

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

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



TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Alan García Moreno

Cd, Obregón, Sonora

Abril de 2016

Universidad de Sonora

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 Alan García Moreno, 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

Q. Manuel Armando Lizárraga Rubio

Vocal

Dra. María del Rosario Martínez Macías

Suplente

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, el Dr. David Octavio Corona Martínez, por su esfuerzo, dedicación y paciencia para la realización de este proyecto. De igual forma gracias por la confianza y amistad que se ha desarrollado a través de los años, misma que me ha ayudado a crecer como profesionista y sobre todo como persona.

A mis sinodales, Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz, Q. Manuel Armando Lizárraga Rubio, Dra. María del Rosario Martínez Macias, por la revisión y contribución a esta tesis.

A la M. en C. Sandra Mónica González Martínez por su apoyo durante la realización de este trabajo, a la Q.F.B. Sandra Miranda Mauricio por alentarme a no desistir durante la realización del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio Jorge, Josué y Mariana por su apoyo dentro del laboratorio para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres, quienes han sido la guía y el camino para poder llegar a este punto de mi carrera, que con su ejemplo, dedicación y sus palabras de aliento me motivaron siempre seguir y salir adelante.

CONTENIDO

	Página
FORMA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIA	4
CONTENIDO	5
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
OBJETIVOS	10
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
ANTECEDENTES	14
Hidrólisis del ARN por Ribonucleasas	14
Hidrólisis del ARN por Ribozimas	17
Enzimas Artificiales	19
Catálisis Acido- Base General	21
El Uso de Disolventes para la Hidrólisis Biomimética	24
Efecto del disolvente	25
Efecto sobre el pKa	25
Efecto sobre la velocidad de reacción	26
Efecto Hidrofóbico	27
Estudios de la Hidrólisis del ARN y su Molécula Modelo	27
Hidrólisis del 2- hidroxipropil <i>p</i> -nitrofenil fosfato en Mezclas de Disolventes con Guanidina	28
MATERIALES Y MÉTODOS	32
Sustrato	32
Disolventes	32
Reactivos	33
Equipo	33
Programas	34
Estudios Cinéticos	34

	Página
Perfil de Concentración	36
Perfil de Neutralización	37
Cálculo de la constante de catálisis básica específica	38
Estudios Potenciométricos	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
Determinación de los Valores del pK_w del Agua y del pK_a de Guanidinio en las Mezclas Acetona- Agua	41
Efecto de la Hidrólisis Básica Específica	47
Efecto de la Concentración Total del Amortiguador	50
Efecto del Grado de Neutralización del Amortiguador	52
CONCLUSIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	65

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Valores de pK_w a 37°C en las diferentes mezclas de acetona-agua	42
2	Comparación de valores de pK_w en mezclas acetona-agua.	44
3	Valores del pK_a de guanidinio a 37°C en las diferentes mezclas acetona-agua	45
4	Relación de los valores obtenidos para las constantes de rapidez de la reacción entre el HpNPP con iones hidróxido a 37°C en las diferentes mezclas de acetona-agua con una fuerza iónica controlada de 0.1 M	48
5	Constantes de rapidez para la hidrólisis básica específica a 37°C en las mezclas acetona-agua	49
6	Relación de valores obtenidos para las constantes de rapidez en función de la concentración del amortiguador de acuerdo al porcentaje de acetona	51
7	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 acetona	53
8	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 acetona	60

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Estructura del ARN	15
2 Mecanismo general de la hidrólisis básica de un diéster de fosfato	16
3 Mecanismo de hidrólisis del enlace fósforo – oxígeno por la Ribonucleasa A	17
4 Mecanismo general de la reacción de la ruptura del ARN por la ribozima VS a través de una catálisis acido-base general	18
5 Propuesta del mecanismo de la reacción de ruptura del ARN por la ribozima VS	19
6 Molécula de guanidina	22
7 Estructuras de resonancia de la guanidina	22
8 Estructura del 2- hidroxipropil <i>p</i> -nitrofenil fosfato (HpNPP)	28
9 Transesterificación del HpNPP con amortiguadores de pH	29
10 Perfil de Neutralización del amortiguador formado a partir de guanidina	30
11 Estructura general de los guanidinocalixarenos	31
12 Reacción de transesterificación del HpNPP	32
13 Reacción general observada de hidrólisis de HpNPP	34
14 Ajuste de la ecuación para formación del 4-nitrofenolato	36
15 Perfiles posibles de la variación de las constantes de rapidez en función de la concentración del catalizador	37
16 Gráfica de volumen de base añadida contra el pH	40
17 Relación de los valores de pK _w determinados en las mezclas de acetona agua	42
18 Relación de los valores de pK _w determinados en las mezclas de acetona agua en función de la fracción molar	43
19 Curva de valoración del cloruro de guanidinio a 37°C en la mezcla de 70% de acetona	45
20 Relación de los valores de pK _a en las mezclas acetona-agua	46
21 Valores de pK _a en función de la fracción molar de acetona	47

Figura	Página
22 Dependencia de las constantes de rapidez con la concentración de hidróxido de tetrametilamonio	49
23 Variación de las constantes de rapidez básica específica contra el porcentaje de acetona	49
24 Perfiles de concentración en la catálisis del HpNPP con guanidina a 37°C en las mezclas de acetona del: (a) 10 a 40% y (b) 50 a 80%	51
25 Perfil de la variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio en: (a) del 20 al 60% y (b) del 70 y 80% de acetona	54
26 (a) Perfil de la variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio en 20% y 30% de acetona. (b) Perfil de la variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio en 40%, 50% y 60% de acetona	56
27 Perfil de la variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio en 70% y 80% de acetona	57
28 Análisis en 30% de acetona del perfil de neutralización corregido. En este análisis se obtiene el valor de la constante básica general	58
29 Ejemplo del análisis del perfil de neutralización corregido en la mezcla de 80% de acetona	59
30 Dependencia de los valores de k_1 (a) y k_2 (b) en función de la fracción molar de acetona	60
31 Mecanismos propuestos para la catálisis con guanidina. (a) Catálisis básica general asistida. (b) Catálisis bifuncional con asistencia electrofilia	62

OBJETIVO

General

Evaluar el efecto de las mezclas de acetona-agua sobre las constantes de rapidez de la reacción de hidrólisis del sustrato modelo del ARN, 2-hidroxipropil *p*-nitrofenilfosfato, (HpNPP) con guanidina/guanidinio a 37°C para determinar las mezclas en las cuales se puede imitar el mecanismo enzimático de la ARNasa A.

Específicos

Determinar los valores de pK_w y el valor de pK_a del ion guanidinio en las mezclas acetona-agua (de 10 a 80%, de 10 en 10%) a una temperatura constante de 37°C.

Determinar las constantes de rapidez para la catálisis básica específica en la reacción de transesterificación del HpNPP en las mezclas acetona-agua (de 10 a 80%, cada 10%) a 37°C.

Determinar la existencia de la catálisis por guanidina en la reacción de transesterificación del HpNPP mediante la realización de perfiles de concentración del catalizador a 37°C en las diferentes mezclas de acetona agua.

Estudiar el efecto del grado de neutralización de guanidina en la constante de rapidez de la reacción de hidrólisis del HpNPP en diferentes mezclas de acetona-agua.

Proponer los posibles mecanismos de reacción para la ruptura del HpNPP con base en los resultados obtenidos.

Determinar en qué mezclas existe una catálisis bifuncional.

RESUMEN

En este trabajo se presenta el estudio cinético de la reacción de transesterificación del sustrato modelo del ARN, el 2-hidroxipropil *p*-nitrofenilfosfato. Los experimentos se hicieron en mezclas de acetona con agua en diferentes proporciones volumen/volumen (desde 10% hasta 80% de acetona) a 37°C en presencia del amortiguador guanidina-guanidinio.

En las mezclas analizadas se pudo observar que el pK_w aumenta conforme aumenta el porcentaje de acetona mostrando un desplazamiento del valor de 13.70 hasta 16.48, lo cual permite que se lleve a cabo la catálisis por el amortiguador empleado. También se determinó el valor del pK_a del guanidinio en las mezclas, donde este valor prácticamente se mantiene constante conforme aumenta el porcentaje de acetona en las mezclas.

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: $k_{obs} = k_1[Gu] + k_2[Gu][HG_u^+] + k_{OH}[OH^-]$.

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 , esta ruta no demostró mucho cambio al cambiar la proporción del disolvente orgánico. La segunda ruta es una catálisis bifuncional, donde participa guanidina como base y el guanidinio en su forma ácida. Este último activa de manera electrostática al grupo fosfato. Esta ruta, puede considerarse como imitación del mecanismo enzimático de la ARNasa y en este trabajo se encontró que se expresaba en mayores porcentajes de la mezcla de acetona. Por último, la tercera contribución se debe a la catálisis básica específica por los iones hidróxido presentes en el medio, la cual se va abatiendo conforme aumenta la cantidad de acetona.

INTRODUCCIÓN

Los ésteres de fosfato son moléculas ampliamente distribuidas en la naturaleza tanto en sistemas biológicos y químicos. Por ejemplo, los monoésteres de fosfato son los modificadores covalentes más comunes en procesos metabólicos que incluyen fosforilación y desfosforilación en la respiración, la glucólisis, gluconeogénesis, etc. (Voet, 2003). Los diésteres de fosfato forman parte de la estructura del ADN y el ARN; desde el punto de vista de la biotecnología, en particular de la ingeniería genética, un paso muy importante para manipular el material genético es la hidrólisis eficiente y selectiva de estas moléculas. Los triésteres de fosfato son tóxicos en su mayoría y se han utilizado como pesticidas y armas químicas, por lo que existe 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).

Los fosfodiésteres son poco reactivos debido a que presentan una carga negativa (la cual se comparte entre dos oxígenos) y esto los hace menos electrofílicos en comparación con los triésteres. La reactividad de los diésteres dependerá significativamente del nucleófilo y del grupo saliente (Kirby y Hollfelder, 2009).

En sistemas biológicos, la naturaleza ha encontrado dos caminos principales para la hidrólisis de los ésteres de fosfato. Uno es mediante el uso de iones metálicos como cofactores en el interior de las enzimas y el otro mediante una catálisis general ácido-base (Hollfelder y col., 2007). La importancia de 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, se conoce poco sobre el efecto que tienen las mezclas de disolventes orgánicos con agua en la hidrólisis de

fosfodiésteres, aún menos, del mecanismo mediante el cual se lleva a cabo esta transesterificación en este tipo de mezclas y en ausencia de metales.

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

ANTECEDENTES

Hidrólisis del ARN por Ribonucleasas

Las enzimas son proteínas sofisticadas con estructuras supramoleculares que catalizan las reacciones químicas que ocurren en los sistemas vivos. Debido a una gran variedad de grupos funcionales en su sitio activo, son capaces de llevar a cabo abundantes biotransformaciones químicas bajo condiciones fisiológicas, con una eficiencia catalítica sorprendente y alta especificidad hacia su sustrato. En las últimas décadas, las enzimas han sido ampliamente investigadas, no sólo para su comprensión catalítica, sino también por sus posibles aplicaciones (Dong y col., 2012).

Para entender las relaciones entre su estructura y función, el mecanismo catalítico y las aplicaciones potenciales que se derivan de su uso, se han desarrollado diversos catalizadores biomiméticos basados en la actividad enzimática. Uno de los grupos de enzimas que ha destacado en este tipo de investigaciones, debido al tipo de sustrato y al mecanismo catalítico, es el de las ARNasas o ribonucleasas. Éstas son enzimas que catalizan la hidrólisis del ácido ribonucleico (ARN) en componentes más pequeños (Delvin y col., 2004). La ruptura se realiza en el fosfato que une a dos nucleótidos, específicamente en los enlaces fósforo–oxígeno del esqueleto del ARN (Ver figura 1). Las ARNasas pueden ser endonucleasas (actividad dentro del núcleo celular) o exonucleasas (actividad fuera del núcleo celular) y existen varias subclases dentro del grupo bioquímico 3.1 de las enzimas (Kirby y col., 1998).

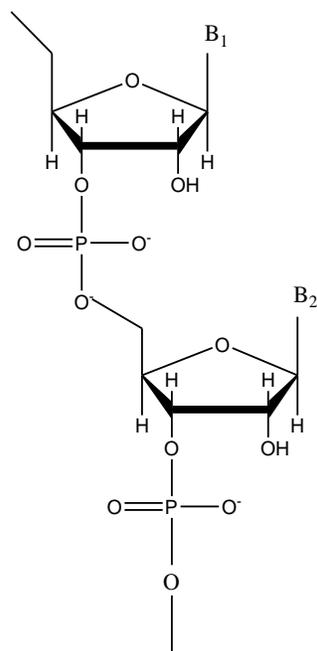


Figura 1. Estructura del ARN.

La formación y la ruptura del enlace fósforo–oxígeno es un proceso de suma importancia para la química de la vida (Kirby y col., 2013). El enlace fósforo–oxígeno es un enlace covalente que se produce entre un grupo fosfato (PO_4^{3-}) y un grupo hidroxilo ($-\text{OH}$). Por la cantidad de sustituyentes sobre el fósforo se distinguen entre mono-, di- y triésteres de fosfato (Taran, 206). La notable estabilidad asociada al enlace fósforo-oxígeno presente en los fosfodiésteres es un elemento esencial para la supervivencia y mantenimiento de la vida (Massoud y col., 2014).

La hidrólisis de los diésteres de fosfato, involucra el ataque nucleofílico al átomo de fósforo, por el oxígeno del agua o del hidróxido (Figura 2). Lo anterior genera un intermediario pentacoordinado y la subsecuente expulsión de un grupo alcohol. En función de la estructura del sustrato, el paso determinante en la reacción será el ataque nucleofílico o la ruptura del intermediario (Mancin y Tecilla, 2007).

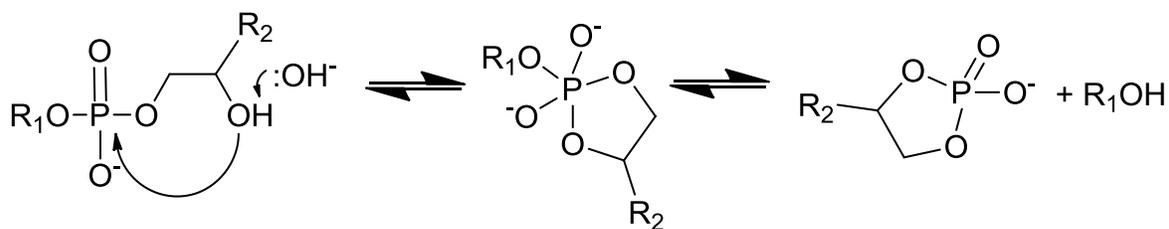


Figura 2. Mecanismo general de la hidrólisis básica de un diéster de fosfato.

