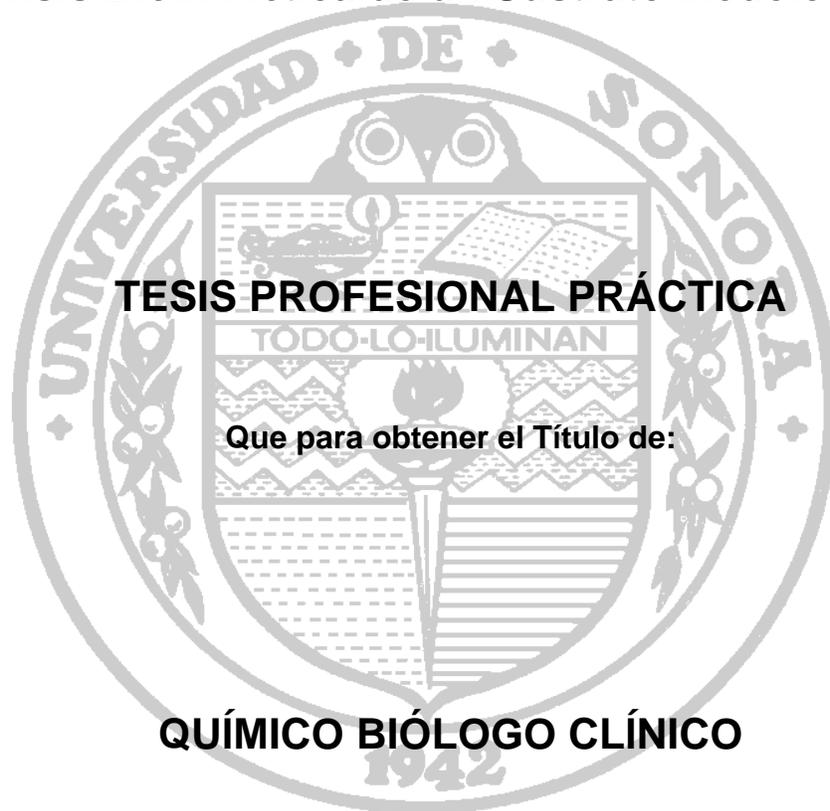


# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**Efecto del Disolvente en Mezclas Etanol-Agua para la  
Hidrólisis Biomimética de un Sustrato Modelo del ARN**



Presenta:

**Andya Jhosephin Ramírez Irigoyen**

Hermosillo, Sonora

Septiembre de 2017

# Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

**FORMA DE APROBACIÓN**

Los miembros designados para revisar la Tesis Profesional de Andya Jhosephin Ramírez Irigoyen, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

Dr. David Octavio Corona Martínez  
Presidente

Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz  
Secretario

Dra. Rosa Marina Arvayo Ortiz  
Vocal

M en C Oralia Orduño Fragoza  
Suplente

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. David Corona Martínez, por su gran cooperación, dedicación y profesionalismo durante la realización de este proyecto. Un especial agradecimiento por su paciencia, comprensión y gran calidad humana que siempre demostró en los momentos de incertidumbre, se ha vuelto para mí un gran ejemplo de lo que un tutor y amante de la enseñanza debe ser.

A mis sinodales, Dr. Juan Carlos Gálvez, Dra. Rosa María Arvayo Ortiz, M. en C. Oralia Orduño Fragoza, por la revisión y contribución a esta tesis. Al igual que por su gran apoyo y comprensión.

A la Dra. Karen Lillian Ochoa Lara por la facilitación de las instalaciones del laboratorio de química supramolecular.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, quienes han sido la guía y el camino, que me han dado las herramientas y la confianza para labrar mi futuro. Por su dedicación y palabras de aliento, que nunca bajaron los brazos para que yo tampoco lo hiciera aun en los momentos de adversidad. Fiel ejemplo de lucha y compromiso.

A mis familiares y amigos por su apoyo incondicional y motivación constante.

## CONTENIDO

	Página
FORMA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIA	4
CONTENIDO	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	9
OBJETIVOS	10
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
ANTECEDENTES	14
Funcionamiento e Importancia de las Enzimas	14
Biomimética	15
Ribozimas	15
Ribonucleasas	17
Efectos del disolvente	19
Efecto del disolvente en la rapidez de las reacciones	19
Efecto del disolvente sobre el pKa	20
Catálisis ácido-base general	21
Catálisis ácido-base general en la hidrólisis de enlaces P–O	23
Importancia del guanidinio en la ruptura de los enlaces P–O	24
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Reactivos	27
Disolventes	27
Programas	28
Equipo	28
Estudios cinéticos	28
Perfil de concentración	29
Perfil de neutralización	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32

Efecto de la hidrólisis básica específica	32
Efecto de la concentración total del amortiguador	36
Efecto del grado de neutralización del amortiguador	38
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Rupturas de los enlaces P–O	17
2	Mecanismo de acción de la ribonucleasa A.	19
3	Molécula de Guanidina.	23
4	Estructuras de resonancia de la guanidina	24
5	Estructura del guanidinio.	26
6	Patrón de unión más común en la interacción de un grupo guanidinio con un fosfodiéster.	26
7	Hidrólisis del HpNPP.	30
8	Perfiles posibles de la variación de las constantes de rapidez en función de la concentración del catalizador.	31
9	Perfil de neutralización de una catálisis bifuncional.	32
10	Perfil de variación de las constantes de rapidez básica específica en función del porcentaje de etanol.	34
11	Perfiles de dependencia de las constantes de la catálisis básica específica en función de la permitividad dieléctrica.	35
12	Perfil de relación de Brønsted para la catálisis básica específica en función del pK <sub>w</sub> del medio.	36
13	Perfil de dependencia de la catálisis básica específica en función del contenido de etanol en la mezcla binaria de disolvente.	36
14	Perfiles de concentración en la catálisis del HpNPP con guanidina a 37°C en las mezclas de etanol-agua	38
15	Perfiles de variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio del 20-80 % de etanol.	41
16	Perfil de la variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio del 20-60 % de etanol corregido.	43
17	Perfil de la variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio del 70-80 % de etanol corregido.	43
18	Análisis en 30% de etanol del perfil de neutralización corregido.	44

19	Ejemplo del análisis del perfil de neutralización corregido en la mezcla de 70% de etanol.	45
20	Dependencia de los valores de $k_1$ (a) y $k_2$ (b) en función de la fracción molar de etanol.	47
21	Relación de las constantes $k_1$ (a) y $k_2$ (b) con el parámetro $E_T(30)$ .	47
22	Relación entre las constantes de la catálisis básica bifuncional y la permitividad dieléctrica.	49
23	Mecanismos propuestos para la catálisis con guanidina. a) Catálisis básica general. b) Catálisis bifuncional con asistencia electrofílica.	51

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Reactivos utilizados y sus propiedades.	27
2	Constantes de rapidez para la hidrólisis básica específica a 37°C en las mezclas etanol-agua.	33
3	Relación de valores obtenidos para las constantes de rapidez en función de la concentración del amortiguador de acuerdo al porcentaje de etanol en agua.	37
4	Dependencia de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio en la transesterificación del HpNPP a 37°C en función del porcentaje de etanol en agua.	39
5	Dependencia de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio en la transesterificación del HpNPP a 37°C en función del porcentaje de etanol.	45

## **OBJETIVO**

### **General**

Evaluar el efecto de las mezclas de etanol-agua en la reacción de transesterificación del sustrato modelo del ARN, 2-hidroxiopropil-p-nitrofenilfosfato (HpNPP), con guanidina, para determinar la(s) mezcla(s) en el cual se lleva a cabo una catálisis bifuncional

### **Específicos**

Determinar las constantes de rapidez de la catálisis con guanidina en la ruptura del HpNPP a diferentes concentraciones de etanol acuoso (20-80% v/v), con la variación de la concentración del catalizador y su neutralización.

Determinar las constantes de rapidez de la catálisis básica específica ( $\text{OH}^-$ ) del HpNPP a diferentes concentraciones de etanol acuoso (20-80% v/v).

Obtener la ley de rapidez en las mezclas estudiadas y proponer un mecanismo posible para la ruptura del HPNPP.

Determinar la(s) mezcla(s) donde el mecanismo sea bifuncional y se pueda mimetizar el mecanismo enzimático.

## RESUMEN

En el presente trabajo se muestra el estudio cinético de la reacción de transesterificación del sustrato modelo del ARN, el 2-hidroxiopropil *p*-nitrofenilfosfato. Los experimentos se hicieron en mezclas de etanol con agua en diferentes proporciones volumen/volumen (desde 10% hasta 80% de etanol) a 37°C en presencia del amortiguador guanidina-guanidinio. Para determinar el mecanismo de reacción se hicieron perfiles de la variación de la constante de rapidez observada con la concentración total del amortiguador (50% neutralizado), el grado de neutralización (con concentración constante) y además un perfil de catálisis básica específica con hidróxido de tetrametilamonio. De los perfiles de la variación de la constante de rapidez de la reacción con la concentración del amortiguador y el grado de neutralización, se obtuvo la siguiente ecuación de rapidez:  $k_{obs} = k_1[Gu] + k_2[Gu][HGu^+] + k_{OH}[OH^-]$ , donde la permitividad del medio y el efecto del medio sobre el pKw y pKa de la mezcla permiten que predomine alguna ruta. De la ecuación de la velocidad se concluye que hay tres rutas catalíticas posibles en la reacción de ruptura del HpNPP en el medio estudiado: una implica una catálisis básica general con constante de velocidad  $k_1$ . La catálisis por guanidina libre no presenta un efecto de disolvente y está presente en todos los porcentajes de manera constante. En el caso de la ruptura por iones  $OH^-$  esta se da en mayores valores de permitividad dieléctrica, lo que es consistente con el hecho de que no predomine en altos porcentajes de etanol. La ruta de la catálisis bifuncional, donde participan ambas especies del catalizador: guanidina como base y el guanidinio en su forma ácida, este último activa de manera electrostática al grupo fosfato, predomina a menores permitividades dieléctricas y donde la diferencia de pKw-pKa del catalizador sea mayor a 5. Esta ruta, puede considerarse como imitación del mecanismo enzimático de la ARNasa y en este trabajo se encontró en las mezclas de etanol con agua con mayor proporción del disolvente orgánico (de 50 a 80%) predomina esta ruta catalítica.

## INTRODUCCIÓN

Las enzimas son moléculas notablemente sofisticadas que catalizan reacciones esenciales para la vida, que de otro modo no podrían ocurrir. Después de la elucidación estructural, se ha podido entender cómo operan a un nivel molecular. La mayoría no se han caracterizado y sus mecanismos químicos siguen siendo un enigma. Lo que todos tienen en común es un complejo sitio de unión que cambia para acomodar huéspedes moleculares y transformarlos en valiosos productos químicos. Cuando se conoce alguna información estructural, es posible imitar la actividad de la enzima mediante el diseño cuidadoso de un análogo artificial (Cragg, 2010).

Una de las características más notables de la química de los organismos vivos es el desarrollo evolutivo de los ésteres de fosfato, por un lado, para proporcionar el esqueleto extremadamente estable para los biopolímeros que codifican la información genética, el ARN y luego el ADN. Por otra parte, para la regulación temporal de proteínas que está en gran parte bajo el control de quinasas y fosfatasas, y una vez más para la generación, distribución y aplicación de energía libre a través de la célula mediante la manipulación de anhídridos de ácido fosfórico y sus ésteres (Bowler y col., 2010).

La solución a la paradoja entre la notable estabilidad química de monoésteres y diésteres de fosfato y su fácil manipulación se encuentra en el poder catalítico de las enzimas para romper los enlaces P–O–C y P–O–P rápidamente. Esto da algunas de las mayores aceleraciones de velocidad enzimática registradas. La base química de esa catálisis está en el corazón de la selección natural de ésteres y anhídridos de fosfato para funciones centrales ubicuas en biología (Bowler y col., 2010).

Los diésteres de fosfato forman parte de la estructura del ADN y el ARN; desde el punto de vista de la biotecnología, un paso clave para manipular el material genético es la hidrólisis eficiente y selectiva de estas moléculas. Los triésteres de fosfato son en su mayoría tóxicos y se han utilizado en la elaboración de pesticidas y armas químicas a lo largo de la historia, por lo que existe un especial interés ambiental en el tratamiento y desactivación de estos compuestos mediante su hidrólisis, para eliminar grandes cantidades almacenadas de ellos y evitar que se formen subproductos tóxicos (Shneider y Yatsimirsky, 2003).

Existen dos caminos principales por los cuales la hidrólisis de los ésteres de fosfato se lleva a cabo. Uno es mediante el uso de iones metálicos como cofactores en el interior de las enzimas y el otro mediante una catálisis del tipo ácido-base general (Hollfelder y col., 2007). La relevancia en la comprensión del mecanismo de la hidrólisis de los ésteres de fosfato radica en

que proveerá una base sólida para el diseño racional de fosfodiesterasas artificiales más eficientes que puedan funcionar como agentes terapéuticos y tener otros usos potenciales (Nome y col., 2008).

Hasta ahora, se conoce que la gran eficiencia de las enzimas se debe a la cooperación entre los grupos funcionales de sus sitios activos y se cree que un factor importante que contribuye a la eficiencia de la catálisis enzimática es la deshidratación parcial del sustrato y del sitio activo debido al microambiente creado por la presencia de grupos laterales hidrofóbicos de los aminoácidos. Se conoce de informes científicos que la transesterificación catalítica de ésteres de fosfato transcurre más rápido en disolventes orgánicos que en agua (Kirby y varvoglis, 1967). Sin embargo, es poco lo que se conoce del efecto que tienen las mezclas de disolventes orgánicos con agua sobre la hidrólisis de fosfodiesteres, y aún menos del mecanismo por el cual se lleva a cabo esta transesterificación en dicho tipo de mezclas y aunado la ausencia de metales.

Debido a esto en el presente trabajo se estudió de manera sistemática la reacción de transesterificación de un sustrato modelo del ARN en ausencia de metales, mediante el uso de un amortiguador de pH, con el fin de conocer el efecto de la mezcla etanol-agua sobre el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo dicha reacción.

## ANTECEDENTES

### Funcionamiento e Importancia de las Enzimas

Dentro de las células ocurre un gran número de reacciones químicas que proveen a éstas de energía y de los componentes necesarios para su mantenimiento y supervivencia, sin los cuales muy difícilmente se podría concebir la vida. Muchas de las reacciones necesarias que se llevan a cabo tienen una rapidez de reacción muy baja por lo que tardarían mucho tiempo o inclusive algunas no ocurrirían. Es por ello la imperativa necesidad de la presencia de catalizadores que potencien la velocidad en que estas se realizan.

Las enzimas son biocatalizadores, específicos, potentes y muy eficientes. Las enzimas brindan estabilización y selectividad biológica a lo largo de la reacción y funcionan disminuyendo la energía de activación ( $\Delta^\ddagger G$ ). Lo anterior se traduce en una aceleración de la rapidez de reacción, (en general aceleran las reacciones en un orden de  $10^{12}$  veces más rápido). De este modo hacen posible la coexistencia de un gran número de reacciones químicas en el interior de las células. (Grisham y Garret, 1999)

Las enzimas poseen ciertas características primordiales en las que se encuentra basada su actividad: aceleran en varios órdenes de magnitud con relación a la reacción no catalizada. No cambian la constante de equilibrio de una reacción química, no presentan modificación al final de la reacción y poseen un alto grado de especificidad para con su sustrato (Bender y Brubacher, 1977). La causa de que las enzimas "reconozcan" de manera muy específica a su sustrato reside en la estructura y la conformación del centro activo de la enzima. Es decir, las enzimas poseen una estructura tridimensional bien definida. Si ésta se modifica, la capacidad catalítica puede verse comprometida ya que gran parte de su actividad incluye la interacción con el sustrato, por tal motivo sus características estructurales y conformacionales deben ser complementarias a las del sustrato (Illanes, 2008).

