



Departamento de Química Física

Facultad de Química

Universidad de Santiago de Compostela

**Estudio del mecanismo de reacciones
modelo de procesos enzimáticos: Catálisis
electrófila en la desprotonación de la glicina
en el carbono alfa**

Tesis Doctoral

Química Física

Santiago de Compostela

Enrique Riveiros Santiago



Departamento de Química Física

Facultad de Química

Universidad de Santiago de Compostela

Dña. Ana María Ríos Rodríguez, Profesora titular del departamento de Química Física de la Universidad de Santiago de Compostela, y D. Juan Crugeiras Martínez, Profesor Titular del mismo Departamento

Informan:

Que la presente memoria, titulada “Estudio del mecanismo de reacciones modelo de procesos enzimáticos: Catálisis electrófila en la desprotonación de la glicina en el carbono alfa”, que para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas presenta D Enrique Riveiros Santiago, ha sido realizada en el Departamento de Química Física de la Universidad de Santiago de Compostela bajo nuestra dirección.

Considerando que constituye trabajo de Tesis, autorizan su presentación en la Comisión de Tercer Ciclo de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firmamos el presente informe en Santiago de Compostela, a 19 de noviembre de 2012

Fdo. Ana María Ríos Rodríguez

Fdo. Juan Crugeiras Martínez

El estudio que se expone en la presente memoria se ha llevado a cabo en el departamento de Química Física de la Universidad de Santiago de Compostela, bajo la dirección de los profesores D. Juan Crugeiras y Dña. Ana Ríos a los que quiero expresar mi agradecimiento por su constante apoyo y dedicación.

Es también mi deseo agradecer a la Dr. AnnMarie O'Donoghue, Lecturer of the University of Durham, UK, por su gran amabilidad y ayuda durante las estancias en el reino unido.

A mis compañeros de laboratorio les deseo todo lo mejor, y les agradezco su amistad.

A mi familia por estar siempre ahí.

1. OBJETIVOS	3
2. INFORME BIBLIOGRÁFICO	9
2.1 Introducción	11
2.2 Reacciones de transferencia protónica en el Carbono	14
2.3 El centro enzimático como medio de reacción	16
2.4 Formación y estabilidad de los enolatos de aminoácidos	18
2.5 Piridoxal 5'-fosfato como cofactor enzimático	22
2.6 Modelos no enzimáticos de la catálisis del piridoxal 5'-fosfato	24
2.7 Mecanismo de actuación del PLP como catalizador de reacciones de aminoácidos	25
2.8 Reacciones modelo que tienen al PLP como catalizador	27
2.8.1 Transaminación	29
2.8.2 Racemización	30
2.8.3 Descarboxilación	31
2.8.4 α-β eliminación	33
2.8.5 Ruptura aldólica	35
2.9 Piridoxamina 5'-fosfato como coenzima	36
CAPÍTULO 3	37
3. Enolatos de glicina: Efecto de la formación de iones iminio con cetonas simples sobre la acidez del carbono en posición α al grupo amino	39
3.1 Introducción	39
3.2 Sección Experimental	42
3.2.1 Materiales	42
3.2.2 Métodos Generales	43
3.2.3 Análisis Espectroscópico RMN¹H	44

3.2.4 Determinación de las Constantes de Equilibrio	45
3.2.5 Medidas Cinéticas	46
3.3 Resultados	51
3.3.1 Constantes de Equilibrio para la Formación de la Imina	51
3.3.2 Constantes de Velocidad para el Intercambio por Deuterio	58
3.3.2.1 Catálisis por acetona	58
3.3.2.2 Catálisis por fenilglioxilato	64
3.4 Discusión de los Resultados	70
3.4.1 Caminos de Reacción	70
3.4.2 Correlaciones de Brønsted	73
3.4.3 Catálisis Electrónica en la Desprotonación de la Glicina	73
CAPÍTULO 4	81
4. Efecto de los sustituyentes sobre la estabilidad termodinámica de iminas derivadas de la glicina y aldehídos aromáticos. Importancia de la estructura del piridoxal 5'-fosfato en su actividad catalítica	83
4.1 Introducción	83
4.2 Sección Experimental	86
4.2.1 Materiales	86
4.2.2 Métodos Generales	86
4.2.3 Análisis Espectroscópico RMN ¹H	87
4.2.4 Determinación de las Constantes de Equilibrio	88
4.3 Resultados	90
4.4 Discusión	101
4.4.1 Fuerza del enlace de hidrógeno intramolecular en aldminas de PLP	103
4.4.2 Otros Efectos de los Sustituyentes sobre la Estabilidad de los	

Iones Iminio	113
4.4.3 Catálisis Enzimática	117
CAPÍTULO 5	119
Efecto de los Sustituyentes en la Catálisis Electrofila por el Grupo Carbonilo: Descripción del Aumento de Velocidad en la Desprotonación de la Glicina catalizada por PLP	121
5.1 Introducción	121
5.2 Sección Experimental	126
5.2.1 Materiales	126
5.2.2 Métodos Generales	126
5.2.3 Análisis Espectroscópico RMN ¹H	127
5.2.4 Determinación de las Constantes de Equilibrio	128
5.2.5 Medidas Cinéticas	129
5.3 Resultados	130
5.3.1 Constantes de Equilibrio para la Formación de Iminas	130
5.3.2 Reacciones de Intercambio por Deuterio	135
5.3.2.1 Catálisis por Acetona	135
5.3.2.2 Catálisis por Benzaldehído (2)	140
5.3.2.3 Catálisis por Salicilaldehído (3)	141
5.4 Discusión de Resultados	145
5.4.1 Valores de pK_a de los Ácidos de Carbono	147
5.4.2 Efecto de los Sustituyentes sobre la Acidez del Carbono de la Glicina	154
5.4.2.1 Efecto del Grupo Ión Iminio	154
5.4.2.2 Efecto de Sustituyentes Aromáticos en el Nitrógeno en α al Grupo Iminio	156

ÍNDICE

5.4.3 Relevancia en la Catálisis Enzimática	158
5.4.4 Efecto de los Sustituyentes sobre la Actividad Catalítica de Cetonas y Aldehídos	160
CONCLUSIONES	163
LISTA DE PUBLICACIONES	169
Anexos.	171

OBJETIVOS

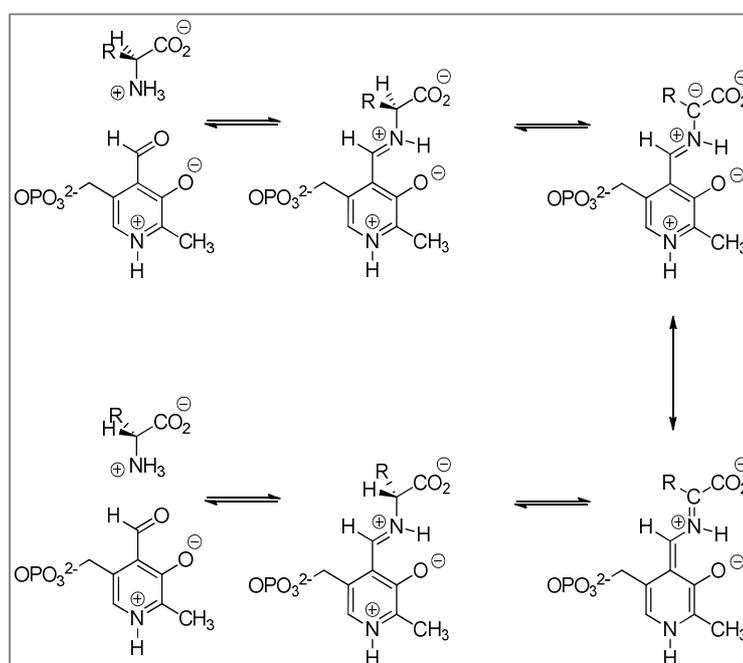
Muchos de los avances producidos en los últimos años en el estudio de las reacciones de catálisis enzimática tienen como denominador común la aceptación general de que muchos de estos procesos pueden ser explicados haciendo uso de los mismos mecanismos químicos que se conocen para reacciones sencillas en disolución. La investigación de los mecanismos utilizados por los sistemas enzimáticos para ejercer su acción catalítica requiere la integración de los resultados obtenidos en el estudio de tres aspectos importantes:

- 1) La estructura del complejo enzima-sustrato.
- 2) El mecanismo de la reacción no enzimática en disolución acuosa.
- 3) El efecto del entorno local de la proteína sobre la estabilidad del estado de transición para esta reacción.

Nuestro interés, se centra en el segundo de estos aspectos, el análisis del mecanismo de procesos no enzimáticos en disolución que representan modelos útiles de reacciones enzimáticas.

La primera etapa en numerosos procesos de catálisis enzimática implica la ruptura heterolítica de enlaces C-H. En la mayoría de los casos, una base general presente en el centro activo es responsable de la abstracción de un protón unido a un átomo de carbono adyacente a un grupo carbonilo. La racemización de aminoácidos catalizada por enzimas pertenece al tipo de reacciones en las cuales se produce la desprotonación de un ácido de carbono. Los dos isómeros D- y L- de los aminoácidos son necesarios en los sistemas biológicos y este hecho proporciona una explicación simple para la existencia de racemasas que catalizan su interconversión. Son dos los mecanismos propuestos para explicar el modo de acción de estas enzimas: (i) Desprotonación directa del aminoácido unido al enzima para formar el enolato

correspondiente y posterior protonación para generar el aminoácido racémico.
(ii) Activación del aminoácido mediante la formación de un ion iminio con el piridoxal 5'-fosfato (PLP) que actúa como coenzima, seguida de la abstracción del protón en la posición α del aducto para dar un carbanión estabilizado por resonancia y protonación no estereoespecífica de este.



Las enzimas que utilizan el piridoxal 5'-fosfato como cofactor juegan un papel importantísimo en el metabolismo de los aminoácidos, catalizando un gran número de reacciones entre las que se incluyen la racemización, la descarboxilación, la transaminación, etc. Todos estos procesos enzimáticos transcurren a través de la formación de una base de Schiff entre el grupo carbonilo del piridoxal y el grupo amino del aminoácido, que ayuda a estabilizar el carbanión generado en la posición adyacente al nitrógeno de la

imina. En este contexto, es posible predecir el efecto catalítico de compuestos carbonílicos simples, como la acetona o el formaldehído, sobre la reacción de abstracción de un protón del carbono α de los aminoácidos. Sin embargo, a pesar de la enorme importancia de estos procesos como modelos sencillos de las correspondientes reacciones enzimáticas, no aparece en la bibliografía ningún estudio cuantitativo que proporcione una medida de la magnitud de dicha catálisis. Los compuestos carbonílicos conjugados deberían ser más efectivos como catalizadores de la transferencia protónica desde el carbono α de los aminoácidos. Aunque se ha observado de forma cualitativa que la piruvamida, que representa un buen modelo del grupo piruvoilo presente en algunas descarboxilasas, cataliza la desaminación y descarboxilación de aminoácidos en medio acuoso, no se han realizado estudios mecanicistas posteriores de estos procesos. Los estudios cuantitativos sobre la desprotonación de aminoácidos catalizada por el piridoxal y compuestos análogos es también escasa y existen muy pocos datos que puedan ser utilizados para estimar la reactividad como ácidos de carbono de las bases de Schiff de estos compuestos con aminoácidos. De todo ello se desprende la necesidad de profundizar en el estudio del comportamiento como ácidos de carbono de las bases de Schiff de aminoácidos con cetonas simples y compuestos carbonílicos conjugados.

El objetivo general del trabajo de investigación de esta tesis doctoral es conseguir un mejor conocimiento de las reacciones de transferencia protónica de aductos tipo base de Schiff de aminoácidos con compuestos carbonílicos electrofílicos, y obtener, mediante el estudio de estas reacciones modelo, información sobre el papel que desempeña el cofactor en la catálisis enzimática de las reacciones de aminoácidos. Se pretende alcanzar este objetivo

investigando el efecto catalítico de tres tipos de compuestos carbonílicos (cetonas simples, moléculas con el grupo piruvoilo y análogos del piridoxal 5'-fosfato) sobre la reacción de desprotonación de la glicina en el carbono α . Mediante este estudio se proyecta obtener información sobre los siguientes aspectos:

(1) Reactividad de las bases de Schiff de aminoácidos como ácidos de carbono. Se determinarán las constantes de velocidad para la desprotonación de los iones iminio por bases. Será de interés comparar la reactividad de estos compuestos con la de otros ácidos de carbono de importancia biológica.

(2) pK_a de estos ácidos de carbono. Se intenta determinar las constantes de acidez para la ionización de los iones iminio actuando como ácidos de carbono. Se pretende proporcionar una medida de la estabilización de los enolatos de aminoácidos mediante la formación de estos aductos con compuestos carbonílicos.

(3) Papel que desempeñan los distintos grupos funcionales presentes en la molécula de piridoxal en la actividad catalítica de esta coenzima en las reacciones de aminoácidos. Se estudiará la catálisis covalente por moléculas similares al piridoxal eliminando sistemáticamente alguno de sus grupos funcionales. Los resultados obtenidos permitirán evaluar la contribución relativa de la base de Schiff y del anillo de piridina a la estabilización del carbanión formado como intermedio en estos procesos.

(4) Origen de la catálisis observada para la racemización enzimática. Se determinará qué fracción de la catálisis observada para las racemasas de aminoácidos que utilizan el piridoxal 5'-fosfato como coenzima es debida a la activación intrínseca de los protones en el carbono α del aminoácido por este cofactor electrofílico.

INFORME BIBLIOGRÁFICO

2. INFORME BIBLIOGRÁFICO

2.1 Introducción

Las enzimas catalizan las reacciones bioquímicas en las células de todos los organismos, reacciones que constituyen la base química de la vida. La mayor parte de las enzimas son proteínas (unas pocas son ácidos ribonucleicos o ribonucleoproteínas). En ellas los grupos catalíticos están localizados en una zona muy concreta, denominada centro activo, al cual se unen los sustratos que posteriormente son convertidos en productos.

El primer objetivo de cualquier estudio mecanicista consiste en la descripción de la acción catalítica de la enzima a nivel atómico. Los sucesos fundamentales en la catálisis enzimática están determinados por las interacciones entre un sustrato y el centro activo del enzima, y constituyen la base molecular del efecto catalítico observado. Las interacciones entre el sustrato y el centro activo de la enzima pueden ser de tipo electrostático, hidrofóbico y enlace de hidrógeno, y los grupos carboxilato, amino, imidazol, hidroxilo, y tiol de las cadenas laterales de aminoácidos actúan como catalizadores ácido-base, nucleofílicos y electrofílicos. Puesto que el número de grupos funcionales de las cadenas laterales de aminoácidos es muy limitado, las propiedades químicas de las enzimas han sido extendidas, en su evolución, mediante la incorporación de coenzimas que se unen al enzima y proporcionan propiedades fisicoquímicas que no posee la estructura proteica.

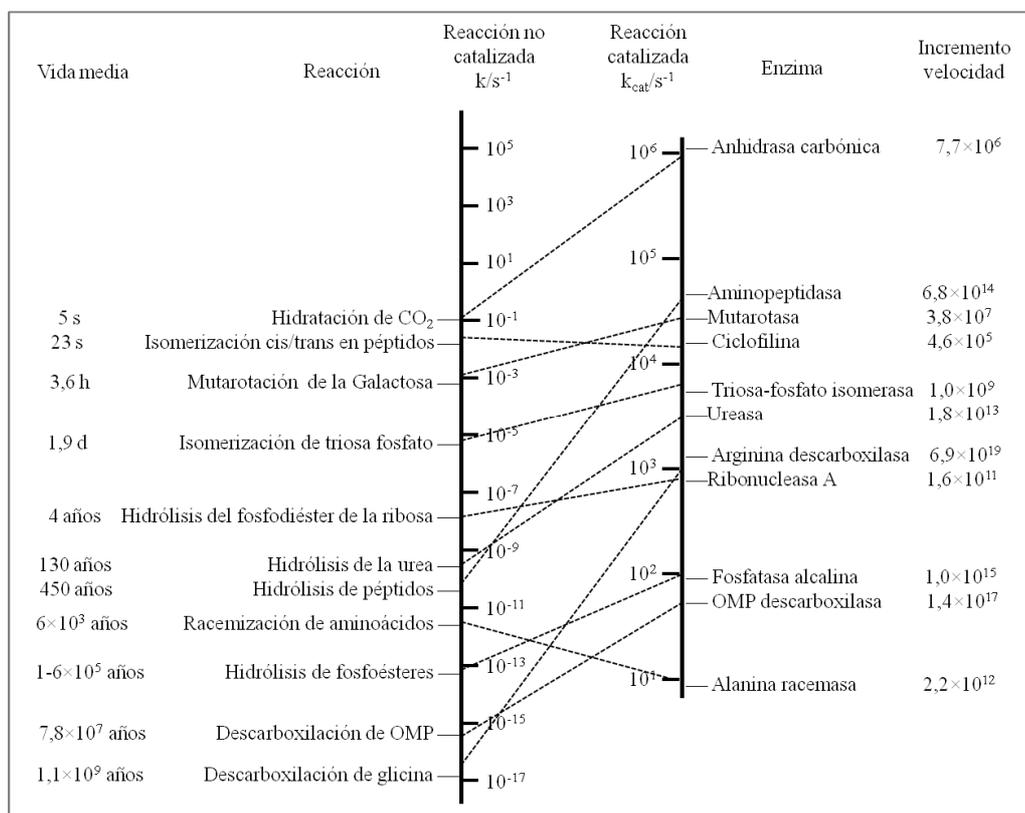


Figura 2.1. Incrementos de velocidad en la catálisis enzimática. En las escalas logarítmicas de la figura se correlacionan las constantes de velocidad de orden uno para algunas reacciones, con el número de recambio, k_{cat} , para las mismas reacciones catalizadas por enzimas.

Las enzimas catalizan reacciones biológicas a velocidades que, en general, son incomprensiblemente más rápidas que las correspondientes reacciones no catalizadas. El incremento de velocidad que se produce en presencia del catalizador con respecto al proceso no catalizado ha podido determinarse para algunos tipos de reacciones enzimáticas. Este factor de incremento de velocidad puede medirse comparando la constante de velocidad para el proceso no enzimático con la constante de velocidad para la reacción enzimática. Aunque dicha comparación no siempre es fácil de realizar, en muchos casos es posible comparar constantes de velocidad para reacciones

unimoleculares o pseudo-unimoleculares que transcurren en presencia y en ausencia de la enzima. En la figura 2.1 se incluyen algunos ejemplos. La escala logarítmica de la izquierda recoge las constantes de velocidad de primer orden y pseudoprimer orden, y tiempos de vida media para un conjunto de reacciones no sujetas a catálisis enzimática. En la escala logarítmica de la derecha (más ampliada) se representan los valores de k_{cat} para las correspondientes reacciones catalizadas por enzimas. El parámetro k_{cat} es el *número de recambio* para una enzima, y se define como el número de moléculas de sustrato convertidas en productos, por molécula de enzima y por unidad de tiempo. La eficiencia catalítica de un enzima se define a través de la relación k_{cat}/K_m , donde K_m es la constante de Michaelis, que se corresponde con la concentración de sustrato a la que la velocidad de reacción es igual a la mitad de la velocidad enzimática máxima.

Las constantes de velocidad para las reacciones no enzimáticas van desde 10^{-17} hasta 10^{-1} s^{-1} , correspondientes a tiempos de vida media que van desde 1 billón de años hasta 5 segundos, respectivamente. Las constantes de velocidad para procesos enzimáticos, k_{cat} , van de 10 a 10^7 s^{-1} , lo cual implica que el intervalo de constantes de velocidad para procesos no enzimáticos es aproximadamente diez órdenes de magnitud más amplio que el que corresponde a los procesos enzimáticos.

El factor de incremento de velocidad, k_{cat}/k , para las reacciones enzimáticas descritas en el esquema de la figura 2.1 va desde 5×10^5 para la reacción de isomerización cis-trans en proteínas hasta 7×10^{19} para la descarboxilación de un aminoácido. El mecanismo a través del cual tiene lugar esta isomerización es probablemente similar en los procesos no enzimático y enzimático, ya que esta reacción no implica la ruptura de enlaces covalentes.

En el caso de la reacción de descarboxilación de aminoácidos, sin embargo, los mecanismos enzimático y no enzimático son muy distintos. En el proceso enzimático interviene una coenzima (el piridoxal-5'-fosfato) que se une al aminoácido para formar una imina, y proporciona la contribución más importante a la eficiencia catalítica de la enzima. La coenzima es un elemento del proceso enzimático, aunque introduce un cambio en el mecanismo de reacción. De todas formas, los incrementos de velocidad típicos de las enzimas son enormes independientemente del mecanismo de reacción.

2.2. Catálisis enzimática de las reacciones de transferencia protónica en el carbono

Los enlaces C-H presentes en las moléculas biológicas tienen que ser estables en agua para garantizar la viabilidad de los sistemas vivos, pero a la vez es necesario que existan mecanismos de catálisis enzimática que reduzcan la escala de tiempos para la ruptura heterolítica de dichos enlaces en una gran variedad de procesos metabólicos. El análisis del mecanismo por el cual la unión de la biomolécula al catalizador enzimático facilita la reacción de transferencia protónica en el carbono requiere la integración de resultados de diferentes estudios. Estos incluyen la determinación de la estructura del complejo enzima-sustrato, la investigación del mecanismo de la correspondiente reacción de transferencia protónica en agua en ausencia de la enzima, y el estudio del efecto del entorno local de la proteína sobre la estabilidad del estado de transición para esta reacción.¹

El intervalo amplio de constantes de velocidad de orden dos (k_B) observado para la transferencia protónica no-enzimática de ácidos de carbono a

¹ Richard, J. P.; Amyes, T. L.; **2001** *Current Opinion in Chemical Biology*. 5: 626-633.

bases de Brønsted en disolución acuosa pone de manifiesto la gran variedad de barreras termodinámicas para la transferencia protónica. Sin embargo, la amplitud del intervalo de valores de la eficacia catalítica, $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$, para las mismas reacciones catalizadas por enzimas es mucho menor, lo que demuestra que existen grandes diferencias en el incremento de velocidad, $(k_{\text{cat}}/K_{\text{M}})/k_{\text{B}}$, logrado por distintas enzimas en la desprotonación de ácidos de carbono.² Estas diferencias en el trabajo realizado por diferentes enzimas^{3,4} se deben de tener en cuenta a la hora de comparar su mecanismo de acción en la catálisis de la transferencia protónica de ácidos de carbono fuertes y débiles.

La reactividad relativa de diferentes ácidos de carbono en reacciones de transferencia protónica no catalizadas por enzimas viene determinada por su valor de $\text{p}K_{\text{a}}$. El problema radica en determinar los valores de $\text{p}K_{\text{a}}$ para ácidos de carbono débiles en agua, debido a que la concentración de equilibrio de la base conjugada es demasiado pequeña para poder detectarla con medidas directas. Las constantes de acidez en el carbono se pueden determinar a partir de la relación de constantes de velocidad para la transferencia protónica reversible del ácido de carbono al disolvente (HO^- o H_2O) o a una base de Brønsted, junto con el valor de $\text{p}K_{\text{a}}$ de la especie que actúa como base. Las constantes de velocidad para la desprotonación de ácidos de carbono débiles se pueden determinar monitorizando la incorporación de deuterio en el ácido de carbono utilizando D_2O como disolvente.^{5,6} La constante de velocidad para la protonación rápida del carbanión formado se puede estimar utilizando una

² Richard, J. P.; **1984** *J. Am. Chem. Soc.* 106: 4926-4936.

³ Bearne, S. L.; Wolfenden, R.; **1995** *J. Am. Chem. Soc.* 117: 9588-9589.

⁴ Taylor, E. A.; Palmer, D. R. J.; Gerlt, J. A.; **2001** *J. Am. Chem. Soc.* 123: 5824-5825.

⁵ Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **1992** *J. Am. Chem. Soc.* 114: 10297-10302.

⁶ D'Ordine, R. L.; Bahnson, B. J.; Tonge, P. J.; Anderson, V. E.; **1994** *Biochemistry*. 33: 14734-14742.

reacción controlada por difusión como reloj para la transferencia protónica^{7,8}, o bien directamente estudiando la protonación de enolatos generados mediante fotólisis de destello⁹, entre otros métodos.

2.3 El centro activo enzimático como medio de reacción

Una gran parte del poder catalítico de las enzimas procede de la orientación favorable del sustrato en el centro activo enzimático, que favorece la formación del estado de transición para la reacción catalizada. Este centro activo es una región específica de la enzima en la que se encuentran los residuos de aminoácidos que contribuyen a la unión del sustrato (y del cofactor si lo hay) y aquellos que participan en la catálisis enzimática, también llamados grupos catalíticos. El centro activo es una parte pequeña del volumen total de la enzima. La mayor parte de los residuos de aminoácidos de la proteína no tienen contacto con el sustrato y su función es la de crear la estructura tridimensional del centro activo, en la que participan una serie de aminoácidos que están alejados unos de otros en la estructura primaria de la enzima.

Los centros activos enzimáticos son generalmente hendiduras o grietas que tienen un cierto carácter no polar, es decir, con una constante dieléctrica efectiva menor que la del agua. Sin embargo, en su interior están presentes de forma estructurada un número limitado de cadenas laterales de aminoácidos con carga o polares, que a su vez interaccionan con los grupos polares o con carga del sustrato. En el microentorno no polar del centro activo, algunos de

⁷ Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **1996** *J. Am. Chem. Soc.* 118: 3129-3141.

⁸ Richard, J. P.; Williams, G.; Gao, J.; **1999** *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 715-726.

⁹ Bakulev, V. A.; Chiang, Y.; Kresge, A. J.; Meng, Q.; Morzherin, Y. Y.; Popik, V. V.; **2001** *J. Am. Chem. Soc.*, 123: 2681-2682.

estos residuos polares adquieren propiedades especiales que son esenciales para la catálisis.

La barrera termodinámica para la transferencia protónica constituye la contribución más importante a la barrera de activación para la desprotonación de un carbono en posición alfa a un grupo carbonilo en el centro activo enzimático. La bibliografía recoge un gran número de evidencias experimentales que indican que ciertos grupos ácidos y básicos de las cadenas laterales de aminoácidos son necesarios para observar una catálisis eficiente. Sin embargo, la catálisis de esta reacción de desprotonación por ácidos y bases de Brønsted en agua es generalmente débil. No se han realizado muchos estudios dirigidos a entender el origen de este aumento en la magnitud de la catálisis por ácidos y bases de Brønsted en reacciones catalizadas por enzimas.¹⁰ La existencia de una mayor fuerza impulsora para la transferencia protónica del carbono a la base catalítica en el medio enzimático en comparación con el medio acuoso permitiría explicar la intensificación de la catálisis ácido-base en presencia de la enzima. El centro activo enzimático es un medio de constante dieléctrica muy inferior a la del agua, en el que están presentes una serie de grupos polares con la orientación adecuada para proporcionar una estabilización electrostática del anión enolato formado como producto de la reacción. La magnitud de esta interacción electrostática es inversamente proporcional a la constante dieléctrica del medio y, por lo tanto, la estabilización del estado de transición será mayor en el medio enzimático que en disolución.^{11,12,13} Además, la interacción entre el estado de transición y

¹⁰ Richard, J. P.; **1998** *Biochemistry* 37: 4305-4309.

¹¹ Richard, J. P.; Amyes, T. L.; **2004** *Bioorganic Chemistry* 32: 354-366.

¹² Simonson, T.; Carlsson, J; Case, D. A.; **2004** *J. Am. Chem. Soc.* 126: 4167-4180.

¹³ Antosiewicz, J.; McCammon, J. A.; Gilson, M. K.; **1996** *Biochemistry* 35: 7819-7833.

un grupo polar de carga o momento dipolar opuesto orientado de forma precisa en el medio enzimático será más favorable desde el punto de vista entrópico que la correspondiente interacción para la reacción bimolecular en agua.¹⁴

La desprotonación de ácidos de carbono catiónicos conduce a la formación de zwitteriones en los que la interacción electrostática entre cargas opuestas puede ser considerada como una solvatación interna, cuya magnitud aumenta al disminuir la distancia entre las cargas. Esta interacción favorece la formación de iluros por desprotonación de ácidos de carbono catiónicos frente a la formación de los carbaniones correspondientes por desprotonación de ácidos de carbono neutros. Este hecho se ve reflejado en la gran acidez del carbono de las cetonas catiónicas,¹⁵ y de la forma zwitteriónica de los aminoácidos.^{16,17,18,19}

2.4 Formación y estabilidad de los enolatos de aminoácidos

Algunas racemasas de aminoácidos catalizan la interconversión de los isómeros D y L del aminoácido mediante la abstracción de un protón del sustrato unido al enzima para formar un enolato intermedio, el cual sufre una reprotonación no-estereoespecífica que genera el aminoácido racémico. La desprotonación en el carbono de la forma catiónica del aminoácido conduce a la formación de un iluro, el cual está fuertemente estabilizado por interacciones de tipo electrostático entre cargas opuestas situadas en átomos contiguos. La

¹⁴ Page, M. I.; Jencks, W. P.; **1971** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68: 1678-1683.

¹⁵ Tobin, J. B.; Frey, P. A.; **1996** *J. Am. Chem. Soc.* 118: 12253-12260.

¹⁶ Guthrie, J. P.; **1996** *Chem. Biol.* 3: 163-170.

¹⁷ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

¹⁸ Rios, A.; Crueiras, J.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2001** *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7949-7950.

¹⁹ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2002** *J. Am. Chem. Soc.* 124: 8251-8259.

magnitud de este tipo de interacciones aumenta al disminuir la constante dieléctrica del medio. La información existente en la bibliografía permite comparar las barreras termodinámicas para la reacción de desprotonación en el carbono de la forma catiónica de aminoácidos, tanto en fase gas como en disolución.²⁰

El efecto que un sustituyente $-\text{NMe}_3^+$ tiene sobre la acidez del oxígeno de un ácido carboxílico depende de forma importante del medio de reacción. Así, cuando se sustituye un protón por un grupo $-\text{NMe}_3^+$ en el ión acetato se observa un pequeño descenso en la basicidad del grupo carboxilato en agua, $\Delta G_w = -4$ kcal/mol ($\Delta pK_a = 2,9$), pero la disminución es mucho mayor en fase gas, $\Delta G_g = -109$ kcal/mol (Figura 2.2, A). Esta diferencia de aproximadamente 100 kcal/mol refleja la mayor energía libre de solvatación del catión trimetilamonio y del anión carboxilato cuando están en moléculas distintas, ΔG_{solv}^R , respecto a la situación en la que forman parte de la misma molécula, como ocurre en un zwitterión, que se puede considerar formalmente neutro, ΔG_{solv}^P (Figura 2.2). Esta diferencia energética se debe a que el acceso del disolvente a los grupos cargados en el zwitterión está restringido por la unión covalente de estos grupos, y además la estabilización del zwitterión por interacción con el disolvente se ve contrarrestada por un debilitamiento de la “solvatación interna” del zwitterión por interacción entre las cargas opuestas en un disolvente polar como el agua en comparación con fase gas. La separación entre las cargas opuestas en el carbanión zwitteriónico resultante de la desprotonación del carbono alfa es menor que en la especie $\text{Me}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$ (Figura 2.2, B).

²⁰ Williams, G.; Maziarz, E. P.; Amyes, T. L.; Wood, T. D.; Richard, J. P.; **2003** *Biochemistry* 42: 8354-8361.

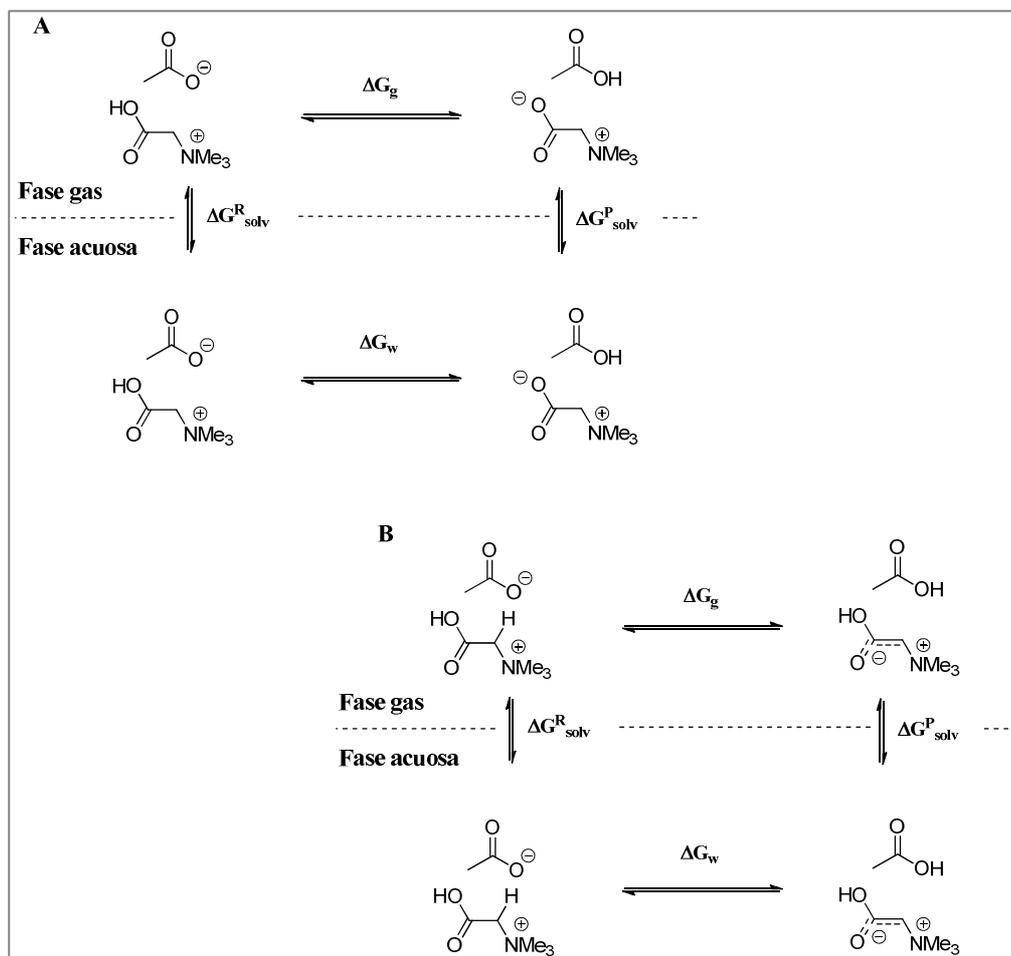


Figura 2.2 Ciclos termodinámicos de las posibles desprotonaciones del aminoácido glicina por el ión acetato en fase gas y en disolución acuosa.²¹

²¹ Richard, J. P.; Amyes, T. L.; **2004** *Bioorganic Chemistry* 32: 354-366.

Como consecuencia de esta menor separación de cargas es de esperar una disminución del valor de $\Delta G_{\text{solv}}^{\text{P}}$ (Figura 2.2, B) debido a una mayor restricción del acceso del disolvente a la carga y a un aumento de la compensación de la “solvatación interna” del zwitterión en fase gas.

Hay que tener en cuenta que cuando la reacción tiene lugar en un centro activo enzimático no polar, sólo es posible observar una fracción del aumento en la fuerza impulsora termodinámica que se produce para la desprotonación en el carbono de la forma catiónica del aminoácido al pasar de fase gas a disolución. Esto es debido a que: (i) La constante dieléctrica “efectiva” en el centro activo de la enzima es superior al valor de $D = 1$ para fase gas, por lo que la diferencia entre la estabilización del enolato zwitteriónico en el centro activo no polar de la enzima con respecto a la estabilización en agua será inferior a las 100 kcal/mol correspondientes a la mayor estabilización que se produce en fase gas con respecto a la disolución acuosa. (ii) El coste energético asociado a la formación de la base que desprotona el aminoácido, un anión tiolato,²² en el centro activo no polar es probablemente significativo. (iii) La forma catiónica del aminoácido ($\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COOH}$) es la forma minoritaria en disolución acuosa a $\text{pH} = 7$, y la protonación del aminoácido en el oxígeno carboxílico también tendrá un coste energético. Sin embargo, solo es necesario que una pequeña parte del aumento de más de 100 kcal/mol en la estabilización del carbanión zwitteriónico observado al pasar de fase gas a disolución se manifieste en la catálisis de la formación del enolato zwitteriónico en el centro activo de la enzima para que dicha estabilización represente una contribución importante al aumento de velocidad observado para la reacción enzimática. Así, un 10% de esta energía de estabilización máxima podría resultar en un

²² Koo, C. W.; Blanchard, J. S.; **1999** *Biochemistry* 38: 4416-4422.

incremento de velocidad superior a 10^7 veces para la desprotonación del ácido de carbono.

Se puede concluir que las racemasas de aminoácidos que actúan sin cofactor desempeñan dos funciones clave: (a) activar la forma más abundante del aminoácido a pH fisiológico, el zwitterión, para la enolización mediante la protonación previa o concertada del grupo carboxilato y (b) favorecer la estabilización intramolecular del enolato formado como intermedio proporcionando un medio de baja constante dieléctrica.

2.5 Piridoxal 5'-fosfato como cofactor enzimático

El éster fosfato de la forma aldehído de la vitamina B6, el piridoxal 5'-fosfato (PLP), es el cofactor de muchas enzimas que catalizan reacciones de aminoácidos y aminas. Las reacciones en las que participa son numerosas y es considerado como uno de los catalizadores naturales más versátiles. La primera etapa en el mecanismo de catálisis covalente por PLP consiste en la formación de un ion iminio entre el aminoácido y el PLP. La formación de este aducto permite estabilizar el carbanión formado mediante la delocalización de la carga negativa en el anillo de piridina del cofactor.

La conversión de un compuesto carbonílico en una imina es una etapa fundamental en numerosos procesos biológicos. La formación de iminas (bases de Schiff) es una reacción reversible que comienza con la adición nucleófila de una amina al grupo carbonilo de una cetona o un aldehído para formar un intermedio tetrahédrico. En una segunda etapa, la eliminación de agua de la carbinolamina, catalizada por ácidos generales, permite obtener la imina

(Figura 2.3).^{23,24} Las iminas existen mayoritariamente en la forma de imina protonada o ion iminio en disoluciones acuosas neutras. Los iones iminio son electrófilos con una reactividad muy superior a la de aldehídos y cetonas, ya que la protonación del nitrógeno polariza el enlace π haciéndolo más reactivo que el C=O.

En las reacciones enzimáticas en las que participa el PLP es necesario que la condensación del aminoácido con el cofactor para formar la base de Schiff ocurra a una velocidad igual o superior a la de etapas posteriores, que implican la ruptura de enlaces C–C o C–H. En general, el PLP está presente en el centro activo de la enzima formando una base de Schiff con el grupo amino de un residuo de lisina, denominada aldimina interna. La formación de la correspondiente imina con el aminoácido, aldimina externa, se produce mediante un proceso de transiminación, que tiene lugar a una velocidad mayor que la reacción del aminoácido con el PLP libre.

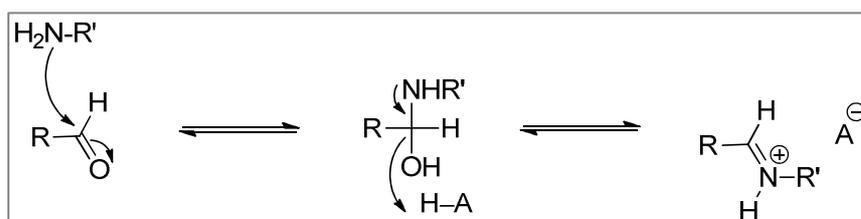


Figura 2.3 Mecanismo de formación de iminas a través de un intermedio carbinolamina.

Todos los procesos enzimáticos en los que participa el PLP comparten ciertas características mecanicistas. La formación de una aldimina entre el aminoácido y el grupo aldehído del cofactor debilita los enlaces con el carbono

²³ Malatesta, V.; Cocivera, M.; **1978**. *J. Org. Chem.* 43: 1737-1742.

²⁴ Jencks, W. P.; **1987**. *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. Dover Mineola, New York.

alfa al grupo imino, ya que la ruptura heterolítica de cualquiera de estos enlaces con pérdida de H^+ , CO_2 o R^+ permite obtener un enolato fuertemente estabilizado por delocalización de la carga negativa en el sistema π conjugado. El trabajo pionero del grupo de E. E. Snell alrededor de 1950 sobre la reactividad de esta coenzima proporcionó el fundamento mecanicista necesario para analizar su actividad enzimática.^{25,26}

2.6 Modelos no enzimáticos de la catálisis por piridoxal 5'-fosfato

La capacidad del piridoxal 5'-fosfato, PLP, para estabilizar la carga negativa en el carbono en alfa al nitrógeno de la imina hace que, en ausencia de la enzima, este cofactor catalice muchas de las reacciones en las que está implicado a nivel metabólico. Sin embargo, estas reacciones modelo son, en general, reacciones muy lentas, hecho que, junto con la complicación derivada de la existencia de diferentes formas iónicas de la aldimina, dificulta enormemente su estudio.²⁷

En los primeros estudios sobre el mecanismo de las reacciones catalizadas por la vitamina B6, E. E. Snell y col. identificaron el grupo aldehído, el grupo fenol y el anillo de piridina como las características estructurales de esta molécula que son esenciales para su actividad catalítica. De los estudios llevados a cabo en su laboratorio sobre las reacciones no-enzimáticas del PLP estos autores obtuvieron las siguientes conclusiones:

²⁵ Snell, E..E; **1944** *J. Biol. Chem.* 154: 313-314.

²⁶ Snell, E..E; Leklem, J. E.; Reynolds, R. D.; **1981** *Methods in Vitamin B₆ Nutrition* 1-19, Plenum, New York.

²⁷ Metzler, D. E.; Ikawa, M.; Snell, E. E.; **1954** *J. Am. Chem. Soc.* 76: 648-652.

(i) El grupo aldehído del cofactor reacciona fácil y reversiblemente con distintos aminoácidos para formar las correspondientes bases de Schiff, que posteriormente evolucionan para dar los productos de reacción.

(ii) Un aldehído es un buen catalizador cuando posee un grupo fuertemente atractor de electrones, como el nitrógeno del anillo de piridina del PLP, en posición *orto* o *para* al grupo –CHO.

(iii) La presencia del grupo hidroxilo adyacente al grupo aldehído hace aumentar la actividad catalítica del PLP. Esto se considera debido a la formación de un anillo quelato de seis miembros que mantiene la base de Schiff en una conformación plana.

(iv) En sistemas modelo, los grupos 5-hidroximetil y 2-metil no juegan un papel importante en la catálisis. Sin embargo, en medios enzimáticos el grupo $5\text{-CH}_2\text{OPO}_3^{2-}$ constituye un punto de unión de la coenzima a la proteína.

El efecto que producen los diferentes sustituyentes sobre la capacidad catalítica del PLP es objeto de estudio de este informe.

2.7 Mecanismo de actuación del PLP como catalizador de reacciones de aminoácidos

En 1952 Braunstein y col.²⁸ propusieron un mecanismo general para la acción catalítica del PLP basándose en estudios de enzimas que utilizan este cofactor para catalizar reacciones del metabolismo de los aminoácidos. Este mecanismo, que coincide con el propuesto por Snell²⁹ a partir del estudio de reacciones no-enzimáticas, puede ser resumido como: *El piridoxal fosfato reacciona para convertir el grupo amino de un substrato en una base de Schiff*

²⁸ Braunstein, A. E.; Kritzmann, M. G.; 1952 *Dokl Akad Nauk SSSR*. 85: 1115-1118.

²⁹ Metzler, D. E.; Ikawa, M.; Snell, E. E.; 1954 *J. Am. Chem. Soc.* 76: 648-652.

que es electrónicamente equivalente a un carbonilo adyacente. Sin embargo, la base de Schiff de un aminoácido con un aldehído sencillo (como por ejemplo el acetaldehído) tiene la polaridad opuesta a la de este grupo C=O, así que una imina no podría sustituir a un grupo carbonilo en la activación de un protón en posición α ni en facilitar la ruptura del enlace C-C del aminoácido. Es necesaria por lo tanto la presencia de un grupo fuertemente aceptor de electrones, como la piridina, conjugado con el grupo C=N, de forma que los electrones puedan fluir del sustrato a la coenzima.

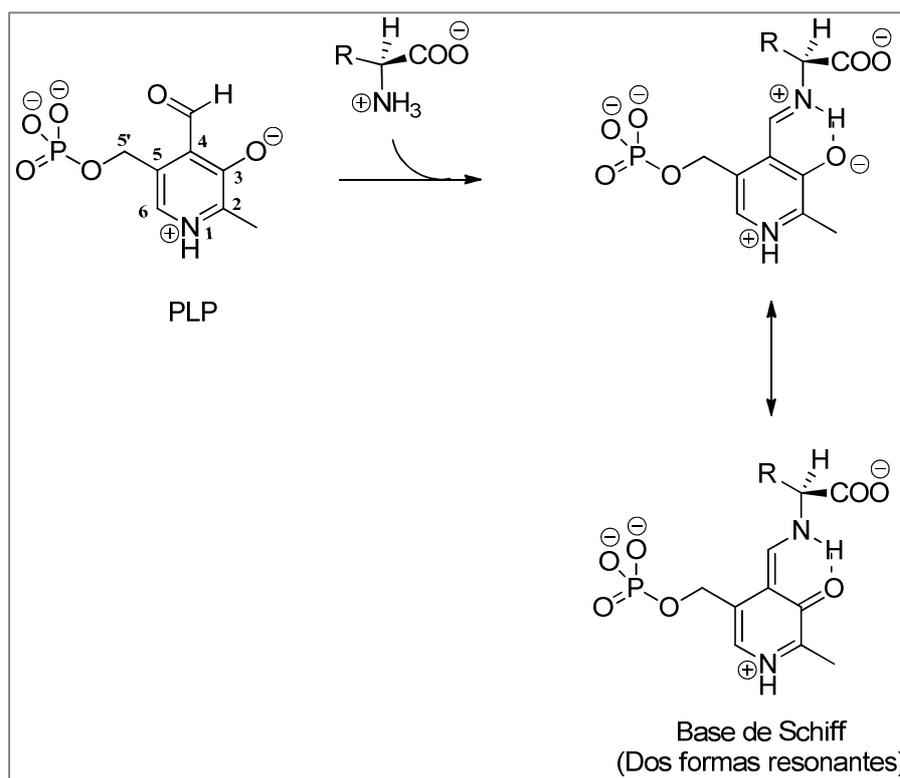


Figura 2.4 Piridoxal 5'-Fosfato (PLP), un coenzima especial para las reacciones de los aminoácidos.

2.8 Reacciones modelo que tienen al PLP como catalizador

Se conocen en la actualidad las estructuras de 1125 enzimas que utilizan el piridoxal 5'-fosfato como cofactor. La gran abundancia de enzimas dependientes del PLP en sistemas biológicos es debida, sin duda, a la utilidad catalítica de este cofactor en las transformaciones químicas de los aminoácidos, y no es por lo tanto sorprendente el número considerable de reacciones químicas no-enzimáticas que pueden experimentar las aldíminas formadas por el PLP con α -aminoácidos. Se han identificado, a través del estudio de sistemas modelo, los siguientes tipos de reacciones de aminoácidos en las que participa el PLP.

1. Transaminación (de aminoácido a cetoácido)
2. Intercambio del protón en posición α .
3. Racemización del centro quiral en el carbono en posición α .
4. Ruptura del enlace C-C en la posición α - β del aminoácido (ruptura aldólica).
5. Reacción de α - β eliminación cuando el sustituyente en posición β es electronegativo.
6. Descarboxilación en la posición α .
7. Descarboxilación en la posición γ .

El descubrimiento de estas reacciones, tanto en ausencia como en presencia de enzimas, se produjo más o menos simultáneamente, aunque algunas de ellas fueron descritas en primer lugar en sistemas no-enzimáticos. La gran ventaja del estudio de sistemas modelo en disolución acuosa frente a los correspondientes sistemas enzimáticos radica en la posibilidad de observar la reacción en intervalos amplios de pH y así poder determinar la reactividad

de las distintas formas iónicas de la aldimina. Al mismo tiempo, en ocasiones es útil hacer modificaciones en la estructura del PLP, eliminando sistemáticamente alguno de sus grupos funcionales. De esta forma se puede obtener información sobre el papel de los distintos sustituyentes presentes en el cofactor en la catálisis. El 5'-deoxipiridoxal (DPL) es muy útil como análogo del PLP en estudios llevados a cabo mediante espectroscopía RMN, debido a las complicaciones que causa el grupo fosfato cuando se utiliza esta técnica.