Fuente: Adaptado de Sánchez, 2010

Los diésteres de fosfato no cíclicos y sin el grupo 2-hidroxilo logran mantener su estabilidad hacia la hidrólisis gracias a la carga negativa del grupo fosfato, que protege a los enlaces contra el ataque nucleofílico. El mecanismo de la hidrólisis que se presenta es nuevamente de adición – eliminación. El nucleófilo entrante se une al fósforo creando un intermediario con geometría bipirámida trigonal, posteriormente ocurre la ruptura de uno de los enlaces en el diéster (Taran, 2006).

Se estima que la ruptura del enlace fósforo–oxígeno del éster en el ácido desoxirribonucleico (ADN) presenta un tiempo de vida media de billones de años. Por otra parte, para el ARN es de al menos cien años (Suh y Seok Hong, 2000). Esto se debe a la presencia del grupo β -hidroxilo en la molécula que funciona como el nucleófilo interno (Taran, 2006). La ARNasa A acelera la ruptura del fosfato al formar enlaces de hidrógeno y una catálisis tipo ácido-base. El mecanismo aceptado para la hidrólisis por la ARNasa A (Figura 3), consiste en una catálisis ácido-base general en donde el imidazol desprotonado de la histidina 12 interviene como una base general, mientras que el grupo imidazol protonado de la histidina 119 funciona como un ácido general que interacciona con el grupo saliente y la lisina 41 actúa como catalizador electrostático (Kirby, 1996).

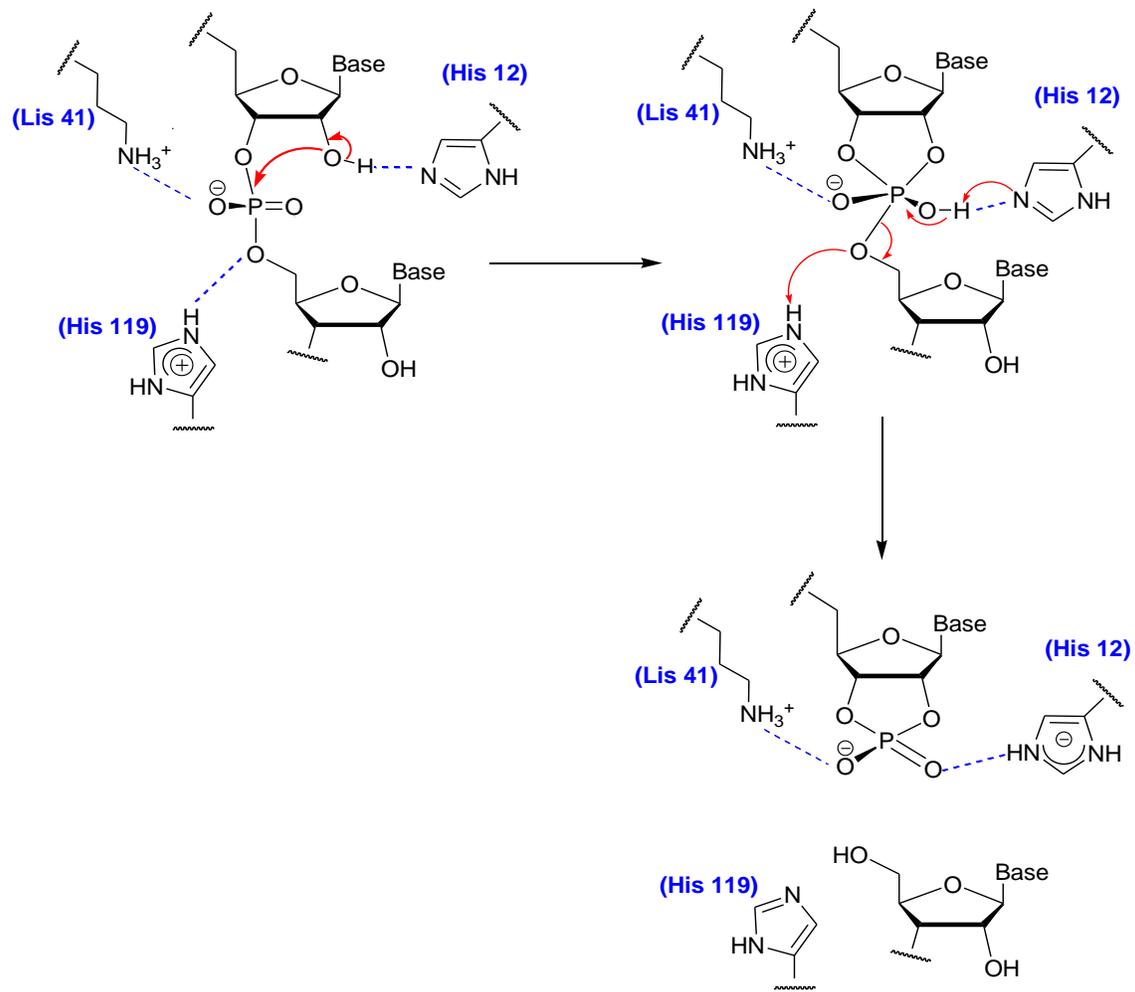


Figura 3. Mecanismo de hidrólisis del enlace fósforo–oxígeno por la Ribonucleasa.
Fuente: Corona, 2008.

Hidrólisis del ARN por Ribozimas

Hasta la década de los ochentas del siglo pasado se tuvo la creencia de que todas las enzimas eran sólo de origen proteico. Después de todo, las proteínas con su variedad de cadenas laterales son las más adecuadas para la catálisis química que otros biopolímeros. De aquí que el descubrimiento de que el ARN tuviera actividad catalítica y no sólo transfiera información genética fue algo sorprendente (Corona, 2008). El término que se acuñó para este tipo de ARN con actividad catalítica fue de “Ribozima”. Desde entonces se han descubierto varios ejemplos de ribozimas: la cabeza de martillo, la de forma de broche de

El efecto cinético isotópico de la ribozima VS muestra que la transferencia del ion hidrógeno ocurre en el estado de transición de la reacción de ruptura del sustrato. La estrategia catalítica requiere de un ácido y una base para llevarse a cabo la reacción. Las bases nitrogenadas adenina 759 y guanina 638 son las responsables de la catálisis. Estudios indican que en la reacción quien participa como base es la guanina 638 y como ácido la adenina 759 (Figura 5) (Wilson y col., 2010).

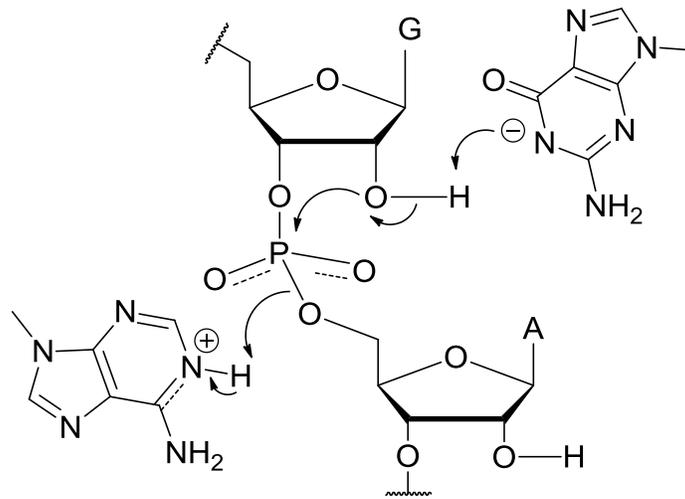


Figura 5. Propuesta del mecanismo de la reacción de ruptura del ARN por la ribozima VS.

Fuente: Wilson y col., 2010

En el mecanismo, el ion hidrógeno es removido del grupo alcohol del carbono 2 de la ribosa por la guanina 638. El grupo alcoxi que se forma actuará como nucleófilo sobre el grupo fosfato, mientras que el grupo saliente es protonado por la adenina 759 (Wilson y col., 2010).

Enzimas Artificiales

Al considerar el mecanismo de acción de las enzimas y de las ribozimas, los científicos se han dado a la tarea de imitar la actividad de estas macromoléculas para poder así

comprender el mecanismo de acción y crear aplicaciones en distintas ramas de la ciencia. Enzima artificial es el término acuñado por Ronald Breslow para las moléculas que imitan la actividad de una enzima. Durante las últimas décadas, los investigadores han creado enzimas artificiales como alternativas altamente estables y de bajo costo en una amplia gama de aplicaciones (Wei y Wang, 2013). Uno de los objetivos de estos ensayos es ayudarnos a comprender la relación entre la estructura y la actividad en un sitio enzimático utilizando la reactividad de un análogo biomimético estructuralmente similar (Boulatov, 2004).

Una reacción química en el laboratorio es muy diferente a las reacciones que suceden en los sistemas vivos. En un laboratorio las especies químicas atacan a un sustrato libre aleatoriamente en una disolución. Cualquier selectividad se debe a la reactividad particular de una sección del sustrato o por un impedimento estérico. Las reacciones que se llevan a cabo en un organismo vivo involucran enzimas, las cuales enlazan y orientan a los reactantes, lo cual se refleja en la selectividad que ofrecen para llevar a cabo una reacción (Breslow, 2009). Dentro de la amplia gama de aplicaciones que podemos encontrar para las ARNasas artificiales, es el posible empleo en el tratamiento de enfermedades producidas por virus, hongos, bacterias y algunos tipos de cáncer (lo anterior, mediante el desarrollo de nucleasas dirigidas a cadenas de ARN para que interrumpan el ciclo celular). Además, si de las anteriores se generan catalizadores que puedan hidrolizar selectivamente al ARN, se podría tener la inhibición selectiva de la expresión de ciertos genes por la modificación estructural de oligonucleótidos (Lönnberg y col, 1998).

Lo anterior, hace importante conocer las condiciones ideales en las cuales se imita de forma eficiente la actividad de este tipo de enzimas, como los microambientes de sus sitios activos, con el objetivo de maximizar la actividad catalítica. El impulso para el desarrollo de nucleasas sintéticas ha estimulado intensivos estudios de la catálisis de la hidrólisis de diésteres de fosfato en los últimos años (Suh y Seok, 2000). De acuerdo con estudios en esta área, el reconocimiento del sustrato, las interacciones específicas, la interacción entre los sitios catalíticos y los sitios de unión al sustrato han sido considerados como factores fundamentales para el diseño de una enzima artificial eficiente. Hasta ahora un gran número de enzimas artificiales se han construido en diferentes estructuras que van desde pequeños compuestos moleculares, polímeros, conjuntos supramoleculares y nanomateriales (Yin y col, 2012).

El diseño de nucleasas artificiales efectivas, necesita el conocimiento sobre varios aspectos de la hidrólisis de los diésteres de fosfato (Sánchez, 2010). Dentro de las consideraciones necesarias para llevar a cabo la imitación enzimática se debe tomar en cuenta al menos tres aspectos importantes: el mecanismo de acción, el sitio activo de la enzima en conjunto con su microambiente y el sustrato.

Catálisis Acido-Base General

No todas las enzimas contienen metales en su sitio activo. Muchas dependen de cadenas de aminoácidos colocadas estratégicamente para interaccionar 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 la catálisis del ARN a través de un mecanismo ácido-base general donde un residuo de un aminoácido del sitio dona un ion hidrógeno (H^+) a la especie que lleva carga negativa en el estado de transición. Además, una base general elimina un protón (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:

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

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

Un modo de discriminar experimentalmente entre ambas rutas es realizar experimentos con una serie de 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). Sin embargo, si en el primer experimento obtenemos una gráfica con pendiente de cero y en el segundo una gráfica en donde exista una dependencia de la constante de rapidez con la fracción de neutralización (que está directamente relacionada con la concentración de los iones hidronio e hidróxido) con pendiente mayor a cero, estaremos en el caso de una reacción catalizada por la ruta ácido-base específica (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 un ácido débil y su base conjugada. La mayoría de los estudios cinéticos se han realizado en amortiguadores de pH con imidazol para elucidar los mecanismos posibles para la catálisis de la ARNasa A, ya que en ésta los grupos imidazol de las dos cadenas laterales de histidina son parte clave en la hidrólisis (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 6) 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).

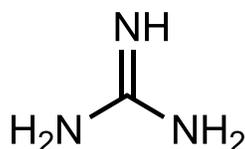


Figura 6. Molécula de Guanidina

La actividad biológica de la guanidina, su particular estabilidad termodinámica, la alta basicidad en disolución acuosa y las 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- π 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 atribuye a la estabilización por resonancia (Figura 7) (Ishikawa, 2009).

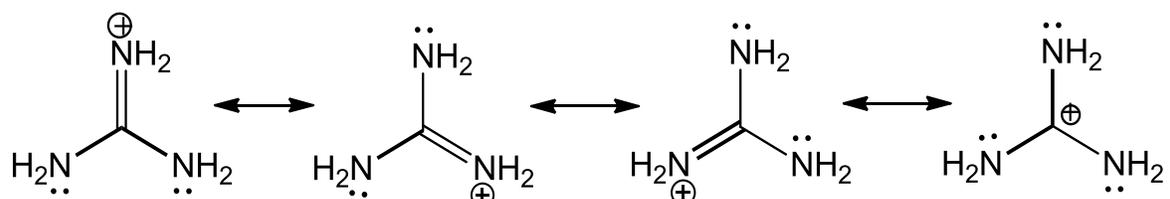


Figura 7. Estructuras de resonancia de la Guanidina.

La guanidina posee tres átomos de nitrógeno susceptibles a ser protonados. La conjugación n- π 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).

