

UNIVERSIDAD DE SONORA

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

**Estudio del Mecanismo de la Hidrólisis Ácido-Base de un
Triéster de Fosfato Modelo de Pesticidas Organofosforados
en Mezclas de Acetonitrilo-Agua**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Horacio Coronado Valenzuela

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



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

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Horacio Coronado Valenzuela, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

Dr. David Octavio Corona Martínez
Presidente

Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz
Secretario

M. en C. Sandra Mónica González Martínez
Vocal

M. en C. Ramón Gertrudis Valdez Melchor
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor y maestro, el Dr. David Octavio Corona Martínez, por ser un gran ejemplo de una combinación de saberes, disposiciones, de un modo particular para transmitir el conocimiento y, sobre todo, de su dedicación y profesionalismo para la realización de este proyecto. Le estoy agradecido a su infinita paciencia y a su gran calidad humana, las cuales, me ayudaron a enfrentarme a aquellos momentos de incertidumbre que me afligieron. Gran modelo de tutor, maestro y persona.

A mis sinodales, Dr. Juan Carlos Gálvez Ruíz, M. en C. Sandra Mónica González Martínez y M. en C. Ramón Gertrudis Valdez Melchor, por la revisión y contribución a esta tesis.

A CONACyT por el financiamiento del Proyecto 243275: Estudio del mecanismo de la hidrólisis básica de triésteres de fosfato como modelos plaguicidas de organofosforados (jóvenes investigadores de ciencia básica) y por la beca otorgada para la realización de esta tesis. Número de becario: 24398.

A mis compañeros de laboratorio, Mariana, Josué, Rafael y Enrique, por su apoyo incondicional, cooperación, lealtad y amistad que hemos formado a través del tiempo.

A mis amigos y compañeros de licenciatura: Sergio Valle, Manuel Huerta, Zulema Chalas, Dalia Cruz, Agustín Martínez, con quienes compartí gran parte de mi formación académica. Gracias por la lealtad y el vínculo de amistad que hemos formado a través del tiempo.

A mis mejores amigos, Alexis, América, por su gran comprensión, empatía, honestidad y, sobre todo, por la gran amistad que hemos mantenido a través de los años.

DEDICATORIA

*A Dios, a mi madre, a mi padre, a mis hermanos,
y en memoria de mis abuelos:
Lupita y David.*

CONTENIDO

| | Página |
|---|---------------|
| FORMA DE APROBACIÓN | 3 |
| AGRADECIMIENTOS | 4 |
| DEDICATORIA | 5 |
| LISTA DE TABLAS | 8 |
| LISTA DE FIGURAS | 9 |
| RESUMEN | 11 |
| INTRODUCCIÓN | 12 |
| OBJETIVOS | 13 |
| General | 13 |
| Específico | 13 |
| ANTECEDENTES | 14 |
| Ésteres de Fosfato | 14 |
| Inhibición de la Acetilcolinesterasa | 16 |
| Química del Fósforo | 18 |
| Hidrólisis de Triésteres de Fosfato | 19 |
| Efecto del Disolvente | 21 |
| Efecto en el Mecanismo de Reacción | 22 |
| Equilibrio Ácido-Base | 23 |
| Catálisis | 24 |
| Catálisis Ácido-Base | 25 |
| Catálisis con Guanidina | 25 |
| Guanidina en la Ruptura de Ésteres de Fosfato | 26 |
| METODOLOGÍA | 29 |
| Reactivos | 29 |
| Sustrato | 30 |
| Síntesis del DPPNPP | 30 |
| Disolventes | 31 |
| Equipo | 32 |
| Programas | 32 |
| Estudios Cinéticos | 32 |
| Perfil de Concentración y Neutralización | 34 |

| | |
|---|----|
| Cálculo de la Constante de Catálisis Básica Específica | 36 |
| Estudios Potenciométricos | 37 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 39 |
| Cambio de Disolvente: Dimetilformamida por Acetonitrilo | 39 |
| Determinación de pK_w del Agua y de pK_a de Guanidina en Mezclas MeCN-Agua | 41 |
| Efecto de la Catálisis Básica Específica | 44 |
| Efecto de la Guanidina en la Ruptura del DPPNPP | 48 |
| CONCLUSIONES | 60 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 61 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|--------------|---|---------------|
| 1 | Estructura y características principales de los reactivos utilizados | 28 |
| 2 | Valores calculados de pK_w en las diferentes mezclas acetonitrilo-agua estudiadas | 40 |
| 3 | Valores calculados de pK_a en las diferentes mezclas acetonitrilo-agua estudiadas | 42 |
| 4 | Efecto del acetonitrilo en la constante de la catálisis básica específica para el rompimiento del DPPNPP | 44 |
| 5 | Valores obtenidos para las constantes de rapidez de los porcentajes de neutralización de guanidina en mezclas acetonitrilo-agua del 10 al 60% | 48 |
| 6 | Efecto del acetonitrilo en la catálisis básica general del DPPNPP a 37 °C | 50 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Estructuras generales de un monoéster, diéster y triéster de fosfato | 13 |
| 2 | Fosforilación de la glucosa | 14 |
| 3 | Estructura del AMPc, ejemplo de un diéster de fosfato | 14 |
| 4 | Estructuras de los compuestos tabún (a), paraoxón (b) y sarín (c) | 15 |
| 5 | Síntesis y reciclado de acetilcolina durante la sinapsis | 16 |
| 6 | Mecanismo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por un éster organofosforado | 17 |
| 7 | Comparación de mecanismos de la hidrólisis alcalina de triésteres de fosfato | 18 |
| 8 | Efecto del disolvente en el mecanismo de reacción de la SN | 21 |
| 9 | Perfil de energía de Gibbs para una reacción sin catalizar (a) y una reacción catalizada por ácido (b) | 23 |
| 10 | Molécula de guanidina | 25 |
| 11 | Estructuras de resonancia de la guanidina | 25 |
| 12 | Interacción del grupo guanidinio con fosfodiésteres | 26 |
| 13 | Estructura del difenil, <i>p</i> -nitrofenil fosfato | 29 |
| 14 | Reacción de síntesis del DPPNPP | 30 |
| 15 | Reacción de ruptura del DPPNPP mediante una catálisis ácido-base | 32 |
| 16 | Ajuste de la ecuación para la formación del 4-nitrofenolato durante la ruptura del DPPNPP | 33 |
| 17 | Perfiles posibles de la variación de las constantes de rapidez en función de la concentración del catalizador | 34 |
| 18 | Perfil de neutralización | 35 |
| 19 | Perfil de catálisis básica específica para la ruptura del DPPNPP | 35 |
| 20 | Gráfica de volumen de base añadida contra pH corregido | 37 |
| 21 | Titulaciones potenciométricas para la determinación de pK_w en DMF acuoso | 38 |
| 22 | Ajuste de la formación del 4-nitrofenolato en la mezcla de DMF acuoso al 70% con guanidina neutralizada al 50% | 39 |
| 23 | Efecto del acetonitrilo sobre los valores de pK_w en las diferentes mezclas estudiadas a 37°C con una fuerza iónica de 0.1 mol L ⁻¹ | 41 |

| | | |
|----|---|----|
| 24 | Relación del pK_w con el inverso de la permitividad dieléctrica en mezclas de MeCN-agua del 10 al 60% a 37°C | 42 |
| 25 | Variación de la constante de rapidez frente la concentración de iones hidróxido en función del porcentaje de MeCN. | 44 |
| 26 | Dependencia del logaritmo de las constantes de la catálisis básica específica en función de la permitividad dieléctrica. | 45 |
| 27 | Relación de Brønsted para la catálisis básica específica en función del pK_w del medio. | 46 |
| 28 | Dependencia de la catálisis básica específica en función del contenido de MeCN en la mezcla binaria. | 47 |
| 29 | Perfil de concentración en la catálisis del DPPNPP con guanidina neutralizada al 20, 50 y 80% en MeCN al 10%. | 49 |
| 30 | Efecto de la neutralización del amortiguador en la k_{Gu} para las mezclas de acetonitrilo del 20 al 50%. | 50 |
| 31 | Productos alternos de la hidrólisis del DPPNPP. | 51 |
| 32 | Efecto del acetonitrilo en la catálisis con guanidina para la ruptura del DPPNPP a 37 °C. | 52 |
| 33 | Ajuste en la mezcla de acetonitrilo al 50% en el perfil de concentración corregido con guanidina neutralizada al 50% para el rompimiento del DPPNPP. | 53 |
| 34 | Corrección de la contribución de la catálisis básica específica para el rompimiento del DPPNPP en las mezclas de acetonitrilo al: a) 40 y b) 60% con guanidina neutralizada al 80%. | 54 |
| 35 | Relación entre el logaritmo de las constantes de la catálisis básica general y el parámetro de Kirkwood | 56 |
| 36 | Mecanismos propuestos para la a) catálisis básica general y la b) catálisis básica específica para la ruptura del DPPNPP. | 57 |

RESUMEN

En el presente trabajo se muestra el estudio cinético de la reacción de hidrólisis ácido-base del difenil *p*-nitrofenilfosfato (DPPNPP), sustrato modelo del pesticida paraoxón. Los experimentos se hicieron en mezclas binarias de acetonitrilo con agua en diferentes proporciones volumen/volumen, desde 10% hasta 60% de acetonitrilo, a una temperatura de 37°C en presencia del amortiguador guanidina-guanidinio. En las mezclas estudiadas, se observó que el pK_w aumenta conforme aumenta la proporción de acetonitrilo, mostrando un desplazamiento del valor de 13.88 hasta 15.59, lo que favorece la catálisis por el amortiguador empleado. También se determinó el valor de pK_a de la guanidina en las mezclas estudiadas, observándose que mientras aumentaba la proporción de la parte orgánica, el valor disminuía, mostrándose un desplazamiento de 13.34 a 12.55. Para determinar el mecanismo de reacción se realizaron perfiles de la variación de la constante de rapidez observada con la concentración total del amortiguador en diferentes grados de neutralización (20%, 50% y 80% neutralizado) y además un perfil de catálisis básica específica con hidróxido de tetrametilamonio. De los perfiles de la variación de la constante de rapidez con respecto a la concentración del amortiguador y el grado de neutralización, se obtuvo la siguiente ecuación de rapidez: $k_{obs} = k_B[Gu] + k_{OH}[OH] + k_0$. De la ecuación de la velocidad se concluye que hay varias rutas catalíticas posibles en la ruptura del DPPNPP en el medio estudiado. Una de estas rutas implica una catálisis básica general con constante de velocidad k_B . La catálisis por guanidina libre presenta un efecto de disolvente y ésta se observa en las mezclas de acetonitrilo-agua del 40 al 60 por ciento.

INTRODUCCIÓN

Muchos trabajos de investigación han informado la importancia de diversos ésteres de fosfato, tal como los monoésteres y diésteres, los cuales tienen actividad biológica en diversos procesos de los organismos vivos. En esta misma clasificación de ésteres de fosfato, se encuentran los triésteres de fosfato, los cuales son compuestos de alta toxicidad para los organismos vivos y su uso se conoce desde la segunda guerra mundial, como arma química.

Diversos trabajos de investigación relacionan una serie de diagnósticos clínicos con el uso de plaguicidas organofosforados para el control de las plagas en la agricultura. Aun así, la exposición no está limitada al medio laboral, sino también a la exposición a través de alimentos y agua contaminados, además de la exposición ambiental (Yanggen y col., 2003).

El paraoxón, un pesticida organofosforado comercial, es muy utilizado en la agricultura para la destrucción de plagas. Se ha confirmado la toxicidad de este pesticida, el cual inhibe la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, mediadora de los influxos nerviosos en el organismo, causando una serie de manifestaciones clínicas derivadas de la intoxicación. Por lo tanto, es importante desarrollar catalizadores que puedan degradar los pesticidas, o transformarlos en compuestos menos tóxicos mediante el uso de reacciones químicas con sistemas sencillos.