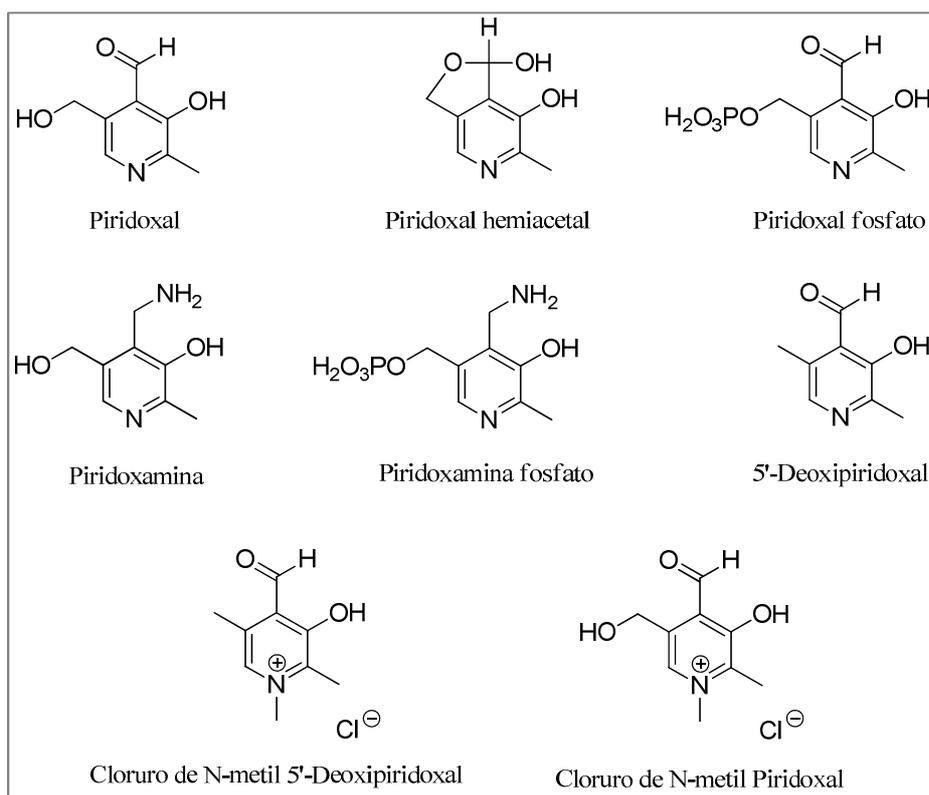


Figura 2.5 Estructuras del piridoxal 5'-fosfato y algunos de sus análogos utilizados en los estudios de reacciones modelo de este cofactor enzimático con aminoácidos.

2.8.1 Transaminación

Las reacciones de transaminación y racemización de aminoácidos fueron las primeras reacciones en la que se demostró experimentalmente la presencia de la base de Schiff formada con el PLP y su papel como intermedio de la reacción.³⁰ La transaminación convierte el α -aminoácido en un α -cetoácido a través de una segunda base de Schiff denominada cetimina.

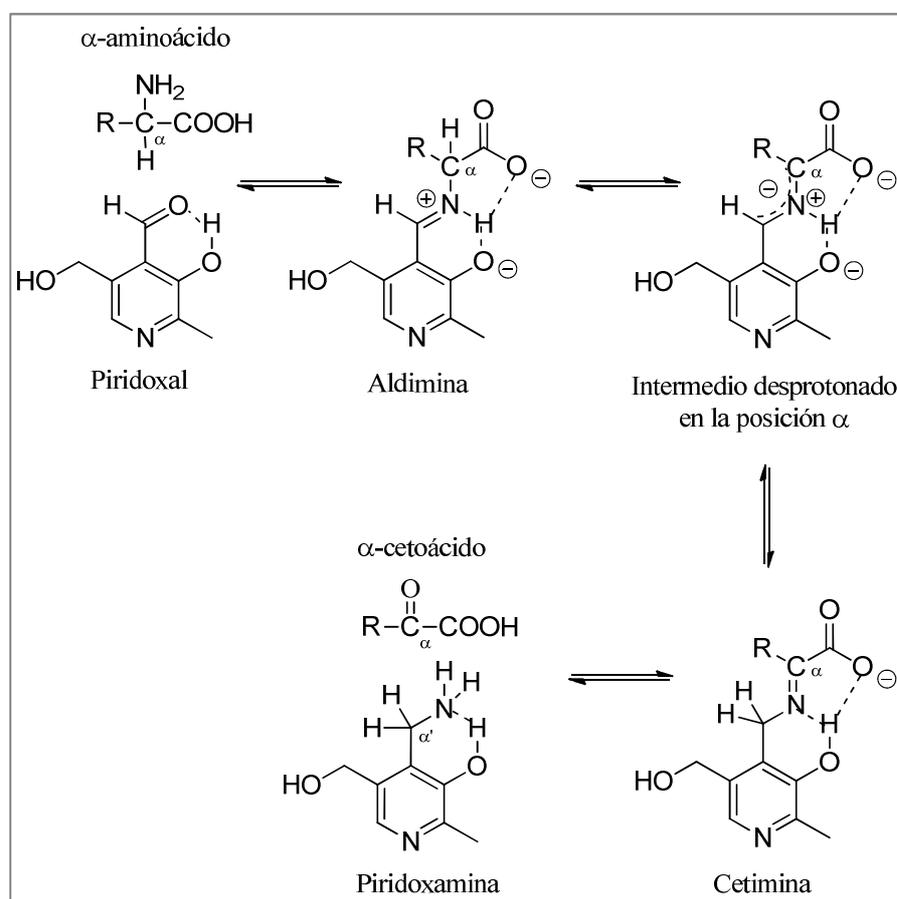


Figura 2.6 Mecanismo de la reacción de transaminación catalizada por piridoxal.

³⁰ Metzler, D. E.; Ikawa, M.; Snell, E. E.; 1954 *J. Am. Chem. Soc.* 76: 648-652.

El intermedio de la reacción es un carbanión producido por la desprotonación de la aldimina en el carbono α y que está estabilizado por delocalización de la carga negativa en el anillo de piridina del cofactor. La reprotonación de este intermedio en el carbono 4' del cofactor conduce a la cetimina, que se hidroliza para formar la piridoxamina 5'-fosfato y el correspondiente α -cetoácido.

Martell y col.³¹ sugirieron que la tendencia a reprotonar el carbanión en el carbono α debería predominar, ya que la aldimina formada estaría estabilizada por conjugación con el anillo aromático. Sin embargo, la presencia de grupos dadores de carga unidos a la posición α favorecería la distorsión de la nube electrónica delocalizada, aumentando la reprotonación del carbanión en la posición 4' y por lo tanto la formación de una cetimina.

2.8.2 Racemización

La reacción de racemización de un α -aminoácido catalizada por PLP viene precedida por la formación de un carbanión tras la abstracción de un protón del carbono en la posición α de la base de Schiff. La reprotonación del intermedio carbaniónico en la misma posición ocurre sin estereoespecificidad.

Las enzimas que catalizan esta reacción se denominan racemasas y tienen gran importancia para las bacterias, pues sintetizan D-alanina y D-ácido glutámico a partir de los isómeros L-³² La ruptura heterolítica del enlace del átomo de hidrógeno en posición α a la base de Schiff es el punto de partida de muchas de las reacciones de los α -aminoácidos catalizadas por piridoxal.

³¹ Martell, A. E.; **1982** *Adv. Enzymol.* 53: 163-199.

³² Shaw, J. P.; Petsko, G. A.; Ringe, D.; **1997** *Biochemistry.* 36: 1329-1342.

2.8.3 Descarboxilación

La reacción de descarboxilación de los α -aminoácidos es una reacción irreversible que suele aparecer con frecuencia como la etapa final en la síntesis de compuestos con un grupo amino.³³ Son muchas las enzimas dependientes del piridoxal 5'-fosfato que catalizan esta reacción, dando lugar a la formación de aminas bioactivas. La catálisis por PLP de la reacción de descarboxilación de ácidos α -amino monocarboxílicos es muy difícil de observar en sistemas modelo,³⁴ ya que existen otras reacciones que se inician con la desprotonación del carbono α que ocurren a mayor velocidad.³⁵

En las aldiminas formadas entre los α -aminoácidos y el PLP, el grupo carboxilato está coordinado a través de un enlace de hidrógeno al átomo de nitrógeno protonado de la imina. La existencia de este enlace de hidrógeno favorece la orientación del grupo carboxilato en el plano del anillo aromático. La disposición más favorable para liberar el par electrónico enlazante por superposición con el sistema π de la base de Schiff sería una posición perpendicular al plano del anillo aromático.³⁶ La coordinación del grupo carboxilato con el nitrógeno protonado de la imina parece ser suficiente para prevenir la descarboxilación en posición α .

Diversos estudios en sistemas modelo no-enzimáticos han demostrado que el piridoxal 5'-fosfato cataliza una serie de reacciones de los aminoácidos. Sin embargo, una enzima dependiente del PLP concreta es muy específica, catalizando solo un tipo de reacción. Este hecho lleva a plantear la pregunta de

³³ Kalyankar, G. D.; Snell, E. E.; **1962** *Biochemistry*. 1: 594-600.

³⁴ Dunathan, H. C.; **1966** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 55: 712-716.

³⁵ Shaw, J. P.; Petsko, G. A.; Ringe, D.; **1997** *Biochemistry*. 36: 1329-1342.

³⁶ Tatsumoto, K.; Martell, A. E.; **1977** *J. Am. Chem. Soc.* 99: 6082-6088.

cómo una enzima logra esta especificidad utilizando un cofactor que puede catalizar múltiples reacciones. En respuesta a esta cuestión, Dunathan propuso en 1966 que las enzimas dependientes del PLP utilizan efectos estereoelectrónicos para controlar la especificidad de sus reacciones. Según su hipótesis, la enzima sitúa el enlace que debe romper en la aldimina externa paralelo al sistema π , de forma que el orbital p que se genera al romper el enlace está alineado con el sistema π para conseguir el máximo solapamiento $\sigma-\pi$. De esta forma, la energía del estado de transición disminuye y la velocidad de la reacción aumenta. Esta orientación también produciría una geometría más cercana a la del intermedio, minimizando el movimiento molecular en la aproximación al estado de transición. En la figura 2.7 se muestra la geometría de la aldimina más favorable para la ruptura del enlace C-H en la posición α del aminoácido. Se consigue otra geometría adecuada para la ruptura del mismo enlace al rotar el aminoácido 180° .

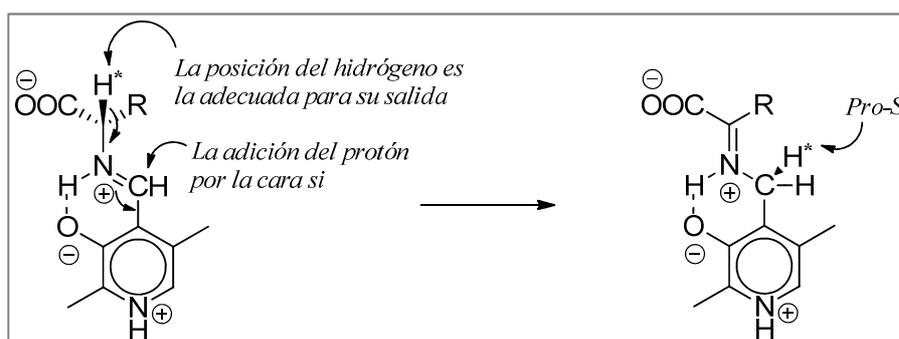


Figura 2.7 Aspectos estereoquímicos de la catálisis enzimática con PLP como coenzima.

Las reacciones enzimáticas de las bases de Schiff del PLP tienen lugar normalmente sobre una misma cara de la estructura molecular relativamente plana (figura 2.7). Este resultado es el esperado si un único grupo ácido-base

actúa como aceptor de protones en una etapa y como dador de protones en una etapa posterior. Esto conduce, naturalmente, a la retención de configuración observada en las etapas que incluyen desplazamiento y transferencia de protones desde una posición de una cara a otra posición de la misma cara.³⁷

2.8.4 α - β eliminación

Martell y Tatsumoto³⁸ realizaron estudios cinéticos de la reacción de eliminación de grupos electronegativos en la posición β de aminoácidos (serina, fosfoserina y β -cloroalanina). La catálisis por piridoxal depende de una serie de factores que controlan las dos etapas determinantes de la velocidad, la disociación del protón en posición α y el desplazamiento del sustituyente electronegativo en posición β . La figura 2.8 muestra el mecanismo propuesto para la reacción de β -eliminación de la forma monoprotonada de la aldimina.

La velocidad de la eliminación del grupo electronegativo en posición β varía con el valor del pH debido a las diferencias en reactividad de las distintas formas protonadas de la base de Schiff. A valores de pH comprendidos entre 6,5 y 10, la velocidad de la reacción aumenta rápidamente con el pH, alcanzar un valor máximo a pH entre 8 y 9, y disminuye a valores de pH mayores. La determinación de las constantes de disociación de las bases de Schiff monoprotonada y diprotonada hace posible el cálculo de las constantes de velocidad específicas para cada especie.³⁹ Las constantes de velocidad asignadas a las especies monoprotonadas son entre 10 a 30 veces mayores que

³⁷ Floss, H. G.; Vederas, J. C.; **1982** *New Comprehensive Biochemistry Stereochemistry*. Vol 3. 161-199. Elsevier, Amsterdam.

³⁸ Tatsumoto, K.; Martell, A. E.; Motekaitis, R. J.; **1981** *J. Am. Chem. Soc.* 103: 6197-6203.

³⁹ Metzler, D. E.; Longenecker, J. B.; Snell, E. E.; **1953** *J. Am. Chem. Soc.* 75: 2786-2787.

las de las formas diprotonadas. El hecho de que las formas monoprotonadas de las bases de Schiff sean más reactivas que las diprotonadas se debe a los efectos relativos sobre las dos etapas determinantes de la velocidad de reacción. Aunque para la especie diprotonada es de esperar una mayor concentración del intermedio carbaniónico, su mayor carga positiva disminuiría la velocidad de eliminación del sustituyente electronegativo. Este último efecto parece predominar.

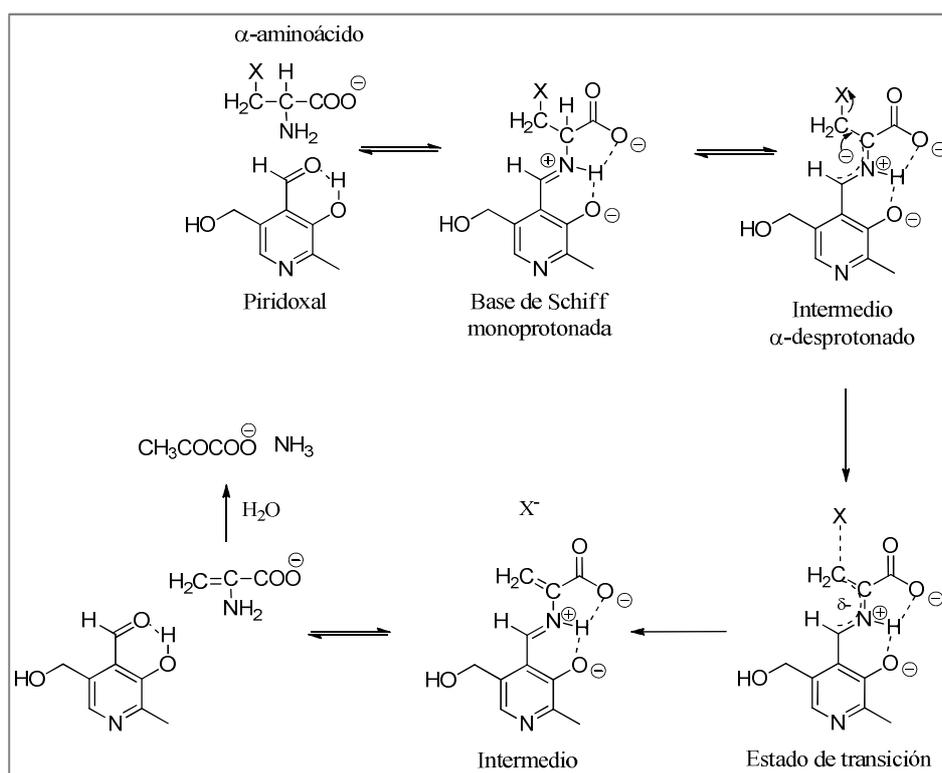


Figura 2.8 Mecanismo para la catálisis por piridoxal de la α,β -eliminación de un aminoácido con un grupo electronegativo en posición β .

2.8.5 Ruptura aldólica

La ruptura aldólica de β -hidroxi- α -aminoácidos en disolución acuosa y a temperatura ambiente ocurre de manera rápida a valores de pH altos, en presencia de piridoxal e iones metálicos.⁴⁰ La velocidad de la reacción normalmente aumenta con el pH en medio alcalino, hasta alcanzar un valor máximo a pH 10, a partir del cual se mantiene constante. Este comportamiento indica la presencia de más de una especie catalítica y la probable variación de la concentración de dichas especies con el valor de pH.

Un sistema interesante es el que involucra al piridoxal como catalizador de las reacciones de la β -fenilserina.⁴¹ En este sistema, la ruptura aldólica ocurre fácilmente para formar benzaldehído, como era de esperar, pero paralelamente se produce también la eliminación de HO^- para dar ácido fenilpirúvico. Este resultado es interesante dado que el ión HO^- es un mal grupo saliente y no es eliminado de la serina en presencia de piridoxal e iones metálicos en condiciones de reacción similares a las utilizadas para la β -fenilserina.

Los estudios cinéticos de la reacción de ruptura aldólica de una serie de fenilserinas sustituidas en posición *para* indican que los sustituyentes electronegativos (nitro, cloro, y grupos amino) tienen poca influencia en la velocidad de reacción (conducen solo a un pequeño aumento) con respecto a la fenilserina como compuesto de referencia.⁴² En general, los sustituyentes atradores de electrones deberían contrarrestar el efecto retirador de carga del nitrógeno de la aldimina. Los sustituyentes electronegativos aumentarían la

⁴⁰ Longenecker, J. B.; Ikawa, M.; Snell, E. E.; **1957** *J. Biol. Chem.* 226: 663-666.

⁴¹ Tatsumoto, K.; Martell, A. E.; **1978** *J. Am. Chem. Soc.* 100: 5549-5553.

⁴² Marcello, J.; Martell, A. E.; **1982** *J. Am. Chem. Soc.* 104: 3441-3447.

acidez del hidrógeno en posición α y estabilizarían el intermedio carbaniónico, favoreciendo así la eliminación. Pero por otra parte, un aumento en la atracción de electrones por parte del sustituyente en el anillo favorecería la disociación de un protón del grupo hidroxilo adyacente al fenilo, y el movimiento del par electrónico hacia el anillo para formar un doble enlace carbono-oxígeno, haciendo más favorable la ruptura aldólica frente a la eliminación. El efecto pequeño de los sustituyentes electronegativos sobre la velocidad de reacción puede ser considerado el resultado de efectos con tendencias opuestas que prácticamente se anulan.

2.9 Piridoxamina 5'-fosfato como coenzima

Si el piridoxal 5'-fosfato es el cofactor diseñado para reaccionar con los grupos amino de una serie de sustratos, la piridoxamina 5'-fosfato (PMP) actúa como coenzima en las reacciones de compuestos carbonílicos. Un ejemplo de este tipo de función lo constituye la formación de 3,6-dideoxihexosas necesarias en la superficie de las células bacterianas.⁴³

La formación de cetiminas (similares a las aldiminas) entre la piridoxamina o compuestos análogos y α -cetoácidos da lugar a reacciones como la descarboxilación en posición β , la desfosforilación en posición β o la eliminación de grupos electronegativos en la posición γ , además de la transaminación para transformar un α -cetoácido en un α -aminoácido.

⁴³ Rubenstein, P. A.; Strominger, J. L.; **1974** *J. Biol. Chem.* 249: 3776-3781.

CAPITULO 3

3. Enolatos de la glicina: Efecto de la formación de iones iminio con cetonas simples sobre la acidez del carbono en posición α al grupo amino

3.1 Introducción

El interés que existe en caracterizar las barreras termodinámicas y cinéticas de la reacción de desprotonación del carbono en posición α al grupo amino de aminoácidos^{44,45,46} y péptidos⁴⁷ en agua se debe a que esta información nos puede ayudar a comprender el mecanismo por el cual las enzimas catalizan la desprotonación de aminoácidos.^{44,45,48,49} Las enzimas que catalizan la desprotonación de ciertos aminoácidos como alanina,^{50,51} glutamato^{52,53} y diaminopimelato⁵⁴ no necesitan la asistencia de ningún cofactor electrófilo que estabilice la carga negativa del carbono en posición α al grupo amino después de la desprotonación. Los resultados obtenidos mediante métodos computacionales,⁵³ experimentales^{45,49,55} y por cristalografía

⁴⁴ Rios, A.; Richard, J. P.; **1997** *J. Am. Chem. Soc.* 119: 8375-8376.

⁴⁵ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

⁴⁶ Richard, J. P.; Williams, G.; Gao, J.; **1999** *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 715-726.

⁴⁷ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2002** *J. Am. Chem. Soc.* 124: 8251-8259.

⁴⁸ Rios, A.; Crujeiras, J.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2001** *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7949-7950.

⁴⁹ Richard, J. P.; Amyes, T. L. **2004** *Bioorg. Chem.*, 32: 354-366.

⁵⁰ Spies, M. A.; Toney, M. D. **2003** *Biochemistry*, 42: 5099-5107.

⁵¹ Spies, M. A.; Woodward, J. J.; Watnik, M. R.; Toney, M. D. **2004** *J. Am. Chem. Soc.*, 126: 7464-7475.

⁵² Gallo, K. A.; Tanner, M. E.; Knowles, J. R. **1993** *Biochemistry*, 32: 3991-3997.

⁵³ Puig, E.; Garcia-Viloca, M.; Gonzalez-Lafont, A.; Lluch, J. M. **2006** *J. Phys. Chem. A*, 110: 717-725.

⁵⁴ Pillai, B.; Cherney, M. M.; Diaper, C. M.; Sutherland, A.; Blanchard, J. S.; Vederas, J. C.; James, M. N. G. **2006** *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 103: 8668-8673.

⁵⁵ Patrick, J. S.; Yang, S. S.; Cooks, R. G. **1966** *J. Am. Chem. Soc.*, 118: 231-232.

de rayos X⁵⁶ muestran que la conversión del aminoácido unido a la proteína en un intermedio de reacción zwitteriónico iluro está favorecido por el medio poco polar del centro activo enzimático.⁵⁷

El piridoxal 5'-fosfato (PLP) es un catalizador electrofílico extraordinario para la reacción de desprotonación en el carbono de los α -aminoácidos en agua,^{58,59} y en centros activos enzimáticos.⁶⁰ La primera etapa del mecanismo en la catálisis covalente por PLP es la formación de una imina con el aminoácido. La formación de este aducto debilita todos los enlaces del carbono en posición α al grupo imino, debido a que la ruptura heterolítica de uno de estos enlaces y la consiguiente pérdida de H⁺, CO₂ o R⁺ produce un carbanión que está muy estabilizado por delocalización de la carga negativa en el anillo de piridina del cofactor.

En algunas enzimas que catalizan la descarboxilación de aminoácidos está presente el grupo prostético piruvoilo, lo que sugiere que esta cetona es un catalizador electrófilo efectivo de las reacciones que transcurren a través de intermedios carbaniónicos.^{61,62,63,64} Sin embargo, poco se sabe sobre la eficiencia catalítica relativa de compuestos carbonílicos sencillos respecto al PLP en los procesos de catálisis electrófila de la desprotonación de

⁵⁶ Pillai, B.; Cherney, M. M.; Diaper, C. M.; Sutherland, A.; Blanchard, J. S.; Vederas, J. C.; James, M. N. G. **2006** *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 103: 8668-8673.

⁵⁷ Richard, J. P.; Amyes, T. L. **2004** *Bioorg. Chem.*, 32: 354-366.

⁵⁸ Dixon, J. E.; Bruice, T. C.; **1973** *Biochemistry* 12: 4762-4766.

⁵⁹ Toth, K.; Richard, J. P. **2007** *J. Am. Chem. Soc.*, 129: 3013-3021.

⁶⁰ Toney, M. D. **2005** *Arch. Biochem. Biophys.*, 433: 279-287.

⁶¹ Tolbert, W. D.; Zhang, Y.; Cottet, S. E.; Bennett, E. M.; Ekstrom, J. L.; Pegg, A. E.; Ealick, S. E. **2003** *Biochemistry*, 42: 2386-2395.

⁶² Graham, D. E.; Xu, H.; White, R. H. **2002** *J. Biol. Chem.*, 277: 23500-23507.

⁶³ Bach, R. D.; Canepa, C. **1997** *J. Am. Chem. Soc.*, 119: 11725-11733.

⁶⁴ Gallagher, T.; Rozwarski, D. A.; Ernst, S. R.; Hackert, M. L. **1993** *J. Mol. Biol.*, 230: 516-528.

aminoácidos. Esto se debe principalmente a la falta de estudios modelo en los que se utilicen compuestos carbonílicos sencillos.^{65,66}

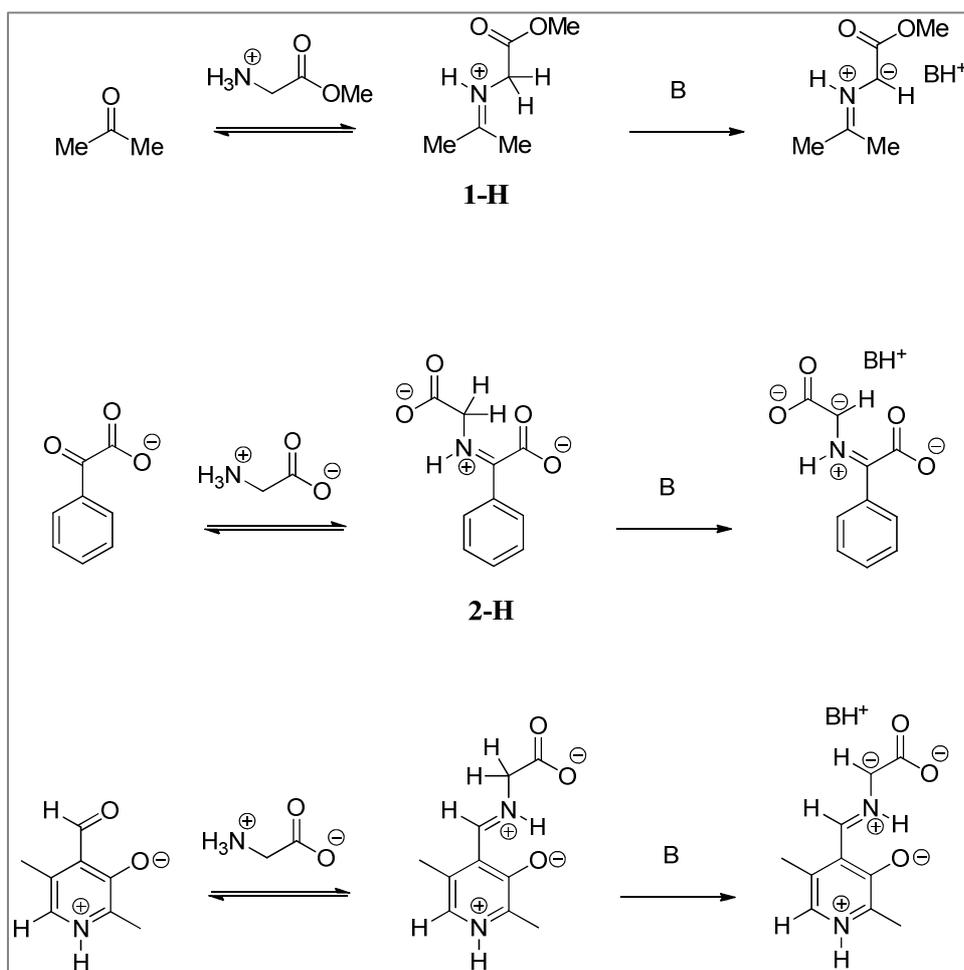


Figura 3.1 Formación de los iones iminio de la glicina metil éster con acetona (**1-H**), de la glicina con fenilgloxilato (**2-H**), de la glicina con **DPL** y su posterior desprotonación.

⁶⁵ Owen, T. C.; Young, P. R., Jr. **1974** *FEBS Lett*, 43: 308-312.

⁶⁶ Young, P. R.; Howell, L. G.; Owen, T. C. **1975** *J. Am. Chem. Soc.*, 97: 6544-6551.

Una cetona simple como la acetona posee una fracción significativa del poder del PLP como catalizador de la desprotonación de aminoácidos, debido a la gran acidez del carbono del aducto ión iminio **1-H** (figura 3.1).⁶⁷ En este capítulo se exponen los resultados obtenidos en la investigación sobre la catálisis por bases de Brønsted de la desprotonación de **1-H** y sobre la catálisis de la desprotonación de glicina por fenilglioxilato (figura 3.1). Cuando comparamos la catálisis por fenilglioxilato de la desprotonación de la glicina con la catálisis por 5'-deoxipiridoxal (DPL)⁶⁸ se puede ver que la acidez del carbono en posición α al grupo imino de los aductos de fenilglioxilato (**2-H**, figura 3.1) y DPL son similares. Por lo tanto, se puede aumentar la acidez del carbono en posición α al grupo amino de los aminoácidos formando iones iminio con compuestos carbonílicos de estructuras mucho más sencillas que el PLP. Sin embargo, el DPL es mucho mejor catalizador de la desprotonación de la glicina que el fenilglioxilato a pD 7, por lo que debe poseer otras propiedades que le confieren un papel único como cofactor en la catálisis de reacciones bioorgánicas.

3.2 Sección Experimental

3.2.1 Materiales. Los compuestos comerciales que se citan a continuación fueron adquiridos a la compañía Aldrich: ácido clorhídrico deuterado (37 wt %, 99,5%D), deuteróxido potásico (40 wt %, 98 + % D), hidrocloreuro de la glicina metil ester, hidrocloreuro de quinuclidina, 3-quinuclidinol, hidrocloreuro de 3-cloroquinuclidina, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-

⁶⁷ Rios, A.; Crugeiras, J.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2001** *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7949-7950.

⁶⁸ Toth, K.; Richard, J. P. **2007** *J. Am. Chem. Soc.*, 129: 3013-3021.

propanol (HFIP), y 2,2,2-trifluoroetanol (TFE). La glicina y el ácido fenilglioxílico fueron adquiridos a Fluka. Las quinuclidinas sustituidas en la posición 3 fueron purificadas por recristalización con los siguientes disolventes: hidrocloreto de quinuclidina, etanol; 3-quinuclidinol, acetona; hidrocloreto de 3-cloroquinuclidina, metanol/propanol 1:1 (v/v). Los demás reactivos fueron utilizados sin ninguna purificación adicional.

3.2.2 Métodos generales. Debido a que las reacciones tienen lugar en agua deuterada como disolvente, los protones ácidos de la glicina, hidrocloreto de glicina metil éster, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , los hidrocloretos de quinuclidina y 3-cloroquinuclidina y el protón del grupo alcohol del 3-quinuclidinol fueron intercambiados por deuterio disolviéndolos en D_2O , y evaporando posteriormente el disolvente a baja presión. Este proceso se repitió al menos en otras dos ocasiones, y se finalizó con el secado a vacío, a una temperatura de $50\text{ }^\circ\text{C}$, durante aproximadamente 12 horas.^{69,70,71,72} El ácido fenilglioxílico, el ácido metoxiacético, el hexafluoroisopropanol (HFIP), y el trifluoroetanol (TFE) fueron disueltos directamente en D_2O , produciendo un aumento de menos de un 1% en el contenido de protio del disolvente.

Los tampones fosfato se prepararon mezclando las disoluciones stock de K_2DPO_4 y KD_2PO_4 en D_2O a $I = 1,0$ (KCl) para dar la relación ácido/base deseada. Los tampones acetato se prepararon disolviendo la forma básica del tampón en D_2O , que contenía la cantidad de KCl necesaria para que la fuerza iónica fuese la unidad, seguida de la adición de DCl hasta dar la relación

⁶⁹ Rios, A.; Richard, J. P.; **1997** *J. Am. Chem. Soc.* 119: 8375-8376.

⁷⁰ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

⁷¹ Rios, A.; Crugeiras, J.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2001** *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7949-7950.

⁷² Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2002** *J. Am. Chem. Soc.* 124: 8251-8259.

ácido/base deseada. Los tampones de metoxiacético, HFIP, y TFE se prepararon disolviendo sus formas ácidas con KCl en D₂O seguido de la adición de KOD para dar la relación ácido/base deseada a $I = 1,0$ (KCl). Las disoluciones de los cationes quinuclidina, 3-quinuclidinol, y 3-cloroquinuclidina en tampones fosfato a pD 7,6 se prepararon mezclando las disoluciones del ión amonio terciario ($I = 1,0$ KCl), el tampón fosfato ($I = 1,0$ KCl) y 1 M de KCl para dar una concentración total de tampón de 0,1 M.

Los valores de pH y de pD se determinaron a 25 °C usando un pHmetro modelo Orion 350 equipado con un electrodo Radiometer pHC4006-9 ($\gamma_{OL} = 0,78$). Los valores de pD se obtuvieron añadiendo 0,4 unidades al valor de pH observado en el pHmetro.⁷³ La concentración de ión deuteróxido a cualquier pD fue calculado usando la ecuación 3.1, donde $K_w = 10^{-14,87}$ es el producto iónico del agua deuterada a 25 °C y γ_{OL} es el coeficiente de actividad aparente del DO⁻ en las condiciones experimentales.^{74,75}

$$[DO^-] = \frac{10^{pD - pK_w}}{\gamma_{OL}} \quad (3.1)$$

3.2.3 Análisis espectroscópico RMN ¹H. Los espectros de RMN ¹H a 500 MHz en D₂O fueron registrados en un espectrómetro Bruker AMX500.^{76,77,78,79} En todos los casos, el tiempo de relajación entre pulsos fue al menos 10 veces superior al tiempo de relajación de los protones de los

⁷³ Glasoe, P. K.; Long, F. A. **1960** *J. Phys. Chem.*, 64: 188-190.

⁷⁴ Glavas, S.; Tanner, M. E.; **1999** *Biochemistry* 38: 4106-4113.

⁷⁵ Rios, A.; O'Donoghue, A. C.; Amyes, T. L.; Richard, J. P. **2005** *Can. J. Chem.*, 83: 1536-1542.

⁷⁶ Rios, A.; Richard, J. P.; **1997** *J. Am. Chem. Soc.* 119: 8375-8376.

⁷⁷ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

⁷⁸ Richard, J. P.; Williams, G.; Gao, J.; **1999** *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 715-726.

⁷⁹ Amyes, T. L.; Richard, J. P. **1992** *J. Am. Chem. Soc.*, 114: 10297-10302.

sustratos que están siendo examinados ($T_1 = 4$ s para la glicina metil éster y la glicina). Los espectros fueron obtenidos con un ancho de barrido de 2600 Hz, un ángulo de pulso de 90° , y un tiempo de adquisición de 6 s. Las líneas base fueron corregidas antes de la integración de los picos. Los desplazamientos químicos de las señales se referenciaron con respecto a las señales de HOD a 4,67 ppm ó $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ a 2,94 ppm.

3.2.4 Determinación de las constantes de equilibrio. La posición del equilibrio en la formación de iminas de la glicina y glicina metil éster fue determinada por análisis de RMN ^1H a 25°C . La formación de la imina de la glicina metil éster fue monitorizada en disoluciones que contenían 0,1 M de glicina metil éster y 3,0 M de acetona a $I = 1,0$ (KCl). La formación de la imina de la glicina se monitorizó en disoluciones que contenían entre 0,1 - 2,0 M de glicina y 0,8 M de fenilgloxilato a $I = 1,0$ (KCl). En todas las disoluciones se mantuvo constante el valor del pD usando una concentración 0,10 M de los siguientes tampones: ácido metoxiacético, pD 3,3 – 4,8; ácido acético, pD 4,5 – 6; fosfato, pD 6,2 – 8; HFIP, pD 8,9; TFE, pD 12 – 13. La glicina metil éster tuvo el doble papel de reactivo y tampón en los experimentos a valores de pD mayores que 8. La hidrólisis del éster a valores de pD menores que 8,8 no fue significativa ($< 6\%$) durante el tiempo necesario para obtener el espectro de RMN (aproximadamente una hora), pero a valores de pD superiores la ruptura del éster impidió la determinación de las constantes de equilibrio para la formación de la imina / ión iminio.

Los valores de la constante de equilibrio observada ($K_{\text{add}})_{\text{obsd}}$ para la formación de la imina fueron determinados a partir de la relación de las áreas integradas de los picos de los protones del grupo metileno del producto imina

($A_{\text{CH}_2}^{\text{X-D}}$), y del reactivo glicina ó glicina metil ester ($A_{\text{CH}_2}^{\text{Gly}}$, ecuación 3.2). Las concentraciones relativas de equilibrio de la imina glicina–fenilglioxilato a pD > 8 se determinaron 24 h después de la mezcla de los reactivos para asegurar que se había alcanzado el equilibrio químico.

$$(K_{\text{add}})_{\text{obsd}} = \frac{[\text{X-D}]_{\text{T}}}{[\text{Gly}]_{\text{T}}[\text{Cetona}]} = \frac{A_{\text{CH}_2}^{\text{X-D}}}{A_{\text{CH}_2}^{\text{Gly}}[\text{Cetona}]} \quad \text{X} = 1,2 \quad (3.2)$$

La velocidad de intercambio por deuterio del hidrógeno del grupo metileno de la glicina catalizado por fenilglioxilato a valores de pD entre 12 y 13 es similar a la velocidad de formación de la imina. Sin embargo, los análisis de RMN ^1H muestran que el enriquecimiento por deuterio de los grupos metileno de la glicina y de la imina formada con fenilglioxilato es el mismo teniendo en cuenta el error experimental. Así pues, la relación de las concentraciones de glicina y de su imina con el anión fenilglioxilato se pudo determinar como la relación de la suma de las áreas integradas de los picos de los grupos $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CHD}-$ obtenidos de los análisis de RMN ^1H .

3.2.5 Medidas cinéticas. Todas las reacciones de intercambio por deuterio se realizaron en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$ y $I = 1,0$ (KCl). Las reacciones se iniciaron mezclando las disoluciones del ácido de carbono, el catalizador, y el tampón al mismo valor de pD y $I = 1,0$ (KCl), para obtener una concentración final del ácido de carbono de 15 mM. Se observó una disminución lenta del pD durante la reacción de intercambio por deuterio de la glicina metil ester, debida

a la reacción de hidrólisis del éster.⁸⁰ El pD de estas disoluciones se monitorizó durante toda la reacción manteniéndolo en el valor inicial ($\pm 0,05$ unidades) mediante la adición de alícuotas de una disolución 2 M de KOD. En la reacción de intercambio por deuterio de la glicina catalizada por fenilgloxilato se pudo observar una pequeña disminución en el valor del pD (0,03 unidades en dos semanas) en aquellos casos en los que la concentración de tampón es pequeña, en cualquier caso una disminución mucho menor que en las reacciones de la glicina metil éster. Durante el transcurso de la reacción no se observó la aparición de nuevas señales en los espectros de RMN ^1H , y tampoco se vio una desviación en las representaciones de los datos cinéticos para esta reacción.

La figura 3.2 muestra espectros RMN ^1H a 500 MHz de la glicina metil éster obtenidos durante la reacción de intercambio por deuterio de los protones en posición α en presencia de acetona (0,05 M) a pD = 5,6 (tampón de acetato 0,25 M) en D_2O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl).

⁸⁰ Rios, A.; Crugeiras, J.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2001** *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7949-7950.

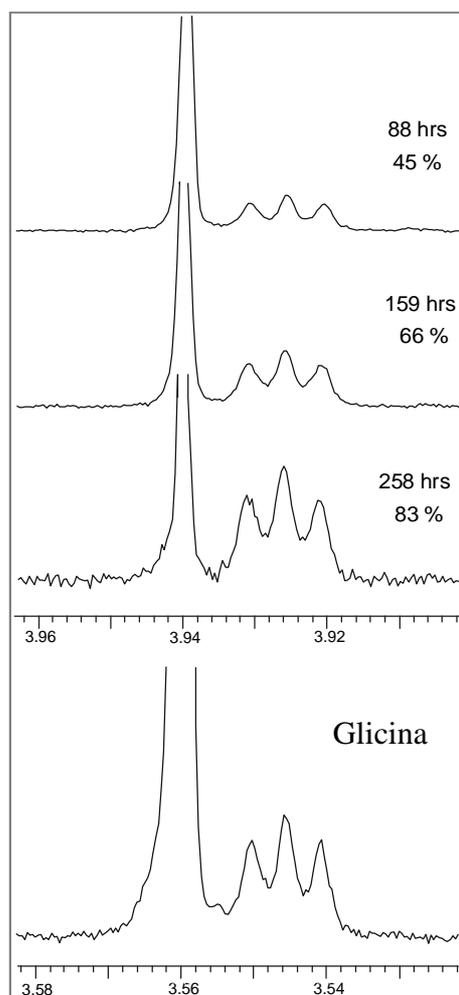


Figura 3.2 Espectros RMN ^1H a 500 MHz de la glicina metil éster obtenidos durante el intercambio por deuterio de los protones en posición α en presencia de acetona (0,50 M) y tampón de acetato (0,25 M, pD = 5,6) en D_2O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl). A la derecha de cada espectro se indica la fracción de aminoácido monodeuterado y el tiempo transcurrido desde el inicio de la reacción. El último espectro corresponde a la glicina procedente de la hidrólisis del éster que tiene lugar durante la reacción de intercambio.

El intercambio por deuterio da lugar a la desaparición del singlete debido al grupo $-\text{CH}_2-$ del sustrato y a la aparición de un triplete a campo más alto debido al grupo $-\text{CHD}-$ del producto.⁸¹ Las reacciones fueron seguidas durante el intercambio por deuterio de entre un 20 a un 90 % del primer protón en posición α del sustrato, y el progreso de la reacción, R , se calculó utilizando la ecuación 3.3, donde A_{CH_2} y A_{CHD} son las áreas integradas de los picos de los grupos $\alpha\text{-CH}_2$ y $\alpha\text{-CHD}$, respectivamente. Las constantes de velocidad de primer orden observadas para el intercambio de un solo protón del grupo $\alpha\text{-CH}_2$ del sustrato, k_{obsd} , se calcularon a partir de las pendientes de las representaciones semilogarítmicas de R frente al tiempo (ecuación 3.4), y los valores de la constante de velocidad de primer orden para el intercambio del primer protón en posición α para dar el producto monodeuterado, k_{ex} , se calcularon como $k_{\text{ex}} = 2 k_{\text{obsd}}$.⁸¹

$$R = \frac{A_{\text{CH}_2}}{A_{\text{CH}_2} + A_{\text{CHD}}} \quad (3.3)$$

$$\ln R = -k_{\text{obsd}} t \quad (3.4)$$

Las velocidades de las reacciones de intercambio por deuterio e hidrólisis de la glicina metil éster en presencia de acetona son similares a $\text{pD} = 7,6$. El enriquecimiento en deuterio del producto de la hidrólisis fue determinado por análisis RMN ^1H después de más de 10 tiempos de vida media para la reacción de hidrólisis. Los valores de $k_{\text{ex}} = 2 k_{\text{obsd}}$ fueron determinados a partir de las áreas integradas del singlete debido al grupo $\alpha\text{-CH}_2$ de la glicina y

⁸¹ Rios, A.; Crugeiras, J.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2001** *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7949-7950.

del triplete debido al grupo α -CHD de la glicina usando la ecuación 3.5 obtenida para el esquema mostrado en la figura 3.3, donde k_{hyd} es la constante de primer orden para la hidrólisis de la glicina metil éster bajo las condiciones experimentales. Los valores de k_{hyd} fueron calculados utilizando la ecuación 3.6, donde $f_{\text{ND}_3^+}$ es la fracción del sustrato presente en la disolución en la forma reactiva de amina protonada, y las constantes de velocidad de segundo orden $(k_{\text{B}})_{\text{hyd}}$ para la catálisis por bases generales de la reacción de hidrólisis (Tabla A1) determinadas anteriormente.⁸² Se realizó un experimento de control a pD 6,6 para comprobar que no hay cambio en la k_{hyd} ($\pm 5\%$), en presencia de una concentración fija de tampón fosfato, cuando la concentración de acetona aumenta de 0 a 0,2 M. Esto significa que la acetona no cataliza significativamente la reacción de hidrólisis de la glicina metil éster.

$$k_{\text{ex}} = \frac{k_{\text{hyd}}}{\left(\frac{A_{\text{CH}_2}}{2A_{\text{CHD}}} - \frac{1}{2}\right)} \quad (3.5)$$

$$k_{\text{hyd}} = \sum ((k_{\text{B}})_{\text{hyd}}[\text{B}])f_{\text{ND}_3^+} \quad (3.6)$$

⁸² Rios, A.; Crugeiras, J.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2001** *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7949-7950.

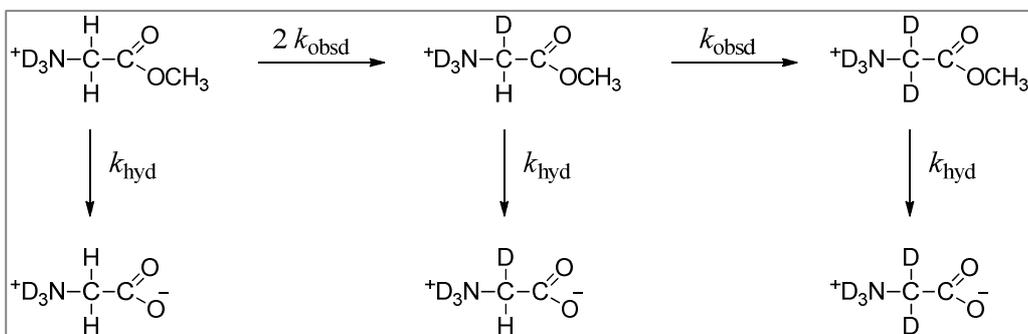


Figura 3.3 Reacción de intercambio por deuterio de los protones en posición α al grupo amino de la glicina metil éster y las respectivas reacciones de hidrólisis para formar glicina.

3.3 Resultados

3.3.1 Constantes de equilibrio para la formación de la imina. El desplazamiento químico de la señal del grupo α -CH₂ del sistema **1/1-D** (imina / imina N-protonada de la glicina metil éster con acetona) varía con el pD, tal como podemos ver en la figura 3.4 (■), desde el valor de 4,18 ppm a pD 8,8 hasta 4,73 ppm a pD 4,5. Este cambio es debido a la protonación del nitrógeno imínico.

Los datos experimentales se pueden ajustar por mínimos cuadrados a la ecuación 3.7, obtenida a partir del esquema de la figura 3.5, donde (a) $\delta_{\text{CH}_2}^{1-\text{D}} = 4,73$ y $\delta_{\text{CH}_2}^1 = 4,18$ ppm son los desplazamientos químicos del grupo α -CH₂ observados a valores de pD bajo y alto, y $(K_a)_{1-\text{D}} = 10^{-7,3}$ M se calcula tratando esta constante de acidez como un parámetro variable. La línea en la figura 3.4 muestra el resultado del ajuste.

$$(\delta_{\text{CH}_2})_{\text{obsd}}^1 = \frac{\delta_{\text{CH}_2}^1 (K_a)_{1-\text{D}} + \delta_{\text{CH}_2}^{1-\text{D}} a_{\text{D}}}{((K_a)_{1-\text{D}} + a_{\text{D}})} \quad (3.7)$$

La figura 3.4 muestra también la variación con el pD del desplazamiento químico de la señal del grupo metileno en posición α al grupo imino del sistema **2/2-D/2-D₂** (imina /imina N-protonada/ imina diprotonada de la glicina con fenilgloxilato)⁸³. El valor del desplazamiento químico cambia al disminuir el valor de pD por la protonación del nitrógeno del grupo imino y de uno de los grupos carboxilato.