El Uso de Disolventes para la Hidrólisis Biomimética

El dominio catalítico de las enzimas es notablemente atribuido a una combinación de efectos, incluido el efecto del medio (Hollfelder y col., 2001). A diferencia de los receptores biológicos, que funcionan casi exclusivamente en el agua, los receptores sintéticos operan en muchos disolventes, lo que permite modificar o mejorar las interacciones intermoleculares, como enlace de hidrógeno (Wiskur y col., 2004). Se conoce de informes científicos que la transesterificación catalítica de ésteres de fosfato transcurre más rápido en disolventes orgánicos que en agua. Sin embargo, se conoce muy poco acerca del mecanismo mediante el cual se lleva a cabo esta transesterificación en ausencia de metales (Sánchez, 2010).

La aceleración de la velocidad de reacción que provocan las enzimas en las reacciones de transferencia de grupos fosforilo depende fuertemente del microambiente en el sitio activo. Algunos cálculos hechos para la reacción que cataliza la nucleasa del estafilococo muestran que la constante de velocidad puede ser incrementada en un factor de 10^{17} como consecuencia de la desolvatación del sustrato. Lo anterior inhibe la formación de enlaces de hidrógeno, y a través de un sitio activo preorganizado donde se encuentran ácidos y/o bases débiles en un ambiente con baja permitividad dieléctrica. Por ello, el uso de medios no acuosos es una aproximación que resulta apropiada para imitar el microambiente al interior de las enzimas naturales (Sánchez, 2010).

Los disolventes orgánicos tienen la ventaja de proporcionar un medio de constante dieléctrica baja, en la que pueden tener lugar fuertes interacciones eléctricas entre los reactivos. El interior no polar de las enzimas que ofrece la célula viva es equivalente al uso de solventes orgánicos usados en el laboratorio (Kirby y Hollfelder, 2009). Poner una molécula de sustrato en un disolvente orgánico se considera, por lo tanto, comparable a su unión a un sitio activo en el “núcleo hidrofóbico” de una enzima. La reactividad puede mejorar mediante el efecto hidrofóbico, especialmente la solvatación específica o la eliminación del disolvente, y las interacciones electrostáticas fuertes entre dipolos en un medio de baja polaridad (Kirby y Hollfelder, 2009).

Efecto del Disolvente

Las reacciones químicas se pueden realizar en fase gaseosa, líquida o en estado sólido, pero, por buenas razones, la gran mayoría de las transformaciones químicas se lleva a cabo en fase líquida, es decir, en disolución (Reichardt, 2007).

El efecto del disolvente engloba a los efectos que un disolvente determinado tiene sobre la reactividad química. Entre dichos efectos se encuentran el efecto en la rapidez y equilibrio de una reacción, por esta razón la elección de un disolvente nos permite tener control sobre una reacción química (Reichardt, 2007).

La sensibilidad de una reacción química a los disolventes ha intrigado a los químicos por mucho tiempo. En las últimas décadas, se han diseñado diferentes técnicas experimentales con el fin de investigar el papel de los disolventes sobre una reacción (Audran G y col., 2012).

Efecto 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 interactúan 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 generan 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 siguiente ecuación (Cox, 2013):



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

Efecto sobre la Rapidez de Reacción

Generalmente, la reactividad y el mecanismo de reacción se visualizan como el comportamiento de moléculas aisladas, en donde el disolvente se ve sólo como un soporte para llevar a cabo dicha reacción. Sin embargo, un disolvente o una mezcla de disolventes pueden influir en la rapidez de las reacciones químicas (Reichardt, 2003).

La dependencia de la rapidez de reacción con el medio puede, en principio, ser abordado desde dos puntos de vista. El primero con la comparación de las tasas de reacción en fase gaseosa y en disolución. El segundo, con la comparación de la rapidez de reacción en disolventes diferentes. Hasta hace poco, muy pocas reacciones que se producen en disolución habían sido examinadas en fase de gas. Por lo tanto, la comparación se ha limitado esencialmente a la comparación de la rapidez en diferentes disolventes. Por ejemplo, las reacciones que siguen mecanismos iónicos con considerable separación de carga o dispersión de carga durante la activación, tales como las de transferencia de protones o reacciones S_N2 , son investigadas en disolución (Reichardt, 2003).

La variación de la naturaleza del medio se manifestará en el cambio de la rapidez de reacción observada o en la proporción relativa de los productos formados cuando el disolvente interacciona con el estado de transición de una reacción, aunque puede no verse afectado el mecanismo general de reacción (Castellanos y col., 2001).

Efecto Hidrofóbico

El efecto hidrofóbico describe el fenómeno que se observa cuando sustancias no polares se mantienen juntas para minimizar su contacto con el agua. Es la base de una gran variedad de fenómenos químicos y biológicos, tales como la estabilización de la estructura terciaria de las proteínas, los hidratos del metano, la formación de micelas y liposomas, el efecto limpiador de los jabones y detergentes, la formación de membranas biológicas, entre otros. Este efecto se produce cuando se mezcla un compuesto no polar con un disolvente polar capaz de formar enlaces de hidrógeno, un ejemplo clásico es el agregar aceite al agua. Desde el punto de vista termodinámico, el efecto hidrofóbico es un proceso conducido por la entropía más que por la entalpía debido al ordenamiento molecular más que a la fuerza de las interacciones formadas (Corona, 2006).

El efecto hidrofóbico tiene un efecto pronunciado en la estructura de las proteínas. Regiones de estas pueden estar compuestas por aminoácidos con cadenas laterales predominantemente hidrofóbicas (Cragg, 2010). Cuando una cadena polipeptídica se enrolla en su estructura tridimensional en disolución, los aminoácidos no polares quedan hacia el interior de la macromolécula, teniendo poco o ningún contacto con el agua. En tanto las cadenas laterales polares de los aminoácidos descansan en el exterior. (Corona 2006). Esto permite que las proteínas se unan a sustratos hidrofóbicos, de tal forma que beneficiará la interacción enzima-sustrato. (Cragg, 2010).

Estudios de la Hidrólisis del ARN y su Molécula Modelo

El estudio de la reactividad del ARN es complicado ya que la estabilidad del enlace fósforo-oxígeno depende fuertemente de la estructura secundaria del biopolímero. En las estructuras de doble hélice el apilamiento de bases entre las cadenas dificulta la salida del nucleótido al adoptar una posición apical en el intermediario fosforano; otra dificultad al trabajar con ARN es que las ribonucleasas naturales se encuentran presentes y pueden afectar los resultados (Taran, 2006). En este sentido, se opta por el 2- hidroxipropil *p*-nitrofenil fosfato (HpNPP) (Figura 8) como análogo del ARN (Taran, 2006). Con este modelo, los requerimientos para una catálisis efectiva son menos rígidos, si tomamos en

cuenta que el sustrato en sí mismo contiene al nucleófilo, lo cual que permite examinar los efectos del disolvente en su transesterificación y así obtener información sobre el diseño de microambientes de nucleasas artificiales efectivas (Hong y Suh, 2000).

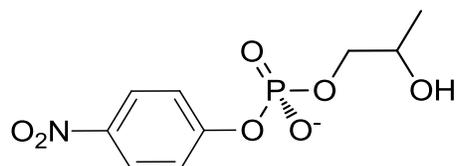


Figura 8. Estructura del 2-hidroxiopropil *p*-nitrofenil fosfato (HPNPP)

Ruptura del 2- hidroxiopropil *p*-nitrofenil fosfato (HpNPP) en Mezclas de Disolventes con Guanidina como Catalizador

Desde hace tiempo se ha estudiado la ruptura del ARN utilizando el HpNPP como modelo, un ejemplo son los trabajos de Kallese quien utilizó el grupo guanidinio como agente hidrolizante; en el estudio se observaron el efecto de cambio de estructura del catalizador y los efectos del disolvente. Para ello se varió la cadena alifática de los compuestos bis(guanidinio), colocando una unidad aromática, entre otros grupos. El efecto del disolvente se analizó utilizando agua y acetonitrilo. Las condiciones de reacción en agua fueron de pseudoprimer orden usando una concentración del sustrato HpNPP 5 veces menor que el catalizador, mientras que en acetonitrilo se consiguió el mismo efecto con la concentración del sustrato 100 veces menor que el catalizador (Kallese, 1997).

Para los estudios en acetonitrilo se observó que a medida que aumenta la cadena alifática en los grupos bis(guanidinio) baja la actividad del catalizador, mientras que al colocar grupos aromáticos como espaciadores aumentó la actividad lográndose un máximo con el compuesto que tiene un espaciador aromático y dos grupos aminoimidazolio. Observaron que al agregar más de 0.1% de agua la contribución de la hidrólisis espontánea por hidróxido es mayor (Kallese, 1997).

Posteriormente, otro grupo reportó un estudio cinético de la reacción de transesterificación del HpNPP (Figura 9) en la mezcla dimetilsulfóxido-agua a 37°C en presencia de diferentes amortiguadores ácido-base como catalizadores (guanidina,

acetamidina, piperidina, benzamidina, aminoguanidina y metilamina), con el fin de proponer los posibles mecanismos involucrados en la catálisis con distintos pares de ácido-base (Corona y col., 2010).

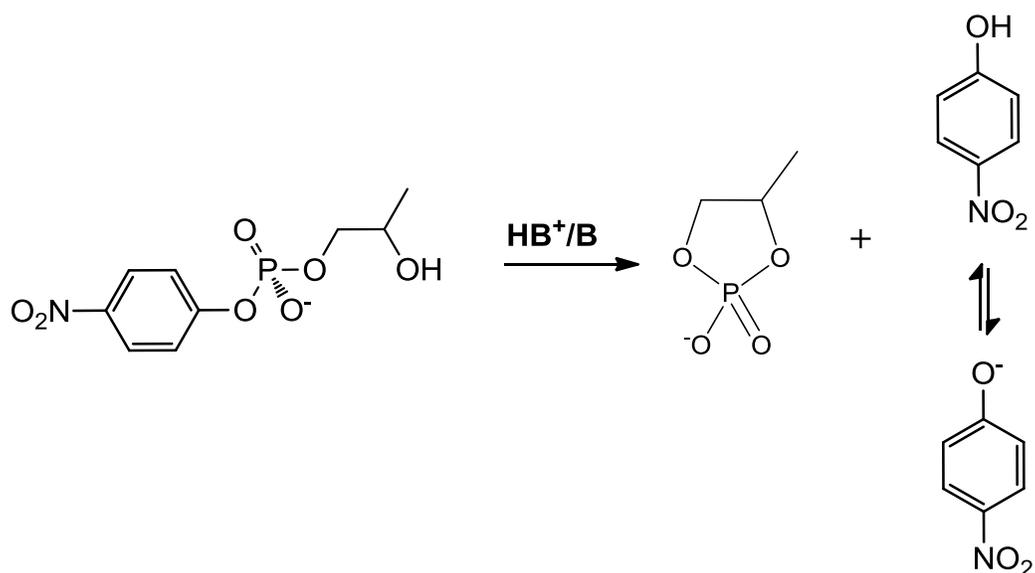


Figura 9. Transesterificación del HpNPP con amortiguadores de pH.

Fuente: Corona y col., 2010

Para determinar el mecanismo se llevaron a cabo perfiles de la variación de la constante de rapidez observada con la concentración total del amortiguador (a varios grados de neutralización), y perfiles de variación de la constante de rapidez observada con el grado de neutralización (con la concentración del amortiguador constante). También se analizó el efecto cinético isotópico del disolvente en mezclas con agua deuterada y relaciones de Brønsted. Los resultados obtenidos por este grupo de investigación muestran que la rapidez de la reacción es óptima en la proporción 4:1 DMSO:H₂O volumen/volumen. La catálisis que se llevó a cabo mostró un perfil de campana que demuestra que la catálisis es bifuncional (figura 10). El análisis de todos los datos mostró que el posible mecanismo de la reacción involucra dos rutas, tal como se muestra en la siguiente ecuación: $k_{obs} = k_1 [B] + k_2 [B] [HB^+]$. En esta ecuación se muestra la catálisis realizada por la base general y la catálisis bifuncional. De la última, en estudios más detallados se encontró que la participación de la forma ácida es como un estabilizador electrostático del grupo fosfato. Lo

anterior puede considerarse como una imitación del mecanismo enzimático de la ARNasa A (Corona y col., 2010).

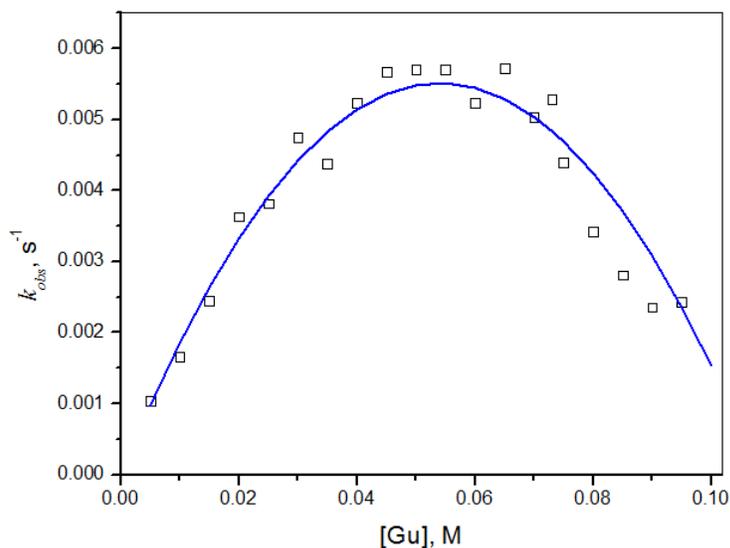


Figura 10. Perfil de Neutralización del amortiguador formado a partir de guanidina.

Fuente: Corona y col., 2010

Otros grupos de investigación han evaluado la hidrólisis del ARN basados en modelos como el HpNPP, utilizando diferentes catalizadores en mezclas de disolventes orgánicos con agua. Especial atención se ha dedicado a la utilización de diferentes estrategias para llevar a cabo la catálisis con guanidinio en combinación con otras unidades activas, tales como cationes metálicos (Aoki y col., 2002), polímeros (Saveli y Salvio, 2015), nanopartículas (Salvio y Cincotti, 2014), entre otros.

Con el objetivo de aprovechar la cooperación del amortiguador formado por guanidina/guanidino intramolecularmente, Baldini y col. informaron la síntesis de guanidinocalixarenos (Figura 11) y del estudio de la transestrificación del HpNPP en la mezcla de DMSO/agua con la proporción 4:1 respectivamente (Baldini y col., 2012).