Existen estudios acerca del mecanismo de hidrólisis tanto de mono, como de diésteres de fosfato y de triésteres. Para estos últimos, solamente se han sugerido mecanismos teóricos, de los cuales se mencionan ataques nucleofílicos del tipo S_N2 en medios alcalinos (Tarrat, 2010).

Para la realización de este trabajo, se ha sintetizado el difenil, *p*-nitrofenil fosfato, un compuesto organofosforado que funciona como modelo del pesticida organofosforado paraoxón (en el cual los dos fenilos se sustituyen por dos grupos etilo), del cual se estudiará su catálisis ácido-base mediante el amortiguador guanidinio/guanidina, utilizando mezclas de agua con acetonitrilo, un disolvente orgánico.

OBJETIVOS

General

Estudiar el mecanismo de la ruptura ácido-base de un triéster de fostato, difenil, *p*-nitrofenil fosfato, modelo de pesticidas organofosforados en mezclas de acetonitrilo-agua mediante la obtención de la ley de rapidez.

Específicos

Determinar las constantes de rapidez de la hidrólisis del difenil, *p*-nitrofenil fosfato (DPPNPP) en las mezclas de acetonitrilo-agua (de 10 en 10 por ciento de variación) con guanidina como catalizador, neutralizada al 50%.

Medir las constantes de rapidez de la hidrólisis con iones hidróxido del DPPNPP en las mezclas de acetonitrilo-agua (de 10 en 10 por ciento de variación).

Determinar la ley de rapidez de la reacción en las mezclas de acetonitrilo-agua de mayor actividad catalítica y con ello el mecanismo de reacción.

Analizar el efecto de las mezclas acetonitrilo-agua en el mecanismo de hidrólisis del DPPNPP.

ANTECEDENTES

Ésteres de fosfato

El fósforo es un elemento vital en la composición de la materia viva y no se conoce un organismo vivo que no utilice la química de este elemento (Domingos y col., 2003). Los ésteres de fosfato juegan un papel central en la estructura, operación y replicación de sistemas vivos (Thatcher y Kluger, 1989). Participan en el almacenamiento y transferencia de información genética, transportan energía química y regulan la actividad de enzimas y moléculas de señalización en la célula (Mitra y Atwood, 2006)

Los ésteres de fosfato son extremadamente numerosos y pueden clasificarse en mono, di y triésteres, de acuerdo con el número de grupos éster presentes. Los monoésteres y diésteres de fosfato contienen grupos hidroxilo en su estructura, caracterizándose, por lo tanto, como ésteres con una funcionalidad equivalente a la de ácidos dipróticos o monopróticos, respectivamente (Domingos y col., 2003) (Figura 1).

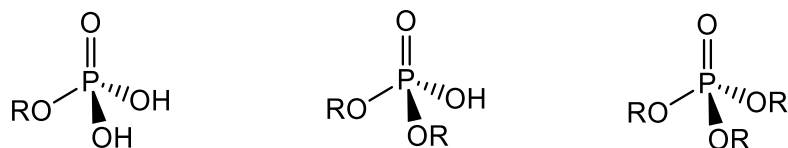


Figura 1. Estructuras generales de un monoéster, diéster y triéster de fosfato.

Un ejemplo de monoéster de fosfato es el formado en el primer paso del proceso de glucólisis. La glucosa empieza, con el uso del ATP, para formar glucosa-6-fosfato (Freeman, 2009). La glucólisis es un proceso por el que los organismos escinden la glucosa en ácido láctico en ausencia de oxígeno molecular con el propósito de obtener energía (Figura 2). Los carbohidratos constituyen la principal fuente de energía en la dieta humana (aproximadamente el 47%) y la mayor parte de estos corresponde a polisacáridos tales como glucógeno y almidón. El resto a glucosa y disacáridos como lactosa y maltosa (Garrido y Teijón, 2006).

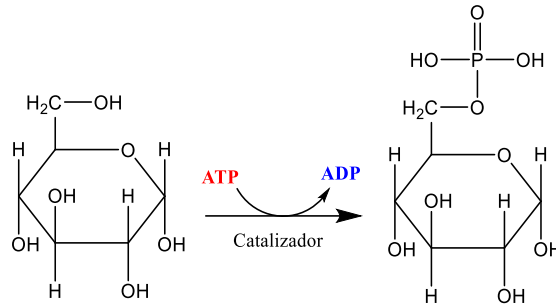


Figura 2. Fosforilación de la glucosa.

Por otro lado, en los diésteres de fosfato, se encuentra el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). El AMPc es un segundo mensajero involucrado en la actividad de transcripción de genes que median la progresión del ciclo celular, diversas respuestas celulares y las respuestas inmunitarias innata y adaptativa. Esta molécula puede regular la actividad funcional de células T reguladoras, T convencionales y de células presentadoras de antígeno (Rueda, 2012) (Figura 3).

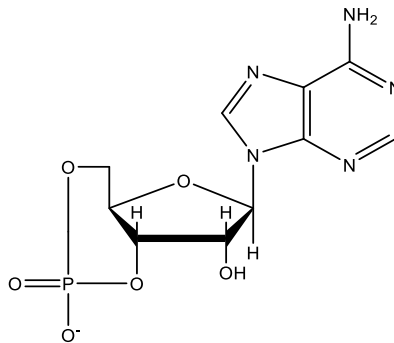


Figura 3. Estructura del AMPc, ejemplo de un diéster de fosfato.

Como se observó anteriormente, la actividad de los mono y diésteres de fosfato en organismos vivos es diversa, sin embargo, los triésteres de fosfato son compuestos tóxicos. Los triésteres de fosfato se desarrollaron después de la II Guerra Mundial, a partir de los gases de guerra (gas sarín, tabún, entre otros). En el último tercio del siglo XX se generalizó su uso, debido a que representaban una excelente alternativa a los pesticidas persistentes organoclorados dentro del sector agrícola para el control de plagas (Rebello y col, 2007). A diferencia de estos últimos, los organofosforados son mucho menos estables en el ambiente. A pesar de ello, estos compuestos pueden provocar efectos adversos en especies de vida silvestre, como

intoxicaciones agudas (Robles y col., 2007). No obstante, el uso más frecuente de los compuestos organofosforados es en la agricultura, fundamentalmente como insecticidas (Cardona, 2008) (Figura 4).

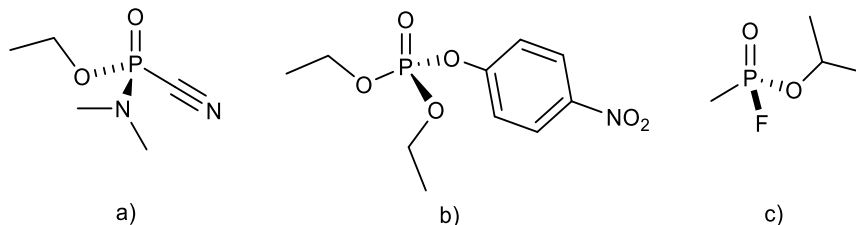


Figura 4. Estructuras de los compuestos tabún (a), paraoxón (b) y sarín (c), ejemplos de compuestos organofosforados.

Es interesante que los compuestos organofosforados fueron seleccionados por el hombre para desarrollar pesticidas, insecticidas y gases de guerra, esto debido a que los enlaces P–O son ideales, ya que se vuelven resistentes a la acción del agua, suelo y aire, de modo que puedan alcanzar su objetivo sin ser alterados químicamente (Domingos y col., 2003).

Inhibición de Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa actúa en la hidrólisis de la acetilcolina (dando lugar a acetato y colina), el mediador de los influjos nerviosos en las terminaciones de las fibras postganglionares del sistema parasimpático y en el sistema nervioso central. La inhibición de la enzima lleva a la acumulación de la acetilcolina, responsable de las manifestaciones clínicas de la intoxicación (Lauwerys, 1994). Algunos estudios han informado una asociación entre trabajar en actividades agrícolas y un bajo desempeño en pruebas de memoria visual, memoria de trabajo, velocidad de procesamiento y coordinación visomotora, pero no todas las investigaciones coinciden en sus resultados. (Muñoz y col., 2016).

Para entender el mecanismo de acción de los organofosforados, es necesario entender el de la sinapsis colinérgica y, en especial, el de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Cuando la neurona presináptica recibe un estímulo, las vesículas con el neurotransmisor (acetilcolina, ACh) se aproximan a la membrana celular, se fusionan con ella y liberan su contenido (ACh) al espacio

extracelular. Aquí, la ACh, puede seguir tres caminos: unirse a sus receptores en la membrana postsináptica (transmitiendo el impulso nervioso), unirse a receptores de la recaptación de la neurona presináptica (volviéndose a almacenar) o quedar libre en el espacio sináptico, donde será metabolizada por la AChE, separándose en acetato y colina. Mediante la enzima colinoacetiltransferasa (CAT) formará ACh que volverá a almacenarse en las vesículas presinápticas (Figura 5) (Robles y col., 2007).

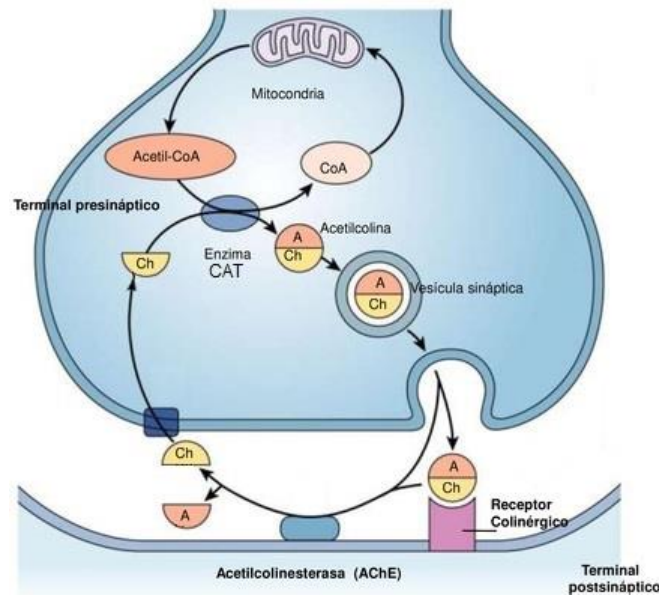


Figura 5. Síntesis y reciclado de acetilcolina durante la sinapsis. A: Acetato; Ch: Colina.

Modificado de: Silverthorn, 2008

Los compuestos organofosforados desarrollan su toxicidad a través de la fosforilación de la enzima acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas. Estos reaccionan con la zona esterásica de la enzima colinesterasa formando una unión estable, quedando la enzima inhabilitada para su función normal (Figura 6). La pérdida de la función enzimática permite la acumulación de acetilcolina en las uniones colinérgicas neuroefectoras, en las uniones mioneurales del esqueleto y los ganglios autónomos y en el sistema nervioso central (SNC) (Fernández y col., 2010).

Cuando la acetilcolinesterasa es inhibida irreversiblemente por un éster organofosforado, la restauración de la actividad enzimática dependerá exclusivamente de la síntesis de nuevas moléculas de enzima (Lauwerys, 1994).

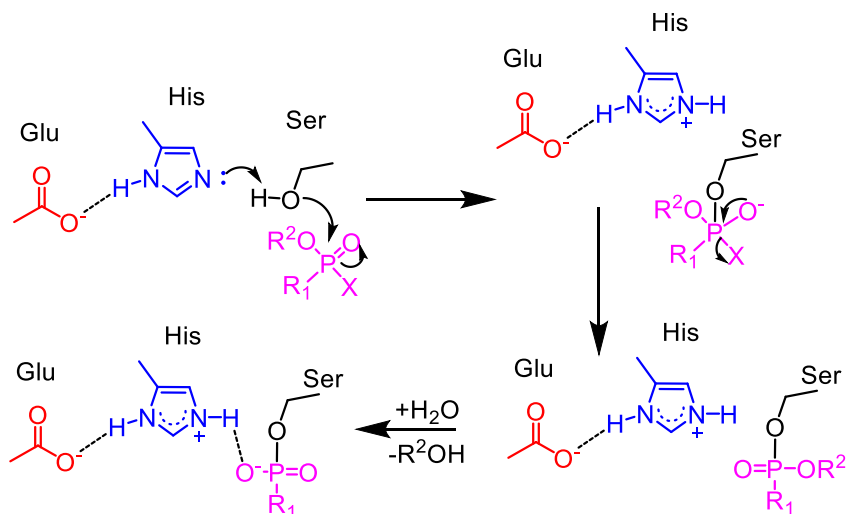


Figura 6. Mecanismo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por un éster organofosforado.