Las enzimas también participan en muchos mecanismos de regulación y de este modo permiten que el metabolismo se adapte a diferentes situaciones. En la gran mayoría de los casos las enzimas son de naturaleza proteica, pero también se conocen ácidos nucleicos catalíticamente activos llamados como "ribozimas" (Peretó y col, 2007).

## **Biomimética**

La biomimética estudia los modelos, sistemas y elementos de la naturaleza con el fin de imitarlos en sistemas sintéticos. Los estudios biomiméticos han tomado gran relevancia los últimos años, en especial los modelos enzimáticos para la comprensión y generación de enzimas artificiales. Uno de los objetivos de este campo es el desarrollar catalizadores que puedan ser activados y modulados durante el proceso catalítico (Dong y col., 2012; Kirby 1996). Lo anterior no solo ayudaría a que las reacciones se llevaran a cabo en sistemas artificiales, sino que también bajo condiciones más seguras y controladas. En el caso de las enzimas, las interacciones no covalentes juegan un papel fundamental en particular en el confinamiento del sustrato en el sitio activo, en la creación de un sitio hidrofóbico interno en agua, en las propiedades de autoreplicación y también en los sitios alostéricos (Raynal y col., 2014).

El diseño de catalizadores artificiales capaces de competir con algunas enzimas es un tema de intensa investigación. Entre algunas de las funciones características de un modelo enzimático están las siguientes: tener actividad catalítica que se asemeje a la actividad de la enzima o que muestre actividad sobre los sustratos de la enzima en cuestión y/o mostrar un alto grado de reconocimiento estructural y quiral de los sustratos. Un sistema artificial debe contar con una masa molar menor de 2000 Da, estabilidad a la manipulación en temperaturas elevadas, solubilidad en una gama de disolventes y pocos centros quirales (Salvio y col., 2010; Raynal y col., 2014).

La habilidad que tienen las enzimas para acelerar las reacciones se puede entender en términos de interacciones más fuertes entre el estado de transición con el sitio activo de la enzima. Dichas interacciones son del tipo electrostáticas o de enlaces de hidrógeno y además contribuyen a la liberación de moléculas de agua del centro activo de la enzima al medio (Abe y col., 2012; Gomez-Tagle, 2006, Hong y Suh, 2000). El cambio de solvatación del sustrato al entrar al sitio activo de la enzima repercute del mismo modo que la variación de la permitividad dieléctrica del medio al aumentar la rapidez de las reacciones. Es por ello, que una forma de mimetizar la acción enzimática puede ser variar la proporción de disolventes orgánicos acuosos con el fin de cambiar la permitividad dieléctrica del medio (Bruice y Benkovic, 2000).

## **Ribozimas**

No todas las enzimas son proteínas a diferencia de lo que se pensaba algunas décadas atrás, lo que contribuyó al esclarecimiento de esto fue el descubrimiento de RNAs con actividad catalítica

en los años 80 por Thomas Cech y Sidney Altman (de manera independiente cada uno). El término que se acuñó para este tipo de RNA que funge como catalizador fue de "ribozima" (proviene de la unión de dos palabras en inglés "Ribonucleic acid" y "enzyme") (Dobey, 2014).

Se han identificado siete clases de RNA catalítico de origen natural hasta la fecha, las cuales catalizan la escisión o la unión de la cadena principal de ARN por transesterificación o hidrólisis de grupos fosfato (Figura 1). Las ribozimas de tipo cabeza de martillo, virus de la hepatitis D (HDV), horquilla, y Satélite Neuroespora Varkud son pequeños RNAs de 50-150 nucleótidos que realizan la autodivisión específica del sitio (Doherty y Doudna, 2001). Estas reacciones son explotadas para el procesamiento de intermediarios de replicación y en el control de expresión de genes por la ruptura de metabolitos del ARN. Notablemente las enzimas nucleolíticas y los intrones de autoensamble llevan a cabo reacciones de transesterificación. La ARNasa P cataliza reacciones de hidrólisis del enlace fosforo-oxígeno necesarias para procesar las moléculas del RNAt (Lilley y Eckstein, 2008).

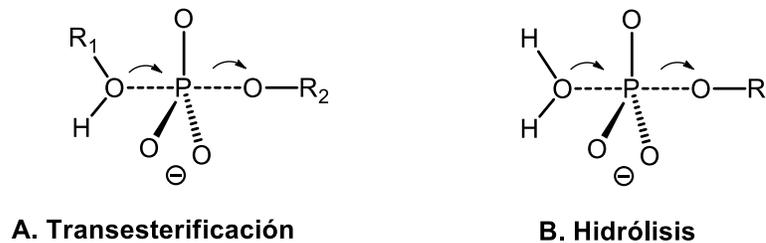


Figura 1. Rupturas de los enlaces P–O mediante: a) transesterificación y b) Hidrólisis.

Podemos dividirlos con base en las diferencias de la naturaleza de la reacción de hidrólisis que realizan, en ribozimas grandes y ribozimas pequeñas. Estas últimas requieren de nucleófilos internos mientras las ribozimas grandes requieren de nucleófilos externos para llevar a cabo la reacción (Bevilacqua y Yajima, 2006). De acuerdo con la estructura cristalina, determinada por estudios cristalográficos, y función de las ribozimas es como se ha obtenido información de los mecanismos de acción de las mismas. Estos estudios han evidenciado que las bases nitrogenadas del RNA juegan un papel importante en la reacción hidrolítica. Como se ha indicado en estudios previos, dos de las bases implicadas en la catálisis de la Hairpin ribozima son la Guanina-8 y la adenina-38 (Lilley y Eckstein, 2008).

El mecanismo general de estas ribozimas es similar a la de muchas ribonucleasas proteicas, en la que un nucleófilo de 2'oxígeno ataca el fosfato adyacente en la cadena principal

de ARN, dando como resultado productos de escisión con 2',3'-fosfato cíclico y terminales 5'hidroxilo. Las ribozimas rompen solamente en un lugar específico, a diferencia de las ribonucleasas proteicas, lo que logran mediante el apareamiento de bases y las interacciones terciarias para ayudar a alinear el sitio de ruptura dentro del núcleo catalítico. El mantenimiento evolutivo de estas secuencias puede ser debido a su especificidad del sitio y a la simplicidad y eficiencia de la auto-división del genoma (Doherty y Doudna, 2001).

### **Ribonucleasas**

Las ribonucleasas (ARNasas) son enzimas que catalizan la hidrólisis de moléculas de ARN (endonucleasas o exonucleasas). Estas enzimas han despertado un genuino interés en el estudio de los mecanismos químicos de la acción enzimática. La hidrólisis de RNA por ribonucleasas proteicas tales como la ARNasa A se produce a través de la catálisis ácido-base, en el que un grupo imidazol de histidina actúa como una base general y abstrae un protón del nucleófilo 2-hidroxilo mientras que una segunda histidina actúa como un ácido general y dona un protón al grupo saliente 5-hidroxilo (Doherty y Doudna, 2001).

La ARNasa A cataliza la ruptura del enlace entre el fósforo y oxígeno 5' del ARN de cadena sencilla. El sitio activo de la enzima está formado por las histidinas 12 y 119, y la lisina 41. El mecanismo de ruptura endonucleótica “en línea” de ARN de cadena simple consiste en un paso inicial de transfosforilación. La histidina 12 actúa como una base y sustrae un protón del hidroxilo 2' del sustrato, facilitando el ataque nucleófilo al átomo de fósforo. La cadena lateral de la histidina 119 actúa como un ácido y protona el oxígeno 5' facilitando su desplazamiento. El fosfodiéster cíclico 2',3' resultante se libera al medio donde será hidrolizado (Cuchillo y col., 1993). La lisina 41 contribuye a la acción catalítica del enzima estabilizando el exceso de carga negativa del oxígeno unido al grupo fosforilo en el estado de transición a través de la transferencia de un protón (Figura 2).

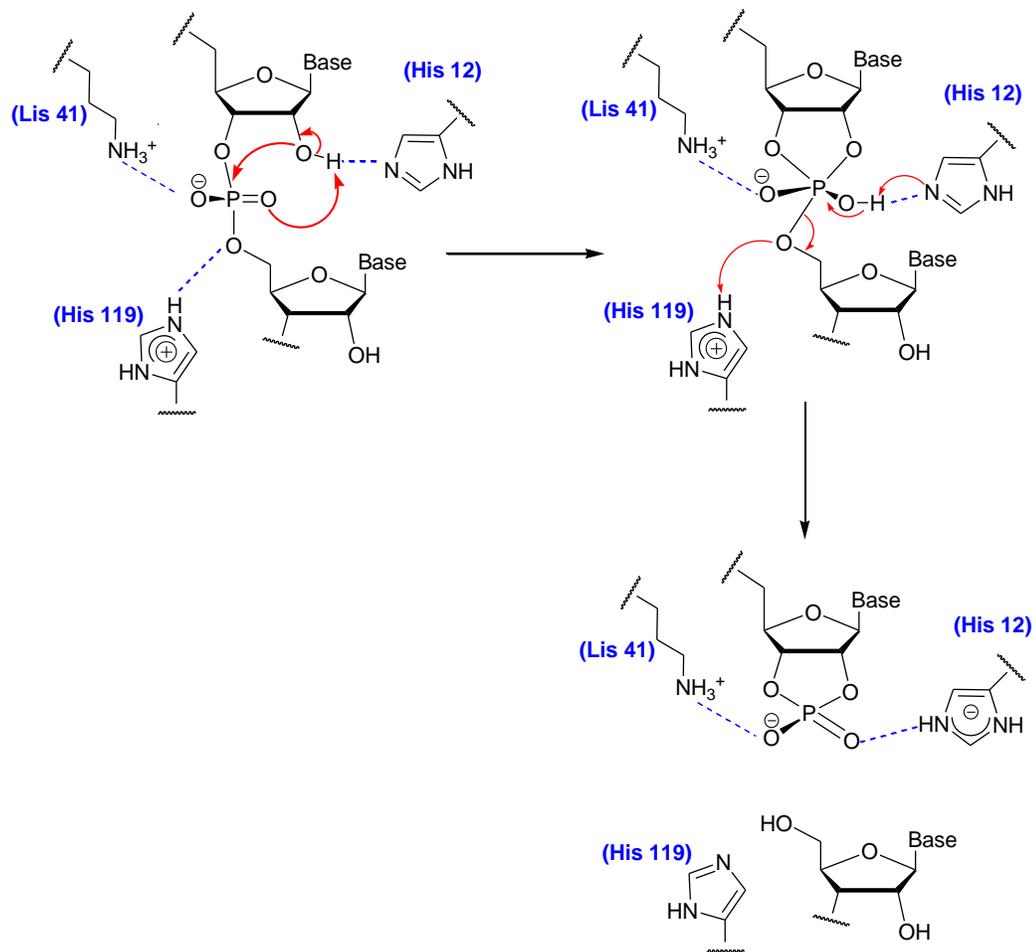


Figura. 2. Mecanismo de acción de la ribonucleasa A.

Fuente: Mecanismo adaptado de Gilliland y col. J. Am. Chem. Soc., 1998.

Es el posicionamiento preciso de estos grupos y la capacidad de la proteína para modular los valores de los  $pK_a$ s de las histidinas, los responsables de la aceleración de la velocidad de reacción en las reacciones catalizadas por la ARNasa A (Doherty y Doudna, 2001). En condiciones fisiológicas, la hidrólisis espontánea del ARN se produce con una constante de rapidez de  $10^{-7} \text{ min}^{-1}$ , lo que significa que el tiempo de vida media de la reacción sería de unos 20 años. En comparación, la ARNasa A acelera la velocidad de transfosforilación más de 12 órdenes de magnitud, resultando la vida media del ARN del orden de microsegundos (López, 2009).

## Efectos del Disolvente

### Efecto del Disolvente en la Rapidez de las Reacciones

Las reacciones químicas se pueden realizar en distintos estados de la materia como son líquido, sólido o gas, pero, por buenas razones, la mayoría de las transformaciones químicas se lleva a cabo en fase líquida es decir en disolución (Reichardt, 2007).

El efecto del disolvente comprende los efectos que un determinado disolvente tiene sobre la reactividad química. Entre estos efectos se encuentra el efecto en la rapidez y equilibrio de una reacción, debido a esto la elección de un disolvente nos puede permitir tener control sobre una reacción química (Reichardt, 2007).

La sensibilidad que presenta una reacción química a los disolventes participantes en la misma ha generado gran interés en los profesionales estudiosos de la materia durante mucho tiempo. En las últimas décadas, se han diseñado diferentes técnicas experimentales con el fin de investigar y esclarecer el rol que juegan los disolventes sobre una reacción (Audran G y col., 2012).

El disolvente en el que transcurre una reacción tiene con frecuencia un notable efecto sobre su rapidez y, desde luego, puede incluso cambiar el mecanismo de la misma. Los efectos de la variación del disolvente pueden ser de tipo electrostáticos, entre ellos: la modificación de las fuerzas derivadas de las constantes dieléctricas (constantes dieléctricas) de disolventes puros y mixtos entre partículas cargadas. Los efectos de cambiar de un tipo de disolvente a otro (de uno polar o uno menos polar), los efectos de la presión interna (cohesión) y externa del disolvente. Los efectos de la viscosidad del disolvente, los efectos de solvatación selectiva por uno de los componentes en un disolvente mixto o del diferente grado de solvatación por diferentes disolventes de los reactivos. El estado de transición y los productos, efectos de los enlaces de hidrógeno, efectos de ionización del disolvente, los efectos de solvólisis por el disolvente, y los efectos de la acidez del medio. Algunos de estos efectos están relacionados (Reichardt y Welton, 2011).

Los efectos del disolvente involucran una acción específica del mismo en la etapa de interconversión química que conduce a un cambio de mecanismo o a un mecanismo sustituto. Esto puede incluir a la catálisis de tipo ácido o base general /específica por las moléculas de disolvente. Para una reacción química que tiene diferente mecanismo por el cual lleva a cabo la reacción, un disolvente puede cambiar las probabilidades relativas entre la vía hacia cada mecanismo, pero no los mecanismos reales (Reichardt, 2007).

Las reacciones de sustitución nucleofílica son claros ejemplos de lo susceptible que puede una reacción ser al cambio de disolventes, y que éste genere a la vez, una variación en el mecanismo por el que transcurre una reacción. Un aumento de polaridad y de la capacidad para solvatar iones suele cambiar (aunque no necesariamente en todos los casos) el mecanismo de  $S_N2$  a  $S_N1$ . El paso de un disolvente polar prótico a otro polar aprótico puede provocar un cambio del mecanismo  $S_N1$  al  $S_N2$ , a través de un extraordinario aumento de eficacia del nucleófilo presente en el sistema (Sykes, 2002).

Los disolventes próticos polares favorecen los mecanismos del tipo  $S_N1$ . Esto se debe a que, en este mecanismo se desarrolla y concentra una carga eléctrica en el estado de transición en relación con los reactivos de partida. La energía requerida para llevar a cabo el proceso se hace menor a medida que crece la constante dieléctrica  $\epsilon$  del medio; el proceso también se ve facilitado al aumentar la solvatación del par iónico en desarrollo (Sykes, 2002).

En cambio, para las reacciones  $S_N2$ , un aumento de la polaridad del disolvente tiene un efecto mucho menor, se observa una fuerte variación en la velocidad de las reacciones  $S_N2$  cuando se ven efectuadas bajo disolvente polares apróticos, en lugar de polares próticos. (Sykes, 2002) Este distinto comportamiento de las reacciones  $S_N1$  y  $S_N2$  frente a los cambios de disolvente puede emplearse como herramienta de diagnóstico mecanístico.