Los datos experimentales se ajustan por mínimos cuadrados a la ecuación 3.8, obtenida a partir del esquema de la figura 3.6, donde $\delta_{\text{CH}_2}^{2-\text{D}_2} = 4,51$, $\delta_{\text{CH}_2}^{2-\text{D}} = 4,33$, y $\delta_{\text{CH}_2}^2 = 4,11$ ppm son los desplazamientos químicos para los grupos metileno de las diferentes formas iónicas de la imina, y $(K_a)_{2-\text{D}_2}$ y $(K_a)_{2-\text{D}}$ son las constantes de acidez para **2-D₂** y **2-D** (Tabla 3.1) determinadas a partir del ajuste de los datos experimentales. La línea trazada a través de los círculos en la figura 3.4 muestra el resultado del ajuste.

$$(\delta_{\text{CH}_2})_{\text{obsd}}^2 = \frac{\delta_{\text{CH}_2}^2 (K_a)_{2-\text{D}} (K_a)_{2-\text{D}_2} + \delta_{\text{CH}_2}^{2-\text{D}} (K_a)_{2-\text{D}_2} a_{\text{D}} + \delta_{\text{CH}_2}^{2-\text{D}_2} a_{\text{D}}^2}{((K_a)_{2-\text{D}} (K_a)_{2-\text{D}_2} + (K_a)_{2-\text{D}_2} a_{\text{D}} + a_{\text{D}}^2)} \quad (3.8)$$

Hay una incertidumbre relativamente grande en el valor de $(K_a)_{2-\text{D}_2}$, debido al limitado número de datos para la formación de la imina a valores bajos de pD (figura 3.4). La figura 3.6 muestra la protonación del carboxilato de la glicina en la especie **2-D** por simplicidad, sin embargo, no hay suficientes

⁸³ La hidratación del grupo carbonilo del fenilgloxilato debe ser poco importante ($\ll 1\%$) ya que sólo un 5% del anión piruvato se encuentra hidratado en agua [Esposito, A.; Lukas, A.; Meany, J. E.; Pocker, Y. **1999** *Can. J. Chem.*, *77*: 1108-1117] y la sustitución del grupo metilo por fenilo en el piruvato debe causar una disminución en la constante de equilibrio de hidratación similar a la observada para el acetaldehído (~130 veces) [Guthrie, J. P. **2000** *J. Am. Chem. Soc.*, *122*: 5529-5538]

datos para distinguir la protonación en esta posición de la protonación del carboxilato en posición α al grupo imino.

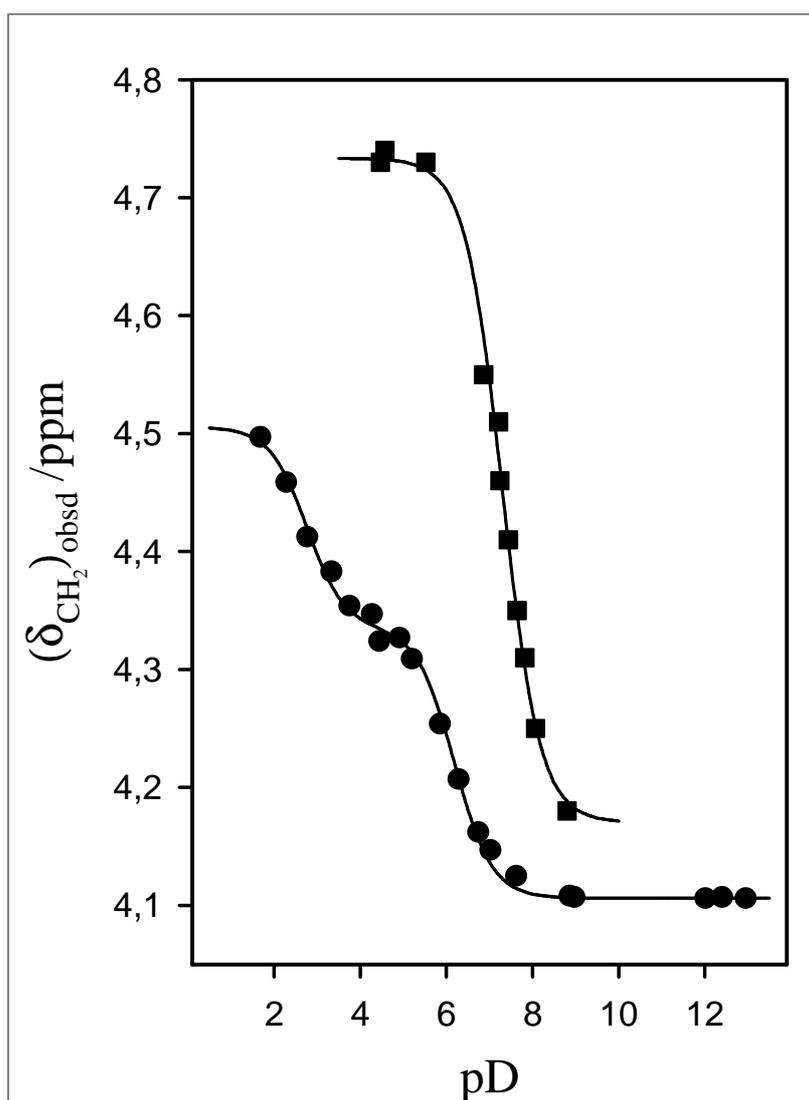


Figura 3.4 Influencia del pD sobre el desplazamiento químico del grupo metileno de la imina formada en presencia de (■), 0,1 M glicina metil éster y 3 M acetona; (●), glicina (0,1-2,0, dependiendo del valor del pD) y 0,8 M fenilgloxilato a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl).

Tabla 3.1 Constantes de equilibrio en D₂O para la adición de glicina metil éster a acetona y para la adición de la glicina a fenilglicoxilato^a

Cetona	Aminoácido	Imina	p(K _a) _{Gly} ^b	p(K _a) _{X-D} ^c	K _{add} ^d (M ⁻¹)
(CH ₃) ₂ CO ^e	⁺ D ₃ NCH ₂ COOCH ₃	1-D	8,48	7,30 ± 0,04	(3,3 ± 0,4) × 10 ⁻³
	D ₂ NCH ₂ COOCH ₃	1			(5,0 ± 0,8) × 10 ⁻²
C ₆ H ₅ COCOO ^{-f}	⁺ D ₃ NCH ₂ COOD	2-D₂		2,76 ± 0,09	
	⁺ D ₃ NCH ₂ COO ⁻	2-D	10,35	6,19 ± 0,04	(1,0 ± 0,1) × 10 ⁻⁴
	D ₂ NCH ₂ COO ⁻	2			1,50 ± 0,01

^aA 25 °C e I = 1,0 (KCl). ^b Constantes de acidez en D₂O a 25 °C y I = 1,0 (KCl) determinadas mediante valoración potenciométrica. ^c Constantes de acidez aparentes en D₂O a 25 °C y I = 1,0 (KCl) determinadas mediante valoración por RMN. ^d Constantes de equilibrio para la adición del aminoácido al correspondiente compuesto carbonílico. ^e Constantes de equilibrio definidas en la figura 3.5. ^f Constantes de equilibrio definidas en la figura 3.6.

En la sección experimental se describe la determinación mediante análisis de RMN ^1H de las constantes de equilibrio aparentes $(K_{\text{add}})_{\text{obsd}}$ para la adición de glicina metil éster a acetona o para la adición de glicina a fenilglioxilato para formar las correspondientes iminas en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

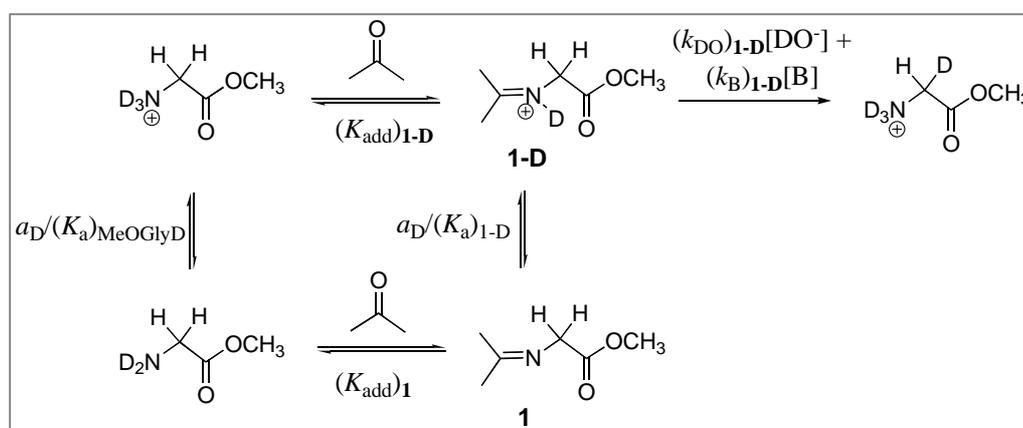


Figura 3.5 Esquema del equilibrio de formación del ion iminio de la acetona con glicina metil éster en equilibrio con su forma no protonada y la posterior reacción de intercambio por deuterio de un protón del carbono en posición α al nitrógeno del ión iminio.

La figura 3.7 muestra la variación con el pD de $\log(K_{\text{add}})_{\text{obsd}}$ para la adición de la glicina metil éster a la acetona (\blacktriangle) y de la glicina al fenilglioxilato (\bullet), la línea trazada a través de los triángulos muestra el ajuste de los datos para la primera reacción a la ecuación 3.9 ($X = 1$), obtenida a partir del esquema de la figura 3.5. Este ajuste se realizó utilizando los valores $(K_{\text{a}})_{\text{MeOGlyD}} = 3,3 \times 10^{-9} \text{ M}$, $^1 (K_{\text{a}})_{1-\text{D}} = 5,0 \times 10^{-8} \text{ M}$ y permitió obtener un valor de $(K_{\text{add}})_{1-\text{D}} = 0,0033 \text{ M}^{-1}$ para la formación del ión iminio **1-D** (Tabla 3.1).

La línea trazada a través de los círculos muestra el ajuste de los datos para la segunda reacción a la ecuación 3.9 ($X = 2$), obtenida a partir del esquema de la figura 3.6. El ajuste se realizó utilizando los valores $(K_{\text{a}})_{\text{GlyD}} =$

$4,5 \times 10^{-11} \text{ M}$,⁸⁴ $(K_a)_{2\text{-D}} = 6,5 \times 10^{-7} \text{ M}$, y permitió obtener un valor de $(K_{\text{add}})_{2\text{-D}} = (1,0 \pm 0,1) \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$ para la formación del ión iminio **2-D** (Tabla 3.1).

$$(K_{\text{add}})_{\text{obsd}} = (K_{\text{add}})_{\text{X-D}} \left(\frac{a_{\text{D}} + (K_a)_{\text{X-D}}}{a_{\text{D}} + (K_a)_{\text{GlyD}}} \right) \quad (3.9)$$

También podemos ver en la figura 3.7 los valores de $(K_{\text{add}})_{\text{obsd}}$ para la adición de glicina a 5'-deoxipiridoxal obtenidos de la bibliografía⁸⁵ y que se muestran a modo de comparación.

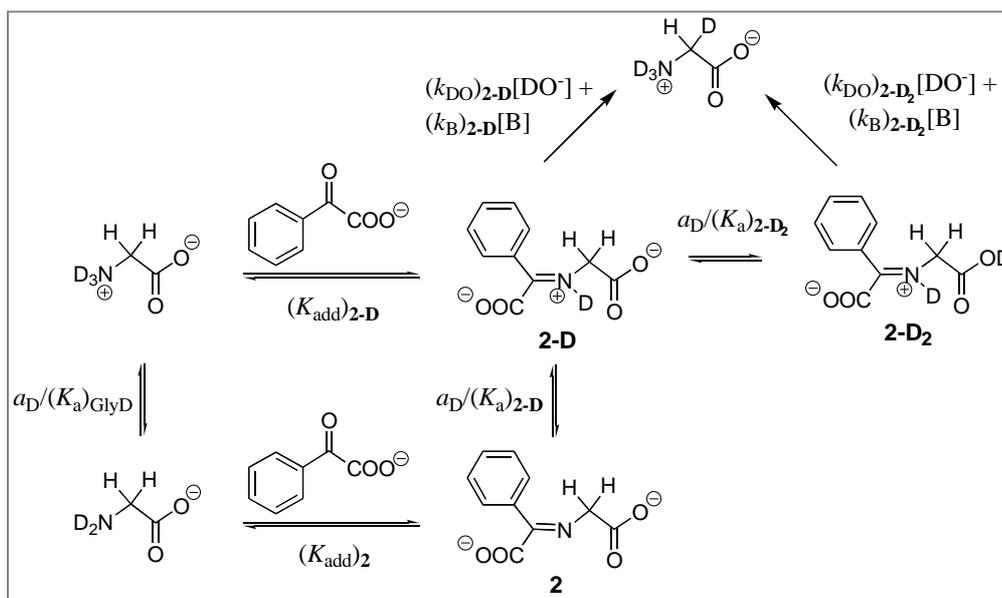


Figura 3.6 Esquema del equilibrio de formación del ion iminio del fenilglicoxilato con glicina en equilibrio con sus diferentes formas protonadas y la posterior reacción de intercambio por deuterio de uno de los protones en posición α al grupo imino.

⁸⁴ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; 2000 *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

⁸⁵ Toth, K.; Richard, J. P. 2007 *J. Am. Chem. Soc.*, 129: 3013-3021.

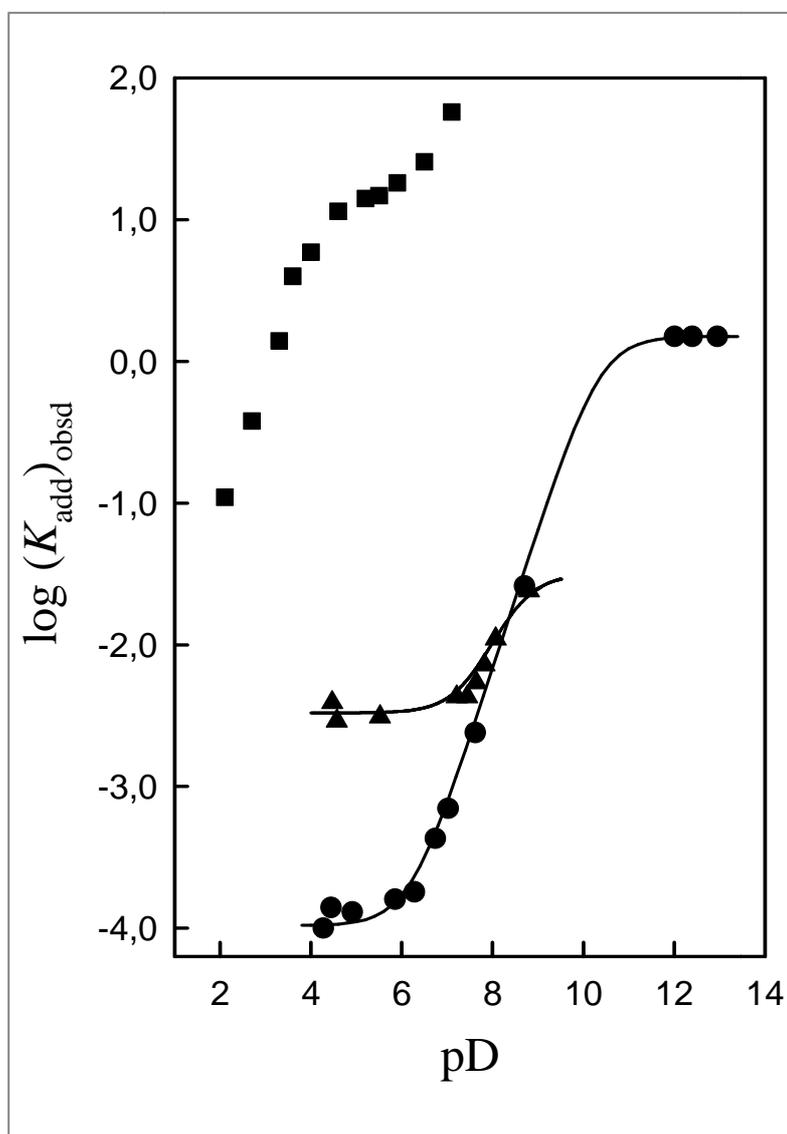


Figura 3.7 Dependencia logarítmica de $(K_{add})_{obsd}$ (M^{-1}) con el pD para la conversión de glicina y glicina metil éster en sus correspondientes iminas en D_2O a $25^\circ C$ y $I = 1,0$ (KCl). Reacción de la glicina con fenilglioxilato (●). Reacción de la glicina metil éster con acetona (▲). Reacción de la glicina con 5'-deoxipiridoxal en H_2O (■).

3.3.2 Constantes de velocidad para el intercambio por deuterio

3.3.2.1 Catálisis por acetona. El intercambio por deuterio del primer protón del grupo metileno de la glicina metil éster en D₂O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl) fue seguido por RMN ¹H (500 MHz).^{86,87} La dependencia lineal de k_{ex} con la concentración total del tampón acetato (pD 5,56) cuando vamos aumentando la concentración fija de acetona se muestra en la figura 3.8 A. Las ordenadas en el origen de estas correlaciones corresponden a $k_o = k_w f_{1-D}$ (tabla 3.2) para el intercambio por deuterio catalizado por el disolvente, donde f_{1-D} es la fracción de glicina metil éster presente en la forma ión iminio **1-D** y k_w es la constante de velocidad de primer orden aparente para la reacción con el disolvente.⁸⁸

$$f_{X-D} = \frac{(K_{add})_{X-D}[\text{Cetona}]}{\left(1 + \frac{(K_a)_{\text{Gly-D}}}{a_D}\right)} \quad (3.10)$$

⁸⁶ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

⁸⁷ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2002** *J. Am. Chem. Soc.* 124: 8251-8259.

⁸⁸ La fracción de glicina metil éster presente como **1-D** viene dada por la ecuación 3.10 ($X = 1$), obtenida del esquema mostrado en la figura 3.5 considerando que la concentración de imina / ión iminio es despreciable porque menos de un 1% del aminoácido se transforma en imina / ión iminio en presencia de una concentración de acetona de 0,5 M a pD inferior a 8.

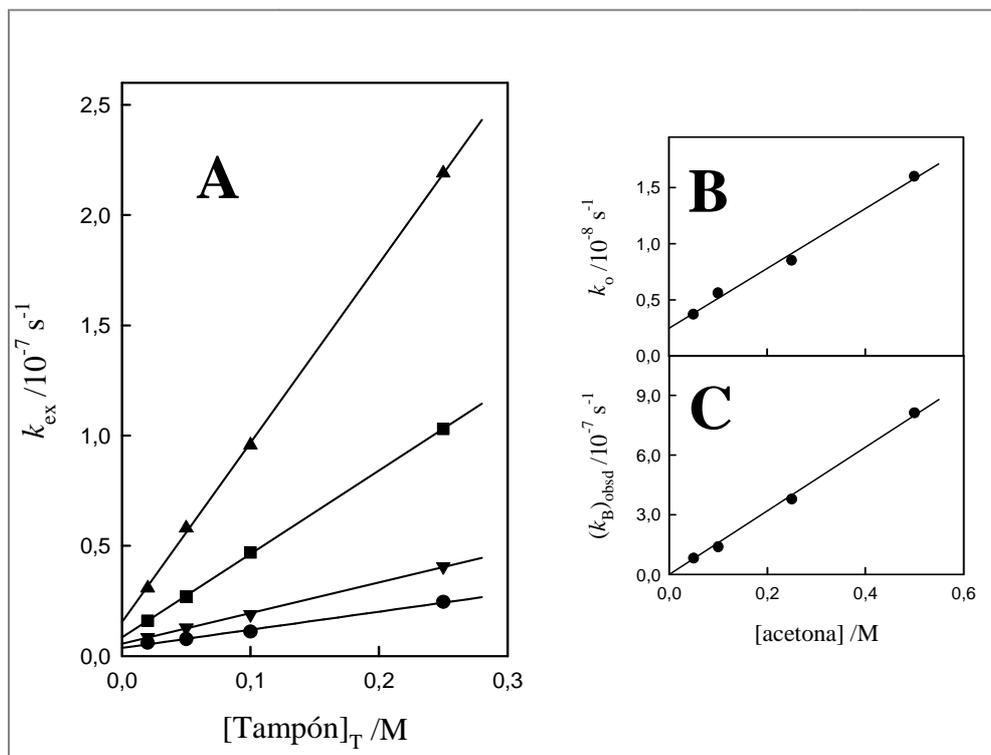


Figura 3.8 (A) Influencia de la concentración total de tampón sobre k_{ex} (s^{-1}) para el intercambio del primer protón del grupo metileno de la glicina metil éster en presencia de acetona y de tampón acetato (pD 5,56) en D_2O a 25°C y $I = 1,0$ (KCl). (●) 0,05 M acetona; (▼) 0,10 M acetona; (■) 0,25 M acetona; (▲) 0,50 M acetona. (B) Representación de las ordenadas en el origen de las correlaciones de la figura 3.8A (k_0) frente a la concentración de acetona. La pendiente de la figura 3.8B proporciona el valor de $(k_{\text{w}})_{\text{obsd}}$ ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para la reacción de intercambio por deuterio catalizada por acetona a pD 5,56. (C) Representación de las pendientes de las correlaciones de la figura 3.8A (k_{B})_{obsd} frente a la concentración de acetona. La pendiente proporciona $(k_{\text{B}}^{\text{T}})_{\text{obsd}}$ ($\text{M}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para la reacción de intercambio por deuterio catalizada por tampón y acetona a pD 5,56.

Al representar los valores de k_o (tabla 3.2) frente a la concentración total de acetona, como se muestra en la figura 3.8 B, se obtiene una línea recta, cuya pendiente es igual a la constante de velocidad aparente $(k_w)_{\text{obsd}} = 2,7 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la reacción de desprotonación de la glicina metil éster por el disolvente catalizada por acetona a pD 5,56 (ecuación 3.11). La ecuación 3.12, que procede de las ecuaciones 3.10 y 3.11, muestra la relación entre $(k_w)_{\text{obsd}}$ y k_w para la desprotonación de **1-D** por el disolvente D_2O . Al sustituir los valores de $(k_w)_{\text{obsd}} = 2,7 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $(K_{\text{add}})_{\text{1-D}} = 0,0033 \text{ M}^{-1}$, $(K_{\text{a}})_{\text{Gly-D}} = 3,3 \times 10^{-9} \text{ M}$ y $a_{\text{D}} = 10^{-5,56} \text{ M}$ en la ecuación 3.12 obtenemos el valor de la constante de velocidad aparente de primer orden para la reacción con el disolvente, $k_w = 8,2 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$.

$$k_o = (k_w)_{\text{obsd}}[\text{Cetona}] = k_w f_{\text{X-D}} \quad (3.11)$$

$$k_w = \frac{(k_w)_{\text{obsd}} \left(1 + \frac{(K_{\text{a}})_{\text{Gly-D}}}{a_{\text{D}}} \right)}{(K_{\text{add}})_{\text{X-D}}} \quad (3.12)$$

Si se hace un análisis similar de los datos para la misma reacción en tampón fosfato a los valores de pD 7,64 y 6,61 (tabla 3.2) se obtienen los valores de $k_w = 9,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y $k_w = 1,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, respectivamente.

En la figura 3.9 podemos ver el perfil con el pD de $\log k_w$ para la desprotonación de **1-D** en D_2O (●). La línea de pendiente unidad muestra que la desprotonación de **1-D** es por DO^- ($(k_{\text{DO}})_{\text{1-D}}$, figura 3.5). El ajuste no lineal por mínimos cuadrados de las constantes de velocidad aparentes k_w para la

reacción con el disolvente a la ecuación 3.13, en la que $K_w = 10^{-14,87} \text{ M}^2$ es el producto iónico del D_2O a 25°C , y $\gamma_{\text{OL}} = 0,79$ es el coeficiente de actividad aparente de DO^- en las condiciones experimentales, proporciona un valor de $(k_{\text{DO}})_{1-\text{D}} = 13.000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la desprotonación de **1-D** por DO^- .⁸⁹

$$\log k_w = \log \left(\frac{(k_{\text{DO}})_{1-\text{D}} K_w}{\gamma_{\text{OL}}} \right) + \text{pD} \quad (3.13)$$

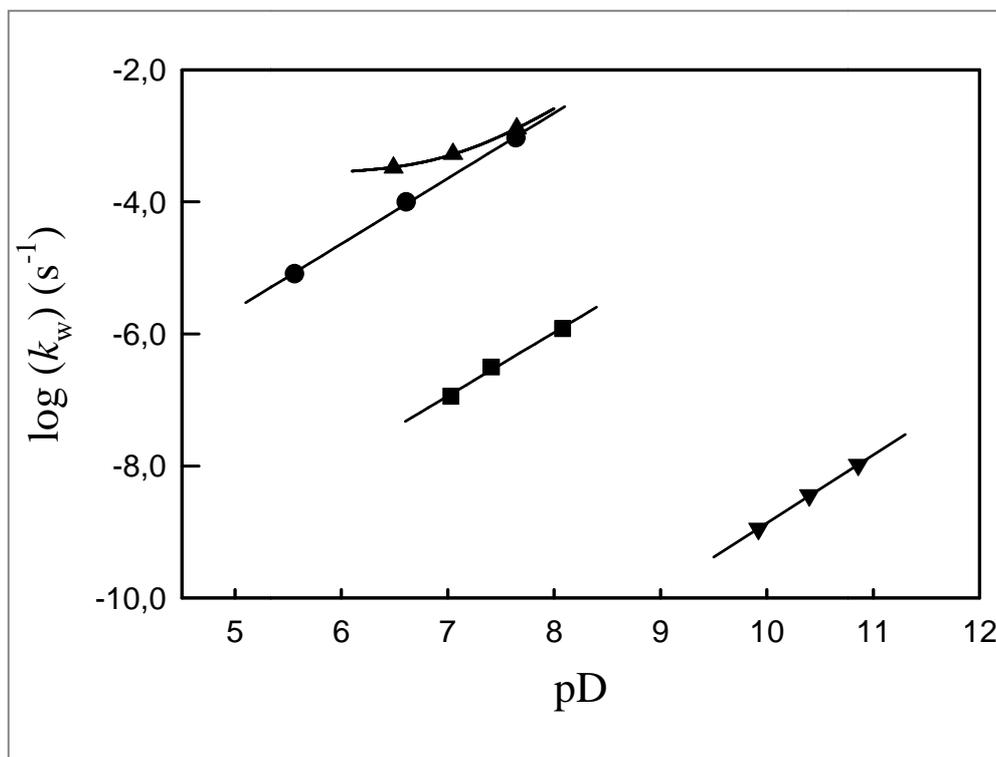


Figura 3.9 Representación de $\log k_w$ (s^{-1}) frente a pD para el intercambio por deuterio de: (●) el primer hidrógeno del grupo $\alpha\text{-CH}_2$ de **1-D**; (▲) el primer hidrógeno del grupo $\alpha\text{-CH}_2$ de **2-D**; (■) el primer hidrógeno del grupo $\alpha\text{-CH}_2$ de la glicina metil éster N-protonada,⁹⁰ (▼) el primer hidrógeno del grupo $\alpha\text{-CH}_2$ de la glicina N-protonada.⁹⁰

⁸⁹ Rios, A.; Crugeiras, J.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2001** *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7949-7950.

Tabla 3.2 Constantes de velocidad para el intercambio por deuterio del primer protón del grupo metileno de la glicina metil éster en presencia de acetona y tampones acetato o fosfato en D₂O.^a

Base	pD	[acetona]/M	k_o/s^{-1} ^c	$(k_B)_{\text{obsd}}/M^{-1}s^{-1}$ ^d	$(k_w)_{\text{obsd}}/M^{-1}s^{-1}$ ^e	$(k_B^T)_{\text{obsd}}/M^{-2}s^{-1}$ ^f
DPO ₄ ²⁻	7,64	0,01	$3,7 \times 10^7$	$2,9 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$1,1 \times 10^4$
		0,02	$4,1 \times 10^7$	$3,9 \times 10^6$		
		0,05	$4,9 \times 10^7$	$7,4 \times 10^6$		
	6,61	0,10	$6,2 \times 10^7$	$1,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^7$	$4,5 \times 10^5$
		0,02	$4,7 \times 10^8$	$1,1 \times 10^6$		
		0,05	$6,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^6$		
CH ₃ COO ⁻	5,56	0,10	$8,0 \times 10^8$	$4,1 \times 10^6$	$2,7 \times 10^8$	$1,6 \times 10^6$
		0,20	$1,1 \times 10^7$	$9,1 \times 10^6$		
		0,05	$3,7 \times 10^9$	$8,2 \times 10^8$		
		0,10	$5,6 \times 10^9$	$1,4 \times 10^7$		
pK _{BD} = 5,0 ^g	0,25	0,25	$8,5 \times 10^9$	$3,8 \times 10^7$	$8,1 \times 10^7$	
		0,50	$1,6 \times 10^8$			

^a A 25 °C y $I = 1,0$ (KCl). ^b Valores de pK_a aparentes de los ácidos conjugados en D₂O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl). ^c Constantes de velocidad aparentes de primer orden para el intercambio por deuterio, determinadas a partir de las ordenadas en el origen de las representaciones de k_{ex} (s⁻¹) frente a la concentración total del tampón. ^d Constantes de velocidad aparentes de segundo orden para la reacción de intercambio catalizada por tampón, determinadas como las pendientes de las representaciones de k_{ex} (s⁻¹) frente a la concentración total del tampón. ^e Constantes de velocidad aparentes de segundo orden para la desprotonación de glicina metil éster catalizada por acetona determinadas como las pendientes de las representaciones de k_o frente a la concentración de acetona. ^f Constantes de velocidad observada de tercer orden para la desprotonación de glicina metil éster catalizada por tampón, determinadas a partir de las pendientes de las representaciones de $(k_B)_{\text{obsd}}$ frente a la concentración de acetona.

⁹⁰ Rios, A.; Crugeiras, J.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2001** *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7949-7950.

⁹¹ Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **1996** *J. Am. Chem. Soc.* 118: 3129-3141.

Las pendientes de las correlaciones de la figura 3.8 A corresponden a $(k_B)_{\text{obsd}} = (k_B)_{1-D} f_B f_{1-D}$ (tabla 3.2) para la reacción de intercambio por deuterio catalizada por tampón a una concentración dada de acetona, donde $(k_B)_{1-D}$ es la constante de velocidad de segundo orden para la desprotonación de **1-D** por la forma básica del tampón y f_B es la fracción del catalizador en forma básica. Los valores de $(k_B)_{\text{obsd}}$ aumentan linealmente con la concentración de acetona, como se puede ver en la figura 3.8C, y la pendiente de esta correlación es la constante de velocidad aparente de tercer orden para la desprotonación de la glicina metil éster catalizada por acetona y por el anión acetato, $(k_B^T)_{\text{obsd}} = 1,6 \times 10^{-6} \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (tabla 3.2). Al sustituir $(k_B^T)_{\text{obsd}}$ en la ecuación 3.14, con $(K_{\text{add}})_{1-D} = 0,0033 \text{ M}^{-1}$, $f_B = 0,75$, $(K_a)_{\text{Gly-D}} = 3,3 \times 10^{-9} \text{ M}$ y $a_D = 10^{-5,56} \text{ M}$ se obtiene el valor de $(k_B)_{1-D} = 6,5 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la desprotonación de **1-D** por el ión acetato (figura 3.5).

$$(k_B)_{1-D} = \frac{(k_B^T)_{\text{obsd}} \left(1 + \frac{(K_a)_{\text{Gly-D}}}{a_D} \right)}{f_B (K_{\text{add}})_{1-D}} \quad (3.14)$$

Un tratamiento similar de los datos para la reacción catalizada por tampón fosfato a los valores de pD 7,64 y 6,61 (tabla 3.2) proporciona los valores de $(k_B^T)_{\text{obsd}}$ que se resumen en la tabla 3.2, y cuando se llevan a la ecuación 3.14, como se describió para la reacción catalizada por ión acetato, se obtienen los valores $(k_B)_{1-D} = 4,7 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $(k_B)_{1-D} = 4,8 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la desprotonación de **1-D** por el dianión fosfato a los valores de pD 7,64 y 6,61, respectivamente.

Los valores de las constantes k_{ex} para el intercambio por deuterio del primer protón en posición α de la glicina metil éster a pD = 7,64 (0,1 M de

tampón fosfato) en presencia de acetona y quinuclidina, 3-quinuclidinol ó 3-cloroquinuclidina se pueden ver en la tabla A2.

En la tabla 3.3 se resumen los valores de $(k_B)_{\text{obsd}}$ para la catálisis por estas aminas terciarias de la reacción de intercambio por deuterio de la glicina metil éster, que fueron determinadas como las pendientes de las regresiones lineales de k_{ex} frente a la concentración total de las formas ácida y básica de la amina. Los valores de $(k_B)_{1-D}$ (tabla 3.3) fueron calculados a partir de los valores de $(k_B)_{\text{obsd}}$ de la misma forma que para la reacción catalizada por el anión acetato.

3.3.2.2 Catálisis por fenilglioxilato. El intercambio por deuterio del primer protón en posición α de la glicina fue estudiado en D_2O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl) utilizando tampones de fosfato para mantener constante el valor del pD del medio de reacción (pD 6,49 – 7,65). En la tabla A3 se recogen los valores de las constantes de velocidad observadas, k_{ex} , para el intercambio por deuterio en presencia de varias concentraciones de fenilglioxilato y tampón fosfato a pD 6,49, 7,05 y 7,65, determinadas tal y como se indica en la sección experimental.

La figura 3.10 muestra el efecto de un aumento en la concentración de tampón fosfato sobre la constante de velocidad k_{ex} a pD 7,65 y a diferentes concentraciones fijas de fenilglioxilato. La ordenada en el origen de las representaciones lineales corresponde a la constante de primer orden $k_o = k_w f_{2-D}$ (tabla 3.4) para el intercambio catalizado por el disolvente a un valor de pD 7,65, donde $f_{2-D} = (K_{\text{add}})_{2-D}$ [fenilglioxilato] es la fracción de glicina presente en la forma **2-D**, calculada usando la ecuación 3.10 ($X = 2$, $1 \gg ((K_a)_{\text{Gly-D}} / a_D)$).

Tabla 3.3 Constantes de velocidad para el intercambio del primer protón del grupo metileno de la glicina metil éster en presencia de acetona y quinuclidinas sustituidas en posición 3 a pD 7,64^a

Base	p <i>K</i> _{BD} ^b	<i>f</i> _B ^c	[acetone]/M	(<i>k</i> _B) _{obsd} /M ⁻¹ s ⁻¹ ^d	(<i>k</i> _B ^T) _{obsd} /M ⁻² s ⁻¹ ^e	(<i>k</i> _B) _{1-D} /M ⁻¹ s ⁻¹ ^f
quinuclidine	12,1	3,5 × 10 ⁻⁵	0,01	8,0 × 10 ⁻⁷	4,6 × 10 ⁻⁵	460 ± 30
			0,02	1,4 × 10 ⁻⁶		
			0,05	2,4 × 10 ⁻⁶		
3-quinuclidinol	10,7	8,7 × 10 ⁻⁴	0,10	5,0 × 10 ⁻⁶	7,3 × 10 ⁻⁵	29 ± 3
			0,01	1,9 × 10 ⁻⁶		
			0,02	2,3 × 10 ⁻⁶		
3-chloroquinuclidine	9,7	8,6 × 10 ⁻³	0,01	3,9 × 10 ⁻⁶	9,0 × 10 ⁻⁵	3,6 ± 0,5
			0,02	8,4 × 10 ⁻⁶		
			0,05	1,4 × 10 ⁻⁶		
			0,10	2,6 × 10 ⁻⁶		
			0,05	6,5 × 10 ⁻⁶		
			0,10	9,5 × 10 ⁻⁶		

^a 0,1 M de tampón fosfato en D₂O a 25 °C y *I* = 1,0 (KCl). ^b Valores de p*K*_a aparentes de los cationes de las quinuclidinas sustituidas en posición 3.⁹² ^c Fracción de la amina terciaria presente en forma básica a pD 7,64. ^d Constantes de velocidad observada de segundo orden para el intercambio por deuterio catalizado por quinuclidina a pD 7,64, determinadas como las pendientes de las representaciones de *k*_{ex} frente a la concentración total de quinuclidina. ^e Constantes de velocidad observada de tercer orden para la desprotonación de glicina metil éster catalizada por acetona y por quinuclidinas sustituidas en la posición 3 a pD 7,64, determinadas como las pendientes de la representación de (*k*_B)_{obsd} frente a la concentración de acetona. ^f Constantes de velocidad de segundo orden para la desprotonación de **1-D** por las quinuclidinas sustituidas en la posición 3 determinadas usando la ecuación 3.14.

⁹² Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **1996** *J. Am. Chem. Soc.* 118: 3129-3141.

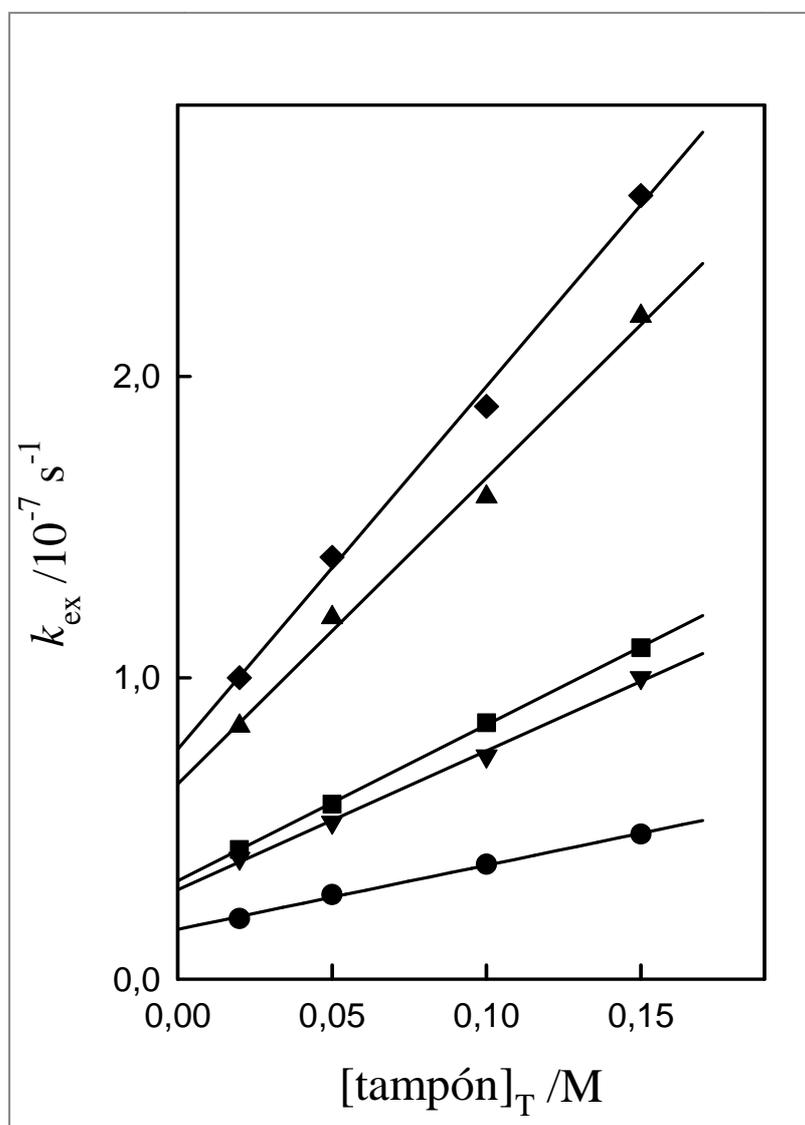


Figura 3.10 Influencia de la concentración total de tampón sobre k_{ex} (s^{-1}) para el intercambio por deuterio del primer protón del grupo metileno de la glicina en presencia de fenilgloxilato a pD 7,65 en D_2O a 25°C y $I = 1,0$ (KCl). (●) 0,1 M fenilgloxilato; (▼) 0,20 M; (■) 0,25 M; (▲) 0,40 M; (◆) 0,50 M.

Tabla 3.4 Constantes de velocidad para el intercambio del primer protón del grupo metileno de la glicina catalizado por fenilgioxilato en D_2O .^a

Base	pD	[PhCOCOO ⁻]/M	k_D/s^{-1} ^d	k_w/s^{-1} ^e	$(k_B)_{obsd}/M^{-1}s^{-1}$ ^f	$(k_B)/M^{-1}s^{-1}$ ^g
DPO_4^{2-}	7,65	0,10	$11,7 \times 10^{-8}$	$1,70 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-7}$	$2,6 \times 10^{-2}$
		0,20	$3,0 \times 10^{-8}$	$1,50 \times 10^{-3}$	$4,6 \times 10^{-7}$	$2,9 \times 10^{-2}$
		0,25	$3,3 \times 10^{-8}$	$1,32 \times 10^{-3}$	$5,2 \times 10^{-7}$	$2,6 \times 10^{-2}$
		0,40	$6,5 \times 10^{-8}$	$1,63 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$3,1 \times 10^{-2}$
		0,5	$7,6 \times 10^{-8}$	$1,52 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^{-2}$
$pK_{BD} = 7,0$ ^b			$(k_w)_{av} = (1,5 \pm 0,2) \times 10^{-3}$		$(k_B)_{av} = (2,8 \pm 0,3) \times 10^{-2}$	
	7,05	0,25	$1,5 \times 10^{-8}$	$6,0 \times 10^{-4}$	$3,7 \times 10^{-7}$	$3,0 \times 10^{-2}$
		0,5	$3,3 \times 10^{-8}$	$6,6 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$4,0 \times 10^{-2}$
				$(k_w)_{av} = 6 \times 10^{-4}$		$(k_B)_{av} = 3,5 \times 10^{-2}$
		6,49	0,5	$2,0 \times 10^{-8}$	4×10^{-4}	$5,2 \times 10^{-7}$

^a A 25 °C y $I = 1,0$ (KCl). ^b pK_a aparente del ácido conjugado en D_2O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl). ^c Fracción del tampón presente en forma básica. ^d La ordenada en el origen de la representación de k_{ex} frente a $[B]_T$ (Figura 3.10) ^e Constante de velocidad aparente de primer orden para la desprotonación de **2-D** catalizada por el disolvente, calculada a partir de los valores de k_D . ^f La pendiente de la representación de k_{ex} frente a $[B]_T$. ^g Constante de velocidad aparente de segundo orden para la desprotonación de **2-D** catalizada por tampón, calculada a partir de los valores de $(k_B)_{obsd}$.

Los valores de k_w , calculados utilizando la ecuación 3.15 para las reacciones a diferentes concentraciones fijas de fenilglioxilato se recogen en la tabla 3.4. A valores de pD 7,05 y 6,49 se han obtenido un número menor de datos experimentales, debido a que la reacción de intercambio por deuterio es lenta y sólo puede ser detectada a concentraciones altas de fenilglioxilato.

El ajuste lineal a la ecuación 3.16 de los valores de k_w a distintas concentraciones de DO^- proporciona la constante de velocidad de segundo orden $(k_{\text{DO}})_{2-\text{D}} = 1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la desprotonación de **2-D** por DO^- (esquema de la figura 3.6) y la constante de velocidad de primer orden $(k_w)_o = 3,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para la desprotonación de **2-D** independiente del pD ó para la desprotonación de **2-D**₂ por DO^- (cinéticamente equivalente).

$$k_w = k_o / f_{2-\text{D}} \quad (3.15)$$

$$k_w = (k_w)_o + (k_{\text{DO}})_{2-\text{D}}[\text{DO}^-] \quad (3.16)$$

Las constantes de velocidad aparentes de segundo orden, $(k_{\text{B}})_{\text{obsd}}$, para la desprotonación de la glicina catalizada por tampones proceden de las pendientes de las correlaciones de la figura 3.10. Estas constantes corresponden a $(k_{\text{B}})_{\text{obsd}} = k_{\text{B}} f_{\text{B}} f_{2-\text{D}}$, donde k_{B} es la constante de velocidad de segundo orden para la desprotonación de **2-D** por DPO_4^{2-} (figura 3.6) y f_{B} es la fracción del tampón en la forma básica. Los valores de k_{B} que se recogen en la tabla 3.4 fueron calculados a partir de los valores de $(k_{\text{B}})_{\text{obsd}}$, utilizando los valores correspondientes de f_{B} , calculados a partir del pD y del $\text{p}K_{\text{a}}$ del tampón, y $f_{2-\text{D}} = (K_{\text{add}})_{2-\text{D}} [\text{fenilglioxilato}]$. En la tabla 3.6 se resumen las constantes de velocidad de segundo orden determinadas para la desprotonación de **2-D**.

Tabla 3.5 Constantes de velocidad de segundo orden para la desprotonación del carbono de **1-D**, **2-D** y **2-D₂** en D₂O. ^a

base catalítica	pK_{BD} ^b	Íon iminio	$k_B/M^{-1}s^{-1}$ ^c
DO ⁻	16,6	1-D	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^4$
		2-D	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^4$
		2-D₂	$\sim(3,0 \pm 0,7) \times 10^8$
quinuclidine	12,1	1-D	460 ± 30
3-quinuclidinol	10,7	1-D	29 ± 3
3-chloroquinuclidine	9,7	1-D	$3,6 \pm 0,5$
DPO ₄ ²⁻	7,0	1-D	$(4,7 \pm 0,2) \times 10^{-2}$
		2-D	$(2,8 \pm 0,1) \times 10^{-2}$
		2-D₂	$\sim(1,1 \pm 0,3) \times 10^2$
CH ₃ COO ⁻	5,0	1-D	$(6,5 \pm 0,2) \times 10^{-4}$

^a A 25 °C y $I = 1,0$ (KCl). Las incertidumbres mostradas son las desviaciones estándar. ^b pK_a aparente del ácido conjugado de la base que actúa como catalizador en D₂O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl). ^c Constantes de velocidad de segundo orden para la desprotonación del ión iminio por la base, calculados a partir de datos cinéticos.

⁹³ Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **1996** *J. Am. Chem. Soc.* 118: 3129-3141.

3.4 Discusión de los resultados

El intercambio por deuterio del hidrógeno del grupo metileno de la glicina metil éster en D₂O catalizado por acetona se monitorizó a 25°C y pD neutro como se indicó en el apartado 3.2.5.^{94,95} No se observó catálisis (<1%) por acetona de la reacción de intercambio por deuterio del hidrógeno del grupo metileno de la glicina después de un mes de incubación del aminoácido con acetona (1 M) en D₂O a pD 7,8 y 25 °C.

Los experimentos realizados en un intento de caracterizar la catálisis por piruvato (análogo del grupo prostético piruvoilo, utilizado por algunas enzimas en reacciones de descarboxilación de aminoácidos)^{96,97,98} de la reacción de intercambio por deuterio del hidrógeno del grupo metileno de la glicina, fallaron debido a que la reacción de condensación aldólica del piruvato compite con la primera. Por ese motivo, se escogió el fenilgloxilato como modelo del piruvato que carece de átomos de hidrógeno ácidos en posición α .

3.4.1 Caminos de reacción. Los datos cinéticos para la reacción de intercambio por deuterio de la glicina metil éster catalizada por acetona fueron ajustados a un mecanismo en el cual la imina **1-D** sufre una desprotonación irreversible por la base conjugada del disolvente, DO⁻, y por otras bases de Brønsted.

⁹⁴ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

⁹⁵ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2002** *J. Am. Chem. Soc.* 124: 8251-8259.

⁹⁶ Tolbert, W. D.; Zhang, Y.; Cottet, S. E.; Bennett, E. M.; Ekstrom, J. L.; Pegg, A. E.; Ealick, S. E. **2003** *Biochemistry*, 42: 2386-2395.

⁹⁷ Graham, D. E.; Xu, H.; White, R. H. **2002** *J. Biol. Chem.*, 277: 23500-23507.

⁹⁸ Gallagher, T.; Rozwarski, D. A.; Ernst, S. R.; Hackert, M. L. **1993** *J. Mol. Biol.*, 230: 516-528.

Para la desprotonación de **2-D** por el disolvente y por bases generales se observan dos rutas. La ruta dominante a pD 7,65 es la desprotonación de **2-D** por DO^- y dianión fosfato. Cuando el pD disminuye hasta 6,49, la constante de velocidad aparente para la reacción del disolvente se aproxima al valor límite de $k_w = 3,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y la constante de velocidad aparente para la reacción catalizada por tampones aumenta (tabla 3.4). Esto parece indicar que existen otras rutas importantes para la reacción de estas bases con **2** a valores de pD bajos.