Adaptado de: Jang y col., 2015.

Química del Fósforo

El átomo de fósforo, con cinco electrones de valencia, forma muchos compuestos estables en el estado de oxidación 5+ (Domingos y col. 2003). Muchos estudios sobre la reactividad de las especies con fósforo mediante sustitución nucleofílica están dirigidos a una mejor comprensión de la bioquímica de las biomoléculas que contienen fósforo (Bethell, 1989). Los ataques nucleofílicos al fósforo, dependiendo del grupo saliente, pueden llevar a la formación de un intermediario pentavalente (llamado "fosforano") o formar directamente los productos de la reacción de sustitución. Un caso típico es la reacción de hidrólisis alcalina de organofosforados. En el mecanismo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, se cree que existe la formación de un intermediario fosforano, donde el ataque nucleofílico es el paso determinante para este. Algunos estudios teóricos han confirmado esta vía, que concuerda con los datos experimentales. Se ha sugerido un mecanismo S_N2 para su hidrólisis y la de compuestos relacionados (Figura 7) (Tarrat, 2010). Para la hidrólisis de un simple monoéster de fosfato, este puede proceder por múltiples mecanismos de reacción diferentes, con la vía precisa dependiendo de la naturaleza del grupo saliente, el pH y el entorno electrostático (por ejemplo, el sitio activo de una enzima), entre otros factores. (Pabis y col., 2016).

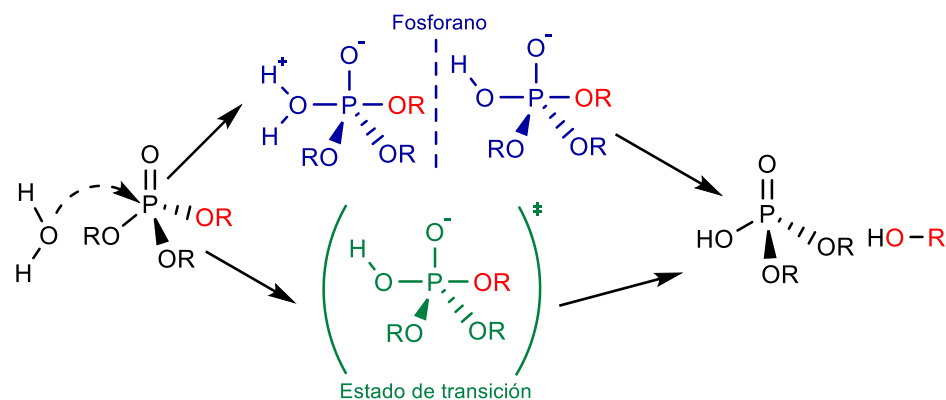


Figura 7. Comparación de mecanismos de la hidrólisis alcalina de triésteres de fosfato.

Adaptado de: Tarrat, 2010.

Hidrólisis de Triésteres de Fosfato

Actualmente, diversos grupos de investigación han trabajado con la hidrólisis de triésteres de fosfato. Tal es el caso de Sharma y colaboradores (2016), quienes estiman la eficiencia nucleofílica de surfactantes de piridinio, el bromuro de 3-hidroxiiminometil-1-alkilpiridinio y el bromuro de 4-hidroxiiminometil-1-alkilpiridinio para la degradación de pesticidas como el paraoxón y metil paraoxón en micelas con agentes catiónicos surfactantes, como bromuro de cetilpiridinio (CPB), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y bromuro de cetildimetiletanolamonio (CDMEAB). Sugieren que, mediante el modelo de pseudofase micelar con intercambio iónico, la micela, cargada positivamente, se une a los iones OH y a las formas protonadas y desprotonadas de las especies surfactantes, disminuyendo la constante de acidez (pK_a). Al mismo tiempo, el contraión del agente surfactante tendería a desplazar al nucleófilo desde la superficie de la micela. Por otro lado, Taran y colaboradores (2008) proponen la ruptura de dos diésteres de fosfato, el bis (4-nitrofenil) fosfato y el 2-hidroxiopropil-4-nitrofenil fosfato, y de un triéster, el 4-nitrofenil difenil fosfato en presencia de metales alcalinotérreos como magnesio (Mg), calcio (Ca) y estroncio (Sr), en mezclas de DMSO acuoso al 90% a 37 °C. Informan que la hidrólisis alcalina del triéster fue inhibida por todos los cationes, pero en ambos diésteres de fosfato sí se observó catálisis. Sugieren, además, que la actividad catalítica incrementada en DMSO acuoso al 90% se atribuye a una asociación más fuerte de los iones hidróxido y de los fosfodiésteres aniónicos con iones metálicos, y a una solvatación preferente de los cationes por el DMSO, lo que crea un microambiente de reacción favorable para el catalizador. El grupo de Orth y colaboradores (2015) informa la ruptura en medio acuoso del dietil 4-nitrofenil fosfato (Paraoxón), disuelto en acetonitrilo

a una concentración de 0.01 mol L^{-1} , con una disolución amortiguadora de imidazol (IMZ) a 20°C . Reportan que este amortiguador acelera la reacción en un orden de 10^6 . Proponen que el IMZ, en condiciones básicas ($\text{pH} > 9.5$), ataca el centro de fósforo como un nucleófilo, liberando el producto fenólico 4-nitrofenolato, formando un intermediario, el cual subsecuentemente se hidroliza, liberando el ion fosfato y regenerando el catalizador. En el trabajo realizado por Gellman y colaboradores (1986), utilizan un complejo de zinc con macrociclos tetraaza en mezclas de MeCN acuoso al 50 por ciento para la ruptura del DPPNPP. Los estudios cinéticos muestran que las especies catalíticas de zinc forman hidroxocomplejos. En el trabajo se sugieren dos tipos posibles de mecanismos para el rompimiento del triéster de fosfato. Uno de ellos es que exista un ataque nucleofílico al átomo de fósforo, esto por el hidróxido unido al zinc. El otro mecanismo involucra una activación electrofílica del enlace P–O, por una coordinación del fosfato al zinc, y un ataque posterior por el hidróxido. En el caso de Say y colaboradores (2005) proponen microesferas poliméricas imitadoras de la fosfotriesterasa preparadas mediante una técnica de impresión de superficie molecular, esto para la catálisis selectiva del agente nervioso paraoxón. Para ello, combinaron la impresión molecular con la capacidad de la histidina para complejar iones metálicos y así crear un centro activo de fosfotriesterasa en la superficie de las microesferas. Para esta propuesta, sintetizaron agentes quelantes metálicos: metacrililoil-histidina-cobre (II) [MAH-Cu(II)] y metacrililoil-histidina-cobre(II)-paraoxón [MAH-Cu(II)]. En este estudio, se evaluó la actividad de hidrólisis de la fosfodiesterasa mediante una cinética de Michaelis-Menten. Reportan que al incrementar el valor de pH ($\text{pH} = 9$), se incrementa la actividad de hidrólisis con la presencia de las microesferas impresas, utilizando una concentración de 100 mmol L^{-1} de paraoxón. Mencionan que el monómero MAH-Cu(II) no mostró un comportamiento enzimático-cinético, ya que no se observó una región de saturación como en la cinética enzimática. Comentan que para una cinética de Michaelis-Menten, la constante k_m refleja la afinidad de una enzima para un sustrato particular. Cuanto menor sea el valor de la constante, mayor será la afinidad de la enzima. Reportan que la constante para el monómero representa la afinidad de grupos funcionales del modelo de la fosfodiesterasa hacia el paraoxón. Sugieren que la actividad hidrolítica de los monómeros se debe principalmente a la unión entre iones cobre(II) y las esferas de coordinación libres que formaron una cavidad impresa durante la polimerización (molde, conformado según afinidad) y protegieron los sitios catalíticos de los polímeros impresos para imitar la fosfotriesterasa. Wong y Gao (2007) realizaron simulaciones de dinámica molecular que emplean potenciales de mecánica cuántica (QM) y mecánica molecular (MM) para investigar el mecanismo de la hidrólisis de paraoxón por fosfotriesterasas (PTE). El modelo de PTE utilizado consiste en un homodímero de 329 aminoácidos en cada monómero, donde se pliega en forma

de barril con dos cadenas antiparalelas β en el extremo amino. El sitio activo está situado en el extremo carboxilo terminal en el centro del núcleo de la lámina β y contiene un centro dinuclear, en el cual dos cationes de zinc están enlazados con cuatro residuos de histidina y un puente hidróxido. Particularmente, determinan las energías intrínsecas (en fase gaseosa) del sitio activo usando la teoría funcional de la densidad (B3LYP) y la teoría de perturbación de Moller-Plesset de segundo orden (MP2). También realizaron simulaciones de energía libre de dinámica molecular utilizando el potencial mixto AM1: CHARMM. El mecanismo soportado por los cálculos teóricos indica que el paraoxón coordina con uno de los iones zinc, después el hidróxido puente, que tiene una nucleofilia aumentada ataca al átomo de fósforo, liberando así el 4-nitrofenol (este se protona con el residuo de histidina 254 del sitio activo). Una vez liberado el grupo saliente, entra una molécula de agua que se coordina entre los dos iones zinc y al unirse puede ser desprotonada fácilmente, ya sea por el residuo de histidina 254 o por otra molécula de agua, debido a su acidez. Al ocurrir esto, se facilita la salida de diéster y se restaura el sitio activo. En el trabajo de Tarrat (2010) se estudia la hidrólisis alcalina de seis diferentes triésteres de dimetilfosfato. Concluye que, para los ésteres con grupos salientes débiles, la reacción ocurre mediante un mecanismo por pasos, mientras que en aquellos ésteres con buenos grupos salientes la hidrólisis se lleva a cabo por un mecanismo concertado. El ataque del ion hidróxido tiene las mismas características para los seis ésteres. Por lo tanto, la diferencia entre la presencia del mecanismo de pasos o concertado para la hidrólisis, solo depende del grupo saliente, lo cual debe tomarse en cuenta cuando se predicen los productos de la hidrólisis de triésteres, tales como los organofosforados.

Efecto del Disolvente

Las reacciones químicas pueden realizarse en estado gaseoso, líquido o sólido, pero la gran mayoría de éstas se llevan a cabo en la fase líquida (Reichardt, 2007). Los disolventes juegan un papel importante en la determinación de la reactividad química, desplazan los equilibrios químicos, alteran las características espectrales de los solutos y modifican la rapidez de las reacciones químicas (Catalán, 1997). En particular, la rapidez de una reacción puede cambiar en órdenes de magnitud cuando se cambia el disolvente (Ghosh, 2001). El efecto de tal cambio en la velocidad es, a menudo, muchas veces mayor que el producido por un cambio de estructura molecular (Arnett, 1965). Una importante propiedad de un disolvente es su constante dieléctrica (permitividad), que puede considerarse como una medida de la capacidad de un material de moderar la fuerza de atracción entre partículas con cargas opuestas (Carey, 2014). Cuanto más

pequeña es la permitividad, mayores son las fuerzas de atracción entre iones opuestos del soluto. En disolventes de elevada constante dieléctrica, los enlaces iónicos se rompen totalmente y los pares iónicos están totalmente disociados (Baeza, 2011). Los disolventes con altas constantes dieléctricas se clasifican como disolventes polares, y los que tienen constantes dieléctricas bajas son no polares (Carey, 2014).