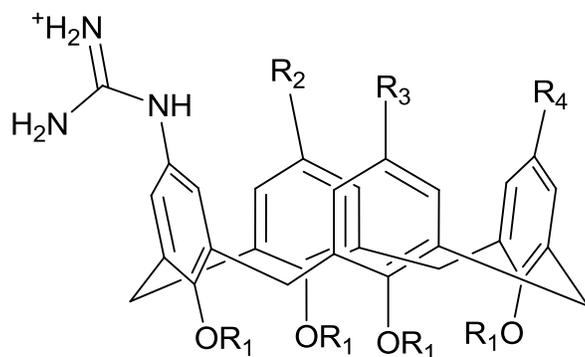


Figura 11. Estructura general de los guanidinocalixarenos.

Fuente: Salvio, 2015.

Los resultados obtenidos por estos investigadores muestran que el requisito para que exista la catálisis es la presencia de una guanidina neutra que actúa como base general y otra protonada que actúa como un activador electrofílico. De igual forma resaltan la importancia de la molécula que forma un espaciador entre las fracciones del amortiguador y cómo ésta genera un impacto en la constante de rapidez observada para la catálisis del HpNPP (Baldini y col., 2012). Investigaciones como estas apoyan el diseño de fosodiesterasas artificiales basadas en guanidina como el catalizador de elección sobre la hidrólisis del ARN basados en modelos como el HpNPP (Salvio, 2015).

MATERIALES Y METODOS

Sustrato

Para la realización de los estudios cinéticos se empleó como sustrato el diéster de fosfato, 2-hidroxipropil *p*-nitrofenilfosfato (HpNPP) con masa molar de 276.16 g/mol. El sustrato fue sintetizado de acuerdo a lo informado por Brown y Usher (Brown y Usher, 1965) con la reacción del 4-nitrofenilfosfato y el óxido de propileno y fue proporcionado por el director del proyecto. Este compuesto es un modelo del ARN ampliamente utilizado. Su reacción de ruptura es irreversible y da como producto el 4-nitrofenolato en valores de pH alcalinos (Figura 12). Este último es fácilmente detectable por espectrofotometría del ultravioleta visible, debido a que tiene una banda característica en la región del visible a 400 nm en agua.

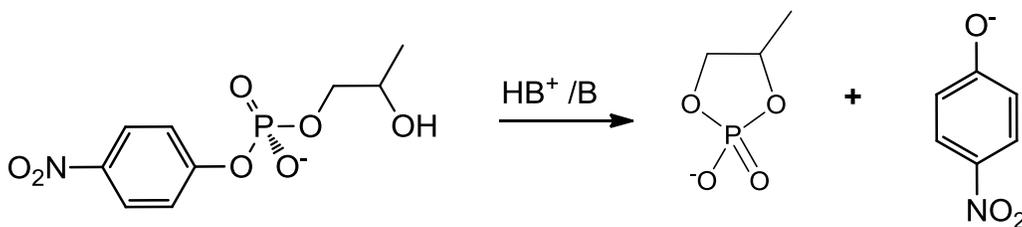


Figura12. Reacción de transesterificación del HpNPP.

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 MΩ que equivale a 0.055 microsiemens. La acetona que se utilizó fue adquirida de Aldrich con una pureza del 99.9% y fue utilizada sin ningún tratamiento previo. En todos los ensayos se utilizaron mezclas acetona-agua, las mezclas evaluadas se hicieron desde 10% hasta el

80% de acetona y el resto de agua. Con un incremento de 10% de acetona en cada mezcla estudiada hasta llegar a 80% de acetona.

Reactivos

Para la realización de los experimentos se utilizó hidróxido de tetrametilamonio ($M = 181.23 \text{ g mol}^{-1}$, pureza del 97%), cloruro de tetrametilamonio ($M = 109.60 \text{ g mol}^{-1}$, pureza del 99%), cloruro de guanidinio ($M = 95.53 \text{ g mol}^{-1}$, pureza del 99 %), ácido clorhídrico ($M = 36.46 \text{ g mol}^{-1}$, densidad = 1.2 g/mL, pureza del 37%) e hidrógeno ftalato de potasio ($M = 204.22 \text{ g mol}^{-1}$, pureza del 99.95 %). Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma Aldrich y fueron usados sin tratamiento previo. El amortiguador usado como catalizador se generaba *in situ* con el cloruro de guanidinio y el hidróxido de tetrametilamonio en proporciones estequiométricas adecuadas.

Equipo

Las mediciones espectrofotométricas se hicieron en un espectrofotómetro modelo Cary 60 de doble haz de luz (con lámpara de Xenón), equipado con multicelda y un recirculador de agua PCB1500, ambos equipos de marca Agilent Technologies. Las titulaciones para conocer los valores de pK_w y pK_a se hicieron con un potenciómetro digital marca Metrohm modelo 780, con el uso de un electrodo de vidrio marca Metrohm (aquatrodo). Para calibrar el potenciómetro se usaron amortiguadores de referencia frescos a 25 °C con valores de pH de 4.00, 7.00 y 9.00. El potenciómetro una vez hecha la calibración, hizo la corrección del valor de pH a la temperatura de trabajo. Durante los experimentos se mantuvo constante la temperatura a 37 °C utilizando un baño de recirculación de agua marca Julabo modelo FP45-HL.

Programas

El análisis de los datos obtenidos de los experimentos cinéticos y de las titulaciones potenciométricas para determinar las constantes de rapidez y la constante de ionización del agua en las diferentes mezclas, se hizo con el programa OriginPro™ versión 9.0 de 64 bits. Los valores de pK_a fueron calculados utilizando el programa Hyperquad 2008 versión 2.1 NT.

Estudios Cinéticos

Las reacciones con el HpNPP (Figura 13) se siguieron espectrofotométricamente con la medición de la aparición del anión 4-nitrofenolato. Durante la síntesis del sustrato se forma un isómero de la molécula del HpNPP, el cual también es considerado en la reacción. La hidrólisis del isómero es mucho más rápida debido a que el grupo hidroxilo presenta menor impedimento estérico (ya que es primario), lo cual permite que la desprotonación ocurra de más rápido y con esto comienza la reacción de transesterificación. El isómero del sustrato es considerado también en los ajustes de las curvas de todas las cinéticas que se llevaron a cabo.

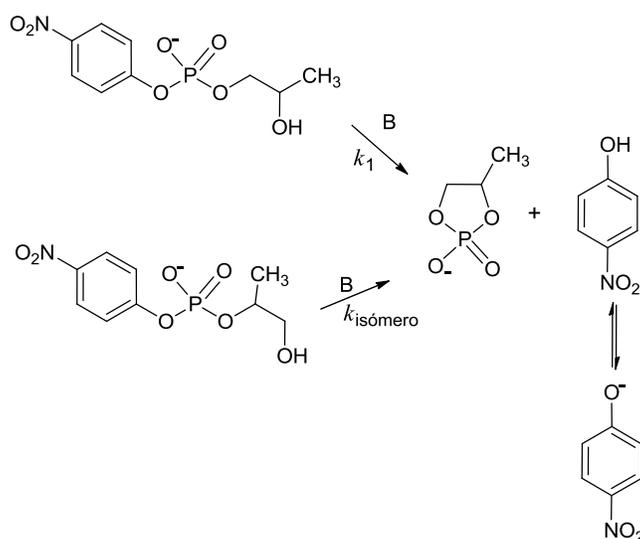


Figura 13. Reacción general observada de hidrólisis de HpNPP

La solución del sustrato se preparó en agua, haciéndola pasar por una columna con resina Amberlite IR-120H de intercambio iónico para eliminar el catión Ba²⁺ (para purificar el sustrato, el mismo es transformado en la sal de bario, de ahí la necesidad de removerlo), que puede ocasionar interferencia con los estudios cinéticos.

Para los estudios cinéticos se utilizaron mezclas de acetona con agua en una proporción variable volumen/volumen desde 10 hasta 80 por ciento de acetona para cada perfil. Las mezclas se elaboraron incrementando 10 por ciento de acetona en cada mezcla hasta llegar a 80 por ciento. La disolución madre del sustrato HpNPP se hizo sólo en agua y fue de una concentración 1 mM. Todas las mediciones se llevaron a cabo en celdas de cuarzo de 1 cm de longitud. El volumen dentro de las celdas fue de 2.5 mL y la temperatura de todos los experimentos fue de 37°C. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de una alícuota de la disolución del HpNPP.

En estos experimentos se monitorizó la formación del producto de la transesterificación intramolecular del HpNPP, el 4-nitrofenolato. Para ello se obtuvo el valor de absorptividad molar en las condiciones del experimento ($\epsilon = 18,000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para la mezcla con 10% de acetona hasta $\epsilon = 25,000 \text{ Lmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en la mezcla de 80% de acetona) en la longitud de máxima absorción (en la mezcla al 80% de DMSO agua fue de 410 nm). En las cinéticas se tuvieron condiciones de pseudoprimer orden, es decir, el sustrato se mantuvo a una concentración mucho menor que la de las bases usadas (20 μM), para realizar el análisis como cinéticas de primer orden.

En todas las cinéticas con guanidina, la transesterificación fue completa, por ello las constantes de rapidez observadas se obtuvieron mediante el ajuste no lineal de la siguiente ecuación.

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

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, ΔA_{∞} es la diferencia entre la absorbancia inicial y la infinita, A_0 es la absorbancia al inicio, k_{obs} es la constante de rapidez observada y t es el tiempo. En la Figura 14 se muestra un ejemplo de un ajuste con la ecuación mencionada anteriormente.

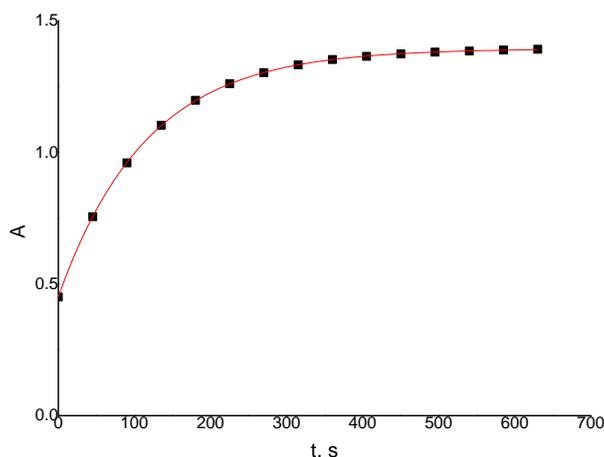


Figura 14. Ajuste de la ecuación para formación del 4-nitrofenolato.

Perfil de Concentración

Para conocer el efecto que tiene la concentración del amortiguador (catalizador) sobre la reacción de ruptura del sustrato, se elaboraron perfiles donde se hizo variar la concentración del amortiguador desde 0.008 a 0.16 M, a una fracción de neutralización del amortiguador constante del 50% en todas las mezclas realizadas de acetona-agua. Con este perfil se buscó conocer si existe la catálisis o no. En caso de existir, con este perfil se puede conocer el orden respecto al catalizador.

Las opciones posibles más comunes se ilustran en la figura 15. En la curva **a** se observa un comportamiento de orden cero respecto al catalizador lo cual indica que no existe la catálisis. Esto se presenta porque 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 ($y = k_{cat}[Cat]_T + k_0$). Esto podría deberse a la participación de alguna de las especies (la forma ácida o la forma básica) del amortiguador (catalizador).

Finalmente, en la curva **c** vemos un comportamiento cuadrático, característico de una reacción de segundo orden ($y = k_{cat}[Cat]_T^2 + k_{cat}[Cat]_T + k_0$). Este tipo de perfiles puede

deberse a una contribución de segundo orden de la base, del ácido o bien de ambos al mismo tiempo.

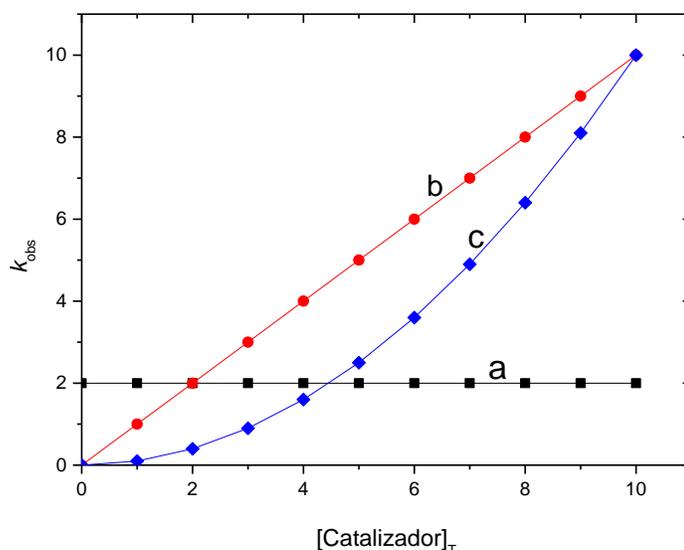


Figura 15. Perfiles posibles de la variación de las constantes de rapidez en función de la concentración del catalizador: (a) perfil de orden cero, (b) perfil de primer orden y (c) perfil de segundo orden.

Para generar estos perfiles, se varía la concentración del catalizador en cada una de las celdas, manteniendo constante el perfil de neutralización, la proporción del disolvente y la concentración del sustrato (en condiciones de pseudoprimer orden).

Perfil de Neutralización

Para conocer las especies del amortiguador que participan en el mecanismo de la reacción de transesterificación del HpNPP, se elaboraron perfiles de neutralización en cada mezcla de acetona-agua a estudiar. En este tipo de perfiles se mantuvo la concentración total del amortiguador constante en un valor de 0.1 M y se hizo variar la fracción del amortiguador desde 0.1 a 0.9 (es decir, del 10 al 90% de neutralización).

Con la elaboración de estos tipos de perfiles se buscó conocer que fracción del amortiguador era la que beneficiaba a la catálisis. En el caso en el que ambas fracciones del amortiguador sean las que llevan a cabo la catálisis, se obtiene un perfil característico de una curva en forma de campana.