La figura 3.9 muestra una representación de $\log k_w$ frente al pD para la desprotonación de **2-D** (\blacktriangle) la línea muestra el ajuste de los datos a la ecuación 3.16 utilizando los valores $(k_{\text{DO}})_{\text{2-D}} = 1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $(k_w)_o = 3,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para la reacción catalizada por DO^- y para la reacción independiente del pD, respectivamente. No se observa una curvatura similar en el intervalo de pD 5-7 para los perfiles pD-velocidad de la desprotonación del carbono de otros derivados de aminoácidos más simples.^{99,100} Esto sugiere que el DO^- es normalmente mucho más reactivo que el DOD para la desprotonación de los átomos de carbono en posición α al grupo amino y que la reacción permanece de primer orden en $[\text{DO}^-]$ en el intervalo de pD 5-7. Por lo tanto, podemos sugerir que el nuevo camino observado a pD bajo corresponde a la desprotonación de la segunda forma iónica del substrato (**2-D₂**) por DO^- (figura 3.6). La constante de velocidad observada para esta reacción es independiente del pD cuando el pD es mayor que $\text{p}(K_a)_{\text{2-D}_2}$ (tabla 3.1) porque el descenso de la concentración de DO^- al disminuir el pD es compensado por el aumento en la concentración del ácido de carbono **2-D₂**. La ecuación 3.17 nos da la

⁹⁹ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

¹⁰⁰ Richard, J. P.; Williams, G.; O'Donoghue, A. C.; Amyes, T. L. **2002** *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 2957-2968.

relación entre la constante de velocidad aparente independiente del pD, $(k_w)_o$, y la constante de velocidad $(k_{DO})_{2-D_2}$ correspondiente a la reacción de desprotonación de la forma iónica minoritaria **2-D₂** por el ión deuteróxido. Un valor de $(k_{DO})_{2-D_2} \approx 3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Tabla 3.5) fue calculado utilizando la ecuación 3.17, el valor experimental de $(k_w)_o$, $K_w = 10^{-14,87} \text{ M}^2$, $\gamma_{OL} = 0,78$ y $(K_a)_{2-D_2} \approx 1,7 \times 10^{-3} \text{ M}$ (tabla 3.1).

$$(k_w)_o = \frac{(k_{DO})_{2-D_2} K_w}{(K_a)_{2-D_2} \gamma_{OL}} \quad (3.17)$$

$$k_B = (k_B)_{2-D} + \frac{(k_B)_{2-D_2} a_D}{(K_a)_{2-D_2}} \quad (3.18)$$

La constante de velocidad aparente de segundo orden k_B para la desprotonación de **2-D** por DPO_4^{2-} aumenta cuando disminuye el valor del pD, debido también a la presencia de un segundo camino de reacción para la desprotonación del ácido de carbono fuerte **2-D₂** por DPO_4^{2-} (figura 3.6). La ecuación 3.18 proporciona la relación entre las constantes de velocidad aparentes k_B y las constantes de velocidad de desprotonación de **2-D** ($(k_B)_{2-D}$) y **2-D₂** ($(k_B)_{2-D_2}$) por DPO_4^{2-} . La representación de k_B frente a a_D es lineal. La ordenada en el origen de la recta corresponde a la constante de velocidad de segundo orden para la desprotonación del ión iminio **2-D** por DPO_4^{2-} , $(k_B)_{2-D} = 2,8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (tabla 3.5). A partir de la pendiente, y teniendo en cuenta el valor de $(K_a)_{2-D_2} = 1,7 \times 10^{-3} \text{ M}$ (Tabla 3.1), obtenemos la constante de velocidad de segundo orden para la desprotonación de **2-D₂** por DPO_4^{2-} , $(k_B)_{2-D_2} = 1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (tabla 3.5).

La incertidumbre en los valores de las constantes de velocidad que se han estimado para la desprotonación del ácido de carbono **2-D₂** por DO^- y por DPO_4^{2-} es grande. En primer lugar, hay que tener en cuenta la incertidumbre inherente al valor de $(K_a)_{2-D_2}$ determinado mediante el ajuste de los datos mostrados en la figura 3.4 (●) a la ecuación 3.8. En segundo lugar, en **2-D** hay dos grupos carboxilato para los cuales se desconoce su basicidad relativa y, por lo tanto, cual de ellos se protonará en primer lugar. Los datos experimentales no permiten distinguir entre las dos formas posibles de **2-D₂**.

3.4.2 Correlaciones de Brønsted. La correlación de Brønsted de las constantes de velocidad de segundo orden k_B para la desprotonación de **1-D** por bases generales, mostrada en la figura 3.11 (●), se obtuvo con los datos de la tabla 3.5. La pendiente de esta correlación, $\beta = 0,83 \pm 0,01$, es menor que el valor de $\beta = 0,92 \pm 0,04$ para la desprotonación de la glicina metil éster N-protonada¹⁰¹ (figura 3.11 (▲)). La disminución en el valor de β de Brønsted observada para **1-D** en comparación con la glicina metil éster N-protonada es consistente con un desplazamiento tipo Hammond a un estado de transición más temprano para la desprotonación del ácido de carbono más fuerte.¹⁰²

3.4.3 Catálisis electrófila de la desprotonación de la glicina. Un objetivo que nos fijamos en este trabajo es la determinación del efecto de diferentes catalizadores electrófilos sobre la acidez del carbono de la glicina. La formación de una imina entre la acetona y la glicina metil éster multiplica la constante de velocidad de segundo orden k_{DO} para la desprotonación por DO^-

¹⁰¹ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

¹⁰² Hammond, G. S. **1955** *J. Am. Chem. Soc.*, 77: 334-338.

del carbono en posición α al grupo amino por un factor de 2200 (figura 3.12). Esto refleja la diferencia de 7 unidades en el valor del pK_a del carbono, que pasa de 21 en la glicina metil éster protonada en el nitrógeno a 14 para la imina **1-H**.¹⁰³

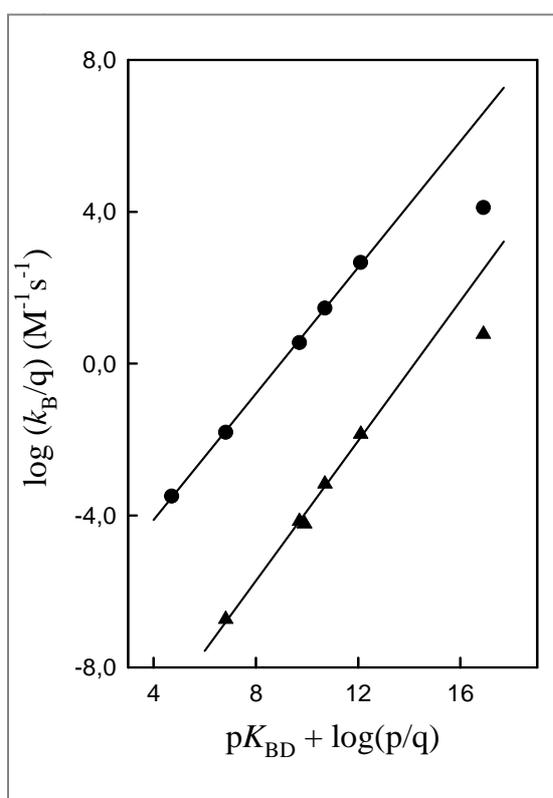


Figura 3.11 Correlaciones de Brønsted para la desprotonación de **1-D** (●) y de la glicina metil éster N-protonada (▲) por bases generales y DO^- en D_2O , donde q y p son el número de centros básicos químicamente equivalentes en el reactivo e hidrógenos ácidos equivalentes en el producto, respectivamente.

¹⁰³ Rios, A.; Crueiras, J.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; 2001 *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7949-7950.

Por otro lado, la formación de una imina entre la glicina y el fenilglioxilato produce un aumento mucho mayor en la constante de velocidad de segundo orden k_{DO} multiplicándola por un factor de $2,2 \times 10^8$. Este incremento es 50 veces mayor que el efecto que produce la formación de una imina con la forma del 5'-deoxipiridoxal ionizada en el oxígeno (figura 3.12). Combinando $k_{\text{DO}} = 1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la desprotonación de **2-D** con un valor estimado del efecto isotópico del disolvente de $k_{\text{DO}}/k_{\text{HO}} = 1,5$ se obtiene un valor de $k_{\text{HO}} = 1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la desprotonación de **2-H** por el ión hidróxido en H_2O (figura 3.6).¹⁰⁴ La ecuación 3.19 proporciona una correlación lineal logarítmica entre k_{HO} y la acidez del carbono $\text{p}K_{\text{CH}}$ para la desprotonación de cetonas y ésteres catiónicos.¹⁰⁵

$$\text{p}K_{\text{CH}} = \left(\frac{10,2 - \log k_{\text{HO}}}{0,44} \right) \quad (3.19)$$

Con esta correlación y el valor de $k_{\text{HO}} = 1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ obtenemos un valor de 14 para el $\text{p}K_{\text{a}}$ del carbono de **2-H**. El $\text{p}K_{\text{a}}$ de este ión iminio es 15 unidades menor que el del carbono de la glicina ($\text{p}K_{\text{a}} = 29$),¹⁰⁶ e incluso menor que el valor de $\text{p}K_{\text{a}}$ de 17 estimado para el aducto **3-H₂**.¹⁰⁶ Como comparación, la formación de una imina con la acetona produce sólo una reducción de 7 unidades en el $\text{p}K_{\text{a}}$ de la glicina metil éster.¹⁰⁵ La fuerte acidez del carbono de **2-H** muestra la estabilización de la carga negativa del carbanión **4**, debida

¹⁰⁴ Este valor del efecto isotópico corresponde al efecto isotópico secundario del disolvente determinado para la desprotonación de la acetona por HO^- a 25 °C (Pocker, Y. **1959** *Chem. Ind.*, 1383-1384)

¹⁰⁵ Rios, A.; Crugeiras, J.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2001** *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7949-7950.

¹⁰⁶ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

presumiblemente a la delocalización de la carga negativa en los sustituyentes deficientes de electrones de **4** (figura 3.13).

k_{HO} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	4,1	9×10^4	
$\text{p}K_{\text{a}}$	21	14	
k_{HO} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$4,5 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^4$	750
$\text{p}K_{\text{a}}$	29	14	17

Figura 3.12 Constantes de velocidad de segundo orden para la desprotonación por ión hidroxido del grupo metileno de la glicina metil éster protonada en el nitrógeno¹⁰⁷ y de su aducto con acetona,¹⁰⁸ y de la glicina¹⁰⁷, y de sus aductos con fenilgloxilato y DPL.¹⁰⁹

Es importante distinguir la reactividad absoluta relativa de los compuestos carbonílicos que actúan como catalizadores de la desprotonación de estos aminoácidos, de la acidez relativa de los grupos metileno de los aductos ión iminio de dichos compuestos (figura 3.12). Así, el 5'-deoxipiridoxal (DPL) es mucho mejor catalizador de la desprotonación de la

¹⁰⁷ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2002** *J. Am. Chem. Soc.* 124: 8251-8259.

¹⁰⁸ Rios, A.; Crueiras, J.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2001** *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7949-7950.

¹⁰⁹ Toth, K.; Richard, J. P. **2007** *J. Am. Chem. Soc.*, 129: 3013-3021.

glicina que el anión fenilglioxilato, a pesar de que el carbono de su aducto con la glicina tiene una acidez inferior

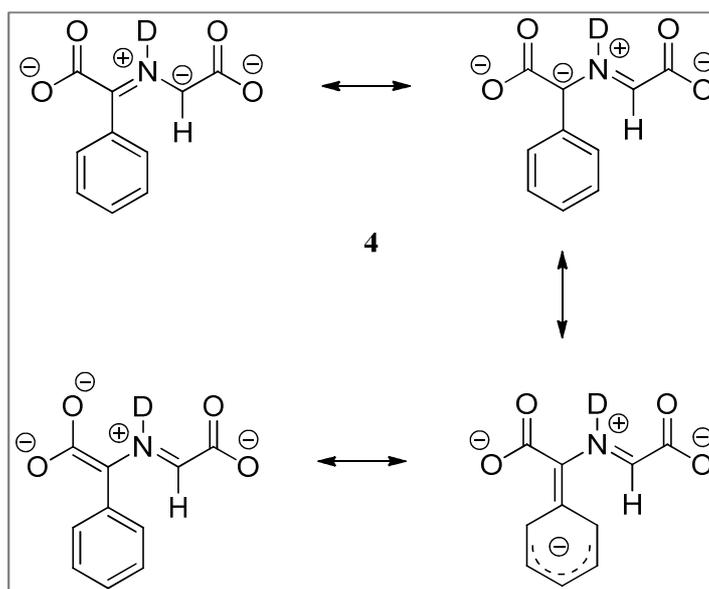


Figura 3.13 Formas resonantes del carbanión formado al extraer un protón en posición α al grupo imino del aducto formado por glicina y fenilglioxilato.

A efectos comparativos, en la figura 3.14 se muestran las constantes de velocidad para la desprotonación catalizada por el disolvente de la glicina metil éster y de la glicina, y las constantes de velocidad observadas en presencia de una concentración 0,01 M del compuesto carbonílico utilizado como catalizador. En la primera fila se puede observar que la adición de una concentración 0,01 M de acetona da lugar a una catálisis moderada de la desprotonación de la glicina metil éster a pD 7,6, a pesar de la fuerte acidez del

carbono del aducto ión iminio. Esto es debido a que la constante de formación de la imina es poco favorable.

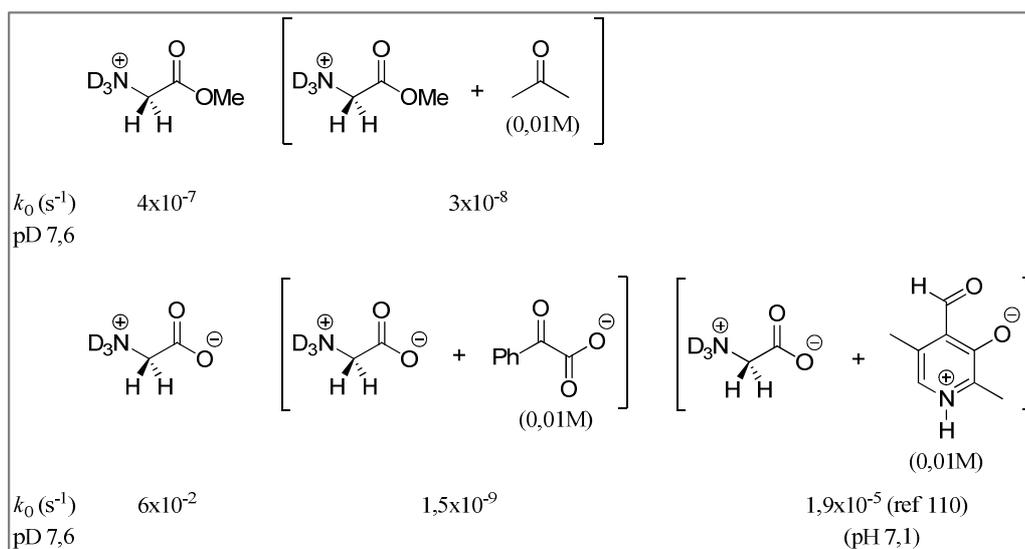


Figura 3.14 Constantes de velocidad para la desprotonación de la glicina y glicina metil éster catalizada por disolvente, y constantes de velocidad observadas para el proceso catalizado por distintos compuestos carbonílicos con una concentración 0,01 M.

Sin embargo, se observa un aumento de velocidad de 250 veces para la catálisis de la desprotonación de la glicina por una concentración 0,01 M de fenilgloxilato, un catalizador mucho más efectivo que la acetona. Esta catálisis es inmensamente inferior al aumento de 3×10^6 veces observado para la catálisis de la desprotonación de la glicina por una concentración 0,01 M de DPL a pH 7,1, donde la constante de velocidad estimada para la desprotonación de la glicina catalizada por disolvente es sólo de $5 \times 10^{-12} \text{ s}^{-1}$.¹¹¹

¹¹⁰ Toth, K.; Richard, J. P. **2007** *J. Am. Chem. Soc.*, 129: 3013-3021.

¹¹¹ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

La gran diferencia que se observa en la actividad catalítica del DPL como catalizador comparada con la del fenilglioxilato, se debe a que la constante de formación de la imina con el DPL es mucho más favorable. De hecho, la imina **2-D** es sólo apenas detectable por RMN ^1H en disoluciones que contienen glicina en concentraciones del orden de 1,0 M y anión fenilglioxilato 0,8 M, mientras que la reacción de 0,01 M de glicina con 0,010 M de DPL a pH 7,1 da lugar a la conversión del 80% del DPL en **3-H₂**.¹¹²

Estos resultados muestran que una de las razones por las que los catalizadores enzimáticos utilizan preferentemente el piridoxal 5'-fosfato como coenzima frente al grupo prostético piruvoilo^{113,114,115} en las diferentes reacciones de los aminoácidos, se debe a la gran afinidad del cofactor piridínico comparado con los α -cetoácidos por la adición al grupo amino para formar una imina. Esta razón fue sugerida previamente en un estudio publicado sobre la formación de iminas con el PLP.¹¹⁶

Como conclusión se puede decir que las iminas formadas entre el piridoxal y aminoácidos están fuertemente estabilizadas por interacciones intramoleculares entre el anillo de piridina, los sustituyentes del anillo y el nitrógeno del grupo imino,¹¹⁷ comparado con las interacciones intramoleculares correspondientes en las iminas formadas entre aminoácidos y cetonas o aldehídos sencillos.

¹¹² Toth, K.; Richard, J. P. **2007** *J. Am. Chem. Soc.*, 129: 3013-3021.

¹¹³ Tolbert, W. D.; Zhang, Y.; Cottet, S. E.; Bennett, E. M.; Ekstrom, J. L.; Pegg, A. E.; Ealick, S. E. **2003** *Biochemistry*, 42: 2386-2395.

¹¹⁴ Graham, D. E.; Xu, H.; White, R. H. **2002** *J. Biol. Chem.*, 277: 23500-23507.

¹¹⁵ Gallagher, T.; Rozwarski, D. A.; Ernst, S. R.; Hackert, M. L. **1993** *J. Mol. Biol.*, 230: 516-528.

¹¹⁶ Gout, E.; Zador, M.; Beguin, C. G. **1984** *Nouv. J. Chim.*, 8: 243-250.

¹¹⁷ Hammond, G. S. **1955** *J. Am. Chem. Soc.*, 77: 334-338.

CAPITULO 4

4. Efecto de los sustituyentes sobre la estabilidad termodinámica de iminas derivadas de la glicina y aldehídos aromáticos. Importancia de la estructura del piridoxal 5'-fosfato en su actividad catalítica.

4.1 Introducción

Tal y como se vio en el capítulo anterior, la mayoría de las enzimas implicadas en el metabolismo de los aminoácidos utilizan al piridoxal 5'-fosfato (PLP) como cofactor,^{118,119,120} aunque hay un pequeño grupo de descarboxilasas de aminoácidos, en las que un grupo prostético piruvoilo sirve de cofactor.¹²¹ Se sabe que la catálisis covalente por PLP tiene lugar a través de la formación de una imina con el aminoácido. Este intermedio de reacción es común a todas las transformaciones de aminoácidos dependientes de PLP. La ruptura de uno de los enlaces del carbono en posición α al grupo imina, con eliminación de H^+ , CO_2 , o R^+ , conduce a la formación de un carbanión que está fuertemente estabilizado por delocalización del par electrónico en el sistema- π del PLP.

En nuestro grupo de investigación estamos interesados en determinar las barreras termodinámica y cinética de la desprotonación de átomos de carbono en posición α al grupo amino de aminoácidos^{122,123,124} y en analizar los efectos que producen en dichas barreras las modificaciones covalentes utilizadas por las enzimas para promover las reacciones de los aminoácidos. La

¹¹⁸ John, R. A. **1995**, *Biochim. Biophys. Acta* 1248: 81–96.

¹¹⁹ Jansonius, J. N. **1998**, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 759–769.

¹²⁰ Eliot, A. C.; Kirsch, J. F. **2004**, *Annu. Rev. Biochem.* 73: 383–415.

¹²¹ Van Poelje, P. D.; Snell, E. E. **1990**, *Annu. Rev. Biochem.* 59: 29–59.

¹²² Rios, A.; Richard, J. P.; **1997** *J. Am. Chem. Soc.* 119: 8375–8376.

¹²³ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373–9385.

¹²⁴ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2002** *J. Am. Chem. Soc.* 124: 8251–8259.

acetona es un catalizador eficiente de la desprotonación del grupo metileno de la glicina metil éster, como resultado del menor pK_a para la desprotonación en el carbono del ión iminio ($pK_{CH} = 14$) comparado con la desprotonación de la glicina metil éster N-protonada ($pK_{CH} = 21$)¹²⁵. Este aumento de acidez de los protones en posición α al grupo amino, es una fracción importante del efecto acidificante que produce la formación de iones iminio entre aminoácidos y PLP. El análisis de la catálisis de la desprotonación de la glicina por fenilglioxilato (modelo del grupo prostético piruvoilo) permitió estimar un pK_a para la desprotonación en el carbono del correspondiente ión iminio unas 15 unidades inferior al pK_a de la glicina ($pK_{CH} = 29$)¹²⁶. Esto demostró que los aductos de aminoácidos con fenilglioxilato y con 5'-deoxipiridoxal (DPL, análogo al piridoxal)¹²⁷ tienen una acidez similar en el carbono en posición α al grupo imino. Aún así, el DPL es mucho mejor catalizador de la desprotonación de la glicina que el fenilglioxilato debido a que la constante de equilibrio para la conversión del aminoácido y el DPL en el ión iminio reactivo es mucho más favorable. Esto corrobora la hipótesis de que una de las razones por las que las enzimas han escogido el PLP como cofactor frente a otros compuestos carbonílicos más simples, es su mayor afinidad para la adición al grupo amino para formar una imina.¹²⁸

La estabilidad y las constantes de disociación en disolución acuosa de las iminas derivadas de aminoácidos y *o*-hidroxiaril aldehídos incluyendo el

¹²⁵ Rios, A.; Crueiras, J.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2001** *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7949-7950.

¹²⁶ Crueiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Amyes, T. L.; Richard, J. P. **2008**, *J. Am. Chem. Soc.* 130: 2041–2050.

¹²⁷ Toth, K.; Richard, J. P. **2007** *J. Am. Chem. Soc.*, 129: 3013-3021.

¹²⁸ Gout, E.; Zador, M.; Beguin, C. G. **1984** *Nouv. J. Chim.*, 8: 243-250.

PLP ha sido estudiada por diversos autores.^{129,130,131,132,133,134,135,133,} En los primeros trabajos se ha propuesto la existencia de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el anión fenóxido y el nitrógeno imínico protonado en iminas de aminoácidos y PLP.¹³⁶

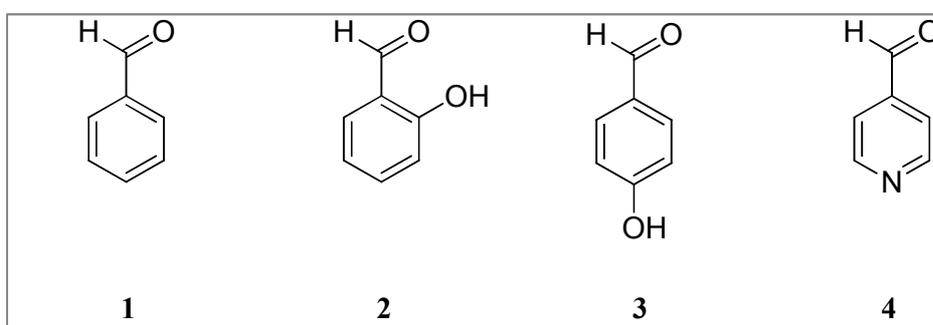


Figura 4.1 Aldehídos utilizados para determinar el efecto de los sustituyentes en el anillo de benceno sobre la constante de equilibrio de formación de iminas entre la glicina y estos aldehídos. Benzaldehído **1**, salicilaldehído (*o*-hidroxi benzaldehído) **2**, *p*-hidroxi benzaldehído **3**, piridincarboxaldehído **4**

Sin embargo, estudios recientes por RMN ¹⁵N sobre los equilibrios ácido-base de aldiminas del PLP en disolución acuosa sugieren que este enlace de hidrógeno intramolecular no existe y que los grupos fenólico e iminio forman enlaces de hidrógeno con moléculas de agua.¹³⁷ En este trabajo se describe una comparación de las constantes de equilibrio para la formación de

¹²⁹ Leach, B. E.; Leussing, D. L. **1971**, *J. Am. Chem. Soc.* 93: 3377–84.

¹³⁰ French, T. C.; Auld, D. S.; Bruice, T. C. **1965**, *Biochemistry* 4: 77–84.

¹³¹ Auld, D. S.; Bruice, T. C. **1967**, *J. Am. Chem. Soc.* 89: 2083–9.

¹³² Felty, W. L.; Ekstrom, C. G.; Leussing, D. L. **1970**, *J. Am. Chem. Soc.* 92: 3006–11.

¹³³ Metzler, C. M.; Cahill, A.; Metzler, D. E. **1980**, *J. Am. Chem. Soc.* 102: 6075–82.

¹³⁴ Shanbhag, V. M.; Martell, A. E. **1990**, *Inorg. Chem.* 29: 1023–31.

¹³⁵ Vazquez, M. A.; Echevarria, G.; Munoz, F.; Donoso, J.; Garcia Blanco, F. **1989**, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1617–1622.

¹³⁶ Metzler, C. M.; Cahill, A.; Metzler, D. E. **1980**, *J. Am. Chem. Soc.* 102: 6075–82.

¹³⁷ Sharif, S.; Huot, M. C.; Tolstoy, P. M.; Toney, M. D.; Jonsson, K. H. M.; Limbach, H.-H. **2007**, *J. Phys. Chem. B* 111: 3869–3876.

iminas entre la glicina y benzaldehídos sustituidos con un grupo hidroxilo en las posiciones orto y para (figura 4.1). Esta comparación proporciona evidencia de la existencia de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el oxígeno del fenolato y el nitrógeno del iminio y permite estimar la fuerza de este enlace de hidrógeno. Nuestros resultados sugieren que el ión iminio de la glicina con el PLP está estabilizado en la misma medida por este enlace $O^- \cdots H-N^+$ intramolecular.

4.2 Sección experimental

4.2.1 Materiales. Los siguientes compuestos fueron suministrados por Aldrich: Benzaldehído (**1**), 4-hidroxibenzaldehído (**3**), 4-piridin-carboxaldehído (**4**), 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), ácido clorhídrico deuterado (37 wt %, 99,5% D), deuteróxido potásico (40 wt %, 8+% D) y agua deuterada (99,9% D). La glicina y el salicilaldehído (**2**) se compraron a la casa comercial Fluka. Todos los demás reactivos orgánicos e inorgánicos eran de la mayor pureza disponible.

4.2.2 Métodos generales. Los protones ácidos de la glicina, K_2HPO_4 , y KH_2PO_4 fueron intercambiados por deuterio antes de utilizarlos en la preparación de disoluciones de estos compuestos en D_2O .¹³⁸ Las disoluciones de los aldehídos **2** y **3**, ácido cloroacético, HFIP y TFE se prepararon disolviéndolos directamente en D_2O (99,9% D), lo que resultó en un aumento de menos de 1 atom % en el contenido prótico del disolvente.

¹³⁸ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2002** *J. Am. Chem. Soc.* 124: 8251-8259.

Los tampones de fosfato se prepararon mezclando las cantidades adecuadas de disoluciones stock de K_2DPO_4 y KD_2PO_4 en D_2O a $I = 1,0$ (KCl) para dar la relación ácido/base deseada. Los tampones de acetato y pirofosfato se prepararon disolviendo la forma básica del tampón y el KCl en D_2O , seguido de la adición de DCl hasta obtener la relación ácido/base deseada a $I = 1,0$ (KCl). Los tampones de cloroacetato, HFIP, y TFE se prepararon disolviendo sus formas ácidas y KCl en D_2O , añadiendo a continuación el KOD necesario para obtener la relación ácido/base deseada a $I = 1,0$ (KCl).

El valor del pH de las disoluciones se determinó a 25 °C utilizando un pHmetro Orion modelo 350 equipado con un electrodo orion 7103 BN. Los valores de pD fueron calculados sumando 0,4 unidades a las lecturas de pH del pHmetro.¹³⁹ Se determinó un valor de pK_a aparente de $pK_{BD} = 8,87$ para **2** en D_2O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl) por valoración potenciométrica de una disolución 10 mM del sustrato con KOD.¹⁴⁰

4.2.3 Análisis RMN 1H . Los espectros RMN 1H a 500 MHz, fueron realizados en D_2O a 25 °C en un espectrómetro Bruker AMX500. El tiempo de relajación entre pulsos fue al menos 8 veces mayor que el mayor de los tiempos de relajación de los protones de interés. Los espectros se obtuvieron con un ancho de barrido de 60000 Hz, un ángulo de pulso de 90°, y un tiempo de adquisición de 6 s. La línea base de los espectros se corrigió antes de determinar las áreas integradas de los picos, y los desplazamientos químicos de los protones se referenciaron con respecto a la señal del $(CH_3)_4N^+$ a 2,94 ppm.

¹³⁹ Glasoe, P. K.; Long, F. A. **1960** *J. Phys. Chem.*, 64: 188-190.

¹⁴⁰ Albert, A.; Serjeant, E. P. *The Determination of Ionization Constants*, 3rd ed.; **1984** Chapman and Hall: London,.

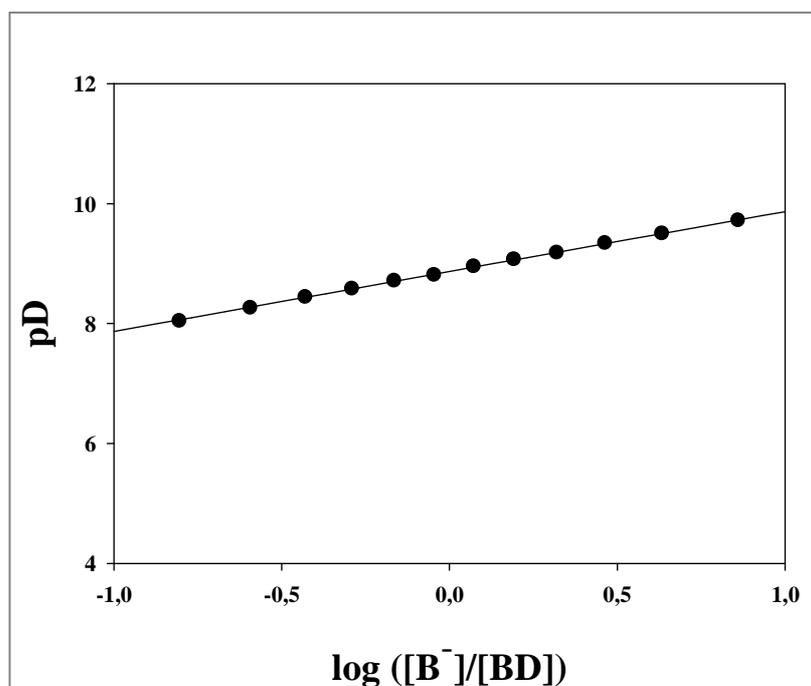


Figura 4.2 Valoración potenciométrica de **2** en D_2O a $25\text{ }^\circ C$ y $I = 1,0$ (KCl). La línea recta representa el ajuste de los datos experimentales a la ecuación $pD = pK_{BD} + \log ([B^-] / [BD])$.

4.2.4 Determinación de las constantes de equilibrio. La posición del equilibrio para la adición de glicina a los aldehídos **1-4** para formar las correspondientes iminas en D_2O a $25\text{ }^\circ C$ y $I = 1,0$ (KCl) se determinó por espectroscopía RMN 1H . La formación de una imina entre la glicina y cada uno de estos aldehídos aromáticos se monitorizó en disoluciones que contenían: 0,1-2,0 M de aminoácido y 5-20 mM de **1**; 0,1-0,5 M de aminoácido y 5-10 mM de **2**; 0,3-1,0 M de aminoácido y 50 mM de **3**; o 0,001-2,0 M de aminoácido y 0,005-1,0 M de **4**. El valor del pD de estas disoluciones se mantuvo constante usando 0,10 M de las siguientes disoluciones tampón: cloroacetato pD 3,2-4,5; acetato pD 4,2-6,0; fosfato pD 6,0-8,0; pirofosfato pD

8,4-8,9; HFIP pD 9,0-11; TFE pD 12,2-13,7. La glicina se utilizó también como tampón en algunos experimentos en el intervalo de pD 9,5-11,4.

La relación de concentraciones de equilibrio del aducto imina y del aldehído ó del aducto imina y el aminoácido se determinaron entre una y dos horas después de la mezcla de los reactivos. Este período de tiempo fue lo suficientemente largo para asegurar que se alcanzan las condiciones de equilibrio, como se pudo comprobar en experimentos de control en los que la relación de concentraciones se determinó de nuevo 24 h después de haber comenzado la reacción.

Los valores de las constantes de equilibrio observadas $(K_{\text{add}})_{\text{obsd}}$ para la formación de iminas con los aldehídos **1**, **2**, o **3** se determinaron a partir de la relación de las áreas integradas de los picos del protón metínico de la imina ($A_{\text{H}}^{\text{X-IM}}$) y del aldehído (A_{H}^{X}) usando para ello la ecuación 4.1, donde $[\text{X-IM}]_{\text{e}}$, $[\text{X}]_{\text{e}}$, y $[\text{Gly}]_{\text{e}}$ son las concentraciones totales de equilibrio de la imina, del aldehído, y de la glicina, respectivamente. La concentración de aminoácido en el equilibrio fue calculada utilizando la ecuación 4.2, donde $[\text{Gly}]_{\text{T}}$ y $[\text{X}]_{\text{T}}$ son las concentraciones totales del aminoácido y aldehído, respectivamente.

$$(K_{\text{add}})_{\text{obsd}} = \frac{[\text{X-IM}]_{\text{e}}}{[\text{X}]_{\text{e}}[\text{Gly}]_{\text{e}}} = \frac{A_{\text{H}}^{\text{X-IM}}}{A_{\text{H}}^{\text{X}}[\text{Gly}]_{\text{e}}} \quad \mathbf{X = 1, 2, 3} \quad (4.1)$$

$$[\text{Gly}]_{\text{e}} = [\text{Gly}]_{\text{T}} - [\text{X-IM}]_{\text{e}} =$$

$$[\text{Gly}]_{\text{T}} - [\text{X}]_{\text{T}} \left(\frac{A_{\text{H}}^{\text{X-IM}}}{A_{\text{H}}^{\text{X}} + A_{\text{H}}^{\text{X-IM}}} \right) \quad \mathbf{X = 1, 2, 3} \quad (4.2)$$

Los valores de las constantes de equilibrio observadas ($(K_{\text{add}})_{\text{obsd}}$ (M^{-1}) para la formación de la imina con el aldehído **4** se determinaron a partir de la relación de las áreas integradas de los picos correspondientes a los protones metileno de la imina ($A_{\text{CH}_2}^{4\text{-IM}}$) y de la glicina ($A_{\text{CH}_2}^{\text{Gly}}$) de acuerdo con la ecuación 4.3, donde $[\mathbf{4}\text{-IM}]_e$ y $[\mathbf{4}]_e$ son las concentraciones de la imina y aldehído en el equilibrio, respectivamente. La concentración del aldehído en el equilibrio se calculó utilizando la ecuación 4.4, donde $[\text{Gly}]_T$ y $[\mathbf{4}]_T$ son las concentraciones totales del aminoácido y del aldehído, respectivamente y K_{hyd} es la constante de equilibrio aparente para la hidratación del aldehído, determinada por RMN ^1H en las condiciones de cada experimento.

$$(K_{\text{add}})_{\text{obsd}} = \frac{[\mathbf{4}\text{-IM}]_e}{[\mathbf{4}]_e[\text{Gly}]_e} = \frac{A_{\text{CH}_2}^{4\text{-IM}}}{A_{\text{CH}_2}^{\text{Gly}}[\mathbf{4}]_e} \quad (4.3)$$

$$[\mathbf{4}]_e = \frac{1}{(1 + K_{\text{hyd}})} \left([\mathbf{4}]_T - \frac{A_{\text{CH}_2}^{4\text{-IM}}}{A_{\text{CH}_2}^{\text{Gly}} + A_{\text{CH}_2}^{4\text{-IM}}} [\text{Gly}]_T \right) \quad (4.4)$$

4.3 Resultados

El valor del desplazamiento químico ($(\delta_{\text{H}})_{\text{obsd}}^{1\text{-IM}}$ de la señal del protón metínico de **1-IM** (imina de la glicina con benzaldehído, figura 4.3, Z=CH, X=1) aumenta desde 8,07 a 8,62 ppm cuando pasamos de valores de pD altos a pD = 5,0, debido a la protonación del nitrógeno imínico (figura 4.5).

La dependencia del desplazamiento químico ($(\delta_{\text{H}})_{\text{obsd}}^{1\text{-IM}}$ con el valor del pD viene descrita por la ecuación 4.5, obtenida a partir del esquema de la

figura 4.3, donde $\delta_{\text{H}}^{1\text{-IM}}$ y $\delta_{\text{H}}^{1\text{-IM-D}}$ son los desplazamientos químicos del hidrógeno metínico de **1-IM** y **1-IM-D**, respectivamente, y $(K_{\text{a}})_{1\text{-IM-D}}$ es la constante de acidez del nitrógeno imínico.

La línea en la figura 4.5 muestra el ajuste no lineal por mínimos cuadrados de los datos experimentales a la ecuación 4.5, utilizando el valor $\delta_{\text{H}}^{1\text{-IM}} = 8,07$ ppm observado a valores de pD alto, y tratando $\delta_{\text{H}}^{1\text{-IM-D}}$ y $(K_{\text{a}})_{1\text{-IM-D}}$ como parámetros variables. El valor de $p(K_{\text{a}})_{1\text{-IM-D}}$ obtenido de este ajuste se recoge en la tabla 4.1.

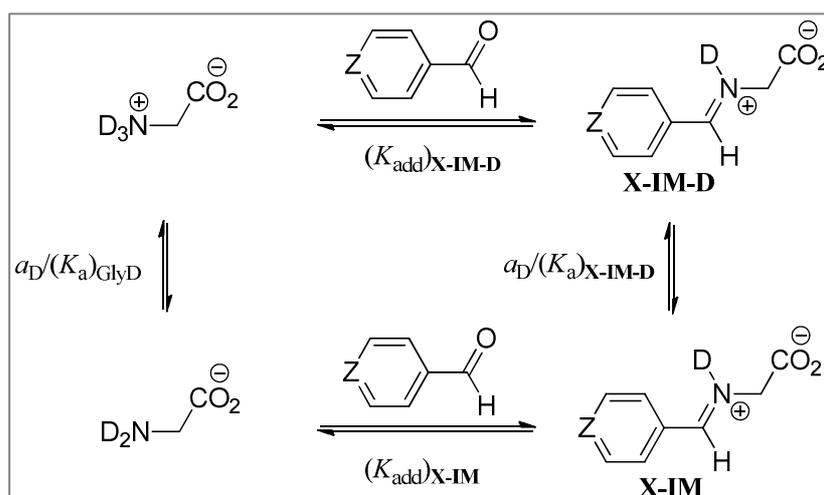


Figura 4.3 Equilibrio de formación de una imina entre la glicina y el benzaldehído ($Z = \text{CH}$, $X = 1$) o entre la glicina y el piridincarboxaldehído ($Z = \text{N}$, $X = 4$).

La variación del desplazamiento químico $(\delta_{\text{H}})_{\text{obsd}}^{2\text{-IM}}$ de la señal del protón metínico del **2-IM** (imina de la glicina con el *o*-hidroxibenzaldehído, figura 4.4, $X=2$) al variar el pD (figura 4.5), es debida a la protonación del nitrógeno imínico y del oxígeno del fenóxido. Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación 4.6, obtenida a partir del esquema mostrado en la figura 5.5, utilizando el valor de: $\delta_{\text{H}}^{2\text{-IM-D}} = 8,09$ ppm para el desplazamiento

químico del protón metínico de **2-IM-D** determinado de los datos experimentales a valores de pD intermedio. La línea en la figura 4.5 muestra el ajuste a dicha ecuación, que proporcionó valores de $\delta_{\text{H}}^{2\text{-IM-D}_2} = 8,48$ ppm y $\delta_{\text{H}}^{2\text{-IM}} = 8,38$ ppm para los desplazamientos químicos del protón metínico de **2-IM-D₂** y **2-IM**, respectivamente, y los valores de las constantes de acidez $(K_{\text{a}})_{2\text{-IM-D}_2}$ y $(K_{\text{a}})_{2\text{-IM-D}}$ para **2-IM-D₂** y **2-IM-D**, respectivamente, que se resumen en la tabla 4.1.

$$\delta_{\text{obsd}}^{\text{X-IM}} = \frac{\delta^{\text{X-IM}}(K_{\text{a}})_{\text{X-IM-D}} + \delta^{\text{X-IM-D}}a_{\text{D}}}{((K_{\text{a}})_{\text{X-IM-D}} + a_{\text{D}})} \quad \mathbf{X = 1, 4} \quad (4.5)$$

$$\begin{aligned} \delta_{\text{obsd}}^{\text{X-IM}} &= \\ &= \frac{\delta^{\text{X-IM}}(K_{\text{a}})_{\text{X-IM-D}}(K_{\text{a}})_{\text{X-IM-D}_2} + \delta^{\text{X-IM-D}}(K_{\text{a}})_{\text{X-IM-D}_2}a_{\text{D}} + \delta^{\text{X-IM-D}_2}a_{\text{D}}^2}{((K_{\text{a}})_{\text{X-IM-D}}(K_{\text{a}})_{\text{X-IM-D}_2} + (K_{\text{a}})_{\text{X-IM-D}_2}a_{\text{D}} + a_{\text{D}}^2)} \\ & \quad \mathbf{X = 2, 3} \quad (4.6) \end{aligned}$$

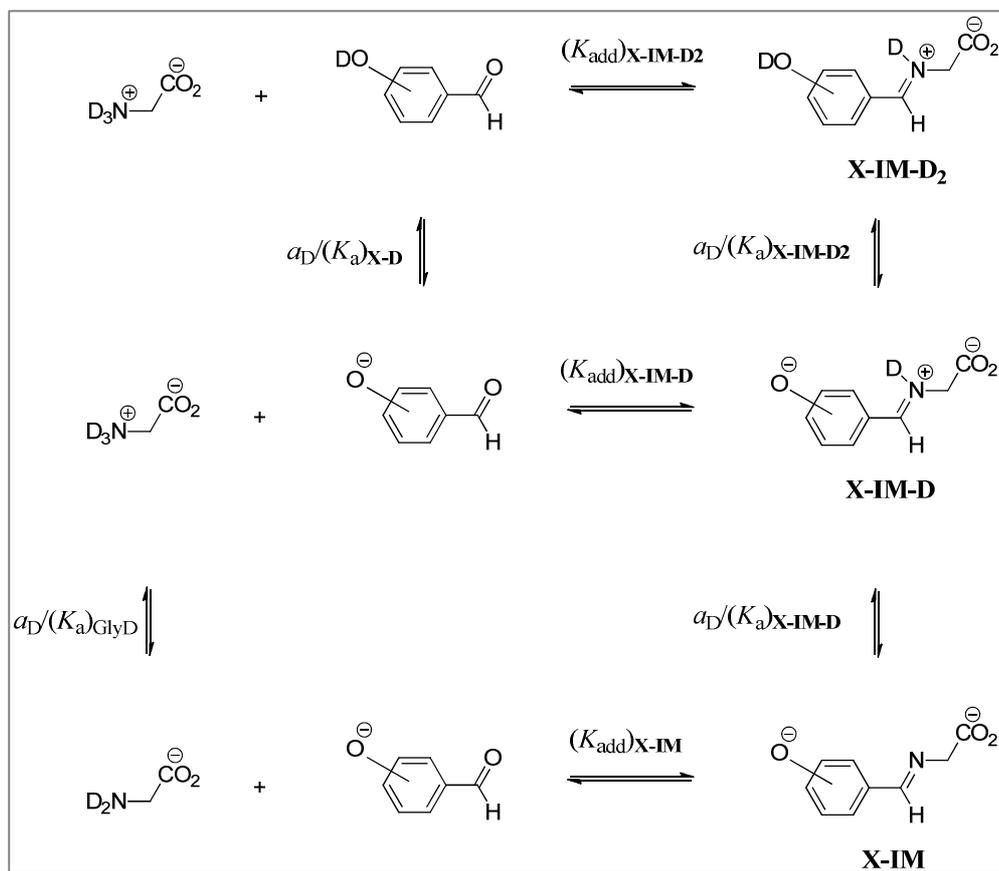


Figura 4.4 Equilibrio de formación de una imina entre la glicina y el *o*-hidroxi benzaldehído ($X = 2$) o entre la glicina con el *p*-hidroxi benzaldehído ($X = 3$).

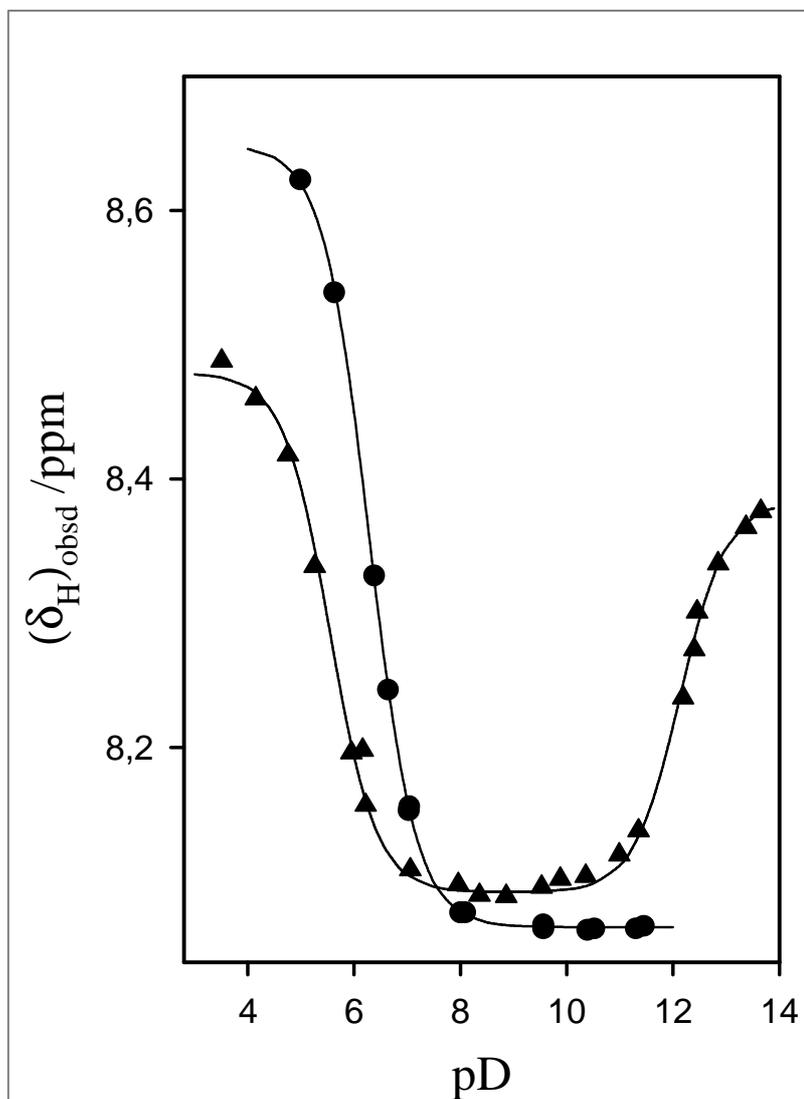


Figura 4.5 Influencia del pD sobre el desplazamiento químico del protón metínico de las iminas formadas en D_2O conteniendo: (●) 0,1-2,0 M glicina y 5-20 mM de **1**; (▲) 0,1-0,5 M glicina y 5-10 mM de **2** a 25 °C y $I=1,0$ (KCl). Las líneas trazadas muestran el ajuste de los datos experimentales a la ecuación 4.5, obtenida a partir del esquema de la figura 4.3 (●) o a la ecuación 4.6 que puede obtenerse del esquema de la figura 4.4 (▲)

El cambio del desplazamiento químico $(\delta_{\text{CH}_2})_{\text{obsd}}^{\mathbf{3-IM}}$ de la señal de los hidrógenos metilénicos del **3-IM** (imina de la glicina con p-hidroxi-benzaldehído, figura 4.4, X = **3**) con el valor del pD (figura 4.6) se debe a la protonación del nitrógeno imínico y del oxígeno del fenóxido. Se realizó un ajuste no lineal por mínimos cuadrados de los datos experimentales a la ecuación 4.6, utilizando para ello los valores: $\delta_{\text{CH}_2}^{\mathbf{3-IM}} = 3,90$ ppm y $\delta_{\text{CH}_2}^{\mathbf{3-IM-D}_2} = 4,20$ ppm para los desplazamientos químicos de los protones del grupo $\alpha\text{-CH}_2$ de **3-IM** y **3-IM-D₂**, respectivamente. La línea en la figura 4.6 muestra el resultado del ajuste, que proporcionó $\delta_{\text{CH}_2}^{\mathbf{3-IM-D}} = 4,00$ ppm para el desplazamiento químico de los hidrógenos del grupo $\alpha\text{-CH}_2$ de **3-IM-D** y los valores de las constantes de acidez $(K_a)_{\mathbf{3-IM-D}_2}$ y $(K_a)_{\mathbf{3-IM-D}}$ para **3-IM-D₂** y **3-IM-D** que se recogen en la tabla 4.1.