Efecto en el Mecanismo de Reacción

En función del disolvente utilizado, un sustrato puede reaccionar por mecanismos de reacción completamente diferentes y, a veces, dar productos de reacción diferentes a partir de los mismos miembros de reacción, simplemente cambiando el disolvente (Reichardt, 1982). Tal es el caso en las reacciones de sustitución nucleofílica. Los disolventes polares son necesarios en las sustituciones bimoleculares debido a que las sustancias iónicas no son apreciablemente solubles en disolventes no polares para alcanzar una concentración lo suficientemente alta del nucleófilo que permita que la reacción ocurra con una rapidez razonable. Lo más importante en una reacción S_N1 o S_N2 es si el disolvente polar es prótico o aprótico (Carey, 2014) (Figura 8). Las reacciones S_N1 suceden mucho más rápidamente en disolventes fuertemente polares y próticos, debido a que la energía en el estado de transición que conduce al intermediario es disminuida por la solvatación. Los efectos del disolvente en una reacción S_N2 se deben en gran medida a la estabilización del nucleófilo reactivo (McMurry, 2012). Los disolventes próticos, como el agua, tienen todos los grupos OH que les permiten formar enlaces de hidrógeno con nucleófilos aniónicos. La aglomeración de moléculas de un disolvente prótico (solvatación) alrededor de un anión suprime su nucleofilia y disminuye la rapidez de sustitución molecular. Los disolventes apróticos carecen de grupos OH y no solvatan los aniones con mucha fuerza, lo que permite que tengan mayor capacidad de expresar su carácter nucleofílico (Carey, 2014). Tal efecto resulta conveniente en el estudio de los mecanismos de reacción, ya que puede emplearse como herramienta de diagnóstico mecanístico.

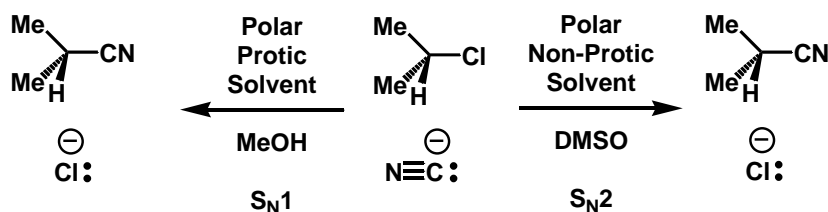


Figura 8. Efecto del disolvente en el mecanismo de reacción de la SN.

Equilibrio Ácido Base

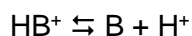
La variación del pKa frente a la composición del disolvente depende de las características de las interacciones soluto-disolvente sobre el comportamiento del equilibrio en mezclas acuosas-orgánicas (Sanli, 2014). La adición de disolvente orgánico en agua modifica la orientación real de una molécula en solución acuosa y las propiedades de solubilidad. Esto trae un cambio en sus interacciones hidrófobas y dipolo-dipolo, interacciones entre disolvente-disolvente, soluto-disolvente y soluto-soluto (Mahali 2016).

De acuerdo con la definición de Brønsted-Lowry, los ácidos y las bases son donadores y aceptores de protones, respectivamente. En solución, una reacción ácido-base tendrá lugar sólo en presencia de una base que posea una afinidad hacia el protón más alta que la base conjugada. Dado que la mayoría de los disolventes poseen propiedades ácidas o básicas, las concentraciones de ácidos y bases dependen del medio en el que se disuelven. El equilibrio de ionización de un ácido o de una base, se ve afectado por un cambio de disolvente, no sólo debido a la acidez o basicidad del disolvente, sino también debido a su permitividad relativa y a la capacidad del disolvente para solvatar las diversas especies. Un cambio en la permitividad relativa o en capacidad de solvatación puede influir así en la acidez de un ácido o en la basicidad de una base (Reichardt 2003).

Algo conocido es que los iones se estabilizan por los disolventes polares, ya que los dipolos electrostáticos interactúan directamente con las cargas eléctricas de los iones y la permitividad dieléctrica disminuye la tendencia de los iones a reasociarse (Fersht, 1980). La ionización de un ácido neutro disminuye con la adición de un disolvente de baja polaridad a una solución acuosa como en la ecuación que se muestra a continuación (Cox, 2013):



La razón por la cual los ácidos neutros se ionizan menos en disolventes de menor permitividad dieléctrica se debe a que en su disociación se genera dos iones. Lo anterior no se favorece ya que el disolvente será menos eficiente en estabilizar las nuevas cargas generadas (hay que recordar que la permitividad dieléctrica es la capacidad de separar cargas). Por otra parte, la ionización de un ácido catiónico es muy poco sensible a la polaridad del disolvente y a su permitividad dieléctrica ya que no hay variación de carga en el equilibrio, como se muestra en la ecuación siguiente (Cox, 2013):



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

Catálisis

Un catalizador es una sustancia que participa en las reacciones químicas mediante el aumento de la rapidez de la reacción, aunque el catalizador queda intacto después de completarse la reacción. La función general de un catalizador es proporcionar un mecanismo alternativo por el que los reactantes se convierten en productos. La presencia de un nuevo mecanismo de reacción, implicando al catalizador, requiere una segunda coordenada de reacción que conecte reactivos y productos. La energía de activación según esta segunda coordenada de reacción será más baja que con la coordenada de reacción de la reacción sin catalizar, por tanto, la velocidad de la reacción global crecerá. Para ser efectivo, un catalizador debe combinarse con uno o más reactantes o con una especie intermedia implicada en la reacción. Después de que la reacción tenga lugar, se libera el catalizador y se puede combinar con otro reactante o intermedio en una reacción subsecuente. El catalizador no se consume durante la reacción, de forma que una pequeña cantidad de catalizador puede participar en numerosas reacciones. (Figura 9) (Engels, 2006).

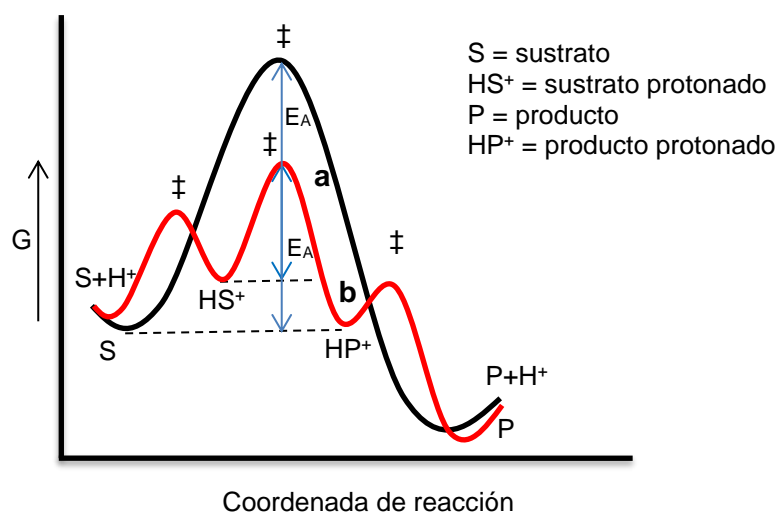


Figura 9. Perfil de Energía de Gibbs para una reacción sin catalizar (a) y una reacción catalizada por ácido (b).

Fuente: Corona, 2011.

Catálisis Ácido Base

El estudio de la catálisis de ácidos y bases ha desempeñado un papel muy importante en el desarrollo de la cinética química, ya que muchas de las reacciones examinadas al iniciarse en este campo fueron de dicho tipo (Laidler, 1997). Hay muchas reacciones químicas que son catalizadas por ácidos, por bases o por ambos. El catalizador ácido más común en solución acuosa es el ion hidronio y el básico más común es el ion hidróxido. No obstante, ciertas reacciones son catalizadas por cualquier ácido o base. Si cualquier ácido cataliza la reacción, se dice que ésta es objeto de una catálisis ácida general. Análogamente, una catálisis básica general se refiere a la ocasionada por cualquier base. Si sólo son efectivos ciertos ácidos o bases, el fenómeno se denomina catálisis específica ácida o básica. Un ejemplo clásico de catálisis específica ácido-base es la hidrólisis de los ésteres. La velocidad de la hidrólisis es demasiado baja en ausencia del ácido o de la base (Castellan, 1987). La ecuación empírica para la rapidez de una reacción de catálisis ácido-base general es:

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

en la que k_{H^+} , k_{OH^-} , k_{HA} y k_B son los coeficientes catalíticos para H^+ , OH^- , HA y B , respectivamente. En la ecuación anterior, HA representa a un ácido débil y B a una base débil. La concentración del agua no aparece en la ley de velocidad, ya que permanece efectivamente constante durante el curso de la reacción en solución acuosa (Castellan, 1987).

Catálisis con Guanidina

El grupo guanidinio, presente en el aminoácido arginina, se observa con frecuencia en la naturaleza para coordinar diferentes oxoaniones, tales como carboxilatos y fosfatos, en enzimas y anticuerpos (Salvio, 2015). Esta clase de grupo tiene muchos usos dentro de la química orgánica. El uso más común de la guanidina es como base orgánica. Es una de las bases orgánicas neutras más fuertes conocidas debido a la capacidad de su forma protonada para deslocalizar la carga sobre dos átomos de nitrógeno (Taylor y col. 2012) (Figura 10). El valor medio del pK_a de la guanidina en agua es de 13.6 (Ishikawa, 2009).

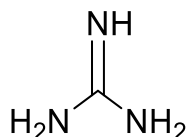


Figura 10. Molécula de Guanidina.

Tradicionalmente, las guanidinas se habían pensado como bases no nucleofílicas. Sin embargo, con el reciente aumento del interés por la organocatálisis, también se ha demostrado que varias guanidinas actúan como catalizadores nucleofílicos en una amplia gama de reacciones (Taylor y col. 2012). La unidad de guanidinio, que desempeña un papel clave en enzimas tales como la nucleasa estafilocócica, se ha utilizado ampliamente como un grupo de activación o anclaje en el diseño de catalizadores hidrolíticos. Estos catalizadores contienen una o más unidades de guanidinio, o una unidad de guanidinio junto con otra unidad activa tal como un centro de metal, un grupo hidroxilo, o una base libre en solución (Salvio y col. 2011).

La guanidina posee tres átomos de nitrógeno susceptibles a ser protonados. La conjugación $n-\pi$ posible entre los nitrógenos del grupo amino y del imino incrementa la basicidad del átomo de nitrógeno imino, y disminuye la basicidad del átomo de nitrógeno amino (Raczynska y col., 2003), esto con la deslocalización de 6 electrones a través de su forma simétrica en Y (Bailey 2001). La estabilidad de las guanidinas acíclicas y sus formas protonadas se atribuye a varios factores, como la estabilización por resonancia, enlaces de hidrógeno intramoleculares, su favorable distribución de la carga positiva y el efecto de solvatación en la estabilidad de la forma protonada (Ishikawa, 2009) (Figura 11).

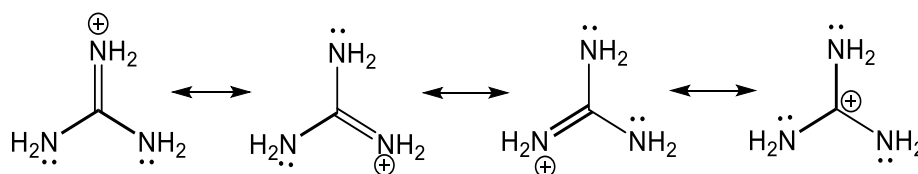


Figura 11. Estructuras de resonancia de la guanidina.

Guanidina en la Ruptura de Ésteres de Fosfato

La ruptura de los ésteres de fosfato es susceptible a la catálisis ácido-base general. Buscar reproducir en el laboratorio este tipo de catálisis nos lleva al uso de un amortiguador de pH, pues

en este se encuentran presentes tanto el ácido débil como su base conjugada (Corona, 2008). En estudios recientes, se ha informado de la síntesis y la actividad catalítica de compuestos con unidades de guanidina. Una investigación cinética mostró que un requisito previo es la presencia simultánea de una unidad guanidinio que actúa como activador electrofílico/electrostático y una unidad de guanidina neutra que actúa como base general (Corona y col., 2010).

