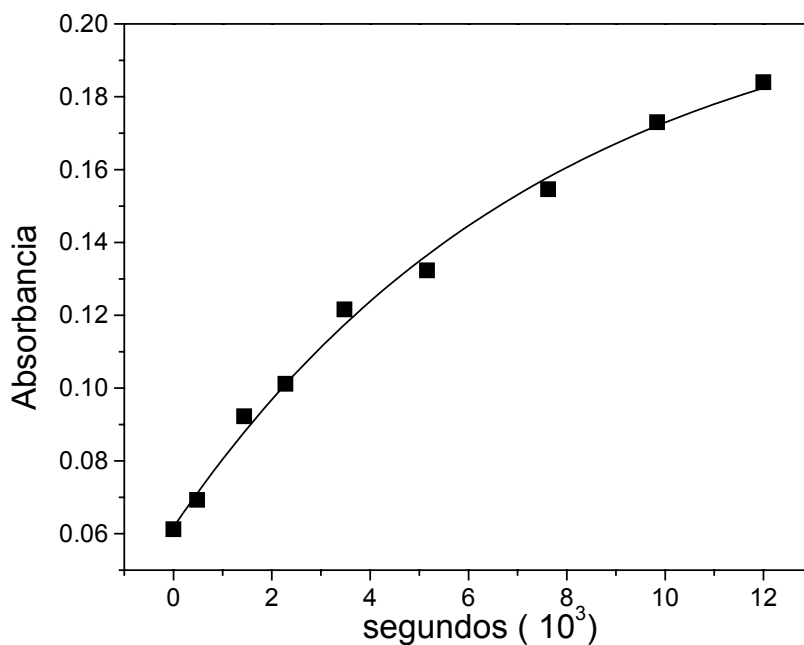


Figura 4.10. Reacción de hidroxilaminólisis para GNH_2 en presencia de Cu(II). Los datos fueron ajustados con la ecuación 3.1 manteniendo fijo sólo el valor inicial de Absorbancia $A_0 = 0.0618$ con lo que se obtiene los valores de k_{obs} de $1.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \pm 1 \times 10^{-5}$ y de absorbancia al infinito (A_∞) de 0.152. La reacción se llevó a cabo a $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=6.0$ y $[\text{Cu}^{2+}] = 0.03\text{M}$.

De estos datos se calculó una constante de velocidad de primer orden con una magnitud de $1.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, esto es casi 4 veces más rápido que sin ion metálico, sin embargo hay que hacer hincapié en dos cosas, primero que el valor de la absorbancia al infinito, 0.152, no coincide con el esperado de 1.95 *, y segundo que la curva no es lineal, esto último podría significar que el sustrato está dejando de reaccionar, o que el producto se encuentra involucrado en otro proceso, cualquiera que sea el caso estarían ocurriendo varios procesos a la vez.

Los iones metálicos que mostraron un aumento en la velocidad de hidroxilaminólisis fueron: Ni(II), Cd(II) y Zn(II), en los tres casos la dependencia de concentración del producto en función del tiempo fue lineal. El Ni(II) produce un aumento en la velocidad de reacción de casi dos veces, no obstante en el estudio de la k_{obs} dependiente de la concentración del ion metálico, se observa una rápida saturación y podemos decir que, para fines prácticos, este sistema tiene poco perspectivas, véase la figura 4.11.

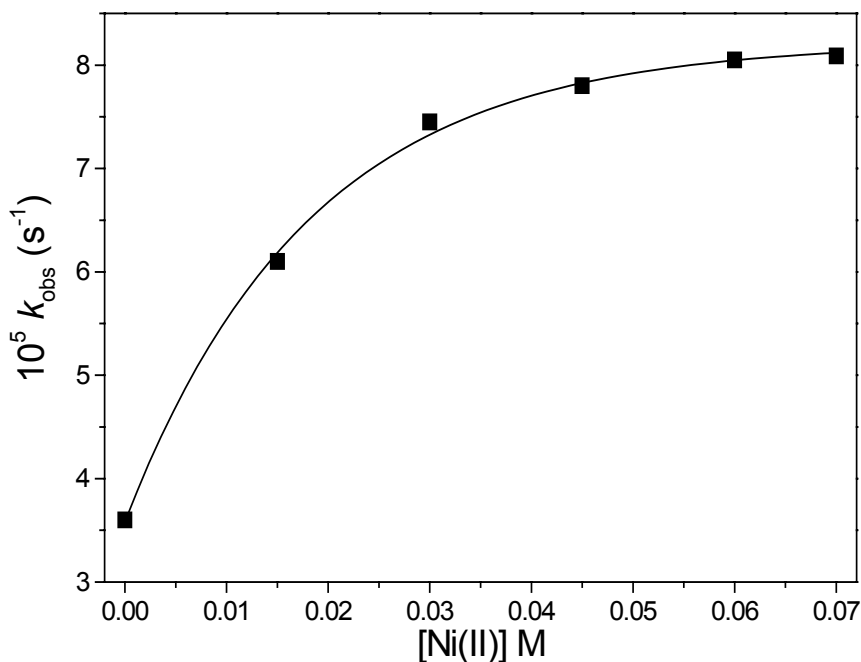


Figura 4.11. Constante observada de velocidad de primer orden para la hidroxilaminólisis de GNH_2 en la presencia de Ni(II) a diferentes concentraciones. El ensayo se realizó a $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7.2$ y 1M de hidroxilamina. $\chi^2 = 1.71 \times 10^{-12}$.

* El coeficiente de extinción es el ya mencionado de $650 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el ácido glicilhidroxámico y Fe(III) en medio ácido. La concentración inicial de GNH_2 puesta en la celda de medición (0.003M) es 10 veces menor que la presente en el matraz de reacción (0.03M).

Con Cd(II) el efecto catalítico aunque es positivo es menor al de Ni(II), en cambio Zn(II) muestra la mejor aceleración (casi 5 veces) y a diferencia de lo que pasa con Ni(II) la saturación sucede mucho más lentamente.

En la figura 4.12 se observa el efecto catalítico para Zn(II) como función de la concentración del cation a diferentes valores de pH y no se ve que se llegue a un valor constante de la k_{obs} , parecería que aun se puede aumentar más la velocidad mediante el aumento en la concentración, sin embargo no es posible experimentalmente, puesto que el intervalo está acotado por la precipitación del hidróxido metálico, sobre todo a valores de pH más básicos de ahí que a pH 7.5 sólo se tengan k_{obs} hasta $[Zn(II)] = 0.03M$.

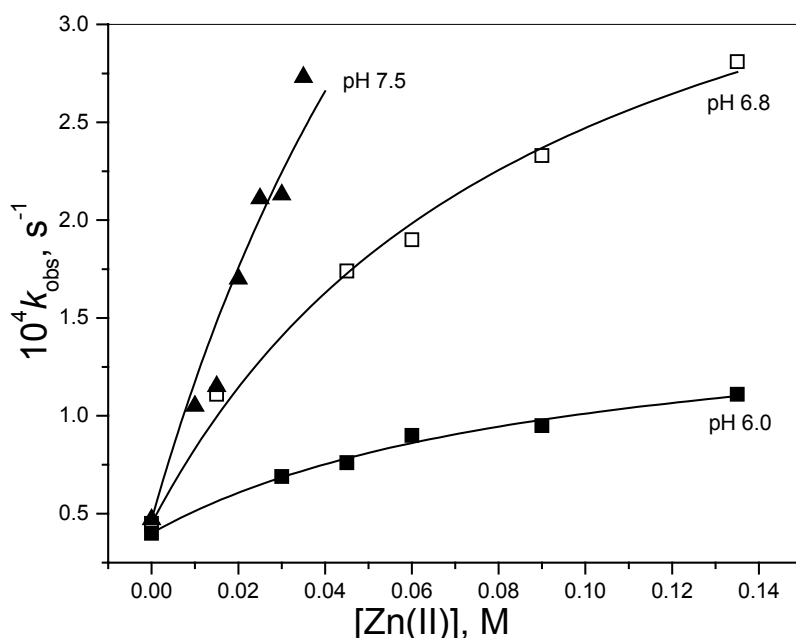


Figura 4.12. Constante de velocidad de primer orden para la sustitución nucleofílica de GNH_2 con hidroxilamina 1M, en función de la concentración de Zn(II) a tres diferentes valores de pH, la temperatura fue $50^\circ C$. $\chi^2_{6.0} = 12.4 \times 10^{-12}$, $\chi^2_{6.8} = 5.5 \times 10^{-11}$, $\chi^2_{7.5} = 6.0 \times 10^{-10}$.

Las constantes de estabilidad para Cu(II), Cd(II), Ni(II) y Zn(II) coordinados a GNH_2 son respectivamente: $\log K = 5.41, 5.2, 4.2$ y 3.28 , estos valores junto con los de k_{obs} dados en la tabla 4.2 tienen una relación que va en orden inverso; a mayor estabilidad del complejo menor velocidad de reacción. El orden de saturación también tendría que ir en el mismo sentido, siendo el Cu(II) quien presenta saturación a menor concentración, y Zn(II) el que tiene el mismo fenómeno a la mayor concentración.

Otro proceso que puede estar presente en este comportamiento de los iones metálicos con las amidas, es su capacidad para desprotonarlas. El hidrógeno de amida sólo es posible sustraerlo a valores de pH muy básicos, $pK_a = 15$, sin embargo en la presencia de iones metálicos el pK_a disminuye considerablemente, así para Cu(II) el pK_a cambia de 15 a 4, realmente un enorme abatimiento de este valor. ^[20] Ahora en la presencia de cobre la amida se desprotona a pH ácido, y el nitrógeno amídico se coordina al ion metálico. En esta situación, la ruptura del enlace C-NR queda imposibilitada, pues es difícil que el grupo -NR salga de la molécula al permanecer coordinado, de hecho se esperaría que el ion metálico también coordinará a la amina de la glicinamida formando un anillo de 5 miembros.

Probablemente lo que se observa en la figura 4.10 sea una disminución en la velocidad de formación del ácido hidroxámico como consecuencia de la coordinación de Cu(II) al nitrógeno amídico, lo que justamente se observa como un agotamiento de la reacción.

Hasta este punto, los datos obtenidos indican que los mejores resultados en estos sistemas se dieron con Zn(II), por lo que el estudio se continuó con este ion metálico.

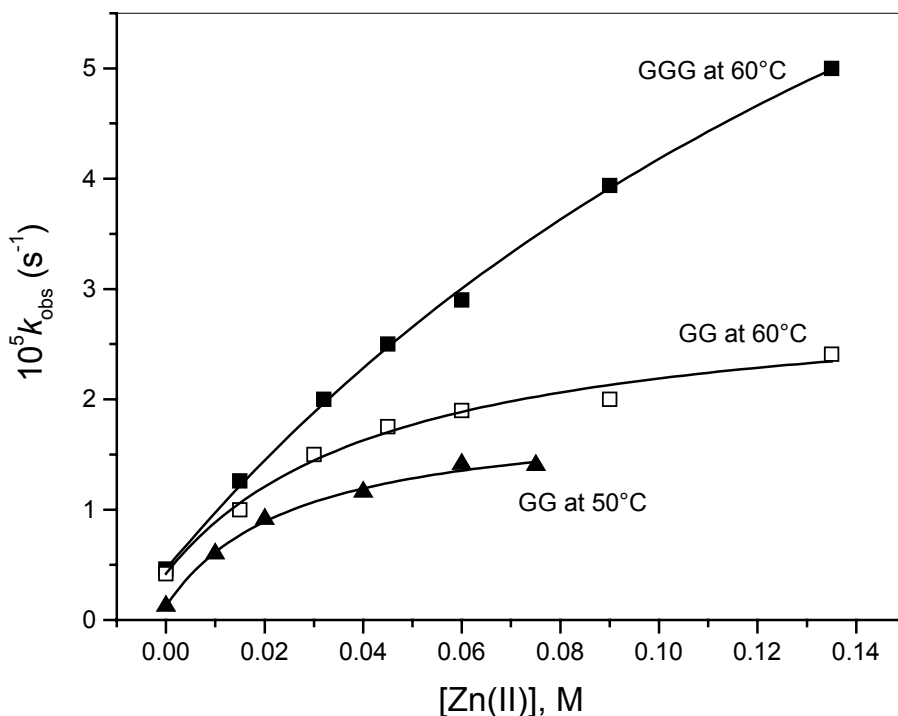
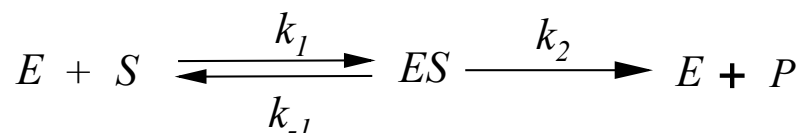


Figura 4.13. Constante observada de velocidad de primer orden para la ruptura de glicil-glicina (GG) y triglicina (GGG) mediante hidroxilamina 1M a pH 6.8 en función de la concentración de Zn(II). $\chi^2_{GG60} = 2.4 \times 10^{-12}$, $\chi^2_{GGG} = 3.7 \times 10^{-13}$.

Bajo el mismo sistema de hidroxilamina y Zn(II) se usaron otros sustratos no activados, tales como algunos derivados de la glicina, en la figura 4.13 se presentan las k_{obs} para la glicilglicina (o diglicina, GG) y para la glicilglicilglicina (o triglicina, GGG) como función de la concentración de Zn(II).

La reactividad de estos sustratos es menor que la de GNH_2 de ahí que se decidiera trabajar a una temperatura mayor. El comportamiento cinético para GG y GGG es similar al mostrado en GNH_2 , lo que significa que el mecanismo de ruptura debe ser el mismo para las tres amidas.

La mayoría de los sistemas enzimáticos que han sido estudiados a la fecha y que se pueden hallar en la bibliografía, se comportan como si existiera un equilibrio entre el sustrato (S) y el sitio activo de la enzima (E) con formación del intermediario ES dentro de cual el sustrato se transforma al producto, tal como se describe bajo el esquema 3.



Esquema 3

Si en lugar de E lo sustituimos por Zn(II) de nuestros sistemas y aplicando la suposición de Briggs-Haldane, que se establece un estado estacionario para la formación y desaparición del *complejo metal-sustrato* (Zn(II)S), entonces se obtiene la ecuación 4.4.

$$k_{obs} = \frac{k_c [\text{Zn(II)}]K + k_0}{1 + K[\text{Zn(II)}]}$$

(4.4)

Este modelo describe una hipérbola conocida como comportamiento cinético tipo **Michaelis-Menten**,^[31] o ecuación del mismo nombre. Las magnitudes k_0 y k_c son las constantes de velocidad para la hidroxilaminólisis del sustrato libre y enlazado al Zn(II), y K es la constante de estabilidad para el complejo metal-sustrato.

Los perfiles a valores bajos de pH mostrados en las figuras 4.12 y 4.13 se ajustan a la ecuación tipo Michaelis-Menten, los parámetros encontrados para los sustratos GNH_2 , GG y GGG, se muestran en la tabla 4.3.

Los valores de K son prácticamente independientes del pH, pero el efecto de aceleración por Zn(II), expresado como k_C/k_0 se incrementa de 4 a 9 yendo desde pH 6 a 6.8. Los resultados a pH 7.5 sólo cubren la parte lineal inicial de la dependencia de la concentración, pero usando el valor de K encontrado a pH menor se puede encontrar de este resultado la relación $k_C/k_0 = 16$. Así que la eficiencia catalítica de Zn(II) se incrementa yendo hacia disoluciones más básicas.

Tabla 4.3. Constantes de velocidad para la hidroxilaminólisis no catalizada (k_0) y catalizada (k_C) de diferentes sustratos en la presencia de Zn(II), y constante de estabilidad (K) de sus complejos con Zn(II), ecuación (4).

Sustrato	T, °C	pH	k_0, s^{-1}	k_C, s^{-1}	K, M^{-1}	k_C/k_0
GNH_2	50	6.0	4.0×10^{-5}	1.6×10^{-4}	10.4	4.0
-	50	6.8	4.5×10^{-5}	4.3×10^{-4}	10.9	9.5
-	50	7.5	4.7×10^{-5}	7.8×10^{-4}	10.6 ^{a)}	16.6
GG	50	6.8	1.2×10^{-6}	1.9×10^{-5}	38.5	15.8
-	60	6.8	4.2×10^{-6}	3.0×10^{-5}	22.2	7.1
GGG	60	6.8	4.6×10^{-6}	1.3×10^{-4}	4.4	28.3

^{a)} Valor promedio entre las constantes a pH 6.0 y 6.8.

La constante de velocidad de primer orden en función del pH, ahora en la presencia de Zn(II), no presenta la forma de campana que se mostró en las figuras 4.2, 4.5, 4.6 y 4.8, sino que existe un aumento continuo con el aumento del pH, véase la figura 4.14. Nuevamente no es posible llegar a valores más altos de pH debido a la aparición de precipitado.

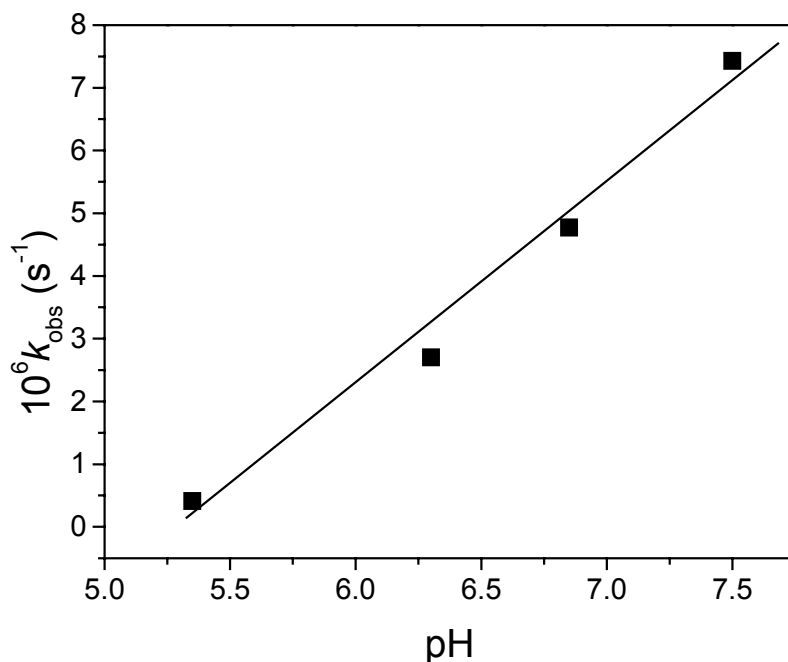
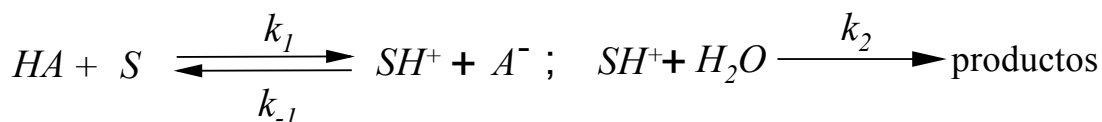


Figura 4.14. Hidroxilaminólisis de GG 0.03 M con NH_2OH 1M y 0.02M de Zn(II) en función del pH a $T=50^\circ\text{C}$. Los valores de k_{obs} de primer orden han sido corregidos para la velocidad no catalizada. $\rho^2=0.992$

La catálisis ácida o básica general puede plantearse conforme se muestra en el esquema 4:



Esquema 4

Bajo este esquema el ion metálico actúa en nuestros sistemas como ácido general sustituyendo al catión del nucleófilo, este es el NH_3OH^+ , de ahí que ya no se dependa de la existencia de esta especie la cual coexiste con su par neutra. Esta explicación es consistente con el aumento de la velocidad al aumentar la concentración de Zn(II) mostrado en las figuras 4.12 y 4.13.

Otro resultado que concuerda con lo anteriormente expuesto es lo observado para k_{obs} vs. concentración de NH_2OH , anteriormente en la hidroxilaminólisis no catalizada se encontró una dependencia cuadrática debida a la participación de las dos especies del nucleófilo, figura 4.3. En la presencia del ion metálico a concentración fija, el proceso sólo depende de la especie NH_2OH , es decir la reacción es de primer orden respecto a la hidroxilamina, véase la figura 4.15.

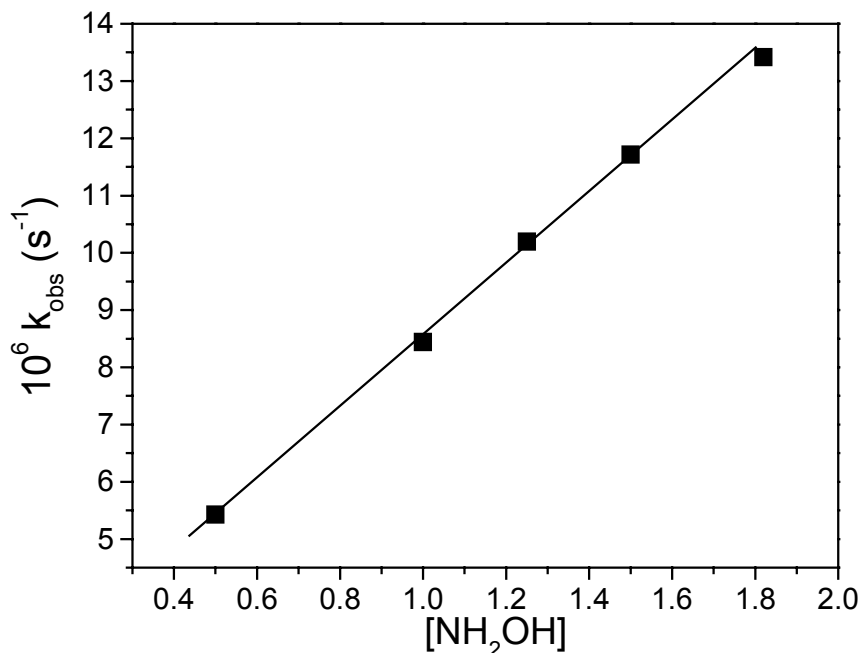


Figura 4.15. Hidroxilaminólisis de GG 0.035 M con NH₂OH 1M y 0.02M de Zn(II) en función de [NH₂OH] a T = 50°C y pH = 7. Los valores de k_{obs} fueron corregidos descontando la contribución no catalítica. La línea continua corresponde al ajuste con una ecuación de primer grado cuyo coeficiente de determinación es $\rho^2 = 0.998$.

Un gráfico de $\log k_{\text{obs}}$ en función del pH, en el que se ha restado la contribución no catalítica y a una concentración fija de Zn(II) para los sustratos GNH₂, GG y GGG, se muestra en la figura 4.16. En los tres casos el comportamiento es lineal con una pendiente de 0.86, cercana a la unidad, para la curva de GNH₂, y una pendiente menor para los péptidos GG y GGG que como ya se ha visto son menos reactivos que la GNH₂.

Las constantes de estabilidad para los complejos de Zn(II) con GNH₂ y los dos péptidos son similares y son aproximadamente $2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ a 25°C. ^[30] Las constantes de estabilidad cinética dadas en la tabla 4.3 son mucho menores, esto es debido parcialmente a un considerable grado de protonación de los grupo amino de los sustratos alrededor de pH = 7. Los valores de los pK_a de las formas protonadas de todos los sustratos son cercanos a 8, ^[119] por lo tanto las constantes de estabilidad esperadas a pH 7 pueden ser estimadas como 200 M^{-1} a 25°C, la cual es aun un orden de magnitud más grande que el valor cinético. Una posible razón de esta contradicción es la alta temperatura, además las medidas para GG a menores temperaturas dan un valor más grande de K, véase la tabla 4.3.

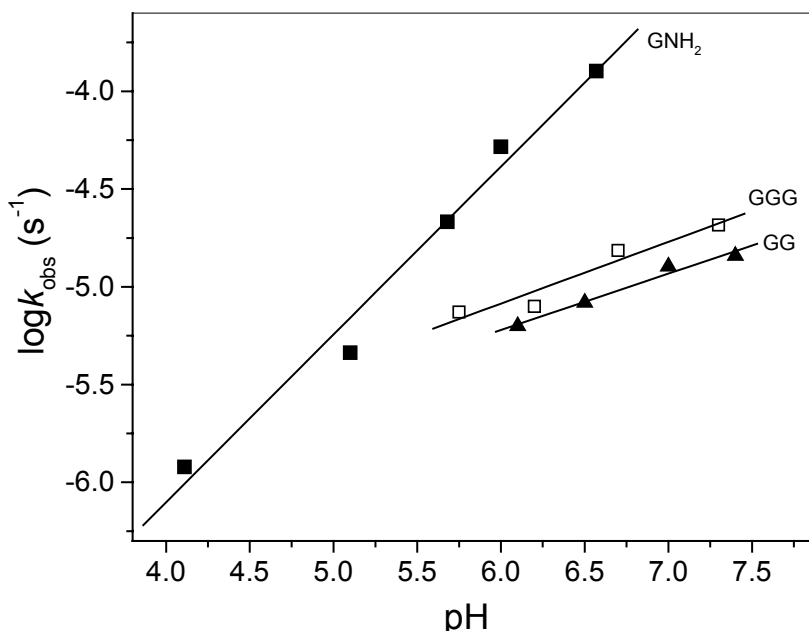
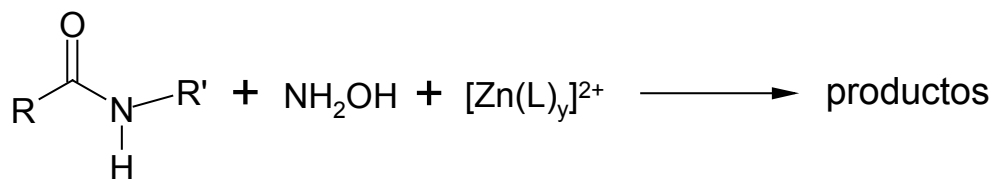


Figura 4.16. Logaritmos de k_{obs} para la hidroxilaminólisis Zn(II)-catalizada de GNH₂ a T=50°C, y de GG y GGG a T= 60°C con NH₂OH 1M. $\rho^2_{\text{GNH}_2}=0.996$, $\rho^2_{\text{GGG}}=0.994$, $\rho^2_{\text{GG}}=0.998$

Hidroxilaminólisis con iones metálicos coordinados.

Uno de los problemas para alcanzar mayores velocidades de reacción en la hidroxilaminólisis de estos sistemas, es la dificultad de alcanzar valores de pH más básicos cuando en la reacción participan iones metálicos. El uso de ligantes, como se mencionó en los antecedentes, no sólo puede ayudar con este propósito, sino que además, es posible que el compuesto complejo disminuya el pK_a de los nucleófilos participantes al encontrarse también coordinados al ion metálico.



En base a esta idea, se propuso el uso de algunos ligantes tales como: etilendiamina (en), imidazol (Im), 2, 2'-bipiridina (bipy), dietilentriamina (dien), 1, 4, 7-triaza-ciclononona (N₃[9]ona) y el 1, 5, 9-triaza-ciclododecano (N₃[12]ona), véase la figura 4.17.

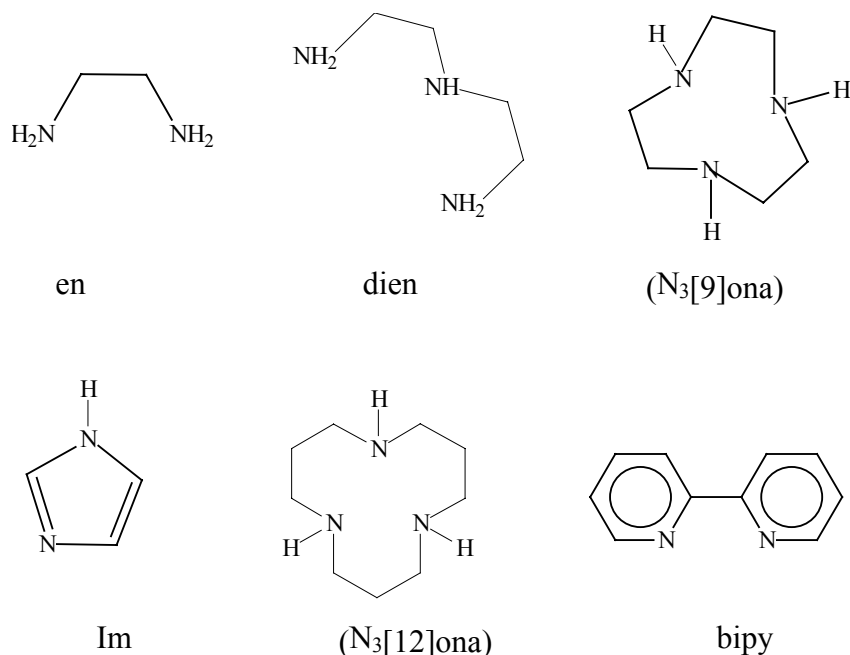


Figura 4.17. Representación de los ligandos usados en la coordinación de Zn(II) en la hidroxilaminólisis de amidas no activadas y péptidos de este trabajo.