La variación del desplazamiento químico $(\delta_{\text{CH}_2})_{\text{obsd}}^{\mathbf{4-IM}}$ de la señal de los protones del grupo metileno de **4-IM** (imina de la glicina con el 4-piridincarboxaldehído, figura 4.3, Z=N, X=**4**) con el valor del pD (figura 4.6) es debida a la protonación del nitrógeno imínico.

La línea mostrada en la figura 4.6 corresponde al ajuste no lineal de los datos experimentales a la ecuación 4.5, utilizando el valor $\delta_{\text{CH}_2}^{\mathbf{4-IM}} = 4,09$ ppm para el desplazamiento químico de la hidrólisis del grupo $\alpha\text{-CH}_2$ de **4-IM** obtenido experimentalmente a valores de pD alto. Este ajuste permitió obtener $\delta_{\text{CH}_2}^{\mathbf{4-IM-D}} = 4,27$ ppm para el grupo $\alpha\text{-CH}_2$ de **4-IM-D** y el valor de la constante de acidez $(K_a)_{\mathbf{4-IM-D}}$ que se recoge en la tabla 4.1.

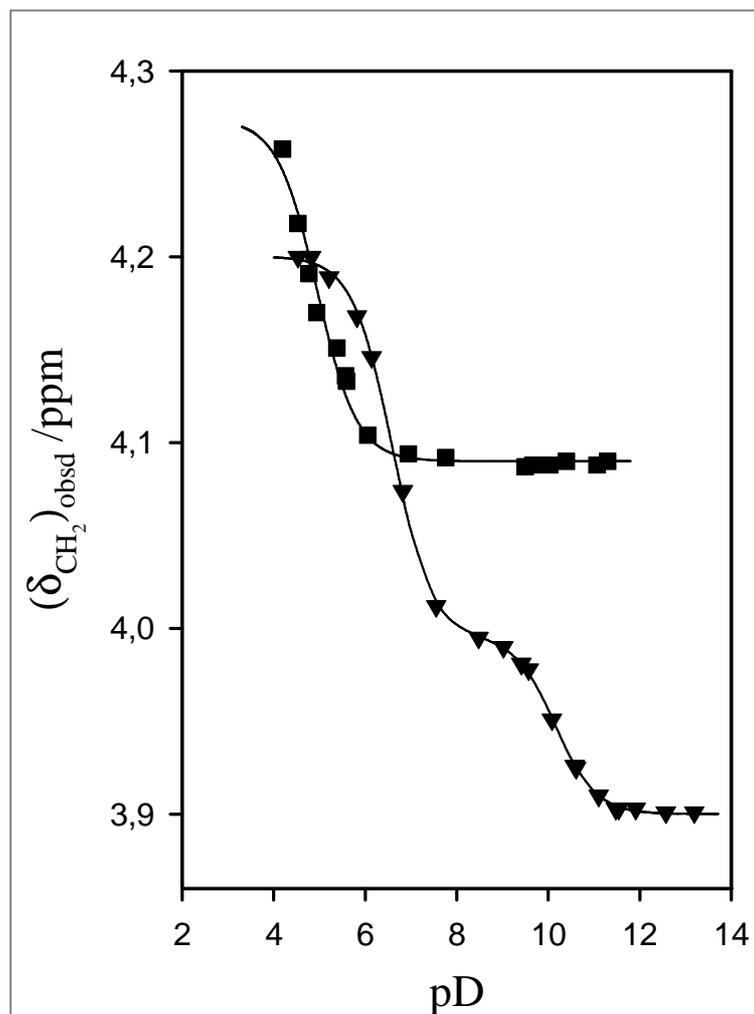
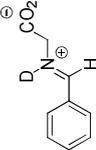
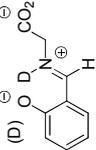
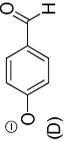
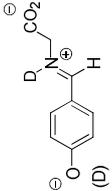
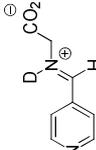


Figura 4.6 Influencia del pD sobre el desplazamiento químico de los hidrógenos del grupo metileno de las iminas formadas en D_2O conteniendo: (▼) 0,3-1,0 M glicina y 50 mM de **3**, (■) 0,001-2,0 M glicina y 0,005-1,0 M de **4** a 25 °C e $I=1,0$ (KCl). Las líneas muestran el ajuste de los datos experimentales a la ecuación 4.5, obtenida a partir del esquema de la figura 4.3, (■) o a la ecuación 4.6, obtenida a partir del esquema de la figura 4.4 (▼).

Tabla 4.1 Constantes de equilibrio en D₂O para la adición de glicina a los aldehídos aromáticos **1-4**^a

Aldehído	Ion iminio	p(K _a) _{IM} ^b	p(K _a) _{OD} ^c	(K _{add}) ^d (M ⁻¹)	(K _{add}) ^{+e} (M ⁻¹)	(K _{add}) ^{++f} (M ⁻¹)
		6,29 ± 0,01		44 ± 8	(3,3 ± 0,4) × 10 ⁻³	
		12,13 ± 0,05	5,55 ± 0,04	1,76 ± 0,02	72 ± 8	(3,4 ± 0,1) × 10 ⁻²
		10,16 ± 0,03	6,61 ± 0,02	0,49 ± 0,03	0,29 ± 0,03	(8,7 ± 0,9) × 10 ⁻³
		4,95 ± 0,06		500 ± 20	(2,0 ± 0,4) × 10 ⁻³	

^a A 25 °C y I = 1,0 (KCl). ^b pK_a aparente del nitrógeno del ión iminio en D₂O, determinado por valoración RMN. ^c pK_a aparente del grupo fenol del ión iminio en D₂O, determinado por valoración RMN. ^d Constante de equilibrio para la adición de la forma básica del aminoácido a la forma básica del aldehído. ^e Constante de equilibrio para la adición del aminoácido en forma zwitteriónica a la forma básica del aldehído. ^f Constante de equilibrio para la adición del aminoácido en forma zwitteriónica a la forma protonada del aldehído.

Las constantes de equilibrio aparentes $(K_{\text{add}})_{\text{obsd}}$ para la adición de la glicina a los aldehídos aromáticos **1-4** para formar las consiguientes aldiminas en D_2O a 25°C fueron determinadas por RMN ^1H , tal y como se describe en la sección experimental.

En la figura 4.7 se muestra el cambio con el valor de pD de $\log (K_{\text{add}})_{\text{obsd}}$ para la adición de la glicina a **1** (●), **2** (▲), **3** (▼) y **4** (■). La línea a través de los círculos (●) representa el ajuste de los datos para la primera reacción a la ecuación 4.7 ($X=1$), obtenida a partir del esquema de la figura 4.3, utilizando $(K_a)_{1\text{-IM-D}} = 5,13 \times 10^{-7} \text{ M}$ (tabla 4.1) y tratando $(K_a)_{\text{GlyD}} = (3,9 \pm 0,5) \times 10^{-11} \text{ M}$ y $(K_{\text{add}})_{1\text{-IM-D}} = (3,3 \pm 0,4) \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ como parámetros variables. Los datos para la formación de la imina de la glicina y **2** (▲) se ajustaron a la ecuación 4.8 ($X=2$) derivada de la figura 4.4, utilizando $(K_a)_{2\text{-IM-D}_2} = 2,8 \times 10^{-6} \text{ M}$ y $(K_a)_{2\text{-IM-D}} = 7,4 \times 10^{-13} \text{ M}$ (tabla 4.1), y tratando $(K_{\text{add}})_{2\text{-IM-D}_2} = (3,4 \pm 0,1) \times 10^{-2} \text{ M}^{-1}$, $(K_a)_{\text{GlyD}} = (3,1 \pm 0,2) \times 10^{-11} \text{ M}$ y $(K_a)_{2\text{-D}} = (1,32 \pm 0,06) \times 10^{-9} \text{ M}$ como parámetros variables. Este ajuste aparece representado por la línea continua que atraviesa los triángulos (▲) en la figura 4.7. Los valores observados de la constante de equilibrio para la adición de la glicina a **3** para formar la correspondiente imina (▼) se ajustaron también a la ecuación 4.8 ($X=3$), usando $(K_a)_{\text{GlyD}} = 3,9 \times 10^{-11} \text{ M}$ y $(K_a)_{3\text{-D}} = 7,4 \times 10^{-9} \text{ M}$ para las constantes de acidez del zwitterión de la glicina y **3-D**, respectivamente, $(K_a)_{3\text{-IM-D}_2} = 2,5 \times 10^{-7} \text{ M}$ y $(K_a)_{3\text{-IM-D}} = 6,9 \times 10^{-11} \text{ M}$ (tabla 4.1) para las constantes de acidez del ión iminio, y tratando $(K_{\text{add}})_{3\text{-IM-D}_2} = (8,7 \pm 0,9) \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ como parámetro variable. Por último, la línea que atraviesa los cuadrados de la figura 4.7 (■) representa el ajuste de los datos experimentales para la reacción de la glicina con **4** a la ecuación 4.7 ($X=4$), con $(K_a)_{\text{GlyD}} = 3,9$

$\times 10^{-11}$ M, $(K_a)_{4\text{-IM-D}} = 1,1 \times 10^{-5}$ M (tabla 4.1), y tomando $(K_{\text{add}})_{4\text{-IM-D}} = (2,0 \pm 0,4) \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ como único parámetro variable.

$$(K_{\text{add}})_{\text{obsd}} = (K_{\text{add}})_{\text{X-IM-D}} \left(\frac{a_{\text{D}} + (K_a)_{\text{X-IM-D}}}{a_{\text{D}} + (K_a)_{\text{GlyD}}} \right) \quad \mathbf{X = 1, 4} \quad (4.7)$$

$$\begin{aligned} & (K_{\text{add}})_{\text{obsd}} \\ &= (K_{\text{add}})_{\text{X-IM-D}_2} \left(\frac{a_{\text{D}}^2 + a_{\text{D}}(K_a)_{\text{X-IM-D}_2} + (K_a)_{\text{X-IM-D}_2}(K_a)_{\text{X-IM-D}}}{a_{\text{D}}^2 + a_{\text{D}}((K_a)_{\text{GlyD}} + (K_a)_{\text{X-D}}) + (K_a)_{\text{GlyD}}(K_a)_{\text{X-D}}} \right) \\ & \quad \mathbf{X = 2, 3} \quad (4.8) \end{aligned}$$

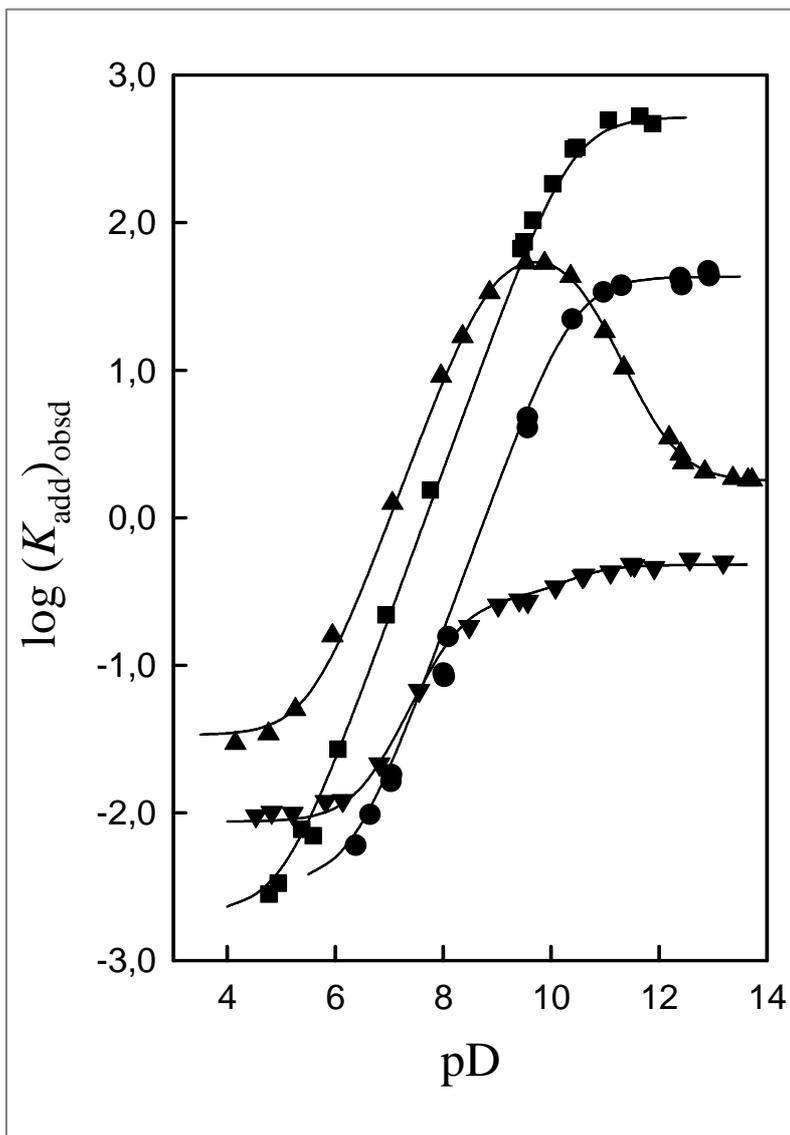


Figura 4.7 Dependencia logarítmica de $(K_{\text{add}})_{\text{obsd}}$ (M^{-1}) con el pD para la conversión de glicina a las correspondientes aldíminas en D_2O a 25°C y $I = 1,0$ (KCl). Los datos experimentales para la reacción de la glicina con (●) 1, (▲) 2, (▼) 3 y (■) 4 se ajustaron a las ecuaciones 4.7 (●, $X=1$; ■, $X=4$) y 4.8 (▲, $X=2$; ▼, $X=3$), y los valores de las correspondientes constantes de equilibrio se resumen en la tabla 4.1.

4.4 Discusión

Las iminas formadas por aminoácidos y aldehídos aromáticos sustituidos tienen un particular interés en química y en bioquímica debido a que constituyen modelos sencillos para caracterizar el comportamiento de las iminas más complejas del cofactor enzimático PLP. Resulta en general difícil detectar la formación de iminas en disolución acuosa a un valor de pH por debajo de 7 debido a que las constantes de equilibrio para la conversión de la amina y cetona o aldehído en el correspondiente aducto imina son muy pequeñas. De hecho, la mayor parte de la información disponible sobre la estabilidad de iminas en disolución acuosa se refiere a las especies no protonadas. Los datos determinados en este trabajo están en concordancia con los datos termodinámicos más limitados publicados con anterioridad por Leussing y Bai para la adición de la glicina al anión salicilaldehído¹⁴¹ y por Bruice y sus colaboradores para la reacción del glicinato con la piridina-4-carboxaldehído.¹⁴²

Los equilibrios para la formación de iminas entre la glicina y el PLP,¹⁴³ DPL^{143,144} o el análogo simple del coenzima, 3-hidroxi piridina-4-aldehído,¹⁴⁵ han sido bien caracterizados. La tabla 4.2 resume los valores bibliográficos de las constantes de equilibrio de formación de las diferentes formas iónicas de estos aductos imina junto con sus valores de pK_a .

¹⁴¹ Leussing, D. L.; Bai, K. S. **1968**, *Anal. Chem.* 40: 575–81.

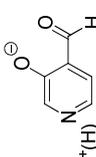
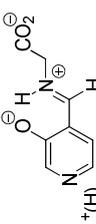
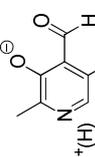
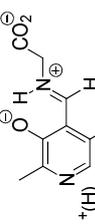
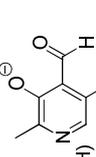
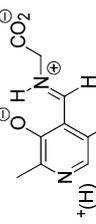
¹⁴² French, T. C.; Bruice, T. C. **1964**, *Biochemistry* 3: 1589–96.

¹⁴³ Vazquez, M. A.; Echevarria, G.; Munoz, F.; Donoso, J.; Garcia Blanco, F. **1989**, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1617–1622.

¹⁴⁴ Metzler, C. M.; Cahill, A.; Metzler, D. E. **1980**, *J. Am. Chem. Soc.* 102: 6075–82.

¹⁴⁵ French, T. C.; Auld, D. S.; Bruice, T. C. **1965**, *Biochemistry* 4: 77–84.

Tabla 4.2 Constantes de equilibrio en H₂O para la adición de la glicina a 3-hidroxi piridina-4-aldehído, DPL, y PLP.

Aldehído	Ion iminio	$p(K_a)_{IM}^a$	$p(K_a)_{pyr}^b$	$(K_{add})^c (M^{-1})$	$(K_{add})^{+d} (M^{-1})$	$(K_{add})^{++e} (M^{-1})$
		9,12 ^f	5,50 ^f	49,3 ^f	10,1 ^f	0,88 ^f
		11,22 ^g (11,30) ^h	6,43 ^g (6,59) ^h	12,3 ^g (13,2) ^h	339 ^g (437) ^h	8,7 ^g (15,9) ^h
		11,35 ^g	6,36 ^g	21,4 ^g	833 ^g	8,9 ^g

^a pK_a aparente del nitrógeno del ión iminio en H₂O. ^b pK_a aparente del grupo piridina del ión iminio en H₂O. ^c Constante de equilibrio para la adición de la forma básica del grupo amino del aminoácido a la forma básica del aldehído. ^d Constante de equilibrio para la adición del aminoácido en forma zwitteriónica a la forma básica del aldehído. ^e Constante de equilibrio para la adición del aminoácido zwitteriónico a la forma N-protonada del aldehído. ^f Datos en H₂O a 30 °C y $I = 1,0$ (KCl)¹⁴⁶. ^g Datos en H₂O a 25 °C y $I = 0,1$ (KCl)¹⁴⁷. ^h Datos en H₂O a 25 °C y $I = 0,2$ (KCl)¹⁴⁸.

¹⁴⁶ French, T. C.; Auld, D. S.; Bruce, T. C. **1965**, *Biochemistry* 4: 77–84.

¹⁴⁷ Vazquez, M. A.; Echevarria, G.; Munoz, F.; Donoso, J.; Garcia Blanco, F. **1989**, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1617–1622.

¹⁴⁸ Metzler, C. M.; Cahill, A.; Metzler, D. E. **1980**, *J. Am. Chem. Soc.* 102: 6075–82.

4.4.1 Fuerza del enlace de hidrógeno intramolecular en aldiminas del PLP. Las iminas formadas por adición de aminoácidos al PLP son muy estables, y existen mayoritariamente como iones iminio en disolución acuosa por debajo de pD 10 (tabla 4.2). Esto contrasta con la estabilidad mucho menor del ión iminio estructuralmente más sencillo formado por la glicina y el benzaldehído, que tiene un valor aproximado de pK_a de 6 (tabla 4.1). La baja acidez de los iones iminio del PLP se ha atribuido generalmente a la existencia de un enlace de hidrógeno fuerte entre el ion iminio y el oxígeno del fenolato. Sin embargo, en un estudio reciente de la dependencia con el valor del pH del desplazamiento químico de RMN ^{15}N de las aldiminas del PLP en disolución acuosa, Limbach y colaboradores concluyeron que probablemente este enlace intramolecular no existe, y que los grupos iminio y fenolato están preferentemente enlazados a moléculas de agua.¹⁴⁹ Esto lleva a preguntarse si las *o*-hidroxiaril aldiminas están realmente estabilizadas por un enlace de hidrógeno intramolecular en disolución acuosa, y si es así, cómo es de fuerte este enlace, o si la gran estabilidad de estos iones iminio puede ser debida únicamente a efectos electrostáticos y de resonancia del sustituyente *orto*-fenóxido. Este problema puede clarificarse si comparamos los efectos de los sustituyentes *orto*-fenóxido y *para*-fenóxido sobre la basicidad del aducto imina formado entre la glicina y el benzaldehído (figura 4.8), ya que el efecto del sustituyente *para*-fenóxido proporciona una estimación de la estabilización por resonancia del ion iminio en ausencia de cualquier interacción directa por enlace de hidrógeno.

¹⁴⁹ Sharif, S.; Huot, M. C.; Tolstoy, P. M.; Toney, M. D.; Jonsson, K. H. M.; Limbach, H.-H. **2007**, *J. Phys. Chem. B* 111: 3869–3876.

El efecto de distintos sustituyentes X en el anillo aromático del benzaldehído sobre la constante de equilibrio para la adición de la glicina a este aldehído (K_{add}) y sobre el valor del $\text{p}K_{\text{a}}$ del ión iminio correspondiente, se resumen en la tabla 4.3. La adición de un sustituyente $p\text{-O}^-$ al benzaldehído produce un aumento en el $\text{p}K_{\text{a}}$ del ión iminio de 3,9 unidades (figura 4.8B). Este cambio corresponde a la suma de las interacciones estabilizantes por resonancia y electrostáticas de este sustituyente con el nitrógeno imínico, que son mayores en el ión iminio que en la imina neutra. Cuando el sustituyente está en posición *orto* (figura 4.8A), el efecto sobre la acidez del ión iminio es 1,9 unidades superior al observado para el sustituyente en posición *para* (figura 4.8B), lo que podría reflejar una estabilización adicional del ión iminio por formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el oxígeno del fenolato y el nitrógeno imínico. El efecto global observado para cada sustituyente puede utilizarse para estimar la fuerza de este enlace de hidrógeno intramolecular después de realizar una corrección para tener en cuenta la diferente estabilización del nitrógeno imínico por los sustituyentes $o\text{-O}^-$ y $p\text{-O}^-$ a través de interacciones electrostáticas y de resonancia.

El efecto que tiene el sustituyente $p\text{-O}^-$ sobre el valor del $\text{p}K_{\text{a}}$ de la benzilamina (figura 4.9)^{150,151} es de 0,5 unidades, lo que corresponde a una energía de estabilización de 0,7 kcal/mol, y proporciona una estimación de la interacción polar que existe entre este sustituyente y la carga positiva del nitrógeno del ion iminio. Se puede calcular un valor de 4,6 kcal/mol para la diferencia en estabilización del ion iminio comparado con la imina neutra mediante interacción resonante con el anión $p\text{-O}^-$, restándole al efecto

¹⁵⁰ Bunting, J. W.; Stefanidis, D. **1990**, *J. Am. Chem. Soc.* 112: 779–86.

¹⁵¹ Hine, J. *Structural Effects on Equilibria in Organic Chemistry*; John Wiley & Sons: **1975**, New York.

estabilizante global de 5,3 kcal/mol observado para el sustituyente $p\text{-O}^-$ (figura 4.8B, figura 4.9) la contribución electrostática estimada.

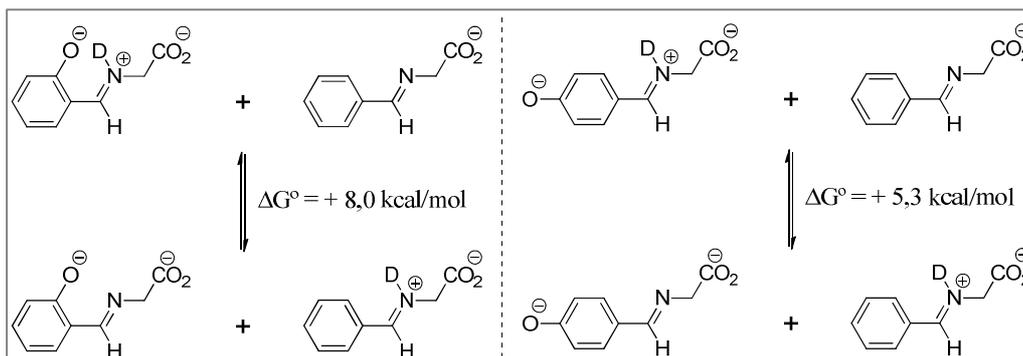


Figura 4.8 Comparación del efecto del sustituyente en *orto* o *para* sobre la basicidad de la imina formada entre la glicina y el benzaldehído sustituido.

Este valor proporciona un límite superior para la diferencia en estabilización por resonancia del ion iminio deficiente en electrones con respecto a la imina por interacción con el sustituyente $o\text{-O}^-$. Sin embargo, el análisis de los datos en la tabla 4.3 muestra que el efecto del sustituyente $o\text{-O}^-$ sobre la constante de equilibrio para la adición del anión glicina al benzaldehído para formar la imina neutra (figura 4.10A) es aproximadamente el 70% del efecto del sustituyente $p\text{-O}^-$ sobre la misma constante de equilibrio (figura 4.10B). Esto indica una mayor estabilización del grupo carbonilo del aldehído que del grupo imina del producto por interacción resonante con un sustituyente $p\text{-O}^-$ comparado con un sustituyente $o\text{-O}^-$. Una estimación de la diferencia en estabilización por resonancia del ión iminio del benzaldehído comparado con la imina neutra por interacción con el anión *orto*- O^- se puede obtener como el 70% del efecto resonante total observado para el anión *para*- O^- , que corresponde a $(0,70) \times (4,6) = 3,2$ kcal/mol.

Tabla 4.3 Efecto de la presencia de sustituyentes en el anillo, o de la sustitución del C-4 del anillo por N, sobre la constante de equilibrio para la adición de la glicina al benzaldehído para formar la correspondiente imina^a

Aldehído	$(K_{\text{add}})_X^b$	$\frac{(K_{\text{add}})_X}{(K_{\text{add}})_H}$	$\Delta\Delta G_X^c$ (kcal/mol)	$(K_{\text{add}})_X^{\dagger d}$	$\frac{(K_{\text{add}})_X^{\dagger}}{(K_{\text{add}})_H^{\dagger}}$	$\Delta\Delta G_X^e$ (kcal/mol)	$p(K_a)_X\text{-IMD}^f$	$\Delta(pK_a)_X^g$
	44	1	0	0,0033	1	0	6,29	0
	1,76	0,04	1,9	72	22000	-5,9	12,13	5,8
	0,49	0,011	2,7	0,29	88	-2,7	10,16	3,9
	1,5 ^h	0,034	2	$1 \times 10^{-4 h}$	0,03	2,1	6,19 ^h	-0,1
	500	11,4	-1,4	0,002	0,61	0,3	4,95	-1,3

^a Datos de la tabla 4.1 para reacciones en D₂O, al menos que se indiquen otras condiciones. ^b Constantes de equilibrio para la adición del anión glicina al aldehído indicado en la primera columna para formar la correspondiente imina no protonada. ^c El efecto del sustituyente X sobre la variación de la energía de Gibbs para la formación de la imina a partir del aldehído y aminoácido libres. ^d Constantes de equilibrio para la adición del zwitterión de la glicina al aldehído indicado en la primera columna para formar el correspondiente ión iminio. ^e El efecto del sustituyente X sobre la variación de la energía de Gibbs para la formación del ión iminio a partir del aldehído y el aminoácido libres. ^f Constantes de acidez aparentes para los iones iminio sustituidos. ^g El efecto del sustituyente X sobre el pK_a para la ionización del ión iminio. ^h Datos de la referencia⁵² para reacciones en D₂O a 25 °C y I = 1,0 (KCl).

¹⁵² Sharif, S.; Huot, M. C.; Tolstoy, P. M.; Toney, M. D.; Jonsson, K. H. M.; Limbach, H.-H. 2007, *J. Phys. Chem. B* 111: 3869–3876.

El ión iminio del salicilaldehído (**5**) puede ser estabilizado también por una interacción Coulómbica a través del espacio entre el nitrógeno cargado positivamente y el anión fenóxido cargado negativamente. Una aplicación sencilla de la ley de Coulomb nos permite determinar la relación de energías electrostáticas en los dos iones iminio **5** y **6**. Si se considera que no hay diferencia en la constante dieléctrica efectiva y en la magnitud de las cargas en ambas interacciones, entonces $E_5/E_6 = r_6/r_5$, donde r_5 y r_6 son las distancias entre cargas opuestas en **5** y **6**, respectivamente. Las estructuras calculadas por métodos computacionales para **5** y **6** (figura 4.11) muestran que los dos centros cargados están a una distancia de 2,6 y 6,5 Å, respectivamente, y por tanto, $E_5/E_6 = 2,5$. Al usar el valor de 0,7 kcal/mol estimado anteriormente para la interacción entre el nitrógeno cargado positivamente y el anión *p*-fenóxido en **6**, obtenemos un valor de 1,8 kcal/mol para la interacción entre estos dos grupos en **5**. Se puede suponer que los efectos estéricos son despreciables dada la conformación substancialmente plana de estas moléculas. Si restamos las contribuciones de los efectos de resonancia y electrostáticos a través del espacio del efecto total de 8,0 kcal/mol que el sustituyente *o*-O⁻ ejerce sobre la acidez del ión iminio del benzaldehído (figura 4.8A), la energía restante (8,0 – 3,2 – 1,8) = 3,0 kcal/mol puede ser atribuida a la contribución del enlace de hidrógeno a la mayor estabilización del ión iminio comparado con la imina neutra.

	pK_a (H ₂ O)		pK_a (H ₂ O)
	9,4		6,3
	9,9		10,2
ΔpK_a	0,5		3,9

Figura 4.9 Efecto del sustituyente cargado en posición *para* sobre el valor del pK_a de la benzilamina en agua y de la imina formada por benzaldehído y glicina en D₂O.

Los enlaces de hidrógeno intermoleculares en disolución acuosa son normalmente muy débiles debido a que las moléculas de agua compiten eficientemente en la solvatación de los grupos ácidos y básicos.¹⁵³ Sin embargo, las interacciones de enlace de hidrógeno en agua pueden hacerse significativas cuando el dador ácido y el aceptor básico están en la misma molécula y forzados a una geometría apropiada por restricciones moleculares.^{154,155} Este es el caso del ión iminio **5**, para el cual hemos demostrado que está estabilizado por un enlace de hidrógeno intramolecular en disolución acuosa. La energía de esta interacción por enlace de hidrógeno es aproximadamente 3 kcal/mol superior al valor predicho para una interacción electrostática simple entre el catión iminio y el anión fenóxido y no es muy distinta del valor estimado de 4 kcal/mol para la energía de estabilización

¹⁵³ Stahl, N.; Jencks, W. P. **1986**, *J. Am. Chem. Soc.* 108: 4196–205.

¹⁵⁴ Frey, P. A.; Cleland, W. W. **1998**, *Bioorg. Chem.* 26: 175–192.

¹⁵⁵ Hibbert, F.; Emsley, J. **1990**, *Adv. Phys. Org. Chem.* 26: 255–79.

implicada en la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular en el caso del anión salicilato (**7**) en agua.¹⁵⁶ En ambas moléculas, la naturaleza especial del enlace de hidrógeno interno parece estar fuertemente relacionada con la existencia de conjugación directa entre los grupos aceptor y dador del enlace de hidrógeno (figura 4.12). Sin embargo, a pesar del gran número de investigaciones sobre este tipo de estructuras,¹⁵⁷ no hay un acuerdo general sobre si la fuerza extra de este enlace de hidrógeno intramolecular es debida a la estabilización por resonancia,^{158,159} o el resultado de la orientación favorable y la coplanaridad de los grupos aceptor y dador.¹⁶⁰

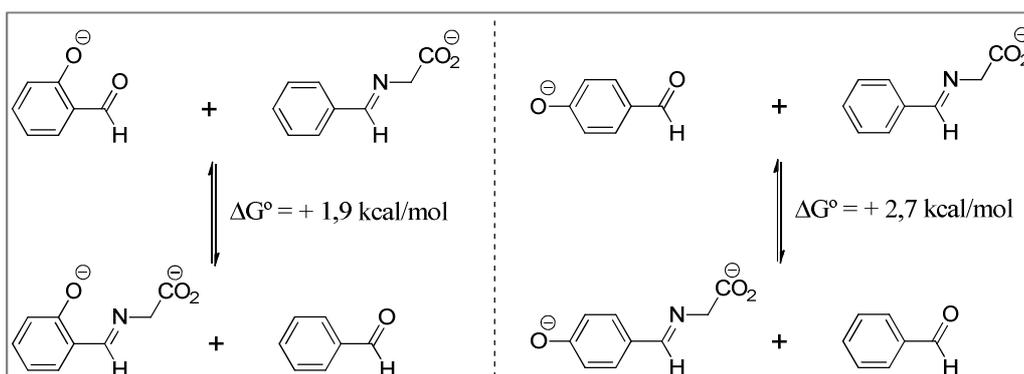


Figura 4.10 Comparación del efecto del sustituyente en posición *orto* o *para* sobre el equilibrio para la adición del anión glicina al benzaldehído para formar una imina neutra.

¹⁵⁶ Hermans, J., Jr.; Leach, S. J.; Scheraga, H. A. **1963**, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 1390–5.

¹⁵⁷ Sobczyk, L.; Grabowski, S. J.; Krygowski, T. M. **2005**, *Chem. Rev.* 105: 3513–3560.

¹⁵⁸ Gilli, G.; Bellucci, F.; Ferretti, V.; Bertolasi, V. **1989**, *J. Am. Chem. Soc.* 111: 1023–8.

¹⁵⁹ Gilli, P.; Bertolasi, V.; Ferretti, V.; Gilli, G. **2000**, *J. Am. Chem. Soc.* 122: 10405–10417.

¹⁶⁰ Sanz, P.; Mo, O.; Yanez, M.; Elguero, J. **2007**, *J. Phys. Chem. A* 111: 3585–3591.

El efecto de un sustituyente *o*-O⁻ sobre el valor del p*K*_a del ión iminio formado entre el 4-piridin-carboxaldehído y la glicina (tabla 4.4) es una unidad menor que el efecto del mismo sustituyente sobre el valor del p*K*_a del ión iminio del benzaldehído (tabla 4.3). La menor estabilización proporcionada por este sustituyente cuando el anillo fenílico es substituido por un anillo de piridina refleja la transferencia de carga negativa al nitrógeno piridínico, lo cual reduciría el grado de estabilización por resonancia debido a la delocalización de la carga negativa en el grupo ión iminio de **8**. No es de esperar que se produzca un cambio significativo en la fuerza del enlace de hidrógeno intramolecular en el ión iminio **5** al introducir un anillo de piridina para dar lugar a **8**. La sustitución del C-4 del anillo por N conduce a una disminución de 1,3 unidades en el valor del p*K*_a del ión iminio del benzaldehído (tabla 4.3). Este descenso es similar a la disminución de 1,4 unidades en el valor del p*K*_a al pasar del fenol (p*K*_a = 10,0) a la 3-hidroxi-piridina (p*K*_a = 8,6).¹⁶¹ Esto sugiere que, como consecuencia de la introducción del nitrógeno piridínico, la acidez del dador de enlace de hidrógeno y el aceptor aumenta en la misma proporción, de forma que la fortaleza del enlace de hidrógeno no se ve afectada significativamente por esta sustitución.

Concluimos por tanto que la energía de estabilización involucrada en la formación de un enlace de hidrógeno interno en los iones iminio del PLP en agua debería ser similar al valor de 3 kcal/mol estimado para **5**. Nuestros datos son por lo tanto consistentes con la existencia en disolución acuosa de un enlace de hidrógeno intramolecular en iones iminio derivados de *o*-hidroxiaril aldehídos y aminoácidos.

¹⁶¹ Metzler, D. E.; Harris, C. M.; Johnson, R. J.; Siano, D. B.; Thomson, J. A. **1973**, *Biochemistry* 12: 5377-92.

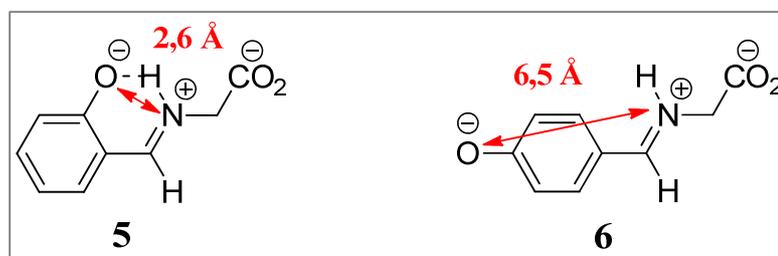


Figura 4.11 Comparación de las distancias entre los centros cargados cuando el sustituyente O⁻ está en posición *orto* o *para*. Las estructuras han sido determinadas por métodos computacionales.

Limbach y colaboradores observaron que el desplazamiento químico de ¹⁵N para el átomo de nitrógeno protonado de la imina del piridoxal en CD₃OH disminuía desde 238 ppm para la aldimina a 154 ppm para su complejo por enlace de hidrógeno con el ácido perfluorobutírico (Figura 4.13A).¹⁶² Esto indica que la protonación parcial del nitrógeno piridínico está acoplado con un desplazamiento del protón desde el oxígeno del fenóxido hacia el nitrógeno imínico en el enlace de hidrógeno intramolecular -O⁻·⁺NH- fuertemente covalente. En cambio, en agua, el desplazamiento químico de $\delta = 146$ ppm para el nitrógeno imínico observado a un valor de pH 10, al cual el anillo de piridina está desprotonado, es consistente con la casi total protonación de este nitrógeno.¹⁶³ El desplazamiento químico de ¹⁵N para este nitrógeno ($\delta = 146$ ppm) no muestra un cambio detectable cuando se disminuye el valor del pH en agua desde 10 (<<1% de protonación del nitrógeno de la piridina) a 6 (60% de protonación del nitrógeno de la piridina),¹⁶³ por lo que puede considerarse que el protón del ión iminio permanece esencialmente estacionario cuando se protona el nitrógeno de la piridina. Estos resultados demuestran que, o no hay

¹⁶² Sharif, S.; Denisov, G. S.; Toney, M. D.; Limbach, H.-H. **2007**, *J. Am. Chem. Soc.* 129: 6313–6327.

¹⁶³ Sharif, S.; Huot, M. C.; Tolstoy, P. M.; Toney, M. D.; Jonsson, K. H. M.; Limbach, H.-H. **2007**, *J. Phys. Chem. B* 111: 3869–3876.

interacción directa por enlace de hidrógeno entre el ion iminio catiónico y el anión fenóxido en agua, o que el enlace de hidrógeno intramolecular entre estos átomos en agua se comporta como un par iónico, con una transferencia protónica mínima del nitrógeno al oxígeno.

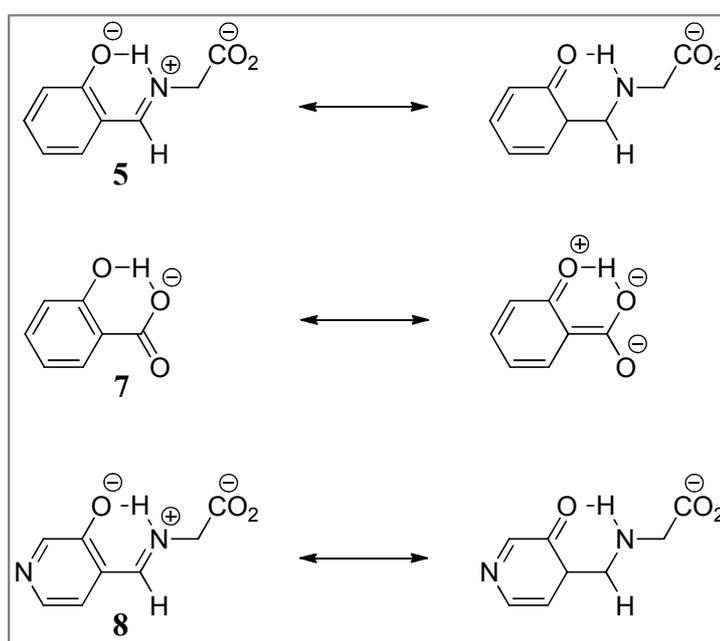


Figura 4.12 Formas resonantes de diferentes fenoles estabilizados por enlace de hidrógeno intramolecular con conjugación directa entre los grupos dador y aceptor.

En este trabajo estimamos que la magnitud de la interacción estabilizante entre el catión iminio y el anión fenóxido es aproximadamente 3 kcal/mol mayor que para una simple interacción electrostática entre los correspondientes iones libres, lo que proporciona una evidencia fuerte de la existencia de un enlace de hidrógeno intramolecular $-O^{\ominus}\cdot^{\oplus}NH-$ en agua. La estabilización de 3 kcal/mol refleja sin duda un grado pequeño de transferencia

protónica del nitrógeno al oxígeno. Los datos de desplazamientos químicos de ^{15}N ponen de manifiesto que la posición del protón en este enlace de hidrógeno no cambia de forma apreciable con la protonación del anillo de piridina. Sin embargo, un desplazamiento grande del protón hacia el nitrógeno no es posible, ya que el cambio en disolvente del metanol al agua ha dado lugar ya a un movimiento en la posición del protón del oxígeno al nitrógeno como consecuencia del cambio en las basicidades relativas del oxígeno del fenóxido y del nitrógeno imínico (figura 4.13).

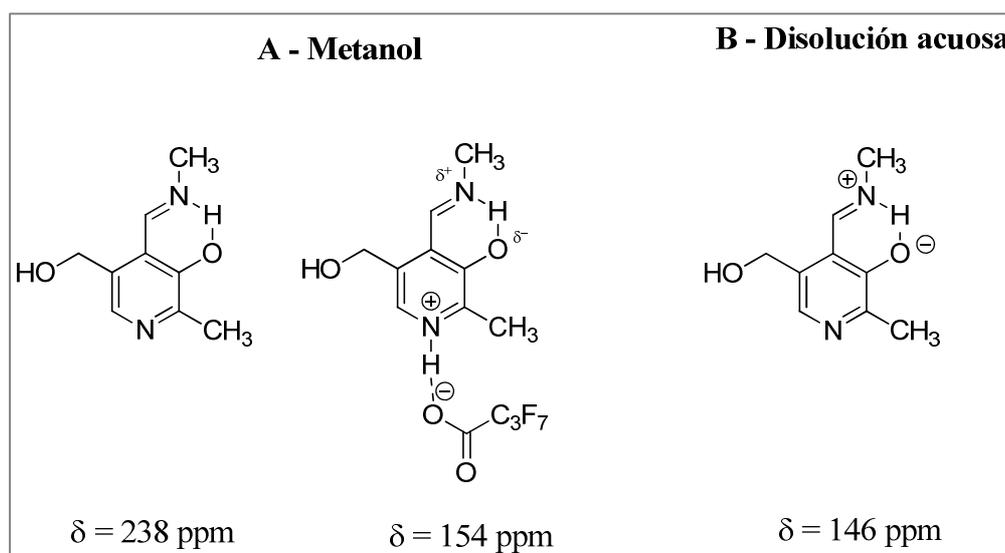


Figura 4.13 Desplazamientos químicos de RMN ^{15}N del nitrógeno protonado de la imina del piridoxal en metanol y en disolución acuosa.

4.4.2 Otros efectos de los sustituyentes sobre la estabilidad de los iones iminio. El análisis de los resultados resumidos en la tabla 4.4 conduce a una serie de conclusiones interesantes que conciernen al efecto de los sustituyentes en el anillo sobre la estabilidad de los iones iminio del piridoxal: (a) En primer lugar, la acidez del ion iminio de la glicina y el DPL es 2,1

unidades menor que la del ión iminio **8**, lo cual pone de manifiesto que la introducción de los grupos metilo en el anillo de piridina da lugar a una estabilización del ion iminio 2,9 kcal/mol mayor que la correspondiente a la imina neutra. El efecto de estos sustituyentes dadores de electrones contrarresta el efecto acidificante del nitrógeno piridínico neutro, de forma que el valor del pK_a del ion iminio del DPL en agua es similar al del ion iminio **5**. (b) En segundo lugar, los valores de pK_a para los iones iminio formados entre la glicina y el DPL (11,2) o entre la glicina y el PLP (11,3) son similares. Esto indica que el grupo fosfato no proporciona una estabilización adicional del ion iminio con respecto a la imina neutra y sugiere que este grupo no juega un papel significativo en la gran estabilidad de las iminas del PLP. Esto está de acuerdo con la suposición de que la función del grupo fosfato en el PLP es servir como anclaje del coenzima a la proteína. El ion iminio formado por la adición de glicina al piridoxal no es un buen sistema de referencia para evaluar el efecto del grupo fosfato, ya que el valor menor del pK_a medido para este compuesto (10,8) se cree que es debido a la estabilización de la imina neutra por enlace de hidrógeno entre el nitrógeno de la imina y el grupo 5'-hidroxi.^{164,165} (c) En tercer lugar, hay un aumento de aproximadamente 6 kcal/mol en la fuerza impulsora termodinámica para la formación de un ion iminio entre el zwitterión de la glicina y el benzaldehído al añadir un sustituyente $o-O^-$ al anillo de benceno (tabla 4.3). Este valor representa una fracción importante de la diferencia de 7,4 kcal/mol en la fuerza impulsora para la adición del zwitterión de la glicina a la forma más básica del PLP comparado con el benzaldehído, y sugiere que el anión fenóxido presente en la molécula

¹⁶⁴ Metzler, C. M.; Cahill, A.; Metzler, D. E. **1980**, *J. Am. Chem. Soc.* 102: 6075–82.

¹⁶⁵ Vazquez, M. A.; Echevarria, G.; Munoz, F.; Donoso, J.; Garcia Blanco, F. **1989**, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1617–1622.

de cofactor proporciona la mayor parte de la estabilización extra observada en los iones iminio del PLP comparado con los aductos del benzaldehído.

En el capítulo anterior vimos que la constante de equilibrio para la formación de un ión iminio con el fenilglioxilato (modelo para el grupo prostético piruvoilo de algunas enzimas que catalizan la descarboxilación de aminoácidos) es menos favorable que para la formación de iones iminio con el PLP. Debido a la existencia de una interacción electrostática estabilizante entre el grupo carboxilato del fenilglioxilato y el grupo ion iminio catiónico, sería de esperar un descenso en la acidez del ión iminio del fenilglioxilato comparado con el ion iminio del benzaldehído. Sin embargo, tal como se muestra en la tabla 4.3, estos dos iones tienen valores de pK_a muy parecidos. Estos datos muestran que el sustituyente $\alpha\text{-CO}_2^-$ proporciona una estabilización muy pequeña o despreciable de la carga positiva cercana, debido a que el efecto atractor de electrones del grupo carbonilo se equilibra con el efecto de campo de este sustituyente aniónico. A modo de comparación, la introducción de un grupo -CO_2^- en el carbono de la metilamina produce solamente una disminución de 1,1 unidad en su valor de pK_a , pasando de 10,8 a 9,7 para el zwitterión de la glicina.¹⁶⁶

¹⁶⁶ Heo, C. K. M.; Bunting, J. W. **1994**, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 2279–2290.

Tabla 4.4 Efecto del cambio en los sustituyentes del anillo sobre la constante de equilibrio para la adición de glicina al piridin aldehído para formar la correspondiente imina^a

Aldehído	$(K_{\text{add}})_X^b$	$\frac{(K_{\text{add}})_X}{(K_{\text{add}})_H}$	$\Delta\Delta G_X^c$ (kcal/mol)	$(K_{\text{add}})_X^{\ddagger d}$	$\frac{(K_{\text{add}})_X^{\ddagger}}{(K_{\text{add}})_H^{\ddagger}}$	$\Delta\Delta G_X^e$ (kcal/mol)	$p(K_{\text{a}})_X\text{-IMD}^f$	$\Delta(pK_{\text{a}})_X^g$
	500 ^h	1,0	0	0,002 ^h	1,0	0	4,95 (D ₂ O) ^h 4,35 (H ₂ O) ⁱ	0
	49 ^j	0,1	1,4	10 ^j	5000	-5,0		4,8
	12,3 ^k (13,2) ^l	0,025	2,2	339 ^k (437) ^l	1,7 x 10 ⁵	-7,1	11,22 ^k (11,30) ^l	6,9
	21,4 ^k	0,043	1,9	833 ^k	4,2 x 10 ⁵	-7,7	11,35 ^k	7,0
				8,9 ^j	4450	-5,0		

^a En H₂O o en D₂O. ^b Constantes de equilibrio para la adición del anión de la glicina al aldehído indicado en la primera columna para formar la correspondiente imina no protonada. ^c Efecto del sustituyente X sobre la variación en la energía de Gibbs para la formación de la imina a partir del aldehído y aminoácido libres. ^d Constantes de equilibrio para la adición del zwitterión de la glicina al aldehído indicado en la primera columna para formar el correspondiente ion iminio. ^e Efecto del sustituyente X sobre la variación de la energía de Gibbs para la formación del ion iminio a partir del aldehído y aminoácido libres. ^f Constantes de acidez aparentes para los iones iminio sustituidos. ^g Efecto del sustituyente X sobre el pK_a para la ionización del ion iminio. ^h Constantes de equilibrio de la tabla 4.1 para las reacciones en D₂O. ⁱ Valores estimados considerando $(K_{\text{a}})_{\text{H}_2\text{O}}/(K_{\text{a}})_{\text{D}_2\text{O}} = 4$ (referencia ¹⁶⁷) para el efecto isotópico del disolvente sobre la constante de acidez del ion iminio de la glicina y el piridin carboxialdehído. ^j Datos en H₂O a 30 °C y $I = 1,0$ (KCl) de la referencia ¹⁶⁸. ^k Datos en H₂O a 25 °C y $I = 0,1$ (KCl) de la referencia ¹⁶⁹. ^l Datos en H₂O a 25 °C y $I = 0,2$ de la referencia ¹⁷⁰.