### **Efecto del Disolvente Sobre el pKa**

El equilibrio de ionización de un ácido o una base está afectado por un cambio en el disolvente. Este efecto no sólo se debe a la acidez o basicidad, sino también a la constante dieléctrica (permitividad dieléctrica). Algo conocido es que los iones se estabilizan por los disolventes polares, ya que los dipolos electrostáticos interaccionan directamente con las cargas eléctricas de los iones y la permitividad dieléctrica disminuye la tendencia de los iones a reasociarse (Fersht, 1980). La ionización de un ácido neutro disminuye con la adición de un disolvente de baja polaridad a una solución acuosa como en la ecuación que se muestra a continuación (Cox, 2013):



La razón por la cual los ácidos neutros se ionizan menos en disolventes de menor permitividad dieléctrica se debe a que en su disociación se genera dos iones. Lo anterior no se favorece ya que el disolvente será menos eficiente en estabilizar las nuevas cargas generadas (hay que recordar que la permitividad dieléctrica es la capacidad de separar cargas). Por otra

parte, la ionización de un ácido catiónico es muy poco sensible a la polaridad del disolvente y a su permitividad dieléctrica ya que no hay variación de carga en el equilibrio, como se muestra en la ecuación siguiente (Cox, 2013):



Cualquier variación es debida a una pequeña estabilización particular de la estructura química del ácido catiónico en el disolvente (Cox, 2013).

### Catálisis Acido-Base General

No todas las enzimas contienen metales en su sitio activo. Muchas dependen de cadenas de aminoácidos colocadas estratégicamente para interactuar con el sustrato y promover la formación del estado de transición de la reacción antes de expulsar el producto, o los productos. Tal es el caso de la ribonucleasa A, la cual lleva a cabo la catálisis del ARN a través de un mecanismo ácido-base general donde un residuo de un aminoácido del sitio dona un ion hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) de la especie que lleva carga negativa en el estado de transición. Además, una base general elimina un protón ( $\text{H}^+$ ) de la especie que lleva carga positiva en el estado de transición (McKee y McKee, 2009). La ecuación empírica para la rapidez de una reacción de catálisis ácido-base general es:

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

En la ecuación anterior, HA representa a un ácido débil y B a una base débil y  $k_{\text{HA}}$ ,  $k_{\text{B}}$  son sus respectivas constantes catalíticas. Mientras que la catálisis en la cual participan los iones hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) e hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) recibe el nombre de catálisis ácido-base específica. Ambos tipos de catálisis pueden distinguirse experimentalmente por medio de la observación de la dependencia de la rapidez de la reacción con la concentración del amortiguador.

Un modo de diferenciar experimentalmente entre ambas rutas catalíticas es realizar experimentos con una serie de disoluciones amortiguadoras en la reacción catalizada. El primero puede realizarse con la variación de la concentración total del amortiguador con una proporción de neutralización fija (constante). En el otro experimento, se mantendría constante la concentración del amortiguador y se haría variar el porcentaje de neutralización. Si en el primer experimento obtenemos una gráfica de la dependencia de la constante de rapidez con la concentración del amortiguador y observamos una dependencia lineal (o no lineal en algunos casos) con una pendiente mayor que cero, estaremos hablando de una catálisis ácido-base general. En este caso, el segundo experimento ayudaría a discriminar si la dependencia es con

la base, con la forma ácida o con ambas formas del amortiguador (Jencks, 1969). No obstante, si en el primer experimento obtenemos una gráfica con pendiente de cero y en el segundo una gráfica en donde exista una dependencia de la constante de rapidez con la fracción de neutralización (que está directamente relacionada con la concentración de los iones hidronio e hidróxido) con pendiente mayor a cero, estaremos en el caso de una reacción catalizada por la ruta ácido-base específica (Corona, 2011).

La ruptura de los ésteres de fosfato es susceptible a la catálisis ácido-base general. Buscar reproducir en el laboratorio este tipo de catálisis nos lleva al uso de un amortiguador de pH, pues en el amortiguador están presentes tanto un ácido débil como su base conjugada. La mayoría de los estudios cinéticos se han realizado en amortiguadores de pH con imidazol con la finalidad de elucidar los mecanismos posibles para la catálisis de la ARNasa A, ya que en ésta los grupos imidazol de las dos cadenas laterales de histidina son parte clave en la hidrólisis (Corona, 2008).

En los últimos años, grupos de investigación se han dado a la tarea de reproducir este tipo de mecanismos catalíticos a partir de otros amortiguadores de pH. Las guanidinas han sido utilizadas como bases de elección para llevar a cabo el proceso de imitación enzimática basados en el mecanismo de la ARNasa A. El grupo guanidinio (Figura 3) está presente en el aminoácido arginina y frecuentemente se observa en la naturaleza para coordinar diferentes oxoaniones, tales como carboxilatos y fosfatos, en enzimas y anticuerpos (Salvio, 2015).

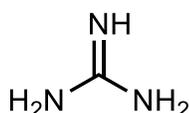


Figura 3. Molécula de Guanidina

La actividad biológica de la guanidina, su particular estabilidad termodinámica, la alta basicidad en disolución acuosa y sus aplicaciones en síntesis han sido objeto de numerosas discusiones en la literatura de las últimas tres décadas (Raczynska y col., 2003). Las guanidinas han sido reconocidas como bases orgánicas de nitrógeno muy fuertes en solución, el valor del pKa de la guanidina medido en agua es 13.6. La guanidina es una base más fuerte que otras que contienen nitrógeno, por ejemplo: piridinas, aminas, amidas y también con dos átomos de nitrógeno básicos como las diaminas. Dichas propiedades básicas de las guanidinas se han utilizado para la catálisis de diversas reacciones orgánicas (Ishikawa, 2009).

La guanidina es un caso especial de sistemas con electrones n- $\pi$  conjugados. Un grupo imino y dos nitrógenos amino se encuentran unidos al mismo átomo de carbono (Raczynska y

col., 2003). La estabilidad termodinámica de las guanidinas acíclicas y sus formas monoprotonadas se atribuyen a la estabilización por resonancia (Figura 4) (Ishikawa, 2009).

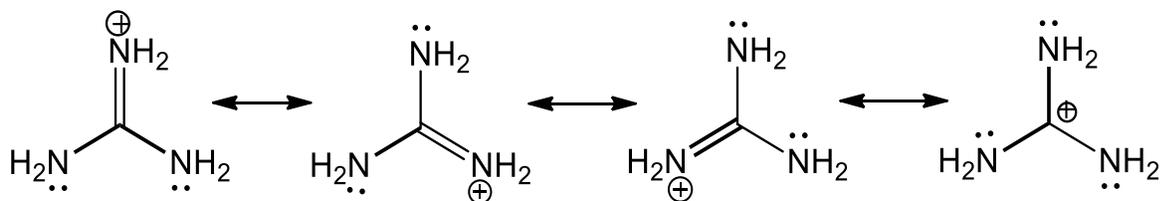


Figura 4. Estructuras de resonancia de la Guanidina.

La guanidina posee tres átomos de nitrógeno susceptibles a ser protonados. La conjugación  $n-\pi$  posible entre los nitrógenos del grupo amino y del imino incrementa la basicidad del átomo de nitrógeno imino y disminuye la basicidad del átomo de nitrógeno amino (Raczynska y col., 2003).

En estudios recientes, se ha informado de la síntesis y la actividad catalítica de compuestos con unidades de guanidina. Una investigación cinética mostró que un requisito previo es la presencia simultánea de una unidad guanidinio que actúa como activador electrofílico/electrostático y una unidad de guanidina neutra que actúa como base general (Corona y col., 2010). Por otro lado, mientras que la catálisis nucleofílica es teóricamente posible, la mayoría de los informes favorecen a una catálisis básica de Brønsted general o modelos de enlaces de hidrógeno para explicar el papel de catalizador de guanidina (Taylor y col., 2012).

### Catálisis Acido-base General en la Hidrólisis de Enlaces P–O

Los principios de la catálisis ácido-base, son útiles para explicar los mecanismos químicos fundamentales de algunas enzimas, ya que muchas reacciones son catalizadas por ácidos y bases. Se conocen dos tipos de catálisis ácido-base: la catálisis ácido-base específica y la catálisis ácido-base general. Cuando el efecto catalítico está dado por los iones  $H^+$  y  $OH^-$ , se trata de una catálisis del tipo ácido-base específica (McKee y McKee, 2009). Si la actividad catalítica es proporcionada por otras especies que actúan como ácidos o bases en el sentido de Brønsted y Lowry (especies que dan o aceptan protones, respectivamente), se trata entonces de una catálisis del tipo ácido-base general. La hidrólisis de los ésteres es un buen ejemplo de una reacción que es catalizada por medio de este tipo de catálisis (Avery, 2002).

En la ribonucleasa pancreática humana, también conocida como RNAasa A, que lleva a cabo la reacción de hidrólisis del enlace fósforo-oxígeno. La acción catalítica se debe a que tanto la forma ácida como la básica de dos histidinas se encuentran presentes en el sitio activo de la enzima, la His 12 (la especie libre, actúa como base general) y la His 119 (especie protonada, que actuará como ácido general). La catálisis comienza con la sustracción de un protón del grupo 2'-OH del sustrato por el par electrónico del imidazol de las His 12 y al mismo tiempo una sesión del protón de la His 119 al sustrato. Liberándose así el primer producto de la catálisis. Entra el segundo sustrato, una molécula de agua. La His119 toma uno de los protones del agua. El protón ataca al grupo fosfato cíclico, dando un segundo estado de transición. Se rompe el enlace entre el carbono y el oxígeno y se libera el segundo producto (Battaner, 2013).

Recientemente también podemos encontrar estudios cinéticos que se han realizado, los cuales se centran en reacciones catalíticas del tipo ácido-base general en la ruptura de enlaces fosfodiéster. Se utilizan amortiguadores de pH con imidazol para esclarecer los posibles mecanismos que emplea la RNasa A para llevar a cabo la catálisis. Se usan amortiguadores que contengan imidazol, como ya antes se mencionó, debido a que este grupo perteneciente a las cadenas laterales de las histidinas está fuertemente relacionado como piezas claves durante la hidrólisis (Corona, 2008).

### **Importancia del Guanidinio en la Ruptura de los Enlaces P-O**

La importancia del enlace fosforo-oxígeno, en el ADN y ARN, y su poca reactividad hacia la hidrólisis ha retado a los científicos a diseñar y sintetizar fosfodiesterasas artificiales con el propósito de que éstas rompan, de manera selectiva y eficiente, polirribonucleótidos, polinucleótidos de igual manera que una nucleasa lo haría. En las fosfodiesterasas la actividad mimética, en su mayoría, se logra utilizando cationes metálicos ligados a los sitios activos, se suele utilizar  $\text{Cu}^{\text{II}}$  y  $\text{Zn}^{\text{II}}$  ya que estos metales responden favorablemente en la reacción (Salvio, 2015). Sin embargo, los iones metálicos no son las únicas unidades activas que pueden jugar un rol central en el mimetismo de la enzima. Una serie de sistemas catalíticos basados en guanidinio capaces de promover eficazmente la escisión de ésteres de fosfato se han reportado en los últimos años.

La unidad de guanidinio (Figura 5), juega un papel clave en enzimas como la nucleasa staphylococcal, se ha utilizado ampliamente como un activador y/o grupo de anclaje en el diseño de catalizadores hidrolíticos. Estos catalizadores contienen uno o más unidades de guanidinio, o

una unidad de guanidinio en conjunción con otra unidad activa como un centro metálico, un grupo hidroxilo, o una base libre en solución (Salvio y col., 2011).

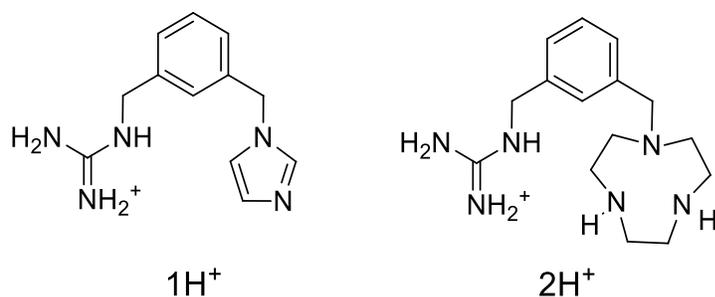


Figura 5. Estructura del guanidinio.

Fuente: Salvio y col., 2011.

La habilidad del guanidinio para enlazar el grupo fosfato se puede atribuir a su estructura rígida y plana y a su complementariedad geométrica con este oxoanión. Esto permite la formación de uno de dos patrones de unión posible de los enlaces de hidrógeno (Figura 6), ya que hay otros sitios de unión de los enlaces de hidrógeno que son posibles. Además, tiene un alto valor de pKa que asegura la protonación sobre un amplio intervalo de valores de pH (Salvio, 2015).

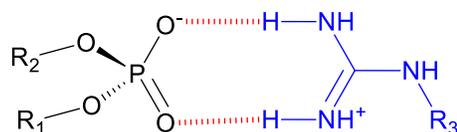


Figura 6. Patrón de unión más común en la interacción de un grupo guanidinio con un fosfodiéster. Fuente: Salvio, 2015

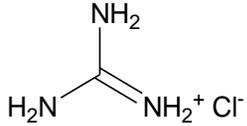
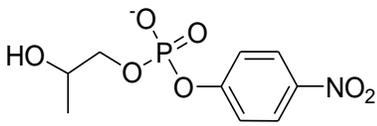
El aducto formado entre fosfato y guanidinio, es resultado de una interacción electrostática y de enlaces de hidrógeno. Esta interacción, particularmente si nos referimos a su constante de asociación en agua y otros disolventes polares no es muy fuerte, pero se presenta. En las proteínas de manera casi general, la interacción guanidinio-oxoanión normalmente se lleva a cabo en el interior de “huecos” hidrofóbicos, en donde se favorece y aumenta la fuerza de la interacción (Salvio, 2015). Además, se han informado de estudios en los que se muestra que la interacción del guanidinio con el fosfato mediante puentes de hidrógeno es más fuerte en mezclas

de DMSO/agua que en agua pura. Lo anterior puede traducir al siguiente razonamiento, un catalizador que tenga una unidad de guanidinio como anclaje y/o grupo activador se verá potencialmente favorecida en una mezcla de solventes con una proporción menos acuosa, en otras palabras, en una mezcla de disolventes menos polar (Salvio y col., 2011).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

Tabla 1. Reactivos utilizados y sus propiedades.

Fórmula del compuesto	Características principales de los compuestos
$(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$	Cloruro de tetrametilamonio Fluka $\geq 99\%$ para cromatografía de intercambio iónico Masa molar = 109.6
	Cloruro de guanidinio Sigma, 99% Masa molar = 95.53
 (HpNPP)	2-hidroxipropil <i>p</i> -nitrofenilfosfato Masa molar = 276.16

### Disolventes

Para la realización de todos los experimentos se utilizó agua desionizada obtenida del equipo Barnstead Nanopure, donde el agua obtenida tenía una resistencia de 18.2 M $\Omega$  que equivale a 0.055 microsiemens. Se utilizó etanol de pureza del 99.9% y fue utilizada sin ningún tratamiento previo. En todos los ensayos se utilizaron mezclas etanol-agua, las mezclas evaluadas se hicieron desde 30% hasta el 80% de etanol y el resto de agua. Con un incremento de 10% de acetona en cada mezcla estudiada hasta llegar a 80% de etanol.