En la bibliografía se encuentran muchos ejemplos en los que se usan compuestos de coordinación en procesos catalíticos de diferente naturaleza. En el caso particular de la hidrólisis de amidas y péptidos ya se han mencionado los casos más sobresalientes en la sección de antecedentes, cabe recordar aquellos ejemplos donde se usan ligandos con grupos coordinantes amino: $[\text{Co N}_4(\text{OH})(\text{OH}_2)]^{2+}$ tal que $\text{N}_4 = \text{en}_2, \text{trien}, \text{tren},$ ^[56] $\text{Cu}(\text{N}_3[9]\text{ona})^{2+},$ ^[63] $[\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6].$ ^[64]

Al igual que en los sistemas anteriores, la cinética de la reacción de hidroxilaminólisis fue seguida por formación del ácido hidroxámico correspondiente, a través de su complejo con Fe(III) ($\lambda = 540\text{nm}$).

Algunos resultados de las constantes observadas en función de la concentración del ligando, son mostradas en la tabla 4.4. Comparando con el valor de la k_{obs} en ausencia de ligando, línea No.1, podemos ver que en todos los casos hay una disminución de la constante de velocidad. Aun a pesar de que se lograron valores de pH más básicos, donde por cierto se esperaban mayores velocidades de reacción, también hay una disminución, véanse las líneas 4 y 5 de la misma tabla.

Tabla 4.4 Constantes de velocidad de primer orden para el péptido GG en la presencia de los complejo Zn(II)-dien, Zn(II)-en y Zn(II)-Im, en las relaciones estequiométricas 1:1 y 1:2 a la T = 50°C, [Zn(II)] = 0.02M.

No.	NH ₂ OH, M	Zn(II)-L, M	pH	k _{obs} s ⁻¹
1	1.0	sin ligando	7.0	1.0x10 ⁻⁵
2	-	0.02 dien	-	4.1x10 ⁻⁶
3	-	0.04 -	-	3.09x10 ⁻⁶
4	-	0.02 -	8.5	3.22x10 ⁻⁶
5	-	0.04 -	-	1.37 x10 ⁻⁶
6	-	0.02 en	7.0	6.85x10 ⁻⁶
7	-	0.04 -	-	6.1x10 ⁻⁶
8	-	0.02 Im	-	8.3x10 ⁻⁶
9	-	0.04 -	-	7.4x10 ⁻⁶

Los ensayos con bipy no se pueden medir por métodos espectrofotométricos, puesto que Fe(III) de concentración 100 veces mayor a la de zinc, forma un compuesto de coordinación con dicho ligando cuya absorbancia cubre la zona de detección del ácido hidroxámico.

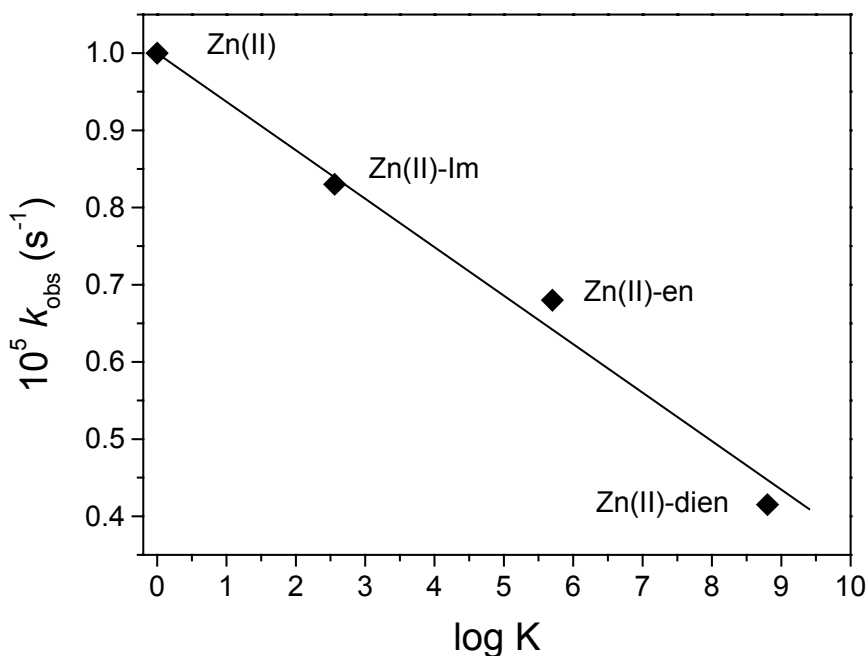


Figura 4.18 Constante de velocidad de primer orden para la hidroxilaminólisis de GG, como función de las constantes de estabilidad de los complejos Zn(II)-Im, Zn(II)-en y Zn(II)-dien, a T = 50°C y pH = 7.

La constante de formación de los complejos 1:1 arriba presentados, se muestran en la tabla 4.5, y en la figura 4.18, puede verse que tienen una correlación con las constantes de velocidad de la tabla 4.4.

Tabla 4.5. Valores de constantes de estabilidad y valores de pK_a para los ligantes usados en la hidroxilaminólisis, y para las amidas en estudio.

Zn(II)-Ligando	logK	pK_a del ligando	2° pK_a
Imidazol	2.56	6.95 (H ₂ L/H+HL)	14.52
Bipy	5.13	1.49(H ₂ L/H+HL)	4.31
Etilendiamina	5.7	6.77 (H ₂ L/H+HL)	9.89
Dietilentriamina	8.8	3.6 (H ₃ L/H+H ₂ L)	9.02
N ₃ [9]ona	11.6	3.44 (H ₃ L/H+H ₂ L)	6.79
GNH ₂	3.28	7.77 (H ₂ L/H+HL)	15.98
GG	3.44	7.82 (H ₂ L/H+HL)	14.84
GGG	3.18	7.8 (H ₃ L/H+H ₂ L)	13.67
NH ₂ OH	0.48	5.9 (HL/H+L)	

En la tabla 4.5 también aparecen las constantes de estabilidad para Zn(II) y los 3 sustratos y el nucleófilo, esos valores son más pequeños que las constantes para los ligantes excepto imidazol, sin embargo, este último tiene un pK_a casi un orden de magnitud menor que las amidas, lo que equivale a decir que en las condiciones de reacción, pH 7, el imidazol se encuentra en una proporción de 10 a 1 en mayor disposición para coordinarse con el ion metálico que cualquiera de los sustratos.

Con los compuestos N₃[9]ona y N₃[12]ona como ligantes, podemos realizar reacciones en medios básicos incluso a pH 9, pero las constantes de velocidad encontradas siguen siendo menores que en ausencia de ligantes, por ejemplo, en el caso de GNH₂ en las condiciones de T = 50°C y pH = 7, la constante medida es de $1.37 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ teniendo NH₂OH 1M y .03M de Zn(II). La misma reacción en las mismas condiciones y en la presencia de N₃[9]ona 0.03M, tenemos $k_{\text{obs}} = 9.31 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, si se cambia a pH 8 el resultado es $1.32 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

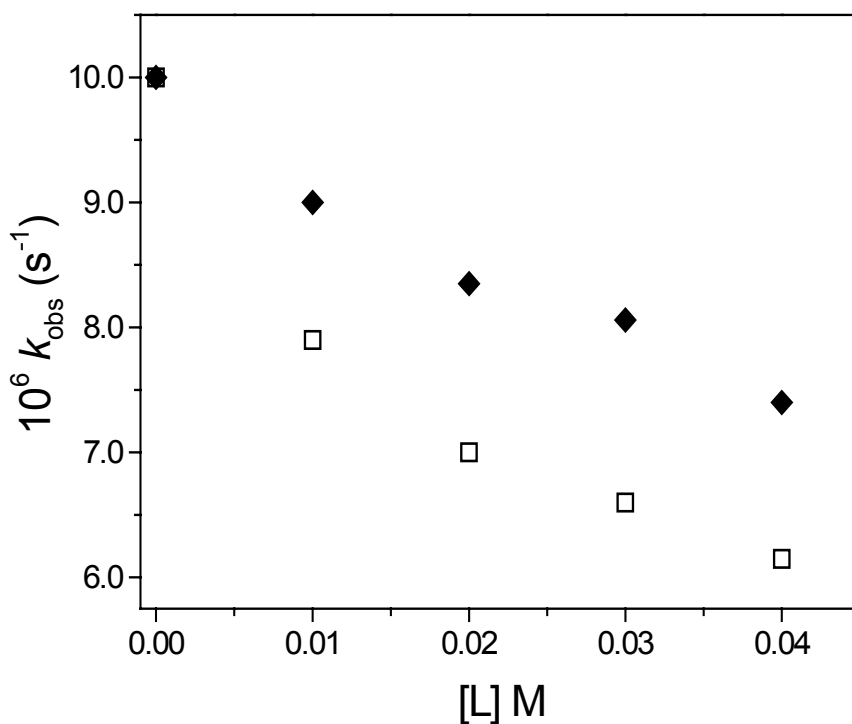


Figura 4.19 Constantes de velocidad de primer orden para la sustitución nucleofílica de GG 0.035 M en presencia de NH_2OH 1M y Zn(II) 0.02M en función de la concentración de los ligantes ([L]) imidazol (\blacklozenge) y etilendiamina (\square), la temperatura fue de 50°C y $\text{pH} = 7$.

La k_{obs} también disminuye con el aumento de la concentración de los ligantes en la mezcla de reacción, y esto es mostrado en la figura 4.19 para GG y Zn(II) coordinado a imidazol y etilendiamina. Un aumento en la concentración del ligando produce una disminución en la formación del ácido glicilglicilhidroxámico aun con ligantes poco coordinantes como el imidazol.

En resumen las figuras 4.18 y 4.19 sugieren que el ion metálico interviene en la reacción de hidroxilaminólisis coordinándose al sustrato, de ahí que cualquier otra sustancia con sitios de coordinación competirá con el sustrato por los iones metálicos.

Ensayos con otros péptidos

Con los resultados encontrados hasta aquí se pueden proponer algunas formas en las que el ion metálico podría estar participando en el proceso de catálisis de estas amidas, véase la figura 4.20.

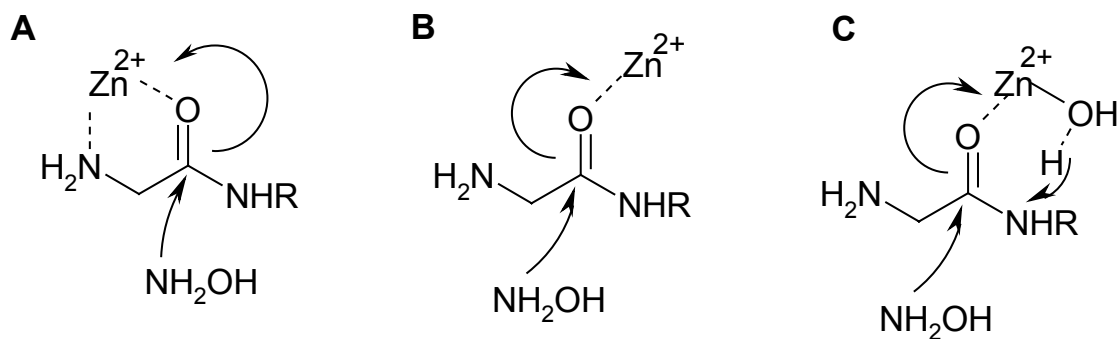


Figura 4.20 Posibles formas de coordinación del ion metálico sobre los sustratos

En las tres estructuras se propone una activación del centro electrofílico mediante la coordinación del ion metálico al oxígeno de carbonilo, seguido por la donación del par de electrones libres del nitrógeno de la hidroxilamina al carbono de carbonilo, justo por el otro lado de la amida. En el dibujo **A** se propone además la coordinación del ion metálico a la amina terminal. Las estructuras **B** y **C** son más parecidas entre si, aunque en la última se considera la posibilidad de que las moléculas de agua participen en el proceso, facilitando la salida del grupo $-NHR$ al donarle un protón.

Conforme a lo presentado en los antecedentes, faltaría un cuarto mecanismo posible en el cual el nucleófilo se encuentra coordinado al ion metálico, sin embargo esto implicaría que la NH_2OH tendría que ir hacia al carbono de carbonilo con el par de electrones de su oxígeno, y se ha mencionado también en esa misma sección, que una sustitución donde el oxígeno de la hidroxilamina se une directamente al carbono de carbonilo es poco probable, así que este mecanismo queda excluido.

A fin de extender el uso de nuestro sistema, se probó la hidroxilaminólisis sobre un grupo de sustratos más diversos, como Alanil-glicina (Ala-Gly), Alanil-Histidina (Ala-His), Histidil-alanina (His-Ala), asparagina (Asn), N-acetil-glicina (N-Ac-Gly), Asparagil-glicina. En la tabla 4.6 se resumen las constantes de velocidad para la hidroxilaminólisis de estos sustratos en la ausencia de iones metálicos y en la presencia de Zn(II).

Tabla 4.6 Constantes de velocidad de primer orden para la hidroxilaminólisis de diversos péptidos (0.03M) en la presencia de NH_2OH 1M. La detección de los ácidos hidroxámicos formados se hizo espectrofotométricamente, de la misma forma que en los casos anteriores.

	Sustrato	Ion metálico	T, °C	pH	k, s^{-1}	k_C/k
1	Ala-Gly	Ninguno	65	6.24	1.03×10^{-6}	-
2	-	Zn(II), 0.03 M	-	-	5.9×10^{-6}	5.7
3	Asp-Gly	Ninguno	65	6.25	3.26×10^{-6}	
4	-	Zn(II), 0.03 M	-	-	4.8×10^{-6}	1.4
5	Ala-His	Ninguno	60	7.0	2.2×10^{-6}	
6	-	Zn(II), 0.03 M	-	-	9.6×10^{-6}	4.4
7	His-Ala	Ninguno	60	7.0	3.4×10^{-6}	
8	-	Zn(II), 0.03 M	-	-	3.7×10^{-6}	1.07
9	Asn	Ninguno	65	6.3	6.6×10^{-5}	
10	-	Zn(II), 0.03 M	-	-	6.0×10^{-5}	1
11	N-AcGly	Ninguno	50	7.0	4.5×10^{-6}	
12		Zn(II), 0.03 M	-	-	8.5×10^{-6}	1.8
13	GG	Ninguno	60	6.8	4.2×10^{-6}	
14		Zn(II), 0.03 M	-	-	1.5×10^{-5}	3.6
15		Hidrólisis no-catalizada ^[4]	60	7.0	3.6×10^{-9}	
16		Hidrólisis por $\text{Zn}_2\text{L}(\text{OH})$ ^[121]	70	ca.8.5	4.6×10^{-7}	
17		Hidrólisis por CuL ^[122]	50	8.1	2.6×10^{-7}	
18	GGG	Ninguno	60	6.8	5.2×10^{-6}	
19		Zn(II), 0.03 M	-	-	2.1×10^{-5}	4.04

Comparando los cocientes de las velocidades catalizadas sobre las no-catalizadas (k_C/k), encontramos que los péptidos terminados en amina tienen un efecto de aceleración por Zn(II) alrededor de 4. En tanto que los péptidos que no terminan en amina próxima al enlace amido, poseen un efecto catalítico pequeño o incluso nulo, de ahí que la relación sea cercana a uno.

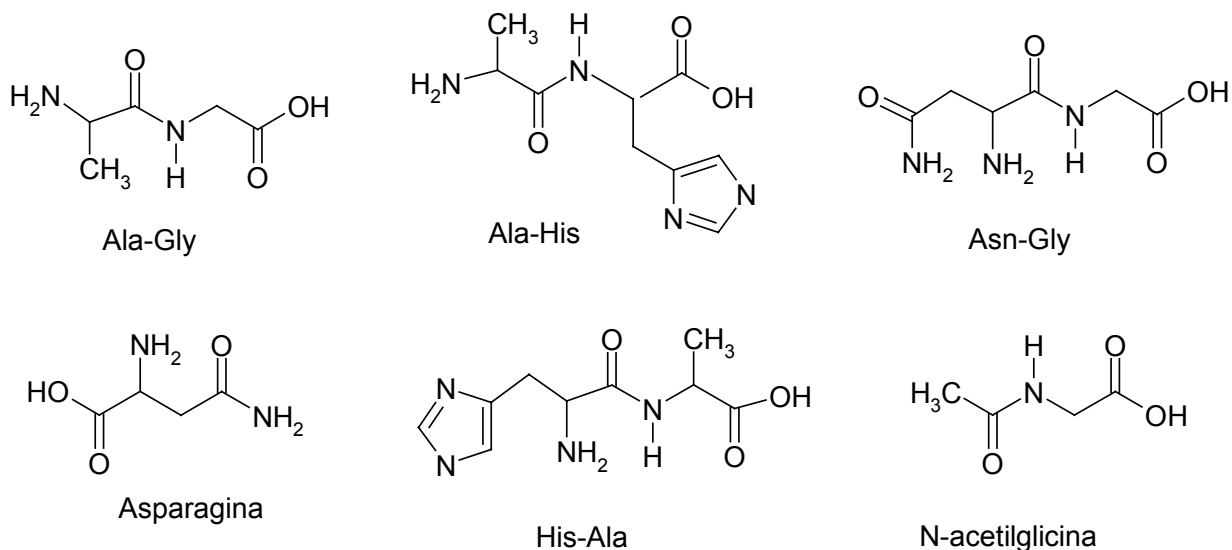
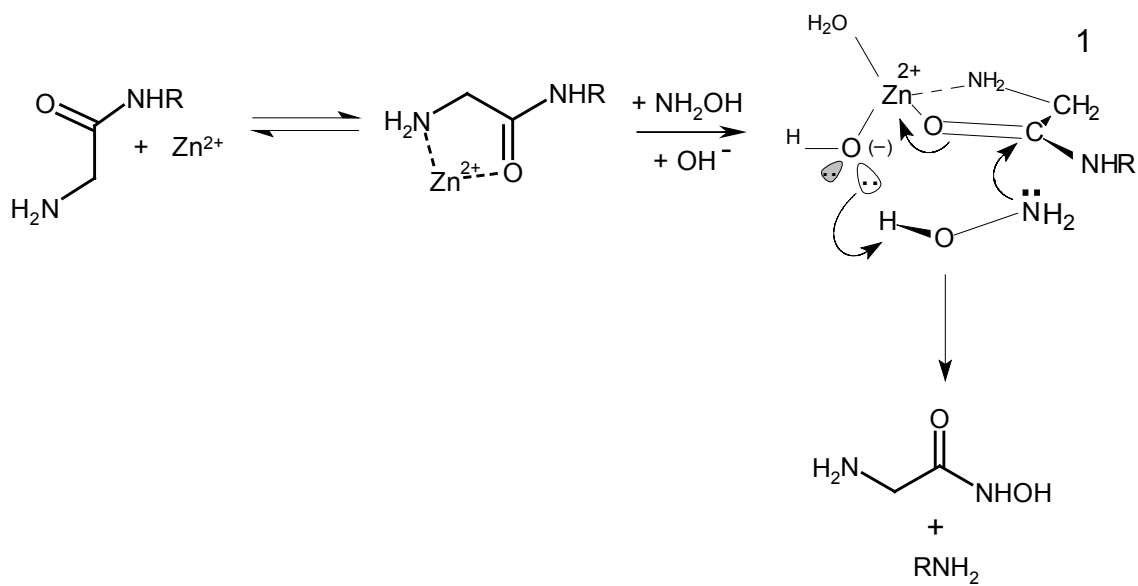


Figura 4.21 Representación de amidas y péptidos usados.

Estos datos nos llevan a un modelo donde el zinc debe tener un buen grupo coordinante cerca del centro de reacción, como sucede en la estructura **A** de la figura 4.20, y a su vez nos dice que si el sustrato tuviera un sitio con mejores características coordinantes, cerca del carbono de carbonilo, entonces serían factibles relaciones (k_c/k) con valores más altos.

Por otro lado, el hecho de que la hidroxilaminólisis catalizada sea más efectiva en unos sustratos y en otros no desde el punto de vista de reactividad no es malo, sino que puede entenderse como un tipo de selectividad que, como se ha dicho en otra parte de este trabajo, sería una característica muy deseable en un buen catalizador.

Todos los resultados mostrados en esta sección nos permiten proponer un mecanismo de reacción tentativo, el cual debe tomar en consideración la coordinación de Zn(II) al grupo α -amino del sustrato, la cinética de primer orden en NH₂OH y la dependencia de primer orden de k_{obs} sobre el OH. Dicho mecanismo es mostrado en el esquema 5.



Esquema 5

Se propone que el catión Zn(II) actúa como un catalizador ácido de Lewis el cual hace innecesaria la participación de NH_3OH^+ , por lo que la reacción resulta ser de primer orden respecto a la concentración total de hidroxilamina. El papel del ion hidróxido es probablemente el de asistir al nucleófilo como una base general de la forma que se muestra en la estructura 1 del esquema 5.

En la tabla 4.6 además se incluyen algunos resultados de la hidrólisis espontánea y de la hidrólisis catalizada por Zn(II) y Cu(II) para GG, tomados de la bibliografía con el propósito de compararlos con la hidroxilaminólisis catalizada por Zn(II). Puede verse que en la presencia de 0.03M de Zn(II) y 1M de NH₂OH la ruptura de GG procede aproximadamente 10⁴ veces más rápido que la hidrólisis no catalizada, y 10² veces que la hidrólisis catalizada por Zn(II) y Cu(II).

La vida media de los péptidos a pH = 7 en la presencia de Zn(II) 0.1M y 1M de NH₂OH es de 5 h a 60°C, similar a aquellos sistemas hidrolíticos más reactivos reportados y que están basados en Pd(II)^[123] y Ce(IV).^[4]

Análisis de productos por RMN

La espectrofotometría usada para estudiar las cinéticas de hidroxilaminólisis de péptidos y amidas no activadas, no permite determinar la existencia o la ausencia y la cuantificación de subproductos, puesto que sólo se registra específicamente la presencia de un producto, el ácido hidroxámico, dicho sea de paso, su complejo con Fe(III) tiene una banda muy ancha que abarca un intervalo de longitudes de onda que va desde los 400 hasta los 500 nm aproximadamente.

Resulta afortunado el hecho de que el ion Zn(II) sea diamagnético, pues nos permite seguir las reacciones en las cuales se haya presente mediante las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN¹H). En este caso los desplazamientos químicos sólo se modifican por la presencia de carga y no por la presencia de un nuevo campo magnético.

De esta forma la cinética de reacción de hidroxilaminólisis para la GNH₂ en presencia de Zn(II) fue seguida por RMN¹H y los espectros correspondientes se observan en la figura 4.22.

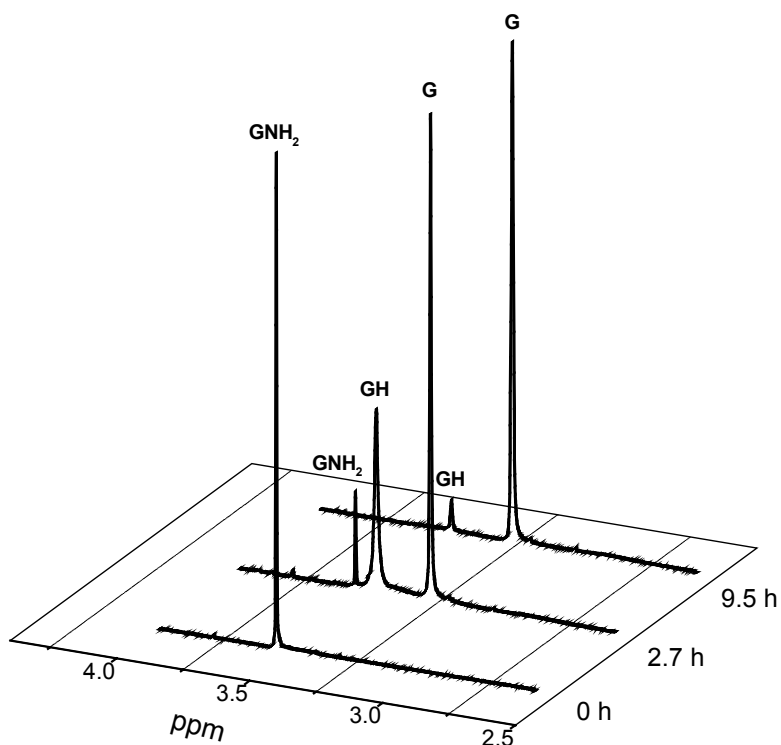
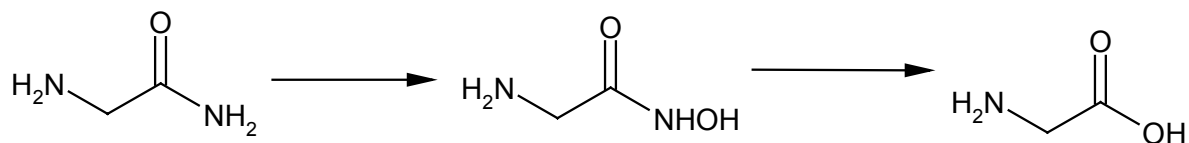


Figura 4.22 Espectros de RMN protónica para la mezcla de reacción con GNH₂ 0.05M, NH₂OH 1M y Zn(II) 0.1M en D₂O. Muestras tomadas a los tiempos de 0, 2.7 y 9.5 horas después de la incubación a pH 7 y T = 65°C.

La glicinamida tiene un par de protones metilénicos con propiedades magnéticas equivalentes, por lo que se observa una sola señal que aparece aproximadamente a 3.55 ppm en la presencia de ZnSO_4 . Después de 2.7 horas de reacción la señal de GNH_2 se reduce al 7%, donde además de la esperada señal del ácido glicilhidroxámico (GH, 3.508 ppm) aparece una más que corresponde a la presencia de glicina (G, 3.32 ppm), este hecho es comprobado mediante la adición de más glicina adquirida comercialmente sobre la mezcla de reacción, observando como la señal de 3.32 ppm se incrementa con cada adición. A este tiempo las intensidades de GH y de G son aproximadamente similares. A las 9.5 horas de iniciada la reacción el 95% de toda la GNH_2 se ha convertido en G y aproximadamente el 5% permanece como GH.

Estos resultados indican que en las condiciones experimentales el ácido GH es posteriormente hidrolizado a G e hidroxilamina. La hidrólisis de ácidos hidroxámicos es un proceso lento que requiere condiciones fuertemente ácidas o básicas. ^{[43], [122]}



La catálisis por iones metálicos tales como Fe(III) y en mucho menor grado por cationes divalentes (Cu(II), Mn(II), Ni(II) y Cd(II)) fue reportada para ácido hidroxámico en ácido sulfúrico 1.5 M a 70°C. ^[124]

Aparentemente la hidrólisis de GH es más sensible a la catálisis ion-metálica. En un experimento por separado se encontró la constante de velocidad de primer orden para la hidrólisis de GH y fue de $6.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, esto es un tiempo de vida media de 3 horas, las condiciones fueron de 65°C, pH 7, en la presencia de 0.1M de Zn(II) e hidroxilamina 1M.