¹⁶⁷ Laughton, P. M.; Robertson, R. E. In *Solute-Solvent Interactions*; Coetzee, J. F., Ritchie, C. D., Eds.; Dekker: **1969**; New York, p 399.

¹⁶⁸ Bunting, J. W.; Stefanidis, D. **1990**, *J. Am. Chem. Soc.* 112: 779–86.

¹⁶⁹ Sobczyk, L.; Grabowski, S. J.; Krygowski, T. M. **2005**, *Chem. Rev.* 105: 3513–3560.

¹⁷⁰ Hibbert, F.; Emsley, J. **1990**, *Adv. Phys. Org. Chem.* 26: 255–79.

4.4.3 Catálisis enzimática. Hemos encontrado que el sustituyente 2-O⁻ en la coenzima PLP produce una estabilización 8,0 kcal/mol mayor en el ion iminio de la glicina que en la correspondiente imina neutra. Esta mayor estabilización contribuirá directamente a la catálisis por PLP de la desprotonación de aminoácidos en disolución y en el centro activo del enzima en el caso de procesos de catálisis enzimática. Esta interacción estabilizante es en parte compensada por la interacción desfavorable entre el sustituyente aniónico 2-O⁻ y la carga negativa que aparece al formarse el carbanión del α -aminoácido estabilizado por piridoxal. Por ejemplo, la protonación del grupo 2-O⁻ en el DPL da lugar a una disminución de 100 veces en la constante de velocidad de segundo orden para la desprotonación del ion iminio de la glicina por el anión acetato.¹⁷¹

La pequeña diferencia de 0,6 veces en la estabilidad de los iones iminio del 4-piridin carboxaldehído comparado con el benzaldehído (tabla 4.3) y la actividad similar de la cetona aromática fenilglioxilato y DPL en la catálisis de la desprotonación del zwitterión de la glicina¹⁷² sugieren que el nitrógeno del anillo de la piridina no tiene una gran contribución en la actividad del PLP como catalizador de la desprotonación de aminoácidos. Sin embargo, hay evidencias de que las enzimas que usan el PLP controlan el estado de protonación del cofactor en el anillo de piridina, para dirigir la evolución del intermedio carbaniónico unido al enzima.¹⁷³ El anillo neutro de piridina favorece la protonación del carbanión en el átomo de carbono en posición α del aminoácido, mientras que la protonación del nitrógeno piridínico favorece la

¹⁷¹ Toth, K.; Richard, J. P. **2007** *J. Am. Chem. Soc.*, 129: 3013-3021.

¹⁷² Crugeiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Amyes, T. L.; Richard, J. P. **2008**, *J. Am. Chem. Soc.* 130: 2041–2050.

¹⁷³ Toney, M. D. **2005** *Arch. Biochem. Biophys.*, 433: 279-287.

delocalización de la carga negativa hacia el carbono en posición α al anillo de piridina, necesaria para la catálisis de la reacción de 1,3-isomerización por transaminasas. Finalmente, sugerimos que un papel importante del grupo fosfato del cofactor PLP es el de proporcionar energía de unión,¹⁷⁴ que puede ser utilizada para la estabilización del carbanión en posición α al grupo imino en reacciones catalizadas por enzimas dependientes de PLP.

¹⁷⁴ Morrow, J. R.; Amyes, T. L.; Richard, J. P. **2008**, *Acc. Chem. Res.* 41: 539–548.

CAPITULO 5

5. Efecto de los Sustituyentes en la Catálisis Electrofila por el Grupo Carbonilo: Descripción del Aumento de Velocidad en la Desprotonación de la Glicina catalizada por PLP.

5.1 Introducción

Durante los últimos 15 años nuestro grupo de investigación ha trabajado en la caracterización de las barreras cinética y termodinámica para la desprotonación del carbono en posición α al grupo amino de aminoácidos^{175,176} (figura 5.1) y péptidos¹⁷⁷ en disolución acuosa y en el análisis del mecanismo que emplean las enzimas para disminuir estas barreras en la catálisis de la desprotonación de aminoácidos.^{176,178} La selección natural de pequeñas moléculas como catalizadores ha visto la evolución del piridoxal 5'-fosfato como cofactor de un gran número de enzimas^{179,180,181,182,183} que catalizan la desprotonación del carbono en posición α al grupo amino de aminoácidos como primera etapa de reacciones más complejas. Estas reacciones enzimáticas incluyen la racemización^{184,185,186} y descarboxilación^{187,188,189,190,191,192} del

¹⁷⁵ Rios, A.; Richard, J. P.; **1997** *J. Am. Chem. Soc.* 119: 8375-8376.

¹⁷⁶ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

¹⁷⁷ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2002** *J. Am. Chem. Soc.* 124: 8251-8259.

¹⁷⁸ Richard, J. P.; Amyes, T. L. **2004** *Bioorg. Chem.*, 32: 354-366.

¹⁷⁹ Toney, M. D. **2005** *Arch. Biochem. Biophys.*, 433: 279-287.

¹⁸⁰ John, R. A. **1995**, *Biochim. Biophys. Acta* 1248: 81-96.

¹⁸¹ Jansonius, J. N. **1998**, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 759-769.

¹⁸² Eliot, A. C.; Kirsch, J. F. **2004**, *Annu. Rev. Biochem.* 73: 383-415.

¹⁸³ Christen, P.; Mehta, P. K. **2001**, *Chem. Rec.* 1: 436-447.

¹⁸⁴ Sun, S.; Toney, M. D. **1999**, *Biochemistry* 38: 4058-65.

¹⁸⁵ Watanabe, A.; Yoshimura, T.; Mikami, B.; Hayashi, H.; Kagamiyama, H.; Esak, N. **2002**, *J. Biol. Chem.* 277: 19166-19172.

¹⁸⁶ Major, D. T.; Gao, J. **2006**, *J. Am. Chem. Soc.* 128: 16345-16357.

¹⁸⁷ Zhou, X.; Toney, M. D. **1999**, *Biochemistry* 38: 311-320.

¹⁸⁸ Zhou, X.; Jin, X.; Medhekar, R.; Chen, X.; Dieckmann, T.; Toney, M. D. **2001**, *Biochemistry* 40: 1367-1377.

aminoácido, la transaminación para formar un α -cetoácido y piridoxamina 5'fosfato^{193,194,195,196}, la sustitución de un buen grupo saliente en la posición β al grupo amino a través de la eliminación del grupo saliente de un carbanión estabilizado por el piridoxal para formar un alqueno activado, que sufre la adición de un segundo nucleófilo^{197,198}, y la adición aldólica del carbanión estabilizado por piridoxal al formaldehído¹⁹⁹ o acetaldehído²⁰⁰.

Los primeros estudios realizados en nuestro grupo de investigación sobre la catálisis de la desprotonación de aminoácidos se centraron en determinar el efecto de la presencia de grupos alquilo en el nitrógeno del grupo amino y en el oxígeno del carboxilato sobre la acidez del carbono alfa de la glicina^{201,202} (figura 5.1). El siguiente paso consistió en examinar la catálisis electrófila de la desprotonación de la glicina metil éster por acetona (**1**, figura

¹⁸⁹ Jackson, L. K.; Brooks, H. B.; Osterman, A. L.; Goldsmith, E. J.; Phillips, M. A. **2000**, *Biochemistry* 39: 11247-11257.

¹⁹⁰ Jackson, L. K.; Brooks, H. B.; Myers, D. P.; Phillips, M. A. **2003**, *Biochemistry* 42: 2933-2940.

¹⁹¹ Fogle, E. J.; Liu, W.; Woon, S.-T.; Keller, J. W.; Toney, M. D. **2005**, *Biochemistry* 44: 16392-16404.

¹⁹² Lin, Y.-L.; Gao, J. **2010**, *Biochemistry* 49: 84-94.

¹⁹³ Kirsch, J. F.; Eichele, G.; Ford, G. C.; Vincent, M. G.; Jansonius, J. N.; Gehring, H.; Christen, P. **1984**, *J. Mol. Biol.* 174: 497-525.

¹⁹⁴ Hayashi, H.; Kagamiyama, H. **1997**, *Biochemistry* 36: 13558-13569.

¹⁹⁵ Hayashi, H.; Mizuguchi, H.; Miyahara, I.; Islam, M. M.; Ikushiro, H.; Nakajima, Y.; Hirotsu, K.; Kagamiyama, H. **2003**, *Biochim. Biophys. Acta* 1647: 103-109.

¹⁹⁶ Liu, W.; Peterson, P. E.; Langston, J. A.; Jin, X.; Zhou, X.; Fisher, A. J.; Toney, M. D. **2005**, *Biochemistry* 44: 2982-2992.

¹⁹⁷ Miles, E. W. **2001**, *Chem. Rec.* 1: 140-151.

¹⁹⁸ Dunn, M. F.; Niks, D.; Ngo, H.; Barends, T. R. M.; Schlichting, I. **2008**, *Trends Biochem. Sci.* 33: 254-264.

¹⁹⁹ Schirch, V.; Szebenyi, D. M. E. *Curr. Opin.* **2005**, *Chem. Biol.* 9: 482-487.

²⁰⁰ Paiardini, A.; Contestabile, R.; D'Aguzzo, S.; Pascarella, S.; Bossa, F. **2003**, *Biochim. Biophys. Acta* 1647: 214-219.

²⁰¹ Rios, A.; Richard, J. P.; **1997** *J. Am. Chem. Soc.* 119: 8375-8376.

²⁰² Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

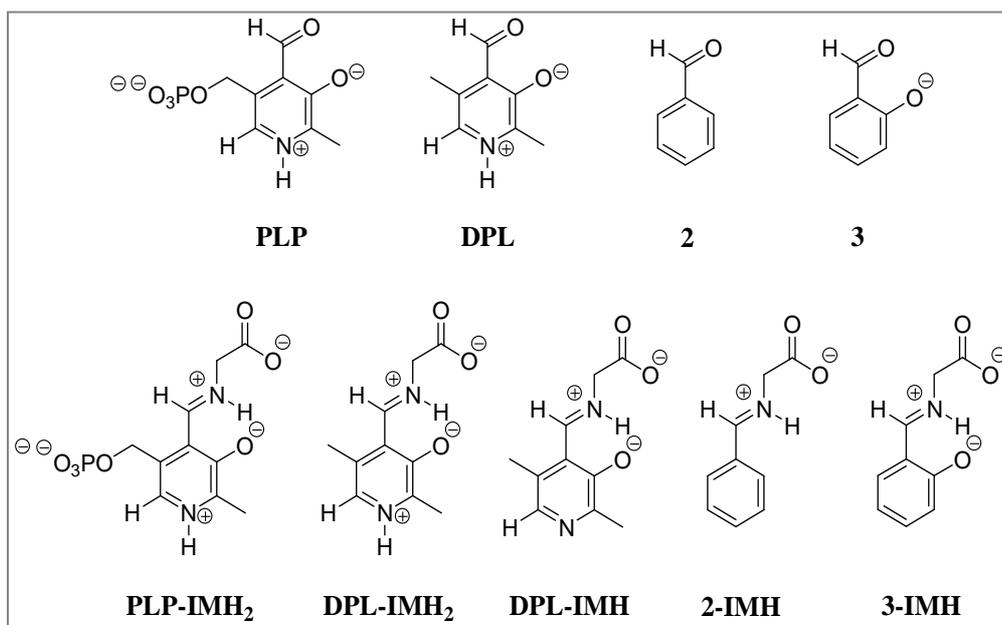


Figura 5.2 Aldehídos utilizados como catalizadores en el estudio de la desprotonación del carbono en posición α al grupo amino de la glicina; **PLP**: piridoxal 5'fosfato; **DPL**: 5' deoxipiridoxal; **2**: benzaldehído; **3**: salicilaldehído. **PLP-IMH₂**; **DPL-IMH₂**; **DPL-IMH**, **2-IMH**; y **3-IMH**, son los iones iminio formados por la adición del zwitterión glicina a los aldehídos anteriores.

La catálisis efectiva por acetona de la desprotonación del carbono en posición α al grupo amino de la glicina²⁰⁶ muestra que el grupo carbonilo del PLP es la fuente esencial de su poder catalítico. La catálisis por el grupo carbonilo es asistida por otros grupos funcionales del cofactor, y los más importantes son el nitrógeno piridínico y el sustituyente 2-O⁻ en el anillo de piridina. Se ha especulado mucho sobre el papel que desempeñan estos sustituyentes en la catálisis de la desprotonación del carbono en posición α al grupo amino²⁰⁷, pero la función de los distintos sustituyentes no ha sido

²⁰⁶ Crueiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Amyes, T. L.; Richard, J. P. **2008**, *J. Am. Chem. Soc.* 130: 2041–2050.

²⁰⁷ Jencks, W. P.; **1987**. *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. Dover Mineola, New York.

evaluada de forma rigurosa. La comprensión de los efectos de estos sustituyentes proporcionará una asistencia importante para el desarrollo de moléculas pequeñas como catalizadores efectivos de estas reacciones²⁰⁸, y al mismo tiempo permitirá avanzar en el entendimiento del mecanismo de acción de las enzimas que utilizan el **PLP** como cofactor.²⁰⁹

El grupo 5'fosfato del **PLP** no parece activar de manera importante al cofactor para la desprotonación de α -aminoácidos. El papel más probable de este grupo funcional es el de proporcionar energía de enlace para la estabilización del complejo de Michaelis y de los estados de transición de aquellas reacciones en las cuales el **PLP** participa como cofactor.^{210,211,212} La estabilización del carbanión del α -aminoácido por delocalización de la carga negativa en el nitrógeno del catión piridinio de **DPL-IMH₂** debería ser mucho mayor que la obtenida por delocalización en el nitrógeno neutro del anillo de piridina de **DPL-IMH** o en el anillo fenílico de **3-IMH**. Sin embargo, el carbanión del aminoácido está ya ampliamente delocalizado lo que debería dar lugar a una atenuación del efecto del nitrógeno catiónico del anillo de piridina sobre la estabilidad del carbanión.²¹³ En este capítulo se recogen los resultados de los experimentos que permiten comparar las actividades del **DPL** y del salicilaldehído (**3**) como catalizadores de la desprotonación de la glicina.

El sustituyente 2-O⁻ del **DLP** y del salicilaldehído, activa estos aldehídos para la catálisis mediante la estabilización de los iones iminio de la

²⁰⁸ Felten, A. E.; Zhu, G.; Aron, Z. D. **2010**, *Org. Lett.* 12: 1916-1919.

²⁰⁹ Toney, M. D. **2005** *Arch. Biochem. Biophys.*, 433: 279-287.

²¹⁰ Morrow, J. R.; Amyes, T. L.; Richard, J. P. **2008**, *Acc. Chem. Res.* 41: 539-548.

²¹¹ Denesyuk, A. I.; Denessiouk, K. A.; Korpela, T.; Johnson, M. S. **2002**, *J. Mol. Biol.* 316: 155-172.

²¹² Richard, J. P.; Amyes, T. L.; Crueiras, J.; Rios, A. **2009**, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13: 1-9.

²¹³ Bordwell, F. G.; Fried, H. E. **1981**, *J. Org. Chem.* 46: 4327-4331.

glicina, **DPL-IMH₂** y **3-IMH**, por la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular con el nitrógeno del grupo imino.²¹⁴ Este efecto está probablemente atenuado, ya que la transferencia protónica parcial desde el nitrógeno catiónico al oxígeno da lugar a una disminución en la carga sobre el nitrógeno y por lo tanto a una reducción en la estabilización electrostática del carbanión del α -aminoácido. Se presentan en este capítulo los resultados de un estudio de la desprotonación de la glicina catalizada por los aldehídos **2** y **3** que define la contribución de este sustituyente 2-O⁻ a la catálisis de la desprotonación de la glicina por **DPL**.

5.2 Sección Experimental

5.2.1 Materiales. La glicina y el salicilaldehído fueron adquiridos a la compañía Fluka, mientras que el benzaldehído, el 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), el 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), el ácido clorhídrico deuterado (37 wt %, 99,5% D), el deuteróxido potásico (40 wt %, 98+% D), el agua deuterada (99,9% D), y la acetona-d₆ (99,9 atom % D) se compraron a Aldrich. Todas las demás sustancias, tanto orgánicas como inorgánicas, eran grado reactivo y se utilizaron sin ningún tipo de purificación adicional.

5.2.2 Métodos generales. Los protones ácidos de la glicina, K₂HPO₄ y KH₂PO₄, se intercambiaron por deuterio²¹⁵ antes de preparar disoluciones de estos compuestos en D₂O. El salicilaldehído, HFIP y TFE se disolvieron directamente en D₂O, lo que dio lugar a un aumento inferior al 1% en el contenido de protio del disolvente.

²¹⁴ Crugeiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Richard, J. P. **2009**, *J. Am. Chem. Soc.* 131: 15815-15824.

²¹⁵ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

Los tampones de fosfato se prepararon mezclando disoluciones stock de K_2DPO_4 y KD_2PO_4 en D_2O a $I = 1,0$ (KCl) para dar la relación ácido/base deseada. Los tampones de pirofosfato y carbonato se prepararon disolviendo la forma básica del tampón en D_2O que contenía la cantidad de KCl necesaria para que la fuerza iónica fuese la unidad, seguida de la adición de DCl hasta dar la relación ácido/base deseada. Los tampones de HFIP, y TFE se prepararon disolviendo la forma ácida y la cantidad adecuada de KCl en D_2O seguido de la adición de KOD para dar la relación ácido/base deseada a $I = 1,0$ (KCl).

Los valores de pD se determinaron a 25 °C usando un pHmetro modelo Orion 350 equipado con un electrodo Radiometer pHC4006-9. Los valores de pD se obtuvieron añadiendo 0,4 unidades al valor de pH observado en el pHmetro.²¹⁶ La concentración de ión deuteróxido a cualquier pD fue calculada usando la ecuación 5.1, donde $K_w = 10^{-14,87}$ es el producto iónico del agua deuterada a 25 °C y $\gamma_{OL} = 0,78$ es el coeficiente de actividad aparente del ión lióxido en las condiciones experimentales.²¹⁷

$$[DO^-] = \frac{10^{pD-pK_w}}{\gamma_{OL}} \quad (5.1)$$

5.2.3 Análisis espectroscópico RMN 1H . Los espectros de RMN 1H a 500 MHz fueron registrados en D_2O utilizando un espectrómetro Bruker AMX500^{217,218}. En todos los casos, el tiempo de relajación entre pulsos fue al menos 10 veces superior al tiempo de relajación más lento de los protones de interés. Los espectros fueron obtenidos con un ancho de barrido de 2600 Hz,

²¹⁶ Glasoe, P. K.; Long, F. A. **1960** *J. Phys. Chem.*, 64: 188-190.

²¹⁷ Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **1996** *J. Am. Chem. Soc.* 118: 3129-3141.

²¹⁸ Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **1992** *J. Am. Chem. Soc.* 114: 10297-10302.

un ángulo de pulso de 90°, y un tiempo de adquisición de 6 s. Las líneas base fueron corregidas antes de la integración de los picos. Los desplazamientos químicos de las señales se referenciaron con respecto a la señal de $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ a 2,94 ppm.

5.2.4 Determinación de las constantes de equilibrio. La posición del equilibrio para la adición de glicina a la acetona para formar la imina correspondiente a 25 °C en D_2O y $I = 1,0$ (KCl) se determinó por espectroscopía RMN ^1H ,^{219,220} monitorizando la formación de la imina en disoluciones que contenían 0,1 M de glicina y 1,0 M de acetona a $I = 1,0$ (KCl). El valor del pD se mantuvo constante añadiendo 0,10 M de las siguientes disoluciones tampón: fosfato, pD 6,1 – 8,0; pirofosfato, pD 8,6 – 9,5; carbonato, pD 10,0 – 11,1; y TFE, pD 12,0 – 13,0.

Los valores de la constante de equilibrio observada $(K_{\text{add}})_{\text{obsd}}$ para la formación de la imina se determinaron a partir de la relación de las áreas integradas de las señales de los protones metileno de la imina ($A_{\text{CH}_2}^{1\text{-IM}}$) y de la glicina ($A_{\text{CH}_2}^{\text{Gly}}$) de acuerdo con la ecuación 5.2, donde $[\mathbf{1-IM}]_e$ y $[\text{Gly}]_e$ son las concentraciones totales en el equilibrio de la imina y de la glicina, respectivamente. La relación de concentraciones de equilibrio se determinó entre 1 y 2 horas después de la mezcla de los reactivos, excepto a pD mayor que 8, donde se esperó 24 horas para asegurar que se alcanzara el equilibrio químico. A pD = 13 se produjo la incorporación de deuterio en la glicina catalizada por acetona durante este período de espera. Sin embargo, el análisis

²¹⁹ Crugeiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Amyes, T. L.; Richard, J. P. **2008**, *J. Am. Chem. Soc.* 130: 2041–2050.

²²⁰ Crugeiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Richard, J. P. **2009**, *J. Am. Chem. Soc.* 131: 15815–15824.

de RMN ^1H mostró el mismo enriquecimiento de deuterio en los grupos metileno de la glicina y de su imina dentro del error experimental. Así pues, la relación de las concentraciones de equilibrio del aducto imina y de la glicina en estas condiciones se calculó como la relación de la suma de las áreas de los picos debidos a los grupos $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CHD}-$.

$$(K_{\text{add}})_{\text{obsd}} = \frac{[\mathbf{1} - \text{IM}]_e}{[\text{Gly}]_e[\text{Acetona}]} = \frac{A_{\text{CH}_2}^{\mathbf{1-IM}}}{A_{\text{CH}_2}^{\text{Gly}}[\text{Acetona}]} \quad (5.2)$$

5.2.5 Medidas cinéticas. Todas las reacciones se llevaron a cabo en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$ y $I = 1,0$ (KCl). Las reacciones de intercambio por deuterio de la glicina en presencia de acetona o **3** se iniciaron mezclando disoluciones del ácido de carbono, el catalizador y el tampón al mismo valor de pD y $I = 1,0$ (KCl). La concentración final del aminoácido estuvo comprendida entre 5 y 15 mM. Las reacciones de intercambio por deuterio de la glicina en presencia de **2** en disoluciones alcalinas de D_2O , se iniciaron mezclando las disoluciones del ácido de carbono, **2**, y KOD a la misma fuerza iónica ($I = 1,0$ (KCl)) hasta obtener una concentración final de glicina de 5 mM.

El intercambio por deuterio del primer protón del grupo metileno de la glicina fue seguido por espectroscopía RMN ^1H a 500 MHz, monitorizando la desaparición del singlete debido al grupo $-\text{CH}_2-$ del aminoácido y la aparición de un triplete a campo más alto debido al grupo $-\text{CHD}-$ del producto monodeuterado.^{221,222,223} El progreso de la reacción, R , se calculó

²²¹ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

²²² Rios, A.; Crueiras, J.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2001** *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7949-7950.

²²³ Crueiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Amyes, T. L.; Richard, J. P. **2008**, *J. Am. Chem. Soc.* 130: 2041-2050.

utilizando la ecuación 5.3, donde A_{CH_2} y A_{CHD} son las áreas integradas de los picos de los grupos $\alpha\text{-CH}_2$ y $\alpha\text{-CHD}$, respectivamente. Las reacciones en presencia de acetona, **2** y **3** se siguieron durante el intercambio por deuterio de un 20 – 30 %, 40 – 90 % y 60 – 90 %, respectivamente, del primer protón del grupo metileno del sustrato. En todos los casos se observó una mezcla en equilibrio de la glicina y la correspondiente imina con anterioridad a la formación de una cantidad significativa de glicina deuterada.

$$R = \frac{A_{\text{CH}_2}}{A_{\text{CH}_2} + A_{\text{CHD}}} \quad (5.3)$$

$$\ln R = -k_{\text{obsd}} t \quad (5.4)$$

Las representaciones semilogarítmicas del progreso de la reacción, R , frente al tiempo de acuerdo con la ecuación 5.4, fueron lineales, con pendientes negativas iguales a k_{obsd} , que es la constante de velocidad de primer orden para el intercambio de un único protón del grupo metileno del sustrato. Los valores de la constante de velocidad de primer orden para el intercambio del primer protón del grupo metileno para dar el producto monodeuterado, k_{ex} , se calcularon como $k_{\text{ex}} = 2 k_{\text{obsd}}$.

5.3 Resultados

5.3.1 Constantes de equilibrio para la formación de iminas. La figura 5.1 muestra la variación con el pD del desplazamiento químico de la señal de los hidrógenos del grupo metileno $(\delta_{\text{CH}_2})_{\text{obsd}}^{\text{1-IM}}$ de la mezcla de **1-IM** y **1-IM-D** (figura 5.3) que se forma en D_2O por reacción de 0,1 M de glicina y 1

M de acetona a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl). El cambio observado en el desplazamiento químico del grupo α -CH₂ se debe al cambio en el estado de protonación del nitrógeno de la imina. La línea mostrada en la figura 5.4 corresponde al ajuste no lineal por mínimos cuadrados de los datos experimentales a la ecuación 5.5, obtenida para el esquema de la figura 5.3, donde (a) $\delta_{\text{CH}_2}^{\text{1-IM-D}} = 4,05$ ppm y $\delta_{\text{CH}_2}^{\text{1-IM}} = 3,69$ ppm son los desplazamientos químicos del grupo metileno observados en el límite de pD bajo y alto, respectivamente, y (b) el valor de la constante de acidez $(K_a)_{\text{1-IM-D}} = 10^{-9,64}$ se determinó tratando esta constante como parámetro variable del ajuste.

$$(\delta_{\text{CH}_2})_{\text{obsd}}^{\text{1-IM}} = \frac{\delta_{\text{CH}_2}^{\text{1-IM}}(K_a)_{\text{1-IM-D}} + \delta_{\text{CH}_2}^{\text{1-IM-D}}a_{\text{D}}}{((K_a)_{\text{1-IM-D}} + a_{\text{D}})} \quad (5.5)$$

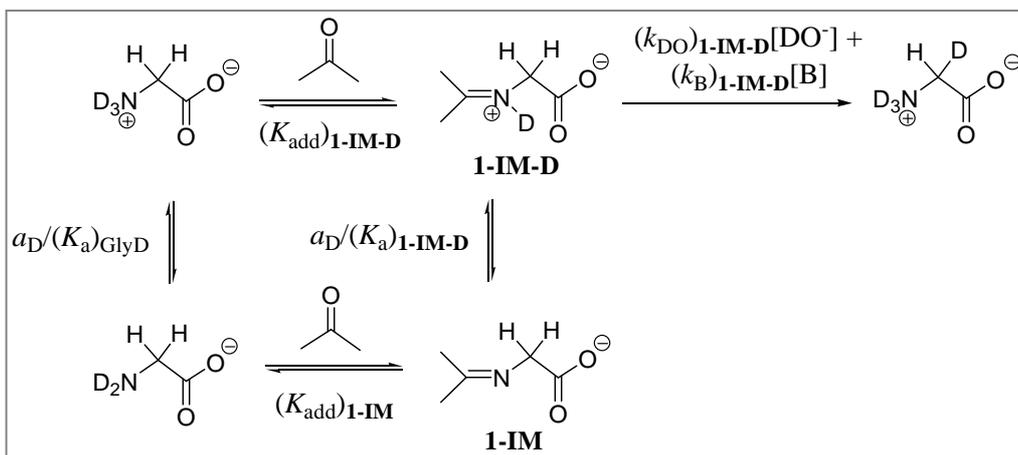


Figura 5.3 Esquema del equilibrio de formación del ión iminio / imina por condensación de la glicina con acetona, y reacción de intercambio por deuterio de un protón en posición α al ión iminio en **1-IM-D**.

Los valores de la constante de equilibrio aparente $(K_{\text{add}})_{\text{obsd}}$ para la adición de la glicina a la acetona para formar la correspondiente imina en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$ fueron determinados por análisis de RMN ^1H , como fue descrito en la sección experimental. La variación con el valor del pD del $\log (K_{\text{add}})_{\text{obsd}}$ para la adición de la glicina a la acetona se muestra en la figura 5.5. La línea muestra el ajuste de los datos a la ecuación 5.6, obtenida para el esquema de la figura 5.3, donde $(K_{\text{a}})_{\text{GlyD}} = 3,5 \times 10^{-11} \text{ M}$, $(K_{\text{a}})_{\mathbf{1-IM-D}} = 2,3 \times 10^{-10} \text{ M}$ (Tabla 5.1) y el valor de $(K_{\text{add}})_{\mathbf{1-IM-D}} = 0,0056 \text{ M}^{-1}$ para la formación de **1-IM-D** se determinó tratando esta constante como un parámetro variable.

$$(K_{\text{add}})_{\text{obsd}} = (K_{\text{add}})_{\mathbf{1-IM-D}} \left(\frac{a_{\text{D}} + (K_{\text{a}})_{\mathbf{1-IM-D}}}{a_{\text{D}} + (K_{\text{a}})_{\text{GlyD}}} \right) \quad (5.6)$$

Tabla 5.1 Constantes de equilibrio para la adición de la glicina a la acetona en D_2O .^a

Forma iónica glicina	Imina	$\text{p}(K_{\text{a}})_{\text{Gly}}$ ^b	$\text{p}(K_{\text{a}})_{\mathbf{X-IM-D}}$ ^c	K_{add} ^d (M^{-1})
$^+\text{D}_3\text{NCH}_2\text{COO}^-$	1-IMD	$10,44 \pm 0,03$	$9,64 \pm 0,03$	$(5,6 \pm 0,1) \times 10^{-3}$
$\text{D}_2\text{NCH}_2\text{COO}^-$	1-IM			$(3,5 \pm 0,5) \times 10^{-2}$

^a A $25\text{ }^\circ\text{C}$ y $I = 1,0$ (KCl). ^b Constante de acidez del aminoácido en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$ y $I = 1,0$ (KCl) determinada mediante valoración por espectroscopía RMN ^1H . ^c Constante de acidez aparente en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$ y $I = 1,0$ (KCl), determinada mediante valoración por espectroscopía RMN ^1H como se describe en el texto. ^d Constante de equilibrio para la adición del aminoácido a la acetona para formar la correspondiente imina.

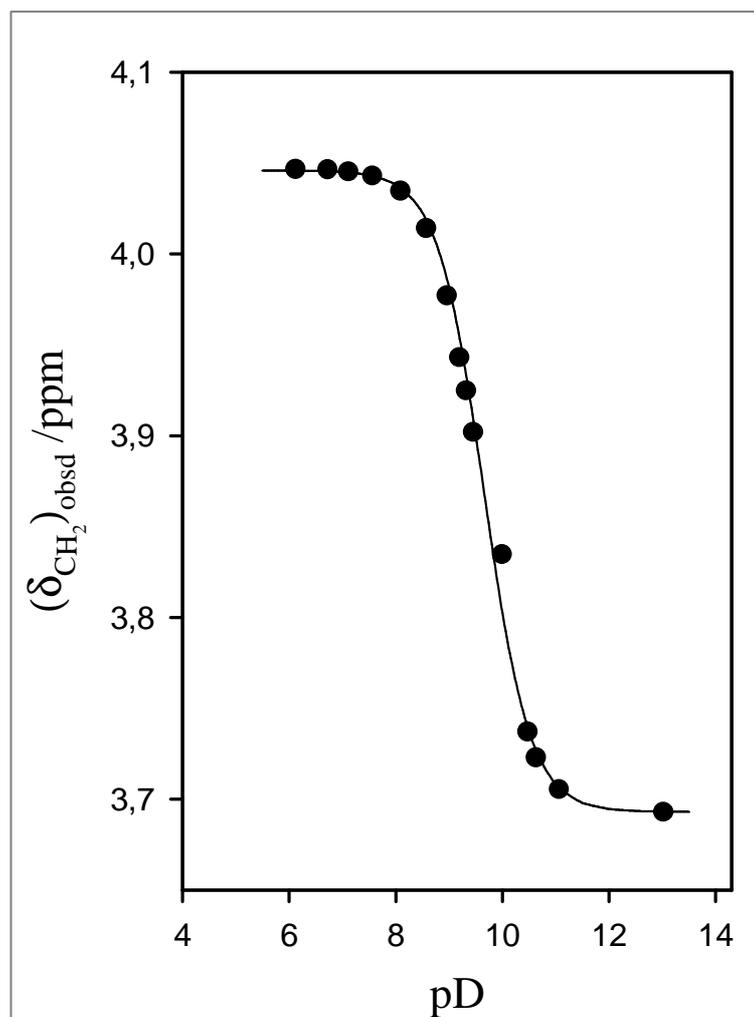


Figura 5.4 Variación con el valor del pD del desplazamiento químico $[(\delta_{\text{CH}_2})_{\text{obsd}} (\text{ppm})]$ de los hidrógenos del grupo $-\text{CH}_2-$ de la imina formada en D_2O con 0,1 M de glicina y 1 M de acetona a 25 °C and $I = 1.0$ (KCl). La línea muestra el ajuste de los datos experimentales a la ecuación 5.5.

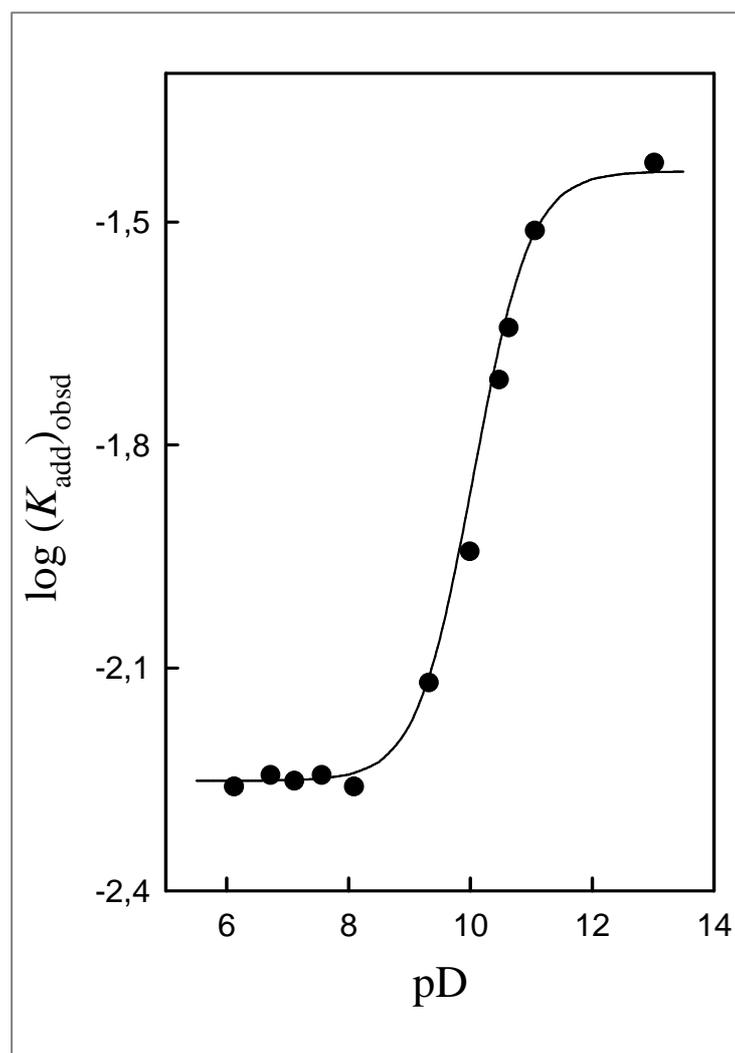


Figura 5.5 Influencia del pD sobre $(K_{\text{add}})_{\text{obsd}}$ para la conversión de la glicina en la imina de la acetona en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$ y $I = 1.0$ (KCl). La línea se obtuvo utilizando la ecuación 5.6 y las constantes de equilibrio de la Tabla 5.1.

5.3.2 Reacciones de intercambio por deuterio

5.3.2.1 Catálisis por acetona. El intercambio por deuterio del primer protón en posición α al grupo amino de la glicina en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$ y $I = 1,0$ (KCl) fue monitorizado por espectroscopía RMN ^1H (500 MHz) de la forma descrita en la sección experimental.^{224,225} Los valores de la constante de velocidad de primer orden observada, k_{ex} , para el intercambio por deuterio, a varias concentraciones de acetona y tampón HFIP a pD 9,3; 9,9; y 10,5 se recogen en la tabla C1 del apéndice. La figura 5.6 muestra la influencia de la concentración del tampón HFIP (50 % base libre) sobre el valor de k_{ex} a diferentes concentraciones fijas de acetona. Las ordenadas en el origen de estas correlaciones lineales son las constantes de velocidad de primer orden $k_o = k_w f_{\mathbf{1-IM-D}}$ (tabla 5.2), para la reacción de intercambio por deuterio catalizada por el disolvente a una concentración dada de acetona donde $f_{\mathbf{1-IM-D}}$ es la fracción de glicina presente como el ión iminio **1-IM-D** (ecuación 5.7, obtenida a partir del esquema de la figura 5.3 suponiendo que la concentración de la imina/ión iminio es despreciable, puesto que sólo el 1% de la glicina se convierte en aducto imina/ión iminio en presencia de 0,5 M de acetona a pD 10,5) y k_w es la constante de velocidad aparente de primer orden para la reacción catalizada por el disolvente. Los valores de k_w calculados como $k_w = k_o / f_{\mathbf{1-IM-D}}$, se recogen en la tabla 5.2, para reacciones a diferentes concentraciones de acetona.

²²⁴ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

²²⁵ Crugeiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Amyes, T. L.; Richard, J. P. **2008**, *J. Am. Chem. Soc.* 130: 2041-2050.

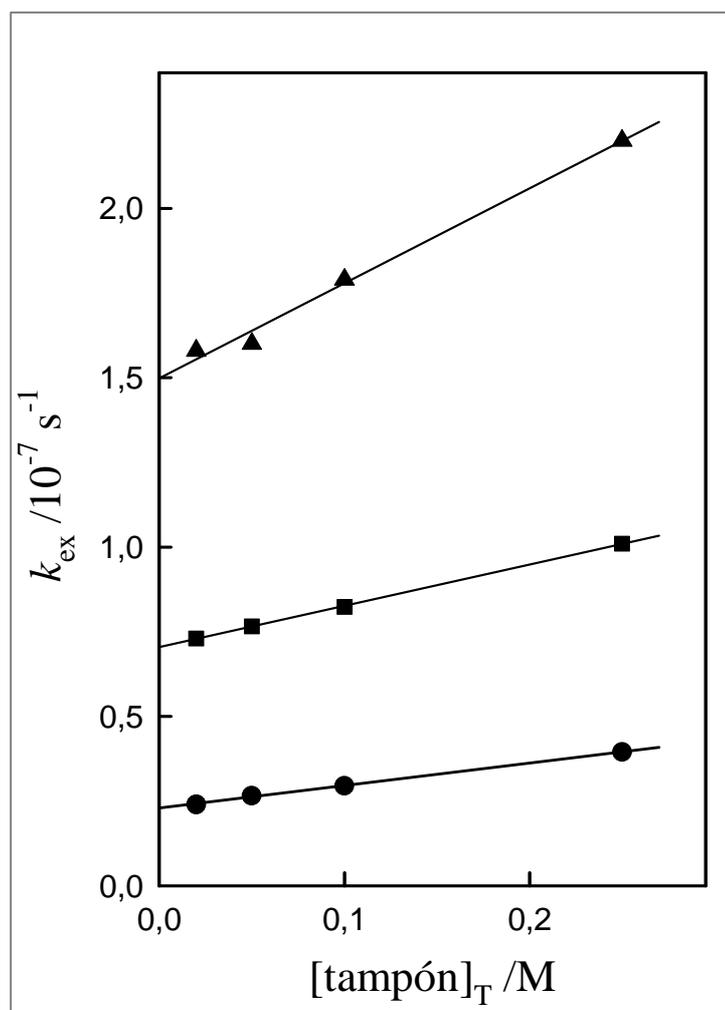


Figura 5.6 Influencia de la concentración total de tampón de HFIP sobre k_{ex} (s^{-1}) para el intercambio del primer protón del grupo metileno de la glicina en presencia de acetona a pD 9,98 ($[RO^-] / [ROH] = 1,0$) en D_2O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl). (●) 0,10 M de acetona; (■) 0,25 M de acetona; (▲) 0,50 M de acetona.

$$f_{\mathbf{1-IM-D}} = \frac{(K_{\text{add}})_{\mathbf{1-IM-D}}[\text{acetona}]}{\left(1 + \frac{(K_a)_{\text{GlyD}}}{a_{\text{D}}}\right)} \quad (5.7)$$

Los datos experimentales para las reacciones en presencia de tampones de HFIP al 20 y 80% de base libre se analizan de modo similar (tabla C1), obteniendo un valor de $k_w = 1,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y $k_w = 2,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para la desprotonación del ión iminio a pD 9,27 y 10,48, respectivamente. El perfil de velocidad ($\log k_w$) frente a pD para la desprotonación de **1-IM-D** en D₂O se puede ver en la figura 5.7 (▼). La línea de pendiente unidad muestra el ajuste por mínimos cuadrados de los datos a la ecuación 5.8, utilizando $(k_{\text{DO}})_{\mathbf{1-IM-D}} = 4,2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la desprotonación de **1-IM-D** por DO⁻ (figura 5.3), donde $K_w = 10^{-14,87} \text{ M}^2$ es el producto iónico del agua deuterada a 25 °C y $\gamma_{\text{OL}} = 0,78$ es el coeficiente de actividad aparente del ión lioxido bajo nuestras condiciones experimentales.

$$\log k_w = \log\left(\frac{k_{\text{DO}} K_w}{\gamma_{\text{OL}}}\right) + \text{pD} \quad (5.8)$$

Las pendientes de las correlaciones lineales de la figura 5.6 son iguales a $(k_{\text{buf}})_{\text{obsd}} = (k_{\text{B}})_{\mathbf{1-IM-D}} f_{\text{B}} f_{\mathbf{1-IM-D}}$ para la reacción de intercambio por deuterio catalizada por tampón a una concentración dada de acetona, donde $(k_{\text{B}})_{\mathbf{1-IM-D}}$ es la constante de velocidad de segundo orden para la desprotonación de **1-IM-D** por la base del tampón (figura 5.3) y f_{B} es la fracción del catalizador en su forma básica. Los valores de k_{B} recogidos en la tabla 5.2 fueron calculados a partir de los valores de $(k_{\text{buf}})_{\text{obsd}}$ utilizando los valores apropiados de f_{B} y $f_{\mathbf{1-IM-D}}$. La media de los valores de k_{B} determinados a diferentes fracciones de base del

tampón proporciona un valor de $(k_B)_{1-IM-D} = 2,4 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la desprotonación de **1-IM-D** por la forma básica de HFIP (figura 5.3).

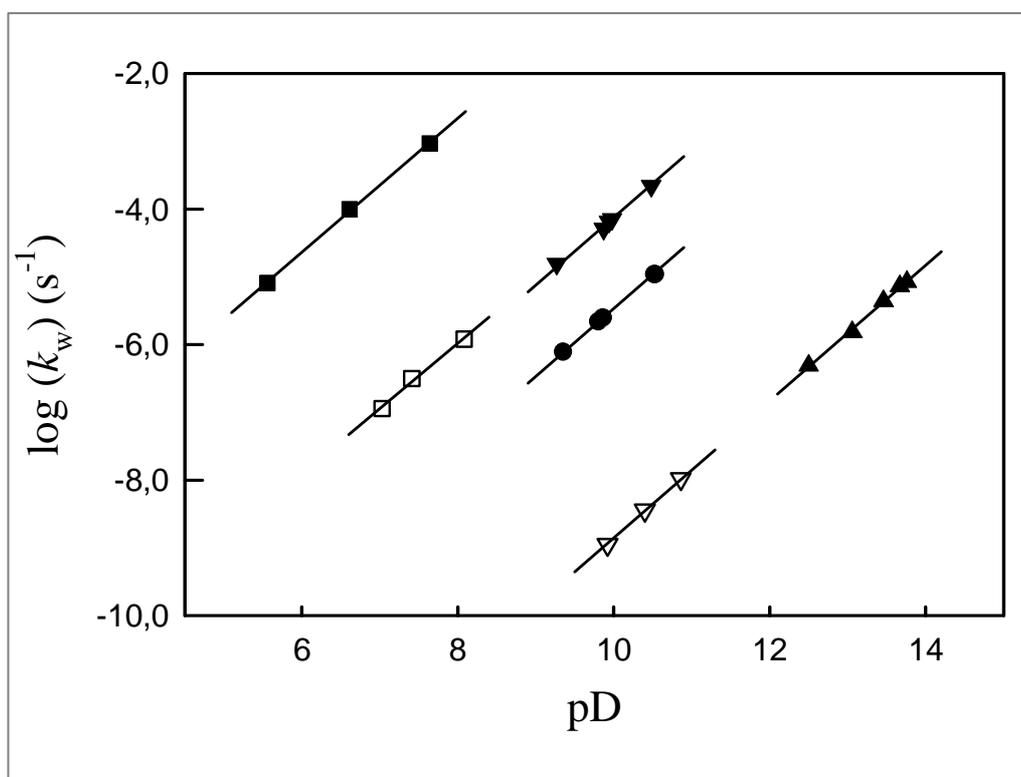


Figura 5.7 Representación de $\log k_w$ (s^{-1}) frente al pD para el intercambio por deuterio del primer hidrógeno del grupo metileno de: (\blacktriangledown) **1-IM-D**; (\blacktriangle) **2-IM**; (\bullet) **3-IM-D**; (∇) glicina N protonada²²⁶; (\square) glicina metil éster N protonada; (\blacksquare) el ión iminio formado a partir de la glicina metil éster y la acetona.^{227,228}

²²⁶ Crugeiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Amyes, T. L.; Richard, J. P. **2008**, *J. Am. Chem. Soc.* 130: 2041–2050.

²²⁷ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

²²⁸ Rios, A.; Crugeiras, J.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2001** *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7949-7950.

Tabla 5.2. Constantes de velocidad para el intercambio del primer proton del grupo metileno de la glicina en presencia de acetona y tampones de HFIP en D₂O ^a

Base	f_B^c	pD	[acetona] / M	f_{1-IM-D}^d	$k_o / s^{-1} e$	$k_w / s^{-1} f$	$(k_{\text{buf}})_{\text{obsd}} / M^{-1} s^{-1} g$	$k_B / M^{-1} s^{-1} h$
HFIP	0,8	10,48	0,25	$6,8 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-7}$	$2,2 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-7}$	$2,4 \times 10^{-4}$
$pK_{BD} = 9,9^b$	0,5	9,87	0,10	$4,4 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^{-8}$	$5,1 \times 10^{-5}$	$6,6 \times 10^{-8}$	$3,0 \times 10^{-4}$
		9,94	0,25	$1,1 \times 10^{-3}$	$7,0 \times 10^{-8}$	$6,5 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^{-4}$
		9,98	0,50	$2,1 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-7}$	$7,1 \times 10^{-5}$	$2,8 \times 10^{-7}$	$2,6 \times 10^{-4}$
	0,2	9,27	0,25	$1,3 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-8}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$5,8 \times 10^{-8}$	$2,2 \times 10^{-4}$

^a A 25 °C y $I = 1.0$ (KCl). ^b Valor del pK_a aparente del ácido conjugado en D₂O a 25 °C y $I = 1.0$ (KCl). ^c Fracción del tampón presente en forma básica. ^d Fracción de la glicina presente en la forma reactiva de ión iminio **1-IM-D**, calculada utilizando la ecuación 5.7 y los valores de las constantes de equilibrio de la tabla 5.1. ^e Las ordenadas en el origen de la representación de k_{ex} frente a $[\text{tampón}]_T$ (Figura 5.6). ^f Constantes de velocidad aparentes de primer orden para la desprotonación de **1-IM-D** catalizada por el disolvente, calculadas a partir de los valores de k_o como se describió en el texto. ^g Las pendientes de las representaciones de k_{ex} frente a $[\text{tampón}]_T$ (Figure 5.6). ^h Constantes de velocidad de segundo orden para la desprotonación de **1-IM-D** catalizada por la base de HFIP, calculadas a partir de los valores de $(k_{\text{buf}})_{\text{obsd}}$ como se describió en el texto.