## **Programas**

El análisis de los datos obtenidos de los experimentos cinéticos para determinar las constantes de rapidez en las diferentes mezclas se hizo con el programa OriginPro™ versión 9.0 de 64 bits.

## **Equipo**

Las mediciones espectrofotométricas se hicieron en un espectrofotómetro HP 8453 de arreglo de diodos equipado con multicelda. Durante los experimentos se mantuvo constante la temperatura a 37 °C utilizando un baño de recirculación de agua marca Julabo modelo FP45-HL.

## **Estudios cinéticos**

Los estudios cinéticos se realizaron en un espectrofotómetro HP 8453 de arreglo de diodos equipado con multicelda, equipado con un compartimento termorregulado a  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . Las reacciones se realizaron en condiciones de pseudoprimer orden ( $[\text{HpNPP}] = 20\text{-}70 \mu\text{ mol/L}$ ) y se evaluó el efecto del catalizador y el disolvente sobre la constante de rapidez de la reacción de transesterificación del HpNPP (Figura 7).

Las reacciones se iniciaron mediante la adición de una alícuota de la disolución del HpNPP. La solución del sustrato se preparó en agua haciéndola pasar por una columna con la resina Amberlite IR-120H de intercambio iónico para eliminar el catión  $\text{Ba}^{2+}$ , que puede ocasionar interferencia con los estudios cinéticos. La concentración del HpNPP se determinó mediante la absorbancia del 4-nitrofenolato después de la hidrólisis con hidróxido de sodio 0.1 mol/L. La disolución madre del sustrato HpNPP se hizo sólo en agua con una concentración de 1 m mol/L. Las mediciones se llevaron a cabo en celdas de cuarzo de 1 cm de longitud. El volumen total en la celda fue de 2.5 mL. En los experimentos se empleó espectrofotométricamente la banda de absorción de 420 nm del anión 4-nitrofenolato que se forma, para seguir el transcurso de la reacción. Las soluciones para las reacciones se prepararon mediante mezclas de etanol-agua de 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 por ciento.

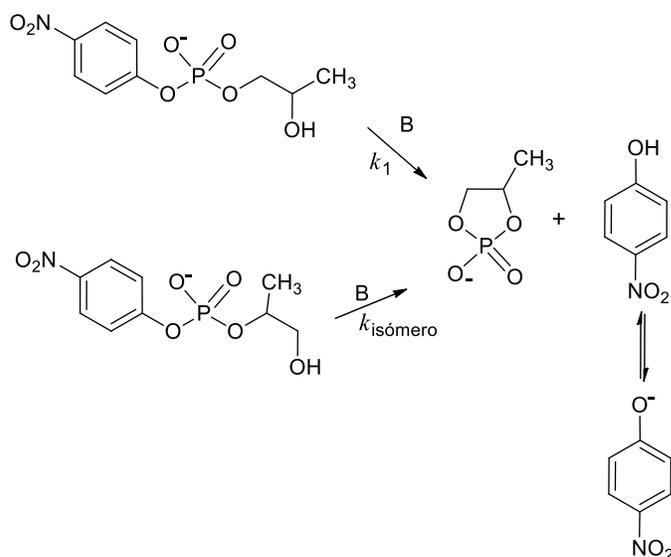


Figura 7. Hidrólisis del HpNPP.

En todas y cada una de las cinéticas con guanidina se completó totalmente la reacción, debido a esto las constantes de rapidez observadas se mantuvieron mediante el ajuste no lineal de la ecuación siguiente.

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

La ecuación corresponde a la formación de dos productos de forma paralela mediante una cinética de primer orden.  $A$  es la absorbancia en cualquier momento,  $\Delta A_{\infty}$  es la diferencia entre la absorbancia inicial y la infinita,  $A_0$  es la absorbancia al inicio,  $k_{obs}$  es la constante de rapidez observada y  $t$  es el tiempo.

### Perfil de Concentración

Para conocer el efecto que tiene la concentración del catalizador sobre la hidrólisis del sustrato, se elaboraron perfiles donde se hizo variar la concentración del amortiguador en un intervalo desde 0.01 a 0.14 mol/L, a una fracción de neutralización del amortiguador constante del 50% en todas las mezclas realizadas de etanol-agua. Con la finalidad de conocer si existe la catálisis o no. En caso de que la reacción se lleve a cabo exitosamente, con este perfil se puede conocer el orden con respecto al catalizador.

Las opciones posibles más comunes se ilustran en la figura 8. En la curva **a** se observa un comportamiento de orden cero respecto al catalizador lo cual indica que no existe la catálisis. Esto se observa ya que no hay dependencia con la concentración del mismo y se ve reflejado en la pendiente de valor cero ( $y = k_0$ ). En la curva **b** se observa un comportamiento lineal, es decir, una dependencia de orden uno con relación al catalizador ( $y = k_{\text{cat}}[\text{Cat}]_{\text{T}} + k_0$ ). Esto podría sugerir la participación de algunas de las especies del catalizador. Finalmente, en la curva **c** vemos un comportamiento cuadrático ( $y = k_{\text{cat}}[\text{Cat}]_{\text{T}}^2 + k_{\text{cat}}[\text{Cat}]_{\text{T}} + k_0$ ), característico de una reacción de segundo orden. Este tipo de perfiles puede deberse a una contribución de segundo orden de la base, del ácido o bien de ambos al mismo tiempo.

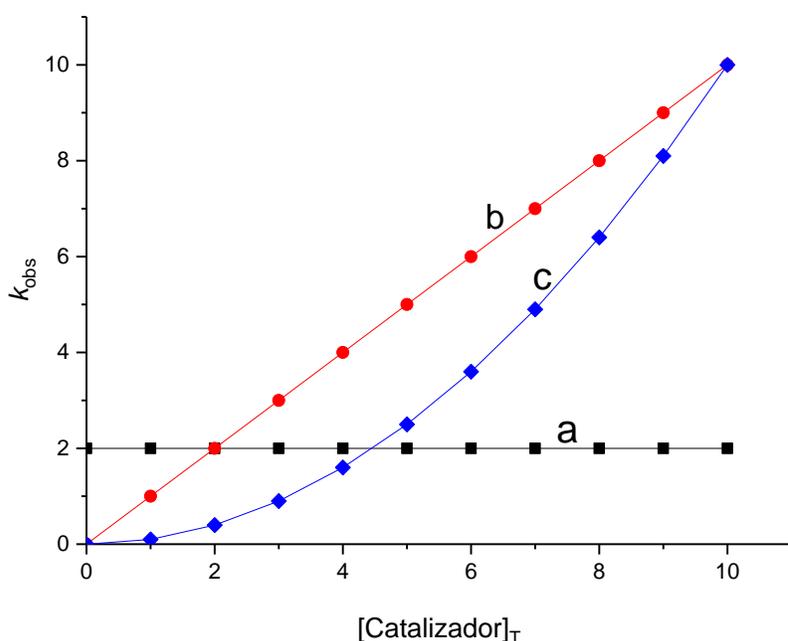


Figura 8. Perfiles posibles de la variación de las constantes de rapidez en función de la concentración del catalizador: (a) perfil de orden cero, (b) perfil de primer orden y (c) perfil de segundo orden.

### Perfil de Neutralización

Para conocer que especies del catalizador participan en el mecanismo de la reacción de transesterificación del HpNPP se llevaron a cabo perfiles de neutralización en cada mezcla de etanol–agua. En estos perfiles se mantuvo constante la concentración total del amortiguador en un valor de 0.1 mol/L y se hizo variar la fracción del amortiguador desde 0.1 a 0.9 (del 10 al 90%).

Lo que se buscaba con la elaboración de un perfil de neutralización es conocer que fracción del catalizador era la que favorecía a la catálisis. En el caso de que ambas fracciones del amortiguador sean las que aporten a la realización de la catálisis, se obtiene un perfil característico de una curva en forma de campana (Figura 9).

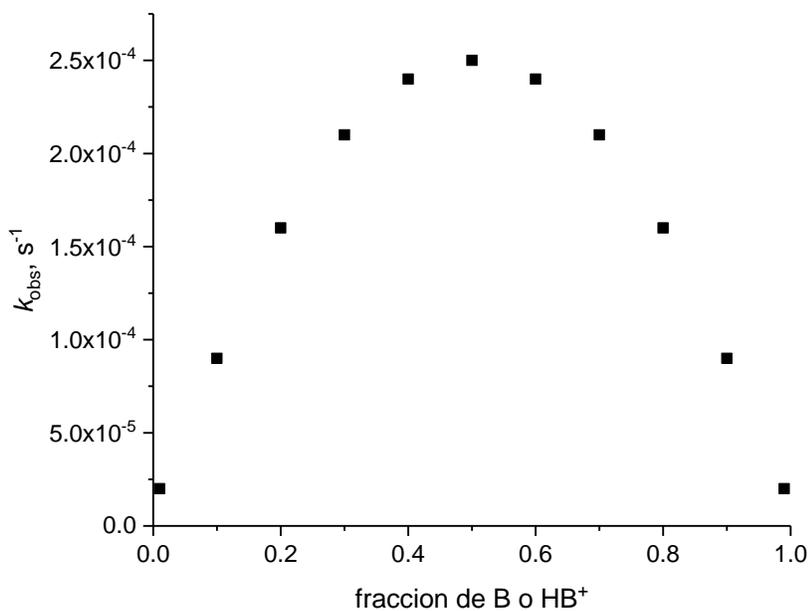


Figura 9. Perfil de neutralización de una catálisis bifuncional.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

La primera parte fue evaluar el efecto de la concentración total del catalizador (guanidinio 50% neutralizado) en las diferentes mezclas etanol-agua (desde 10 hasta 80 por ciento de etanol, para conocer el efecto del disolvente sobre la ruptura catalítica del sustrato). Este experimento es muy importante para confirmar la existencia de la catálisis por guanidina y el orden respecto al amortiguador. El intervalo de las concentraciones del catalizador estuvo entre las siguientes concentraciones: 0.01 a 0.2 mol/L.

Después se estudió el efecto del grado de neutralización del catalizador en las diferentes mezclas etanol-agua para conocer las especies involucradas en el mecanismo de reacción de ruptura del HpNPP. Con relación a los objetivos planteados, este experimento puede permitir, además de conocer las especies participantes, conocer en qué mezclas de disolventes se podría tener una catálisis bifuncional, es decir, un mecanismo donde participen la forma neutra y la protonada del catalizador.

Debido a que una de las posibles especies participantes en la ruptura del sustrato puede ser el ion hidróxido, es importante determinar el valor de la constante básica específica ( $k_{OH}$ ) en cada mezcla de disolventes. Lo anterior fue para descartar o considerar la aportación de la catálisis por iones hidróxido en la ruptura del HpNPP con la guanidina.

### Efecto de la Hidrólisis Básica Específica

Debido a la posibilidad de una contribución por parte de la catálisis básica específica (hidrólisis del sustrato por iones hidróxido) en la reacción en las diferentes mezclas de disolvente, se realizaron perfiles de la dependencia de las constantes de rapidez con la concentración de hidróxido. Las cinéticas se hicieron a 37 °C en un intervalo de concentración entre 0.02 a 0.14 mol/L de hidróxido de tetrametilamonio, con un valor de fuerza iónica constante de 0.2 mol/L con cloruro de tetrametilamonio. Los valores obtenidos en los experimentos realizados en las diferentes mezclas de disolvente utilizadas se muestran en la figura 10. De estas gráficas se obtuvo la pendiente, la cual corresponde al valor de la constante de la catálisis básica en el medio,  $k_{OH}$ . Este valor es importante de obtener ya que con él podemos conocer la contribución de la reacción por iones hidróxido en función de su concentración ( $k_{obs} = k_{OH}[\text{OH}^-]$ ). Los valores

obtenidos en cada mezcla de reacción se muestran en la tabla 2. De los valores encontrados podemos observar que conforme aumenta el contenido de etanol en la mezcla los valores de las constantes tienden a disminuir con un comportamiento no lineal. Es decir, lo anterior significa que, a mayor contenido de etanol, menor es la contribución de la catálisis por iones hidróxido. Esto podría deberse a que hay una interacción fuerte entre el etanol y los iones hidróxido en comparación por ejemplo con acetona (García-Moreno, 2016) y con dimetilsulfóxido (Corona, 2008). Esta interacción puede hacer que compita el disolvente con el sustrato lo que ocasiona una disminución en los valores de las constantes de rapidez.

Tabla 2. Constantes de rapidez para la hidrólisis básica específica a 37°C en las mezclas etanol-agua.

% etanol-agua (v/v)	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%
$k_{OH}, L mol^{-1}s^{-1}$	0.092	0.066	0.068	0.053	0.054	0.043	0.037	0.028	0.012

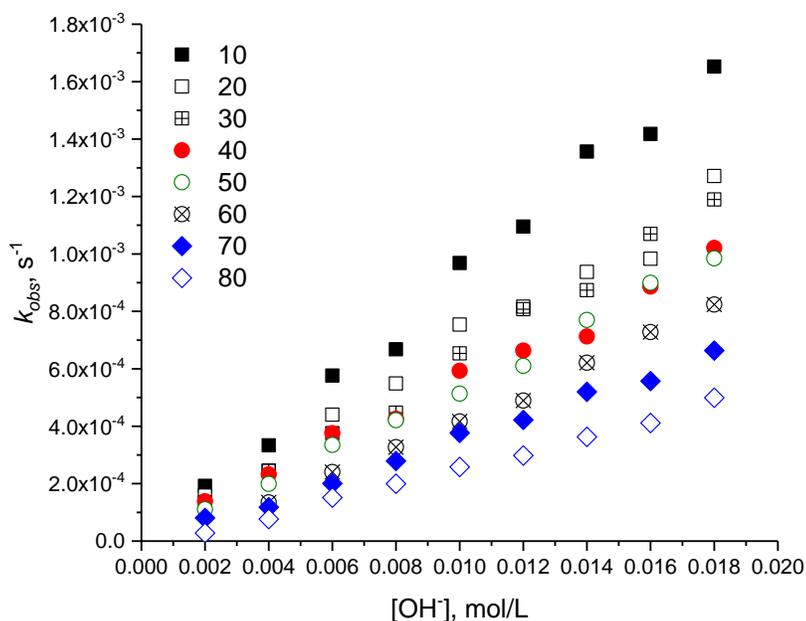


Figura 10. Variación de las constantes de rapidez básica específica en función del porcentaje de etanol.

Caldin (1954) informó acerca de la predominación de la formación del ion etóxido en las mezclas de etanol agua en la presencia de los iones hidróxido, mediante evidencia experimental. Esto puede resultar importante, ya que la competencia entre los iones hidróxido y los iones etóxido en la catálisis básica específica puede ser una explicación del motivo de la disminución de su actividad catalítica al aumentar la proporción de disolvente. Así mismo, puede existir un efecto sobre la solvatación en el estado de transición, el cual puede tener una mayor carga que los reactivos y al aumentar el contenido de etanol no se mejora su estabilización. Hecho que puede evidenciarse con la gráfica que se muestra en la Figura 11, donde se observa que existe una dependencia lineal en una parte de la gráfica entre el logaritmo de la constante de rapidez y el inverso de la permitividad dieléctrica ( $1/\epsilon$ ). La permitividad dieléctrica es una medida de la capacidad del disolvente para separar cargas mediante una estabilización (Reichardt, 2007). Esta gráfica permite observar que en una fracción de 0 al 90% en volumen de etanol, hay una dependencia lineal. Esto da evidencia que, en el mecanismo al formarse el estado de transición, este tiene mayor carga que los reactivos por lo que al aumentar la cantidad de etanol, se disminuye la permitividad dieléctrica del medio y esto disminuye la rapidez de reacción. Esto es indicativo de una posible desprotonación del grupo hidroxilo del sustrato que a su vez ataca al átomo de fósforo con lo que se genera un estado de transición de mayor carga que los reactivos (Reichardt, 2007).