Cálculo de la constante de catálisis básica específica

Para confirmar o descartar la contribución de la catálisis básica en la transesterificación del HpNPP, se elaboraron perfiles de dependencia de la constante catalítica respecto a la concentración de hidróxido. Para este perfil, se utilizó hidróxido de tetrametilamonio como base y la concentración se hizo variar desde 0.002 a 0.02 M. Los experimentos se realizaron en todas las mezclas de acetona-agua estudiadas. Para conocer esta contribución se debe obtener la constante de la catálisis básica en cada mezcla de acetona-agua. Esta constante se obtuvo con las pendientes de las curvas obtenidas en cada mezcla ($k_{obs} = k_{OH}[OH]$)

Estudios Potenciométricos

Las titulaciones se realizaron en mezclas de acetona-agua a 37°C en una celda de vidrio, cerrada y de 30.0 mL; el volumen inicial de las disoluciones a titular fue de 25.0 mL. Las disoluciones a titular se burbujearon con N₂ y se mantuvieron en atmósfera de nitrógeno durante todo el experimento para evitar la presencia de CO₂ en disolución ya que la presencia de carbonatos dificulta el alcance del equilibrio en el electrodo después de cada adición de titulante. El potenciómetro se calibró usando amortiguadores de referencia a 25°C, pH 4.00, 7.00, 9.00.

Para conocer el *pKa* se utilizó como electrolito soporte cloruro de tetrametilamonio para ajustar la fuerza iónica a una concentración 0.1 M. Se utilizó cloruro de guanidinio con concentración de 0.1 M para ser valorado. Como titulante se usó hidróxido de tetrametilamonio cuya concentración fue de 0.05 M en cada mezcla de acetona-agua. El titulante también estaba en disoluciones que contenían el mismo porcentaje de acetona y

agua de la mezcla a titular. Después de las titulaciones potenciométricas, los valores de pK_a fueron calculados utilizando el programa Hyperquad 2008.

Previo a estas titulaciones, se determinó el pK_i de cada mezcla de acetona-agua realizada a 37°C con la valoración de 25 mL de una solución con una fuerza iónica de 0.1 M de cloruro de tetrametilamonio y ácido clorhídrico como valorante con concentración de 0.01 M (previamente valorado) y con hidróxido de tetrametilamonio para ser valorado. Se tomaron al menos 15 puntos antes y después del punto de equivalencia para poder realizar los ajustes.

La obtención de la constante de disociación del agua K_i en la mezcla acetona-agua, usada para calibrar el electrodo, se determinó con un ajuste no lineal mediante la ecuación de la gráfica de volumen de base añadido contra el pH (Johansson y Johansson, 1978); para la obtención de la constante K_i se utilizó la ecuación que se muestra a continuación:

$$V = \frac{V_0(C_A + 10^{(pH-pK_i)} - f10^{-pH})}{C_B + f10^{-pH} - 10^{(pH-pK_i)}}$$

Donde V es el volumen añadido, C_B es la concentración de la base añadida, V_0 es el volumen inicial del ácido, C_A es la concentración del ácido, pH es el valor de pH medido, pK_i es el menos logaritmo del producto iónico del agua en este medio (K_i) y f es un factor de corrección que es una función de los coeficientes de actividad y la diferencia en el potencial de la interfase del electrodo (potencial de unión). De la ecuación anterior al despejar el volumen añadido (V) y al agrupar términos se obtiene la siguiente ecuación que es a que se utiliza para la titulación de un ácido fuerte con base fuerte:

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

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

En las titulaciones hechas, la concentración de la base añadida, el volumen inicial, los volúmenes adicionados, la concentración exacta del ácido fuerte a titular y los valores de pH para cada adición eran conocidos, por lo que fue posible calcular el valor de pK_i y de f . Una vez obtenidos los valores de f , se corrigieron los valores de pH observados restándoles el logaritmo de f ($pH_{corr} = pH - \log f$). Los valores obtenidos de pK_i de la mezclas acetona-agua a 37.0°C se mostrarán en el próximo capítulo. En la figura 16 se muestra un ejemplo de las gráficas obtenidas y del ajuste por la ecuación despejada.

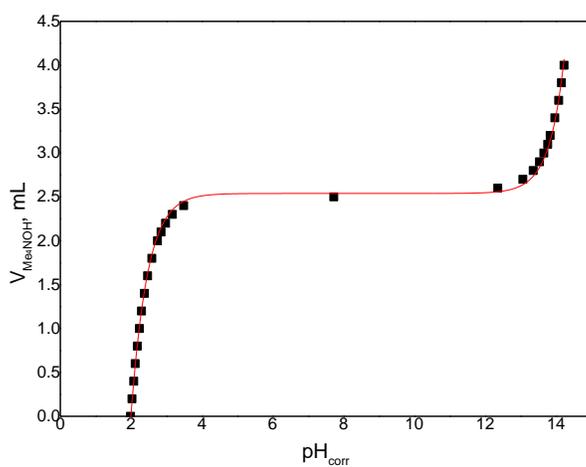


Figura 16. Gráfica de volumen de base añadida contra el pH.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

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

Primero se hizo el estudio del efecto de la concentración total del catalizador (guanidinio) en las diferentes mezclas acetona-agua (desde 10 hasta 80 por ciento de acetona, para conocer el efecto del disolvente sobre la catálisis del sustrato) 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 acetona-agua para conocer las especies involucradas en el mecanismo de reacción de ruptura del HpNPP. Con este experimento también se podrá conocer en qué mezclas de disolventes se podría tener una catálisis bifuncional. De acuerdo con los resultados obtenidos en esta fase, se requirió conocer 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.

También fueron determinados los valores de pKa de la guanidina en todas las mezclas acetona-agua. Así mismo, se determinó el valor de la autoionización del agua (pKw) en las diferentes mezclas de acetona-agua usadas, para poder conocer la concentración de iones hidróxido en los diferentes amortiguadores utilizados en los experimentos.

Determinación de los Valores del pKw del Agua y del pKa de Guanidinio en las Mezclas Acetona- Agua

Como el presente trabajo se realizó en mezclas de acetona-agua a una temperatura constante de 37°C, los valores de pKa de la guanidinio determinados en agua a 25°C no pueden utilizarse, dada la dependencia de la temperatura y de la mezcla de disolventes utilizados. Primero se buscó si existían informes sobre la determinación del pKa de la guanidinio en las mezclas de acetona-agua que se utilizaron. Al no encontrarse en las condiciones de trabajo empleados, se decidió determinarlos a partir de titulaciones

potenciométricas. Para facilitar las mediciones de pH del electrodo en este medio, se utilizó cloruro de tetrametilamonio como electrolito de soporte.

Antes de hacer la medición del valor pKa de guanidina se determinaron los valores de la constante de autoionización del agua (pKw) de todas las mezclas utilizadas bajo las mismas condiciones. Los valores del pKw en cada mezcla de disolvente se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1. Valores de pKw a 37°C en las diferentes mezclas de acetona-agua.

Porcentaje de Acetona	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%
pKw	13.77	14.02	14.3	14.43	14.78	15.29	15.87	16.48

En la tabla 1 se puede notar que los valores de aumentan notablemente conforme aumenta el porcentaje en volumen de acetona. Sin embargo, antes del 50% de acetona el aumento es de menos de una unidad del valor de pKw. A partir del 50% de acetona, el aumento es de casi 0.5 unidades por cada porcentaje. En la figura 17, podemos ver el comportamiento mencionado. En el gráfico se observa un cambio de pendiente en 50% en volumen de acetona.

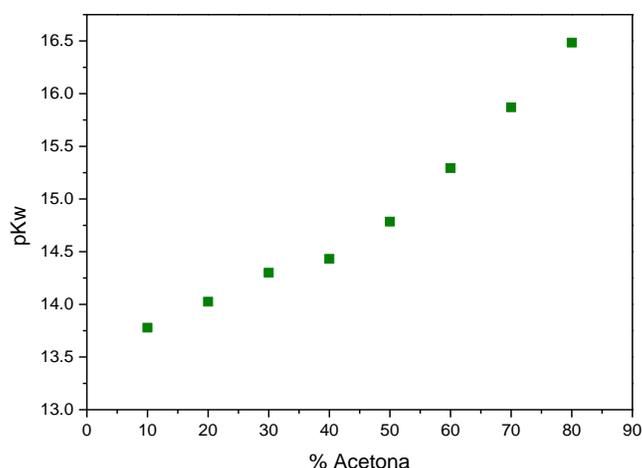


Figura 17. Relación de los valores de pKw determinados en las mezclas de acetona agua.

Ya que en la gráfica del valor de pKw en función del porcentaje en volumen de acetona, no tenemos una correlación clara, se buscaron otras opciones para analizar el

efecto de la acetona sobre el valor de pKw en cada mezcla. La primera correlación que se hizo fue con la fracción molar de acetona, es decir la relación en moles de moléculas de cada componente del disolvente. La gráfica se muestra en la Figura 18. En ella podemos observar un comportamiento lineal del pKw con relación al contenido de acetona. A mayor contenido de acetona el valor de pKw aumenta, lo que es de esperarse ya que la acetona es menos polar que el agua y además tiene una permitividad dieléctrica menor. Esto genera que el agua se disocie menos y por ende su valor de pKw aumente. Al gráfico se le hizo un ajuste lineal, la ecuación de la recta obtenida fue: $pKw = 5.81X_{acetona} + 13.68$, con un valor de r^2 de 0.995. El valor del intercepto es muy cercano al valor informado para el agua a la temperatura de trabajo. En el caso de la pendiente, el valor de 5.81 nos permite esclarecer que por cada aumento de 0.1 unidades en la fracción molar, el aumento del pKw será de 0.58 unidades. Lo anterior es de suma importancia porque entre mayor contenido de acetona en el medio, menor será la cantidad de los iones hidrógeno e hidróxido generados por el medio. Es posible que esto último permita observar una catálisis por guanidina sin la contribución notable de la catálisis por los iones hidróxido. En el caso del análisis en función de la permitividad dieléctrica del medio no hubo una tendencia clara, por lo tanto, no se informa de su análisis.

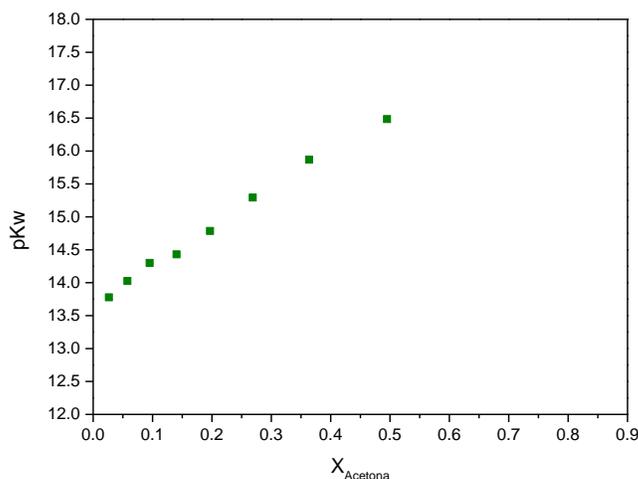


Figura 18. Relación de los valores de pKw determinados en las mezclas de acetona agua en función de la fracción molar.

Existe un informe para valores de pKw en mezclas binarias formadas por acetona y agua. Desafortunadamente, los valores determinados por el grupo de Woolley se

encuentran a una temperatura de 25°C y en mezclas menores al 50% de acetona. En la tabla 2 se muestran los valores obtenidos por este grupo y los valores determinados en el presente trabajo (Woolley y col., 1977).

Tabla 2. Comparación de valores de pKw en mezclas acetona-agua.

Porcentaje de acetona en volumen	pKw, 25°C * (Woolley y col., 1970)	pKw, 37°C
10%	14.3	13.77
20%	14.68	14.02
30%	15	14.3
40%	15.36	14.43
50%	15.78	14.78

*Valores reportados por Woolley y colaboradores (1977).

En la tabla se puede observar que los valores en ambas columnas aumentan en la misma proporción, sin embargo muestran diferencias en los valores de pKw para el mismo porcentaje. Este comportamiento es de esperarse pues la temperatura aumentó, lo que genera que la constante de autoionización del agua aumente y por ende el pKw disminuya. El análisis comparativo para el pKw en las mezclas de acetona-agua a 37°C con otros informes se dificulta al no contar con datos bajo las mismas condiciones, sin embargo existe una tendencia similar en los valores comparados.

Para conocer los valores de pKa se realizaron las titulaciones agregando alícuotas de soluciones (mezclas acetona-agua) de hidróxido de tetrametilamonio. Cada vez que se añadía un alícuota se anotaba el valor del pH medido por el potenciómetro. El valor de pH mostrado en el potenciómetro se corrigió para el análisis de los datos como se menciona en la sección de materiales y métodos. En la figura 19 se muestra la curva de valoración del cloruro de guanidinio obtenida mediante el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos. Una vez hechas todas las valoraciones potenciométricas se analizaron las curvas obtenidas con el programa hyperquad para obtener los valores de pKa. Los valores promedio obtenidos de guanidinio para cada mezcla de acetona agua se muestran en la tabla 3.

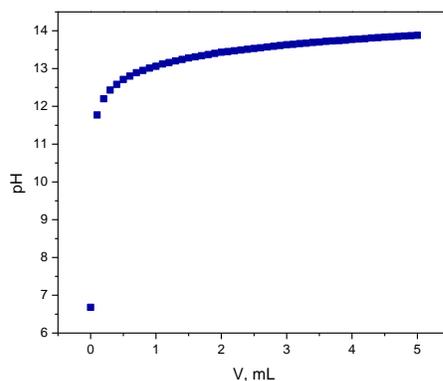


Figura 19. Curva de valoración del cloruro de guanidinio a 37°C en la mezcla de 70% de acetona.

Tabla 3. Valores del pKa de guanidinio a 37°C en las diferentes mezclas acetona-agua.

Porcentaje de Acetona en volumen	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%
pKa	13.1	13.2	13.3	13.5	13.6	13.63	13.65	13.88

En los resultados de la tabla 3 se observa que el valor de pKa del guanidinio aumenta en menos de una unidad conforme aumenta el porcentaje de acetona. Por lo que podemos concluir que el efecto de la acetona en las mezclas no afecta en gran medida el valor del pKa. Esto es razonable ya que el guanidinio es un ácido catiónico, y cuando se disocia, genera ion hidrógeno y guanidina (especie neutra), lo que no tendrá un aumento significativo en las energías de Gibbs de transferencia de fase. En 2012, en el grupo de Yatsimirsky se informa del valor determinado en mezclas binarias de DMSO-agua para guanidinio. Para la mezcla que contiene 80% de DMSO el valor del pKa del guanidinio es de 13.8 (Corona y col., 2012), valor similar al obtenido en la mezcla de acetona-agua en la misma proporción que es de 13.9. La diferencia del valor del pKa determinado en este trabajo, en comparación en las mezclas binarias es de 0.1. Este comportamiento es muy razonable pues el guanidinio es un ácido catiónico, lo que lo hace poco sensible a la polaridad del disolvente y a la permitividad dieléctrica del mismo, ya que no hay variación de carga en el equilibrio. Cualquier variación es debida a una pequeña estabilización

particular de la estructura química del ácido catiónico en el disolvente (Cox, 2013). Basados en esta información y el informe del valor en la mezcla DMSO-agua 4:1, encontramos que es de esperarse que el valor de pKa del guanidinio se mantenga estable en mezclas binarias con alto contenido de disolvente orgánico.