5.3.2.2 Catálisis por benzaldehído (2). El intercambio por deuterio del primer protón del grupo metileno de la glicina en presencia de **2** a varias concentraciones de ión deuteróxido en D₂O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl) fue seguido por espectroscopía RMN ¹H (500 MHz). La tabla C2 del apéndice recoge los valores de las constantes de velocidad de primer orden k_{ex} para la reacción de intercambio por deuterio y los valores de $f_{\mathbf{2-IM}}$, la fracción del aminoácido que se convierte en imina (figura 5.8) bajo las condiciones experimentales, determinados por análisis espectroscópico RMN ¹H de mezclas de glicina y **2** en D₂O²²⁹. Las constantes de velocidad para la desprotonación del aducto imina catalizada por el disolvente, $k_w = k_{\text{ex}} / f_{\mathbf{2-IM}}$, aumentan linealmente con la concentración de ión deuteróxido. La pendiente de esta correlación proporciona un valor de $((k_{\text{DO}})_{\mathbf{2-IM}} = 2,90 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$ para la constante de velocidad de segundo orden correspondiente a la desprotonación de **2-IM** catalizada por ión deuteróxido. La figura 5.7 (▲) muestra el perfil de $\log k_w$ frente a pD para la desprotonación de **2-IM** en D₂O. La línea de pendiente unidad muestra el ajuste de los datos a la ecuación 5.8 $((k_{\text{DO}})_{\mathbf{2-IM}} = 2,90 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$. No fue posible determinar el valor de la constante de velocidad de segundo orden para la desprotonación de **2-IM-D** por DO⁻ debido a que la reacción de intercambio por deuterio es demasiado lenta para ser monitorizada a valores de pD inferiores a 11, donde la concentración de **2-IM-D** empezaría a ser significativa.

²²⁹ Crugeiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Richard, J. P. **2009**, *J. Am. Chem. Soc.* 131: 15815-15824.

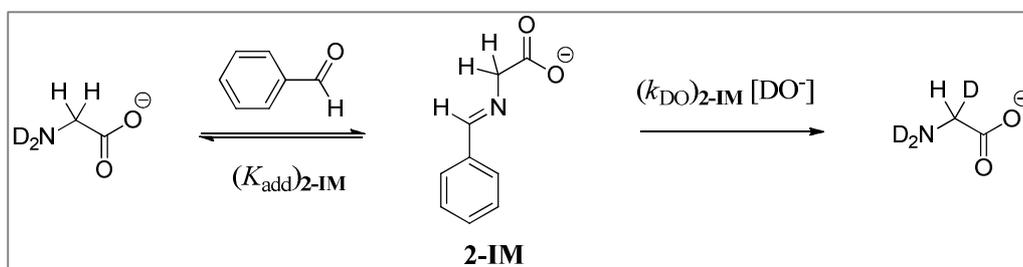


Figura 5.8 Equilibrio de adición de la glicina al benzaldehído y reacción de intercambio por deuterio de un protón en posición α al grupo imino de **2-IM**.

5.3.2.3 Catálisis por salicilaldehído (3). El intercambio por deuterio del primer protón del grupo metileno de la glicina en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$ y $I = 1,0$ (KCl) fue examinado en disoluciones tamponadas por HFIP (pD 9,3 – 10,5). Los valores de la constante de velocidad observada de primer orden, k_{ex} , para la reacción de intercambio por deuterio en presencia de varias concentraciones de **3** y HFIP a valores de pD 9,3; 9,8; y 10,5 se presentan en la tabla C3 del apéndice. En esta tabla se recogen también los valores de $f_{3\text{-IM-D}}$, fracción de la glicina total que se convierte en el ión iminio reactivo (figura 5.9) a cada concentración de **3** al valor de pD dado. Estos valores se determinaron como se explicó en apartados anteriores, por espectroscopía RMN ^1H de mezclas de glicina y **3**²³⁰. La dependencia lineal de k_{ex} con la concentración total del tampón HFIP (pD 9,8) para reacciones a dos concentraciones fijas de **3** se puede observar en la figura 5.10. Las ordenadas en el origen de estas representaciones lineales son las constantes de velocidad de primer orden $k_0 = k_w f_{3\text{-IM-D}}$ (tabla 5.3), para el intercambio catalizado por el disolvente al valor de pD indicado, donde k_w es la constante de velocidad aparente de primer orden para la reacción con el disolvente, y $f_{3\text{-IM-D}}$ es la fracción de glicina presente como el ión iminio **3-IM-D** (tabla C3). Los valores de k_w , calculados como k_w

²³⁰ Crugeiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Richard, J. P. **2009**, *J. Am. Chem. Soc.* 131: 15815-15824.

$= k_o / f_{\mathbf{3-IM-D}}$ para reacciones a dos concentraciones diferentes de **3** se recogen en la tabla 5.3. Un tratamiento análogo de los datos experimentales para las reacciones a valores de pD 10,5 y 9,3 (tabla 5.3) permite obtener los valores $k_w = 1,1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y $k_w = 7,8 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. La representación de k_w frente a la concentración de DO^- es lineal y su pendiente proporciona la constante de velocidad de segundo orden $(k_{\text{DO}})_{\mathbf{3-IM-D}} = 0,19 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la desprotonación de **3-IM-D** por el ión deuteróxido. La figura 5.7 (●) muestra la representación de $\log k_w$ frente al pD para la desprotonación de **3-IM-D** en D_2O . La línea de pendiente unidad trazada a través de los datos se calculó utilizando la ecuación 5.8 y el valor $(k_{\text{DO}})_{\mathbf{3-IM-D}} = 0,19 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

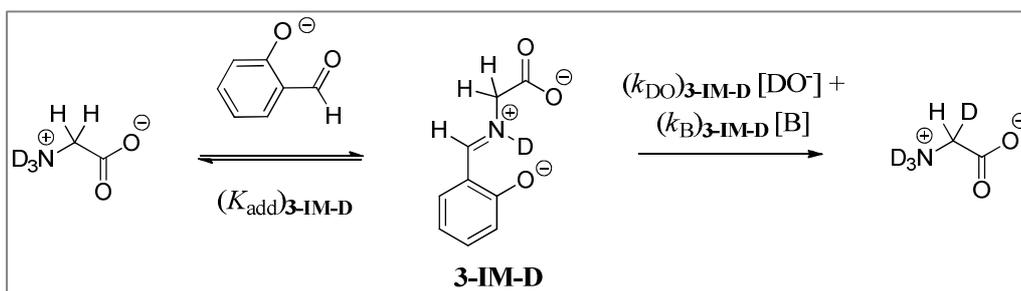


Figura 5.9 Equilibrio de adición del zwitterión de la glicina al salicilaldehído y posterior reacción de intercambio por deuterio de un protón en posición α al ión iminio de **3-IM-D**.

Las pendientes de las correlaciones lineales de la figura 5.10 son las constantes de velocidad aparentes de segundo orden, $(k_{\text{buf}})_{\text{obsd}} = (k_{\text{B}})_{\mathbf{3-IM-D}} f_{\text{B}} f_{\mathbf{3-IM-D}}$, para la reacción de intercambio por deuterio catalizada por tampón a la concentración dada de **3**, donde $(k_{\text{B}})_{\mathbf{3-IM-D}}$ es la constante de velocidad de segundo orden para la desprotonación de **3-IM-D** por la forma básica del tampón, y f_{B} es la fracción del catalizador en su forma básica. Los valores de k_{B} que se muestran en la tabla 5.3 fueron calculados a partir de los valores de $(k_{\text{buf}})_{\text{obsd}}$, f_{B} y $f_{\mathbf{3-IM-D}}$. El valor $(k_{\text{B}})_{\mathbf{3-IM-D}} = 2,9 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la

desprotonación de **3-IM-D** por la forma básica del HFIP se calculó como la media de los valores de k_B determinados a diferentes fracciones de base del tampón.

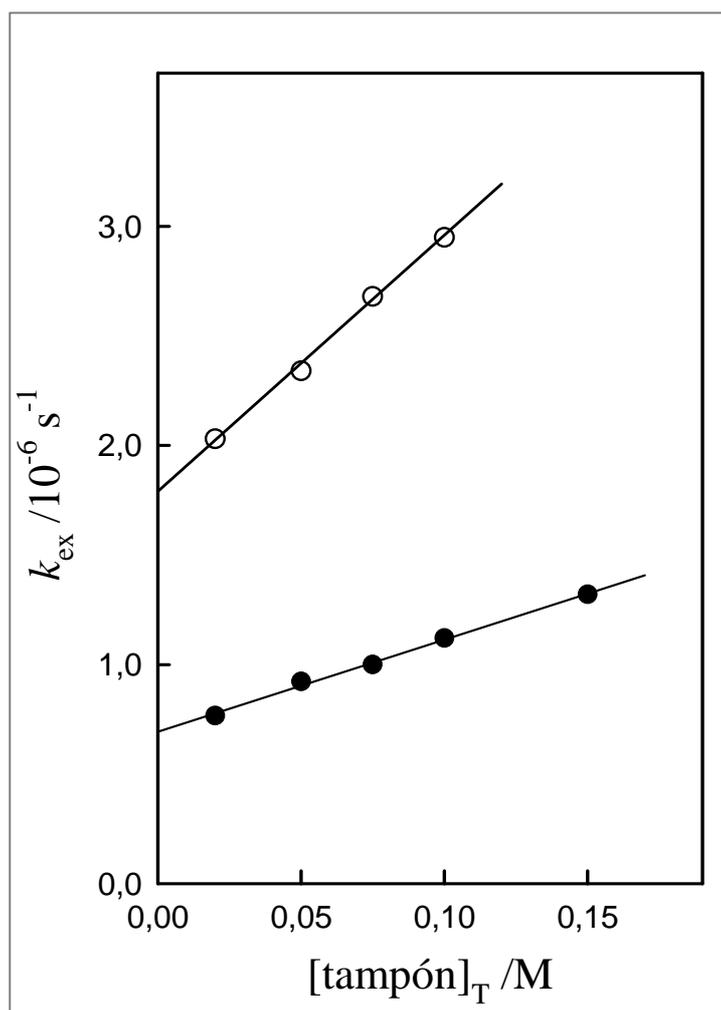


Figura 5.10 Influencia de la concentración total de tampón de HFIP sobre k_{ex} (s^{-1}) para el intercambio por deuterio del primer protón del grupo metileno de la glicina en presencia de salicilaldehído a pD de 9,8 en D_2O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl). (●) 10 mM de **3**; (○) 52 mM de **3**.

Tabla 5.3 Constantes de velocidad para el intercambio del primer protón del grupo metileno de la glicina en presencia de **3** y tampones de HFIP en D₂O^a

Base	f_B^c	pD	[aldehído] /M	$f_{3\text{-IM-D}}^d$	k_0/s^{-1e}	k_w/s^{-1f}	$(k_{\text{buf}})_{\text{obsd}}/M^{-1}s^{-1g}$	$k_B/M^{-1}s^{-1h}$
HFIP	0,8	10,53	$6,0 \times 10^{-3}$	0,15	$1,7 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-5}$	$3,1 \times 10^{-6}$	$2,6 \times 10^{-5}$
		10,52	$2,0 \times 10^{-2}$	0,39	$4,4 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-5}$	$8,8 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^{-5}$
$pK_{\text{BD}} = 9,9^b$	0,5	9,80	$1,0 \times 10^{-2}$	0,32	$6,9 \times 10^{-7}$	$2,2 \times 10^{-6}$	$4,2 \times 10^{-6}$	$2,6 \times 10^{-5}$
		9,86	$5,2 \times 10^{-2}$	0,73	$1,8 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-5}$	$3,3 \times 10^{-5}$
	0,2	9,35	$2,0 \times 10^{-2}$	0,45	$3,5 \times 10^{-7}$	$7,8 \times 10^{-7}$	$2,9 \times 10^{-6}$	$3,2 \times 10^{-5}$

^aA 25 °C y $I = 1,0$ (KCl). ^bValor del pK_a aparente del ácido conjugado en D₂O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl). ^cFracción del tampón presente en su forma básica. ^dFracción de glicina presente en la forma reactiva de ión iminio **3-IM-D** a la concentración dada de **3**, determinada por análisis espectroscópico de RMN ¹H de la mezcla en equilibrio de glicina e imina. ^eLas ordenadas en el origen de las representaciones de k_{ex} frente a la concentración total de tampón (Figura 5.10). ^fConstantes de velocidad aparentes de primer orden para la desprotonación de **3-IM-D** catalizada por el disolvente, calculadas a partir de los valores de k_0 como se describió en el texto. ^gLa pendiente de las representaciones de k_{ex} frente a la concentración total de tampón (Figura 5.10). ^hConstantes de velocidad de segundo orden para la desprotonación de **3-IM-D** catalizada por la base del tampón de HFIP, calculadas a partir de los valores de $(k_{\text{buf}})_{\text{obsd}}$, tal y como se describió en el texto.

5.4 Discusión de los resultados

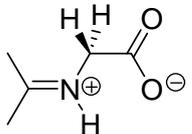
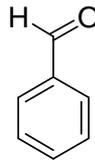
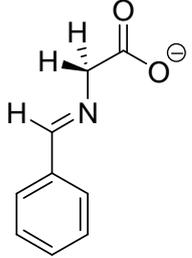
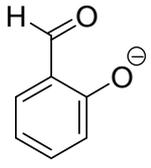
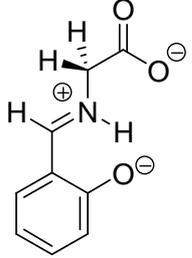
La acetona (**1**), el salicilaldehído (**3**) y el benzaldehído (**2**) son catalizadores efectivos de la desprotonación del carbono en posición α al grupo amino de la glicina en D_2O . Esta reacción conduce al intercambio del hidrógeno de la glicina por deuterio del disolvente, que se monitoriza por espectroscopía RMN 1H . La observación que las reacciones de intercambio por deuterio son de primer orden en la concentración del catalizador electrofílico e ión deuteróxido, indica que transcurren a través de la formación de la imina ó ión iminio de la glicina, que sufre la desprotonación por el ión deuteróxido para formar el correspondiente enolato (figuras 5.3, 5.8 y 5.9). La tabla 5.4 muestra las constantes de equilibrio K_{add} para la formación de aductos entre la glicina y **1**, **2** ó **3** y las constantes de velocidad de segundo orden k_{DO} para la desprotonación de estos aductos. Las constantes de velocidad de segundo orden $k_{HO} = 2,9 M^{-1}s^{-1}$, $0,13 M^{-1}s^{-1}$ y $2,0 \times 10^{-4} M^{-1}s^{-1}$ (tabla 5.5), para la desprotonación de **1-IMH**, **3-IMH** y **2-IM**, respectivamente, por el ión hidróxido en agua fueron calculadas utilizando los valores experimentales de k_{DO} y un valor estimado para el efecto isotópico secundario del disolvente de $k_{DO} / k_{HO} = 1,46$. Este valor del efecto isotópico secundario del disolvente para la desprotonación de **1-IM-L**, **3-IM-L** y **2-IM** por el ión hidróxido se supone igual al medido para la desprotonación de la acetona.²³¹ En la tabla 5.5 se recogen los valores de k_{HO} para la desprotonación de la glicina y algunos de sus derivados determinados en los estudios que forman parte de esta tesis doctoral y en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación.^{232,233,234}

²³¹ Pocker, Y. **1959** *Chem. Ind.*, 1383-1384)

²³² Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

²³³ Toth, K.; Richard, J. P. **2007** *J. Am. Chem. Soc.*, 129: 3013-3021.

Tabla 5.4. Constantes de equilibrio para la adición de glicina a compuestos carbonílicos en D₂O, y constantes de velocidad de segundo orden k_{DO} para la desprotonación en el carbono de los aductos imina ó ión iminio.^a

Aldehído	Ácido de Carbono	K_{add}^b (M ⁻¹)	$(K_{\text{add}})^+^c$ (M ⁻¹)	k_{DO}^d (M ⁻¹ s ⁻¹)
		$3,5 \times 10^{-2}$	$5,6 \times 10^{-3}$	4,2
		44^e	$0,0033^e$	$2,90 \times 10^{-4}$
		$1,76^e$	72^e	0,19

^a A 25 °C y $I = 1,0$ (KCl). ^b Constante de equilibrio para la adición de la forma básica del grupo amino de la glicina al compuesto carbonílico. ^c Constante de equilibrio para la adición de la glicina en forma zwitteriónica al compuesto carbonílico. ^d Constante de velocidad de segundo orden para la desprotonación en el carbono del aducto ión iminio por el ión deuteróxido en D₂O. ^e Datos de la referencia²³⁵.

²³⁴ Crugeiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Amyes, T. L.; Richard, J. P. **2008**, *J. Am. Chem. Soc.* 130: 2041–2050.

²³⁵ Crugeiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Richard, J. P. **2009**, *J. Am. Chem. Soc.* 131: 15815–15824.

5.4.1 Valores de pK_a de los ácidos de carbono. La figura 5.11 (■) muestra la relación lineal de pendiente 0,44 entre los valores corregidos estadísticamente de $\log k_{OH}$ para la desprotonación de cetonas y ésteres catiónicos y los valores de pK_a de los ácidos de carbono.²³⁶ Los valores de pK_a para **1-IMH** y **3-IMH** que se recogen en la tabla 5.5 fueron estimados suponiendo que los valores de $\log k_{OH}$ para estos ácidos de carbono caen sobre la relación lineal para otras cetonas y ésteres.

La relación lineal entre los valores estadísticamente corregidos de $\log k_{OH}$ para la desprotonación de ácidos de carbono monocarbonílicos neutros y los valores de pK_a de los ácidos de carbono se muestra también en la figura 5.11 (●).^{237,238,239,240,241} El valor de $pK_a = 27$ (tabla 5.5) para la ionización de **2-IM** se calculó suponiendo que el valor de $\log k_{HO}$ para este ácido de carbono cae sobre esta relación lineal.

La constante de equilibrio favorable para la formación de la base de Schiff **2-IM** entre la glicina y **2** ($K_{add} = 44 \text{ M}^{-1}$) facilita la detección de la reacción de intercambio por deuterio de la glicina catalizada por **2** a valores altos de pD (figura 5.7). En cambio, no fue posible detectar la reacción de intercambio por deuterio de la glicina catalizada por **2** a valores bajos de pD , donde **2-IM-D** es el ácido de carbono reactivo, porque la constante de equilibrio para la formación de **2-IM-D** es muy pequeña ($(K_{add})^+ = 0,0033 \text{ M}^{-1}$

²³⁶ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

²³⁷ Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **1992** *J. Am. Chem. Soc.* 114: 10297-10302.

²³⁸ Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **1996** *J. Am. Chem. Soc.* 118: 3129-3141.

²³⁹ Richard, J. P.; Williams, G.; O'Donoghue, A. C.; Amyes, T. L. **2002** *J. Am. Chem. Soc.* 124: 2957-2968.

²⁴⁰ Keeffe, J. R.; Kresge, A. J. In *The Chemistry of Enols*; Rappoport, Z., Ed.; John Wiley and Sons: Chichester, **1990**, p 399-480.

²⁴¹ Chiang, Y.; Griesbeck, A. G.; Heckroth, H.; Hellrung, B.; Kresge, A. J.; Meng, Q.; O'Donoghue, A. C.; Richard, J. P.; Wirz, J. **2001** *J. Am. Chem. Soc.*, 123: 8979-8984.

(tabla 5.4)) y la baja solubilidad del benzaldehído en agua no permite realizar experimentos con concentraciones del aldehído superiores a 0,02 M.

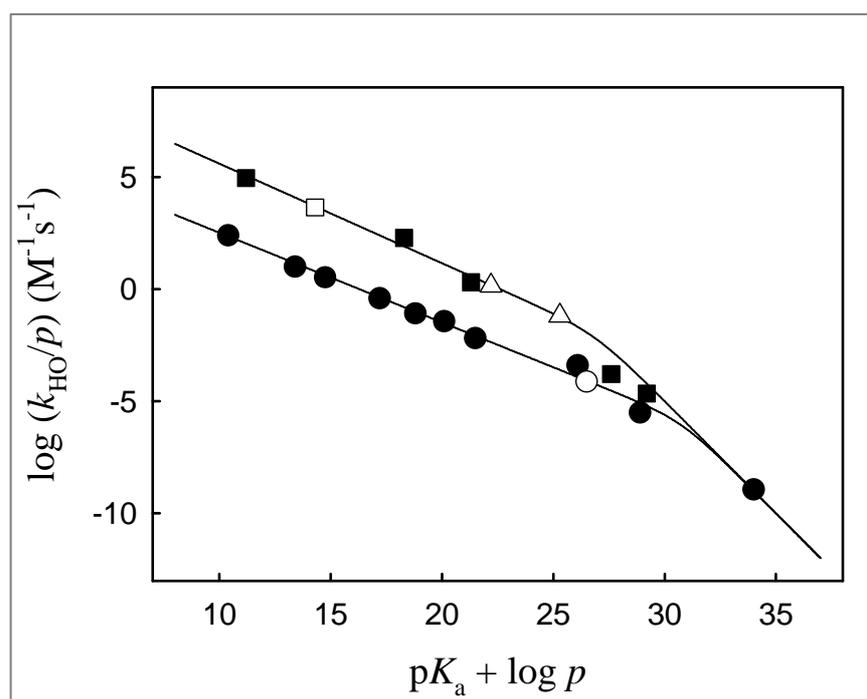


Figura 5.11 Correlaciones velocidad-equilibrio de las constantes de velocidad, k_{HO} ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), para la desprotonación por ión hidróxido de ácidos de carbono en α a un grupo carbonilo con el valor del $\text{p}K_{\text{a}}$ del ácido de carbono. Los valores de k_{HO} y $\text{p}K_{\text{a}}$ fueron corregidos estadísticamente por el número de protones ácidos p en el ácido de carbono.

(●) Correlación de $\log(k_{\text{HO}}/p)$ para la desprotonación de aldehídos neutros, cetonas, ésteres y acetamida por ión hidróxido, construida utilizando datos de la bibliografía.^{242,243,244,245,246} Sin incluir el valor del anión acetato ($\text{p}K_{\text{a}} = 33,5$), la relación lineal viene dada por $\log(k_{\text{HO}}/p) = 6,496 - 0,401(\text{p}K_{\text{a}} + \log p)$.

(■) Correlación de $\log(k_{\text{HO}}/p)$ para la desprotonación de cetonas y ésteres catiónicos.²⁴⁷ La relación viene dada por $\log(k_{\text{HO}}/p) = 10,044 - 0,444(\text{p}K_{\text{a}} + \log p)$.

(□) Datos para la desprotonación del ión iminio de la acetona con la glicina metil éster²⁴⁸. (△) Datos para la desprotonación de **1-IM-H** y **3-IM-H**. (○) Datos para la desprotonación de **2-IM**.

Se estimó un valor de k_{HO} para la desprotonación en el carbono de **2-IMH** suponiendo que la protonación del nitrógeno de la glicina y de **2-IM** produce cambios similares en la acidez termodinámica y cinética del carbono en posición α al grupo amino e imino. El sustituyente $\alpha\text{-NH}_3^+$ produce un descenso de 4,6 unidades en el $\text{p}K_{\text{a}}$ como ácido de carbono del anión acetato desde 33,5 hasta 28,9 para el zwitterión de la glicina,^{247,245} o del acetato de etilo desde 25,6 hasta 21,0 para la glicina metil éster.^{247,243} En comparación el sustituyente $\alpha\text{-NH}_2$ es de esperar que tenga un efecto menor sobre la acidez del carbono. Por ejemplo, sólo hay 0,5 unidades de diferencia entre los valores de $\text{p}K_{\text{a}}$ de 26,5 para la acetona y 26,0 para la 2-dimetilaminoacetona en DMSO.²⁴⁹ El efecto acidificante tan débil del grupo α -dimetilamino en la acetona muestra que el efecto inductivo de este grupo retirador de carga en el $\text{p}K_{\text{a}}$ es prácticamente anulado por la desestabilización del enolato, debida a la interacción repulsiva entre el par electrónico no enlazante del nitrógeno y el par electrónico delocalizado del anión enolato.²⁵⁰ Una cancelación similar de efectos inductivos y electrónicos ha sido propuesta para explicar los efectos tan

²⁴² Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **1992** *J. Am. Chem. Soc.* 114: 10297-10302.

²⁴³ Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **1996** *J. Am. Chem. Soc.* 118: 3129-3141.

²⁴⁴ Richard, J. P.; Williams, G.; O'Donoghue, A. C.; Amyes, T. L. **2002** *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 2957-2968.

²⁴⁵ Crugeiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Richard, J. P. **2009**, *J. Am. Chem. Soc.* 131: 15815-15824.

²⁴⁶ Keeffe, J. R.; Kresge, A. J. In *The Chemistry of Enols*; Rappoport, Z., Ed.; John Wiley and Sons: Chichester, **1990**, p 399-480.

²⁴⁷ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

²⁴⁸ Rios, A.; Crugeiras, J.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2001** *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7949-7950

²⁴⁹ Bordwell, F. G.; Gallagher, T.; Zhang, X. **1991** *J. Am. Chem. Soc.*, 113: 3495-3497.

²⁵⁰ Hine, J. *Structural Effects on Equilibria in Organic Chemistry*; John Wiley & Sons: **1975**, New York.

pequeños de los sustituyentes α -hidroxi y α -alcoxi sobre la acidez cinética del carbono en posición α al grupo carbonilo.^{251,252,253,254}

Tabla 5.5 Constantes de velocidad y equilibrio para la desprotonación en el carbono de la glicina y derivados de la glicina en agua a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl).

Ácido de Carbono	k_{HO}^a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$\text{p}K_a^b$	Ácido de Carbono	k_{HO}^a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$\text{p}K_a^b$
	$4,5 \times 10^{-5}^c$	28,9 ^c		4,1 ^c	21,0 ^c
	$3,3 \times 10^{-4}^c$	27,3 ^c		390 ^c	18,0 ^c
	2,9	21,9		$9,0 \times 10^3^d$	14 ^d
	$2,0 \times 10^{-4}$	27		Aprox 1	Aprox 23

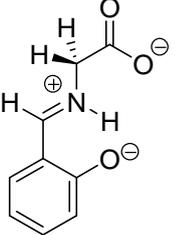
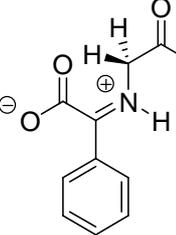
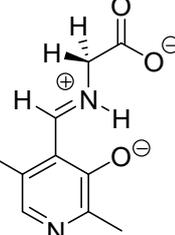
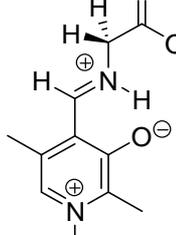
²⁵¹ Hine, J. *Structural Effects on Equilibria in Organic Chemistry*; John Wiley & Sons: **1975**, New York.

²⁵² Hine, J.; Hampton, K. G.; Menon, B. C. **1967** *J. Am. Chem. Soc.*, 89; 2664-2668.

²⁵³ Hine, J.; Mahone, L. G.; Liotta, C. L. **1967** *J. Am. Chem. Soc.*, 89; 5911-5920.

²⁵⁴ Crugeiras, J.; Richard, J. P. **2004** *J. Am. Chem. Soc.*, 126; 5164-5173.

Tabla 5.5 Continuación

Ácido de Carbono	k_{HO}^a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$\text{p}K_a^b$	Ácido de Carbono	k_{HO}^a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$\text{p}K_a^b$
	0,13	25		$1,1 \times 10^{4d}$	14^d
	Sin determinar	Aprox 23^e		$7,5 \times 10^{2f}$	17^f

^a Constante de velocidad de segundo orden para la desprotonación del ácido de carbono por el ión hidróxido, calculado con los datos de este capítulo, salvo que se indique lo contrario. ^b Valores de $\text{p}K_a$ para la ionización del ácido de carbono en agua calculados con los datos de este capítulo, salvo que se indique lo contrario. ^c Datos de la referencia²⁵⁵. ^d Datos de la referencia²⁵⁶. ^e Estimados como se indica en el texto. ^f Datos de la referencia²⁵⁷.

Al combinar el efecto de 4,6 unidades que produce el sustituyente $\alpha\text{-NH}_3^+$ sobre la acidez del carbono con el efecto de $\sim 0,5$ unidades del sustituyente $\alpha\text{-NH}_2$, se puede estimar que la protonación del nitrógeno produce una disminución de aproximadamente 4 unidades en el $\text{p}K_a$ como ácido de carbono de la glicina y de la glicina metil éster (figura 5.12). Es de esperar que la protonación del nitrógeno del grupo imino de **2-IM** produzca un descenso

²⁵⁵ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

²⁵⁶ Crueiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Amyes, T. L.; Richard, J. P. **2008**, *J. Am. Chem. Soc.* 130: 2041-2050.

²⁵⁷ Toth, K.; Richard, J. P. **2007** *J. Am. Chem. Soc.*, 129: 3013-3021.

similar de 4 unidades en el valor del pK_a del carbono, de 27 a 23. El valor de $k_{HO} = 1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la desprotonación del ácido de carbono **2-IMH** (tabla 5.5) fue estimado a partir de un valor de 23 para el pK_a del ácido de carbono utilizando la correlación lineal $\log(k_{HO}/p) = 10,044 - 0,444(pK_a + \log p)$ establecida en trabajos previos (figura 5.11).²⁵⁸

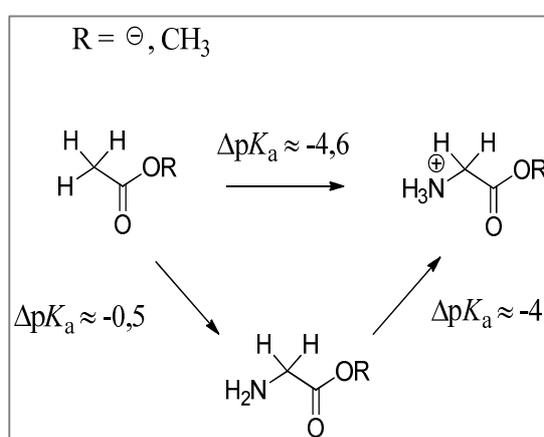


Figura 5.12 Estimación del efecto que produce la protonación del nitrógeno del grupo amino en el valor del pK_a como ácido de carbono de la glicina y glicina metil éster.

Una comparación de los datos cinéticos para la desprotonación de **DPL-IMH₂** y **3-IMH** por OH^- muestra que la sustitución en el anillo de 4-CH por $-\text{NH}^+$ produce un aumento de 6000 veces en el valor de k_{HO} para la desprotonación de este carbono por el ión hidróxido. La correlación lineal entre $\log k_{HO}$ y el valor del pK_a del ácido de carbono que se muestra en la figura 5.11 indica que este cambio en k_{HO} corresponde a una disminución de aproximadamente 8 unidades en el valor del pK_a del carbono en posición α al

²⁵⁸ Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

grupo imino. Es de esperar que una gran parte de este efecto de 8 unidades sea debida al aumento en una unidad de la carga positiva en el anillo aromático de **DPL-IMH₂**. Así por ejemplo, aproximadamente el 30% (2,1 unidades de pK_a) de las 7,8 unidades que corresponden al efecto total del nitrógeno protonado de la piridina sobre la constante de acidez para la ionización del ácido de carbono bencil fenil cetona se observa para la sustitución en el anillo del carbono por un nitrógeno neutro, y el 70% restante (5,7 unidades de pK_a) se expresa al protonar el átomo de nitrógeno (figura 5.13).^{259,260} Se puede estimar un valor de pK_a de aproximadamente 23 (tabla 5.5) para la ionización de **DPL-IMH** suponiendo que el 70% del efecto de la sustitución de 4-CH por $-NH^+$ en el anillo aromático sobre la acidez del carbono (~ 8 unidades de pK_a) se pierde con la desprotonación del nitrógeno.

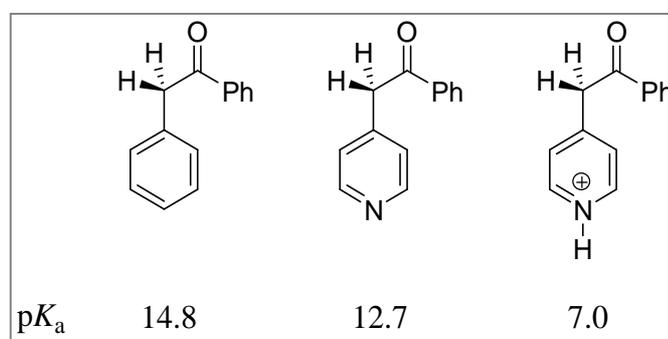


Figura 5.13 Efecto de la sustitución en el anillo del carbono en posición *para* por nitrógeno o nitrógeno protonado sobre el pK_a del ácido de carbono bencil fenil cetona.

²⁵⁹ Carey, A. R. E.; Eustace, S.; More O'Ferrall, R. A.; Murray, B. A. **1993** *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2285-2296.

²⁶⁰ Carey, A. R. E.; More O'Ferrall, R. A.; Murray, B. A. **1993** *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2297-2302.

5.4.2 Efecto de los sustituyentes sobre la acidez del carbono de la glicina

5.4.2.1 Efecto del grupo ión iminio. La adición de acetona a la glicina metil éster para formar el correspondiente ión iminio produce un descenso de 7 unidades en el valor del pK_a como ácido de carbono de la glicina metil éster desde 21 a 14 (tabla 5.5),²⁶¹ mientras que la adición de acetona al zwitterión de la glicina produce un descenso similar de siete unidades en el valor del pK_a como ácido de carbono de la glicina desde 29 a 22 (tabla 5.5). El efecto global de la formación de un ión iminio sobre el pK_a del ácido de carbono es debido a la suma de dos efectos.

- (1) El aumento en la estabilización electrostática intramolecular del anión enolato por interacción con el nitrógeno catiónico cuando los protones del grupo amino que se encuentran formando enlaces de hidrógeno son reemplazados por grupos orgánicos no polares.²⁶² Esta sustitución da lugar a un mayor efecto acidificante (3 unidades de pK_a) del grupo $\alpha\text{-NMe}_3^+$ en la betaína metil éster ($pK_{\text{CH}} = 18,0$) que del grupo $\alpha\text{-NH}_3^+$ en la glicina metil éster ($pK_{\text{CH}} = 21,0$).²⁶²
- (2) La estabilización del enolato por delocalización directa de la carga negativa en el carbono en posición α al grupo imino (figura 5.8). Una delocalización de carga similar es parcialmente responsable del pK_a aproximadamente 3 unidades inferior para

²⁶¹ Rios, A.; Crueiras, J.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2001** *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7949-7950.

²⁶² Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9373-9385.

el protón del C-2 de la 3-ciclohexenona ($pK_a = 15,2$)²⁶³ comparado con el $pK_a = 18,1$ para la ciclohexanona.²⁶⁴

Las dos observaciones experimentales siguientes sugieren que el efecto de la delocalización de carga negativa en el carbono en posición α al grupo iminio sobre el pK_a de los iones iminio de la acetona, es pequeño.

(1) La metilación del oxígeno de los zwitteriones de la glicina y betaína, que elimina las interacciones electrostáticas desestabilizantes entre los átomos de oxígeno y carbono vecinos cargados negativamente, produce un descenso de 8 y 9 unidades, respectivamente, en el pK_a de estos ácidos de carbono (tabla 5.5). La metilación del oxígeno de **1-IMH** produce un descenso similar de 8 unidades en el valor del pK_a de este ácido de carbono, lo que concuerda con una interacción electrostática desestabilizante similar entre los átomos de oxígeno y carbono vecinos cargados negativamente en **1-IMH**. Esta observación pone de manifiesto que no se produce una disminución significativa en la magnitud de esta interacción por delocalización de la carga negativa en el carbono en posición α al grupo imino de **1-IMH**.

(2) El valor estimado de 23 para el pK_a de **2-IMH** es mayor que el de 22 para **1-IMH**, lo que muestra que no hay una estabilización significativa del enolato de **1-IMH** cuando se sustituye el grupo metilo por fenilo. Si hay estabilización de **2-IMH** por delocalización de la carga negativa desde el carbono en posición

²⁶³ Dzingeski, G. D.; Blotny, G.; Pollack, R. M. **1990** *J. Org. Chem.*, 55: 1019-1023.

²⁶⁴ Keefe, J. R.; Kresge, A. J. In *The Chemistry of Enols*; Rappoport, Z., Ed.; John Wiley and Sons: Chichester, **1990**, p 399-480.

α al grupo imino al anillo fenílico, entonces la densidad de carga negativa en este carbono es con casi total seguridad pequeña.

5.4.2.2 Efecto de los sustituyentes aromáticos en el nitrógeno en α al grupo iminio. La figura 5.14 resume los resultados de nuestros estudios sobre el efecto de los sustituyentes en el aldehído R-CHO que forma un ión iminio con el zwitterión de la glicina sobre el pK_a para la desprotonación del carbono en α al grupo amino. El valor del pK_a del ión iminio de la glicina con el salicilaldehído (25) es mucho mayor que el pK_a del ión iminio de la glicina con DPL (17). Aparentemente, es necesario un grupo fuertemente retirador de carga como el ión piridinio para forzar la delocalización de la carga negativa sobre el carbono en posición α al grupo imino y producir un aumento adicional en la acidez del carbono (figura 5.15 A). La gran acidez como ácido de carbono del análogo de la piridoxamina, el dicatión 4-(aminometil) piridina (pK_a de aproximadamente 18),²⁶⁵ constituye una evidencia de que el sustituyente piridinio en posición α proporciona una fuerte estabilización del carbono cargado negativamente.

²⁶⁵ Crugeiras, J.; Rios, A.; Amyes, T. L.; Richard, J. P. **2005** *Org. Biomol. Chem.*, 3: 2145-2149.

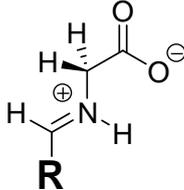
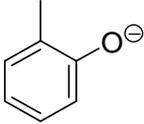
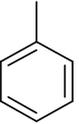
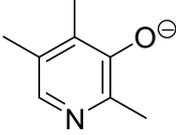
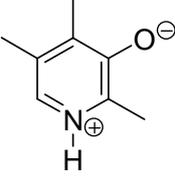
Ácido de Carbono					
	3-IMH	2-IMH	DPL-IMH	DPL-IMH ₂	
R					
pK_a estimado	25	23	23	17	

Figura 5.14 Resumen de los valores de pK_a del carbono en posición α al grupo iminio en los iones iminio formados por adición del zwitterión de la glicina a distintos aldehídos aromáticos.

La tabla 5.5 muestra que la adición de un sustituyente fuertemente atractor de electrones por efecto resonante como el $-\text{CO}_2^-$ al carbono en α al grupo imino de **2-IMH** también conduce a la delocalización extensiva de la carga negativa en el carbono en posición α al grupo imino y da lugar a un gran descenso en el valor del pK_a desde aproximadamente 23 a 14²⁶⁶ para el ión iminio **PG-glicina** (figura 5.15 B). Se puede concluir que el segundo grupo atractor de electrones por efecto resonante presente en el grupo prostético piruvoilo (CO_2^-) y en el PLP (catión piridinio) proporciona un gran impulso cinético a la catálisis electrófila de la desprotonación de la glicina en la

²⁶⁶ Crugeiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Amyes, T. L.; Richard, J. P. **2008**, *J. Am. Chem. Soc.* 130: 2041–2050.

catálisis de reacciones enzimáticas que transcurren a través de un carbanión en posición α al grupo amino como intermedio de reacción.

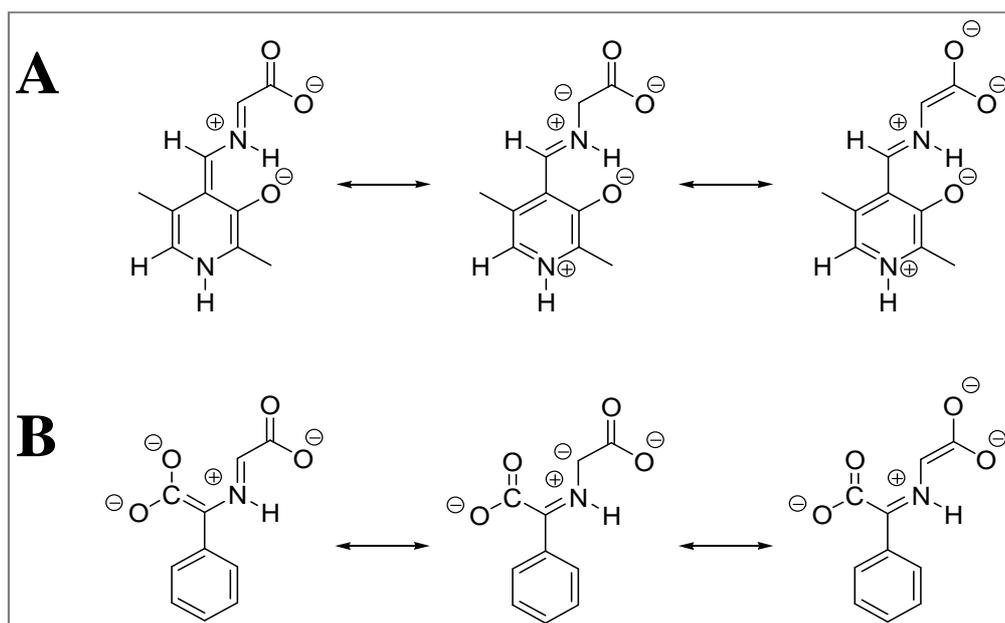


Figura 5.15 Aumento de la delocalización de la carga negativa del carbanión formado por la reacción de desprotonación del carbono en posición α al ión iminio con la presencia de grupos fuertemente aceptores de carga por resonancia como **A**: ión piridinio ó **B**: $-\text{CO}_2^-$.

5.4.3 Relevancia en la catálisis enzimática. Se ha sugerido para las enzimas que utilizan PLP como cofactor que la protonación del anillo de piridina del carbanión del ión iminio produce un movimiento de la densidad de carga negativa desde el carbono en posición α al grupo imino hacia el carbono en posición α al grupo piridilo, lo que favorece la protonación de este último carbono y por tanto la reacción de isomerización 1,3 aza-alílica que es una etapa en las reacciones de transaminación catalizada por enzimas.²⁶⁷ Esta

²⁶⁷ Toney, M. D. 2005 *Arch. Biochem. Biophys.*, 433: 279-287.

propuesta está de acuerdo con la observación de que el PLP unido a la enzima alanina racemasa está estabilizado por un enlace de hidrógeno al ácido débil catiónico de la cadena lateral de Arg-219,²⁶⁸ mientras que el cofactor unido a la enzima D-aminoácido transaminasa^{269,270} y a la alanina glioxalato aminotransferasa²⁷¹ está con casi total seguridad protonado por un ácido más fuerte, que corresponde al ácido carboxílico de las cadenas laterales de Gly-177 y Asp-180, respectivamente. Las seis unidades de diferencia en el pK_a como ácido de carbono de **DPL-IMH** y **DPL-IMH₂** muestran que la protonación del anillo de piridina produce un aumento sustancial en la estabilidad de la carga negativa en el carbono en posición α al grupo amino. Esto proporciona una evidencia directa del aumento de la delocalización de la carga negativa a través del sistema π , que favorecerá la reacción de isomerización 1,3 aza-alílica catalizada por la enzima. A modo de resumen podemos decir que las racemasas dependientes del PLP sacrifican parte del poder catalítico intrínseco del cofactor al utilizarlo en la forma de piridina neutra. Al parecer, la necesidad de dirigir la reacción hacia la transferencia protónica en el carbono en posición α al grupo amino y evitar la reacción de transaminación anula la necesidad de utilizar al cofactor en su forma más activa. Este hecho muestra que el poder catalítico latente de las racemasas dependientes de PLP es tan grande que una parte puede ser sacrificada para asegurar la especificidad adecuada de la reacción.

²⁶⁸ Shaw, J. P.; Petsko, G. A.; Ringe, D.; **1997** *Biochemistry*, 36: 1329-1342.

²⁶⁹ Sugio, S.; Petsko, G. A.; Manning, J. M.; Soda, K.; Ringe, D. **1995** *Biochemistry*, 34: 9661-9669.

²⁷⁰ Van Ophem, P. W.; Peisach, D.; Erickson, S. D.; Soda, K.; Ringe, D.; Manning, J. M. **1999** *Biochemistry*, 38: 1323-1331.

²⁷¹ Han, Q.; Robinson, H.; Gao, Y. G.; Vogelaar, N.; Wilson, S. R.; Rizzi, M.; Li, J. **2006** *J. Biol. Chem.*, 281: 37175-37182.

5.4.4 Efecto de los sustituyentes sobre la actividad catalítica de cetonas y aldehídos. La figura 5.16 compara las constantes de velocidad de primer orden para la desprotonación de la glicina catalizada por el disolvente k_o a pL neutro en presencia y ausencia de una concentración 0,01 M de un electrófilo carbonílico.²⁷² Estos datos nos permiten estimar la contribución de cada componente del **DPL** al aumento tan grande de velocidad observado para la desprotonación de la glicina.

- 1) La constante de velocidad para la reacción en presencia de 0,01 M de acetona, $k_o = 2 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$, proporciona una medida de la reactividad intrínseca del grupo carbonilo como catalizador electrofílico de la desprotonación de la glicina.
- 2) La constante de velocidad para la reacción en presencia de 0,01 M de benzaldehído, $k_o = 1 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$, muestra que la sustitución de un grupo alquilo por un grupo fenilo no aumenta la reactividad catalítica del grupo carbonilo.
- 3) La comparación de las constantes $k_o = 1 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$ y $k_o = 5,4 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ para la catálisis por 0,01 M de benzaldehído y salicilaldehído, respectivamente, muestra que el sustituyente *o*-fenoxi estabiliza el estado de transición para la desprotonación de la glicina en 3,8 kcal/mol (figura 5.16). Esto se debe a la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el oxígeno aniónico del anillo y el ión

²⁷² Las constantes de velocidad de primer orden k_o (s^{-1}) que figuran en la figura 5.16 para la desprotonación de la glicina catalizada por el disolvente a pL neutro en presencia de salicilaldehído y DPL fueron calculadas como $k_o = (k_{LO})_{X-IM} [LO^-] f_{X-IM}$, donde $(k_{LO})_{X-IM}$ es la constante de velocidad de segundo orden para la desprotonación por ión lióxido del correspondiente ión iminio (**3-IMH** o **DPL-IMH₂**), y f_{X-IM} es la fracción del aminoácido en forma de ión iminio al valor de pL dado y en presencia de 0,01 M del monoanión salicilaldehído y 0,01 M del zwitterión DPL respectivamente.

iminio²⁷³. El fuerte enlace de hidrógeno intramolecular produce un aumento en el valor del pK_a desde 23 para **2-IMH** hasta 25 para **3-IMH**. Este descenso en la acidez del carbono atenúa la estabilización del estado de transición por enlace de hidrógeno, al causar un descenso en la reactividad de **3-IMH** hacia la desprotonación por ión hidróxido.

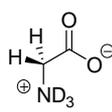
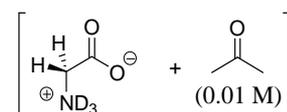
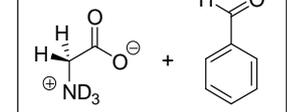
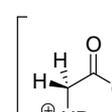
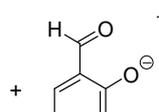
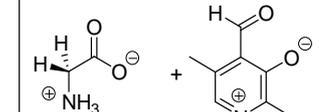
			
k_o (s^{-1}) (pD 7.6)	6.0×10^{-12}	2.2×10^{-11}	ca. 1×10^{-11}
$\Delta\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)		-0.8	-0.3
			
k_o (s^{-1}) (pD 7.6)		5.4×10^{-9}	4.6×10^{-6} (pH 7.0)
$\Delta\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)		-4.1	-8.1

Figura 5.16 Valores de las constantes de velocidad de primer orden para la desprotonación de la glicina a pL neutro en ausencia y presencia de compuestos carbonílicos electrofílicos.

- 4) La sustitución del grupo fenilo por un catión piridinio fuertemente atractor de electrones en **3-IMH** produce un aumento en k_o desde 5,4

²⁷³ Crugeiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Richard, J. P. **2009**, *J. Am. Chem. Soc.* 131: 15815-15824.

$\times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ hasta aproximadamente $4,6 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Despreciando el pequeño efecto del grupo *o*-metilo sobre la reactividad de **DPL-IMH₂**, hay una estabilización adicional del estado de transición para la desprotonación de glicina de 4 kcal/mol (figura 5.16). Esto refleja la fuerte demanda electrónica del catión piridinio, el cual fuerza la delocalización de carga a través del extenso sistema π .

Estos resultados proporcionan un ejemplo impresionante de cómo la suma de efectos relativamente pequeños en el diseño de las moléculas complejas de **PLP** y **DPL** ha producido un tipo de catalizador de extraordinario poder²⁷⁴. Queda la cuestión abierta de si los químicos modernos podrán igualar el éxito de la evolución por prueba y error y tener éxito en el diseño de moléculas grandes o pequeñas con un poder catalítico similar al de los catalizadores naturales.

²⁷⁴ Richard, J. P.; Amyes, T. L.; Crujeiras, J.; Rios, A. **2009**, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13: 1-9.