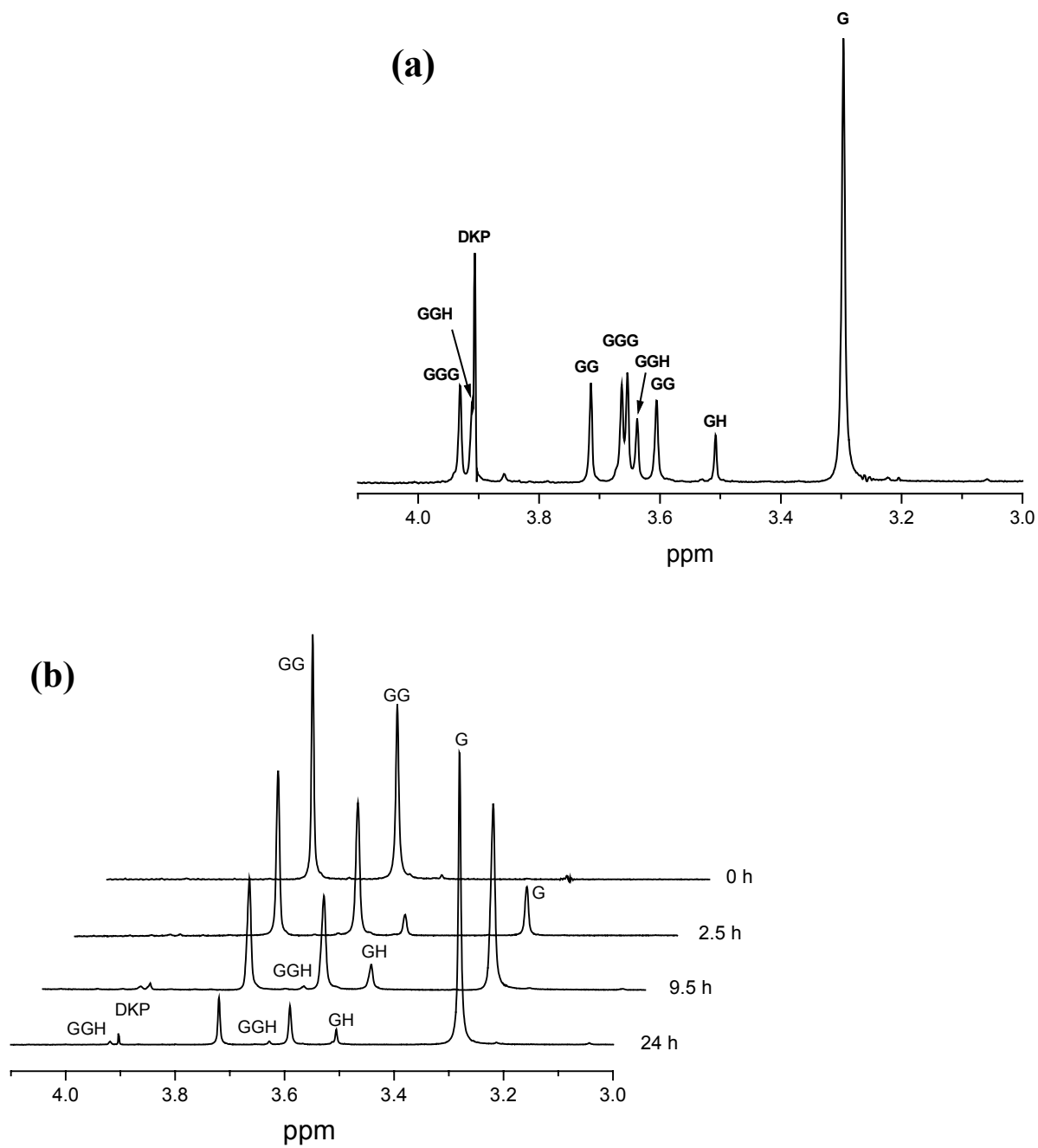
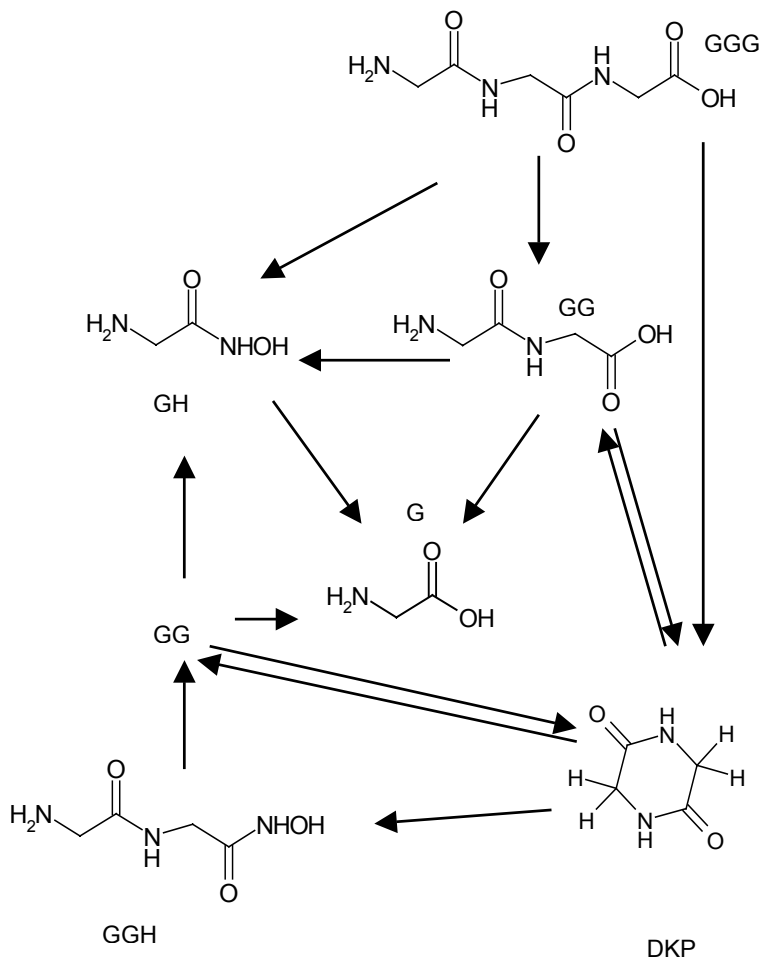


Figura 4.23. Espectros de RMN protónica para (a) glicilglicina y (b) GGG, en la presencia de NH_2OH 1M y Zn(II) 0.1M, a la temperatura de 65°C y pH 7.

Para los sustratos GG y GGG los espectros de RMN protónica se muestran en la figura 4.23, después de 24 horas en ambos casos el grado de transformación es del 80% siendo G el producto principal.



Esquema 6

En el caso de GG también se forman pequeñas cantidades de dicetopiperacina (DKP, 1.5% del total de los productos) y del ácido glicilglicilhidroxámico (GGH). Bajo las condiciones usadas es posible que se lleve a cabo la ciclización de GG, y la ruptura de DKP por hidroxilamina explica la existencia de GGH. ^[121]

La ciclización de un tripeptido para formar DKP podría ser mucho más rápida, ^[121] además la señal de DKP para la mezcla de reacción de GGG es relativamente fuerte con un 7% del total de los productos, figura 4.23 b. El esquema 6 presenta algunas posibles rutas para la formación de DKP, así mismo muestra la formación de los diferentes intermediarios y producto de la reacción de sustitución

nucleofílica de la GGG. De esta forma la reacción de hidroxilaminólisis catalizada por Zn(II) no suprime totalmente la formación de DKP, pero compete favorablemente con la ciclización.

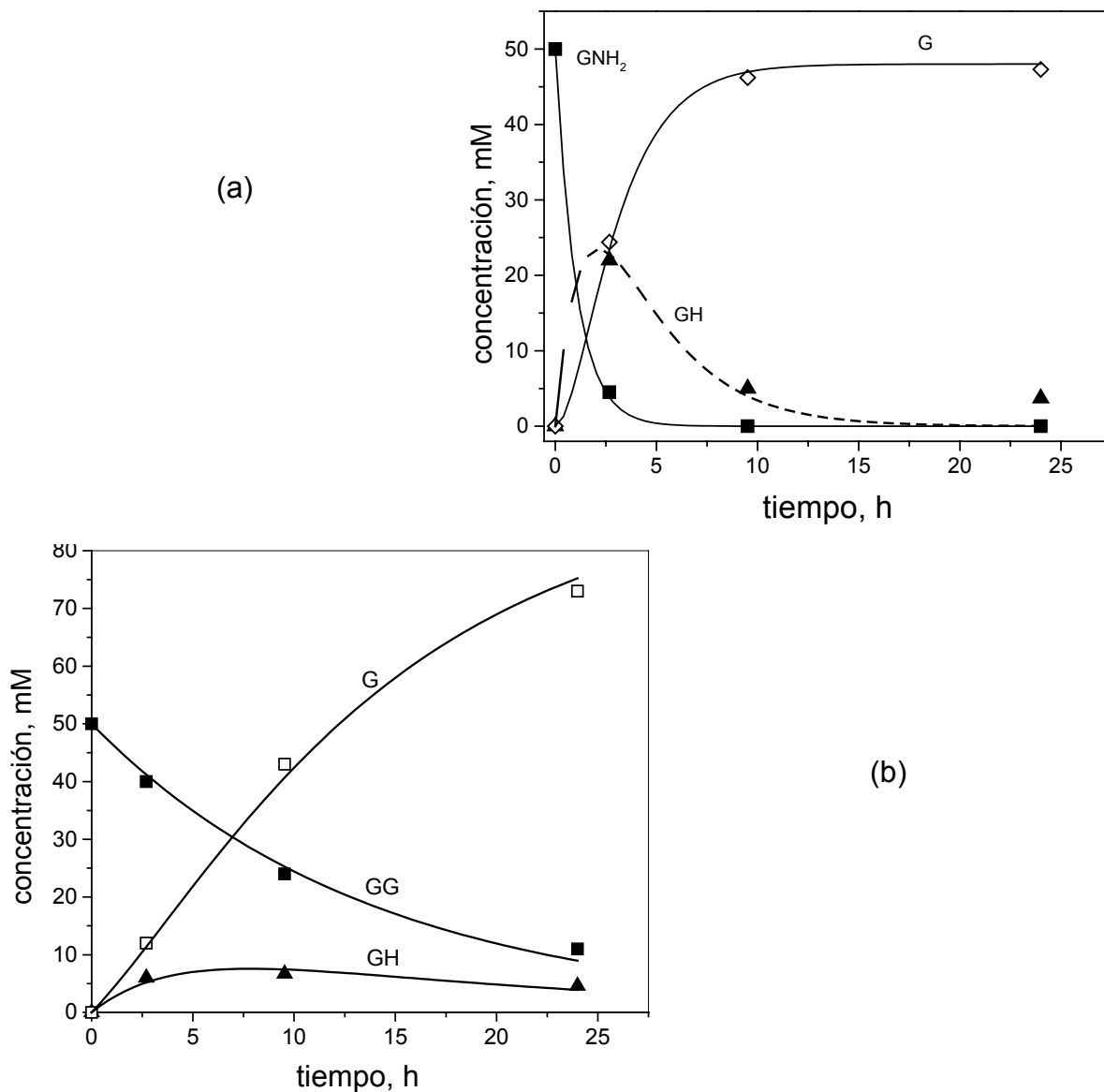
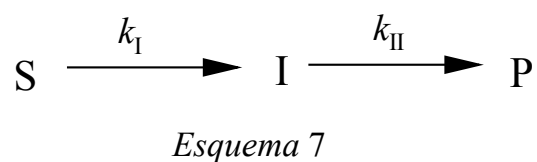


Figura 4.24 Valores de concentración de productos y sustratos en función del tiempo para la reacción de sustitución nucleofílica de GNH₂ **(a)** ($\chi^2_{\text{GNH}_2} = 6.22 \times 10^{-12}$) y GG **(b)** ($\chi^2_{\text{GG}} = 4.09 \times 10^{-11}$), en la presencia de 0.1M de Zn(II) y 1M de NH₂OH en D₂O a pH 7 y T=65°C. Valores determinados por RMN protónica.

El curso de las reacciones de las mezclas en D₂O para las amidas GNH₂, GG y GGG es seguido a través de la RMN a diferentes intervalos de tiempo. Los datos de concentración de productos y sustratos calculados a partir de las integrales de los espectros como función del tiempo se muestran en la figura 4.24.

La curva de la cinética para GH tiene la forma típica de un intermediario de reacción. Para el dipéptido la concentración máxima de GH es de aproximadamente 15% del total de la concentración de GG, indicando con ello que la constante de velocidad de descomposición de GH es más grande que la constante de velocidad de su formación.

Los perfiles en función del tiempo para todos los componentes de la reacción pueden ser ajustados a un esquema formal de dos reacciones consecutivas, como el mostrado en el esquema 7:



a partir del cual se obtienen las ecuaciones 4.5, 4.6 y 4.7

$$[S]_t = [S]_0 \exp(-k_I t) \quad [I]_t = \frac{k_I [S]_0}{(k_{II} - k_I)} [\exp(k_I t) - \exp(k_{II} t)]$$

(4.5) (4.6)

$$[P]_t = [S]_0 \left\{ 1 - \frac{1}{(k_{II} - k_I)} [k_{II} \exp(-k_{II} t) - k_I \exp(-k_I t)] \right\}$$

(4.7)

En la figura 4.24 las líneas continuas representan los perfiles teóricos calculados usando para ello $k_{II} = 6.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, valor de la constante de velocidad para la hidrólisis de GH dada más arriba en este texto, y $k_I = 2.2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ para GG y $1.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para GNH_2 , ambos valores también calculados anteriormente por el método espectrofotométrico usando Fe(III).

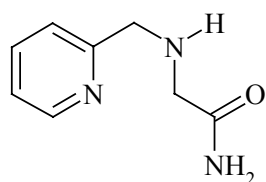
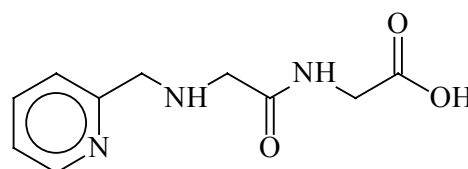
Los espectros de RMN obtenidos a varios intervalos de tiempo para la hidroxilaminólisis de GGG, bajo condiciones similares (1 M NH_2OH , 0.1 M Zn(II) a 65°C y pH 7) mostraron que el GH también se comporta como un intermediario y su máxima concentración se alcanza después de 7 horas, siendo el 12% del total de la cantidad del péptido.

En resumen se puede decir que existe una buena concordancia entre los resultados encontrados por las 2 diferentes técnicas y que el resultado final del tratamiento de los péptidos con hidroxilamina y catalizado con Zn(II) es la ruptura hidrolítica.

Hidroxilaminólisis de amidas modificadas

En el estudio de otras amidas diferentes a los derivados de la glicina, figura 21, se vio que cuando éstas tenían un buen grupo coordinante cerca del centro de reacción se presentaban las velocidades de reacción más altas.

Con el propósito de mejorar las capacidades coordinantes de los sustratos se realizó la alquilación reductiva de los grupos amino de las amidas G y GG con 2 piridil-aldehído, lo cual se describe en la sección de métodos. Los productos correspondientes son el 2 piridi-metil-N glicinamida (PyGNH₂) y el 2 piridi-metil-N glicilglicina (PyGG).

PyGNH₂

PyGG

Probando la reacción de sustitución nucleofílica en presencia de iones metálicos e hidroxilamina, se encuentra que es posible trabajar en medios básicos aun con Cu(II), situación que no era posible para los sustratos sin modificar. Las constantes de velocidad encontradas espectrofotométricamente para algunos iones metálicos se muestran en la tabla 4.7.

Tabla 4.7 Constantes de velocidad de primer orden para la Hidroxilaminólisis de PyGNH₂ 0.03M y NH₂OH 1M en la presencia de varios iones metálicos, valores medidos espectrofotométricamente.

Ion metálico 0.03M	T/°C	pH	k _{obs} s ⁻¹	k _c /k ₀
0.0	50	7.0	1.4x10 ⁻⁵	-
Ni(II)	-	-	3.90x10 ⁻⁵	2.7
Cd(II)	-	-	4.07x10 ⁻⁵	2.9
Cu(II)	-	-	2.8x10 ⁻⁴	20
Zn(II)	-	-	1.7x10 ⁻⁴	12
Cu(II)	-	8.0	2.18x10 ⁻⁴	16
Zn(II)	-	-	2.53x10 ⁻⁴	18

Al igual que con los anteriores sustratos se puede seguir aplicando el modelo de reacción tipo Michaelis-Menten presentado en el esquema 3 y al que corresponde la ecuación 4.4, esto se puede apreciar en la figura 4.25 para el caso del ion Zn(II).

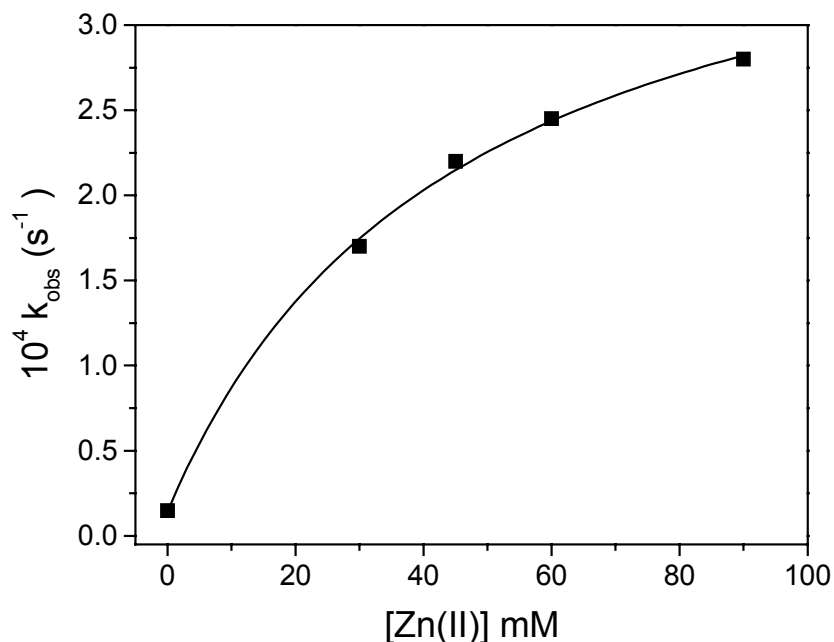


Figura 4.25. Constantes de velocidad de primer orden para la hidroxilaminólisis de PyGNH₂ 0.03M en la presencia de cantidades variables de Zn(II), a las condiciones de T=50°C, pH=7.0 y 1M de NH₂OH. $\chi^2 = 9.47 \times 10^{-12}$.

Los parámetros encontrados para PyGNH₂ mediante la ecuación 4.4 bajo las condiciones de T = 50°C y pH = 7 son: constante de estabilidad K = 22 M⁻¹, y constantes de velocidad no-catalizada y catalizada de $k_0 = 1.4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y $k_c = 4.17 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ respectivamente, de donde se obtiene un factor de aceleración de aproximadamente 30. Si comparamos los resultados para la hidroxilaminólisis de GNH₂ en condiciones similares, se tiene K = 10.9 M⁻¹ y $k_c/k_0 = 9.5$, es decir la aceleración de las reacciones catalizadas se incrementó de 9.5 a 30 veces para el sustrato sin modificar (GNH₂) y modificado (PyGNH₂) respectivamente.

El ion Zn(II), al igual que con los anteriores sustratos, sustituye al catión del nucleófilo NH₃OH⁺, por lo que la constante de primer orden presenta un aumento continuo con el aumento del pH, véase la figura 4.26.

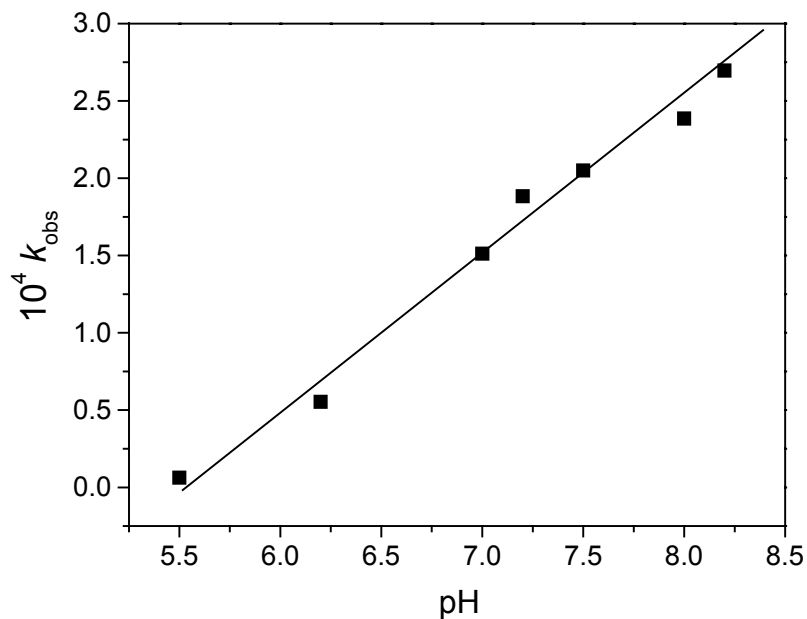


Figura 4.26 Constante de primer orden para la reacción de hidroxilaminólisis de PyGNH₂ 0.03M, a la temperatura de 50°C, NH₂OH 1M y Zn(II) 0.03M como función del pH. $\rho^2 = 0.995$.

La constante de velocidad como función del pH en las disoluciones de PyGNH₂ con Cu(II), no sigue el mismo comportamiento mostrado en los sistemas que contienen Zn(II), en este caso el aumento de la velocidad se interrumpe a pH alrededor de 7, pues a partir de este valor la constante disminuye.

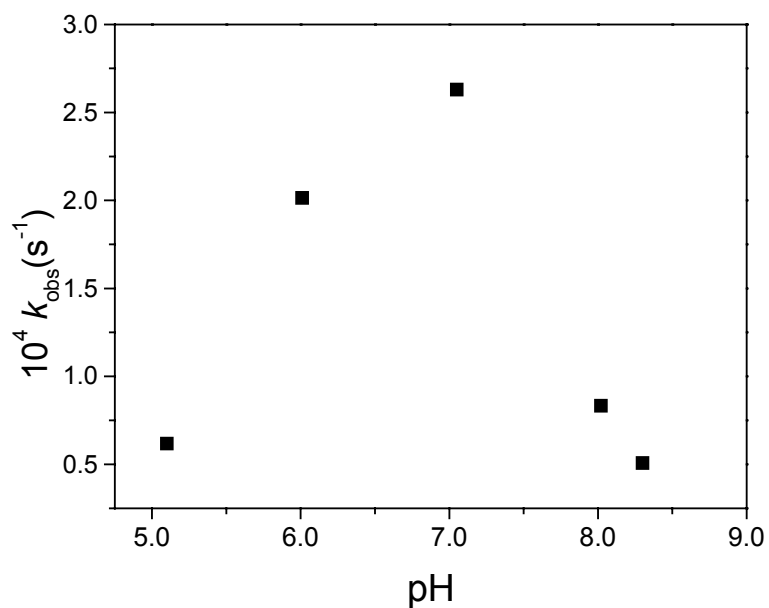


Figura 4.27. Constante de velocidad de primer orden para la hidroxilaminólisis de PyGNH₂ 0.03M como función del pH, las condiciones fueron: NH₂OH 1M, Cu(II) 0.03 M y temperatura de 50°C.

Debe mencionarse que en las disoluciones con Cu(II) y el sustrato modificado no se logra apreciar algún precipitado y tal vez la disminución se deba al mismo factor presentado en la GNH₂ y Cu(II), es decir, la desprotonación del nitrógeno de la amida y su coordinación.

El análisis por RMN protónica resulta sencillo en las reacciones sin ion metálico, es posible asignar los desplazamientos de los productos formados. Sin embargo cuando se pone en el medio Zn(II), las bandas de los espectros se ensanchan y pierden su definición, por lo que es muy difícil seguir la cinética, véase la figura 4.28.

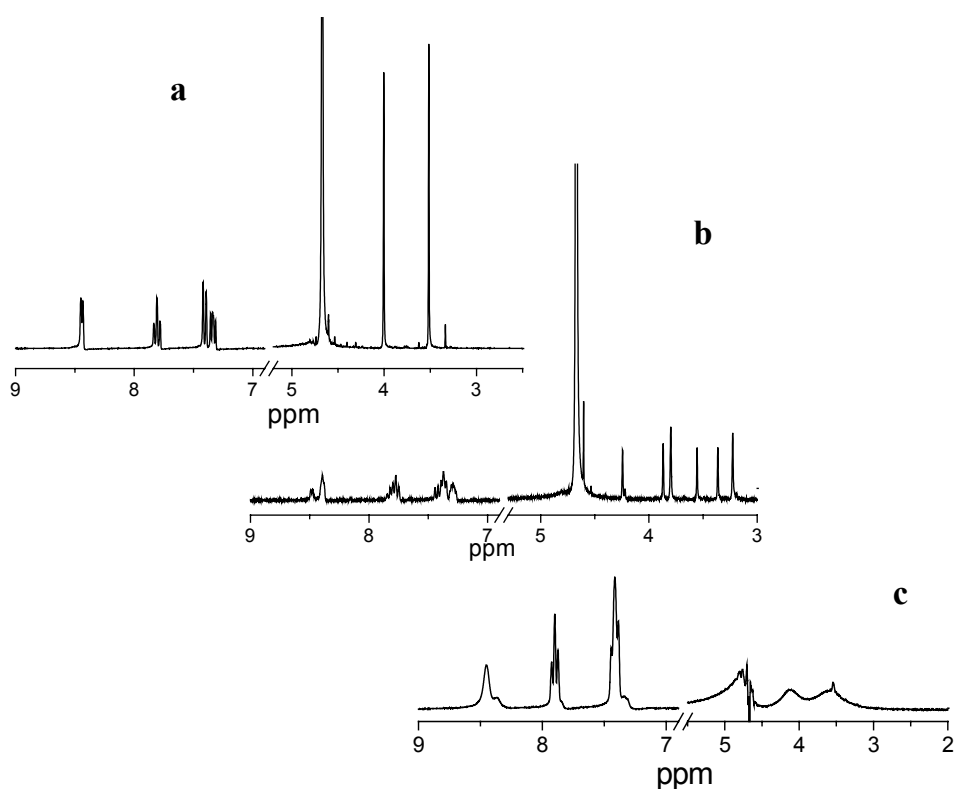


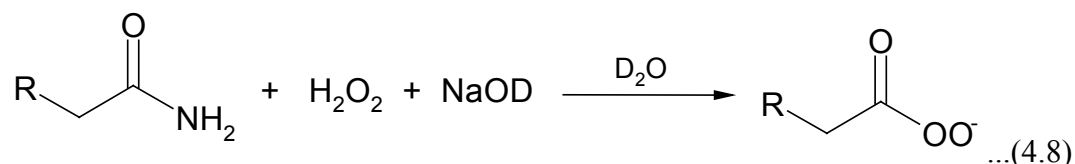
Figura 4.28. Espectros de RMN protónica de PyGNH₂ 0.04M y NH₂OH 1M, a T = 65°C y pH = 7. a) mezcla inicial, b) después de 7 h de reacción y c) en la presencia de Zn(II) 0.035M después de 1h de iniciada la reacción

En la figura 4.28 c) la señal del agua se ha saturado magnéticamente con el propósito de definir mejor las señales de nuestro reactivo y productos, sin embargo como se puede ver no se logró. La idea de contaminación con alguna sustancia paramagnética fue desechada por medición de la susceptibilidad magnética de la sal de Zn(II) con la que trabajamos.

El ensanchamiento de las señales del espectro puede deberse a procesos de intercambio lento en el tiempo de RMN.

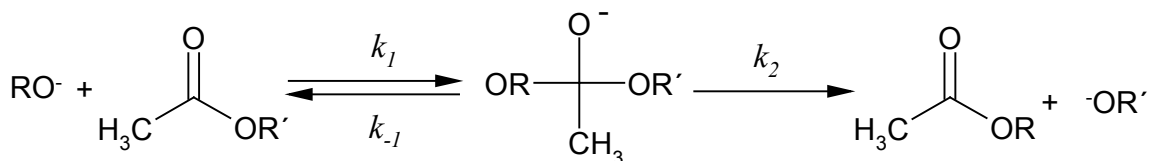
Peroxidólisis de amidas

Al igual que la hidroxilamina, el peróxido de hidrógeno es una molécula que tiene un átomo con pares de electrones libres y que se encuentra adyacente al átomo donador, en otras palabras, el H_2O_2 puede presentar efecto alfa en las reacciones de sustitución nucleofílica de las amidas.



En la bibliografía encontramos algunos trabajos en los que se usa el anión del H_2O_2 con sustratos tales como: ésteres arílicos,^[125] fosfonatos,^[126] y fosfatos.^[127]

Tomando como punto de referencia las reacciones de oxígeno-aniones con ésteres*, se puede suponer que el proceso sucede a través de la existencia de un intermediario tetraédrico,^[125] como se muestra en el esquema 8.



Esquema 8

Dependiendo de la capacidad electro-atrayente de los sustituyentes, R y R', se presentaran tres situaciones en la reacción. Cuando R y R' son idénticos el intermediario

* Los ésteres al igual que las amidas (y que los acil-haluros y los anhídridos carboxílicos) son considerados derivados de los ácidos carboxílicos, con una estructura similar y el mismo centro electrofílico.

se romperá a iguales velocidades tanto hacia materiales de partida como a productos. Si $R'O^-$ tiene el sustituyente más electro-atrayente entonces será menos básico y por lo tanto un buen grupo saliente; en este caso $k_{-1} < k_2$ y cada molécula de intermediario formado irá hacia productos mejor que a materiales de partida, y el primer paso k_1 será la etapa determinante de la reacción. Si por el contrario RO^- es mejor grupo saliente $k_{-1} > k_2$, el intermediario regresará hacia reactivos en lugar de ir a productos, así el primer paso será un rápido preequilibrio y la segunda etapa la que determine la velocidad.

Para los ésteres arílicos arriba mencionados y HO_2^- como nucleófilo, la reacción va hacia la formación del peroxiácido, y está favorecida puesto que el grupo saliente se encuentra altamente activado por el grupo fenilo. Sin embargo, cuando se cambia a ésteres etílicos ya no hay reacción con el HO_2^- ,^[128] el anión del peróxido de hidrógeno no es lo suficientemente básico ($pK_a = 11.7$)^[129] para desplazar al grupo etóxido ($pK_a = 15.8$)^[130] en el intermediario tetraédrico.

Aparentemente para péptidos y amidas cuyo grupo saliente (NHR) es mucho más básico que el etóxido, la situación debería ser aun peor, sin embargo en esta sección se presentan los resultados para amidas y péptidos no activados donde se observó efecto α teniendo HO_2^- como nucleófilo.

Los sustratos usados en esta parte del trabajo son una vez más derivados de la glicina, p. Ej., glicinamida, glicilglicina, N-acetilglicina y otros más, y la acetamida.

Inicialmente las reacciones se realizaron a la temperatura de $50^\circ C$, sin embargo no es posible conseguir resultados confiables y reproducibles, pues aparentemente tenemos una descomposición sustancial del peróxido de hidrógeno. A $37^\circ C$ esa descomposición se controla suficientemente y permite obtener datos aceptables.