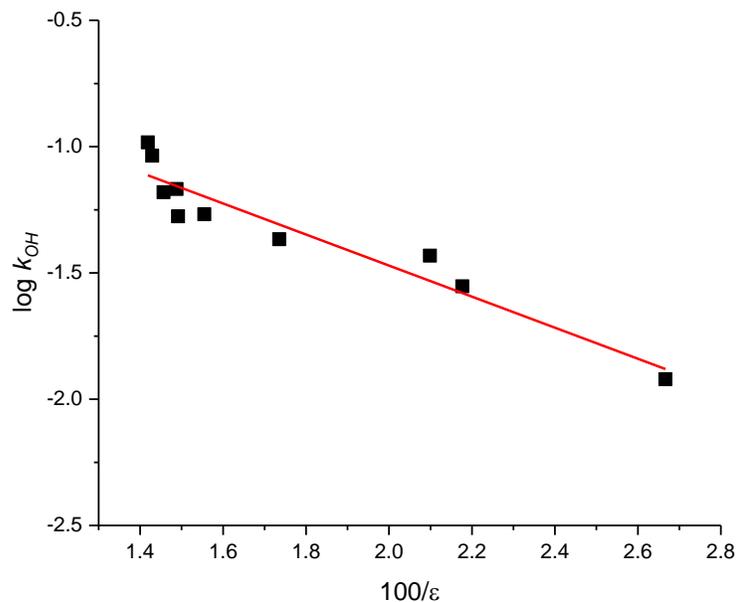


Figura 11. Dependencia de las constantes de la catálisis básica específica en función de la permitividad dieléctrica.

En la Figura 12 en la dependencia de la constante de rapidez con el valor de  $pK_w$ , una correlación de Brønsted, tiene un valor de pendiente de -0.5. Este valor de pendiente involucra un desarrollo intermedio de la carga en el estado de transición (en donde el complejo activado tiene un aspecto similar al producto (Williams, 1988)). Esto puede explicar en gran medida porque al aumentar la proporción de etanol, se disminuye la permitividad dieléctrica y por ende se disminuye la constante de rapidez. Finalmente, en la figura 13 se observa una dependencia casi lineal entre la forma logarítmica de la constante de rapidez y la fracción molar del etanol en la mezcla binaria con agua.

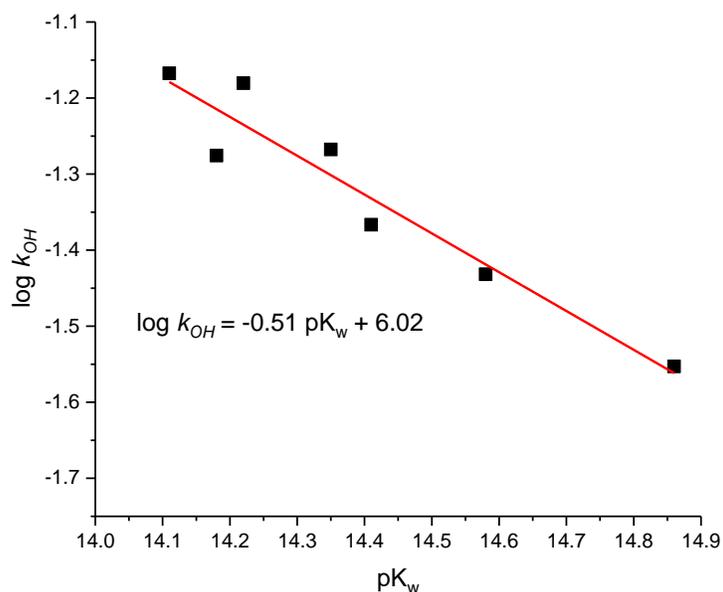


Figura 12. Relación de Brønsted para la catálisis básica específica en función del  $pK_w$  del medio.

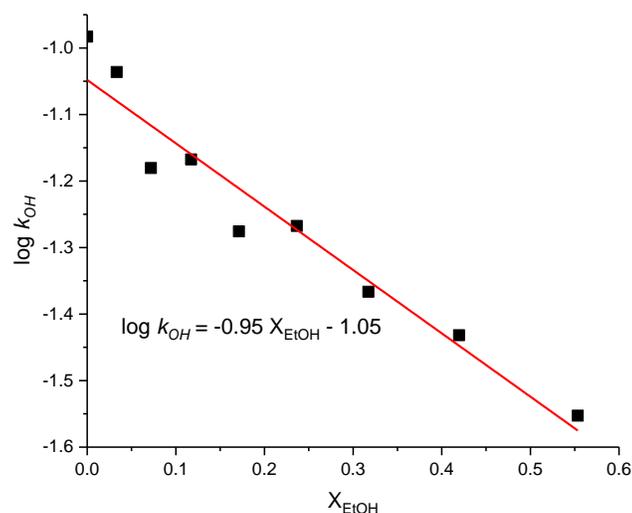


Figura 13. Dependencia de la catálisis básica específica en función del contenido de etanol en la mezcla binaria de disolvente.

### Efecto de la Concentración Total del Amortiguador

Para investigar si la guanidina es capaz de efectuar una catálisis ácido-base en la reacción de transesterificación del HpNPP se evaluó el efecto de la concentración del amortiguador. El experimento se realizó de la siguiente manera, se varió la concentración del amortiguador en cada una de las mezclas de etanol-agua manteniendo fija una proporción de neutralización del 50%. Se utilizó esta fracción de neutralización para tener presentes en cantidades equimolares las dos especies del amortiguador ( $HGu^+/Gu$ ), además, justo en esa proporción el valor de pH del amortiguador es igual al pKa del ácido en el medio que se utilizó para llevar a cabo la reacción. Lo anterior lo podemos confirmar con la ecuación de Henderson-Hasselbach para amortiguadores de pH:  $pH = pKa + \log([Gu]/[HGu^+])$ ; si  $[Gu] = [HGu^+]$ , entonces  $\log([Gu]/[HGu^+]) = 0$  y  $pH = pKa$ .

Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones de pseudoprimer orden respecto al sustrato ( $[HpNPP] = 20 \mu mol/L$ ). El amortiguador se generó a partir de las concentraciones adecuadas entre cloruro de guanidinio y el hidróxido de tetrametilamonio (dependiendo de la proporción de neutralización que se deseaba utilizar). La concentración total del amortiguador se hizo variar desde 0.01 hasta 0.14 mol/L y en todos los casos se mantuvo constante la fuerza

iónica con cloruro de tetrametilamonio de 0.2 mol/L. Los valores de las constantes de rapidez se obtuvieron mediante un ajuste no lineal con la ayuda de la ecuación mencionada en la sección de materiales y métodos. Esto fue posible debido a que el sistema catalítico hidroliza el HpNPP en menos de dos horas y permite el uso de la ecuación integral.

En la tabla 3 se muestran valores obtenidos para las constantes de rapidez de los diferentes perfiles de concentración correspondiente a cada mezcla de etanol-agua. Estos valores se graficaron para evaluar los efectos sobre la reacción, se muestra en la figura 14. En la parte (a) de la figura 14 se observa que desde el 30% al 50% de etanol con agua, existe la catálisis por guanidina. Sin embargo, la dependencia es de primer orden ya que observamos una línea recta. Lo que significa es que en estas fracciones de etanol-agua el mecanismo involucra aparentemente sólo a una especie del catalizador guanidina ( $k_{obs} = k_{Gu}[Gu]_T + k_0$ , donde  $k_0 = 0$ ), ya sea la forma protonada o la desprotonada, por lo tanto, en esta zona no es posible encontrar una catálisis bifuncional. Para poder distinguir qué especie es la que participa en el mecanismo, se hizo el perfil de neutralización cuyos resultados se analizan más adelante.

Tabla 3. Relación de valores obtenidos para las constantes de rapidez en función de la concentración del amortiguador de acuerdo con el porcentaje de etanol en agua.

[Gu] <sub>T</sub> mol/L	$k_{obs} \times 10^3, s^{-1}$					
	30%	40%	50%	60%	70%	80%
0.01						0.035
0.02	0.064	0.055	0.08	0.066	0.058	0.062
0.04	1.4	1.24	1.44	1.35	1.37	1.47
0.05	1.93					
0.06	2.41	2.15	2.27	2.22	2.16	2.64
0.08	3.4	3.06	3.18	3.1	3.51	4.01
0.10	4.34	4.08	3.83	4.12	4.72	5.41
0.12	5.31	5.12	4.73	5.21	6.0	7.07
0.14		6.21	5.78	6.53	6.87	

En los perfiles hechos en las mezclas con más de 60% de etanol se comienza a observar un ligero comportamiento cuadrático de la curva, como se observa en la parte (b) de la figura 14 [(este comportamiento no se le puede atribuir al efecto de la fuerza iónica, ya que esta se mantuvo constante, (Kirby, 1988)]. En la mezcla con 80% de etanol, la curvatura del perfil es más marcada

y lo que refleja una contribución de segundo orden por parte del catalizador ( $k_{obs} = k_0 + k_1[Gu]_T + k_2[Gu]_T^2$ ). Esto puede ser por la parte básica del amortiguador o bien por ambas fracciones del catalizador en la transesterificación catalítica del sustrato. Del mismo modo que en los casos anteriores, una vez identificada la existencia de la catálisis básica se hace la caracterización de las especies importantes mediante los perfiles de neutralización.

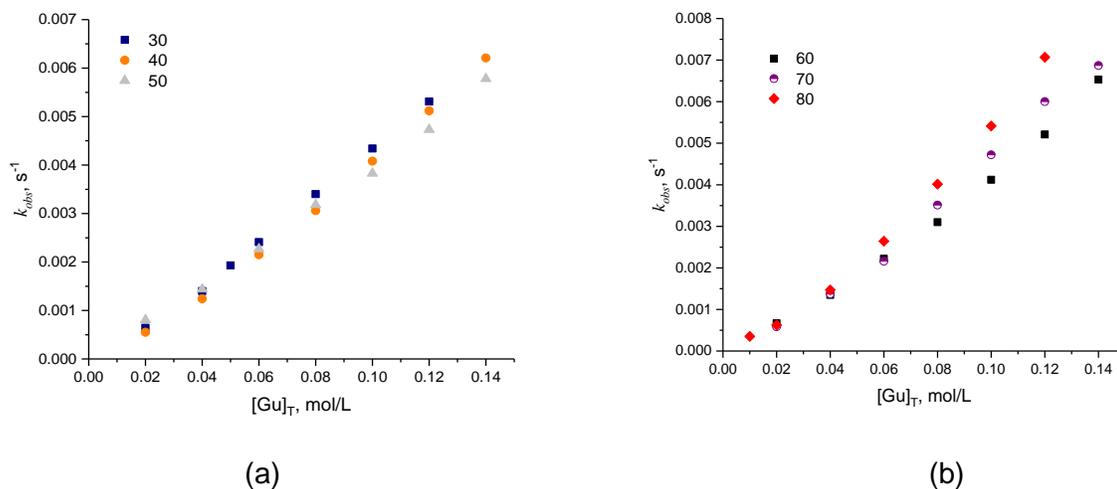


Figura 14. Perfiles de concentración en la catálisis del HpNPP con guanidina a 37°C en las mezclas de etanol-agua del: (a) 30 a 50% y (b) 60 a 80%.

Este tipo de perfil, cuadrático, fue informado por primera vez por el grupo de Yatsimirsky (Corona, 2010), en el cual se utilizaron guanidinos y amidinos de 70 a 90% de DMSO acuoso. Por otra parte, el grupo de Salvio se ha basado en el trabajo de este grupo y ha sintetizado diferentes compuestos derivados de guanidinio. Los sistemas incluyen ligantes tipo pinza derivatizados en una o dos partes con guanidinio, hasta calixarenos de tipo bisguanidinos. Lo anterior, se basa en el perfil cuadrático mencionado, ya que todos los trabajos de Salvio se han hecho principalmente en la mezcla 4:1 en volumen de DMSO:agua (Salvio y col. 2011, 2013, 2015).

Si tomamos como base los trabajos hechos con sistemas biomiméticos de las ARNasas y Ribozimas (Corona y col., 2010 y 2012), el trabajo que se presenta tiene alta congruencia ya que se encuentra que a mayor contenido de disolvente orgánico se comienza a evidenciar la presencia de una catálisis de segundo orden en el catalizador (en este caso el amortiguador).

### Efecto del Grado de Neutralización del Amortiguador

Debido a los resultados obtenidos en el efecto de la concentración del amortiguador guanidina, se realizaron perfiles de variación de la neutralización del amortiguador desde 20 al 80% en cada mezcla de etanol-agua para la reacción de ruptura del HpNPP. En estos experimentos se mantuvo la concentración del amortiguador constante en 0.1 mol/L. El objetivo de estos perfiles es determinar qué especie o especies del amortiguador participan en el mecanismo catalítico de la transesterificación del HpNPP. Los valores para las constantes de rapidez observadas obtenidas se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Dependencia de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio en la transesterificación del HpNPP a 37°C en función del porcentaje de etanol en agua. La desviación estándar en todos los valores fue menor al 1%.

[Gu] <sub>L</sub> mol/L	$k_{obs} \times 10^3, s^{-1}$						
	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%
0.1	--	0.834	--	--	--	--	--
0.2	1.92	1.46	1.29	--	2.1	2.04	2.21
0.3	--	2.23	2.06	2.19	2.26	2.64	3.57
0.4	3.26	2.87	2.73	3.16	3.4	3.22	4.19
0.5	3.89	3.56	3.19	3.75	3.77	4.17	4.93
0.6	4.91	4.06	3.8	4.51	4.34	4.76	5.5
0.7	5.38	4.71	--	5.0	5.05	5.44	5.92
0.8	6.03	5.36	4.69	5.4	5.71	5.94	6.22
0.9	6.97	5.76	5.32	6.32	6.32	6.32	5.9

Para poder explicar las tendencias encontradas en este tipo de experimentos, se hicieron las gráficas de los perfiles de neutralización que se muestran en la figura 15. En los perfiles que se hicieron del 20% al 60% de etanol, se observa un comportamiento casi lineal con una pequeña caída entre el 70 y 80% del amortiguador (correspondiente a las concentraciones de guanidina libre de 0.07 y 0.08 mol/L). Este comportamiento puede deberse a una alta contribución de la forma básica del amortiguador en el mecanismo y/o a la participación de la catálisis básica específica.

Por otro lado, en las mezclas de 70 y 80% de etanol, este perfil denota una tendencia de disminución del intervalo entre los valores de la constante de rapidez entre las concentraciones de guanidina libre de 0.05 y 0.07. Este comportamiento sugiere un mecanismo bifuncional. Sin embargo, la caída de los valores de constantes de rapidez no es suficiente para generar un perfil de campana tradicional. Los perfiles de campana son muy representativos de catálisis de tipo bifuncional, sobre todo en los mecanismos enzimáticos. En sistemas no biológicos, este tipo de perfil ha sido informado por el grupo de Yatsimirsky (Corona y col, 2010 y 2012) de manera natural en sistemas catalizados con guanidina y amidinio pero en mezclas de DMSO acuso. El estudio anterior se limitó al trabajo en mezclas que sólo abarca de 70 a 90% de DMSO acuso. Aunque también, existen informes previos como el del grupo de Breslow del perfil en forma de campana en la catálisis de sustratos modelos del ARN (Breslow y Anslyn, 1989) (Breslow R y Xu, 1993). El grupo de Kirby demostró (Kirby y col., 1988) que el perfil informado por Breslow era ocasionado por un efecto de codisolvente y de la fuerza iónica del medio. La importancia de encontrar este tipo de perfiles radica en que se biomimetiza el comportamiento cinético de una enzima en función del valor de pH. Lo que permite trabajar en condiciones donde se puede imitar el mecanismo mediante el cual realizan sus funciones las enzimas ribonucleasas.