La capacidad del guanidinio para unirse al grupo fosfato puede atribuirse a su estructura plana y rígida, y a su complementariedad geométrica con este oxoanión, lo que permite la formación de un quelato de enlace de hidrógeno de dos puntos, aunque son posibles otros patrones de unión de hidrógeno. El aducto de fosfato-guanidinio, resultante de esta interacción electrostática y de enlace de hidrógeno, no es particularmente estable en términos de constantes de asociación en agua y en otros disolventes polares (Figura 12). Sin embargo, en la catálisis, el objetivo de fuertes constantes de unión con el sustrato no es necesariamente la mejor estrategia porque la aceleración de la velocidad surge de una estabilización selectiva del estado de transición. (Salvio, 2015).

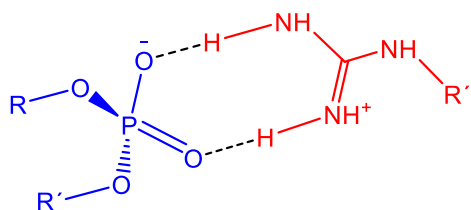


Figura 12. Interacción del grupo guanidinio con fosfodiésteres.

Adaptado de: Salvio, 2015.

Diversos grupos de investigación han utilizado guanidina como amortiguador de pH en la ruptura de enlaces tipo fosfoéster, tal es el caso de Corona y colaboradores (2010), en donde se observa la transesterificación del sustrato 2-hidroxipropil 4-nitrofenil fosfato (HPNPP) modelo de ARN, en mezclas de DMSO-agua al 80% utilizando amortiguadores de alta basicidad como guanidinas, amidinas o alquilaminas a 37 °C. Estos amortiguadores aceleran el rompimiento del HPNPP en un orden de 10^3 . Reportan que la eficacia catalítica del ion guanidinio y del ion amidinio es 10 veces más alta que otros iones amónicos ácidos. En la determinación de la ley de rapidez indican la contribución de la parte neutra y protonada de las especies del amortiguador. Sugieren que el rol del grupo guanidinio en la transesterificación de un fosfodiéster con un buen grupo saliente es una catálisis electrostática, en lugar de una transferencia de protones, la cual puede ser posible en una reacción catalizada por hidróxido, asistida por guanidinio. En el caso de Tjioe

y colaboradores (2016), informan la síntesis de ligantes de bis-1,4,7-triazaciclononano (TACN) utilizando guanidina como puente de unión, donde prueban complejos de cobre (II) para la ruptura de ésteres de fosfato en condiciones cercanas a las fisiológicas, usando dos fosfodiésteres modelo, el bis-*p*-nitrofenil fosfato (BNPP) y el 2-hidroxipropil *p*-nitrofenil fosfato (HPNPP). Informan que los complejos de cobre (II) aceleran la ruptura de BNPP y HPNPP, y son significativamente más activos en comparación al complejo Cu(II)-TACN al promover la escisión de BNPP y HPNPP a pH 7 y 6, respectivamente. Sugieren que el grupo guanidinio y los centros de cobre(II) actúan en forma cooperativa para facilitar la escisión. Sin embargo, a un pH mayor, la ruptura del fosfoéster parece estar moderada por la formación de puentes hidroxilo y/o una desprotonación y coordinación de los grupos guanidinio. Salvio y colaboradores (2011) someten el HPNPP, modelo de ARN, a la combinación de la unidad de guanidinio y complejos de zinc(II) y cobre(II) en coordinación con el ligando bis-1,4,7-triazaciclononano (TACN), usando el *m*-xileno como separador de la unidad de guanidinio y los complejos metálicos, en mezclas de DMSO-agua al 80%. Reportan que el complejo Zn(II)-TACN revela un grado modesto de cooperación hacia la unidad de guanidinio con el centro metálico, la cual es significativamente menor que la encontrada en el complejo Cu(II)-TACN. Sugieren que el espaciador de *m*-xileno induce contactos buenos entre los grupos catalíticos y el sustrato en el estado de transición.

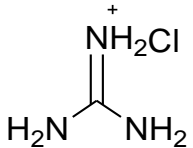
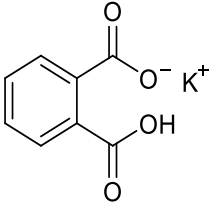
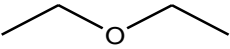
La importancia de la comprensión del mecanismo de hidrólisis de los ésteres de fosfato radica en que proveerá una base sólida para el desarrollo de catalizadores, los cuales puedan funcionar como agentes terapéuticos, en remediación o tener otros usos potenciales. Por lo anterior, en el presente trabajo se muestra un estudio del efecto del disolvente de la ruptura de un triéster de fosfato modelo de paraoxón mediante una catálisis con amortiguadores hechos con guanidina.

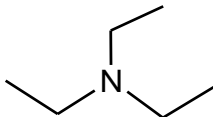
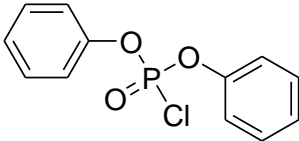
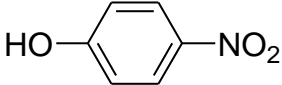
MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

En la Tabla 1 se muestran los reactivos que se utilizaron en la fase experimental del proyecto. Cabe mencionar que todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma Aldrich® y se utilizaron sin tratamiento previo. El amortiguador usado como catalizador se generó *in situ* con el cloruro de guanidinio y el hidróxido de tetrametilamonio en proporciones estequiométricas adecuadas.

Tabla 1. Estructura y características principales de los reactivos utilizados

| Reactivo | Características |
|---|--|
| $\text{Me}_4\text{NOH}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | Hidróxido de tetrametilamonio pentahidratado $M = 181.23 \text{ gmol}^{-1}$ Pureza > 97% |
| Me_4NCl | Cloruro de tetrametilamonio $M = 109.60 \text{ gmol}^{-1}$ Pureza > 99% |
|  | Cloruro de guanidinio $M = 95.53 \text{ gmol}^{-1}$ Pureza > 99% |
| HCl | Ácido clorhídrico $M = 36.46 \text{ gmol}^{-1}$, $\rho = 1.2 \text{ gmL}^{-1}$ Pureza del 37% |
|  | Biftalato de potasio $M = 204.22 \text{ gmol}^{-1}$ Pureza > 99.5% |
|  | Éter etílico $M = 74.12 \text{ gmol}^{-1}$ Pureza > 99% |

| | |
|---|---|
|  | Trietilamina $M = 101.19 \text{ g mol}^{-1}$ Pureza > 99% |
|  | Cloruro de difenil fosfato $M = 268.63 \text{ g mol}^{-1}$ Pureza > 99% |
|  | 4-nitrofenol $M = 139.11 \text{ g mol}^{-1}$ Pureza > 99% |

Sustrato

Para la realización de los estudios cinéticos se empleó como sustrato el triéster de fosfato, difenil *p*-nitrofenilfosfato (DPPNPP) con masa molar de $371.28 \text{ g mol}^{-1}$ (Figura 13); su síntesis se describe en la siguiente sección. La reacción de hidrólisis de este triéster es irreversible y da como uno de sus productos el 4-nitrofenolato en valores de pH alcalinos. Este es fácilmente detectable por espectrofotometría de ultravioleta visible, lo que presenta la ventaja de ser fácilmente detectable por espectrofotometría de absorción electrónica, debido a que tiene una banda característica en la región visible del espectro electromagnético a 400 nm en agua y presenta muy poco efecto solvatocrómico.

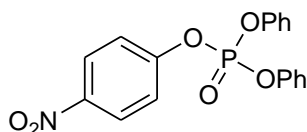


Figura 13. Estructura del difenil, *p*-nitrofenil fosfato.

Síntesis del DPPNPP

Para la síntesis del DPPNPP se modificó la metodología descrita por Bunton y colaboradores (1968), Jones y colaboradores (2003), Gulick y Geske (1966) (Figura 14). En un matraz tipo Schlenk se disolvieron 1.18 g de 4-nitrofenol (8 mmol) en 30 mL de éter etílico y 2.6 mL de cloruro

de difenil fosfato (12 mmol), además, se agregó lentamente 1.7 mL de trietilamina (12 mmol). El sistema se mantuvo en agitación durante 5 horas en una atmósfera de nitrógeno para evitar que el agua del ambiente hidrolizará al cloruro de difenilfosfato. Al terminar la reacción (se siguió por TLC), el producto se sometió a lavados con agua y unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. Después de los lavados, se realizó una extracción con éter, de donde fue recuperado el producto. El éter se dejó evaporar hasta obtener un líquido viscoso de apariencia amarillo ocre, el cual se recristalizó con etanol. Al sólido obtenido se le determinó el punto de fusión ($T_f = 48-49\text{ }^\circ\text{C}$) y se tomaron los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) y de fósforo (RMN ^{31}P), de donde se obtuvieron las siguientes señales: RMN ^1H (500 MHz, $\text{d}^6\text{-DMSO}$) $\delta(\text{ppm})$: 8.38 (d, 2H), 7.58 (d, 2H), 7.49 (t, 4H), 7.36 (t, 2H), 7.33 (d, 4H); RMN ^{31}P (500 MHz, $\text{d}^6\text{-DMSO}$) $\delta(\text{ppm})$: -16 ppm. Además, para confirmar la formación del compuesto se hizo una prueba de hidrólisis por espectrofotometría de UV-Vis, donde se monitoreo la formación de la banda del 4-nitrofenolato a diferentes valores de pH alcalino. Debido a la solubilidad del compuesto, las soluciones concentradas se hicieron en DMSO en concentración 10 mmol L^{-1} .

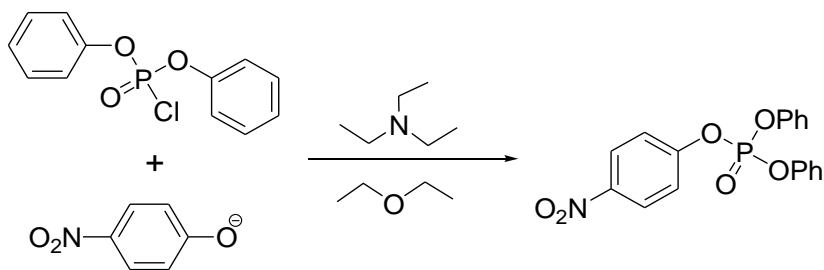


Figura 14. Reacción de síntesis del DPPNPP.

Disolventes

Para la realización de todos los experimentos se utilizó agua desionizada obtenida del equipo Barnstead Nanopure (modelo D11901) marca Thermo Fisher Scientific. La N, N-dimetilformamida (DMF) ($M = 73.09\text{ gmol}^{-1}$; densidad = 0.944 gmL^{-1}) que se utilizó fue adquirida de Sigma Aldrich con una pureza del 99.8% y fue utilizada sin ningún tratamiento previo. En todos los ensayos se utilizaron mezclas DMF-agua, las mezclas evaluadas se hicieron desde 10% hasta el 80% de DMF y el resto de agua, incrementando 10% de DMF en cada mezcla estudiada hasta llegar a 80% de DMF. El acetonitrilo (MeCN) ($M = 41.05\text{ gmol}^{-1}$; densidad = 0.786 gmL^{-1}) fue adquirido de

Sigma Aldrich® con una pureza del 99.8% y fue utilizado sin ningún tratamiento previo. En todos los ensayos se utilizaron mezclas CH₃CN–agua, evaluando desde 10% hasta el 60% de CH₃CN (V/V), debido a la miscibilidad de la mezcla binaria.

Equipo

Las mediciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro modelo Cary 60 de doble haz de luz (con lámpara de Xenón), equipado con multicelda y un recirculador de agua PCB1500, ambos equipos de marca Agilent Technologies. Las titulaciones para conocer los valores de pK_w y pK_a se realizaron con un potenciómetro digital marca Metrohm modelo 780, con el uso de un electrodo de vidrio marca Metrohm (aquadrodo) y un sensor de temperatura Pt 100 con un intervalo de medición entre -50 y 100 °C marca Metrohm. Las titulaciones se hicieron en una celda de vidrio de 50 mL marca metrohm, equipada con una chaqueta de recirculación de temperatura para mantener la temperatura constante. Esto se hizo con un baño de recirculación de agua marca Jubalo modelo FP45-HL.