La figura 4.29 es un ejemplo representativo de las cinéticas seguidas por RMN protónica para las amidas estudiadas aquí.

En los espectros de RMN de GG se han asignado las señales que corresponden a las especies que aparecen en la reacción de peroxidólisis, y corresponden al propio material de partida y a la glicina como producto (G , $\delta = 3.0$ ppm), nuevamente la presencia de G es comprobada por adición de más producto adquirido comercialmente.

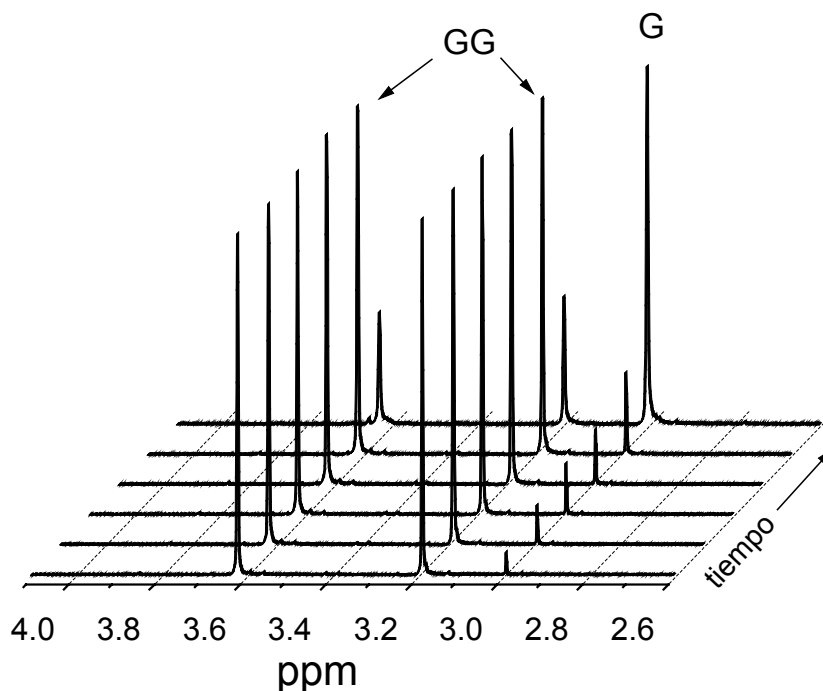


Figura 4.29. Espectros de RMN ^1H de GG 0.04M en agua deuterada, en la presencia de 0.5 M de NaOD y 0.1M de H_2O_2 a la $T = 37^\circ\text{C}$. Los intervalos de tiempo fueron 13, 26, 38, 50 y 60 minutos, y 10 horas después de iniciada la reacción.

El resultado muestra al producto de la hidrólisis y no la formación del peroxiácido correspondiente, de ser así, tendríamos la transformación de la amida hasta la formación del ácido carboxílico pasando por el peroxiácido como intermediario, lo que significaría que este último compuesto es inestable en nuestras condiciones de reacción. Ambos tipos de ácidos pueden diferenciarse por RMN, por ejemplo, en protónica la señal del metilo del acético aparece a 2.16 ppm, en tanto que la de peracético se observa a 2.22ppm.^[136] En RMN de ^{13}C la señal del carbono de carbonilo se encuentra a 178-180 ppm para el acético, y la señal de peracético se encuentra en 172-174 ppm. Además hay que mencionar que éste último ácido es inestable ante la luz y que en nuestros ensayos no hubo control con los iones metálicos que pudieran estar como impurezas los cuales catalizan la descomposición de los perácidos.^[137]

Las reacciones de ruptura fueron seguidas hasta el 10-20% de la conversión del sustrato, y las velocidades iniciales fueron calculadas del gráfico de la concentración del

producto obtenida de la integración de las señales contra el tiempo de reacción, véase la figura 4.30.

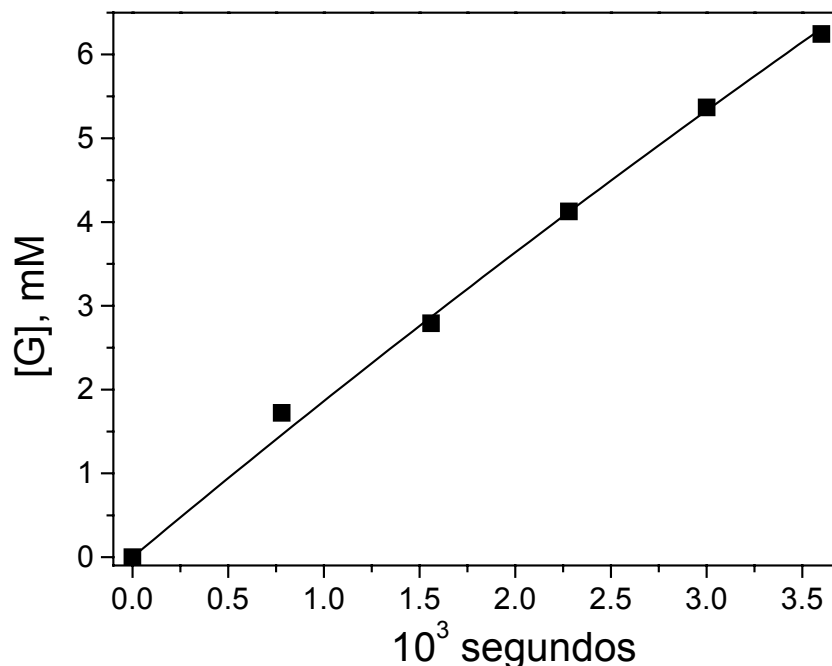


Figura 4.30. Peroxidólisis para GG 0.04M en la presencia de 0.54M de NaOD y 0.1M de H_2O_2 a la temperatura de 37°C. La constante de velocidad observada de primer orden es de $4.77 \times 10^{-5} \pm 7 \times 10^{-7} s^{-1}$. $\chi^2 = 1.6 \times 10^{-8}$.

Para determinar cuál es la participación de cada uno de los nucleófilos (OH^- , H_2O_2 y/o HO_2^-) en las reacciones de ruptura de las amidas estudiadas aquí, se realizó un grupo de ensayos variando la concentración de NaOD a concentración fija de H_2O_2 , y otro grupo donde $[NaOD]$ permanece constante y $[H_2O_2]$ es variable. Los resultados para acetamida ($AcNH_2$) como sustrato se muestran en la figura 4.31.

El mezclado de H_2O_2 con NaOD permite la desprotonación casi completa del H_2O_2 (el 85% para una relación 1:1), de ahí que un aumento de k_{obs} con la adición de H_2O_2 significa que HO_2^- es un nucleófilo más fuerte que OH^- . La adición de mayores concentraciones de H_2O_2 cuando éste ya se encuentra en exceso sobre NaOD, no produce más HO_2^- , sin embargo la velocidad sigue aumentando, en consecuencia, se puede decir que la reacción con HO_2^- es catalizada por H_2O_2 neutro.

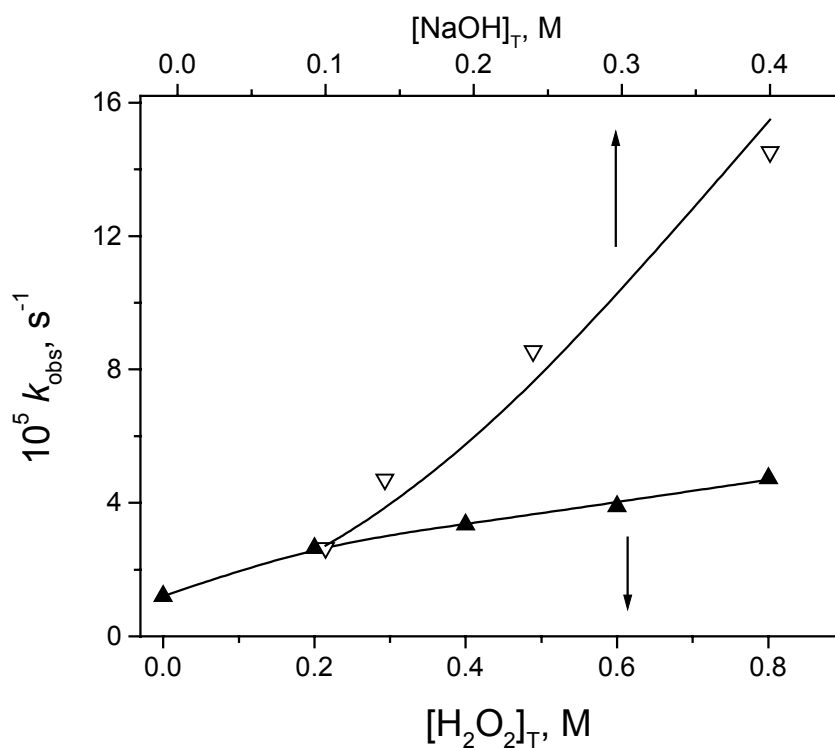
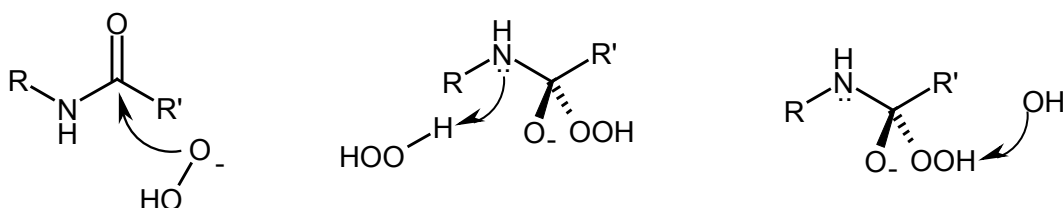


Figura 4.31. Constante observada de primer orden para la ruptura de AcNH_2 0.04M en función de la concentración total de H_2O_2 en la presencia de 0.1M de NaOD (eje inferior) y contra la concentración total de NaOD en la presencia de H_2O_2 0.2M (eje superior a la temperatura de 37°C). Las líneas que unen los puntos son los perfiles teóricos calculados de acuerdo con la ecuación 4.10. $\chi^2_{\text{H}_2\text{O}_2} = 8.60 \times 10^{-11}$, $\chi^2_{\text{NaOH}} = 7.8 \times 10^{-9}$

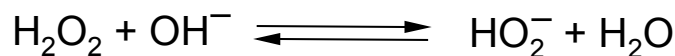
En el otro grupo de resultados donde la $[\text{NaOD}]$ crece y llega a un exceso sobre la concentración fija de H_2O_2 , también permite una aceleración significativa indicando que la reacción con HO_2^- es catalizada además por OH^- . Véase el esquema 9.



Esquema 9

Para el análisis cuantitativo de los resultados, se determinó la constante de equilibrio de la ecuación 4.9 a 37°C , el método de titulación espectrofotométrica y usado para este propósito

es descrito en la sección de métodos de este trabajo y corresponde al usado por *Yatsimirsky* y *Mejía-Radillo*.^[127]



(4.9)

El valor de la constante es de $276 \pm 2 \text{ M}^{-1}$ en D_2O el cual concuerda bien con aquellos reportados en la literatura para disoluciones acuosas,^{[127], [112]} e indica un efecto isotópico positivo de aproximadamente 1.5.

El valor de la constante de equilibrio permite calcular las concentraciones de OH^- , HO_2^- y H_2O_2 libres a cada mezcla dada de $[\text{NaOH}]$ y $[\text{H}_2\text{O}_2]$ totales.

Conforme a lo anterior, la ecuación de velocidad propuesta para el análisis de los resultados con acetamida, debe incluir por lo menos la concentración de las especies OH^- , HO_2^- y H_2O_2 ; en la práctica observamos que además hay que incluir otro término que describa la influencia de la catálisis básica general, como resultado se tiene la ecuación número 4.10.

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] + k_{\text{HO}_2}[\text{HO}_2^-] + k_{\text{GA}}[\text{HO}_2^-][\text{H}_2\text{O}_2] + k_{\text{GB}}^{\text{OH}}[\text{HO}_2^-][\text{OH}^-]$$

(4.10)

en donde k_{OH} y k_{HO_2} son las constantes de velocidad de segundo orden para la ruptura del sustrato por OH^- y HO_2^- respectivamente, k_{GA} y $k_{\text{GB}}^{\text{OH}}$ son las constantes de tercer orden para la ruptura por HO_2^- asistida por mecanismos ácido-general y base-general, respectivamente.

La constante de velocidad para la hidrólisis alcalina, k_{obs} en la ausencia de H_2O_2 , fue medida para la acetamida teniendo un valor de $1.19 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, muy cercano al reportado en la literatura.^[131]

Si la k_{obs} es corregida para la contribución de hidrólisis alcalina, entonces la ecuación 4.10 una vez reacomodados los términos, queda en la forma de la ecuación 4.11.

$$(k_{\text{obs}} - k_{\text{OH}}[\text{OH}^-]) / [\text{HO}_2^-] = k_{2\text{obs}} = k_{\text{HO}_2} + k_{\text{GA}}[\text{H}_2\text{O}_2] + k_{\text{GB}}^{\text{OH}}[\text{OH}^-] \quad (4.11)$$

Cada uno de los parámetros de la ecuación 4.11 fue calculado por regresión múltiple de $k_{2\text{obs}}$ como una función lineal de dos variables independientes, $[\text{OH}^-]$ y $[\text{H}_2\text{O}_2]$, en la tabla 4.8 se encuentran los valores para las constante de velocidad resultantes.

Tabla 4.8. Constantes de velocidad para las diferentes trayectorias de la ruptura de amidas por peróxido de hidrógeno en medio alcalino.

Sustrato	$k_{\text{OH}} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{HO}_2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{GA}} \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{GB}}^{\text{OH}} \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1\text{c}}$	$k_{\text{GB}}^{\text{HO}_2} \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$
AcNH ₂	1.2×10^{-4}	2.4×10^{-4}	3.4×10^{-4}	2.1×10^{-3}	
GG	3.8×10^{-5}	6.8×10^{-5}	3.9×10^{-4}	4.8×10^{-4}	1.9×10^{-4}

La ruptura de uno de los péptidos más simples GG fue estudiada con más detalle, la figura 4.32 muestra los resultados obtenidos por variación de la concentración total de peróxido de hidrógeno en la presencia de tres concentraciones totales y fijas de hidróxido de sodio.

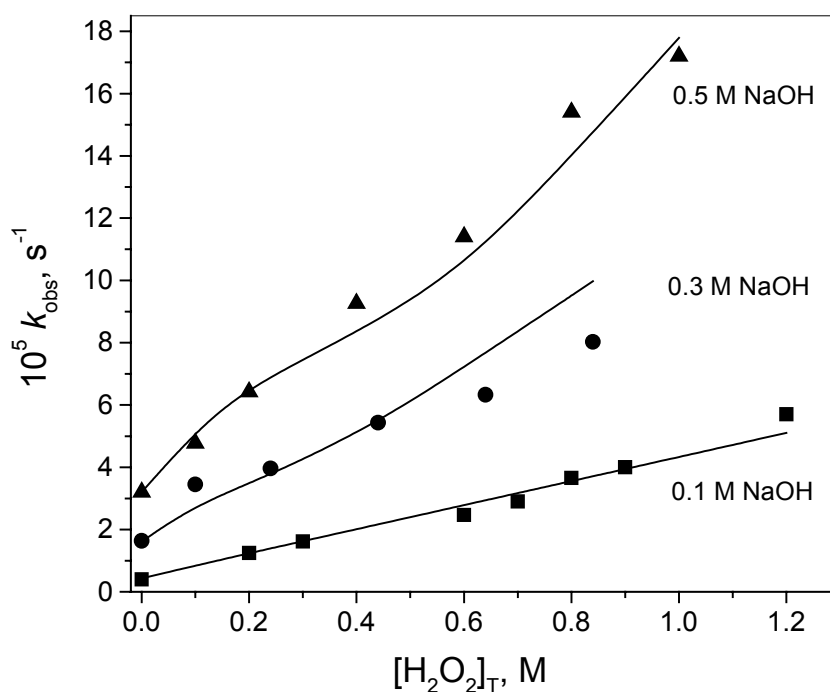


Figura 4.32. Constante observada de velocidad de primer orden para la ruptura de GG 0.04M en función de la concentración total de H₂O₂, en la presencia de 0.1, 0.3 y 0.5 M de NaOH a la T = 37°C. Las líneas que unen los puntos son los perfiles teóricos de acuerdo con las ecuaciones 4.12 y 4.13.

Las tendencias generales son similares a aquéllas presentadas por la acetamida, sin embargo las cinéticas de reacción son más complicadas en este caso. Bajo las condiciones

usadas GG es un monoanión y es aproximadamente un orden de magnitud menos reactivo que la acetamida.

La velocidad de la hidrólisis alcalina de GG no fue función lineal de $[\text{OD}^-]$ como puede verse en la figura 4.33: La constante de velocidad de segundo orden se incrementó con el incremento de $[\text{OD}^-]$ en concordancia con la ecuación empírica 4.12.

$$k_{\text{OH}} = k_{\text{OH}}^1 + k_{\text{OH}}^2[\text{OD}^-] \quad (4.12)$$

en donde $k_{\text{OH}}^1 = 3.8 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_{\text{OH}}^2 = 5.1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Esto puede ser parcialmente debido a un efecto salino positivo producido por concentraciones crecientes de NaOD sobre la reacción de dos aniones, pero muy probablemente refleja la catálisis básica-general por el segundo anión hidróxido reportado anteriormente para la hidrólisis de anilida. ^{[132], [36]}

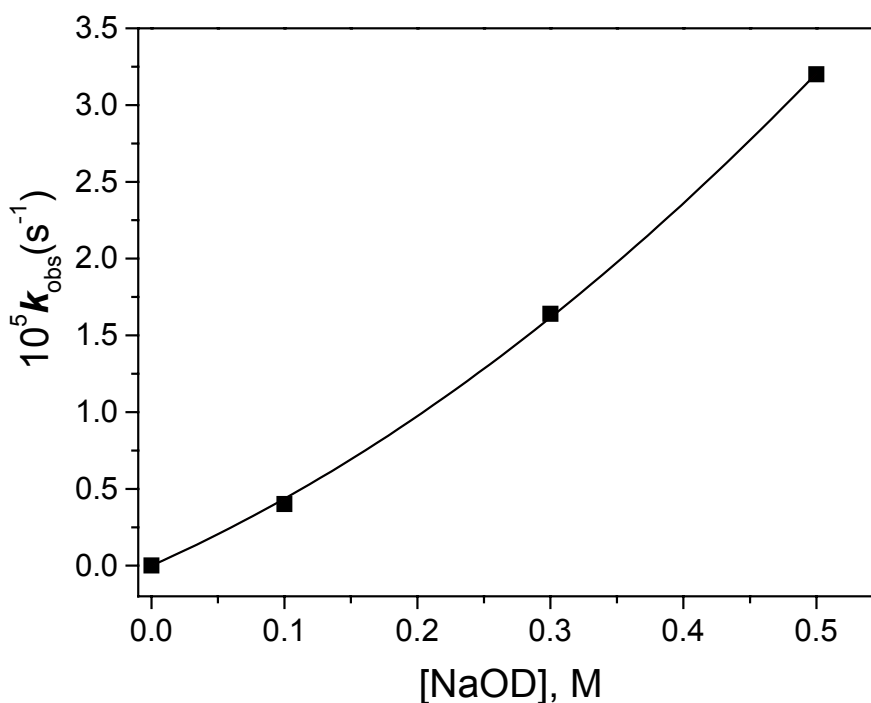


Figura 4.33. Constante observada de velocidad de primer orden para la hidrólisis alcalina de GG como función de $[\text{NaOD}]$, a la temperatura de 37°C . $\chi^2 = 9.60 \times 10^{-14}$.

El análisis de los resultados en términos de la ecuación 4.11 requirió un término adicional proporcional a la concentración de HO_2^- libre, por lo que los resultados fueron ajustados a la ecuación 4.13.

$$k_{2\text{obs}} = k_{\text{HO}_2} + k_{\text{GA}}[\text{H}_2\text{O}_2] + k_{\text{GB}}^{\text{OH}}[\text{OH}^-] + k_{\text{GB}}^{\text{HO}_2}[\text{HO}_2^-] \quad (4.13)$$

Los valores numéricos de todas las constantes de velocidad para la ruptura de GG están dadas en la tabla 4.8. Al comparar los resultados con aquéllos para la ruptura de acetamida se tienen valores más bajos, lo cual puede ser atribuido a los efectos estéricos y a la carga negativa del péptido. Lo último explica la relativamente decrecida contribución de la trayectoria catalizada por base-general, que involucra una especie aniónica adicional en comparación con la trayectoria ácido-general involucrando peróxido de hidrógeno.

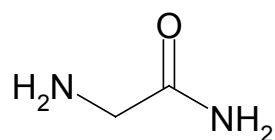
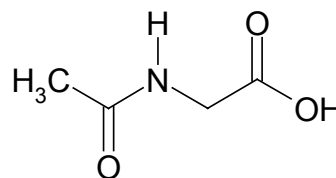
Con propósitos comparativos, varios derivados más de glicina fueron estudiados como sustratos bajo condiciones similares de reacción. Los resultados se resumen en la tabla 4.9.

Tabla 4.9. Constantes de velocidad de primer orden para la ruptura con peróxido de hidrógeno en medio alcalino y 37°C de temperatura de la acetamida y varios péptidos.

Sustrato	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	$[\text{NaOD}]_{\text{T}}, \text{M}$	$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{T}}, \text{M}$
AcNH ₂	3.9×10^{-5}	0.1	0.6
GNH ₂	2.5×10^{-4}	0.1	0.6
N-AcG	1.9×10^{-5}	0.3	0.8
N-AcGNH ₂ ^a	4.4×10^{-4}	0.3	0.6
GG	8.0×10^{-5}	0.3	0.8
GGGG ^b	6.3×10^{-5}	0.3	0.7
GGAla ^c	4.7×10^{-5}	0.3	0.6

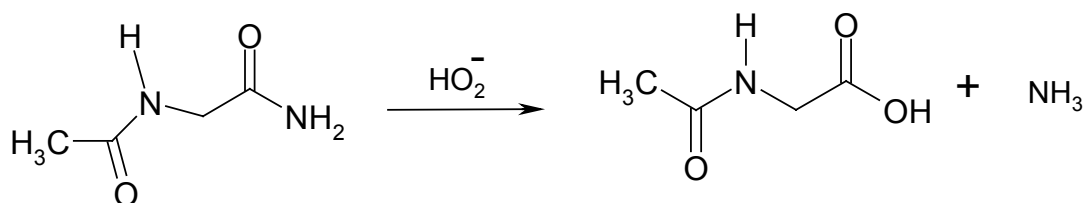
^a ruptura a N-AcG y NH₃, ^b ruptura a glicina y GGG, ^c ruptura a G y G-Ala.

Como se esperaba, la glicinamida y la N-acetilglicina son más y menos reactivas que la acetamida, respectivamente, debido al efecto inductivo positivo del grupo α -amino para el primero y la carga negativa para el último.

glicinamida, GNH₂

N-acetilglicina, NacG

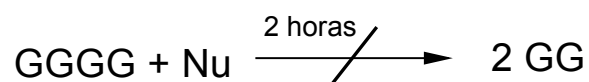
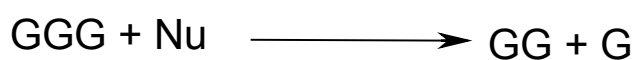
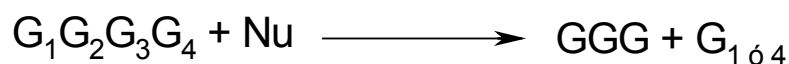
En concordancia con esto, la hidrólisis de N-acetilglicinamida procede con la formación de N-acetilglicina y NH₃. La ruptura de GG es más rápida que aquella de N-acetilglicina.



N-acetilglicinamida

N-acetilglicina

Para observar la selectividad exo/endo de la ruptura de péptidos, se usaron los sustratos tri y tetraglicina, para este último durante las 2 primeras horas sólo se observa la formación de glicina y triglicina con una constante de velocidad similar a la de GG, y sólo después de la aparición del 25% de GGG fue detectable la presencia de GG, figura 4.34 y esquema 10. Estos resultados sugieren que la ruptura del tetrapéptido se efectúa por uno de los extremos y no en la parte central.



Esquema 10

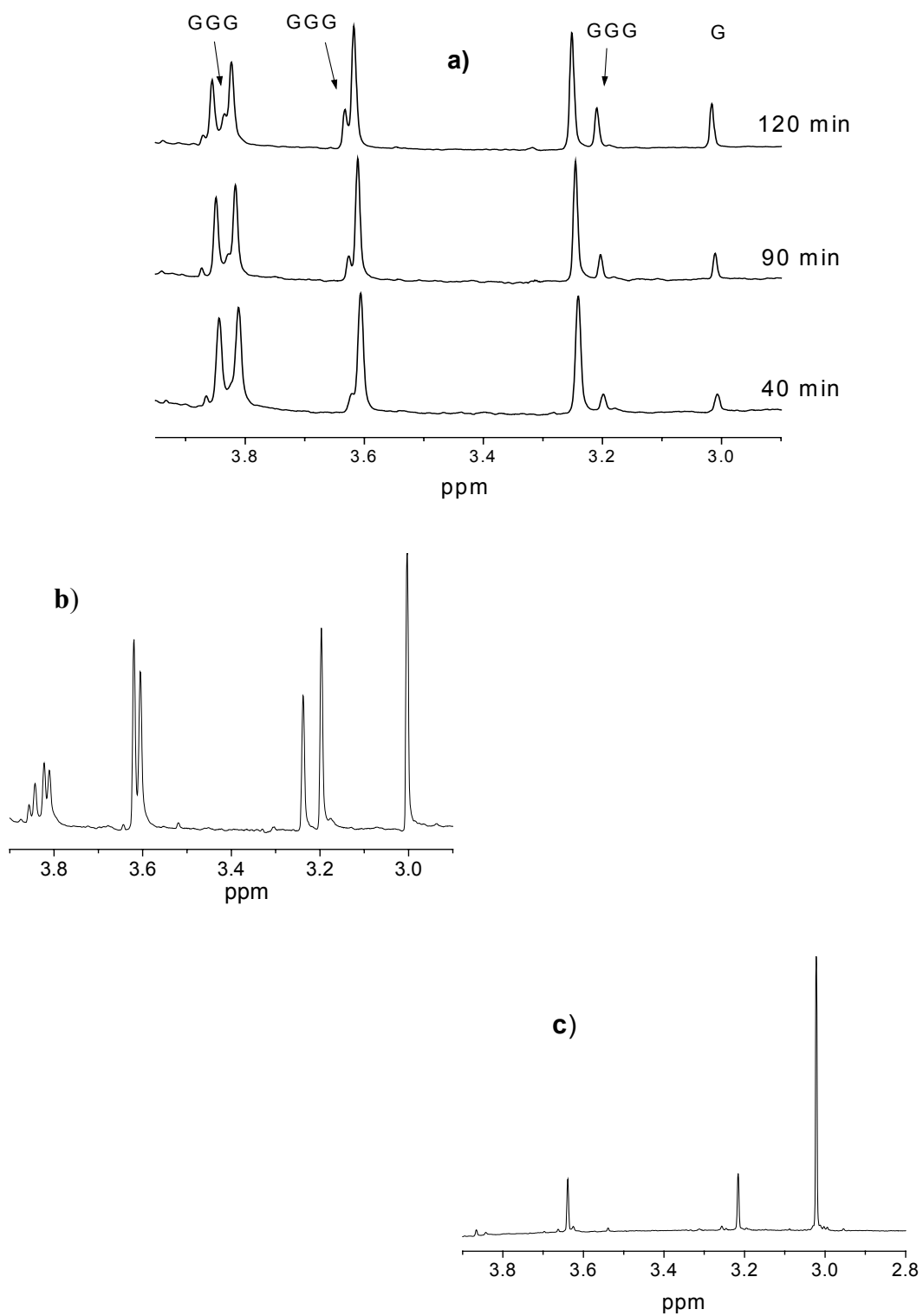


Figura 4.34. Espectros de RMN protónica para la ruptura de GGGG 0.04M y 0.3 M de H₂O₂ en la presencia de NaOD 0.34 M, a la T = 37°C. a) Durante las 2 primeras horas de reacción, b) a las 24 h y c) después de 3 días.

Probablemente, la razón por la cual el tetrapéptido sólo permita su ruptura en los extremos, pueda deberse simplemente a efectos estéricos. No obstante Martín R.B. ^[133] ofrece una explicación a partir de las energías libres de hidrólisis y formación del enlace peptídico. La hidrólisis de los péptidos está constituida por dos procesos, uno que es propiamente la hidrólisis con la formación de un ácido y una amina neutros, y el otro que es la ionización de esos dos productos.

$$\Delta G = \Delta G_m - \Delta G_i \quad (4.14)$$

en donde ΔG es la energía libre del proceso total, ΔG_m es la de hidrólisis y ΔG_i la que corresponde a la ionización de los productos.