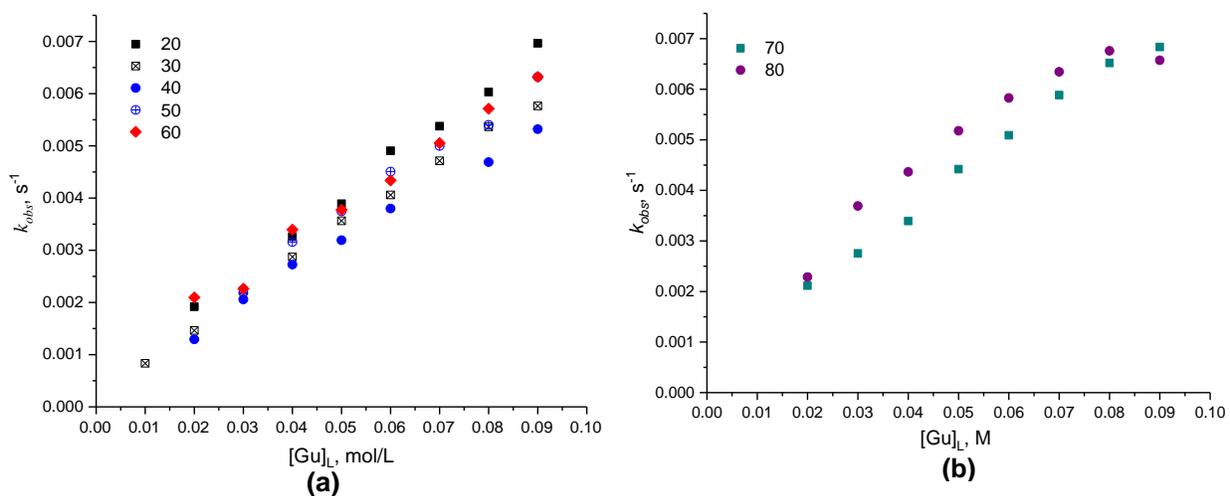


Figura 15. Perfiles de variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio en: (a) 20 al 60% y (b) 70 y 80% de etanol en agua.

El comportamiento mostrado en las mezclas de 70 y 80% de etanol puede deberse a las contribuciones simultáneas de todas las especies presentes en el medio [iones hidróxido (catálisis básica específica), guanidinina libre (catálisis básica general), ion guanidinio (catálisis ácida general) y el disolvente], incluso por la combinación de algunas de ellas. Es por esto, que para

discriminar entre varias rutas se requiere considerar la ecuación canónica de la catálisis ácido-base propuesta por Brønsted (1928) (Jencks, 1969; Kwan, 2005; Laidler, 1987), donde se consideran todas las especies participantes en el mecanismo. Con los experimentos ya analizados (*vide supra*), podemos indagar que las especies que están participando en la reacción de ruptura en las condiciones que se establecieron son los iones hidróxido, la guanidina libre y la combinación de guanidina con guanidinio en la siguiente ecuación de rapidez:

$$k_{obs} = k_1[Gu] + k_2[Gu][HGu^+] + k_{OH}[OH^-]$$

Lo anterior debido a que en el perfil de concentración se tiene un comportamiento cuadrático en algunos perfiles y en el perfil de neutralización tiene una forma de campana incompleta. Este tipo de ley de rapidez fue informado también en sistemas similares por el grupo de Yatsimirsky (Corona y col., 2010 y 2012), sólo que en el presente trabajo se añaden los iones hidróxido debido a que su contribución es aparentemente significativa (*vide infra*).

En todos los casos, debido a la posibilidad de la contribución de la catálisis básica específica, se hizo la corrección restando su contribución a la constante de rapidez observada. Lo anterior se puede hacer con los valores determinados de la catálisis básica específica en cada mezcla. Para conocer la concentración de iones hidróxido en cada una de las fracciones del amortiguador se tuvo que recurrir a la ecuación sin aproximaciones de la constante de equilibrio ácido base para la del guanidinio. Esto es porque los valores de pKa y del pKw son muy cercanos y las aproximaciones conocidas que generan la ecuación de Henderson-Hasselbach para disoluciones amortiguadoras no son válidas (Charlot, 1980). La ecuación general del cálculo de la concentración, cuando se toma en cuenta el balance de carga y el de materia de las especies involucradas en el equilibrio, es:

$$[H^+] = \frac{Ka([HGu^+] - [H^+] + [OH^-])}{[Gu] + [H^+] - [OH^-]}$$

La cual, al despejarse para calcular la concentración de ion hidrógeno, queda como:

$$[H^+]^3 + \{[Gu] + Ka\}[H^+]^2 - \{Kw + Ka[HGu^+]\}[H^+] - KaKw = 0$$

La concentración de hidrógeno y considerando el valor de Kw y su expresión, Kw = [H<sup>+</sup>] [OH<sup>-</sup>], podemos calcular las concentraciones de iones hidrógeno. La resolución de la cúbica que se empleo fue por el método algebraico, haciendo un algoritmo en Excel para poder hacer el cálculo más rápido. No se utilizó el método de Newton-Rapson por ser más elaborado para calcular tantos datos, al basarse en aproximaciones.

Con el valor calculado de la concentración para los iones hidróxido y los valores de la constante de la catálisis básica específica para cada porcentaje en volumen de etanol (ver tabla 2) se hizo la siguiente operación para el tratamiento de los datos obtenidos:

$$k_{\text{obs}} - k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] = k_2[\text{Gu}] [\text{HGu}^+] + k_1[\text{Gu}]$$

La ecuación anterior nos permite descartar la contribución básica específica en cada una de las mezclas. La corrección permitirá verificar si existe un efecto de los iones hidróxido sobre la catálisis bifuncional. Para conocer dicho efecto se realizaron las gráficas mostradas en la figura 16 y 17. En la figura 16a se muestran los porcentajes de 20 y 30% de etanol corregidas. En estas gráficas podemos ver que conservan la linealidad, por lo que no se puede determinar una contribución bifuncional de manera adecuada. Esto es congruente con la sospecha que no aparecía la catálisis bifuncional en estos porcentajes.

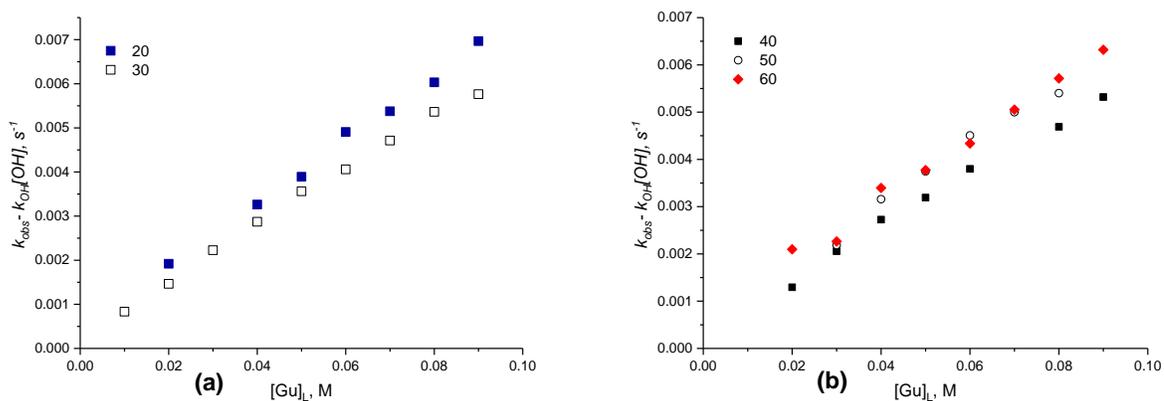


Figura 16. (a) Perfil de la variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio en 20% y 30% de etanol. (b) Perfil de la variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio en 40%, 50% y 60% de etanol.

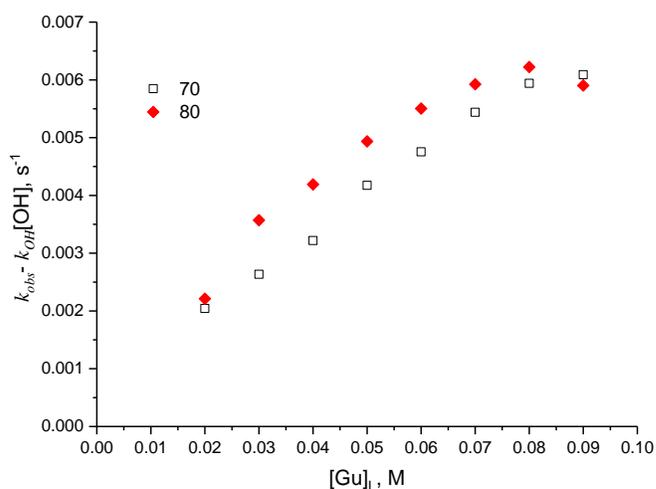


Figura 17. Perfil de la variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio en 70% y 80% de etanol.

Los perfiles corregidos de las mezclas de 70 y 80% de etanol, no aparece claramente la forma de campana, pero si hay una caída en las constantes de rapidez a partir de 80% de la forma libre, esto es una evidencia que en el mecanismo participan ambas formas del amortiguador.

Como podemos ver, la aparición de la catálisis bifuncional se da en mayores proporciones de etanol. Aproximadamente desde 60% es donde aparece un vestigio de su participación. Para hacer el análisis correcto de los datos se dividió en dos grupos, en el primero se hizo un ajuste lineal del perfil de neutralización corregido para conocer el valor de la catálisis básica general. En la figura 18 se muestra un ejemplo de este análisis, el valor de la pendiente de la gráfica corresponde al valor de la constante de rapidez, si consideramos la siguiente ecuación:

$$k_{\text{obs}} - k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] = k_1[\text{Gu}] + k_0$$

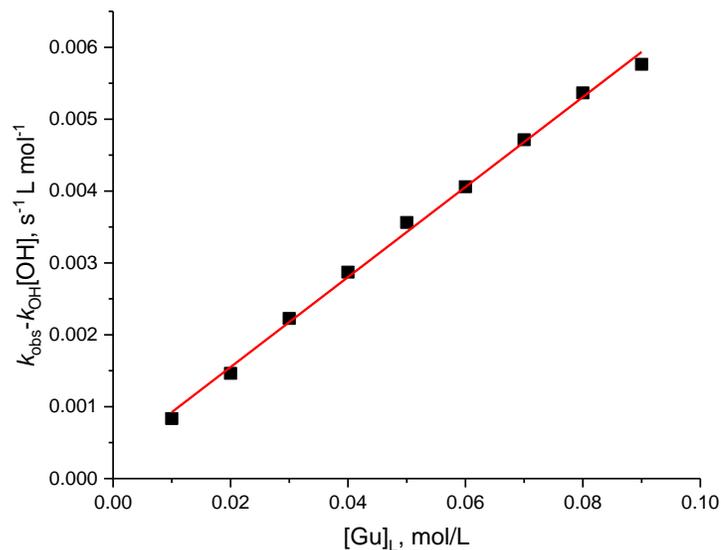


Figura 18. Análisis en 30% de etanol del perfil de neutralización corregido. En este análisis se obtiene el valor de la constante básica general.

El segundo grupo de datos fue de 60 a 80%, donde se observa un perfil en forma de campana o una curvatura. Para el análisis de estos datos, debemos considerar la ecuación de rapidez corregida:  $k_{obs} - k_{OH}[OH^-] = k_2[Gu][HG_u^+] + k_1[Gu]$ . Si dividimos ambos lados entre  $[Gu]$ , la ecuación anterior se transforma en:

$$(k_{obs} - k_{OH}[OH^-])/[Gu] = k_2 [HG_u^+] + k_1$$

La ecuación anterior toma la forma de una línea recta en un gráfico con las coordenadas de  $(k_{obs} - k_{OH}[OH^-])/[Gu]$  en función  $[HG_u^+]$ . Los valores de las constantes corregidas se dividieron con la concentración de la guanidina libre y se graficaron en función de la concentración del ion guanidinio (se calcula restando a 0.1 mol/L la concentración de la base libre). En la figura 19 se muestra un ejemplo de este análisis para el caso de 70% de etanol. En estas coordenadas, el valor de la pendiente corresponde a la constante de la catálisis bifuncional, mientras que el intercepto a la constante de la catálisis básica general.

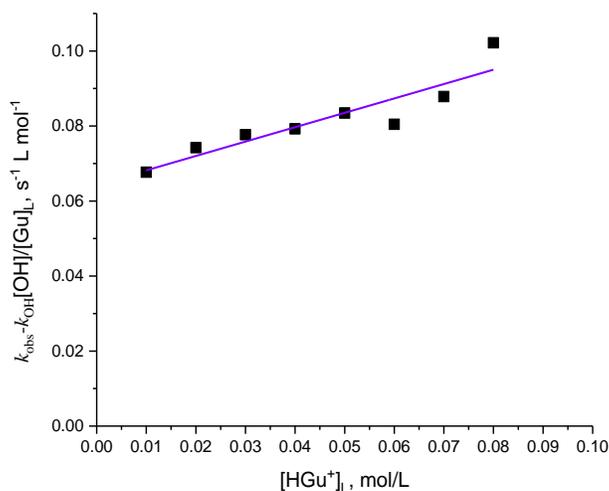


Figura 19. Ejemplo del análisis del perfil de neutralización corregido en la mezcla de 70% de etanol.

Los valores obtenidos en el análisis de los dos tipos de gráficas se encuentran en la tabla 5. En todos los porcentajes se intentó hacer la extracción de las contribuciones de la constante para la catálisis básica general,  $k_1$  y el de la catálisis básica bifuncional,  $k_2$ . Sólo que, en los casos de menor proporción de etanol, hubo mayor dispersión en las contribuciones bifuncionales. Es importante señalar que el valor de la constante de la catálisis básica general,  $k_1$  prácticamente no varió. Lo que implica una baja contribución del efecto de disolvente sobre esta ruta del mecanismo. Lo que es importante del análisis anterior y cuyos valores se muestran en la tabla, es que aún y cuando por el perfil de concentración no se sospecha de la presencia de la catálisis bifuncional por la falta de una curvatura evidente, está presente. Existen informes acerca de la presencia de la catálisis bifuncional en agua (Corona, 2012), sin embargo, debido a la alta proporción de iones hidróxido presentes en el medio y su alta contribución no permite la detección de la misma. En el presente estudio se detectó que conforme aumenta el contenido del disolvente orgánico, hay un incremento en la presencia de la catálisis bifuncional, lo que puede deberse en gran medida a que se favorecen las interacciones entre el guanidinio y el fosfato del sustrato (Anslyn, 1992 y Kneeland, 1993) al disminuir la permitividad del medio.

Tabla 5. Dependencia de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio en la transesterificación del HpNPP a 37°C en función del porcentaje de etanol.

$X_{etanol}$	$k_1, s^{-1} M^{-1}$	$k_2, s^{-1} M^{-2}$
0.033	0.06	
0.072	0.075	0.1
0.117	0.063	0.14
0.171	0.058	0.13
0.237	0.068	0.1
0.317	0.062	0.24
0.420	0.064	0.38
0.554	0.063	0.7

En la figura 20, se observan las tendencias de la dependencia de los valores de las constantes de rapidez  $k_1$  y  $k_2$  en función de la fracción molar de etanol. En el caso de la catálisis básica general,  $k_1$ , se observa que no hay un cambio aparente, ya que hay una tendencia horizontal con un valor de pendiente prácticamente de cero (figura 20 a). Esto significa que en el caso de la catálisis por la forma desprotonada del amortiguador, no se afecta en su reactividad al variar la proporción de etanol. Es decir, no hay efecto de disolvente en este tipo de catálisis. En el caso de la gráfica de la figura 20b, vemos que conforme aumenta la fracción molar del etanol se incrementa el valor de la constante de rapidez de la catálisis bifuncional, que es en la que participan ambas especies del amortiguador.