CONCLUSIONES

Conclusiones

Se ha investigado el efecto de las modificaciones covalentes utilizadas por las enzimas para facilitar las reacciones de aminoácidos sobre las barreras cinética y termodinámica para la desprotonación del carbono en posición α de la glicina en disolución acuosa. Las principales conclusiones de este estudio se resumen a continuación:

- La formación de un ion iminio entre el zwitterión de la glicina y la acetona da lugar a una disminución de 7 unidades en el pK_a de este ácido de carbono (de 29 a 22). Este efecto corresponde a más de un 50% de la disminución de 12 unidades observada al formar el correspondiente ion iminio con el DPL. La formación de un aducto con el fenilglioxilato tiene un efecto aun mayor, con una disminución de 15 unidades en el valor de pK_a (de 29 a 14). Estos resultados muestran que el ion iminio de la glicina con el DPL no es un ácido de carbono *excepcionalmente* fuerte.
- Si se compara la reactividad absoluta de los distintos compuestos carbonílicos como catalizadores de la desprotonación de la glicina, se puede observar que el 5'-deoxipiridoxal es un catalizador mucho más efectivo que el anión fenilglioxilato, a pesar de la menor acidez del aducto formado entre la glicina y el DPL. La gran diferencia en poder catalítico entre el DPL y el fenilglioxilato es debida a la formación de una imina mucho más estable entre la glicina y el derivado del piridoxal. Nuestros resultados indican que el problema de incrementar la acidez en el carbono alfa de los aminoácidos puede ser resuelto mediante la

formación de aductos tipo base de Schiff con compuestos carbonílicos con estructuras mucho más simples que el PLP. Sin embargo, uno de los motivos por los que las enzimas muestran una preferencia hacia el PLP, frente al grupo piruvoílo, como cofactor para la catálisis de las reacciones de aminoácidos es la mayor afinidad del cofactor piridínico, comparado con los α -cetoácidos, por el grupo amino del aminoácido para formar una imina.

El estudio del efecto de los distintos sustituyentes presentes en el cofactor enzimático piridoxal 5'-fosfato (PLP) sobre la estabilidad termodinámica de la imina formada entre la glicina y este cofactor permitió llegar a las siguientes conclusiones:

- Un análisis comparativo de las constantes de equilibrio para la adición de la glicina al *orto*- y *para*-hidroxibenzaldehído para formar las correspondientes iminas y de los valores de pK_a para la ionización de los iones iminio pone de manifiesto que el ion iminio del salicilaldehído está estabilizado por un enlace de hidrógeno intramolecular en disolución acuosa. Este enlace de hidrógeno es unas 3 kcal/mol más fuerte de lo que cabría esperar para una interacción puramente electrostática.
- La comparación del efecto del sustituyente *orto*-fenoxi sobre la acidez de los iones iminio de la glicina con el benzaldehído y el 4-piridín-carboxaldehído permite concluir que la presencia del nitrógeno piridínico no tiene un efecto significativo sobre la estabilidad del enlace de hidrógeno intramolecular. Por lo tanto, es posible estimar que la estabilización del ion iminio de la glicina con el PLP, mediante la

formación de un enlace de hidrógeno $O^{\cdots}H-N^+$, es próxima al valor de 3 kcal/mol.

- Los dos grupos metilo presentes en la estructura del cofactor estabilizan el ion iminio con respecto a la imina neutra, pero este efecto se ve contrarrestado por el efecto acidificante del nitrógeno piridínico neutro, de forma que, el pK_a del ion iminio de la glicina con el DPL es similar al del ion iminio de la glicina con el salicilaldehído.
- El grupo fosfato no juega un papel importante en la elevada estabilidad de las iminas de aminoácidos con el PLP, lo que apoya la hipótesis de que dicho grupo sirve principalmente como anclaje del cofactor a la proteína.

Se ha realizado un estudio de la catálisis covalente de la desprotonación de la glicina por acetona, benzaldehído y salicilaldehído. A continuación se recogen las conclusiones derivadas del mismo relativas al efecto de los distintos elementos estructurales del PLP sobre el pK_a como ácido de carbono del ion iminio formado por adición de la glicina a este cofactor.

- La conversión del zwitterión de la glicina en su ion iminio con la acetona reduce su pK_a como ácido de carbono en 7 unidades. Este efecto es el resultado de dos contribuciones: (a) el aumento en la estabilización del anión enolato por interacción electrostática con el átomo de nitrógeno catiónico adyacente cuando los protones del grupo amino se remplazan por un fragmento orgánico y (b) la estabilización del enolato por interacción de tipo inductivo con el sustituyente $-N^+=C(CH_3)_2$.
- El sustituyente $2-O^-$ presente en el ion iminio del salicilaldehído da lugar a una pequeña disminución en la acidez del carbono en posición

alfa al grupo imino. Sin embargo, el gran efecto de este sustituyente sobre la estabilidad termodinámica del ion iminio predomina sobre el pequeño efecto en la acidez, de forma que el salicilaldehído es un catalizador mucho más eficaz que el benzaldehído de la desprotonación de la glicina.

- Un grupo fuertemente retirador de carga como el ion piridinio es necesario para favorecer la delocalización de carga del carbono en posición alfa al grupo amino al carbono en alfa al grupo piridinio, y causar una disminución aun mayor en el pK_a como ácido de carbono del ion iminio.
- El PLP es solo uno de los muchos aldehídos aromáticos que podrían haber evolucionado para catalizar la desprotonación del carbono alfa de aminoácidos. Los resultados de este estudio proporcionan un ejemplo admirable de cómo la suma de varios efectos relativamente pequeños en el ensamblaje de moléculas complejas como el PLP ha dado lugar a un catalizador con un poder catalítico extra.

El trabajo realizado en esta tesis doctoral se encuentra recogido en los siguientes artículos

- “Glycine Enolates: The effect of formation of Imidium Ions to Simple Ketones on α -Amino Carbon Acidity and a Comparison with Piridoxal Iminium Ions” J. Crugeiras, A. Ríos, E. Riveiros, T. L. Amyes, J. P. Richard.

Journal of the American Chemical Society,
Vol 130, 2041-2050, 2008.

- “Substituent Effects on the Thermodynamic Stability of Imines Formed from Glycine and Aromatic Aldehydes: Implications for the Catalytic Activity of Pyridoxal-5'-Phosphate” J. Crugeiras, A. Ríos, E. Riveiros, J. P. Richard.

Journal of the American Chemical Society,
Vol 131, 15815-15824, 2009.

- “Substituent Effects on Electrophilic Catalysis by Carbonyl Group: Anatomy of the Rate Acceleration for PLP-Catalyzed Deprotonation of Glicine” Crugeiras, A. Ríos, E. Riveiros, J. P. Richard.

Journal of the American Chemical Society,
Vol 133, 3173-3183, 2011.

ANEXOS

Tabla A1 Constantes de velocidad de segundo orden, $(k_B)_{\text{hyd}}$, para la hidrólisis catalizada por base general de la Glicina Metil Éster N-protonada en D₂O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl).

Base	pK_{BD}^a	$(k_B)_{\text{hyd}} / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
DO ⁻	16,6	40,4
Quinuclidina	12,1 ^b	$\leq 2,7 \times 10^{-2}$
3-Quinuclidinol	10,7 ^b	$1,4 \times 10^{-3}$
3-Cloro Quinuclidina	9,7 ^b	$1,3 \times 10^{-4}$
DPO ₄ ²⁻	7,0 ^c	$2,1 \times 10^{-5}$

^a pK_a aparente del ácido conjugado de la base catalizadora en D₂O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl). ^b Datos de la referencia²⁷⁵ ^c Datos de la referencia²⁷⁶.

²⁷⁵ Chiang, Y.; Kresge, A. J.; Popik, V. V.; Schepp, N. P.; **1997** *J. Am. Chem. Soc.* 119: 10203-10212.

²⁷⁶ Hartwell, E.; Hodgson, D. R. W.; Kirby, A. J.; **2000** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9326-9327.

Tabla A2 Valores de las constantes de velocidad de primer orden, k_{ex} , para el intercambio por deuterio del primer protón en posición α de la glicina metil éster en presencia de Acetona y tampones en D_2O , a pD 7,6 (0,1 M de tampón fosfato), 25 °C y $I = 1,0$ (KCl) determinadas a partir de los valores de las constantes de velocidad de la hidrólisis y del enriquecimiento en deuterio de la glicina como producto de la hidrólisis.

Base catalizadora	$\text{p}K_{\text{BD}}^a$	f_B^b	[Acetona]/M	[B] _T /M	pD	f_{N}^{+c}	[DO] ⁻ /M ^d	$\frac{[\text{glyH}_2]^e}{[\text{glyHD}]}$	k_{hyd}/s^{-1f}	k_{ex}/s^{-1g}
Quinuclidina	12,1 ^h	$3,4 \times 10^{-5}$	0,01	0,04	7,63	0,876	$7,28 \times 10^{-8}$	7,72	$4,10 \times 10^{-6}$	$5,68 \times 10^{-7}$
				0,08	7,63	0,876	$7,28 \times 10^{-8}$	7,39	$4,13 \times 10^{-6}$	$5,99 \times 10^{-7}$
				0,12	7,64	0,874	$7,45 \times 10^{-8}$	7,31	$4,21 \times 10^{-6}$	$6,18 \times 10^{-7}$
				0,16	7,64	0,874	$7,45 \times 10^{-8}$	7,18	$4,25 \times 10^{-6}$	$6,36 \times 10^{-7}$
				0,2	7,64	0,874	$7,45 \times 10^{-8}$	6,53	$4,28 \times 10^{-6}$	$7,10 \times 10^{-7}$
			0,02	0,04	7,64	0,874	$7,45 \times 10^{-8}$	6,57	$4,15 \times 10^{-6}$	$6,84 \times 10^{-7}$
				0,08	7,64	0,874	$7,45 \times 10^{-8}$	5,93	$4,18 \times 10^{-6}$	$7,70 \times 10^{-7}$
				0,12	7,65	0,871	$7,63 \times 10^{-8}$	5,87	$4,26 \times 10^{-6}$	$7,93 \times 10^{-7}$
				0,16	7,65	0,871	$7,63 \times 10^{-8}$	5,78	$4,30 \times 10^{-6}$	$8,14 \times 10^{-7}$
				0,2	7,65	0,871	$7,63 \times 10^{-8}$	5,09	$4,33 \times 10^{-6}$	$9,43 \times 10^{-7}$

Tabla A2 Continuación.

Base catalizadora	pK_{BD}^a	f_B^b	[Acetona]/M	[B] _r /M	pD	f_N^{+c}	[DO]/M ^d	$\frac{[gbH_2]^e}{[gbHD]}$	k_{hyd}/s^{-1f}	k_{ex}/s^{-1g}
Quinuclidina	12,1 ^h	$3,4 \times 10^{-5}$	0,05	0,04	7,65	0,871	$7,63 \times 10^{-8}$	3,86	$4,20 \times 10^{-6}$	$1,25 \times 10^{-6}$
				0,08	7,65	0,871	$7,63 \times 10^{-8}$	3,84	$4,23 \times 10^{-6}$	$1,27 \times 10^{-6}$
				0,12	7,65	0,871	$7,63 \times 10^{-8}$	3,48	$4,26 \times 10^{-6}$	$1,43 \times 10^{-6}$
				0,16	7,65	0,871	$7,63 \times 10^{-8}$	3,35	$4,30 \times 10^{-6}$	$1,51 \times 10^{-6}$
				0,2	7,65	0,871	$7,63 \times 10^{-8}$	3,39	$4,33 \times 10^{-6}$	$1,50 \times 10^{-6}$
			0,1	0,04	7,66	0,869	$7,80 \times 10^{-8}$	2,54	$4,25 \times 10^{-6}$	$2,08 \times 10^{-6}$
				0,08	7,66	0,869	$7,80 \times 10^{-8}$	2,46	$4,28 \times 10^{-6}$	$2,18 \times 10^{-6}$
				0,12	7,66	0,869	$7,80 \times 10^{-8}$	2,39	$4,32 \times 10^{-6}$	$2,29 \times 10^{-6}$
				0,16	7,66	0,869	$7,80 \times 10^{-8}$	2,14	$4,35 \times 10^{-6}$	$2,65 \times 10^{-6}$
				0,2	7,66	0,869	$7,80 \times 10^{-8}$	2,04	$4,38 \times 10^{-6}$	$2,84 \times 10^{-6}$

Tabla A2 Continuación.

Base catalizadora	pK_{BD}^a	f_B^b	[Acetona]/M	[B] _T /M	pD	f_N^{+c}	[DO] ⁻ /M ^d	$\frac{[g]_{VH_2}}{[g]_{VHD}}^e$	k_{hyd}/s^{-1f}	k_{ex}/s^{-1g}
3-Quinuclidinol	10,7 ^h	$8,7 \times 10^{-4}$	0,01	0,04	7,64	0,874	$7,45 \times 10^{-8}$	7,37	$4,16 \times 10^{-6}$	$6,06 \times 10^{-7}$
				0,08	7,63	0,876	$7,45 \times 10^{-8}$	7,3	$4,15 \times 10^{-6}$	$6,10 \times 10^{-7}$
				0,12	7,63	0,876	$7,28 \times 10^{-8}$	6,24	$4,19 \times 10^{-6}$	$7,30 \times 10^{-7}$
				0,16	7,62	0,879	$7,12 \times 10^{-8}$	5,32	$4,19 \times 10^{-6}$	$8,68 \times 10^{-7}$
				0,2	7,62	0,879	$7,12 \times 10^{-8}$	5,38	$4,23 \times 10^{-6}$	$8,66 \times 10^{-7}$
			0,02	0,04	7,64	0,874	$7,45 \times 10^{-8}$	6,07	$4,16 \times 10^{-6}$	$7,47 \times 10^{-7}$
				0,08	7,64	0,874	$7,45 \times 10^{-8}$	5,78	$4,20 \times 10^{-6}$	$7,96 \times 10^{-7}$
				0,12	7,66	0,869	$7,81 \times 10^{-8}$	5,28	$4,36 \times 10^{-6}$	$9,12 \times 10^{-7}$
				0,16	7,66	0,869	$7,81 \times 10^{-8}$	5,05	$4,40 \times 10^{-6}$	$9,67 \times 10^{-7}$
				0,2	7,67	0,866	$7,99 \times 10^{-8}$	4,52	$4,50 \times 10^{-6}$	$1,12 \times 10^{-6}$

Tabla A2 Continuación.

Base catalizadora	pK_{BD}^a	f_B^b	[Acetona]/M	[B] _T /M	pD	f_N^{+c}	[DO]/M ^d	$\frac{[glyH_2]}{[glyHD]}^e$	$k_{hyd}/s^{-1}f$	$k_{ex}/s^{-1}g$
3-Quinuclidino	10,7 ^h	$8,7 \times 10^{-4}$	0,05	0,04	7,65	0,871	$7,63 \times 10^{-8}$	4,64	$4,21 \times 10^{-6}$	$1,02 \times 10^{-6}$
				0,08	7,65	0,871	$7,63 \times 10^{-8}$	3,68	$4,25 \times 10^{-6}$	$1,34 \times 10^{-6}$
				0,12	7,64	0,874	$7,45 \times 10^{-8}$	3,57	$4,24 \times 10^{-6}$	$1,38 \times 10^{-6}$
				0,16	7,64	0,874	$7,45 \times 10^{-8}$	3,11	$4,29 \times 10^{-6}$	$1,64 \times 10^{-6}$
				0,2	7,63	0,876	$7,28 \times 10^{-8}$	3,11	$4,27 \times 10^{-6}$	$1,64 \times 10^{-6}$
			0,1	0,04	7,64	0,879	$7,45 \times 10^{-8}$	2,94	$4,16 \times 10^{-6}$	$1,70 \times 10^{-6}$
				0,08	7,63	0,879	$7,28 \times 10^{-8}$	2,69	$4,15 \times 10^{-6}$	$1,89 \times 10^{-6}$
				0,12	7,63	0,874	$7,28 \times 10^{-8}$	2,29	$4,19 \times 10^{-6}$	$2,34 \times 10^{-6}$
				0,16	7,63	0,874	$7,28 \times 10^{-8}$	1,98	$4,23 \times 10^{-6}$	$2,86 \times 10^{-6}$
				0,2	7,62	0,869	$7,12 \times 10^{-8}$	1,96	$4,23 \times 10^{-6}$	$2,90 \times 10^{-6}$

Tabla A2 Continuación.

Base catalizadora	pK_{BD}^a	f_B^b	[Acetona]/M	[B] _{IT} /M	pD	f_N^{+c}	[DO]/M ^d	$\frac{[glyH_2]^e}{[glyHD]}$	k_{hyd}^{s-1f}	k_{ex}^{s-1g}
3-Cloro Quinuclidina	9,7 ^h	$8,1 \times 10^{-3}$	0,01	0,04	7,66	0,869	$7,81 \times 10^{-8}$	6,87	$4,26 \times 10^{-6}$	$6,67 \times 10^{-7}$
				0,08	7,66	0,869	$7,81 \times 10^{-8}$	6,58	$4,31 \times 10^{-6}$	$7,09 \times 10^{-7}$
				0,12	7,65	0,871	$7,63 \times 10^{-8}$	5,88	$4,28 \times 10^{-6}$	$7,95 \times 10^{-7}$
				0,16	7,62	0,879	$7,12 \times 10^{-8}$	5,45	$4,18 \times 10^{-6}$	$8,45 \times 10^{-7}$
				0,2	7,61	0,881	$6,96 \times 10^{-8}$	5,21	$4,16 \times 10^{-6}$	$8,83 \times 10^{-7}$
	0,02			0,04	7,65	0,871	$7,63 \times 10^{-8}$	6,32	$4,20 \times 10^{-6}$	$7,21 \times 10^{-7}$
				0,08	7,64	0,874	$7,45 \times 10^{-8}$	6,01	$4,20 \times 10^{-6}$	$7,63 \times 10^{-7}$
				0,12	7,63	0,876	$7,28 \times 10^{-8}$	4,37	$4,18 \times 10^{-6}$	$1,08 \times 10^{-6}$
				0,16	7,62	0,879	$7,12 \times 10^{-8}$	4,2	$4,18 \times 10^{-6}$	$1,13 \times 10^{-6}$
				0,2	7,61	0,881	$6,96 \times 10^{-8}$	4,39	$4,16 \times 10^{-6}$	$1,07 \times 10^{-6}$

Tabla A2 Continuación.

Base catalizadora	pK_{BD}^a	f_B^b	[Acetona]/M	[B] _T /M	pD	f_N^{+c}	[DO ⁻]/M ^d	$\frac{[\text{glyH}_2]}{[\text{glyHD}]}$ ^e	$k_{\text{hyd}}/s^{-1}f$	$k_{\text{ox}}/s^{-1}g$
3-Cloro Quinuclidina	9,7 ^h	$8,1 \times 10^{-3}$	0,05	0,04	7,65	0,871	$7,63 \times 10^{-8}$	3,94	$4,20 \times 10^{-6}$	$1,22 \times 10^{-6}$
				0,08	7,64	0,874	$7,45 \times 10^{-8}$	3,64	$4,20 \times 10^{-6}$	$1,34 \times 10^{-6}$
				0,12	7,64	0,874	$7,45 \times 10^{-8}$	3,25	$4,23 \times 10^{-6}$	$1,54 \times 10^{-6}$
				0,16	7,63	0,876	$7,28 \times 10^{-8}$	3,16	$4,22 \times 10^{-6}$	$1,59 \times 10^{-6}$
				0,2	7,62	0,879	$7,12 \times 10^{-8}$	2,26	$4,21 \times 10^{-6}$	$2,40 \times 10^{-6}$
			0,1	0,04	7,66	0,869	$7,81 \times 10^{-8}$	2,51	$4,26 \times 10^{-6}$	$2,12 \times 10^{-6}$
				0,08	7,65	0,871	$7,63 \times 10^{-8}$	2,46	$4,24 \times 10^{-6}$	$2,16 \times 10^{-6}$
				0,12	7,64	0,874	$7,45 \times 10^{-8}$	1,93	$4,23 \times 10^{-6}$	$2,97 \times 10^{-6}$
				0,16	7,64	0,874	$7,45 \times 10^{-8}$	1,83	$4,27 \times 10^{-6}$	$3,20 \times 10^{-6}$
				0,2	7,63	0,876	$7,28 \times 10^{-8}$	1,71	$4,26 \times 10^{-6}$	$3,53 \times 10^{-6}$

Tabla A2 Continuación.

^a Valores de pK_a aparentes del ácido conjugado de la base catalizadora en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$ y $I = 1,0$ (KCl). ^b Fracción del catalizador de Brønsted en su forma básica reactiva. ^c Fracción de la glicina metil éster presente en la forma reactiva N-protonada, calculada a partir del valor del pD de la disolución y del valor de $pK_{BD} = 8,48$ de la glicina metil éster en D_2O ($25\text{ }^\circ\text{C}$, $I = 1,0$ (KCl)). ^d Concentración del ión deuteróxido calculado a partir del valor de pD de la disolución con la ecuación 3.1 ($pK_w = 14,87$; $\gamma = 0,79$).²⁷⁷ ^e Razón de las concentraciones de los productos determinados por análisis de RMN ¹H después de más de 10 tiempos de vida media para la hidrólisis del éster. ^f Valores de las constantes de velocidad de primer orden para la hidrólisis de la glicina metil éster determinadas al monitorizar la desaparición de la glicina metil éster por análisis de RMN ¹H. ^g Valores de las constantes de velocidad de primer orden para el intercambio por deuterio del primer protón en posición α de la glicina metil éster calculados a partir de los valores de k_{hyd} y $[glyH_2]/[glyHD]$ usando la ecuación $k_{ex} = k_{hyd} / (([glyH_2]/[glyHD]) - 0,5)$. ^h Datos de la referencia²⁷⁸.

²⁷⁷ Amyes, T. L.; Richard, J. P.; **1996** *J. Am. Chem. Soc.* 118: 3129-3141.

²⁷⁸ Chiang, Y.; Kresge, A. J.; Popik, V.V.; Schepp, N. P.; **1997** *J. Am. Chem. Soc.* 119: 10203-10212.

Tabla A3. Valores de las constantes de velocidad de primer orden para el intercambio por deuterio del primer protón en posición α de la glicina en presencia de fenilgloxilato y tampones en D₂O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl).

Base del tampón	pK_{BD}^a	f_B^b	[PhCOCOO ⁻]/M	[Tampón] _T /M	pD	k_{ex}/s^{-1}^c
DPO ₄ ²⁻	7,0	0,8	0,1	0,02	7,63	1,95 x 10 ⁻⁸
				0,05	7,65	2,78 x 10 ⁻⁸
				0,10	7,68	3,80 x 10 ⁻⁸
				0,15	7,70	4,80 x 10 ⁻⁸
			0,2	0,02	7,64	4,00 x 10 ⁻⁸
				0,05	7,64	5,16 x 10 ⁻⁸
				0,10	7,70	7,40 x 10 ⁻⁸
				0,15	7,74	1,03 x 10 ⁻⁷
			0,25	0,02	7,62	4,26 x 10 ⁻⁸
				0,05	7,64	5,78 x 10 ⁻⁸
				0,10	7,68	8,50 x 10 ⁻⁸
				0,15	7,70	1,09 x 10 ⁻⁷
			0,4	0,02	7,65	8,36 x 10 ⁻⁸
				0,05	7,66	1,17 x 10 ⁻⁷
				0,10	7,69	1,61 x 10 ⁻⁷
				0,15	7,73	2,23 x 10 ⁻⁷
			0,5	0,02	7,68	1,06 x 10 ⁻⁷
				0,05	7,70	1,42 x 10 ⁻⁷
				0,10	7,74	1,88 x 10 ⁻⁷
				0,15	7,76	2,57 x 10 ⁻⁷

Tabla A3 Continuación.

Base del tampón	pK_{BD}^a	f_B^b	[PhCOCOO ⁻]/M	[Tampón] _T /M	pD	k_{ex}/s^{-1}^c
DPO ₄ ²⁻	7,0	0,5	0,25	0,02	7,04	2,44 x 10 ⁻⁸
				0,05	7,04	3,26 x 10 ⁻⁸
				0,10	7,06	4,74 x 10 ⁻⁸
				0,15	7,08	6,70 x 10 ⁻⁸
	0,5	0,5	0,5	0,0125	7,07	4,26 x 10 ⁻⁸
				0,0250	7,06	4,62 x 10 ⁻⁸
				0,0625	7,06	9,26 x 10 ⁻⁸
				0,125	7,08	1,59 x 10 ⁻⁷
				0,0125	6,49	2,62 x 10 ⁻⁸
				0,0250	6,48	3,46 x 10 ⁻⁸
	0,2	0,2	0,5	0,0625	6,45	4,94 x 10 ⁻⁸
				0,125	6,42	8,62 x 10 ⁻⁸

^a Valores del pK_a aparente del ácido conjugado de la base catalizadora en D₂O a 25 °C y $I=1,0$ (KCl). ^b Fracción del catalizador de Brønsted en su forma básica reactiva. ^c Valores de las constantes de velocidad de primer orden para el intercambio por deuterio del primer protón en posición α de la glicina, determinadas al monitorizar la incorporación de deuterio a la glicina por espectroscopía RMN ¹H.

Tabla B1. Valores de la constante de equilibrio observada para la adición de la glicina al benzaldehído a 25 °C y $I = 1.0$ (KCl).

[Gly] _T /M	[Benzaldehído] _T /M	pD ^a	δ _{CHO} /ppm ^b	δ _H /ppm ^c	A _H ^{IM,d}	A _H ^{BzHO,e}	[Gly] _{le} /M ^f	(K _{add}) _{obsd} /M ⁻¹
0,05	1 x 10 ⁻²	12,93	9,68	8,064	1,0000	0,4570	0,050	43,76
0,10	1 x 10 ⁻²	12,91	9,659	8,064	1,0000	0,2123	0,100	47,12
0,05	1 x 10 ⁻²	12,42	9,687	8,064	1,0000	0,5260	0,050	38,03
0,10	1 x 10 ⁻²	12,39	9,667	8,064	1,0000	0,2366	0,100	42,27
0,50	5 x 10 ⁻³	11,45		8,067				
0,10	1 x 10 ⁻²	11,30	9,691	8,065	1,0000	0,2664	0,100	37,552
0,10	1 x 10 ⁻²	10,97	9,693	8,064	1,0000	0,2949	0,100	33,92
0,50	5 x 10 ⁻³	10,52		8,065				
0,10	1 x 10 ⁻²	10,39	9,695	8,064	1,0000	0,4490	0,100	22,281
0,50	5 x 10 ⁻³	9,56	9,685	8,068	1,0000	0,4898	0,500	4,088
0,10	1 x 10 ⁻²	9,56	9,7	8,065	1,0000	2,0858	0,100	4,804

Tabla B1. Continuación

[Gly] _T /M	[Benzaldehído] _T /M	pD ^a	δ _{CHO} /ppm ^b	δ _H /ppm ^c	A _H ^{IM,d}	A _H ^{BzHO,e}	[Gly] _e /M ^f	(K _{add}) _{obsd} /M ⁻¹
0,50	1 x 10 ⁻²	8,09	9,704	8,077	1,0000	12,9350	0,492	0,157
0,50	5 x 10 ⁻³	8,02	9,704	8,077	1,0000	24,0149	0,496	0,084
0,50	5 x 10 ⁻³	8,00	9,705	8,077	1,0000	22,6641	0,496	0,089
2,00	2 x 10 ⁻²	7,04	9,702	8,156	1,0000	28,0558	1,980	0,018
0,50	1 x 10 ⁻²	7,03	9,705	8,153	1,0000	130,0338	0,481	0,016
2,00	2 x 10 ⁻²	6,64	9,7	8,243	1,0000	51,6386	1,980	0,010
2,00	2 x 10 ⁻²	6,38	9,703	8,328	1,0000	83,4769	1,980	0,006
2,00	2 x 10 ⁻²	5,63		8,539				
2,00	2 x 10 ⁻²	4,99		8,623				

^a Valores del pD de la mezcla de reacción medidos antes realizar los espectros de RMN ¹H, e inmediatamente después; todas las mezclas de reacción contenían 0,1 M de tampón. ^b Valores del desplazamiento químico de los protones del grupo aldehído del benzaldehído. ^c Valores del desplazamiento químico del protón del grupo metino de la imina formada por la glicina y el benzaldehído. ^d Area integrada de la señal del protón del grupo metino de la imina formada por la glicina y el benzaldehído. ^e Area integrada de la señal del protón del grupo aldehído del benzaldehído. ^f Valores de la concentración de glicina en el equilibrio calculada a través de la ecuación 4.2.

Tabla B2. Valores de la constante de equilibrio observada para la adición de la glicina y el 4-piridín carboxaldehído a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl).

[Gly] _T / M	[4-PCHO] _T / M	pD ^a	$\delta_{\text{CH}_2}^{\text{Gly}}$ / ppm	$\delta_{\text{CH}_2}^{\text{IM}}$ / ppm	$\delta_{\text{CH}_2}^{\text{IM}}$ / ppm ^c	$A_{\text{CH}_2}^{\text{Gly}}$	$A_{\text{CH}_2}^{\text{IM}}$	K_{Hyd}^f	[4-PCHO] _e / M ^g	$(K_{\text{add}})_{\text{obsd}}$ / M ⁻¹
0,001	0,005	11,88	2,921	4,087	1,7403	1,0000	2,781	0,0012	468,740	
0,005	0,050	11,64		4,083	0,0969	1,0000	1,325	0,0195	527,906	
0,050	0,005	11,30	2,941	4,090						
0,005	0,005	11,06	2,994	4,088	1,3495	1,0000	0,918	0,0015	494,902	
0,050	0,005	10,47	3,099	4,087	10,4574	1,0000	1,155	0,0003		
0,005	0,005	10,40	3,105	4,089	2,0577	1,0000	1,183	0,0015	315,290	
0,005	0,005	10,03	3,191	4,088	3,1959	1,0000	1,235	0,0017	183,628	
0,100	0,005	9,66	3,252	4,088	23,5163	1,0000	1,250	0,0041	103,877	
0,050	0,005	9,50	3,269	4,087	15,4902	1,0000	1,256	0,0009	74,009	
0,005	0,005	9,44	3,264	7,087	7,9561	1,0000	1,357	0,0019	66,698	
0,500	0,010	7,76	3,311	4,092	267,2642	1,0000	2,352	0,0024	1,542	

Tabla B2. Continuación

[Gly] _{Tr} / M	[4-PCHO] _{Tr} / M	pD ^a	$\delta_{\text{CH}_2}^{\text{Gly}}$ / ppm ^b	$\delta_{\text{CH}_2}^{\text{IM}}$ / ppm ^c	$A_{\text{CH}_2}^{\text{Gly},d}$	$A_{\text{CH}_2}^{\text{IM},e}$	K_{Hyd}^f	[4-PCHO] _e / M ^g	$(K_{\text{add}})_{\text{obsd}}$ / M ⁻¹
0,500	0,010	6,94	3,312	4,094	1150,3655	1,0000	1,422	0,0039	0,220
1,000	0,100	6,05	3,320	4,104	10406,2635	1,0000	1,793	0,0035	0,027
0,500	0,050	5,59	3,312	4,133	10332,2213	1,0000	2,716	0,0134	0,007
1,000	0,100	5,57		4,136					
1,000	0,100	5,38	3,321	4,151	5551,1293	1,0000	3,311	0,0232	0,007
2,000	1,000	4,94	3,358	4,170	298,8337	1,0000	5,128	0,1630	0,003
2,000	1,000	4,77	3,357	4,191	2682,4957	1,0000	6,559	0,1322	0,003
2,000	1,000	4,53		4,218					
2,000	1,000	4,19		4,258					

^a Valores del pD de la mezcla de reacción medidos inmediatamente antes de realizar los espectros de RMN ¹H y una hora después como medida de control, todas las mezclas contenían 0,1 M de tampón para mantener el valor de pD constante. ^b Valores del desplazamiento químico de los protones del grupo metileno de la glicina. ^c Valores del desplazamiento químico de los protones del grupo metileno de la imina formada por glicina y 4-piridín carboxaldehído. ^d Area integrada de la señal debida a los protones del grupo metileno de la glicina. ^e Area integrada de la señal debida a los protones del grupo metileno de la imina formada por glicina y 4-piridín carboxaldehído. ^f Constante de equilibrio de formación del hidrato del 4-piridín carboxaldehído calculada para cada espectro. ^g Valores de la concentración en el equilibrio de la 4-piridín carboxaldehído calculadas a través de la ecuación 4.4.

Tabla B3. Valores de la onstante de equilibrio observada para la adición de la glicina y el *p*-hidroxibenzaldehído a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl).

[Gly] _T /M	[pHBzHO] _T /M	pD ^a	δ _{CHO} /ppm ^b	δ _H /ppm ^c	A _H ^{IM,d}	A _H ^{pHBzHO,e}	[Gly] _e /M ^f	(K _{add}) _{obsd} /M ⁻¹
0,30	0,050	13,19	9,184	7,825	1,000	0,141	0,28	0,501
0,30	0,050	12,57	9,184	7,825	1,000	0,148	0,28	0,524
0,30	0,050	11,91	9,184	7,825	1,000	0,129	0,28	0,460
0,30	0,050	11,54	9,183	7,824	1,000	0,134	0,28	0,475
0,30	0,050	11,48	9,183	7,823	1,000	0,136	0,28	0,483
0,30	0,050	11,10	9,184	7,825	1,000	0,120	0,28	0,429
0,30	0,050	10,61	9,184	7,824	1,000	0,114	0,28	0,409
0,30	0,050	10,58	9,183	7,824	1,000	0,112	0,28	0,399
0,30	0,050	10,08	9,185	7,825	1,000	0,094	0,28	0,339
0,30	0,050	9,57	9,193	7,827	1,000	0,075	0,27	0,272
0,30	0,050	9,41	9,195	7,826	1,000	0,076	0,28	0,277

Tabla B3. Continuación

[Gly] _T /M	[pHBzHO] _T /M	pD ^a	δ _{CHO} /ppm ^b	δ _H /ppm ^c	A _H ^{M,d}	A _H ^{pHBzHO,e}	[Gly] _e /M ^f	(K _{add}) _{obsd} /M ⁻¹
0,30	0,063	9,02	9,216	7,822	1,000	0,069	0,27	0,256
0,30	0,050	8,48	9,272	7,828	1,000	0,049	0,27	0,183
0,30	0,050	7,55	9,399	7,866	1,000	0,018	0,26	0,068
0,50	0,050	6,82	9,446	8,016	1,000	0,010	0,45	0,022
0,50	0,050	6,14	9,457	8,194	1,000	0,006	0,45	0,012
0,50	0,050	5,82	9,460	8,251	1,000	0,005	0,45	0,012
0,70	0,050	5,21	9,461	8,299	1,000	0,006	0,65	0,010
1,00	0,050	4,82	9,461	8,312	1,000	0,010	0,95	0,010
1,00	0,050	4,53	9,461	8,312	1,000	0,009	0,95	0,010
0,50	0,050	3,97		8,321				
1,00	0,050	3,35		8,339				

Tabla B3. Continuación

^a Valores del pD de la mezcla de reacción medidos antes de realizar los espectros de RMN ¹H y una hora después de haberlos realizado como medida de control, todas las mezclas contenían 0,1 M de tampón. ^b Valores del desplazamiento químico de los protones del grupo aldehído del *para* hidroxibenaldehído. ^c Valores del desplazamiento químico del protón del grupo metino de la imina formada por glicina y *p*-hidroxibenaldehído. ^d Área integrada de la señal del protón del grupo metino de la imina formada por glicina y *p*-hidroxibenaldehído. ^e Área integrada de la señal del protón del grupo aldehído del *p*-hidroxibenaldehído. ^f Valores de la concentración de glicina en el equilibrio calculada a través de la ecuación 4.2.

Tabla B4. Valoración de 8 mL de Salicilaldehido $9,25 \times 10^{-3}$ M con KOD 0,5 M, en D₂O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl).

pH	pD ^a	V _{KOD} / μ L ^b	[B ⁻]/[BD] ^c	log([B ⁻]/[BD])
7,29	7,69	10	0,072	-1,140
7,65	8,05	20	0,156	-0,806
7,87	8,27	30	0,254	-0,595
8,05	8,45	40	0,370	-0,431
8,19	8,59	50	0,510	-0,292
8,32	8,72	60	0,682	-0,166
8,42	8,82	70	0,897	-0,047
8,56	8,96	80	1,176	0,071
8,68	9,08	90	1,552	0,191
8,79	9,19	100	2,083	0,319
8,95	9,35	110	2,895	0,462
9,11	9,51	120	4,286	0,632
9,33	9,73	130	7,222	0,859
9,64	10,04	140	17,500	1,243

^a Valores de pD obtenidos al sumar 0,4 unidades al valor de pH obtenido experimentalmente. ^b Volumen de KOD que vamos añadiendo en la valoración. ^c Razón entre las concentraciones del salicilaldehido desprotonado y protonado determinado como $[V_{\text{KOD}} / (148 - V_{\text{KOD}})]$.

Tabla B5. Valores de la constante de equilibrio observada para la adición de la glicina y el o-hidroxibenzaldehído a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl).

[Gly] _T /M	[Salicilaldehído] _T /M	pD ^a	δ _{CHO} /ppm ^b	δ _H /ppm ^c	A _H ^{IM,d}	A _H ^{oHBzHO^e}	[Gly] _e /M ^f	(K _{add}) _{obsd} /M ⁻¹
0,30	1 x 10 ⁻²	13,72	9,822	8,371	1,000	0,540	0,30	1,808
0,30	1 x 10 ⁻²	13,65	9,824	8,376	1,000	0,540	0,30	1,809
0,30	1 x 10 ⁻²	13,37	9,824	8,364	1,000	0,554	0,30	1,856
0,30	1 x 10 ⁻²	12,85	9,823	8,337	1,000	0,611	0,30	2,044
0,30	1 x 10 ⁻²	12,45	9,822	8,301	1,000	0,706	0,30	2,361
0,30	1 x 10 ⁻²	12,40	9,822	8,273	1,000	0,807	0,30	2,700
0,30	1 x 10 ⁻²	12,19	9,822	8,237	1,000	1,043	0,30	3,485
0,30	1 x 10 ⁻²	11,35	9,817	8,138	1,000	3,109	0,30	10,373
0,10	5 x 10 ⁻³	10,99	9,814	8,120	1,000	1,829	0,10	18,295
0,10	5 x 10 ⁻³	10,36	9,809	8,104	1,000	4,318	0,10	43,188
0,10	5 x 10 ⁻³	9,88	9,803	8,102	1,000	5,305	0,10	53,055

Tabla B5. Continuación

[Gly] _T /M	[Salicilaldehído] _T /M	pD ^a	δ _{CHO} /ppm ^b	δ _H /ppm ^c	A _H ^{IM,d}	A _H ^{oHBzHO,e}	[Gly] _e /M ^f	(K _{add}) _{obsd} /M ⁻¹
0,30	1 x 10 ⁻²	9,53	9,790	8,096	1,000	15,991	0,30	53,313
0,30	1 x 10 ⁻²	8,86	9,766	8,089	1,000	10,098	0,30	33,670
0,30	1 x 10 ⁻²	8,36	9,734	8,090	1,000	5,073	0,30	16,921
0,10	5 x 10 ⁻³	7,96	9,720	8,098	1,000	0,911	0,10	9,110
0,10	5 x 10 ⁻³	7,06	9,705	8,109	1,000	0,125	0,10	1,254
0,30	1 x 10 ⁻²	6,22		8,157				
0,10	5 x 10 ⁻³	6,16		8,198				
0,30	1 x 10 ⁻²	5,59	9,700	8,196	1,000	0,047	0,29	0,159
0,30	1 x 10 ⁻²	5,26	9,700	8,335	1,000	0,015	0,29	0,050
0,30	1 x 10 ⁻²	4,76	9,699	8,418	1,000	0,010	0,29	0,034
0,50	1 x 10 ⁻²	4,15	9,700	8,460	1,000	0,015	0,49	0,029

Tabla B5. Continuación

[Gly] _T /M	[Salicilaldehído] _T /M	pD ^a	δ _{CHO} /ppm ^b	δ _H /ppm ^c	A _H ^{IM,d}	A _H ^{oHBzHO^e}	[Gly] _e /M ^f	(K _{add}) _{obsd} /M ⁻¹
0,50	1 x 10 ⁻²	3,51						8,488

^a Valores del pD de la mezcla de reacción medidos antes de realizar los espectros de RMN ¹H y una hora después como medida de control, todas las mezclas contenían 0,1 M de tampón. ^b Valores del desplazamiento químico de los protones del grupo aldehído del *ortho* hidroxil benzaldehído ^c Valores del desplazamiento químico del protón del grupo metino de la imina formada por glicina y *o*-hidroxil benzaldehído. ^d Area integrada de la señal del protón del grupo metino de la imina formada por glicina y *o*-hidroxil benzaldehído. ^e Area integrada de la señal del protón del grupo aldehído del *o*-hidroxil benzaldehído. ^f Valores de la concentración de glicina en el equilibrio calculada a través de la ecuación 4.2.

Tabla C1. Constantes de velocidad de primer orden , k_{ex} , para el intercambio por deuterio del primer protón del grupo metileno de la glicina en presencia de acetona y tampón HFIP en D_2O a $25\text{ }^\circ C$ y $I = 1.0$ (KCl).

Tampón	pK_{BD}^a	f_B^b	[acetona] /M	[Tampón] _T /M	pD	k_{ex}/s^{-1c}
HFIP	9,9	0,8	0,25	0,02	10,48	$(1,48 \pm 0,06) \times 10^{-7}$
				0,05	10,50	$(1,56 \pm 0,12) \times 10^{-7}$
				0,10	10,51	$(1,61 \pm 0,04) \times 10^{-7}$
				0,25	10,51	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-7}$
	0,5	0,1	0,1	0,02	9,87	$(2,40 \pm 0,12) \times 10^{-8}$
				0,05	9,89	$(2,66 \pm 0,03) \times 10^{-8}$
				0,10	9,91	$(2,95 \pm 0,03) \times 10^{-8}$
				0,25	9,94	$(3,95 \pm 0,06) \times 10^{-8}$
	0,25		0,25	0,02	9,94	$(7,30 \pm 0,04) \times 10^{-8}$
				0,05	9,93	$(7,66 \pm 0,12) \times 10^{-8}$
				0,10	9,94	$(8,23 \pm 0,14) \times 10^{-8}$
				0,25	9,97	$(1,01 \pm 0,04) \times 10^{-7}$
	0,5		0,5	0,02	9,98	$(1,58 \pm 0,06) \times 10^{-7}$
				0,05	9,98	$(1,60 \pm 0,07) \times 10^{-7}$
				0,10	9,99	$(1,79 \pm 0,08) \times 10^{-7}$
				0,25	10,03	$(2,20 \pm 0,12) \times 10^{-7}$

Tabla C1. Continuación

Tampón	pK_{BD}^a	f_B^b	[acetona] /M	[Tampón] _T /M	pD	k_{ex}/s^{-1c}
HFIP	9,9	0,2	0,25	0,02	9,27	$(2,16 \pm 0,08) \times 10^{-8}$
				0,05	9,29	$(2,32 \pm 0,08) \times 10^{-8}$
				0,10	9,30	$(2,74 \pm 0,10) \times 10^{-8}$
				0,25	9,32	$(3,50 \pm 0,08) \times 10^{-8}$

^a Valor de pK_a aparente del ácido conjugado de la base catalítica en D_2O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl). ^b Fracción del catalizador de Brønsted en su forma básica reactiva. ^c constantes de velocidad de primer orden para el intercambio por deuterio del primer protón del grupo metileno de la glicina, determinado monitorizando la incorporación de deuterio en la glicina por espectroscopía RMN 1H .

Tabla C2. Constantes de velocidad de primer orden, k_{ex} , para el intercambio por deuterio del primer protón del grupo metileno de la glicina en presencia de benzaldehído en D₂O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl).

[benzaldehído] /M	[DO ⁻]/M	$f_{2\text{-IM}}^a$	$k_{\text{ex}}/\text{s}^{-1}{}^b$
0,015	$5,5 \times 10^{-3}$	0,322	$(4,9 \pm 0,2) \times 10^{-7}$
	$1,5 \times 10^{-2}$	0,310	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^{-6}$
	$5,0 \times 10^{-2}$	0,310	$(4,4 \pm 0,2) \times 10^{-6}$
	$8,0 \times 10^{-2}$	0,297	$(7,3 \pm 0,3) \times 10^{-6}$
	$1,0 \times 10^{-1}$	0,300	$(8,4 \pm 0,3) \times 10^{-6}$

^a Fracción del aminoácido presente en la forma reactiva del aducto imina a la concentración dada de benzaldehído, determinada por análisis de RMN ¹H de una mezcla en equilibrio de la glicina y la imina. ^b Constantes de velocidad de primer orden para el intercambio por deuterio del primer protón del grupo metileno de la glicina, determinada monitorizando la incorporación de deuterio en la glicina por espectroscopía RMN ¹H.

Tabla C3. Constantes de velocidad, k_{ex} , para el intercambio por deuterio del primer protón de la glicina en presencia de salicilaldehído y tampón HFIP en D_2O a 25°C y $I = 1,0$ (KCl).

Tampón	$\text{p}K_{\text{BD}}^a$	f_{B}^b	[aldehído] /M	[Tampón] _T /M	pD	$f_{3\text{-IMD}}^c$	$k_{\text{ex}}/\text{s}^{-1d}$	
HFIP	9,9	0,8	$6,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-2}$	10,53	0,155	$(1,80 \pm 0,04) \times 10^{-6}$	
				$5,0 \times 10^{-2}$	10,57	0,149	$(1,92 \pm 0,05) \times 10^{-6}$	
				$7,5 \times 10^{-2}$	10,54	0,145	$(1,96 \pm 0,02) \times 10^{-6}$	
				0,10	10,57	0,146	$(2,04 \pm 0,03) \times 10^{-6}$	
				0,15	10,55	0,143	$(2,21 \pm 0,01) \times 10^{-6}$	
			$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	10,55	0,391	$(4,66 \pm 0,03) \times 10^{-6}$	
				$5,0 \times 10^{-2}$	10,52	0,393	$(4,80 \pm 0,02) \times 10^{-6}$	
				$7,5 \times 10^{-2}$	10,51	0,377	$(4,90 \pm 0,03) \times 10^{-6}$	
				0,10	10,51	0,391	$(5,21 \pm 0,05) \times 10^{-6}$	
				0,15	10,52	0,388	$(5,79 \pm 0,06) \times 10^{-6}$	
			0,5	$1,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	9,80	0,317	$(7,66 \pm 0,11) \times 10^{-7}$
					$5,0 \times 10^{-2}$	9,82	0,311	$(9,22 \pm 0,15) \times 10^{-7}$
					$7,5 \times 10^{-2}$	9,84	0,313	$(1,00 \pm 0,02) \times 10^{-6}$
					0,10	9,85	0,316	$(1,12 \pm 0,01) \times 10^{-6}$
					0,15	9,86	0,318	$(1,32 \pm 0,02) \times 10^{-6}$
			$5,2 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	9,86	0,730	$(2,03 \pm 0,02) \times 10^{-6}$	
				$5,0 \times 10^{-2}$	9,87	0,730	$(2,34 \pm 0,06) \times 10^{-6}$	
				$7,5 \times 10^{-2}$	9,89	0,731	$(2,68 \pm 0,08) \times 10^{-6}$	
				0,10	9,89	0,731	$(2,95 \pm 0,05) \times 10^{-6}$	

Tabla C3. Continuación

Tampón	pK_{BD}^a	f_B^b	[aldehído] /M	[Tampón] _T /M	pD	f_{3-IMD}^c	k_{ex}/s^{-1d}
		0,2	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	9,35	0,448	$(4,18 \pm 0,04) \times 10^{-7}$
				$5,0 \times 10^{-2}$	9,33	0,445	$(4,80 \pm 0,09) \times 10^{-7}$
				$7,5 \times 10^{-2}$	9,34	0,453	$(5,68 \pm 0,10) \times 10^{-7}$
				0,10	9,32	0,455	$(6,44 \pm 0,08) \times 10^{-7}$

^a Valor del pK_a aparente del ácido conjugado de la base del catalizador en D_2O a 25 °C y $I = 1,0$ (KCl). ^b Fracción del catalizador de Brønsted en su forma básica reactiva. ^c Fracción del aminoácido presente en la forma reactiva del aducto ión iminio a la concentración dada de salicilaldehído, determinada por análisis de RMN 1H de una mezcla en equilibrio de la glicina y la imina. ^d constantes de velocidad de primer orden para el intercambio por deuterio del primer protón del grupo metileno de la glicina, determinado monitorizando la incorporación de deuterio en la glicina por espectroscopía RMN 1H .