Para la mayoría de las amidas, la energía libre de su hidrólisis es positiva, de ahí que la reacción inversa, es decir su formación, está favorecida. La energía libre de ionización, puede ser estimada a partir de los valores de las constantes de acidez conocidas de los productos de la hidrólisis, es decir, $\Delta G_i = 2.3RT(pK_a - pK_b) = 1.36 \cdot (pK_a - pK_b)$ kcal/mol a $T = 25^\circ\text{C}$. Para el caso del ácido carboxílico, se usa el pK_a y para la amina el pK_b , estas constantes tienen en general valores de $pK_a < 4$ y $pK_b > 8$, y puesto que $pK_a < pK_b$, entonces ΔG_i siempre será negativa. Al sumar ambas energías, ΔG_m y ΔG_i , se tiene como resultado un proceso total de hidrólisis favorecido.

Para tri y péptidos mayores la diferencia de pK puede ser alterada según la trayectoria que tome la hidrólisis. En la tabla 4.10, se muestran los valores de ΔG calculados con la ecuación (4.14), para las 3 trayectorias de hidrólisis de la GGGG.

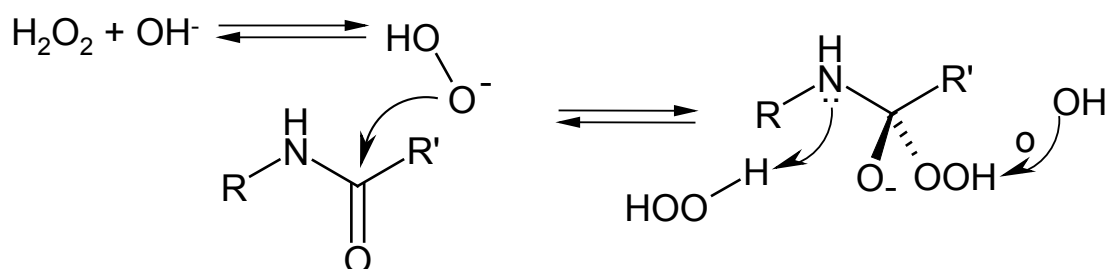
Tabla 4.10. Parámetros para la hidrólisis del enlace peptídico de GGGG en sus 3 posibles trayectorias. ^[133]

No.	Reacción	$pK_b - pK_a$	$-\Delta G_i$	ΔG_m	$-\Delta G$
1	$\text{GGGG} \rightarrow \text{G} + \text{GGG}$	5.6	7.6	5.3	2.35
2	$\text{GGGG} \rightarrow \text{GG} + \text{GG}$	4.9	6.7	5.3	1.4
3	$\text{GGGG} \rightarrow \text{GGG} + \text{G}$	6.4	8.7	6.3	2.4

Estos resultados indican que las trayectorias de hidrólisis más favorecidas son la ruptura del enlace peptídico de los extremos, con una ligera preferencia por la terminación C, ecuación No. 3 de la tabla 4.10.

Para distinguir entre una ruptura de enlace N o C-terminal, en nuestros sistemas con peróxido de hidrógeno en medio alcalino, se usó GGAla que es un tripéptido con diferente aminoácido terminal, solo se observó la ruptura del enlace G-G. Así que la ruta de reacción preferida es la ruptura del enlace peptídico N-terminal, similar a la ecuación No. 1 de la tabla 4.10.

Con base en los resultados obtenidos de este estudio, podemos proponer un mecanismo que explique la ruptura de amidas y péptidos por el nucleófilo HO_2^- , y que involucre las rutas adicionales de catálisis ácido-general asistida por H_2O_2 y base-general asistida por OH^- y HO_2^- , el esquema correspondiente es el número 11.



Esquema 11

Existe una cierta similitud en la cinética de ruptura de los péptidos realizado por HO_2^- y por NH_2OH . En los estudios de la hidroxilaminólisis de sustratos similares se observó la misma trayectoria de reacción como la indicada en la ecuación 4.13, con la diferencia de que para la hidroxilamina la trayectoria ácido-general predomina sobre las otras trayectorias de reacción.

Esto es explicable por la mucho mayor acidez de NH_3OH^+ ($\text{pK}_a = 6.0$) comparada con H_2O_2 ($\text{pK}_a = 11.5$), lo cual hace al primero un catalizador más fuerte.

Por otro lado, la reactividad absoluta de HO_2^- asistida por H_2O_2 es sustancialmente mayor que aquélla de NH_2OH asistida por NH_3OH^+ ; la constante de velocidad de tercer orden de este segundo nucleófilo con el anion de GG como sustrato es de $2.9 \times 10^{-4} \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a 60°C , mientras que para el primero $k_{\text{GA}} = 3.9 \times 10^{-4} \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a 37°C , tabla 4.8.

En el trabajo de Rana T.M. y Meares C.F. ^[134] descrito brevemente en los antecedentes, pág. 32, cuyo sistema es Albúmina de Suero Bovino (ASB) modificada con 1-(*p*-bromobencil)-EDTA y Fe(II) y H_2O_2 como nucleófilo, no se informa la constante de velocidad, pero puesto que la reacción prácticamente está completa en 10 s se puede esperar que la k_{obs} sea de aproximadamente 1 s^{-1} . ^[134]

De acuerdo con el mecanismo propuesto esta constante se refiere al ataque intramolecular (k_{intra}) del péptido enlazado a un grupo MHO_2^- , así que se puede estimar la *molaridad efectiva* (EM)^[135] para GG usando para ello su valor de k_{OH_2} como la constante de velocidad para la reacción intermolecular (k_{inter}):

$$\text{EM} = k_{\text{intra}}/k_{\text{inter}} = 1/(6.8 \times 10^{-5}) = 1.4 \times 10^4 \text{ M}$$

Valor que caé en el intervalo de reacciones de sustitución nucleofílica típica.

5 Conclusiones

■ La cinética y el mecanismo de hidroxilaminólisis no catalizada de acetamida y de los derivados de glicina (glicinamida, di- y triglicina), en términos generales, concuerdan con lo establecido en la literatura para formamida, el cual es un sustrato más activado. Para derivados de glicina existen rutas de reacción adicionales que involucran formas protonadas de los sustratos. Ha sido establecido un mecanismo general para la hidroxilaminólisis de amidas no activadas y han sido determinadas las constantes de velocidad de las etapas elementales, siendo las rutas predominantes, las catálisis ácido específica, ácido-general y la básica general.

■ Entre los metales de transición divalentes la mayor actividad catalítica en procesos de hidroxilaminólisis de amidas y péptidos lo presenta Zn(II). Se observa una cinética de reacción catalítica del tipo Michaelis-Menten con parámetros k_{cat} y K_M dependientes del pH en acuerdo con un mecanismo que incluye pre-asociación del ion metálico con el grupo amino libre del sustrato y el ataque nucleofílico del sustrato coordinado por parte de hidroxilamina asistido por un hidroxilo anión coordinado. Como consecuencia de este mecanismo nuestro sistema presenta las mayores constantes de velocidad en péptidos y amidas con amina terminal que aquellos con terminación en ácido, lo que representa un tipo de selectividad.

■ El análisis de los productos de la reacción catalítica indica que el Zn(II) también sirve como un catalizador de la hidrólisis del ácido hidroxámico, producto primario de la reacción de hidroxilamina con sustratos. Así el proceso catalítico total es la hidrólisis de amidas y péptidos en presencia de hidroxilamina y Zn(II).

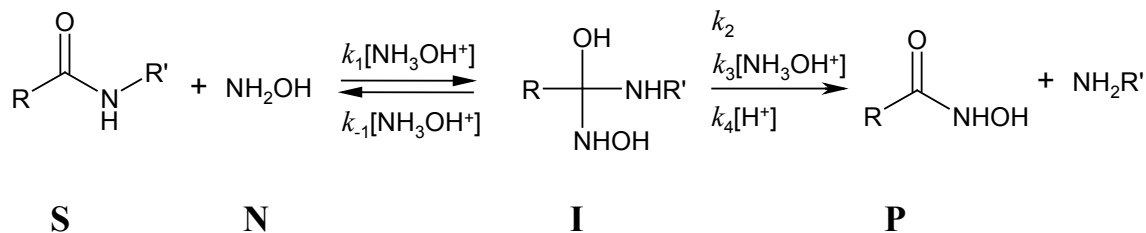
- La modificación de amidas y péptidos con grupos mejor coordinantes en presencia de hidroxilamina y Zn(II) resulta en una hidrólisis mas eficiente, por el contrario cuando se usan compuestos de coordinación de Zn(II) sobre nuestros sustratos, las constantes de velocidad son menores que en ausencia de ligantes.
- El sistema desarrollado en base a Zn(II) e hidroxilamina para la ruptura catalítica de los péptidos permite reducir el tiempo de vida de un péptido de 350 años a 22 horas y presenta la mayor eficiencia entre otros sistemas catalíticas conocidos hasta la fecha.
- El peróxido de hidrógeno en medio básico es capaz de romper enlaces peptídicos mediante la reacción en su forma desprotonada asistida por los mecanismos de catálisis ácido general (H_2O_2) y básico general (HO_2^-). Los productos observados en estas reacciones son los correspondientes a la hidrólisis, lo que sugiere que los peroxi-ácidos esperados inicialmente como productos son inestables bajo las condiciones de reacción.
- Los resultados con diferentes sustratos y peróxido de hidrógeno en medio básico muestran que la trayectoria de reacción preferida es para sustratos con N-terminal que con C-terminal.

6 Apéndices

Apéndice A

Ecuación 4.2 (pág 74) propuesta por Jenck y Guilchrist para la hidroxilaminólisis de formamida.

La ecuación se obtiene bajo la consideración de que el intermediario **I** tetraédrico se consume a la misma velocidad con la que se forma, es decir proponiendo un estado estacionario. Bajo el siguiente esquema:



$$\frac{d[\mathbf{I}]}{dt} = k_1[\text{HA}][\mathbf{S}][\mathbf{N}] - k_{-1}[\text{HA}][\mathbf{I}] - k_2[\mathbf{I}] - k_3[\text{HA}][\mathbf{I}] - k_4[\text{H}^+][\mathbf{I}]$$

en donde $[\text{HA}] = [\text{NH}_3\text{OH}^+]$

En el estado estacionario

$$\frac{d[\mathbf{I}]}{dt} = 0$$

$$0 = k_1[\text{HA}][\mathbf{S}][\mathbf{N}] - k_{-1}[\text{HA}][\mathbf{I}] - k_2[\mathbf{I}] - k_3[\text{HA}][\mathbf{I}] - k_4[\text{H}^+][\mathbf{I}]$$

$$0 = k_1[\text{HA}][\text{S}][\text{N}] - (k_{-1}[\text{HA}] + k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+])[\text{I}]$$

$$\frac{k_1[\text{HA}][\text{S}][\text{N}]}{(k_{-1}[\text{HA}] + k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+])} = [\text{I}]$$

$$\frac{d[\text{P}]}{dt} = k_2[\text{I}] + k_3[\text{HA}][\text{I}] + k_4[\text{H}^+][\text{I}]$$

$$\frac{d[\text{P}]}{dt} = (k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+])[\text{I}]$$

sustituyendo [I]

$$\frac{d[\text{P}]}{dt} = \frac{(k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+])k_1[\text{HA}][\text{S}][\text{N}]}{(k_{-1}[\text{HA}] + k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+])}$$

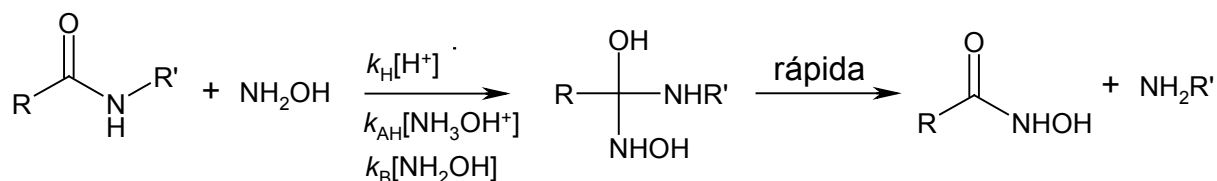
$$\frac{d[\text{P}]}{[\text{S}][\text{N}]dt} = \frac{(k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+])k_1[\text{HA}]}{(k_{-1}[\text{HA}] + k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+])}$$

Si [S] = constante.

$$\frac{k_{\text{obs}}}{[\text{NH}_2\text{OH}]} = \frac{(k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+])k_1[\text{HA}]}{(k_{-1}[\text{HA}] + k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+])} \quad \dots \text{ec. (4.2)}$$

Apéndice B

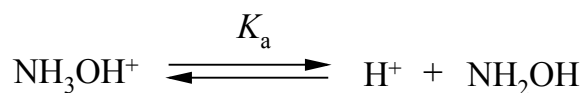
Ecuación 4.3 (pág. 76) modelo propuesto en este trabajo para la hidroxilaminólisis de derivados de la glicina.



la k_{obs} será:

$$k_{\text{obs}} = (k_{\text{H}}[\text{H}^+] + k_{\text{AH}}[\text{NH}_3\text{OH}^+] + k_{\text{B}}[\text{NH}_2\text{OH}])([\text{NH}_2\text{OH}]) \quad \dots\text{ec. (a)}$$

de donde



$$K_{\text{a}} = \frac{[\text{H}^+][\text{NH}_2\text{OH}]}{[\text{HA}]}, \dots [\text{HA}] = \frac{[\text{H}^+][\text{NH}_2\text{OH}]}{K_{\text{a}}} \quad \dots\text{ec. (b)}$$

con $\text{NH}_3\text{OH}^+ = \text{HA}$

Al mismo tiempo

$[\text{NH}_2\text{OH}]_{\text{T}} = [\text{NH}_2\text{OH}] + [\text{HA}]; \therefore$ sustituyendo con ec. (b)

$$[\text{NH}_2\text{OH}]_{\text{T}} = [\text{NH}_2\text{OH}] + \frac{[\text{H}^+][\text{NH}_2\text{OH}]}{K_{\text{a}}} \quad \dots\text{ec (c)}$$

reordenando la ec. (c);

$$[\text{NH}_2\text{OH}]_{\text{T}} = \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a}\right)[\text{NH}_2\text{OH}]; \text{ finalmente } [\text{NH}_2\text{OH}] = \frac{[\text{NH}_2\text{OH}]_{\text{T}}}{\left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a}\right)} \dots \text{ec. (d)}$$

sustituyendo la ec. (d) en la ec. (b):

$$[\text{HA}] = \frac{[\text{H}^+]}{K_a} \left(\frac{[\text{NH}_2\text{OH}]_{\text{T}}}{\left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a}\right)} \right) \dots \text{ec. (e)}$$

sustituyendo las ecuaciones (d) y (e) en la (a):

$$k_{\text{obs}} = \left(k_{\text{H}}[\text{H}^+] + k_{\text{AH}} \frac{[\text{H}^+][\text{NH}_2\text{OH}]_{\text{T}}}{K_a \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a}\right)} + k_{\text{B}} \frac{[\text{NH}_2\text{OH}]_{\text{T}}}{\left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a}\right)} \right) \left(\frac{[\text{NH}_2\text{OH}]_{\text{T}}}{\left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a}\right)} \right)$$

factorizando:

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{H}}[\text{H}^+][\text{NH}_2\text{OH}]_{\text{T}}/(1+[\text{H}^+]/K_a) + (k_{\text{AH}}[\text{H}^+]/K_a + k_{\text{B}})[\text{NH}_2\text{OH}]_{\text{T}}^2/(1+[\text{H}^+]/K_a)^2 \quad \text{(4.3)}$$

Apéndice C

Para la obtención de la ecuación de **Michaelis-Menten**, ecuación 4.4 (pág. 86) se tiene:



donde S = sustrato, K es la constante de estabilidad para el complejo metal-sustrato, k_c constante de velocidad catalizada por Zn(II), y P = producto.

$$K = \frac{[ZnS]}{[Zn(II)][S]} \quad K[S][Zn(II)] = [ZnS] \quad \text{ecuación (a)}$$

además

$$[S]_T = [S] + [ZnS]$$

$$[S]_T = [S] + [Zn(II)][S]K \quad \therefore [S] = \frac{[S]_T}{(1 + K[Zn(II)])} \quad \text{ecuación (b)}$$

la concentración del complejo, después de sustituir la ec. (b) en la ec. (a) será:

$$[ZnS] = \frac{K[Zn(II)][S]_T}{(1 + K[Zn(II)])}$$

La velocidad de formación del producto esta dado por:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_c [NH_2OH][ZnS]$$

En la constante de velocidad observada existe además contribución de la reacción no catalizada por lo tanto:

$$k = k_0[S]_T[NH_2OH] + k_c[NH_2OH][ZnS]$$

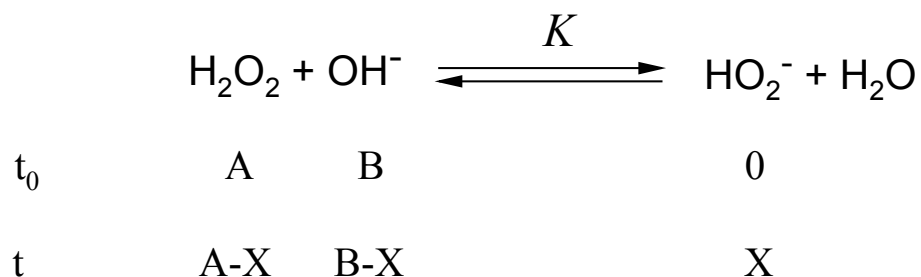
$$k = k_0[S]_T[NH_2OH] + k_c[NH_2OH] \frac{K[Zn(II)][S]_T}{(1+K[Zn(II)])}$$

$$k = \frac{(k_0+k_cK[Zn(II)])[NH_2OH][S]_T}{(1+K[Zn(II)])}$$

$$k_{obs} = \frac{(k_0+k_cK[Zn(II)])}{(1+K[Zn(II)])} \text{ ecuación 4.4}$$

Apéndice D

Ecuación 3.4 propuesta por Yatsimirsky A.K. y Mejía-Radillo Y. para la constante de desprotonación básica del peróxido de hidrógeno, conforme al siguiente esquema:



$$K = \frac{[X]}{[A-X][B-X]}$$

$$[A-X][B-X] = AB - AX - BX + X^2$$

$$\frac{[X]}{K} = AB - (A+B)X + X^2$$

Sustituyendo A y B se tiene:

$$K^{-1}X = X^2 - \{[\text{H}_2\text{O}_2] + [\text{NaOH}]\}X + [\text{H}_2\text{O}_2][\text{NaOH}]$$

$$X^2 - \{[\text{H}_2\text{O}_2] + [\text{NaOH}] + K^{-1}\}X + [\text{H}_2\text{O}_2][\text{NaOH}] = 0$$

que es una ecuación de la forma: $aX^2 + bX + c = 0$

Las soluciones para una ecuación de segundo grado con una incógnita son:

$$X = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad \text{ó} \quad X = (0.5a) \left\{ -b \pm (b^2 - 4ac)^{0.5} \right\}$$

para nuestro caso:

$$a = 1; -b = [\text{H}_2\text{O}_2] + [\text{NaOH}] + K^{-1}; c = [\text{H}_2\text{O}_2][\text{NaOH}] \quad \text{y} \quad X = [\text{HO}_2^-]$$

por lo tanto:

$$[\text{HO}_2^-] = (0.5) \left\{ ([\text{H}_2\text{O}_2] + [\text{NaOH}] + K^{-1}) - \left(([\text{H}_2\text{O}_2] + [\text{NaOH}] + K^{-1})^2 - 4[\text{H}_2\text{O}_2][\text{NaOH}] \right)^{0.5} \right\}$$

Siendo el método espectrofotométrico

$$A = A_0 + l\Delta\varepsilon [\text{HO}_2^-]; \text{ donde } \Delta\varepsilon \text{ es la diferencia en las absorptividades molar de } \text{HO}_2^- \text{ y } \text{H}_2\text{O}_2,$$

ademas de $l = 1$

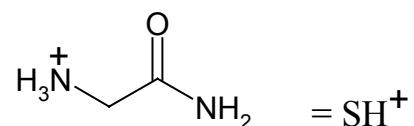
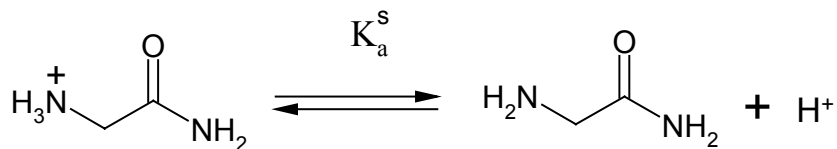
finalmente

$$A = A_0 + 0.5\Delta\varepsilon (K^{-1} + [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{T}} + [\text{NaOH}]_{\text{T}} - \left\{ (K^{-1} + [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{T}} + [\text{NaOH}]_{\text{T}})^2 - 4[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{T}}[\text{NaOH}]_{\text{T}} \right\}^{0.5})$$

....ecuación (3.4)

Apéndice E

Ecuación modificada para la hidroxilaminólisis de la glicinamida en la forma ácida



$$K_a^S = \frac{[\text{S}][\text{H}^+]}{[\text{SH}^+]} \dots \text{(a)}; \quad [\text{SH}^+] = \frac{[\text{S}][\text{H}^+]}{K_a^S} \quad \text{(b)}$$

$$[\text{S}]_T = [\text{S}] + [\text{SH}^+]$$

$$[\text{S}]_T = [\text{S}] + \frac{[\text{S}][\text{H}^+]}{K_a^S}$$

$$[\text{S}]_T = [\text{S}] \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a^S} \right)$$

$$[\text{S}] = \frac{[\text{S}]_T}{\left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a^S} \right)}; \text{ sustituyendo } [\text{S}] \text{ en (b) se tiene:}$$

$$[\text{SH}^+] = \frac{[\text{S}]_T[\text{H}^+]}{\left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a^S} \right) K_a^S} = \frac{[\text{S}]_T[\text{H}^+]}{(K_a^S + [\text{H}^+])}$$

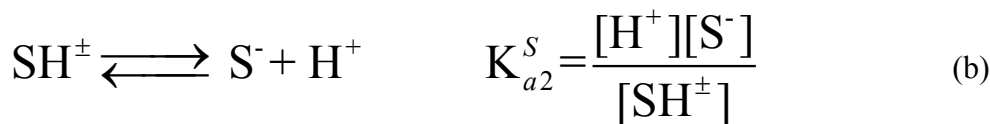
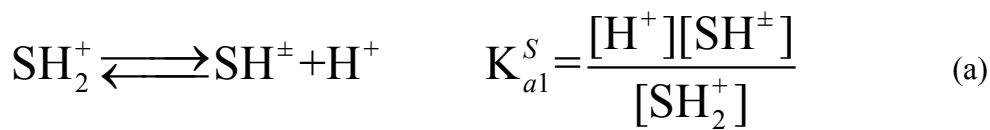
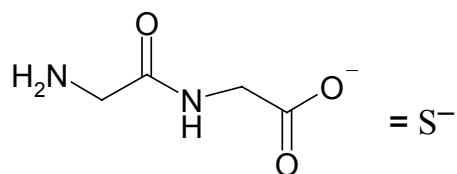
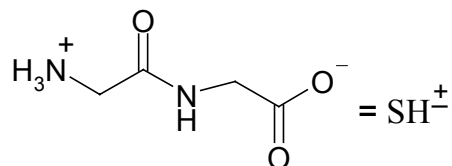
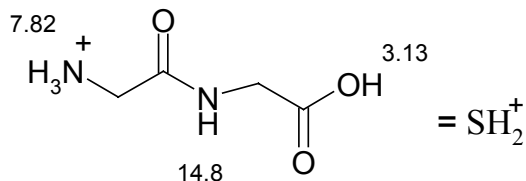
Conforme al esquema 2 (pág. 78) y del apéndice B se tiene:

$$\frac{dP}{dt} = \left(k_H [H^+] + k_{AH} [NH_3OH^+] + k_B [NH_2OH] \right) ([NH_2OH]) ([SH^+])$$

$$k_{\text{obs}} = \left\{ k_H [H^+] \frac{[NH_2OH]_T}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_a}\right)} + \left(k_{AH} \frac{[H^+]}{K_a} + k_B \right) \left(\frac{[NH_2OH]_T^2}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_a}\right)^2} \right) \right\} \left\{ \frac{[H^+]}{(K_a^S + [H^+])} \right\}$$

Apéndice F

Ecuación modificada para la hidroxilaminólisis de las formas neutras y aniónicas de los sustratos glicilglicina y triglicina



$$\text{de (b)} \quad [\text{SH}^\pm] = \frac{[\text{H}^+][\text{S}^-]}{K_{a2}^S} \quad (\text{c})$$

$$\text{y de (a)} \quad [\text{SH}_2^+] = \frac{[\text{H}^+][\text{SH}^\pm]}{K_{a1}^S} \quad (\text{d})$$

$$\text{sustituyendo } [\text{SH}^\pm] \text{ en (d)} \quad [\text{SH}_2^+] = \frac{[\text{H}^+]^2[\text{S}^-]}{K_{a1}^S K_{a2}^S} \quad (\text{e})$$

$$\text{además} \quad [\text{S}]_T = [\text{S}^-] + [\text{SH}^\pm] + [\text{SH}_2^+] \quad (\text{f})$$

sustituyendo (c) y (e) en (f)
$$[S]_T = [S^-] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}^S} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}^S K_{a2}^S} \right) \quad (g)$$

por lo tanto
$$[S^-] = \frac{[S]_T}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}^S} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}^S K_{a2}^S} \right)} \quad (h)$$

haciendo la sustitución del equivalente de $[S^-]$ en la expresión para el zwitterion, ecuación (c), se tiene:

$$[SH^\pm] = \frac{[H^+][S]_T}{K_{a2}^S \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}^S} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}^S K_{a2}^S} \right)} = \frac{[H^+][S]_T}{\left(K_{a2}^S + [H^+] + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}^S} \right)} \quad (i)$$

De manera similar al apéndice anterior y haciendo uso de la expresión (i) para la especie zwitteriónica $[SH^\pm]$, la ecuación para en nuestro esquema propuesto es:

$$k_{\text{obs}} = \left\{ k_H [H^+] \frac{[NH_2OH]_T}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_a} \right)} + \left(k_{AH} \frac{[H^+]}{K_a} + k_B \right) \frac{[NH_2OH]_T^2}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_a} \right)^2} \right\} \left\{ \frac{[H^+]}{\left(K_{a2}^S + [H^+] + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}^S} \right)} \right\}$$

Y para la especie aniónica $[S^-]$:

$$k_{\text{obs}} = \left\{ k_H [H^+] \frac{[NH_2OH]_T}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_a} \right)} + \left(k_{AH} \frac{[H^+]}{K_a} + k_B \right) \frac{[NH_2OH]_T^2}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_a} \right)^2} \right\} \left\{ \frac{1}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}^S} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}^S K_{a2}^S} \right)} \right\}$$

7 Bibliografía

- [1] **Watanabe Ken-Ichi**, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1964**, *32*, 1280.
- [2] **John M. Wood**. *Enzimes and the environment*, **1972**, Bogden & Quigley, Inc. Publishers.
- [3] **Yamana T., Mizukami Y., Tsuji A., Yasuda Y. y Masuda K.** *Chem. Pharm. Bull.*, **1972**, *20*, 881.
- [4] **Radzicka A. y Wolfenden R.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 6105.
- [5] a) **Chin J., Banaszcyk M., Jubian V.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *118*, 186; b) **Williams N.H., Chin J.**, *J. Chem. Soc. Chem. Comm*, **1996**, 131.
- [6] **Copeland R. A.** *Enzymes a Practical Introduction to Structure, Mechanism and data Analysis*, VCH Publishers, Inc., (1996) N.Y..
- [7] **Krämer R.**, *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, *182*, 243.
- [8] **Sayre L.M.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 1632.
- [9] **Bertini I., Gray H. B., Lippard S.J., Valentine J.S.**, *Bioinorganic Chemistry*, University Science Book, Mill Valley California, USA, **1994**, Cap. 2, págs.40-43.
- [10] **Bennett E.G.**, *Inorg. Chem.*, **1973**, *12*, 1200.
- [11] **Connors K.A.** *Chemical Kinetics, the study of reaction rates in solution*, VCH Pulishers Inc., **1990**, Chap. 7, pág. 355.
- [12] **Guthrie J.P. and Cullimore P.A.**, *Can J. Chem.*, **1980**, *58*, 1281.
- [13] **Baldomero Gómez-Reyes y Anatoli Yatsimirsky**, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 866-872.
- [14] **Baldomero Gómez-Reyes y Anatoli Yatsimirsky**, *Org. Lett.*, **2003**, *5(25)*, 4831-4834.
- [15] **Ehnore D.T.** *Peptides and proteines*, Cambrige University Press, Great Britain, **1968**, pág. 49
- [16] **Copeland R. A.** *Enzymes a pratical introduction to Structure, Mechanism and data Analysis*, VCH Publishers, Inc., **1996**, N.Y., pág.46.
- [17] a) **Wiberg K.B., Breneman C.M.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 831; b) **Wiberg K.B., Laiding K.E.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 5935.
- [18] **Clement O., Hay B.P., Rapko B.M.**, *Coord. Chem. Rev.*, **1998**, *170*, 203.
- [19] **Martín B.R.**, *Metal Ions in Biological Systems*, A. Siegel, H. Sigel editores, Vol. 38 Marcel Dekker, Inc. N.Y., **2001**, Cap. 1 Peptide Bond Characteristics, pág. 2.
- [20] **Sigel H. y Martín B.R.**, *Chem. Rev.*, **1982**, *82*, 385.
- [21] a) **Martín B.R.**, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1972**, 793; b) **Martín B.R., Hutton W.C.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 4752.
- [22] **Koltun W.L.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, *82*, 233.
- [23] **Nakata T., Tasumi Miyazawa.**, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1975**, *48*, 1599.
- [24] **Scheller-Krattiger V., Scheller K.H., Sinn E., Martin R.B.**, *Inorg. Chim. Acta*, **1982**, *60*, 45.
- [25] **Farkas E., Sóvágó I.**, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1983**, 1545.