Programas

El análisis de los datos obtenidos en los experimentos cinéticos y en las titulaciones potenciométricas en las diferentes mezclas, se hizo con el programa OriginPro™ versión 9.0 de 64 bits. Mientras que los valores de pK_a fueron calculados utilizando el programa Hyperquad 2008 versión 2.1 NT (Gans y col., 1996). En ambos programas se obtuvieron los errores estándar de cada experimento

Estudios Cinéticos

La reacción de ruptura del DPPNPP (Figura 15) se siguió mediante el uso de un espectrofotómetro de UV/Vis, ya que durante la ruptura se genera el anión 4-nitrofenolato (Figura 15), el cual presenta una banda de absorción característica en la región del visible (400-420 nm, dependiendo de la proporción de disolvente).

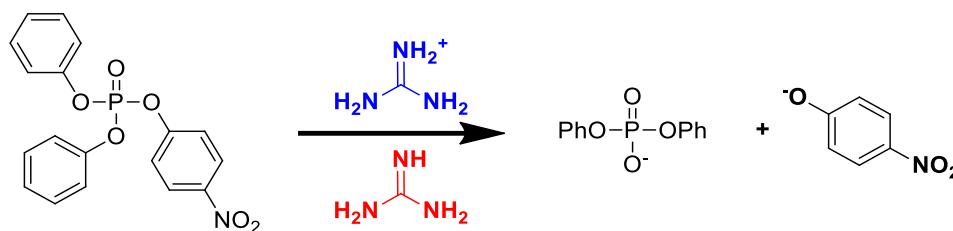


Figura 15. Reacción de ruptura del DPPNPP mediante una catálisis ácido-base.

Para los estudios cinéticos se utilizaron mezclas de MeCN con agua en una proporción variable volumen-volumen desde 10 hasta 60 por ciento de MeCN para cada perfil. Las mezclas se elaboraron incrementando en 10% de MeCN en cada mezcla hasta llegar a 60%. La disolución madre del sustrato DPPNPP se hizo sólo en MeCN y fue de una concentración 10 mmol L^{-1} . Todas las mediciones se llevaron a cabo en celdas de cuarzo de 1 cm de longitud. El volumen dentro de las celdas fue de 2.5 mL y la temperatura de todos los experimentos fue de 37°C . Las reacciones se iniciaron mediante la adición de una alícuota de la disolución del DPPNPP. Se mantuvo una fuerza iónica constante de 0.1 mol L^{-1} utilizando cloruro de tetrametilamonio

En estos experimentos se siguió la formación del producto de la hidrólisis del DPPNPP, el 4-nitrofenolato. Para ello, se obtuvo la longitud de máxima absorción de cada una de las mezclas de MeCN-agua, la cual fue de 405 nm para todas las mezclas estudiadas. En las cinéticas se tuvieron condiciones de pseudoprimer orden, es decir, el sustrato se mantuvo a una concentración mucho menor que la de las bases usadas ($20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), para realizar el análisis como cinéticas de primer orden.

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

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

La ecuación corresponde a la formación del producto mediante una cinética de primer orden. A es la absorbancia en cualquier momento, ΔA_{∞} es la diferencia entre la absorbancia inicial y la infinita, A_0 es la absorbancia al inicio, k_{obs} es la constante de rapidez observada y t es el tiempo. En la Figura 16 se muestra un ejemplo de un ajuste con la ecuación mencionada anteriormente.

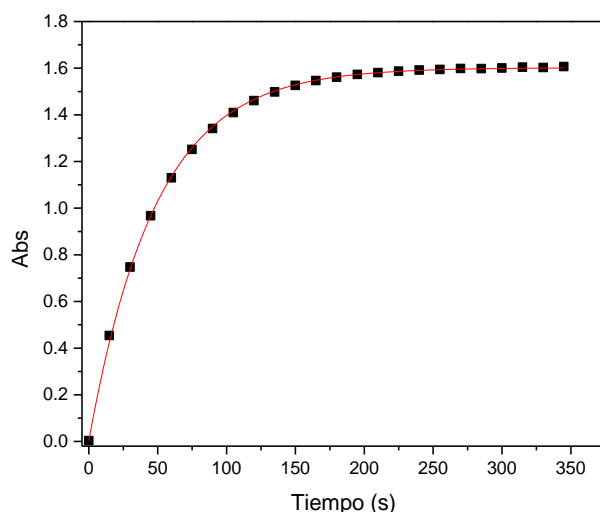


Figura 16. Ajuste de la ecuación para la formación del 4-nitrofenolato durante la ruptura del DPPNPP.

Perfil de Concentración y Neutralización

Para conocer el efecto que tiene la concentración del amortiguador (catalizador) sobre la reacción de ruptura del sustrato, se elaboraron perfiles donde se hizo variar la concentración del amortiguador desde 0.002 a 0.045 mol L⁻¹, a una fracción de neutralización del amortiguador constante en todas las mezclas realizadas de MeCN-agua. Con este perfil se buscó conocer si existe la catálisis o no. En caso de existir, con este perfil se puede conocer el orden respecto al catalizador. Para generar estos perfiles, se varía la concentración del catalizador en cada una de las celdas, manteniendo constante el perfil de neutralización.

Las opciones posibles más comunes del perfil de concentración se ilustran en la Figura 17. En la curva a se observa un comportamiento de orden cero respecto al catalizador lo cual indica que no existe la catálisis. Esto se presenta porque no hay dependencia con la concentración del mismo y se ve reflejado en la pendiente de valor cero ($y = k_0$). En la curva b se observa un comportamiento lineal, es decir, una dependencia de orden uno con relación al catalizador ($y = k_{cat}[Cat]_T + k_0$). Esto podría deberse a la participación de alguna de las especies del amortiguador (catalizador). Finalmente, en la curva c vemos un comportamiento cuadrático, característico de una reacción de segundo orden ($y = k_{cat}[Cat]_T^2 + k_{cat}[Cat]_T + k_0$). Este tipo de perfiles puede deberse a una contribución de segundo orden de la base, del ácido o bien de ambos al mismo tiempo.

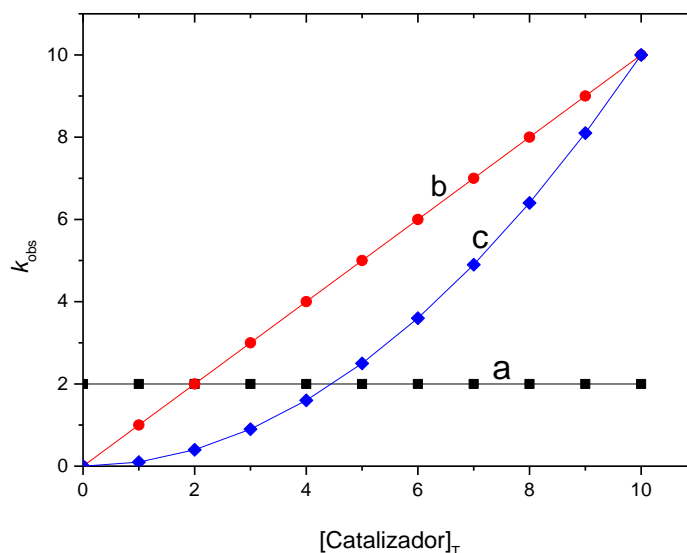


Figura 17. Perfiles posibles de la variación de las constantes de rapidez en función de la concentración del catalizador; (a) perfil de orden cero; (b) perfil de primer orden; (c) perfil de segundo orden.

Para conocer las especies del amortiguador que participan en el mecanismo de la reacción de hidrólisis del DPPNPP, se elaboraron perfiles de neutralización en cada mezcla de MeCN-agua a estudiar. Estos se realizaron mediante perfiles de concentración en distintos porcentajes de neutralización, los cuales fueron de 0.2, 0.5 y 0.8, en cada una de las mezclas realizadas de acetonitrilo-agua

Con los valores de las pendientes de cada perfil se realizó una gráfica en función de la fracción de neutralización. De los perfiles que se pueden obtener destacan dos, donde hay una contribución de una de las especies del amortiguador, o donde hay una catálisis por ambas especies y se observa una gráfica de campana. Ambos ejemplos se ilustran en la Figura 18. Una vez conocido el perfil de neutralización, se hizo un ajuste eliminando la contribución por la catálisis básica específica. Con el ajuste ya corregido en cada medio, se obtuvo el valor de la constante de rapidez de la catálisis por guanidina (k_{Gu}).

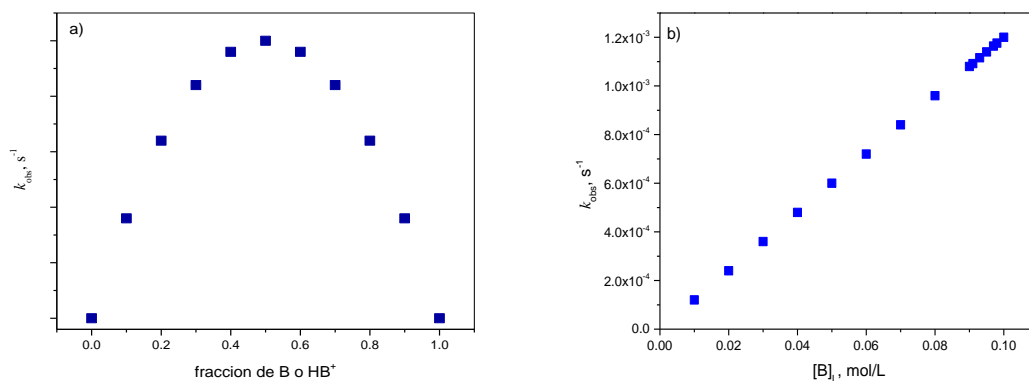


Figura 18. Perfil de neutralización, a) gráfico en campana, característico de una catálisis bifuncional; b) recta con pendiente positiva, característico de una catálisis básica.

Cálculo de la constante de catálisis básica específica

Para determinar la contribución de la catálisis básica específica en la hidrólisis del DPPNPP, se elaboraron perfiles de dependencia de la constante catalítica respecto a la concentración de hidróxido. Para este perfil, se utilizó hidróxido de tetrametilamonio como base y la concentración se hizo variar desde 0.002 a 0.02 mol L⁻¹. Los experimentos se realizaron en todas las mezclas de MeCN-agua estudiadas. Para conocer esta contribución se debe obtener la constante de la catálisis básica en cada mezcla de MeCN-agua. Esta constante se obtuvo con las pendientes de las curvas obtenidas en cada mezcla ($k_{obs} = k_{OH}[OH]$) (Figura 19).

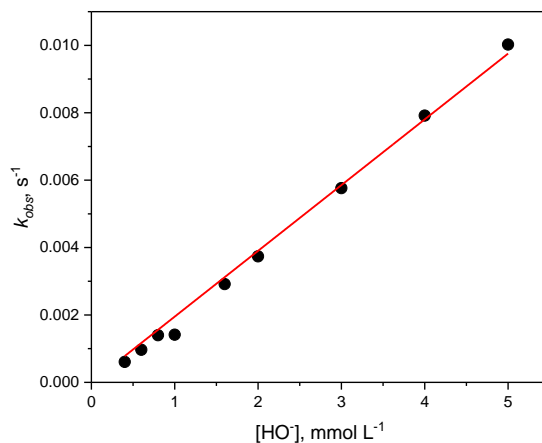


Figura 19. Perfil de catálisis básica específica para la ruptura del DPPNPP.