La estabilidad del valor del pKa podría tener un efecto positivo en la búsqueda de una catálisis por la forma ácida y básica del amortiguador (catálisis bifuncional) porque el valor de pKw del medio aumenta mientras que el valor de pKa no. Lo anterior se puede ver con un ejemplo sencillo, si consideramos un amortiguador hecho en una mezcla de 80% de acetona con el 50% de la forma protonada con una concentración total 0.1 M, el pH sería de 13.9 (según el valor estimado). Con el valor de pKw determinado como 16.5, podríamos conocer la concentración de ion hidróxido como $pOH = pKw - pH$, lo que nos daría una concentración de $10^{-2.6}$ (0.0025). Si comparamos las concentraciones de guanidina y del ion hidróxido, el guanidinio supera al ion hidróxido casi 100 veces. En la Figura 20 se muestra el perfil del pKa en función del porcentaje de acetona.

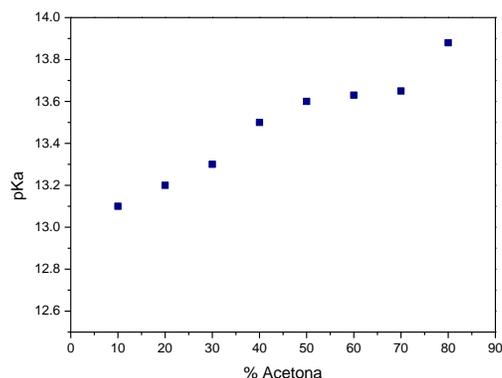


Figura 20. Relación de los valores de pKa en las mezclas acetona-agua.

En la gráfica de la figura 20 podemos observar que hay un aumento moderado en el pKa desde 10% hasta 50% de acetona. Entre el intervalo de 50 a 70% muestra un estancamiento y a partir de 80% comienza a elevarse de nuevo. Al igual que con los valores de pKw se hizo el análisis en función de la fracción molar de acetona. El gráfico obtenido del efecto del valor de pKa en función de la fracción molar del disolvente se muestra en la Figura 21. En esta figura podemos observar que tiene un comportamiento semejante al del porcentaje en volumen. Se intentó analizar el efecto del disolvente con el parámetro de la

permitividad dieléctrica pero tampoco hubo una tendencia clara, por lo que no se informa este análisis.

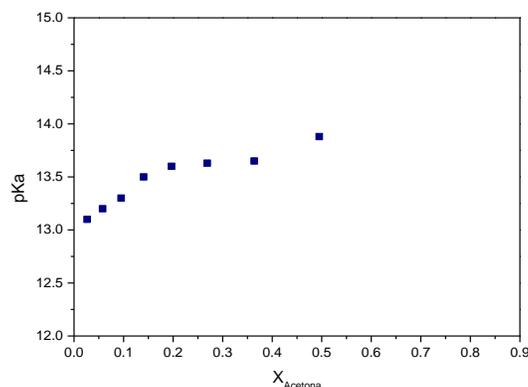


Figura 21. Valores de pKa en función de la fracción molar de acetona.

Debido a que los valores de pK_w y pK_a pueden cambiar con el disolvente (o mezcla de ellos) y la temperatura, es necesario determinar su valor cuando se hagan experimentos para poder correlacionar mejor con los parámetros de reacción. En el caso del guanidinio, además de agua, se conocen sus valores de pK_a en mezclas de DMSO:agua 4:1, tanto a 25°C (Salvio y col., 2011) como a 37°C (Corona y col., 2012). Al no contar con informes que muestren los valores de pK_a del guanidinio para la mezcla de acetona-agua a 37°C, dificulta realizar una comparación de los datos obtenidos con las otras investigaciones. Por esta razón es importante reportar lo obtenido sobre estos valores en las condiciones con las que se trabajaron en este proyecto.

Efecto de la Hidrólisis Básica Específica

Para conocer la contribución de la catálisis básica específica en las diferentes mezclas de disolvente, se realizaron perfiles de la dependencia de las constantes de rapidez con la concentración de hidróxido de tetrametilamonio. Las cinéticas se hicieron a 37 °C en un intervalo de concentración entre 0.002 a 0.02 M de hidróxido de tetrametilamonio, con un valor de fuerza iónica constante de 0.1 M con cloruro de tetrametilamonio. Los valores

obtenidos para este experimento se muestran en la tabla 4. En este experimento se determina la pendiente de la recta obtenida y el valor de la pendiente corresponde al valor de la constante de la catálisis básica específica en cada medio.

En la figura 22 se muestran todos los perfiles. En ella podemos observar que conforme aumenta el contenido de acetona en las mezclas, el valor de la pendiente aumenta (ver tabla 5). Para confirmar este comportamiento se hizo el gráfico de la figura 23, en ella podemos ver que hay una tendencia al aumento de la constante de rapidez por el aumento de acetona. Esto podría esperarse debido a que la interacción entre la acetona y el ion hidróxido es menor que entre la del agua y la del ion hidróxido, lo que afecta en la basicidad del mismo ion. Es decir, debido a que la acetona solvata de manera menos eficiente al ion hidróxido este estará más disponible para llevar a cabo la reacción y por lo tanto la constante de rapidez será más elevada.

Tabla 4. Relación de los valores obtenidos para las constantes de rapidez de la reacción entre el HpNPP con iones hidróxido a 37°C en las diferentes mezclas de acetona-agua con una fuerza iónica controlada de 0.1 M.

[OH], M	$k_{obs} \times 10^3 \text{ s}^{-1*}$						
	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%
0.002	0.018		0.020		0.40	0.35	0.27
0.004	0.41	0.44	0.48	0.58	0.83	1	
0.005	0.54	0.58	0.64	0.78	1.1	1.5	2.2
0.006	0.67	0.73	0.77	0.93	1.3	2.1	
0.008	0.92	1.0	1.0	1.3	1.9	1.6	4.6
0.01	1.2	1.2	1.4	1.8	2.0	2.4	6.3
0.014	1.6	1.8	2.0	2.4	3.5	3.9	11.8
0.018	2.2	2.3	2.6	3.3	4.5	5.9	14.9
0.020	2.4	2.6	3.0	3.8	5.2	7.2	16.2

*El porcentaje de error para las constantes fue menor a 1%.

Tabla 5. Constantes de rapidez para la hidrólisis básica específica a 37°C en las mezclas acetona-agua.

Porcentaje de acetona en volumen	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%
$k_{OH}, M^{-1}s^{-1}$	0.12	0.13	0.15	0.18	0.26	0.31	0.75

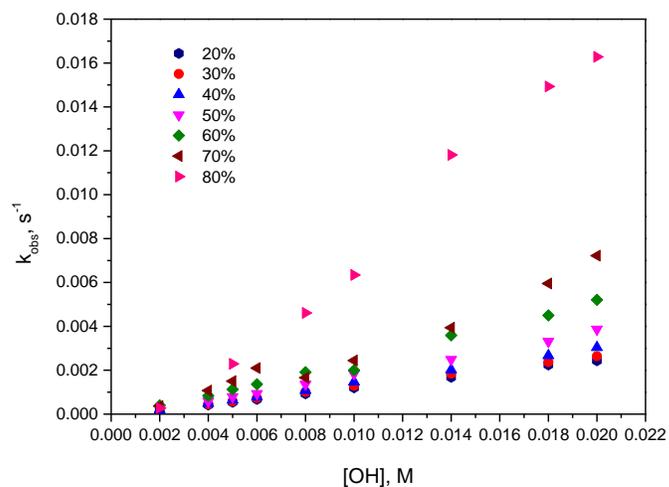


Figura 22. Dependencia de las constantes de rapidez con la concentración de hidróxido de tetrametilamonio.

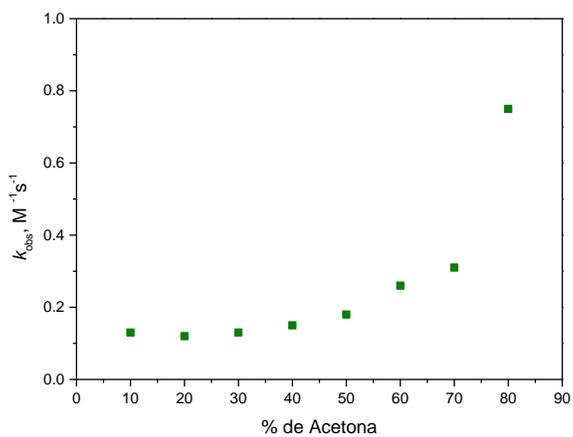


Figura 23. Variación de las constantes de rapidez básica específica contra el porcentaje de acetona.

Efecto de la Concentración Total del Amortiguador

Para conocer 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 mediante la variación de la concentración del amortiguador en cada mezcla de acetona-agua con una proporción de neutralización fija del 50%. El motivo de usar esta fracción de neutralización es porque se tiene la presencia en cantidades equimolares de las dos especies del amortiguador (HGu^+/Gu) y además, justo en esa proporción el valor de pH del amortiguador es igual al pKa del ácido. Lo anterior lo podemos confirmar con la ecuación de Henderson-Hasselbach: $\text{pH} = \text{pKa} + \log ([\text{Gu}]/[\text{HGu}])$; si $[\text{Gu}] = [\text{HGu}^+]$, entonces $\log ([\text{Gu}]/[\text{HGu}^+]) = 0$ y $\text{pH} = \text{pKa}$.

En todos los experimentos se utilizaron condiciones de pseudoprimer orden respecto al sustrato ($[\text{HpNPP}] = 20 \mu\text{M}$). El amortiguador se generó a partir de las concentraciones adecuadas entre cloruro de guanidinio y el hidróxido de tetrametilamonio. La concentración total del amortiguador se hizo variar desde 0.008 hasta 0.16 M y en todos los casos se mantuvo constante la fuerza iónica con cloruro de tetrametilamonio. 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.

Los valores obtenidos para las constantes de rapidez para los perfiles de concentración en las diferentes mezclas se muestran en la tabla 6. Dichos valores fueron utilizados para elaborar los gráficos que se muestran en la figura 24 con el fin de explicar los siguientes efectos. En el panel (a) de la figura 24 se observa que desde el 10% al 40% de acetona con agua, existe la catálisis por guanidina. Sin embargo, la dependencia es de primer orden ya que tenemos una línea recta. Esto significa que, en estas fracciones de acetona, en el mecanismo está involucrado sólo una especie de guanidina ($k_{\text{obs}} = k_{\text{Gu}}[\text{Gu}]_{\text{T}} + k_0$, donde $k_0 = 0$), la forma protonada o la desprotonada, por lo que en esta zona no es posible encontrar una catálisis bifuncional. En otras investigaciones se ha visto el mismo comportamiento, donde al incrementar la cantidad de disolvente orgánico incrementa también la constante de la rapidez de la reacción de la ruptura del éster de fosfato. Por ejemplo, en las mezclas de DMSO-agua y acetonitrilo-agua muestran que la constante catalítica aumenta conforme disminuye la cantidad de agua en las mezclas

(Gómez y col., 2006; Salvio y col., 2011; Baldini y col., 2012). Sin embargo no se ha visto un perfil cuadrático, por lo que no es posible considerar una catálisis bifuncional por el amortiguador de pH.

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 6. Relación de valores obtenidos para las constantes de rapidez en función de la concentración del amortiguador de acuerdo al porcentaje de acetona.

[Gu] _T , mol/L	$k_{obs} \times 10^3 \text{ s}^{-1}$						
	10%	20%	40%	50%	60%	70%	80%
0.008	0.038	0.039	0.041	0.027	0.054	1.0	1.4
0.01	0.065	0.068	0.078	0.039	0.074	0.75	0.86
0.02	1.1	0.099	1.1	0.055	1.0	1.3	2.4
0.04	2.2	2.2	2.4	1.1	2.8	2.3	4.3
0.08	4.9	4.7	4.8	2.3	5.4	5.0	10.6
0.1	6.6	6.1	6.2	4.7	7.5	6.9	14.0
0.12	7.9	7.6	7.5	6.5	8.9	9.8	20.3
0.14	9.4	8.9	8.8	7.8	10.6	8.5	26.5
0.16	10.6	10.5	10.2	11.0	12.6	16.3	30

*El porcentaje de error para las constantes fue menor a 1%.

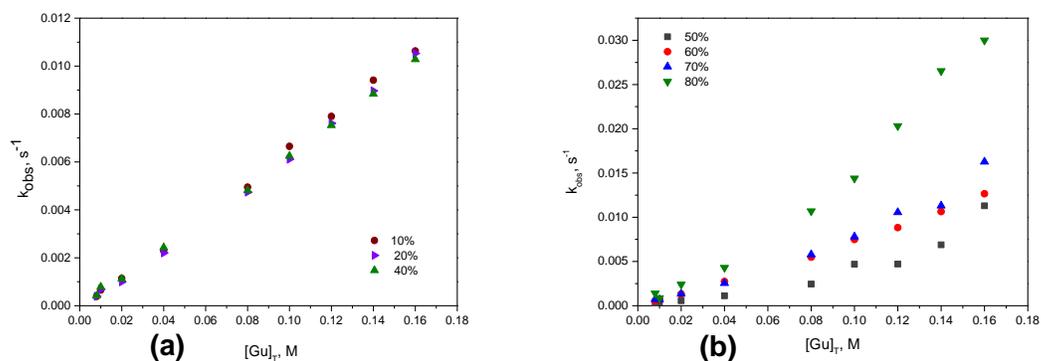


Figura 24. Perfiles de concentración en la catálisis del HpNPP con guanidina a 37°C en las mezclas de acetona del: (a) 10 a 40% y (b) 50 a 80%)

En los perfiles hechos a partir de las mezclas con 50% de acetona se comienza a observar un ligero comportamiento cuadrático de la curva, como se observa en la parte (b) de la figura 24 (el cual no es efecto de la fuerza iónica, ya que esta se mantuvo constante). En la mezcla con 80% de acetona, la curvatura del perfil es más evidente y 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.