- [26] Rabenstein D.L., Susan A.D., Anvarhusein A.I., Alan p.A., Mohamed M. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 6435.
- [27] Bunting J.W., Thong K.M., *Can. J. Chem.*, **1970**, *48*, 1654.
- [28] Sigel H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1968**, *7*, 137.
- [29] Martín B. R., Chamberlin M., Edsall J.T., *J. Am. Chem. Soc*, **1960**, *82*, 495.
- [30] Rabenstein D.L., Libich S., *Inorg. Chem.*, **1972**, *11*, 2960.
- [31] Espenson J.H., *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms*, 2a edic., McGraw-Hill, Inc., Singapore, **1995**.
- [32] Jencks P.W., “*Catálisis in Chemistry and Enzymology*”, Dover Publicatins Inc., New York **1987**, pág. 166.
- [33] Burgess A.E., Latham J.L., *Elementary Reaction Kinetics*, Butterworth & Co. (Publishers)Ltd., London **1977**, pág. 117.
- [34] Connors K.A., *CHEMICAL KINETICS, The Study of reation Rates in Solution*, VCH Publishers Inc., N.Y. **1990**, pág. 344.
- [35] Bender M.L. *Chem. Rev.* **1960**, *60*, 53.
- [36] Bender M.L. y Thomas R.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, *83*, 4183.
- [37] Breslow R. *OrganicReaction Mechanisms*, W.A. Benjamin, Inc., New York **1978**, Capítulo. 3, pág.174.
- [38] Biechler S.S. y Taft R.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, *79*, 4927.
- [39] Mader P.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, *87*, 3191.
- [40] Schowen R.L., Jayaraman H. y Kershner L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, *88*, 3373.
- [41] Dolman, D., Stewart R., *Can. J. Chem.*, **1967**, *45*, 911.
- [42] Jencks W.P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*, 4583
- [43] Jencks W.P. y Gilchrist M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, *86*, 5616.
- [44] a) Cordes E., Jencks W.P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, *84*, 4319; b) Jencks W.P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, *81*, 475.
- [45] Polzin G.M. y Burstyn J.N. “*Metal Ions in Biological Systems*”, Vol. 38, “*Probing of Proteins by metal Ions and their low molecular weight Complexes*”, Editado por Sigel A. y Sigel H., Marcel Dekker Inc. New York Basel **2001**, Capítulo 4, pág. 103.
- [46] Takasaki B.K., Kim J.H., Rubin E., Chin J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 1157.
- [47] Gómez-Tagle P., Yatsimirsky A.K., *Inorg. Chem.*, **2001**, *40*, 3786.
- [48] Fife T.H., Przystas T.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 4631.
- [49] Przystas T.J, Fife T.H., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.2*, **1990**, 393.
- [50] Groves J.T., Chambers Jr R.R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 630.
- [51] Fife T.H., Squillacote V.L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, *101*, 3017.
- [52] Suh J., *Acc. Chem. Res.* **1992**, *25*, 273.
- [53] Hegg E.L., Burstyn J.N., *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *173*, 133.
- [54] Meriwether L., Westheimer F.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 5119.
- [55] Grant I.J. y Hay R.W., *Aust. J. Chem.*, **1965**, *18*, 1189.

- [56] a) **Collman J.P. y Buckingham D.A.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 3039; b) **Buckingham D.A. y Collman J.P.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, 1089; c) **Sutton P.A. y Buckingham D.A.**, *Acc.Chem. Res.* **1981**, *20(10)*, 357; d) **Hay B.P.** *Lewis acid catalysis and the reactions of coordinated Ligands*, Comprehensive Coordination Chemistry. Edited by Wilkinson G. Pergamon Press, (1987) Vol. 2 Chap. 61.14; e) **Schepartz A. y Breslow R.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 1814.
- [57] a) **Angus P.M., Fairlie D.P., y Jackson W.G.**, *Inorg. Chem.*, **1993**, *32*, 450; b) **Pinnell D., Wright G.B., y Jordan R.B.**, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6104.
- [58] **Marzilli L.G. y Buckingham D.A.**, *Inorg. Chem* , **1967**, *6*, 1042.
- [59] **Kimura E., Young S., Collman J.P.**, *Inorg. Chem* , **1970**, *9*, 1183.
- [60] Con Co(III) se evita la ambigüedad debido al equilibrio de estructuras isoméricas en el curso de la reacción.
- [61] a) **Parac T.N., Kostić N.M.** *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 51; b) **Kaminskaia N.V., Kostić N.M.** *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 2368, y referencias citadas ahí.
- [62] **Zhu L., Kostić N.M.**, *Inorg. Chem.*, **1992**, *31*, 3994.
- [63] **Hegg E.L., Burstyn J.N.** *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7015.
- [64] **Takarada T., Yashiro M., Komiyama M.** *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3906.
- [65] **Ott R., Kramer R.**, *Angew. Chem Int. Ed. Engl.*, **1998**, *37*, 1957.
- [66] **Meares C.F. y Rana T.M.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 2457.
- [67] **Cotton F.A. y Wilkinson G.**, *Advanced Inorganic Chemistry*, 5a edic. **1988**, John Wiley, New York, págs. 597, 605.
- [68] **Geofrey P.**, “*Ions in solution (3): inorganic properties*”, **1973** cap. 7, Oxford University Press.
- [69] **Baes C.F.Jr y Mesmer R.E.**, *The hydrolysis of cations*, John Wiley, New York **1976**, Capítulo 13.
- [70] **Vallee B.L., Auld D.S.**, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 6493.
- [71] **Galdes A., Vallee B.**, *Metal ions in Biological Systems*, Vol. 15, *Zinc and Its Role in Biology and Nutrition*. Editado por Sigel A. y Sigel H., Marcel Dekker Inc. New York Basel, 1983, Capítulo 1.
- [72] **Vallee B.L. y Williams**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1968**, *59*, 498.
- [73] **Open A.G.**, *J. Chem. Dalton Trans.*, **S1**, **1989**.
- [74] **Martin R.B., Sigel H.**, *Chem. Soc. Rev.*, **1994**, 83.
- [75] **Lipscomb W.N. y Strater N.**, *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 2375.
- [76] a) **Basolo F. Pearson R.G.**, *Mechanims of Inorganic Reactions*, John Wiley, 2a. edición, N.Y. 1967, pág. 129; b) **Williams R.J.P.**, *Coord. Chem. Rev.*, **1990**, *100*, 573.
- [77] **Bertini I., Luchinat C.**, *Bioinorganic Chemistry* editado por, Grey H.B., Lippard S.J., *Capítulo 2*, University Science Books Mill Valley California, USA, **1994**.
- [78] **Westheimer F.H.**, *Spec.Publ.Chem.Soc.*, **1957**, *8*, 1.
- [79] **Bertini I.**, *Inorg. Chem.*, **1990**, *29*, 1460.
- [80] **Burgess J.**, “*Metal Ions in Solution*”, Hellis Horwood Limited, John Wiley & Sons N.Y. **1978**, pág. 273.
- [81] **Yamamura Y.**, *J. Inorg. Biochem.*, **1997**, *67(4)*, 225.
- [82] **Marilde T. Bordignon Luiz , Bruno Szpoganicz , Marcela Rizzoto , Manoel G. Basallote , Arthur E. Martell.**, *Inorg. Chim. Acta*, 1999, 287, 134.
- [83] La reacción es seguida por RMN, por lo que tiene lugar el intercambio entre OH⁻ y D₂O.

- [84] **Koike T. Inoue M., Kimura E. y Shiro M.** *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*,3091.
- [85] **Neverov A. A., Pedro J. Montoya-Pelaez y Brown R.S.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 210.
- [86] **Koike T. Takamura M., y Kimura E.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 8443.
- [87] **Kimura E. Shiota T., Koike T., Shiro M., y Kodama M.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 5805.
- [88] **Chin J.** *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3687.
- [89] Muchas de las cinéticas de reacción conciernen con reacciones químicas donde se liberan o consumen iones OH^- o H_3O^+ . Se debe tomar en cuenta, que la velocidad de formación depende de las condiciones de operación, en particular del pH del medio de reacción. Para realizar el estudio es importante mantener, en el medio de reacción, el pH constante (estacionario) y a esto se le conoce como pHstat. Un estudio de pHstat toma lugar conforme a los siguientes puntos:
 i) Determinación de un pH óptimo de la reacción estudiada. ii) Mantener el pH constante por adición de un reactivo para neutralizar los iones H_3O^+ . iii) Calculo de la cinética de la reacción estudiada basado en el consumo de reactivos para mantener el pH constante sobre el tiempo.
- [90] **Kluger R., Chin J.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 2891.
- [91] **Jiang Xia, Yan Xu, Shu-an Li, Wei-yin Sun, Kai-bei Yu, y Wen-xia Tang.**, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 2394.
- [92] **Koike T., Kajitani S., Nakamura I., Kimura E., y Shiro M.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 1210.
- [93] **Ruf M. y Vahrenkamp H.** *Chem. Ber.*, **1996**, *129*, 1025.
- [94] **Long A. Truscott L., Cronin M.**, *Trans Faraday Soc.*, **1971**, *67*, 1094.
- [95] **Jencks W.P.**, “*Catalysis in Chemistry and Enzymology*”, Dover Publications, N.Y. **1969**, pág. 78.
- [96] **Pimentel G.C. y McClellan**, “*The Hydrogen Bond*”, Freeman and company, San Francisco, **1960**.
- [97] **Spratley R.D. y Pimentel G.C.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, *88*, 2394.
- [98] **Klopman G., Tsuda K., Lois J.B. y Davis R.E.**, *Tetrahedron*, **1970**, *26*, 4549.
- [99] **Condon F.E.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *87*, 4481.
- [100] a) **Fountain K.R., y Patel K.D.** *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 4795; b) **Moutiers G., LeGuevel E., Villien L., y Terrier F.**, *J. Chem. Soc. Perkins Trans.2*, **1997**, 7.
- [101] **Ik-Hwan Um y Erwin Buncel**, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 577, b) **Ik-Hwan Um y Erwin Buncel**, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 11111.
- [102] Un grupo prostético es una colección de iones metálicos exógenos y/o ligandos orgánicos que son mantenidos firmemente por la proteína o por la enzima y retiene su enlace aun en los procedimientos de aislamiento y purificación.
- [103] **Baran E.J.**, *Química Bioinorgánica*, McGraw Hill/Interamericana, Madrid España, **1995**, Capítulo 2, 14.
- [104] **Hughes** *The Inorganic Chemistry of Biological processes*, **1984**, 2ª edic., John Wiley & Sons, New York, capº 4, pág. 103 .
- [105] **Parkin G.**, “*Metal Ions in Biological Systems*”, Vol. 38, “*Probing of Proteins by metal Ions and their low molecular weight Complexes*”, Editado por Sigel A. y Sigel H., Marcel Dekker Inc. New York Basel **2001**, Capítulo 14, pág. 412.
- [106] **Christianson D. W.** *Acc. Chem. Res.*, **1989**, *22*, 62-69.
- [107] a) **Zhang, K. Auld, D.S.** *Biochemistry* **1995**, *34*, 16306; b) **Kim, H. y Lipscomb, W.N.** *Biochemistry*, **1990**, *29*, 5546.
- [108] **Hay R.W.** *Lewis acid catalysis and the reactions of coordinated Ligands*, Comprehensive Coordination Chemistry. Edited by Wilkinson G. Pergamon Press, **1987** Vol. 2 Cap. 61.14.

- [109] **Cowan J.A.** *Inorganic Biochemistry An Introduction* 1993, VCH Publishers Inc. N.Y., Chap. 4, 142.
- [110] **Bergmann F.**, *Anal. Chem.* 1952, 24, 1367.
- [111] **Goldenberg V. y Spoerri P.E.**, *Anal. Chem.*, 1958, 30, 1327.
- [112] **Yamilet Mejia-Radillo, Anatoly K. Yatsimirsky, et. al.**, *J. Phys. Org. Chem.*, 2000, 13, 505.
- [113] **McIsaac J.E. Jr., Subbaraman, L.R.; Subbaraman, J.; Mulhausen, H.A.; Behrman, J.** *Org. Chem.*, 1972, 37, 1037.
- [114] El hervir y filtrar la disolución de KMnO_4 tiene el propósito de eliminar dióxido de manganeso (MnO_2) que cataliza la descomposición del H_2O_2 .
- [115] **Vogel's**, *Textbook of Quantitative Chemical Analysis*, 5a. edition, Longman Scientific & Technical, N.Y. 1989, pág. 371-373.
- [116] **Means G. E. y Feeney R.E.**, *Biochemistry* 1968, 7, 2192.
- [117] Con los parámetros de velocidad a 37°C dados arriba, la relación r_+/r_- es igual a 1.1 y 6.4 a pH 5 y 4 respectivamente, y 1.2 y 8.4 a pH 7 y 8 respectivamente. Así en el intervalo de pH entre 5 y 7 la relación r_+/r_- se encuentra entre 0.5 y 1, aunque afuera de este intervalo $r_+/r_- > 1$ en ambas disoluciones ácidas y básicas.
- [118] Puesto que los valores de pH siempre fueron medidos a temperatura ambiente el perfil de velocidad vs. pH fue analizado usando $\text{pK}_a = 6.0$ para hidroxilamonio a todas las temperaturas.
- [119] **Smith R.M. y Martell A.E.**, *Critical Stability Constants*, Plenum Press, New York, 1975, Vol. 2, 1982, Vol. 5.
- [120] **Conley H.L. y Martin R.B.**, *J. Phys. Chem.*, 1965, 69, 2914.
- [121] **Ghosh K.K. y Ghosh S.**, *J. Org. Chem.*, 1994, 59, 1369, ; L=OBISDIEN.
- [122] $L = N_3[9]$ ona, k estimada del rendimiento de la hidrólisis de GG después de 7 días, ver también la referencia [43].
- [123] **Kamiskaia N.V. y Kostic N.M.**, *Inorg. Chem.*, 2001, 40, 2368.
- [124] **Hu X. y Boyer G.L.**, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 1812.
- [125] **Jencks, W.P.; Gilchrist, M.** *J. Am. Chem. Soc.* 1968, 90, 2622.
- [126] **Behrman E.J. Bialla M.J., Braas H.J., Edwards J.O., Isaks M.**, *J. Org. Chem.* 1970, 35, 3069.
- [127] **Mejía-Radillo, Y.; Yatsimirsky, A.K.; Foroudian, H.J.; Jillit, N.; Bunton C.A.** *J. Phys. Org. Chem.*, 2000, 13, 505.
- [128] **Wiberg, K.B.** *J. Am. Chem. Soc.* 1955, 77, 2519.
- [129] **Evans M.G., Uri N.**, *Trans. Faraday Soc.*, 1949, 45, 224.
- [130] **Schilt A.A., Dunbar W.E.**, *Tetrahedron*, 1974, 30, 401.
- [131] **Packer J., Thomson A.L., Vaughan, J. J.** *Chem. Soc.* 1955, 2601.
- [132] **Beichler S.S., Taft R.W.**, *J. Am. Chem. Soc.* 1957, 79, 4927.
- [133] **Martin R.B.**, *Biopolymers*, 1998, 45, 351.
- [134] **(a) Rana, T.M.; Meares, C.F.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991, 88, 10578; **(b) Rana, T.M.; Meares, C.F.** *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 1859, **(c) Rana, T.M.; Meares, C.F.** *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 2457.
- [135] **Kirby, A.J.** *Adv. Phys. Org. Chem.* 1980, 17, 183.
- [136] **House Herbert O.**, *Modern Synthetic Reactions*, 2ª edición, Merlo park, W.A. Benjamin, 1972.
- [137] **Robert Raja, John Meurig T., Mingean Xu y Kieran Quill**, *Chem. Comm.* 2006, 448.

Metal-catalyzed hydroxylaminolysis of unactivated amide and peptide bonds

Baldomero Gómez-Reyes and Anatoly K. Yatsimirsky*

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 D.F., México

Received 11th November 2002, Accepted 16th January 2003

First published as an Advance Article on the web 11th February 2003

Kinetics of the hydroxylaminolysis of acetamide, glycinamide, glycylglycine and triglycine have been studied in the range of temperatures 37–60 °C as a function of pH and hydroxylamine concentration. Rate constants for specific acid, general-acid and general-base catalyzed pathways have been determined for all substrates (for glycine derivatives rate constants for different protonation forms were obtained). Testing different metal ions as possible reaction catalysts revealed a significant catalytic effect of Zn(II) on the hydroxylaminolysis of glycine substrates, but not acetamide. On the basis of the kinetic results, a mechanism of Zn(II) catalysis is proposed, which involves the coordination of the metal ion to the α -amino group of the substrate and the base-assisted nucleophilic attack of hydroxylamine on the bound substrate. The product analysis by proton NMR shows that the primary reaction product in the catalytic reaction is glycine hydroxamic acid, which undergoes further Zn(II)-catalyzed hydrolysis to glycine. Thus the final result of the Zn(II)-catalyzed treatment of peptides by hydroxylamine is hydrolytic cleavage.

Introduction

Reagents, which can afford the cleavage of peptides and proteins under mild conditions find important applications in biochemistry.¹ Much attention has been paid to the catalytic peptide hydrolysis in this connection.² The uncatalyzed peptide hydrolysis is a very slow reaction: estimated half-lives for short peptides range from 7 to 600 years at pH 7 and 25 °C.³ In earlier studies cupric ions were found to catalyze the hydrolysis of glycinamide (GNH₂)[†] and dipeptides; lower activities were reported also for Ni(II), Co(II) and Zn(II).⁴ A much higher reactivity was observed for the cleavage of peptides coordinated to Co(III) tetraamino complexes⁵ and this reaction was used for the determination of *N*-terminal amino acids of peptides and proteins.^{5b} Recently a macrocyclic Cu(II) complex,⁶ a series of Pd(II) aquo complexes,^{7,2f} and the Ce(IV) hydroxide gel,^{8,2d} as well as the peptide-attached iron(II) complexes in a combination with H₂O₂ and ascorbic acid^{9,2e} were proposed for the efficient peptide hydrolytic cleavage.

In spite of significant progress made in this area further efforts are necessary to develop practically useful systems for the peptide cleavage in aqueous neutral solutions. This paper explores a possibility to achieve this by the metal-catalyzed hydroxylaminolysis instead of hydrolysis. Hydroxylamine is a strong nucleophile towards amide bonds.^{10,11} A detailed kinetic study of the hydroxylaminolysis of formamide revealed that the reaction is second-order in total hydroxylamine and the reaction rate shows a maximum near pH 6 due to the general-acid catalysis of the reaction by NH₃OH⁺.¹¹ The observed first-order rate constant 0.04 min⁻¹ at 39 °C for the reaction of formamide with 1 M hydroxylamine at optimum pH is only 10 times smaller than that for the alkaline hydrolysis in 1 M NaOH.¹¹ Thus, one may consider hydroxylamine as a convenient nucleophile for amide cleavage in neutral solution, which could require only modest catalysis to achieve acceptable rates of the peptide cleavage.

The hydroxylaminolysis of *N*-substituted amides including peptides proceeds much slower than that of simple amides.^{10a} The only exception is the relatively fast hydroxylaminolysis at the Asn–Gly bonds of peptides and proteins, which is employed as a selective method of protein cleavage.¹² The reaction

mechanism involves intramolecular nucleophilic catalysis by the asparagine amide group.^{12a} To our knowledge, metal ion catalysis has not been reported for the hydroxylaminolysis of amides or peptides. Attempts to observe metal ion catalysis in the hydroxylaminolysis of more reactive carboxylic acid anhydride¹³ and ester¹⁴ bonds were unsuccessful, although the hydrolysis of both substrates was strongly accelerated by the same metal ions. The reason for this different behavior is that the catalytic hydrolysis involves the nucleophilic attack of the substrate by the metal-bound hydroxide anion and such a mechanism is impossible for the hydroxylaminolysis because the nitrogen of NH₂OH possesses only one pair of unshared electrons, which it may use either for coordination to the metal or for the nucleophilic attack on the substrate. The alternative mechanism of catalysis involves the Lewis acid activation of the substrate by the metal cation and an attack of free nucleophile on the activated substrate. Due to the poor donor ability of esters and anhydrides such a mechanism would be inefficient with these substrates, but amides are stronger donors and they can at least weakly coordinate metal ions even in aqueous solutions.¹⁵ Thus, we chose to study the metal ion catalysis of hydroxylaminolysis of amides rather than reactive esters.

This paper reports a first example of the metal ion catalysis in the hydroxylaminolysis of unactivated amides and peptides. Preliminary testing of a series of divalent cations revealed a significant catalytic effect of Zn(II) in the cleavage of glycine derivatives, which was studied in detail. A tentative mechanism of the Zn(II)-catalyzed reaction is proposed.

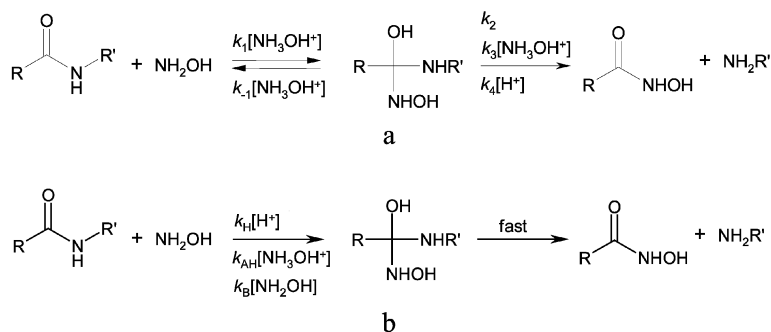
Results and discussion

Kinetics of the non-catalytic hydroxylaminolysis

Scheme 1a illustrates the mechanism of amide hydroxylaminolysis established by Jencks and Gilchrist¹¹ with formamide as a substrate.

The rate-determining step is changed from the formation to the decomposition of the tetrahedral addition intermediate on increase in the concentration of hydroxylammonium cations. This is manifested in the non-linear dependence of the observed second-order rate constant of the formamide hydroxylaminolysis on the total concentration of hydroxylamine at a fixed pH value. The rate equation, which follows from Scheme 1a has the form:¹¹

[†] Abbreviations used in the paper are: G - glycine, GNH₂ - glycinamide, GH - glycine hydroxamic acid, GG - glycylglycine, GGG - triglycine, DKP - diketopiperazine, GGH - glycylglycine hydroxamic acid.



Scheme 1

$$k_{\text{obs}}/[\text{NH}_2\text{OH}] = k_1[\text{HA}](k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+]) / (k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+] + k_{-1}[\text{HA}]) \quad (1)$$

where k_{obs} is the observed first-order rate constant of the reaction and HA is NH_3OH^+ .

Since formamide is to some extent an activated substrate we have studied first the kinetics of the hydroxylaminolysis of much less reactive acetamide, which is closer by its intrinsic reactivity to peptides. Figs. 1 and 2 show the pH profiles for the observed rate constants at two temperatures and the concentration profile, respectively.

Like in the case of formamide a pH-optimum is observed at $\text{pH} \approx \text{p}K_a=6$ and the reaction order in hydroxylamine is higher than unity. The plot of $k_{\text{obs}}/[\text{NH}_2\text{OH}]$ (open squares in Fig. 2)

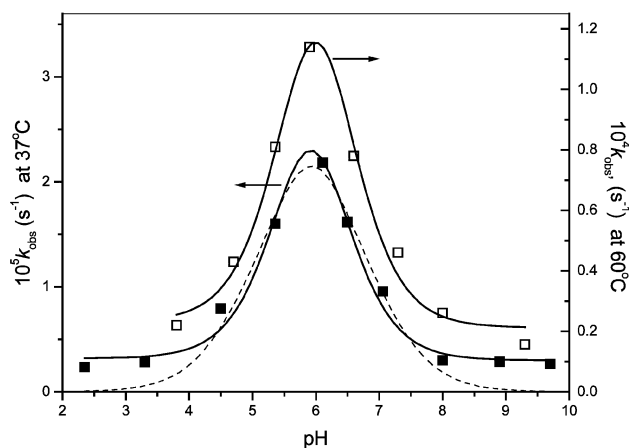


Fig. 1 Observed first-order rate constants for the cleavage of acetamide by 1 M hydroxylamine as a function of pH at 37 °C and 60 °C. Solid lines are theoretical profiles in accordance with eqn. (2) with parameters given in Table 1; dash line is the fitting curve to eqn. (1).

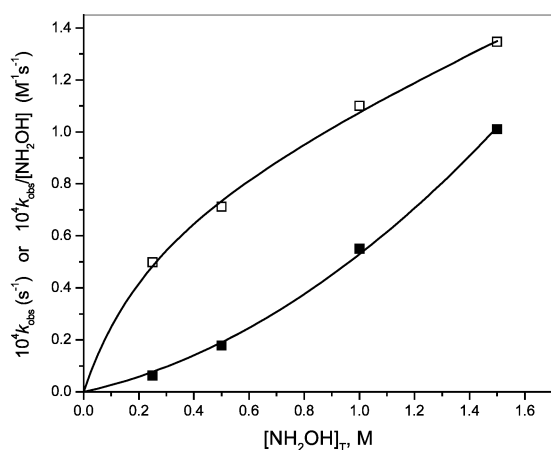


Fig. 2 Observed first-order (■) and second-order ($k_{\text{obs}}/[\text{NH}_2\text{OH}]$) (□) rate constants for the hydroxylaminolysis of acetamide at pH 6 and 50 °C as a function of total hydroxylamine concentration.

follows the equation (1) with $k_1 = 6.4 \times 10^{-4} \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $(k_2 + k_4[\text{H}^+])/k_{-1} = 0.17 \text{ M}$ and $k_3/k_{-1} = 0.16$ at 50 °C and pH 6.0. Fitting of the pH profile to the expression for k_{obs} which follows from the equation (1) is shown by the dash line in Fig. 1. It is satisfactory only around the pH-optimum, but both at higher and lower pH values the equation requires k_{obs} to approach zero. Apparently, the general-acid catalyzed addition of hydroxylamine in accordance with Scheme 1a is the predominant pathway only at a pH close to $\text{p}K_a$ of hydroxylammonium when the product $[\text{NH}_3\text{OH}^+][\text{NH}_2\text{OH}]$ reaches its maximum value, but at more acidic and more basic solutions the specific-acid and general-base catalysis respectively become the predominant pathways. Fitting the results between pH 5 and 7 to equation (1) gives the following parameters: $k_1 = 2.2 \times 10^{-4} \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $k_2/k_{-1} = 0.08 \text{ M}$, $k_4/k_{-1} = 6.2 \times 10^4$ and $k_3/k_{-1} = 0.36$ at 37 °C. In comparison, formamide as a substrate has the parameters $k_1 = 8.5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $k_2/k_{-1} = 0.18 \text{ M}$, $k_4/k_{-1} = 4 \times 10^4$ and $k_3/k_{-1} = 0.09$ at 39 °C.¹¹ Thus, formamide is *ca.* 40 times more reactive than acetamide due to the faster formation of the addition intermediate, as one would expect for a substrate with the activated acyl part.

The above results allow one to estimate the ratio of rates of decomposition of the tetrahedral intermediate in the forward direction to final products (r_+) and in the back direction to starting molecules (r_-): $r_+/r_- = (k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+]) / (k_{-1}[\text{HA}])$. At pH 6 and 37 °C $r_+/r_- = 0.65$ (from the pH-dependence) and at 50 °C $r_+/r_- = 0.44$ (from the concentration dependence). Thus at pH 6 the rates of decomposition in both directions are similar. It is easy to see that both an increase and decrease in pH will lead to an increase in r_+/r_- due to decrease in $[\text{HA}]$ and increase in $[\text{H}^+]$ respectively.¹⁶ Values of r_+/r_- considerably larger than unity indicate that the rate-determining step is the formation of the addition intermediate. Therefore, the whole pH-dependence of the rate of hydroxylaminolysis of acetamide was analyzed in terms of a simplified scheme, which assumes the rate-determining formation of the intermediate *via* three pathways: specific-acid, general-acid and general-base catalyzed attack by hydroxylamine, Scheme 1b. The respective rate equation has the form:

$$k_{\text{obs}} = k_H[\text{H}^+][\text{NH}_2\text{OH}]_T / (1 + [\text{H}^+]/K_a) + (k_{AH}[\text{H}^+]/K_a + k_B)[\text{NH}_2\text{OH}]_T^2 / (1 + [\text{H}^+]/K_a)^2 \quad (2)$$

where $[\text{NH}_2\text{OH}]_T$ is the total concentration of hydroxylamine and K_a is the acid dissociation constant of NH_3OH^+ .¹⁷ Solid lines in Fig. 1 are the fitting curves in accordance with the equation (2) and the respective rate constants at three temperatures together with the activation energies are collected in Table 1.¹⁸

The reactivity of GNH_2 at the optimum pH value is close to that of acetamide, but the optimum range of pH is wider and is shifted to 7. In addition, in acid solutions the reaction rate goes to zero on decrease in pH, Fig. 3.