Estudios potenciométricos

Las titulaciones se realizaron en cada una de las mezclas de MeCN-agua estudiadas, a 37°C en una celda de vidrio cerrada, de volumen igual a 50 mL. En todos los casos se mantuvo la fuerza iónica constante en un valor de 0.1 mol L⁻¹ con cloruro de tetrametilamonio. Las disoluciones a titular se mantuvieron en atmósfera de nitrógeno durante todo el experimento para evitar la presencia de CO₂ en disolución, ya que la presencia de carbonatos dificulta el alcance del equilibrio en el electrodo después de cada adición de titulante. El potenciómetro se calibró mediante el uso de amortiguadores de referencia con valores de pH de 4.00, 7.00 y 9.00, a una temperatura de 25 °C.

Para determinar los valores de pK_w , en una celda de vidrio de 50 mL de capacidad, se valoraron 20 mL de ácido clorhídrico 0.01 mol L⁻¹ con hidróxido de tetrametilamonio 0.1 mol L⁻¹. La solución de la celda, al igual que la del titulante, se encontraba en la misma proporción de mezclas MeCN-agua estudiadas, además de las condiciones mencionadas anteriormente. El valor de pK_w se obtiene mediante el ajuste no lineal con la ecuación 1 (Johansson y Johansson, 1978) de la gráfica de volumen de base añadido contra pH, obtenida experimentalmente.

$$V = \frac{V_0(C_A + 10^{(pH-pK_w)}) - f10^{-pH}}{C_B + f10^{-pH} - 10^{(pH-pK_w)}} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde, V es el volumen añadido de base, V_0 el volumen inicial, C_A la concentración del ácido clorhídrico a titular, C_B la concentración de la base usada como valorante, f es un factor de corrección que es una función de los coeficientes de actividad y de la diferencia en el potencial de la interfase del electrodo (potencial de unión), pK_w el cologaritmo de la constante de ionización del medio, y pH el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno.

Para todas las titulaciones realizadas se conocía la concentración de la base añadida, el volumen inicial, los volúmenes adicionados, la concentración exacta del ácido fuerte a titular y los valores de pH , lo que hizo posible calcular K_w y el valor de f . Al obtener el valor de f para la titulación se corrigió el valor de pH , restando el logaritmo del valor de f al valor de pH observado ($pH_{\text{corr}} = pH_{\text{obs}} - \log f$) y con esto se recalculó el valor de pK_w , con los datos del valor del pH corregido. Un ejemplo del ajuste de las gráficas obtenidas se muestra en la Figura 20.

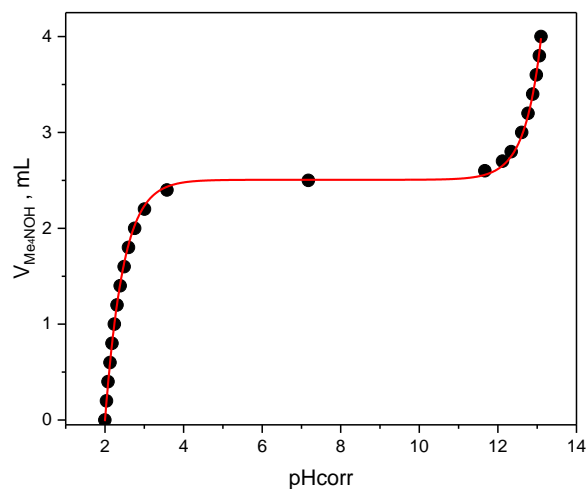


Figura 20. Gráfica de volumen de base añadida contra pH corregido.

Una vez determinado el pK_w , se determinó el valor de pK_a del sistema amortiguador. Por lo que se valoró una disolución de cloruro de guanidinio de concentración 0.01 mol L^{-1} con adiciones de hidróxido de tetrametilamonio 0.1 mol L^{-1} para cada mezcla de MeCN-agua estudiada. Después de las titulaciones potenciométricas, los valores de pK_a fueron obtenidos mediante el análisis de las curvas de titulación con el programa Hyperquad 2008. Para tener un resultado correcto se hizo, al igual que en el caso del pK_w , una corrección del valor de pH.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cambio de Disolvente: Dimetilformamida por Acetonitrilo

Al iniciar el trabajo experimental, se contempló el uso de la dimetilformamida (DMF) como el disolvente a utilizar en los estudios cinéticos, así como en las titulaciones potenciométricas, en mezclas de DMF acuoso del 10 al 80%. El DMF es un disolvente polar aprótico con una permitividad dieléctrica (ϵ) de 37, en su estructura tiene el grupo funcional amida, lo cual podría proveernos de un buen medio biomimético del sitio activo de una enzima, con lo que se podría favorecer la catálisis. Sin embargo, durante las titulaciones potenciométricas para la determinación del pK_w , nos encontramos con una o varias especies desconocidas, donde se incrementaba su presencia al incrementar la proporción de DMF de 10 en 10 en las mezclas DMF-agua estudiadas, mostrándose en un intervalo de valores de pH de entre 3 y 7. En la Figura 21 se muestran las gráficas donde se aprecia una distorsión en el rango de pH mencionado en las proporciones de 10 y 80 por ciento de DMF.

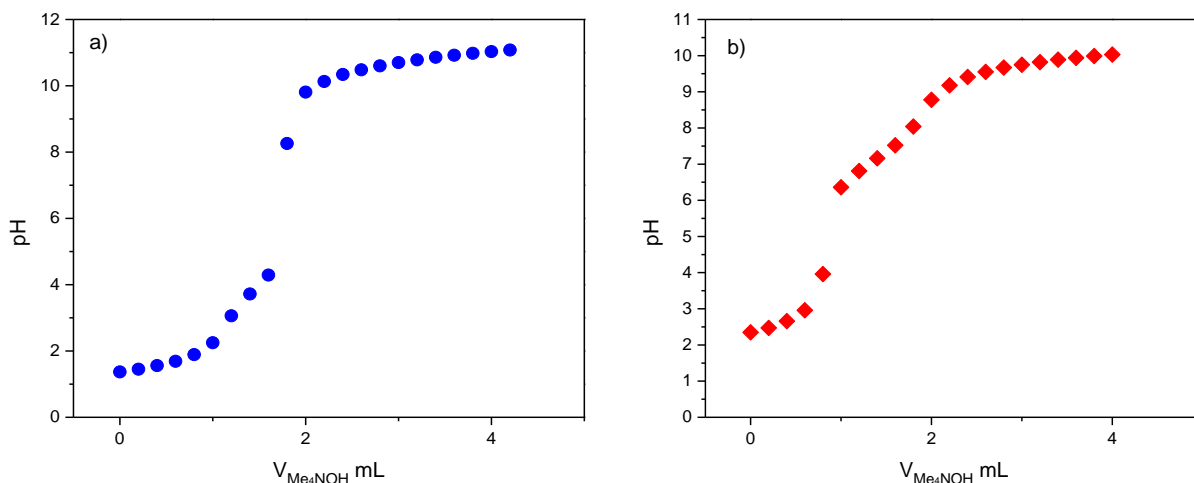


Figura 21. Titulaciones potenciométricas para la determinación de pK_w en DMF acuoso: (a) 10 y (b) 80 por ciento.

Normalmente el DMF es estable en muchas condiciones, pero podría sufrir varias degradaciones cuando se mezcla con ácidos o bases fuertes, inclusive con agua (Bretherick, 1999) puede ser hidrolizado en ácido fórmico/dimetilamina o formiato de dimetilamina (Yang, 2015). Incluso puede sufrir una tautomerización catalizada por base en donde se desplace el

equilibrio por el cambio del medio. Lo anterior puede interferir de manera notable en las reacciones de hidrólisis del sustrato utilizado, lo cual fue observado en las curvas de las cinéticas obtenidas para la ruptura del DPPNPP. En la Figura 22 se muestra un ajuste no lineal de la formación del 4-nitrofenolato para la mezcla de DMF acuoso al 70 por ciento en el perfil de concentración con guanidina neutralizada al 50 por ciento. En la mayoría de los experimentos realizados, se mostraba una desviación de la curvatura antes de llegar a la saturación, al momento de ajustar las cinéticas. Esto es indicativo de la presencia de otro producto o un equilibrio extra en la reacción que puede afectar en la determinación del mecanismo de hidrólisis del DPPNPP. Para poder hacer la identificación de lo que estaba ocurriendo en la reacción se pensó en hacer un experimento en RMN de ^1H y de ^{31}P para poder identificar las especies participantes en solución. Sin embargo, el equipo donde podríamos realizar los experimentos se encontraba en reparación, por lo que se declinó continuar con el uso del DMF como codisolvente. Si tomamos en cuenta la permitividad dieléctrica del DMF y su polaridad, se encontró que el acetonitrilo es muy similar en ambos parámetros, aunque la estructura es diferente. Debido a esto, para la realización del presente trabajo se adecuó cambiando la utilización del DMF por el acetonitrilo. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

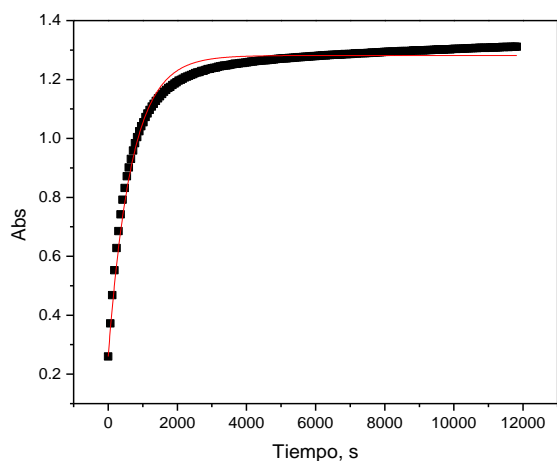


Figura 22. Ajuste de la formación del 4-nitrofenolato en la mezcla de DMF acuoso al 70% con guanidina neutralizada al 50%.

Determinación del pK_w del Agua y de pK_a de Guanidina en Mezclas MeCN-Agua

Para conocer el efecto de la variación de MeCN sobre los valores de pK_w y pK_a del guanidinio, se realizaron titulaciones potenciométricas en cada una de las mezclas de acetonitrilo acuoso estudiadas. Las titulaciones potenciométricas se realizaron en una celda de vidrio cerrada de 50 mL en una atmósfera de nitrógeno, manteniendo una fuerza iónica de 0.1 mol L^{-1} utilizando cloruro de tetrametilamonio. Para el cálculo del pK_w , se valoró una solución de 20 mL de ácido clorhídrico 0.01 mol L^{-1} con hidróxido de tetrametilamonio 0.1 mol L^{-1} , donde las gráficas resultantes se ajustaron mediante la ecuación mencionada en la metodología (Ec.1). Primeramente, se realizó el cálculo de la constante f , esto para realizar la corrección del pH en cada titulación ($pH_{\text{corr}} = pH_{\text{obs}} - \log f$) y posteriormente realizar el cálculo de pK_w . Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores calculados de pK_w en las diferentes mezclas acetonitrilo-agua estudiadas.

| % MeCN (V/V) | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| pK_w^* | 13.87 | 14.15 | 14.24 | 14.74 | 15.19 | 15.59 |

*Error menor al 0.05 %

Se puede observar que existe un aumento del valor de pK_w al incrementar el porcentaje en volumen de MeCN en la mezcla, comportándose como una línea recta, por lo que a mayor contenido de MeCN, la autoionización del agua en la mezcla es menor. Esto puede atribuirse a la disminución de la permitividad dieléctrica (que nos indica la capacidad del medio para separar las cargas). En la Figura 23 a) se muestra que a partir de ese porcentaje hay un cambio en la pendiente con respecto a los porcentajes inferiores de mezclas.