Este tipo de perfil, cuadrático, fue informado por primera vez el grupo de Yatsimirsky. En el grupo de Yatsimirsky se utilizó guanidinos y amidinos de 70 a 90% de DMSO acuoso. Por otra parte el grupo de Salvio se ha basado en el trabajo del grupo de Yatsimirsky 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 encontrado por el grupo de Yatsimirsky, 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, 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

Con base en los resultados obtenidos en el efecto de la concentración del amortiguador, se realizaron perfiles de variación de la neutralización del amortiguador desde 10 al 80% en cada mezcla de acetona-agua para la reacción de ruptura del HpNPP. Los experimentos anteriores se hacen manteniendo la concentración del amortiguador constante en 0.1 M. Estos perfiles tienen el objetivo de determinar qué especie o especies del amortiguador

participan en el mecanismo catalítico de la transesterificación del HpNPP. Los valores obtenidos de las constantes de rapidez se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. 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 acetona.

Gu _L	$k_{obs} \times 10^3 \text{ s}^{-1}$							
	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%
0.01	1.1	1.2	1.2	1.1	1.2		2.1	4.5
0.02	2.3	2.4	2.8	2.3	2.4	1.6	3.7	7.3
0.03	3.7	3.7	3.8	3.7	4.0	2.6	5.4	10.7
0.04	4.7	5.0	5.3	4.8	5.0	4.1	7.2	12.9
0.05	6.0	6.2	6.0	6.1	6.4	5.9	8.7	15.0
0.06	7.5	7.9	7.5	7.4	7.6	7.6	10.2	15.6
0.07	8.5	8.7	8.7	8.5	8.8	9.2	11.6	16.4
0.08	9.0	9.5	10.0	9.5	10.2	10.6	13.3	17.8
0.09	9.8	9.9	11.1	11.5	11.9	12.8	15.4	20.4

*El porcentaje de error para las constantes fue menor a 1%.

Para poder explicar las tendencias encontradas, se hicieron las gráficas de los perfiles de neutralización que se muestran en la figura 25. En los perfiles que se hicieron del 20% al 60% de acetona, se observa un comportamiento casi lineal con una pequeña caída entre el 80 y 90% del amortiguador (correspondiente a las concentraciones 0.08 y 0.09 M de guanidina libre). 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. Al no presentarse curvatura alguna o una mayor actividad en fracciones correspondientes a la forma ácida del catalizador es un indicativo de que no hay participación de la forma ácida, por lo tanto, no hay una catálisis bifuncional en estas mezclas.

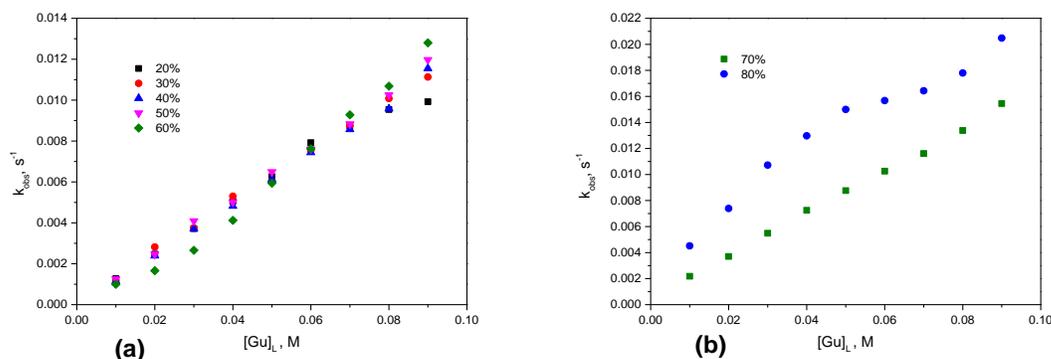


Figura 25. Perfil de la variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio en: (a) del 20 al 60% y (b) del 70 y 80% de acetona.

Por otro lado en la mezcla de 80% de acetona, este perfil denota una tendencia de disminución del intervalo entre los valores de la constante que se encuentran entre las concentraciones de guanidina libre de 0.05 y 0.07. Este comportamiento sugiere un mecanismo bifuncional. Sin embargo, no cae lo suficiente como un perfil de campana tradicional. Este tipo de perfiles ha sido informado recientemente por el grupo de Yatsimirsky (Corona y col, 2012). En su caso utilizó, para el sustrato HpNPP, amortiguadores de tipo guanidinio y amidinio. Su estudio, lamentablemente 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 anterior se debía a un simple 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.

El comportamiento mostrado en la mezcla de 80% de acetona puede deberse a las contribuciones simultaneas 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. Para esto, consideraremos la ecuación canónica de la catálisis ácido-base propuesta por Brønsted (1928), Jencks (1969), Laidler (1987) y Kwan (2005), donde se consideran todas las especies participantes. En nuestro caso, al tener un perfil cuadrático en el efecto de la

concentración total, un perfil en forma de campana no simétrico y casi hiperbólico consideraremos la participación de los iones hidróxido, la guanidina libre y la combinación de guanidina con guanidinio en la siguiente ecuación de rapidez:

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

En la ecuación anterior se considera la contribución de la catálisis básica general, debido a la dependencia que tiene con la concentración del amortiguador, se considera también la catálisis ácido-base general (bifuncional) debido al ligero comportamiento en forma de campana mostrado (en perfiles de alto contenido de acetona), y por último la catálisis básica específica atribuida por el medio. Este tipo de ley de rapidez fue informado también en sistemas similares por el grupo de Yatsimirsky (Corona y Col, 2012), sólo que en el presente trabajo se añade la participación de los iones hidróxido debido a que si es aparentemente significativa (*vide infra*).

Para poder analizar los datos donde se sospecha que si existe la contribución bifuncional en la catálisis, se tendrá que dar un tratamiento a los datos haciendo la corrección por la contribución de la catálisis por iones hidróxido. 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 no son válidas. 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:

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

Con la concentración de hidrógeno y considerando el valor de Kw y su expresión, $Kw = [H^+][OH^-]$, podemos calcular la 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 de iones hidróxido y los valores de la constante de la catálisis básica específica para cada porcentaje en volumen de acetona (ver tabla 5) 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 26 y 27. En la figura 26a se muestran los porcentajes de 20 y 30% de acetona corregidas, se observa que se conserva la linealidad y aparece más dispersión. Esto es congruente con la sospecha que no aparecía la catálisis bifuncional en estos porcentajes. En la figura 26b, en el caso de 40% comienza a caer el perfil, al igual que en 50% y en 60% ya se nota una forma de campana. Los perfiles de 40% y 50% son perfiles clásicos de una catálisis básica general, donde a mayor proporción de la base comienza a saturar la actividad. Sin embargo, no hay una existencia clara de una catálisis bifuncional.

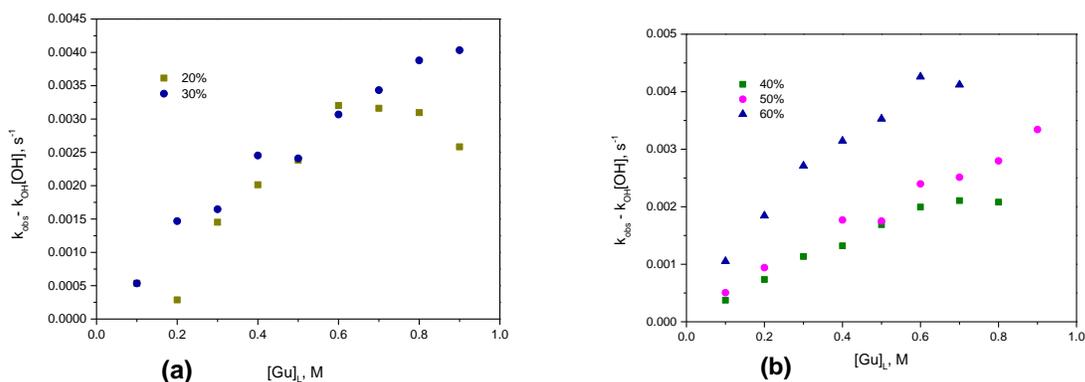


Figura 26. (a) Perfil de la variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio en 20% y 30% de acetona. (b) Perfil de la variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio en 40%, 50% y 60% de acetona.

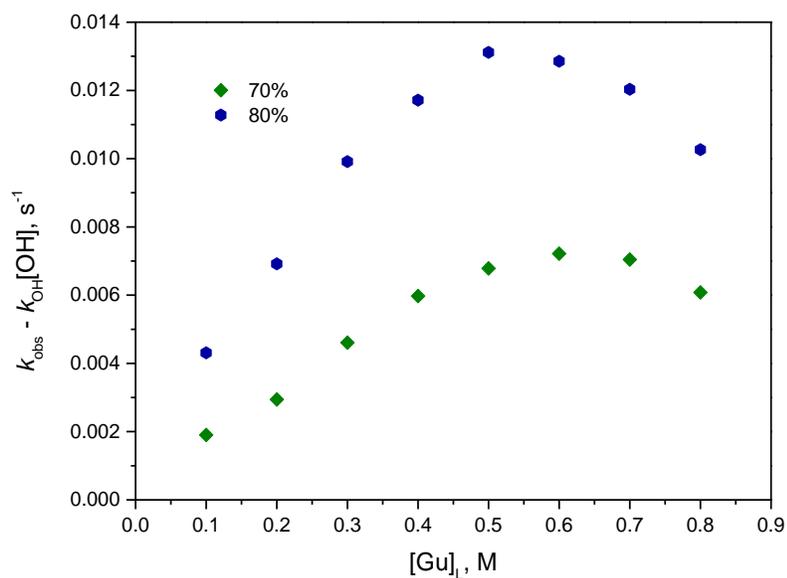


Figura 27. Perfil de la variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación del guanidinio en 70% y 80% de acetona.

Los perfiles corregidos de las mezclas de 70 y 80% de acetona, tienen una forma de campana con un máximo entre 0.5 y 0.6 de la fracción de base libre, que confirman que en el mecanismo participan ambas formas del amortiguador. Además, presenta una asimetría que confirma una contribución simultánea de la catálisis básica general.

Como podemos ver, la aparición de la catálisis bifuncional se da en mayores proporciones de acetona. 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 28 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:

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

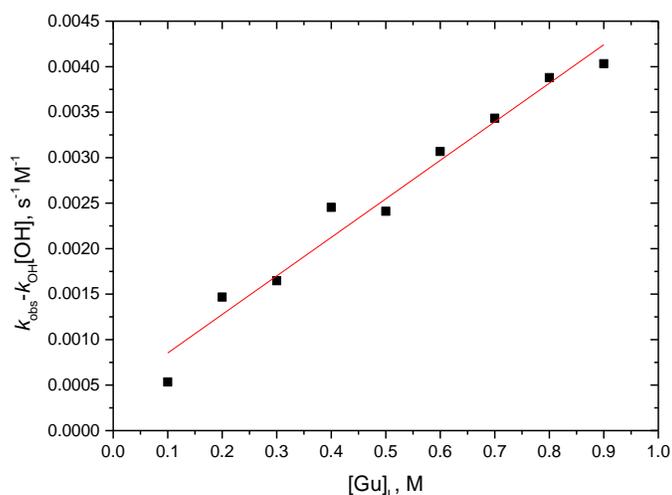


Figura 28. Análisis en 30% de acetona del perfil de neutralización corregido. En este análisis se obtiene el valor de la constante básica general.

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: $k_{obs} - k_{OH}[OH^-] = k_2[Gu][HGu^+] + k_1[Gu]$. Si dividimos ambos lados entre $[Gu]$, la ecuación anterior se transforma en:

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

La ecuación anterior toma la forma de una línea recta en un gráfico coordenadas de $(k_{obs} - k_{OH}[OH^-])/[Gu]$ en función $[HGu^+]$. 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 M la concentración de la base libre). En la figura 29 se muestra un ejemplo de este análisis para el caso de 80% de acetona. 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.

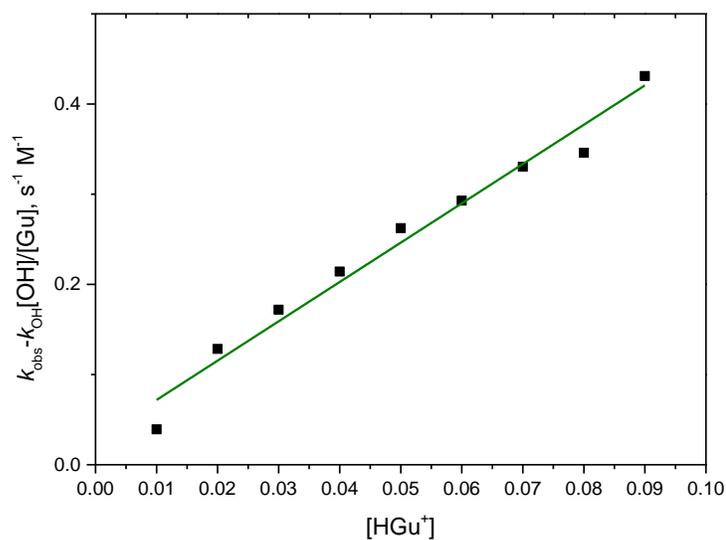


Figura 29. Ejemplo del análisis del perfil de neutralización corregido en la mezcla de 80% de acetona.

Los valores obtenidos en el análisis de los dos tipos de gráficas se enumeran en la tabla 8. En el análisis de 20 a 50% se extrajo el valor de la constante para la catálisis básica general, k_1 , mientras que del segundo grupo de 60 a 80% se obtuvieron el valor de k_1 y el de la catálisis básica bifuncional, k_2 . Un caso especial fue el de 50% de acetona que se analizó en los dos tipos de coordenadas. En ambos casos el valor de k_1 prácticamente no varió, por lo que se tomó el valor obtenido para la catálisis bifuncional. Existen reportes acerca de la presencia de la catálisis bifuncional en agua. Con los experimentos se determina que la contribución existe, pero debido a la presencia de iones hidróxido en una alta proporción, su catálisis es prácticamente indetectable. Esto mismo, puede aplicarse en los sistemas estudiados, ya que en caso de 50%, encontramos que si existe pero la contribución es muy pequeña.