The plot of $k_{\text{obs}}/[\text{NH}_2\text{OH}]$ vs. total hydroxylamine concentration shown in Fig. 4 (open squares) is linear up to 1.2 M hydroxylamine. As follows from equation (1), such linearity can

Table 1 Rate parameters for the uncatalyzed hydroxylaminolysis of acetamide and some glycine derivatives in differently protonated forms

Substrate species	$T/^\circ\text{C}$	$k_{\text{H}}/\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{AH}}/\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{B}}/\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$
CH_3CONH_2	37	2.9 ± 0.5	$(8.3 \pm 0.7) \times 10^{-5a}$	$(2.9 \pm 0.6) \times 10^{-6}$
	45	7.1 ± 3.3	$(1.4 \pm 0.2) \times 10^{-4a}$	$(8.3 \pm 3.0) \times 10^{-6}$
	60	23 ± 4	$(4.0 \pm 0.2) \times 10^{-4a}$	$(2.1 \pm 0.3) \times 10^{-5}$
$E_a/\text{kJ mol}^{-1} =$		76.4 ± 5.8	54.8 ± 0.5	71.4 ± 14.1
$^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CONH}_2$	50	0	$(8.7 \pm 0.5) \times 10^{-5}$	0
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONH}_2$	50	0	$(4.6 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	$(1.6 \pm 0.1) \times 10^{-5}$
$^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CONHCH}_2\text{COO}^-$	60	2.1 ± 0.4	$(6.7 \pm 1.6) \times 10^{-6}$	0
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONHCH}_2\text{COO}^-$	60	0	$(2.9 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	$(1.6 \pm 0.1) \times 10^{-6}$
$^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CONHCH}_2\text{CONHCH}_2\text{COO}^-$	60	3.2 ± 0.2	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	0
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONHCH}_2\text{CONHCH}_2\text{COO}^-$	60	0	$(2.3 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	0

^a $k_1 = 2.3 \times 10^{-4}$, 3.7×10^{-4} and $1.05 \times 10^{-3} \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$ at 37, 45 and 60°C respectively, as estimated by using the equation (1) from the results around pH 6 only.

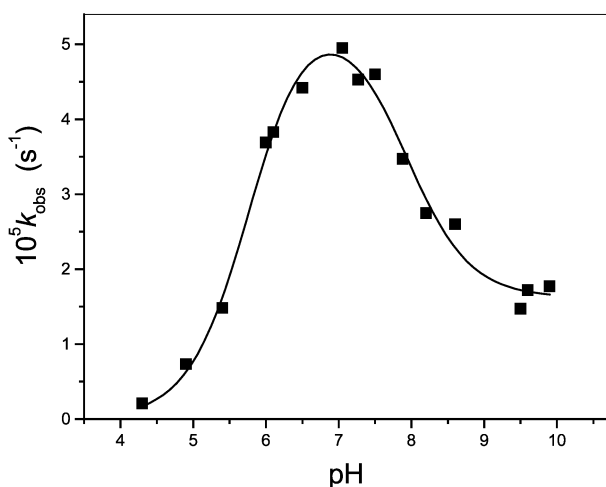


Fig. 3 Observed first-order rate constants for the cleavage of glycylglycine by 1 M hydroxylamine as a function of pH at 50°C . The solid line is the theoretical profile in accordance with Scheme 2 with parameters given in Table 1.

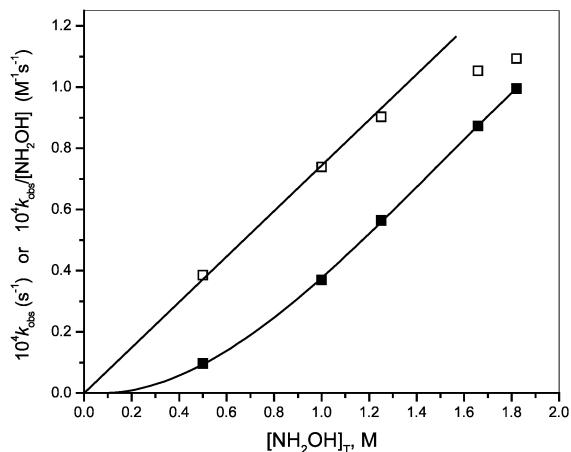
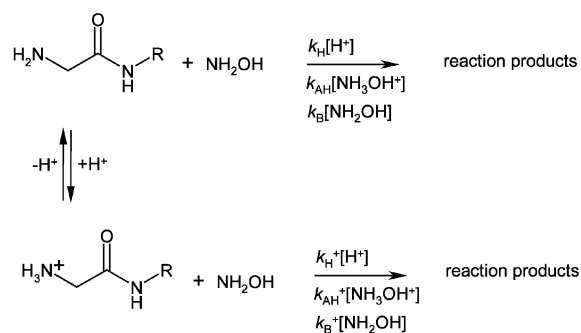


Fig. 4 Observed first-order (■) and second-order ($k_{\text{obs}}/[\text{NH}_2\text{OH}]$) (□) rate constants for the hydroxylaminolysis of glycylglycine at pH 6 and 50°C as a function of total hydroxylamine concentration.

be observed only when the $k_{-1}[\text{HA}]$ term in the denominator is negligible, that is when $k_{-1}[\text{HA}] \ll (k_2 + k_3[\text{HA}] + k_4[\text{H}^+])$. This inequality means that the rate of decomposition of the addition intermediate in the back direction is much smaller than that in the forward direction and the addition step is the rate-determining. Shift and widening of the pH-optimum can be explained by different reactivities of neutral and protonated forms of GNH_2 ($\text{p}K_{\text{a}}=7.93$),¹⁹ Scheme 2. Fitting the results in Fig. 3 to the equation (2) modified in accordance with Scheme 2 allowed us to determine the rate constants for different reaction pathways



Scheme 2

with both neutral and cationic forms of the substrate collected in Table 1. The specific acid catalysis does not operate in this case apparently because of repulsion of hydroxonium cations from the protonated substrate. For the same reason the rate constant for the general acid catalysis by hydroxylammonium cation (k_{AH}) is smaller for the protonated than for neutral substrate, although the protonated substrate should be more reactive due to the inductive effect of the ammonium group, as is observed in the alkaline hydrolysis of glycine ethyl ester.^{4b} The specific acid catalysis should be efficient for the reaction with the neutral form of GNH_2 also, but we were unable to estimate the respective rate constant probably because of too small fraction of the neutral form in acid solutions.

The hydroxylaminolysis of peptides GG and GGG proceeds as expected much slower than that of GNH_2 and the reaction kinetics were studied at a higher temperature, Fig. 5.

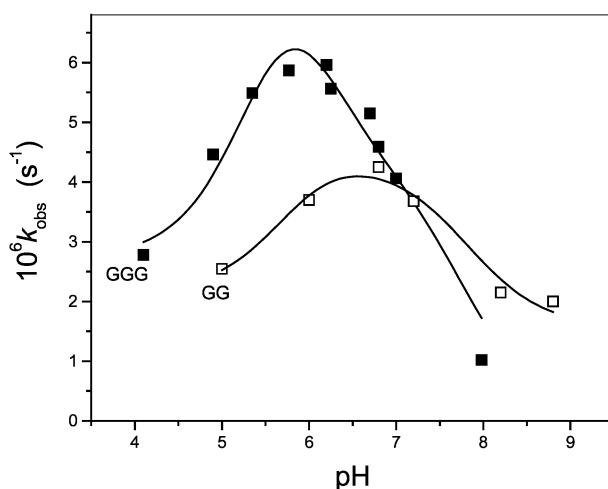


Fig. 5 Observed first-order rate constants for the cleavage of glycylglycine (GG) and triglycine (GGG) by 1 M hydroxylamine as a function of pH at 60°C . Solid lines are theoretical profile in accordance with Scheme 2 with parameters given in Table 1.

Table 2 Representative first-order rate constants for the hydroxylaminolysis of glycine amide and glycine peptides in the presence of metal cations (1 M hydroxylamine)

	Substrate	Metal ion	$T/^\circ\text{C}$	pH	k/s^{-1}
1	GNH ₂	None	50	7.2	4.5×10^{-5}
2		Ni(II), 0.03 M	—	—	8.6×10^{-5}
3		Ni(II), 0.06 M	—	—	8.0×10^{-5}
4		Zn(II), 0.01 M	—	—	1.0×10^{-4}
5		Zn(II), 0.03 M	—	—	2.1×10^{-4}
6	Asn	Cd(II), 0.025 M	—	—	7.3×10^{-5}
7		None	65	6.3	6.6×10^{-5}
8		Zn(II), 0.03 M	—	—	6.0×10^{-5}
9	N-AcGly	None	50	7.0	4.5×10^{-6}
10		Zn(II), 0.03 M	—	—	8.5×10^{-6}
11	GG	None	60	6.8	4.2×10^{-6}
12		Zn(II), 0.03 M	—	—	1.5×10^{-5}
13		Uncatalyzed hydrolysis ^a	60	7.0	3.6×10^{-9}
14	GGG	Hydrolysis by Zn ₂ L(OH) ^b	70	ca. 8.5	4.6×10^{-7}
15		Hydrolysis by CuL ^c	50	8.1	2.6×10^{-7}
16	GGG	None	60	6.8	5.2×10^{-6}
17		Zn(II), 0.03 M	—	—	2.1×10^{-5}

^a Ref. 3a. ^b Ref. 23; L=OBISDIEN. ^c Ref. 6; L=[9]aneN₃, k estimated from the yield of GG hydrolysis after 7 days.

The optimum pH for GG is about 7 like in the case of glycine amide, but for GGG it is closer to 6 like in the case of acetamide. For the tripeptide two peptide bonds are cleaved, one of which is more distant from the terminal amino group and its cleavage may be insensitive to the protonation. For both peptides the reaction order in hydroxylamine is two. The rate constants found from the fitting of these pH-dependences are given in Table 1. The most essential difference from glycine amide is a considerable contribution of the specific acid catalysis for the hydroxylaminolysis of both peptides in protonated forms. This is explicable by the fact that the protonated peptides are zwitterions rather than cations, as in the case of GNH₂. The general-acid catalyzed reaction is faster for deprotonated anionic peptides than for zwitterions. This can be due to the electrostatic attraction of the hydroxylammonium cation to the anionic substrate.

Kinetics of the hydroxylaminolysis in the presence of metal cations

At the first step several divalent cations were tested for possible catalysis in the hydroxylaminolysis of more reactive GNH₂. Additions of 0.025 M Cu(II), Co(II), Fe(II) and Pb(II) to 1 M hydroxylamine solution at pH 6–7 and 50 °C produced precipitates and Mn(II) did not affect the reaction rate. Positive results were observed with Ni(II), Zn(II) and Cd(II). Representative rate constants for these cations are given in Table 2 (lines 1–6). The largest (ca. five-fold) acceleration is observed with Zn(II). Additions of Ni(II) at higher concentrations lead to ca. two-fold acceleration, which is independent of the metal concentration. The “saturation” of the reaction rate is observed also with Zn(II) (see below), but for Ni(II) it occurs at lower metal concentration apparently due to much higher stability of GNH₂ complexes with Ni(II) as compared with Zn(II) ($\log K=4.20$ and 3.28 for Ni(II) and Zn(II) respectively).¹⁹ The catalytic effect of Cd(II) is lower than that of Ni(II). The reaction in the presence of Zn(II) was studied in more detail.

Catalysis by Zn(II) was not observed in the hydroxylaminolysis of acetamide. It is absent also for asparagine (Table 2, lines 7 and 8). The reaction with *N*-acetylglucine shows a modest catalytic effect (Table 2, lines 9 and 10). Thus the presence of the α -amino group is essential for the efficient catalysis.

Fig. 6a shows the observed first-order rate constant for the hydroxylaminolysis of GNH₂ as a function of Zn(II) concentration at three pH values. The variation in concentration at pH 7.5 was limited by precipitation of Zn(II) hydroxide above 0.03 M metal. The profiles at lower pH values fit to a Michaelis–Menten type equation (3)

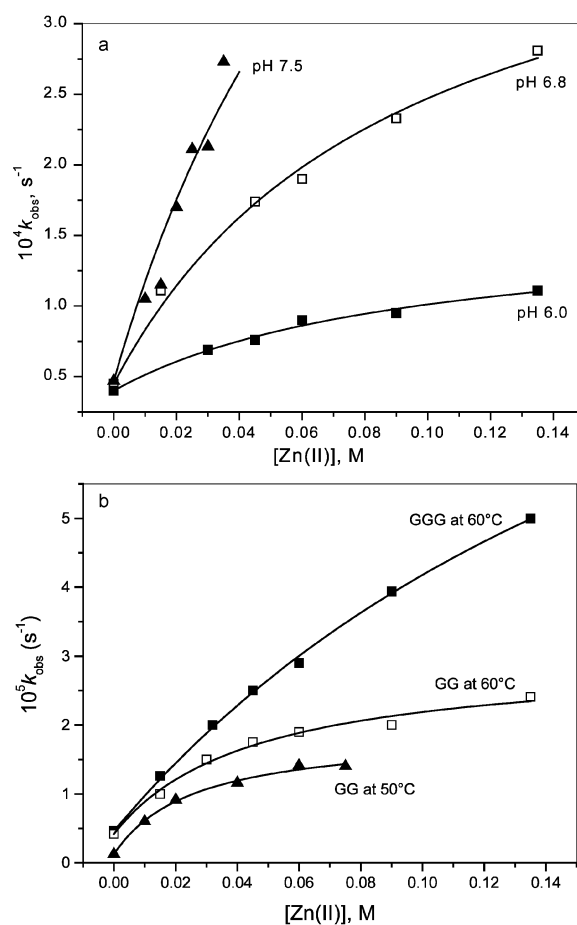


Fig. 6 a Observed first-order rate constants for the cleavage of glycine amide by 1 M hydroxylamine at 50 °C vs. Zn(II) concentration at pH 6.0 (■), 6.8 (□) and 7.5 (▲); b Observed first-order rate constants for the cleavage of glycine peptides by 1 M hydroxylamine at pH 6.8 vs. Zn(II) concentration: GGG at 60 °C (■), GG at 60 °C (□) and GG at 50 °C (▲).

$$k_{\text{obs}} = (k_0 + k_C K [\text{Zn(II)}]) / (1 + K [\text{Zn(II)}]) \quad (3)$$

where k_0 and k_C are the rate constants for the hydroxylaminolysis of free and bound to Zn(II) GNH₂ and K is the stability constant for the metal–substrate complex. The values of parameters of equation (3) are given in Table 3.

The values of K are practically pH-independent, but the acceleration effect of Zn(II) expressed as k_C/k_0 increases from 4

Table 3 Rate constants of the uncatalyzed (k_0) and catalytic (k_c) hydroxylaminolysis of different substrates in the presence of Zn(II) and stability constants (K) of their complexes with Zn(II), Scheme 3, equation (3)

Substrate	$T/^\circ\text{C}$	pH	k_0/s^{-1}	k_c/s^{-1}	K/M^{-1}	k_c/k_0
GNH ₂	50	6.0	4.0×10^{-5}	1.6×10^{-4}	10.4	4.0
—	50	6.8	4.5×10^{-5}	4.3×10^{-4}	10.9	9.5
—	50	7.5	4.7×10^{-5}	7.8×10^{-4}	10.6 ^a	16.6
GG	50	6.8	1.2×10^{-6}	1.9×10^{-5}	38.5	15.8
—	60	6.8	4.2×10^{-6}	3.0×10^{-5}	22.2	7.1
GGG	60	6.8	4.6×10^{-6}	1.3×10^{-4}	4.4	28.3

^a Mean value between binding constants at pH 6.0 and 6.8.

to 9 on going from pH 6.0 to pH 6.8. The results at pH 7.5 cover only the initial linear part of the concentration dependence, but using the K value found at lower pH one can obtain from this results the ratio $k_c/k_0=16$. Thus the efficiency of Zn(II) catalysis strongly increases on going to more basic solutions. A plot of $\log k_{\text{obs}}$ corrected for the rate of uncatalyzed reaction at fixed Zn(II) concentration vs. pH is linear (Fig. 7) with the slope 0.86 close to unity. Measurements of k_{obs} at different NH₂OH concentrations showed that in contrast to the uncatalyzed reaction, the catalytic reaction is first-order in hydroxylamine.

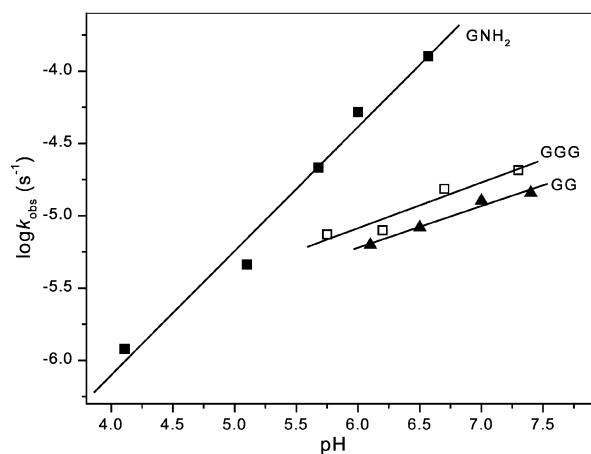


Fig. 7 Logarithms of k_{obs} for Zn(II)-catalyzed cleavage of GNH₂ (at 50 °C), GG and GGG (at 60 °C) by 1 M hydroxylamine vs. pH.

The catalytic effect of Zn(II) on the hydroxylaminolysis of peptides GG and GGG is similar to that for GNH₂ (Table 2, lines 11 and 12; 16 and 17). Rate vs. Zn(II) concentration profiles for the cleavage of GG and GGG (Fig. 6b) also follow equation (3) with rate parameters given in Table 3. Rates of catalytic reactions for both peptides increase on increase in pH, although plots of $\log k_{\text{obs}}$ vs. pH are flatter than in the case of GNH₂ (Fig. 7). Like in the case of GNH₂ the reaction order in hydroxylamine is reduced to one in the presence of Zn(II) for both peptides. Thus, the catalytic hydroxylaminolysis of GNH₂ and peptides generally have similar features.

The reported stability constants for Zn(II) complexes with GNH₂ and both peptides are similar and are *ca.* $2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ at 25 °C.²⁰ “Kinetic” stability constants given in Table 3 are much smaller. This is due partly to a significant degree of protonation of the amino group of substrates at about pH 7. The $\text{p}K_{\text{a}}$ values of the protonated forms of all substrates are close to 8.¹⁹ Therefore the expected stability constant at pH 7 can be estimated as 200 M^{-1} at 25 °C, which is still one order of magnitude larger than the “kinetic” values. A possible reason of this disagreement is the enhanced temperature. Indeed, measurements with GG at a lower temperature give a larger value of K , Table 3.

The above results allow one to propose a tentative reaction mechanism, which should take into account the coordination of Zn(II) to the α -amino group of the substrate, the first-order

kinetics in NH₂OH and the first-order dependence of k_{obs} on OH⁻. Such a mechanism is illustrated in Scheme 3. It is proposed that the Zn(II) cation serves as a Lewis acid catalyst, that makes unnecessary the participation of NH₂OH⁺ and the reaction becomes first-order in total hydroxylamine. The role of hydroxide ion is most probably a general-base assistance to the nucleophile, as illustrated in structure 1, Scheme 3.

Fig. 8 shows the reaction course for the hydroxylaminolysis of GNH₂ in the presence of Zn(II) followed by the proton NMR. The signal of GNH₂ reduces to *ca.* 7% of its initial intensity after 2.7 h and disappears after 9.5 h. Surprisingly, together with glycine hydroxamic acid (GH), an equal amount of glycine (G) appears after 2.7 h, and after 9.5 h *ca.* 95% of the starting amount of GNH₂ is converted into G and only *ca.* 5% remains as GH.

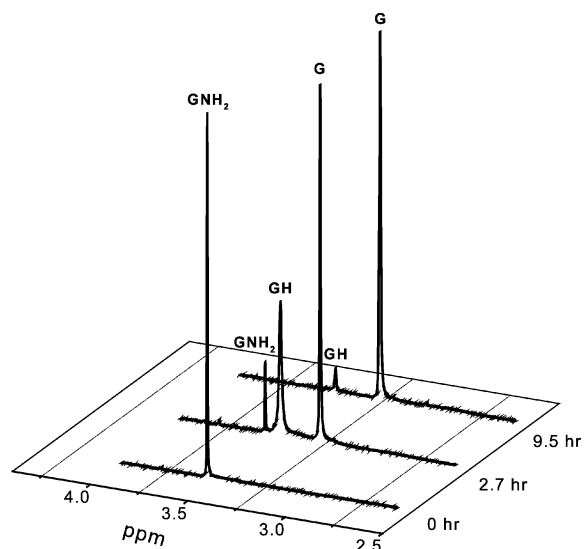
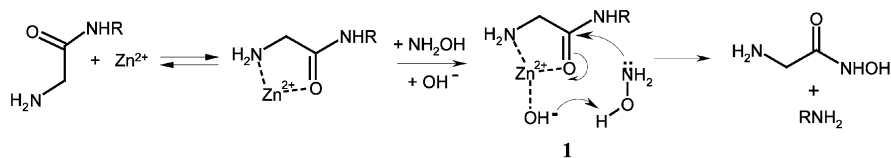


Fig. 8 Proton NMR spectra of the reaction mixture containing 0.05 M GNH₂, 0.1 M Zn(II) and 1.0 M hydroxylamine in D₂O recorded after 0, 2.7 and 9.5 h of incubation at pH 7 and 65 °C.

These results indicate that under experimental conditions GH is further hydrolyzed to G and hydroxylamine. The hydrolysis of hydroxamic acids is a slow process, which requires strongly acidic or basic conditions.^{11,21} Metal ion catalysis by Fe(III) and to a much lesser degree by divalent cations (Cu(II), Mn(II), Ni(II) and Cd(II)) was reported for the hydrolysis of desferal hydroxamic acid in 1.5 M sulfuric acid at 70 °C.²² Apparently, the hydrolysis of GH is more sensitive to the metal ion catalysis. In a separate experiment the first-order rate constant for the hydrolysis of GH was found to be $6.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (half-life 3 h) at 65 °C, pH 7.0 in the presence of 0.1 M Zn(II) and 1 M hydroxylamine.

Fig. 9(a,b) shows proton NMR spectra of the reaction mixtures containing GG and GGG respectively after 24 h. In both cases the degree of cleavage is *ca.* 80% and the principal product is G. In the case of GG also small amounts (1.5% of total cleavage products) of diketopiperazine (DKP) and glycylglycine hydroxamic acid (GGH) are formed. The cyclization of GG may occur under conditions employed^{3a} and the cleavage of DKP by hydroxylamine explains the formation of GGH. The cyclization of a tripeptide affording DKP should be much more rapid.^{3a} Indeed, the signal of DKP is relatively strong for the GGG reaction mixture (Fig. 9b) and accounts for *ca.* 7% of the total amount of the cleavage products. Thus the Zn(II)-catalyzed hydroxylaminolysis does not suppress completely the DKP formation, but favorably competes with the cyclization.

The time course of the peptide cleavage was followed also by recording NMR spectra of the reaction mixtures in D₂O at different time intervals. Fig. 10 shows the time course of



Scheme 3

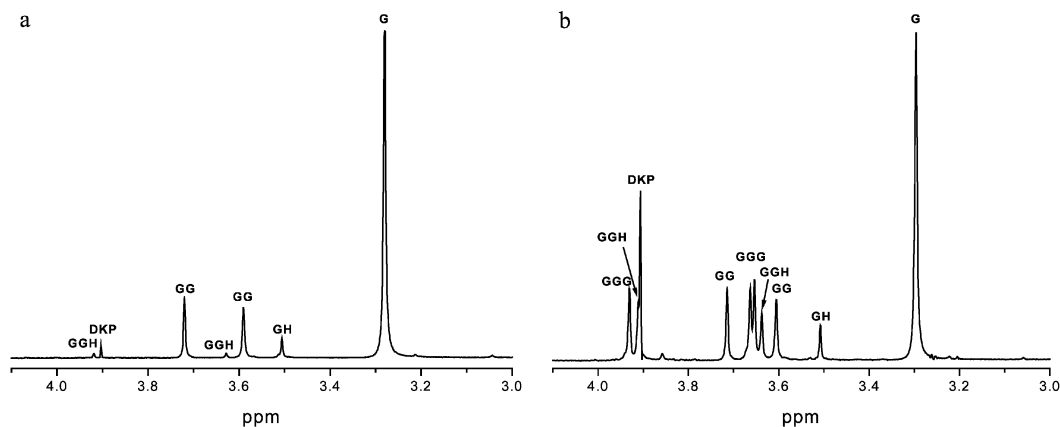


Fig. 9 Proton NMR spectra of the reaction mixtures containing 0.05 M GG (a) or GGG (b), 0.1 M Zn(II) and 1.0 M hydroxylamine in D₂O recorded after 24 h of incubation at pH 7 and 65 °C.

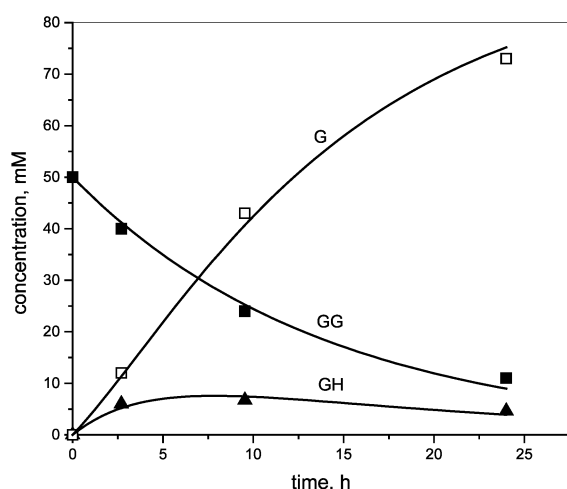
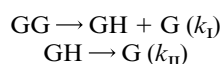


Fig. 10 The time course of the cleavage of glycyglycine in the presence of 0.1 M Zn(II) and 1 M NH₂OH in D₂O at pH 7 determined by proton NMR spectra of the reaction mixture recorded at various times.

GG cleavage in the presence of 0.1 M Zn(II) and 1 M hydroxylamine at 65 °C and pH 7 monitored by NMR. The kinetic curve for GH has a typical form for a reaction intermediate. The maximum concentration of GH is *ca.* 15% of the initial GG concentration indicating that the rate constant of GH decomposition is higher than the rate constant of its formation.

The time profiles for all reaction components may be fitted to a formal scheme of two consecutive reactions:



from which one obtains:

$$[\text{GG}] = [\text{GG}]_0 e^{-k_1 t} \quad (4)$$

$$[\text{GH}] = k_1 [\text{GG}]_0 (e^{-k_1 t} - e^{-k_{II} t}) / (k_{II} - k_1) \quad (5)$$

$$[\text{G}] = [\text{GG}]_0 (2 + (k_1 e^{-k_{II} t} + (k_1 - 2k_{II}) e^{-k_1 t}) / (k_{II} - k_1)) \quad (6)$$

Solid lines in Fig. 10 are the theoretical profiles calculated by using $k_{II} = 6.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ as given above and the value of $k_1 = 2.2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ determined independently from the initial rate of GH formation measured by the Fe(III) procedure (see Experimental). Obviously there is a good agreement between results obtained by the two different techniques. The NMR spectra recorded at various time intervals for the hydroxylaminolysis of GGG under similar conditions (1 M NH₂OH, 0.1 M Zn(II) at 65 °C) showed that GH also behaves as an intermediate and the maximum concentration of GH reached after *ca.* 7 hours is 12% of the total amount of the peptide. Thus the final result of the Zn(II)-catalyzed treatment of peptides by hydroxylamine is the hydrolytic cleavage.