Con los valores obtenidos en la tabla 5 se hizo un análisis del efecto de disolvente mediante parámetros teóricos y empíricos conocidos para las mezclas binarias de etanol-agua. Los parámetros utilizados fueron la permitividad dieléctrica del medio (Wohlfarth, 2008) (este parámetro indica la capacidad del medio para separar cargas, en este caso entre mayor sea la misma, significa que se favorece la formación de cargas nuevas en la reacción, específicamente en el complejo activado), el valor de  $E_T(30)$  y  $E_T^N$  (Dimroth, 1963; Roses, 1995 y 1996) (estos dos parámetros dan una idea de la formación de especies más o menos polares en el estado de transición en función de los valores de los disolventes) además de los parámetros de Catalán que se muestran en la figura 21 (2000, 2001 y 2009).

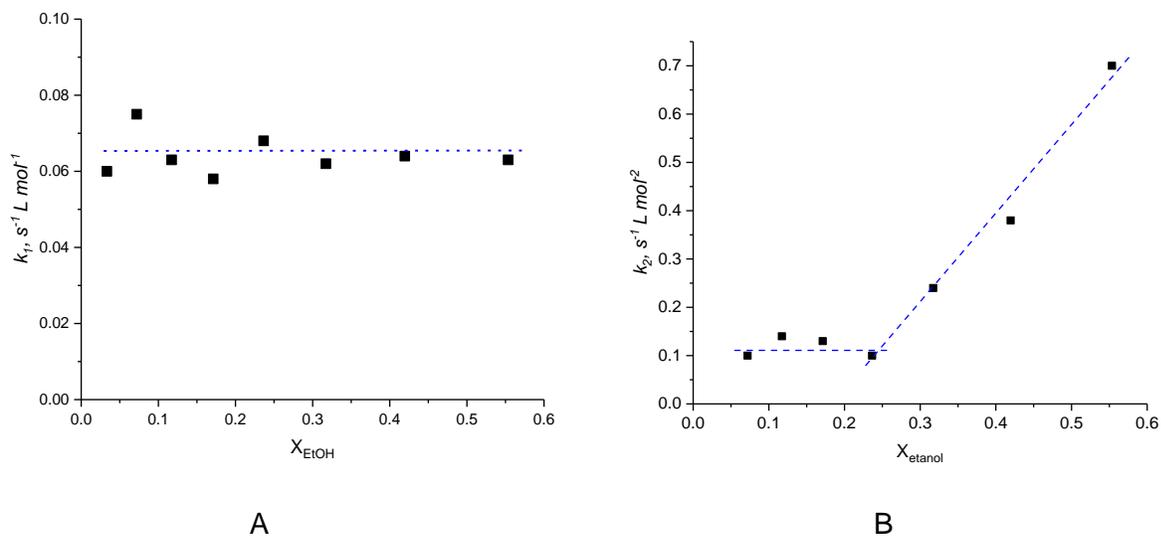


Figura 20. Dependencia de los valores de  $k_1$  (a) y  $k_2$  (b) en función de la fracción molar de etanol.

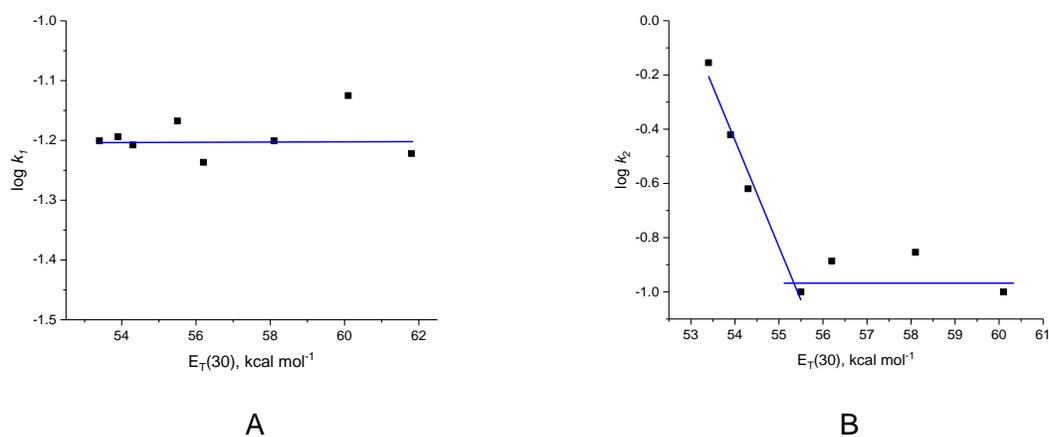


Figura 21. Relación de las constantes  $k_1$  (a) y  $k_2$  (b) con el parámetro  $E_T(30)$ .

En el caso de los parámetros  $E_T(30)$  y  $E_T^N$ , los perfiles de la forma logarítmica de  $k_1$  y  $k_2$  tuvieron el mismo comportamiento. En el caso de la catálisis básica específica ( $k_1$ ) muestra un valor de pendiente cero, es decir no se ve afectado; en tanto que con la catálisis básica bifuncional, muestra una doble tendencia, una parte lineal con pendiente negativa y una parte con pendiente cero. Ambos parámetros empíricos se derivan de la polaridad del medio, entre más polar sea este, mayor será el valor del parámetro. La única diferencia entre el valor de  $E_T(30)$  y

$E_T^N$ , es que el último está normalizado, es decir el valor 0 se le otorga al TMS (tetrametilsilano) y el 1.0 al agua (Roses, 1992). Es interesante que conforme aumenta la polaridad del disolvente en el caso de la catálisis bifuncional donde participan una especie neutra y una catiónica por parte del catalizador, además del sustrato aniónico, la rapidez de la reacción disminuye. Esto puede deberse a que la carga neta del complejo activado en el estado de transición comienza a disminuir debido a la ruptura y formación de enlaces. En tanto que, en el caso de la catálisis básica general, es posible que no haya ningún efecto sobre la carga o polaridad en el estado de transición, debido a la participación de una especie neutra como lo es la guanidina. Así mismo, tenemos que considerar que los catalizadores son eficientes formadores de enlaces de hidrógeno y esto puede tener una competencia entre el disolvente con los reactivos y el complejo activado en el estado de transición. Cuando se hizo el análisis con los parámetros de catalán que correlacionan, la polaridad, la acidez y basicidad del medio no se encontró una correlación.

El otro parámetro analizado fue la permitividad del medio, en donde se evalúa el desarrollo de cargas durante el estado de transición. De nuevo, la catálisis básica general no tuvo ninguna correlación mientras que de 50 a 80% de etanol sí. En la figura 22 se muestra el perfil del logaritmo de la constante de la catálisis básica bifuncional en función de la permitividad dieléctrica. La pendiente de este perfil es positiva, lo que implica una disminución en la carga en el estado de transición ya que al estar en las mezclas de mayor permitividad la rapidez disminuye, mientras que en las de menor permitividad la rapidez aumenta. Además, esta pendiente positiva indica que el radio del complejo activado en el estado de transición debe ser más grande (Reichardt, 2003) lo que indica que está más solvatado por moléculas de etanol. Este perfil encontrado, da evidencia que la permitividad del medio es de suma importancia para la catálisis, ya que al parecer el hecho de que no haya mucha carga en el estado de transición, favorece un mecanismo bifuncional. Algo, que debe ser considerado también, es que en el mecanismo donde participan dos especies, ha sido informado que la forma catiónica fundamentalmente se asocia por enlaces de hidrógeno e interacciones ion-ion con el fosfato. Lo anterior, también puede explicar porque una disminución de la permitividad dieléctrica puede favorecer este mecanismo. Por un lado, se favorecen las interacciones ion-ion y por otro, esta interacción permite que la carga que se forma en el complejo activado se distribuya entre más átomos.

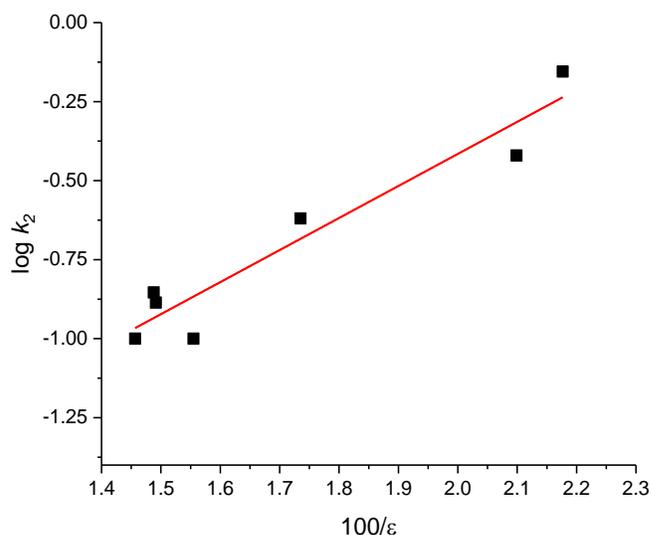


Figura 22. Relación entre las constantes de la catálisis básica bifuncional y la permitividad dieléctrica

Además de lo analizado anteriormente para el caso del mecanismo bifuncional que imita a los mecanismos enzimáticos, otros parámetros que parecen ser de suma importancia son los valores de pKa y pKw del guanidinio y de las mezclas binarias analizadas. Si hacemos un análisis de los perfiles de neutralización, el perfil en forma de campana casi aparece en 80% y no es hasta que se quita la contribución por la catálisis básica específica que se encuentra el perfil deseado. También podemos observar que la catálisis básica general no tiene efecto de disolvente y cuando la diferencia del pKa y del pKw es menor que dos unidades, hay una alta contribución por las rutas básicas específica y general. Esto no permite ver la catálisis bifuncional, pero es hasta que la diferencia es de más de dos unidades que permite detectar su presencia.

Por lo anterior, podemos establecer que otro factor para encontrar las condiciones donde aparezca un mecanismo donde participen ambas especies, como en las enzimas, es que el pKw aumente bastante y el pKa no, de tal modo que la diferencia sea mayor que dos unidades para poder encontrar la catálisis. Otro medio donde se observa este tipo de catálisis es en DMSO, donde la diferencia entre el pKw y el pKa es de más de 5 unidades (Corona, 2008).

Esta diferencia entre las constantes además permite el abatimiento de la concentración del ion hidróxido en el medio, lo que hace posible que se detecte en el mecanismo. En un estudio reciente (García-Moreno, 2016) similar al presente, pero con acetona, se encontró que el efecto del medio es de suma importancia para que se presente la ruta bifuncional. Además, si

comparamos los valores de constantes obtenidos en ese trabajo, son ligeramente mayores a las presentadas en este. Esto es importante ya que al tener dos disolventes con valores de permitividad dieléctrica similar (Wohlfarth, 2008) pero estructuras diferentes, encontramos que si hay efectos diferentes. Es decir, en el disolvente aprótico como lo es la acetona se intensifican las interacciones entre el sustrato y el catalizador y por ende tenemos mayores valores en las constantes de rapidez de la reacción estudiada. En tanto que etanol, al ser un disolvente prótico la magnitud de las interacciones puede ser menor (ya que hay competencia con el sustrato y el catalizador por parte del disolvente) y por eso los valores encontrados en las constantes de rapidez son menores que las de las mezclas con acetona.

En la figura 23 se muestran las dos principales rutas encontradas para la catálisis con guanidina en la ruptura del sustrato HpNPP a 37°C en las mezclas de etanol-agua. Ambas rutas, participan al mismo tiempo en conjunto con la ruptura por iones hidróxido. Estas dos rutas, son los más probables con base en las evidencias encontradas en el presente trabajo. La coexistencia de los tres mecanismos mencionados anteriormente es algo muy común en las catálisis de tipo ácido-base. Sin embargo, regularmente en ciertas condiciones predomina una ruta en particular sobre las demás. Es por eso por lo que en este trabajo se buscaron las condiciones para encontrar donde se favorece el mecanismo bifuncional.

En la figura 23a se ilustra el mecanismo donde una base actúa desprotonando al grupo 2-hidroxilo del sustrato, el cual ataca posteriormente al fósforo del grupo fosfato. En la figura 23b se observa a la catálisis bifuncional donde de igual modo se da mediante el ataque de la guanidina al grupo 2-hidroxi desprotonándolo y de manera concertada este ataca al fosfato que está activado por la interacción de tipo electrostática con el guanidinio, favorecido por la formación de enlaces de hidrógeno y la complementariedad del fosfato con el guanidinio.

Este último tipo de interacción ha sido encontrada en el mismo tipo de sustratos en las mezclas de DMSO-agua, para los cuales existen distintos informes donde se analiza la catálisis tipo ácido base con amortiguadores formados por derivados de la guanidina, donde el mecanismo que se propone es similar al de este trabajo: catálisis básica general y la catálisis bifuncional con asistencia electrofílica. También, Salvio y colaboradores (Salvio y col., 2011, 2013, 2014 y 2015; Baldini y col., 2012) proponen el mecanismo bifuncional con asistencia electrofílica de diferentes tipos de sistemas bisguanidinos con una guanidina protonada y una desprotonada en mezclas de DMSO-agua (Salvio y col., 2011, 2013 y 2015). En ese tipo de sistemas, se ha encontrada una excelente eficiencia catalítica.

Por otra parte, Baldini y colaboradores al igual que Cacciapaglia y colaboradores, presentan el mismo mecanismo bifuncional para la catálisis del HpNPP con derivados de

calixarenos con unidades de guanidina en una mezcla de DMSO-agua 80/20 v/v. (Cacciapaglia y col., 2013; Baldini y col., 2012).

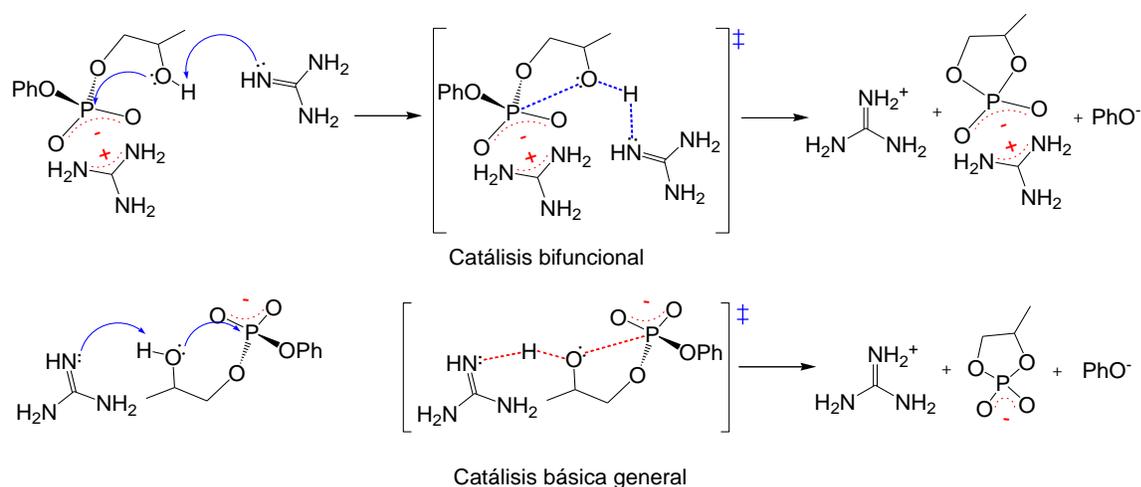


Figura 23. Mecanismos propuestos para la catálisis con guanidina. a) Catálisis básica general.  
b) Catálisis bifuncional con asistencia electrofílica.