Tabla 8. 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 acetona.

$X_{Acetona}$	$k_1, s^{-1} M^{-1}$	$k_2, s^{-1} M^{-2}$
0.0577	0.035	
0.095	0.043	
0.140	0.028	
0.196	0.031	0.19
0.268	0.061	0.376
0.363	0.020	1.94
0.495	0.028	4.36

En la figura 30, 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 acetona. 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 30 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 acetona. Es decir, no hay efecto de disolvente en este tipo de catálisis. En el caso de la gráfica de la figura 30b, vemos que conforme aumenta la fracción molar de la acetona va aumentando el valor de la constante de rapidez de la catálisis bifuncional, que es en la que participan ambas especies del amortiguador.

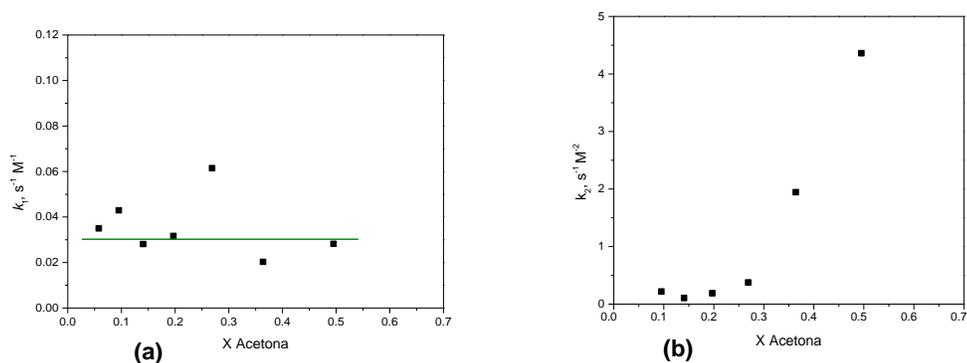


Figura 30. Dependencia de los valores de k_1 (a) y k_2 (b) en función de la fracción molar de acetona.

La aparición de la catálisis bifuncional puede deberse a un efecto de disolvente sobre la reactividad. Para tratar de encontrar la explicación se analizaron los datos de las constantes de rapidez obtenidas con la permitividad dieléctrica de manera directa, para ver si había un efecto electrostático. La correlación no existe y no hay ninguna tendencia. En el modelo de Kirkwood, cuyo análisis también depende de la permitividad dieléctrica del medio y que da una correlación con el cambio de polaridad entre las especies participantes de la reacción, tampoco se encontró una tendencia. Para las mezclas acetona-agua, tampoco hay valores informados de valores del parámetro $E_T(30)$, que permitirían encontrar una correlación con el cambio de solvatación en la reacción, por lo que no se pudo correlacionar. Al intentar hacer varios tipos de análisis y buscar una posible explicación de la presencia de la catálisis bifuncional en un mayor contenido de acetona, la posible respuesta la podemos encontrar en los parámetros termodinámicos que se midieron, los valores de pK_a y pK_w .

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 pK_a y del pK_w 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 encontrar su presencia.

Por lo anterior, podemos establecer que el factor más importante en encontrar las condiciones donde aparezca un mecanismo donde participen ambas especies, como en las enzimas, es que el pK_w aumente bastante y el pK_a 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 pK_w y el pK_a es de más de 5 unidades.

En la figura 31 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 acetona-agua. Ambas rutas, participan al mismo tiempo en conjunto con la ruptura por iones hidróxido.

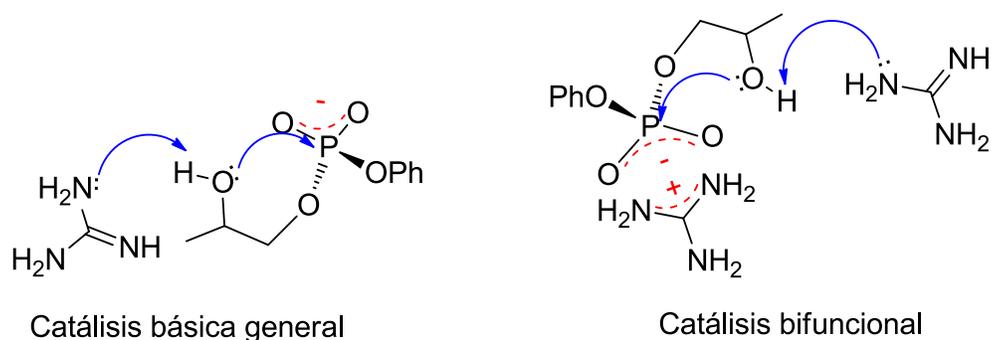


Figura 31. Mecanismos propuestos para la catálisis con guanidina. a) Catálisis básica general asistida. b) Catálisis bifuncional con asistencia electrofílica.

En la figura 31a 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 31b 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 reportes 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 propuesto: catálisis básica general y la catálisis bifuncional con asistencia electrofílica. En 2012, Corona y colaboradores en un trabajo donde utilizaron diferentes tipos de catalizadores de tipo amidinio y guanidinio, encontraron este tipo de catálisis en mezclas de DMSO con agua en 80% volumen (Corona y col. 2012). 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). 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 acetona-agua, en el que se muestra el mecanismo bifuncional en las mezclas que superan el 60% de acetona.

En el presente trabajo, se hizo un estudio detallado en mezclas formadas con un disolvente aprótico polar (acetona) con agua, desde un 10 hasta un 80%. En este se encontró que conforme se acerca a un porcentaje mayor de 50% de acetona 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

La reacción de transesterificación del 2-hidroxiopropil *p*-nitrofenilfosfato en mezclas de acetona con agua a 37°C presenta una catálisis con guanidina, según se observa en los perfiles de concentración.

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: $k_{obs} = k_1[Gu] + k_2[Gu][HGu^+] + k_{OH}[OH^-]$. Esto implica la participación de tres rutas catalíticas en los sistemas estudiados, donde puede predominar alguna en función de la concentración de las especies participantes.

En las mezclas de acetona con agua con mayor proporción de acetona (de 60 a 80%) se presenta el mecanismo bifuncional. Es decir, a mayor contenido de acetona la existencia del mecanismo biomimético se hace presente.

Se determinaron los valores de pKw y pKa en las mezclas de acetona-agua a de 37°C. En el caso del pKw el aumento fue de 13.7 a 16.48. Para el valor de pKa, el aumento fue de 13.1 para la mezcla de 10% de acetona hasta 13.9 en la mezcla de 80% de acetona.

La catálisis básica específica del HpNPP con hidróxido de tetrametilamonio se observa en todas las mezclas de acetona-agua estudiadas (10% hasta 80% de acetona). La constante catalítica mostró un incremento conforme aumenta la proporción de acetona la mezcla desde 0.12 hasta 0.75 M⁻¹s⁻¹.

BIBLIOGRAFÍA

Aoki S, Iwaida K, Hanamoto N, Shiro M, Kimura E. 2002. Guanidine Is a Zn²⁺-Binding Ligand at Neutral pH in Aqueous Solution. J. Am. Chem. Soc. 124, 5256 – 5257.

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.

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.*

Boulatov R. 2004. Understanding the reaction that powers this world: Biomimetic studies of respiratory O₂ reduction by cytochrome oxidase. Pure Appl. Chem. 76(2), 303-319.

Breslow R. 2009. Biomimetic Chemistry: Biology as an Inspiration. J. Biol. Chem. 284(3), 1337-1342.

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

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.

Brönsted JN. 1926. Acid and Basic Catalysis. Chemical Review. (5), 3. 231-338.

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.

Castellanos MG, Nelly J, Gomez ME, Cafferata RF. 2001. Relación Isocinética y Efecto de Solvente en la termólisis de diperoxido cíclico de benzaldehído. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2001/8-Exactas/E-015.pdf>

Corona DO. 2006. Estudio de Reconocimiento de Aminoácidos con un Piridinofano y sus Complejos de Zinc en Solución Acuosa. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.

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

Corona DO, Taran O, Yatsimirsky A. 2010. Mechanism of general acid-base catalysis in transesterification of RNA model phosphodiester studied with strongly basic catalysts. *Org. Biomol. Chem.* 8, 873-880.

Corona DO, 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.

Cragg PJ. 2010. *Supramolecular Chemistry: From Biological Inspiration to Biomedical Applications*. 1ra ed. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. Brighton, Reino Unido.

Devlin, T. M. 2004. *Bioquímica*, 4ª edición. Reverté, Barcelona, España.

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

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

Hollfelder F, Avenier F, Domingos JB, Van Vliet LD. 2007. Polyethylene imine derivatives (synsymes) accelerate phosphate transfer in the absence of metal. *J. Am. Chem. Soc.* 129. 7611-7619.

Hollfelder F, Kirby AJ, Tawfik DS. 2001. On the Magnitude and Specificity of medium Effects in Enzyme-like catalysts for Proton Transfer. *J. Org. Chem.* 66, 5866-5874.

Hong S, Suh J. 2000. Acceleration of Acid-Catalyzed Transesterification of 2-Hydroxypropyl-p-nitrophenyl Phosphate by Organic Solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 2 (3). 377-380.

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.

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

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

Kirby AJ, Hollfelder F. From Enzyme Models to Model Enzymes. 2009. Cambridge, UK.

Kirby AJ, Mora JR, Nome F. 2012. New light on phosphate transfer from triesters. Elsevier. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1834. 454-463

Kirby AJ, Varvoglis AG. 1967. The reactivity of phosphate esters. Monoesters hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 415.

Kwan EE. 2005. Factors Affecting the Relative Efficiency of General Acid Catalysis. *J. Chem. Edu.* (82) 7, 1026-1030.

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

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

Mancin F, Tecilla P. 2007. "Zinc(II) complexes as hydrolytic catalysts of phosphate diester cleavage: from model substrates to nucleic acids" *New J. Chem.* 31, 800-817.

Massoud SS, Perkins RS, Louka FR, Xu W, Roux AL, Dutercq Q, Fischer RC, Mautner FA, Handa M, Hiraoka Y, Kreft GL, Bortolotto T, Terenzi H. 2014. Efficient hydrolytic cleavage of plasmid DNA by chloro-cobalt (II) complexes based on sterically hindered pyridyl tripod tetraamine ligands: synthesis, crystal structure and DNA cleavage. *Dalton Trans.*, 43, 10086-10103.

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

Nome F, Orth ES, Brandao TAS, Milagre MS, Eberlin MN. 2008. Intramolecular acid-base catalysis of phosphate diester: modeling the ribonuclease mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 130. 2436-2437.

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.

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.

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.

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

Salvio R, Cacciapaglia R, Mandolini L, Sansone, Casnati A. 2014. Diguanidinocalix[4]arenes as effective and selective catalysts of the cleavage of diribonucleoside monophosphates. *R. Soc. Chem.* 4, 34412-34416.

Salvio R, Cincotti A. 2014. Guanidine based self-assembled monolayers on Au nanoparticles as artificial phosphodiesterases. *R. Soc. Chem.* 4, 28678 – 28682.

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

Sasi MS, Mlitan AM, Alkheraz. 2014. Comparing Spontaneous Hydrolysis Rates of Activated Models of DNA and RNA. *Int. J. Chem.* 8 (9) 896-898.

Sánchez I. 2010. Estabilización y reactividad fosfoesterolítica de hidroxocomplejos metálicos en presencia de disolventes dipolares apróticos. México, DF. Tesis de Doctorado, UNAM. Cd. de México, DF.

Savelli C, Salvio R. 2015. Guanidine-Based Polymer Brushes Grafted onto Silica Nanoparticles as Efficient Artificial Phosphodiesterases. *Chem. Eur. J.* 21. 5856-5863.

Shneider HJ, Yatsimirsky AK. 2003. Lanthanide-Catalyzed Hydrolysis of Phosphate Esters and Nucleic Acids in Metal Ions in biological Systems. Vol 40. A. Sigel y H. Sigel Editores, M. Dekker Inc., New York, Estados Unidos.

Smith MD, Collins RA. 2007. Evidence for proton transfer in the rate-limiting step of a fast-cleaving Varkud satellite ribozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 5818-5823.

Suh J, Seok Hong I. 2000. Acceleration of acid-catalyzed transesterification of 2-hidroxypropyl-p-nitriphenyl phosphate by organic solvents. *Org. Lett.* . 2(3): 377-380.

Takagi Y, Ikeda Y, Taira K. 2004. Rybozyme mechanisms. *Top. Curr Chem.* 232. 313-251.
Taran O, 2006. Catálisis con metales alcalinotérreos en hidrólisis de ésteres fosfato. México, DF. Tesis de Doctorado, UNAM. Cd. de México, DF.

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

Voet D, Voet JG. 2003. *Biochemistry* 3ra ed. Jhon Wiley and Sons, Inc. Hoboken, Estados Unidos.

Wilson TJ, Frederikksen JK, Piccirilli JA, Lilley DMJ. 2010. Nucleobase-mediated general acid-base catalysis in the Varkud satellite ribozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 11751-11756.

Wei H, Wang E. 2013. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nonozymes): next-generation artificial enzymes. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6060-6093.

Wiskur SL, Lavigne JJ, Metzeger A, Tobey SL, Lynch V, Anslyn EV. 2004 Thermodynamic Analysis of Receptors Based on Guanidinium/Bonoric Acid Groups for the Complexation of Carboxylates, α -Hydroxycarbolates, and Diols: Driving Force for Binding and Cooperativity. *Chem. Eur.* 10, 3792 – 3804.

Woolley M, Hurkot DG, Hepler LG. 1970. Ionization Constants for Water in Aqueous Organic Mixtures. *J. Physical Chem.* 74 (22), 3908-3913.

Yin Y, Dong Z, Luo Q, Liu J. 2012. Biomimetic catalyts designe don macromoleculare scaffolds. Elsevier. Proffress In polymer science. 37. 1476-1509.

Zhang S, Ganguly A, Goyal P, Bingman JL, Bevilacqua PC, Hammes-Schiffer S. 2015. Role of the Active Site Guanine in the glmS Ribozyme Self Cleavage Mechanism: Quantum Mechanical/Molecular Free Energy Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 784-798.