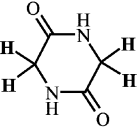
For the purpose of comparison of the efficiency of Zn(II)-catalyzed hydroxylaminolysis of peptides with the metal-catalyzed peptide hydrolysis we also included in Table 2 the literature values of the rate constants of spontaneous hydrolysis and Zn(II) and Cu(II) catalyzed hydrolysis of GG (Table 2, lines 13–15). One can see that in the presence of 0.03 M Zn(II) and 1 M NH₂OH the cleavage of GG proceeds *ca.* 10⁴ times faster than the uncatalyzed hydrolysis and *ca.* 10² times faster than the Zn(II) and Cu(II) catalyzed hydrolysis. Peptide half-lives at pH 7 in the presence of 0.1 M Zn(II) and 1 M hydroxylamine are about 5 h at 60 °C, similar to those reported for the most reactive hydrolytic systems based on Pd(II)⁷ and Ce(IV).⁸ The rate vs. pH profiles, Fig. 7, indicate that the catalytic activity of Zn(II) may be strongly increased on going to higher pH values, but the precipitation of Zn(II) hydroxide limits the possible pH interval to values below pH 7.5. To prevent the hydroxide precipitation, polyamine ligands (ethylenediamine and diethylenetriamine) or imidazole were added to Zn(II), but caused inhibition of the catalytic activity. Search for suitable stabilizing ligands as well as a study of the reaction selectivity in respect of the amino acid side groups is in progress.

Experimental

Materials

The compounds studied as substrates (acetamide, glycinamide, *N*-acetyl glycine, glycyglycine, and triglycine), acetohydroxamic acid and glycine hydroxamic acid were purchased from Sigma and used without further purification. Glycyglycine hydroxamic

Table 4 Proton NMR chemical shifts in D₂O at pH 7 in the absence and in the presence of 0.085 M ZnSO₄

Substance	Chemical shift	
	alone	with ZnSO ₄
H ₂ NCH ₂ CONH ₂	3.652	3.551
H ₂ NCH ₂ CONHCH ₂ COOH	3.633	3.654
H ₂ NCH ₂ CONHCH ₂ COOH	3.686	3.713
H ₂ NCH ₂ CONHCH ₂ CONHCH ₂ COOH	3.670	3.660
H ₂ NCH ₂ CONHCH ₂ CONHCH ₂ COOH	3.918	3.931
H ₂ NCH ₂ CONHCH ₂ CONHCH ₂ COOH	3.644	3.639
H ₂ NCH ₂ COOH	3.320	3.276
H ₂ NCH ₂ CONHOH	3.506	3.508
H ₂ NCH ₂ CONHCH ₂ CONHOH	3.906	3.906
H ₂ NCH ₂ CONHCH ₂ CONHOH	3.609	3.609
	Diketopiperazine	4.080 3.909

acid used as a standard for identification of the reaction products by NMR was prepared by reacting glycylglycine ethyl ester with excess hydroxylamine in D₂O. Reagent-grade inorganic salts and hydroxylammonium hydrochloride from Aldrich were used as supplied. All solutions were prepared in purified (Milli-Q Reagent Water System) water or in D₂O (Aldrich) for NMR studies.

Instrumentation

Ultraviolet-Visible spectra were obtained with a Hewlett Packard 8452A spectrophotometer. ¹H NMR spectra were recorded on 300 MHz Varian Unity INOVA spectrometer.

Methodology

Kinetics of the hydroxylaminolysis of glycinamide and peptides were followed by colorimetric reaction of aliquots taken periodically from the reaction mixture with Fe(NO₃)₃ in 0.3 M nitric acid.^{10,11} The molar absorptivity at 540 nm produced by glycine hydroxamic acid (650 M⁻¹cm⁻¹ respectively) was determined by using the standard solutions of glycine hydroxamic acid of known concentrations. The hydroxylaminolysis of acetamide was followed spectrophotometrically by appearance of acetohydroxamic acid at 215 nm (molar absorptivity 744 M⁻¹ cm⁻¹). Typically 0.02–0.05 M solutions of amides or peptides, 0.01–0.1 M metal salt and 0.5–1.5 M hydroxylamine were employed. The reaction mixtures were adjusted to desired pH by adding concentrated NaOH or HCl solutions and placed into the thermostat.

Products of the hydroxylaminolysis of glycine derivatives were identified by proton NMR in D₂O. Chemical shifts of starting materials and reaction products in D₂O at pH 7 are given in Table 4.

Acknowledgements

The work was supported by DGAPA-UNAM (Project IN 208901).

References

- 1 K. B. Grant and S. Patabhi, *Anal. Biochem.*, 2001, **289**, 196 and references therein.
- 2 Recent reviews on artificial proteases/peptidases: (a) E. L. Hegg and

- J. N. Burstyn, *Coord. Chem. Rev.*, 1998, **173**, 133; (b) R. Krämer, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **182**, 243; (c) G. M. Polzin and J. N. Burstyn, in *Metal Ions in Biological Systems*, eds. A. Sigel and H. Sigel, Marcel Dekker, New York, 2001, vol. 38, p. 103; (d) M. Komiyama, *Metal Ions in Biological Systems*, eds. A. Sigel and H. Sigel, Marcel Dekker, New York, 2001, vol. 38, p. 25; (e) S. A. Datwyler and C. F. Meares, *Metal Ions in Biological Systems*, eds. A. Sigel and H. Sigel, Marcel Dekker, New York, 2001, vol. 38, p. 213; (f) N. M. Milovic and N. M. Kostic, *Metal Ions in Biological Systems*, eds. A. Sigel and H. Sigel, Marcel Dekker, New York, 2001, vol. 38, p. 145.
- 3 (a) A. Radzicka and R. Wolfenden, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 6105; (b) R. M. Smith and D. E. Hansen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 8910; (c) D. Kahne and W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 7529.
- 4 (a) L. Meriwether and F. H. Westheimer, *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 5119; (b) H. L. Conley and R. B. Martin, *J. Phys. Chem.*, 1965, **69**, 2914.
- 5 (a) P. A. Sutton and D. A. Buckingham, *Acc. Chem. Res.*, 1987, **20**, 357; (b) K. W. Bentley and E. H. Creaser, *Biochem. J.*, 1973, **135**, 507.
- 6 E. L. Hegg and J. N. Burstyn, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 7015.
- 7 (a) L. Zhu and N. M. Kostic, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 3994; (b) L. Zhu and N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 4566; (c) T. N. Parac and M. N. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 51; (d) N. V. Kaminskaia and N. M. Kostic, *Inorg. Chem.*, 2001, **40**, 2368.
- 8 T. Takarada, M. Yashiro and M. Komiyama, *Chem. Eur. J.*, 2000, **6**, 3906.
- 9 (a) T. M. Rana and C. F. Meares, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**, 10578; (b) T. M. Rana and C. F. Meares, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 2457; (c) T. M. Rana and C. F. Meares, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 1859.
- 10 (a) F. Bergmann, *Anal. Chem.*, 1952, **24**, 1367; (b) V. Goldenberg and P. E. Spoerri, *Anal. Chem.*, 1958, **30**, 1327.
- 11 W. P. Jencks and M. Gilchrist, *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, **86**, 5616.
- 12 (a) P. Bornstein and G. Balian, in *Methods in Enzymology*, eds. C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff, Academic Press, New York, 1977, Vol. 47, Part E, p. 132; (b) H. Park, S. Pyo, S. Hong and J. Kim, *Biotechnol. Lett.*, 2001, **23**, 637.
- 13 R. Breslow, D. F. McClure, P. S. Brown and J. Eisenach, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 194.
- 14 M. A. Wells and T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 5356.
- 15 B. K. Takasaki, J. H. Kim, E. Rubin and J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 1157.
- 16 With the given above rate parameters at 37 °C the ratio r_+/r_- equals 1.1 and 6.4 at pH 5 and 4 respectively, and 1.2 and 8.4 at pH 7 and 8 respectively. Thus, in the range of pH 5–7 the ratio r_+/r_- is between 0.5 and 1, but outside this range $r_+/r_- > 1$ both in acidic and basic solutions.
- 17 Since pH values were always measured at room temperature the rate vs. pH profiles were analyzed by using $pK_a=6.0$ for hydroxylammonium at all temperatures. When pK_a was left as an adjustable parameter in the equation (2), the fitting of the pH-profiles at different temperatures gave the values 5.94, 6.10 and 6.0 at 37, 45 and 60 °C respectively. Thus using uncorrected pK_a at different temperatures seems justified and on this basis we used also uncorrected pK_a values for glycine derivatives employed as substrates.
- 18 Obviously in the range of pH 5–7 the assumption of the rate-determining addition step for the hydroxylaminolysis of acetamide is rather rough and the calculated value of k_{AH} (see Scheme 1b) should be smaller than the real value of the addition rate constant (k_1 in Scheme 1a) by a factor of 2 or 3. The correct values of k_1 at different temperatures were calculated by using the equation (1) from the results around pH 6 only and they are given as footnotes to Table 1. For glycine derivatives as the substrates the assumption is valid at all pH values.
- 19 R. M. Smith and A. E. Martell, *Critical Stability Constants*, Plenum Press, New York, 1975, Vol. 2, 1982, Vol. 5.
- 20 D. L. Rabenstein and S. Libich, *Inorg. Chem.*, 1972, **11**, 2960.
- 21 K. K. Ghosh and S. Ghosh, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 1369.
- 22 X. Hu and G. L. Boyer, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 1812.
- 23 M. T. B. Luiz, B. Szpoganicz, M. Rizzoto, M. G. Basallotta and A. E. Martel, *Inorg. Chim. Acta*, 1999, **287**, 134.

Kinetics of Amide and Peptide Cleavage by Alkaline Hydrogen Peroxide

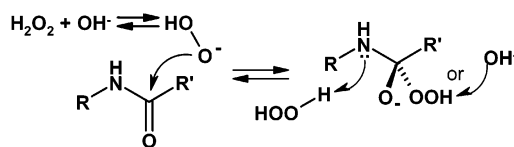
Baldomero Gómez-Reyes and Anatoly K. Yatsimirsky*

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México,
04510 D.F., Mexico

anatoli@servidor.unam.mx

Received September 19, 2003

ABSTRACT



The hydroperoxide anion cleaves unactivated amides and peptides although it is completely unreactive toward ethyl esters. The cleavage by HO_2^- proceeds faster than by OH^- and involves additional routes with general acid assistance by H_2O_2 and general base assistance by OH^- and HO_2^- . Cleavage of polypeptides occurs at the N-terminal peptide bond.

There is much current interest in the development of new reagents and/or catalysts for the hydrolytic cleavage of peptides and proteins.^{1–3} The most active system reported so far is the iron chelate mediated cleavage achieved with peptide-attached iron(II) complexes in combination with H_2O_2 and ascorbic acid.^{4,5} The proposed reaction mechanism involves the nucleophilic attack of the peptide bond by the metal-bound HO_2^- anion producing the tetrahedral addition intermediate, which undergoes further decomposition to the final hydrolytic products. However, a serious problem with this mechanism is that the HO_2^- anion is not expected to be able to afford the nucleophilic substitution of unactivated amide bonds. Indeed, the well-known α -nucleophilic char-

acter of HO_2^- , i.e., its strongly enhanced reactivity over that expected from its basicity, is manifested only in reactions with substrates possessing highly activated leaving groups, such as aryl esters,⁶ phosphonates,⁷ or phosphates.⁸ Already ethyl esters do not react with HO_2^- at all.⁹ The reason for this lack of reactivity is that HO_2^- is not sufficiently basic to throw out more basic ethoxide anion from the tetrahedral intermediate. The situation should be apparently even worse for amides and peptides possessing even more basic leaving groups. This paper demonstrates, however, that the α -effect is observed for HO_2^- in reactions with unactivated amides and peptides and also gives preliminary results on the selectivity of the peptide cleavage by HO_2^- .

The compounds studied as substrates (acetamide, glycine, N-acetylglycine, glycyglycine, and other peptides) were purchased from Sigma and used without further purification. Reagent-grade inorganic salts and hydrogen peroxide from Aldrich were used as supplied. UV spectra were obtained with a Hewlett-Packard 8452A spectrophotometer. ^1H NMR spectra were recorded on a 300 MHz Varian Unity INOVA spectrometer.

(1) Grant, K.B.; Patabhi, S. *Anal. Biochem.* **2001**, *289*, 196.

(2) (a) Milovič, N. M.; Kostič, N. M. In *Metal Ions in Biological Systems, Vol. 38: Probing of Proteins by Metal Ions and Their Low-Molecular Weight Complexes*; Sigel, A., Sigel, H., Eds.; Dekker: New York, 2001; p 145. (b) Komiyama, M. In *Metal Ions in Biological Systems, Vol. 38: Probing of Proteins by Metal Ions and Their Low-Molecular Weight Complexes*; Sigel, A., Sigel, H., Eds.; Dekker: New York, 2001; p 25. (c) Polzin, G. M.; Burstyn, J. N. In *Metal Ions in Biological Systems, Vol. 38: Probing of Proteins by Metal Ions and Their Low-Molecular Weight Complexes*; Sigel, A., Sigel, H., Eds.; Dekker: New York, 2001; p 103.

(3) (a) Hegg, E. L.; Burstyn, J. N. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *173*, 133. (b) Krämer, R. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *182*, 243

(4) (a) Rana, T. M.; Meares, C. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 10578. (b) Rana, T. M.; Meares, C. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2457. (c) Rana, T. M.; Meares, C. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1859.

(5) Datwyler, S. A.; Meares, C. F. In *Metal Ions in Biological Systems, Vol. 38: Probing of Proteins by Metal Ions and Their Low-Molecular Weight Complexes*; Sigel, A., Sigel, H., Eds.; Dekker: New York, 2001; p 213.

(6) Jencks, W. P.; Gilchrist, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2622.

(7) Behrman, E. J.; Biella, M. J.; Braas, H. J.; Edwards, J. O.; Isaks, M. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 3069.

(8) Mejía-Radillo, Y.; Yatsimirsky, A. K.; Foroudian, H. J.; Jillit, N.; Bunton C. A. *J. Phys. Org. Chem.* **2000**, *13*, 505.

(9) Wiberg, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 2519. See also: Klopman, G.; Tsuda, K.; Louis, J. B.; Davis, R. E. *Tetrahedron* **1970**, *26*, 4549.

Kinetics of the cleavage reactions were followed by ^1H NMR at 37°C in D_2O containing 0.3–3% of H_2O introduced with H_2O_2 solution. Typically, 0.02–0.05 M solutions of amides or peptides, 0.1–0.5 M NaOD, and 0.1–1.0 M H_2O_2 were employed.

Figure 1 illustrates a typical kinetic experiment with GlyGly as a substrate. The signal at 3.0 ppm belongs to the

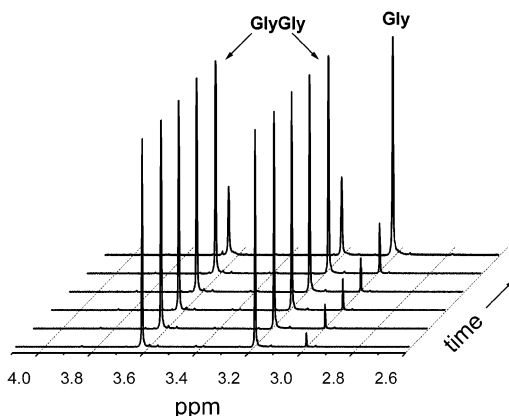


Figure 1. ^1H NMR spectra of 0.04 M GlyGly in D_2O in the presence of 0.5 M NaOD and 0.1 M H_2O_2 recorded after 13, 26, 38, 50, and 60 min and ca. 10 h at 37°C .

glycinate anion, and its intensity grows with increase in the incubation time. In this and other experiments, only signals of the substrate and of the hydrolysis product(s) were observed. Apparently, the peroxy acids expected as primary reaction products are either too unstable under the reaction conditions or give the NMR signals indistinguishable with those of respective acids. The cleavage reactions were followed up to ca. 10–20% substrate conversion, and the initial rates were calculated from the plots of the product concentration obtained by the integration of signals vs the incubation time. The observed first-order rate constants (k_{obs}) were then calculated by dividing the initial rates by the initial substrate concentration.

Figure 2 shows the effect of added H_2O_2 on the rate of acetamide cleavage in the presence of 0.1 M NaOD (solid triangles) and the effect of added NaOD at a constant 0.2 M H_2O_2 (open triangles). Mixing of H_2O_2 with NaOH leads to a nearly quantitative deprotonation of H_2O_2 . Therefore, an increase in k_{obs} on addition of H_2O_2 means that HO_2^- is a stronger nucleophile than OH^- . Additions of higher concentrations of H_2O_2 when it already is in excess over NaOH does not produce more HO_2^- anions, but the reaction rate is obviously going higher, thus indicating that the reaction with HO_2^- is catalyzed by neutral H_2O_2 . On the other hand, additions of increasing amounts of NaOD in the presence of a fixed concentration of H_2O_2 in excess of the latter also lead to a significant acceleration, indicating that the reaction with HO_2^- is catalyzed also by OH^- .

To analyze the results quantitatively we determined the equilibrium constant K for the reaction 1 at 37°C by

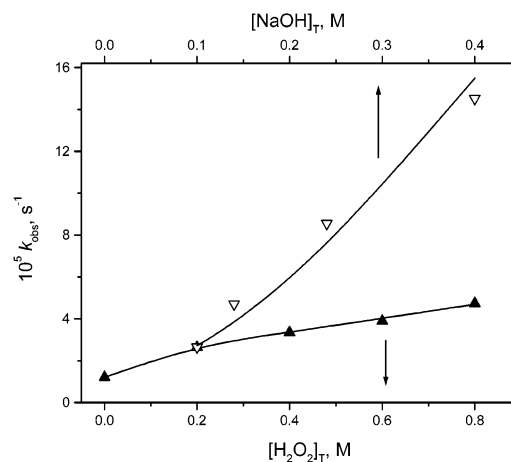
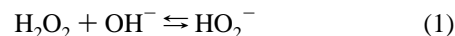


Figure 2. Observed first-order rate constants for the cleavage of 0.04 M AcNH_2 vs total H_2O_2 concentration in the presence of 0.1 M NaOD (lower axis) and vs total NaOD concentration in the presence of 0.2 M H_2O_2 (upper axis) at 37°C . Solid lines are theoretical profiles calculated in accordance with eq 2 and rate constants given in Table 1.

spectrophotometric titration of H_2O_2 with NaOD in D_2O as described in ref 8. The value of $K = 276 \pm 2 \text{ M}^{-1}$ in D_2O agrees well with those reported in the literature for aqueous solutions^{8,10} and indicates a small positive solvent isotope effect of ca. 1.5.



With this equilibrium constant, concentrations of free OH^- , HO_2^- , and H_2O_2 at each given mixture of known total NaOH and H_2O_2 concentrations were calculated, and the results in Figure 2 were analyzed in terms of the following kinetic equation

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] + k_{\text{HO}_2}[\text{HO}_2^-] + k_{\text{GA}}[\text{HO}_2^-][\text{H}_2\text{O}_2] + k_{\text{GB}}^{\text{OH}}[\text{HO}_2^-][\text{OH}^-] \quad (2)$$

where k_{OH} and k_{HO_2} are the second-order rate constants for the cleavage of the substrate by OH^- and HO_2^- respectively, k_{GA} and $k_{\text{GB}}^{\text{OH}}$ are the third-order rate constants for the cleavage by HO_2^- assisted by general-acid and general-base mechanisms, respectively. The k_{OH} was measured in the absence of H_2O_2 and appeared to be very close to the value reported in the literature in H_2O .¹¹ Then the values of k_{obs} were corrected for the contribution of the alkaline hydrolysis and the eq 2 was rearranged as follows:

$$(k_{\text{obs}} - k_{\text{OH}}[\text{OH}^-]) / [\text{HO}_2^-] = k_{2\text{obs}} = k_{\text{HO}_2} + k_{\text{GA}}[\text{H}_2\text{O}_2] + k_{\text{GB}}^{\text{OH}}[\text{OH}^-] \quad (3)$$

Parameters of the eq 3 were then calculated by multiple regression of $k_{2\text{obs}}$ as a linear function of two independent

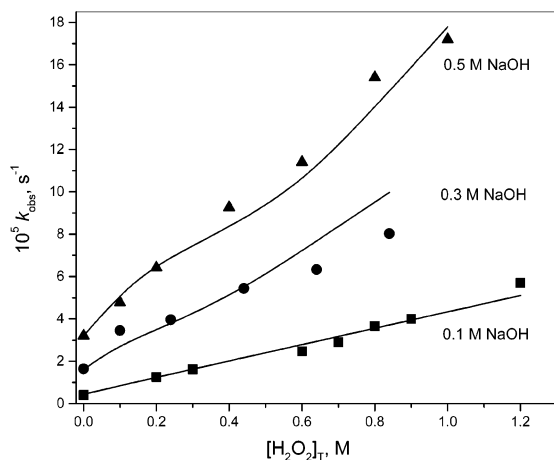
Table 1. Rate Constants for Different Paths of the Amide and Peptide Cleavage by Alkaline Hydrogen Peroxide at 37 °C^a

substrate	$k_{\text{OH}}, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$k_{\text{HO}_2}, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$k_{\text{GA}}, \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$	$k_{\text{GB}}^{\text{OH}}, \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$	$k_{\text{GB}}^{\text{HO}_2}, \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$
AcNH ₂	1.2×10^{-4}	2.4×10^{-4}	3.4×10^{-4}	2.1×10^{-3}	
GlyGly	3.8×10^{-5}	6.8×10^{-5}	3.9×10^{-4}	4.8×10^{-4}	1.9×10^{-4}

^a Relative error $\pm 10\%$.

variables [H₂O₂] and [OH⁻]. The resulting rate constants are given in Table 1.

The cleavage of a simplest peptide substrate GlyGly was studied in more details. Figure 3 shows the results obtained

**Figure 3.** Observed first-order rate constants for the cleavage of 0.04 M GlyGly vs total H₂O₂ concentration in the presence of 0.1, 0.3, and 0.5 M NaOD at 37 °C. Solid lines are theoretical profiles calculated in accordance with eqs 4 and 5 and rate constants given in Table 1.

by variations in total hydrogen peroxide concentration in the presence of three different fixed total sodium hydroxide concentrations. General tendencies are similar to those for acetamide, but the reaction kinetics is more complicated in this case. Under conditions employed, GlyGly is a mono-anion and is ca. 1 order of magnitude less reactive than acetamide.

The rate of the alkaline hydrolysis of GlyGly was not a linear function of [OD⁻]: the second-order rate constant k_{OH} increased on increase in [OD⁻] in accordance with the empirical eq 4

$$k_{\text{OH}} = k_{\text{OH}}^1 + k_{\text{OH}}^2[\text{OD}^-] \quad (4)$$

where $k_{\text{OH}}^1 = 3.8 \times 10^{-5} \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $k_{\text{OH}}^2 = 5.1 \times 10^{-5} \text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$. This may be partially due to a positive salt effect produced by increased concentration of NaOD on the reaction

between two anions, but most probably reflects the general-base catalysis by the second hydroxide anion reported previously for the hydrolysis of anilides.^{12,13} The analysis of the results in terms of the eq 3 required also an additional term proportional to the concentration of free HO₂⁻, so the results were fitted to the eq 5.

$$k_{2\text{obs}} = k_{\text{HO}_2} + k_{\text{GA}}[\text{H}_2\text{O}_2] + k_{\text{GB}}^{\text{OH}}[\text{OH}^-] + k_{\text{GB}}^{\text{HO}_2}[\text{HO}_2^-] \quad (5)$$

The numerical values of all rate constants for the cleavage of GlyGly are given in Table 1. Lower values of these constants, as compared to those for the cleavage of acetamide, can be attributed to steric effects and the negative charge of the peptide. The latter explains the decreased relative contribution of the general-base-catalyzed path, which involves an additional anionic species in comparison with the general-acid path involving neutral hydrogen peroxide.

Several other glycine derivatives were studied as substrates under similar conditions for comparative purposes. The results are collected in Table 2. As expected, glycinamide

Table 2. Selected First-Order Rate Constants for the Amide and Peptide Cleavage by Alkaline Hydrogen Peroxide at 37 °C^a

substrate	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$	[NaOD] _T , M	[H ₂ O ₂] _T , M
AcNH ₂	3.9×10^{-5}	0.1	0.6
GlyNH ₂	2.5×10^{-4}	0.1	0.6
<i>N</i> -AcGly	1.9×10^{-5}	0.3	0.8
<i>N</i> -AcGlyNH ₂ ^a	4.4×10^{-4}	0.3	0.6
GlyGly	8.0×10^{-5}	0.3	0.8
GlyGlyGlyGly ^b	6.3×10^{-5}	0.3	0.7
GlyGlyAla ^c	4.7×10^{-5}	0.3	0.6

^a Cleavage to *N*-AcGly and NH₃. ^b Cleavage to Gly and GlyGlyGly. ^c Cleavage to Gly and GlyAla.

and *N*-acetylglycine are more and less reactive than acetamide, respectively, due to a positive inductive effect of the α -amino group for the former and the negative charge for the latter. In agreement with this, the hydrolysis of *N*-acetylglycinamide proceeds with formation of *N*-acetylglycine and NH₃. The cleavage of GlyGly is faster than that of *N*-acetylglycine due to the presence of α -amino group.

To see the exo/endo selectivity of the peptide cleavage a tetra- and a tripeptide substrates were employed. In the case

(10) McIsaac, J. E., Jr.; Subbaraman, L. R.; Subbaraman, J.; Mulhausen, H. A.; Behrman, E. J. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 1037.(11) Packer, J.; Thomson, A. L.; Vaughan, J. J. *Chem. Soc.* **1955**, 2601.(12) Beichler, S. S.; Taft, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4927.(13) Bender, M. L.; Thomas, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 4183.

of tetraglycine during first 2 h only formation of Gly and GlyGlyGly was observed with the rate constant similar to that for the GlyGly cleavage (Table 2). Only after accumulation of ca. 25% of GlyGlyGly did the appearance of GlyGly become detectable. These results clearly indicate the cleavage of one of the terminal peptide bonds. To distinguish between N- and C-terminal bonds, a tripeptide with different terminal amino acids GlyGlyAla was used. Only the cleavage of Gly-Gly bond was observed with the rate constant again similar to that for GlyGly (Table 2). Thus, the preferable reaction path is the cleavage of N-terminal peptide bond.

There is a certain similarity in the kinetics of peptide cleavage by HO_2^- and by NH_2OH . Studies of the hydroxylaminolysis of similar substrates showed the same reaction paths as indicated in the eq 5, the only difference being that for NH_2OH the general-acid path was always strongly predominant over other reaction paths.¹⁴ This is explicable by much the higher acidity of NH_3OH^+ ($\text{p}K_a = 6.0$) as compared to H_2O_2 ($\text{p}K_a = 11.5$), which makes the former a more powerful catalyst. On the other hand, the absolute reactivity of HO_2^- assisted by H_2O_2 is substantially higher than that of NH_2OH assisted by NH_3OH^+ : the third-order rate constant for the latter with GlyGly anion equals $2.9 \times 10^{-4} \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$ at 60°C ¹⁴ while for the former $k_{\text{GA}} = 3.9 \times 10^{-4}$ at 37°C (Table 1).

No rate constants were reported for the iron chelate mediated protein cleavage, but since the reaction is typically complete in 10 s^4 one may expect the k_{obs} value to be about 1 s^{-1} . In accordance with the proposed mechanism (see Introduction) this rate constant refers to the intramolecular attack (k_{intra}) of the peptide bond by metal-bound HO_2^- . Therefore, one may estimate the "effective molarity" (EM)¹⁵

(14) Gómez-Reyes, B.; Yatsimirsky, A. K. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 866.

of the system by using the $k_{\text{HO}_2^-}$ value for GlyGly as the rate constant for the intermolecular reaction (k_{inter}) and to obtain $\text{EM} = k_{\text{intra}}/k_{\text{inter}} = 1/(6.8 \times 10^{-5}) = 1.4 \times 10^4 \text{ M}$, a value which is within the range typical for nucleophilic substitution reactions.¹⁵ Thus, the results presented here indirectly confirm the validity of the hydrolytic mechanism proposed for the iron chelate mediated protein cleavage.

The HO_2^- anion shows a modest α -effect in the cleavage of amide and peptide substrates: the ratio $k_{\text{HO}_2^-}/k_{\text{OH}^-}$ equals ca. 2 for AcNH_2 and GlyGly (Table 1). Since the rate-determining step in the amide hydrolysis is the decomposition of the tetrahedral addition intermediate to final products, this ratio should be closer to the "equilibrium" α -effect observed for nucleophile addition to carbonyl compounds¹⁶ rather than to the "kinetic" α -effect observed for the cleavage of substrates with good leaving groups. In the case of hydrogen peroxide both types of effects are similar and are of the order of 10^2 – 10^3 .¹⁶ However, for substrates with poor highly basic leaving groups, e.g., with ethyl acetate, the low basicity of HO_2^- makes it unreactive because the tetrahedral intermediate decomposes principally to the starting materials. Apparently the protonation of the leaving RNH^- anion, postulated as a necessary step in the amide hydrolysis,^{13,17} reduces its basicity sufficiently and makes possible the partition of the tetrahedral intermediate toward the reaction products rather than to starting materials.

Acknowledgment. We authors are grateful to the DGAPA-UNAM (Project IN 208901) for financial support.

OL035811X

(15) Kirby, A. J. *Adv. Phys. Org. Chem.* **1980**, *17*, 183.

(16) Sander, E. G.; Jencks, W. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6154.

(17) Jencks W. P. *Catalysis in Chemistry and Enzymology*; McGraw-Hill: New York, 1969.