También existe al menos un informe del uso de nanopartículas de silicio con guanidina para la catálisis del HpNPP, llevados a cabo en una mezcla de DMSO-agua 4:1, en el cual se propone el mecanismo bifuncional con asistencia electrofílica. (Savelli y Salvio, 2015). Es importante mencionar que los informes citados, se realizaron en mezclas que contenían 80% de disolvente orgánico. Al comparar los resultados obtenidos con dichos informes, se pudo observar que el comportamiento de la catálisis por el amortiguador formado por guanidina-guanidinio es similar al que se presenta en este trabajo, donde la mezcla de disolventes fue de etanol-agua, en el que se muestra el mecanismo bifuncional en las mezclas que superan el 50% de etanol.

En el presente trabajo, se hizo un estudio detallado en mezclas formadas con un disolvente prótico polar (etanol) con agua, desde un 10 hasta un 80%. En este se encontró que conforme se acerca a un porcentaje mayor de 50% de etanol se comienza a presentar una catálisis de segundo orden por el amortiguador. Además, se encuentra un perfil en forma de campana. Este trabajo resulta de gran importancia porque fundamenta la utilización de mezclas binarias de disolvente orgánico-agua en sistemas biomiméticos de las ARNasas. Lo que es importante ya que al diseñar catalizadores no enzimáticos debe tomarse en cuenta para tener una mejor eficiencia. Además, permitirá la generación de más sistemas catalíticos que se pueden probar en este tipo de condiciones que permiten emular a la enzima.

## CONCLUSIONES

Se midieron los valores para la catálisis básica específica de la ruptura del HpNPP a la temperatura de 310 K de 0 a 90% de etanol en agua. La constante de la catálisis en cada medio varió de 0.092 a 0.012 L mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, lo que indica un fuerte efecto del medio en esta ruta.

Se encontró una correlación entre el logaritmo de la constante básica específica con el pKw del medio, la permitividad dieléctrica del medio y la fracción molar del etanol con las siguientes ecuaciones:

$$\log k_{OH} = 6.02 - 0.51 \text{ pKw} \quad (7, 0.903);$$

$$\log k_{OH} = -0.24 - 65.1/\epsilon \quad (10, 0.9)$$

$$\text{y } \log k_{OH} = -1.05 - 0.95 X_{EtOH} \quad (9, 0.934)$$

La reacción de transesterificación del 2-hidroxiopropil *p*-nitrofenil fosfato en mezclas de etanol con agua a 37°C presenta una catálisis con guanidina, según se observa en los perfiles de concentración. Conforme aumenta el porcentaje de etanol, el valor de las constantes de rapidez obtenidas aumenta.

De los perfiles de concentración y del grado de neutralización, se obtuvo la siguiente ecuación cinética de rapidez para la reacción de transesterificación del HpNPP a 37°C:

$$k_{obs} = k_1[Gu] + k_2[Gu][HGu^+] + k_{OH}[OH^-]$$

La catálisis por guanidina libre no presenta un efecto de disolvente y está presente en todos los porcentajes de manera constante.

La ruptura del HpNPP por iones OH<sup>-</sup> se da en mayores valores de permitividad dieléctrica y la ruta bifuncional predomina a menores permitividades dieléctricas y donde la diferencia de pKw-pKa del catalizador sea mayor a 5.

Con base en la conclusión anterior, en las mezclas de etanol con agua con mayor proporción del disolvente orgánico (de 50 a 80%) predomina el mecanismo bifuncional. Es decir, a mayor contenido de etanol el predominio del mecanismo biomimético se hace presente.

En el presente trabajo se encuentran las condiciones de mezclas de disolventes para poder mimetizar el mecanismo enzimático, es decir, donde predomine la catálisis bifuncional. Esto permitirá diseñar catalizadores que puedan ser estudiados en las mismas condiciones con sustratos como nucleótidos.

## Recomendaciones

El presente trabajo de investigación nos ha permitido un acercamiento al estudio de la relación que existe entre las reacciones químicas y el medio en el que ocurren. Además, de la relevancia en cuanto a la preferencia de alguna vía o mecanismo de reacción en función de las mezclas de disolventes utilizadas. Como perspectivas de este trabajo, debido a los resultados obtenidos tenemos:

Estudiar el efecto de las mezclas de disolvente en las constantes de asociación entre guanidinio y ésteres de fosfato (mono y di), para poder tener evidencia que este puede ser uno de los factores preponderantes en la eficiencia de la catálisis en los sistemas estudiados.

Evaluar la capacidad catalítica del mejor sistema con nucleótidos y polinucleótidos para evaluar su eficiencia en la ruptura.

Diseñar catalizadores derivados de guanidina o del aminoácido arginina que puedan actuar mediante un mecanismo bifuncional.

Con las condiciones establecidas probar el mismo sistema en la ruptura de otro tipo de ésteres de fosfato como los Triésteres que tienen importancia ambiental.

## BIBLIOGRAFIA

Abe H, Abe N, Shibata A, Ito K, Tanaka Y, Ito M, Saneyoshi H, Shuto H, Ito Y. 2012. Structure Formation and Catalytic Activity of DNA Dissolved in Organic Solvents. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51: 6475-6479.

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

Anslyn EV y Perreault DM. 1997. Unifying the current data on the mechanism of cleavage - transesterification of RNA. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36: 432-450.

Audran G, Brémond P, Marque SRA, Obame Germain. 2012. Chemically triggered C-ON bond hemolysis of alkoxyamines. Part 4: solvent effect. *Polym. Chem.* 2901-2908.

Avery H. E. 2002. *Cinética química básica y mecanismos de reacción.* España. Reverté. 9:128-132.

Baldini L, Cacciapaglia R, Casnati A, Mandolini L, Salvio R, Sansone F, Ungaro R. 2012. "Upper rim guanidinocalix[4]arenes as artificial phosphodiesterases". *J. Org. Chem.* 77: 3381– 3389.

Battaner A. E. 2013. *Compendio de enzimología.* 1ra Ed. Universidad de Salamanca, España. 7: 207-212.

Bender M. y Brubacher J. 1997. *Catálisis y acción enzimática.* Ed reverté.

Bevilacqua P.C., Yajima R. 2006. Nucleobase catalysis in ribozyme mechanism. *Curr. Op. Chem. Biol.* 10: 455-464.

Breslow R., Anslyn. 1989. On the mechanism of catalysis by ribonuclease: Cleavage and isomerization of the dinucleotide UpU catalyzed by imidazole buffers. *J. Am. Chem. Soc.* 111: 4473-4482.

Breslow R., Xu R. 1993. Quantitative evidence for the mechanism of RNA cleavage by enzyme mimics. Cleavage and isomerization of UpU by morpholine buffers. *J. Am. Chem. Soc.* 115: 10705-10713.

Bruice TC, Benkovic SJ. 2000. Chemical basis for enzyme catalysis. *Biochem.* 39(21): 5267-6274.

Cacciapaglia R, Casnati A, Mandolini L, Peracchi A, Reinhoudt DN, Salvio R, Sartori A, Ungaro R. 2007. Efficient and Selective Cleavage of RNA Oligonucleotides by Calix[4]arene-Based Synthetic Metallonucleases. *J. Am. Chem. Soc.* 129: 12512-12520.

Caldin E, Long G. 1954. The equilibrium between ethoxide and hydroxide ions in ethanol and in ethanol-water mixtures. *J. Chem. Soc.* 3737-3742.

Catalán J, García-Blanco F. 2000. Characterization of Binary Solvent Mixtures. *J. Org. Chem.* 65: 9226-9229.

Catalán J, Díaz C, García-Blanco F. 2001. Characterization of Binary Solvent Mixtures of DMSO with Water and Other Cosolvents. *J. Org. Chem.* 66: 5846-5852

Catalán J. 2009. Toward a Generalized Treatment of the Solvent Effect Based on Four Empirical Scales: Dipolarity (SdP, a New Scale), Polarizability (SP), Acidity (SA), and Basicity (SB) of the Medium. *J. Phys. Chem. B.* 113: 5951-5960.

Charlot G. 1980. *Química Analítica General*. Tomo 1. Ed. Toray- Masson. New York. NY.

Corona D. 2008. Catálisis con amortiguadores en la hidrólisis de un fosfodiéster modelo del ARN en mezclas DMSO- Agua. Tesis de Maestría, UNAM. Cd. de México, DF.

Corona D., Taran O., Yatsimirsky A. 2010. Mechanism of general acid-base catalysis in transesterification of an RNA model phosphodiester studied with strongly basic catalysts. *Organic & biomolecular Chemistry.* 8: 873-880.

Corona D. 2011. Estudios de la hidrólisis biomimética por el mecanismo ácido base de sustratos modelos del ARN. Tesis de Doctorado, UNAM. Cd. de México, DF.

Corona D., Gomez P., Yatsimirsky A. 2012. Electrophilic assistance to the cleavage of an RNA model phosphodiester via specific and general base-catalyzed mechanisms. *J. Org. Chem.* 77: 9110-9119.

Cox BG. 2013. *Solvent Effects on Acid-Base Strength*. 1ra ed. Oxford University Press. Reino Unido.

Cuchillo, C.M., Parés X., Guasch A., Barman T., Travers F., Nogués M.V. 1993. The Role of 2', 3'-Cyclic Phosphodiesters in the Bovine Pancreatic Ribonuclease A Catalysed Cleavage of RNA: Intermediates or Products? *FEBS Lett* 333: 207-210.

Dimroth K, Reichardt C, Siepmann T, Bohlmann F. 1963. Über Pyridinium-N-phenol-betaïne und ihre Verwendung zur Charakterisierung der Polarität von Lösungsmitteln. *Justus Liebigs Annalen der Chemie.* 661(1): 1-37.

Doherty E y Doudna J. 2001. Ribozyme structures and mechanisms. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure.* 30: 457-475.

Dong Z, Lou Q, Liu J. 2012. Artificial enzymes based on supramolecular scaffolds. *Chem. Soc. Rev.* 41: 7890-7908.

Fersht A. 1980. *Enzyme Structure and Mechanism*. 1ra ed. Reverté. Barcelona, España.

Grisham, C. M., Garrett, R. 1999. *Biochemistry*. Philadelphia: Saunders College Pub. 426-7.

García-Moreno A. 2016. Efecto del Disolvente en Mezclas Acetona-Agua para la Hidrólisis Biomimética de un Sustrato Modelo del ARN. Universidad de sonora.

Illanes A. 2008. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Springer. 1: 1-3.

Ishikawa T. 2009. *Superbases for Organic Synthesis: Guanidines, Amidines, Phosphazenes and*

Related Organocatalysts. 1ra. ed. Wiley. Chippenham, Inglaterra.

Jencks W. P. 1969. Catalysis in chemistry and enzymology. Canadá. Dover Publications. 163-198.

Kneeland DM, Ariga K, Lynch VM, Huang CY, Anslyn EV. 1993. Bis(alkylguanidinium) receptors for phosphodiesterases: Effect of counterions, solvent mixtures, and cavity flexibility on complexation. *J. Am. Chem. Soc.* 115: 10042-10055

Kwan EE. 2005. Factors Affecting the relative Efficiency of General Acid Catalysis. *J. Chem. Educ.* 82(7): 1026-1030.

Kirby AJ, Beckmann C, Kuusela S, Tickle DC. 1998. Mechanism of catalysis by imidazole buffer of the hydrolysis and isomerization of RNA models. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2.* 573-581.

Kirby AJ. 1996. Enzyme mechanisms, models and mimics. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35: 705-724.

Laidler KJ. 1987. *Chemical Kinetics*. 3ra ed. Prentice Hall.

Lilley D.M., Eckstein F. 2008. *Ribozymes and RNA catalysis*. Ed The Royal Society of Chemistry, Reino Unido.

López J. A. 2009. *Modulación de la estructura y función de la RNasa A y de Presuntas Ribonucleasas Prebióticas (Tesis doctoral)*. Universidad Autónoma de Madrid, España.

McKee T, McKee JR. 2009. *Bioquímica, las Bases Moleculares de la Vida*. 4ta ed. Mc Graw Hill. México, DF.

Peretó J., Sendra R., Pamblanco M., Bañó C. 2007. *Fundamentos de Bioquímica*. España. Universitat de València. 5: 97-102.

Raczynska ED, Cyranski MK, Gutowski M, Rak J, Gal JF, María PC, Darowska M, Duczmal K. 2003. Consequences of proton transfer in guanidine. *J. Phys. Org. Chem.* 16: 91-106.

Raynal M., Ballester P., Vidal-Ferran A., van Leeuwen P. W. N. M. 2014. Supramolecular catalysis. Part 2: artificial enzyme mimics. *Chem. Soc. Rev.* 43: 1734-1787.

Reichardt C. 1979. Empirical Parameters of Solvent Polarity as Linear Free-Energy Relationships. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 18: 98-110.

Reichardt C. 2003. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. 3ra ed. Verlag GmbH & Co. Alemania.

Reichardt C. 2007. Solvents and Solvents Effects. *Org. Process Research and Development*. 11 (1): 105-113.

Rosés M, Bosch E. 1992. Relationships between ET Polarity and Composition in Binary Solvent Mixtures. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 88(24): 3541-3546.

Rosés M, Ortega J, Ràfols C, Bosch E. 1995. Solute-solvent and solvent-solvent interactions in binary solvent mixtures. Part 1. A comparison of several preferential solvation models for describing ET (30) polarity of dipolar hydrogen bond acceptor-cosolvent mixtures. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*: 1607-1615.

Rosés M, Ortega J, Ràfols C, Bosch E. 1996. Solute-solvent and solvent-solvent interactions in binary solvent mixtures. Part 3. The ET(30) polarity of binary mixtures of hydroxylic solvents. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* :1497-1503.

Salvio R., Cacciapaglia R., Mandolini L. 2010. General BaseGuanidinium Cooperation in Bifunctional Artificial Phosphodiesterases. *J. Org. Chem.* 76: 5438–5443.

Salvio R., Cacciapaglia R., Mandolini L. 2011. General BaseGuanidinium Cooperation in Bifunctional Artificial Phosphodiesterases. *J. Org. Chem.* 76: 5438–5443.

Salvio R., Mandolini L., Savelli C. 2013. Guanidine–Guanidinium Cooperation in Bifunctional Artificial Phosphodiesterases Based on Diphenylmethane Spacers; gem-Dialkyl Effect on Catalytic Efficiency. *J. Org. Chem.* 78: 7259–7263.

Salvio R, Volpi S, Cacciapaglia R, Casnati A, Mandolini L, Sansone F. 2015. Ribonuclease Activity of an Artificial Catalyst That Combines a Ligated Cull Ion and a Guanidinium Group at the Upper Rim of a cone-Calix arene Platform. *J. Org. Chem.* 80: 5887–5893.

Salvio R. 2015. The Guanidinium Unit in the Catalysis of Phosphoryl Transfer Reactions: From Molecular Spacers to Nanostructured Supports. *Chem. Eur. J.* 21: 1–13.

Sykes P. 2002. *Mecanismos de reacción en química orgánica*. 5th Ed. Reverté. 43,44,75-82 p.

Taylor JE, Bull SD, Williams JMJ. 2012. Amidines, isothioureases, and guanidines as nucleophilic catalysts. *Chem. Soc. Rev.* 41: 2109-2121.

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

Wohlfarth C. 2008. *Landolt-Börnstein: Numerical Data and Functional Relationships in Science and Technology - New Series. Static Dielectric Constants of Pure Liquids and Binary Liquid Mixtures*. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 17: 229-245