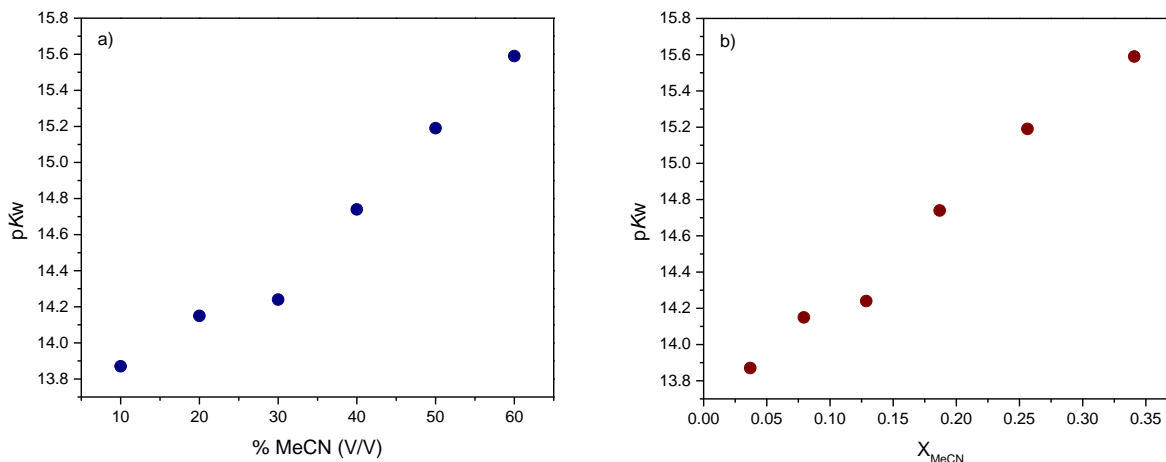


Figura 23. Efecto del acetonitrilo sobre los valores de pK_w en las diferentes mezclas estudiadas a 37°C con una fuerza iónica de 0.1 mol L⁻¹: (a) Porcentaje en volumen y (b) fracción molar.

En la Figura 23 b), se muestra la gráfica de la dependencia del valor de pK_w en función de la fracción molar del MeCN en la mezcla, en ella se muestra una recta con una pendiente más clara y homogénea, a comparación de la mostrada en función del porcentaje en volumen de MeCN en la mezcla, donde aparentemente hay un cambio de volumen. Posteriormente, en la Figura 24, se muestra la dependencia del pK_w con el inverso de la permitividad dieléctrica, mostrando un aumento del pK_w al disminuir la permitividad, esto conforme aumenta la fracción de acetonitrilo en la mezcla. Esto es en gran medida un reflejo del sistema en equilibrio, donde a partir de una especie neutra (el agua) se generan dos especies iónicas (el ion hidróxido y el ion hidrógeno), lo que es desfavorable desde el punto de vista de las energías de Gibbs de transferencia de fase, además de que a menor permitividad dieléctrica se favorece menos la formación de las especies iónicas. Del gráfico obtenido se encontró que había una relación lineal entre el valor de pK_w y el inverso de la permitividad dieléctrica, de la cual se obtuvo la siguiente ecuación: $pK_w = 325(44)/\epsilon + 9.6(0.7)$, (6, 0.92).

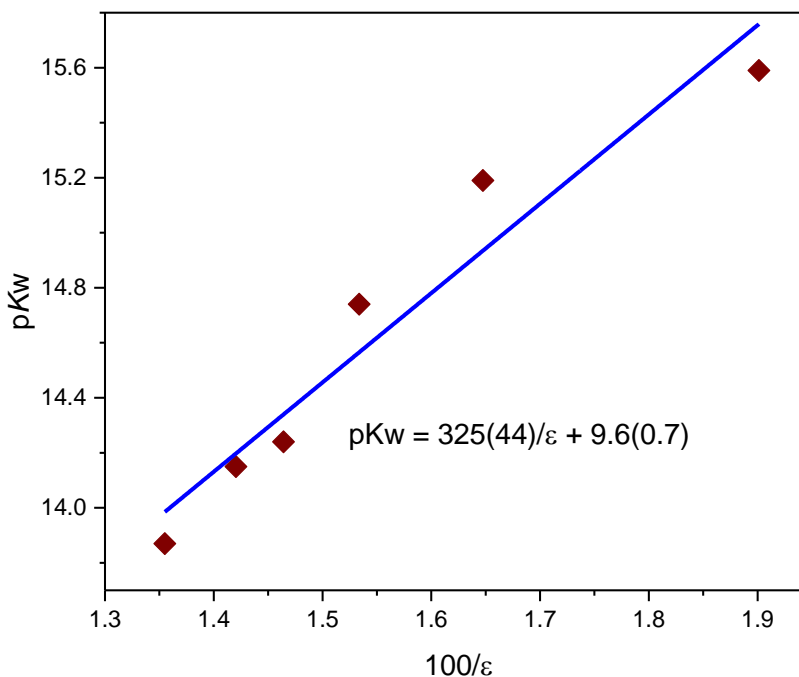


Figura 24. Relación del pK_w con el inverso de la permitividad dieléctrica en mezclas de MeCN-agua del 10 al 60% a 37°C.

Posteriormente se determinaron los valores de pK_a de la guanidina en cada mezcla MeCN-agua estudiadas a 37°C. Para el cálculo de la constante, se valoraron 20 mL de cloruro de guanidinio 0.01 mol L⁻¹ con hidróxido de tetrametilamonio 0.1 mol L⁻¹. Los valores de pH obtenidos se corrigieron como se indica en la metodología y se analizaron mediante el uso del programa Hyperquad 2008 versión 2.1 NT. Los valores de pK_a se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores calculados de pK_a en las diferentes mezclas acetonitrilo-agua estudiadas.

| % MeCN (V/V) | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| pK_a^* | 13.37 | 13.26 | 13.21 | 12.52 | 12.45 | 12.55 |

*Error menor al 1.18 %

De la tabla anterior, podemos afirmar que existe una disminución del valor de pK_a conforme aumenta la proporción de disolvente orgánico. Este efecto en las primeras mezclas es pequeño, pero al pasar de 30 a 40% el cambio es más notable. Lo que podemos analizar también es que, conforme aumenta el contenido del disolvente orgánico en la mezcla, el guanidinio se vuelve más ácido, es decir, se vuelve más proclive a donar el ion hidrógeno y formar guanidina libre (la cual es neutra). Aunque habitualmente en el caso de los ácidos catiónicos no hay variaciones grandes en los valores de pK_a (tal como en este trabajo), existe la posibilidad de que los valores aumenten o disminuyan en función de las interacciones entre el disolvente y una especie química del equilibrio (Cox, 2013). En el caso de la disminución observada en el presente trabajo, ésta puede deberse a que la guanidina libre interacciona mejor con el acetonitrilo que el ion guanidinio. Lo anterior, debido, en gran medida, a la baja permitividad dieléctrica del disolvente (Pillai et al. 1979; (Nag y Datta, 2007).

Efecto de la Catálisis Básica Específica

Para conocer la contribución de la catálisis básica específica en la ruptura del DPPNPP en las mezclas acetonitrilo-agua estudiadas, se evaluó el efecto de la concentración de iones hidróxido. La concentración de hidróxido de tetrametilamonio en este experimento se varió en un intervalo de 0.0005 a 0.005 mol L⁻¹, con una fuerza iónica constante de 0.1 mol L⁻¹, mediante el uso de cloruro de tetrametilamonio. Los valores obtenidos en los experimentos realizados en las diferentes mezclas de disolvente estudiadas se muestran en la Figura 24. De estas gráficas se obtuvo la pendiente, la cual corresponde al valor de la constante de la catálisis básica específica, k_{OH} . Este valor es importante, ya que mediante esta constante podemos determinar la contribución de esta base en la reacción. En la Tabla 5 se observan los valores obtenidos para las constantes de rapidez de los perfiles de la catálisis básica específica para cada mezcla MeCN-agua estudiada.

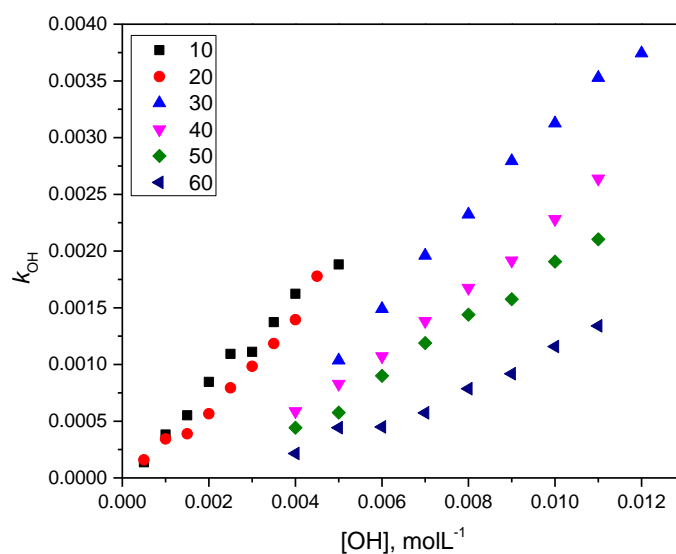


Figura 25. Variación de la constante de rapidez frente la concentración de iones hidróxido en función del porcentaje de MeCN.

Tabla 4. Efecto del acetonitrilo en la constante de la catálisis básica específica para el rompimiento del DPPNPP.

| % MeCN (V/V) | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| k_{OH} | 0.391 | 0.388 | 0.394 | 0.291 | 0.245 | 0.150 |

*Error menor al 5 %

De los valores obtenidos, podemos observar que de 10 a 30% las variaciones de los valores de las constantes de rapidez para la catálisis básica específica se mantienen prácticamente constantes, mientras que de 40% en adelante comienza una disminución marcada hasta llegar al 60% de acetonitrilo-agua. En la Figura 26 se muestra la gráfica del logaritmo de la constante de rapidez y el inverso de la permitividad dieléctrica ($1/\epsilon$), donde se observa una dependencia lineal en una parte de la gráfica. Anteriormente, se mencionó que la permitividad dieléctrica es una medida de la capacidad de un material (en este caso de un disolvente) de moderar la fuerza de atracción entre partículas con cargas opuestas (Carey, 2014). Se puede notar que en la fracción de 30 a 60 por ciento en volumen de MeCN, existe una dependencia lineal. Esto evidencia que, en el mecanismo, el estado de transición tiene mayor carga que los

reactivos, por lo que al aumentar la cantidad de MeCN, disminuye la permitividad dieléctrica del medio y consecuentemente disminuye la rapidez de reacción. Uno de los factores en este fenómeno, es que puede existir un efecto sobre la solvatación en el estado de transición, el cual puede tener una mayor carga que los reactivos y al aumentar el contenido de MeCN no se mejora su estabilización.

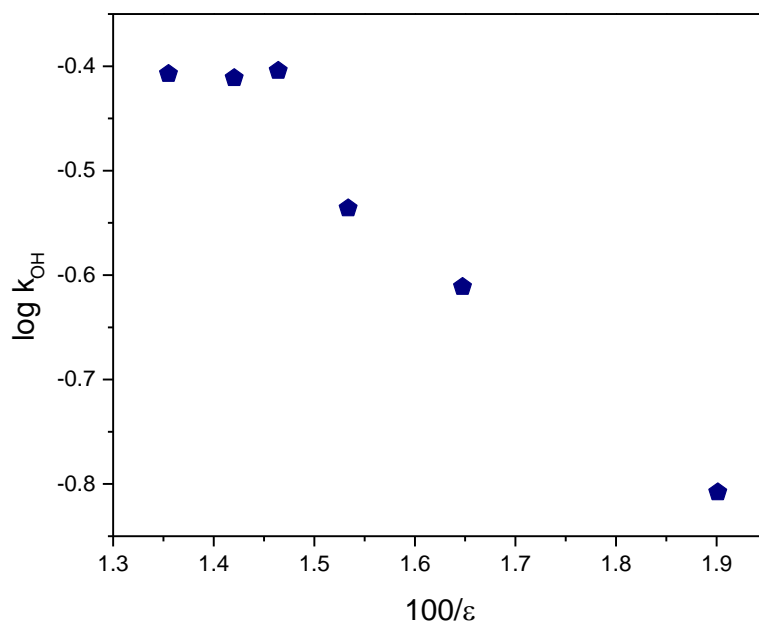


Figura 26. Dependencia del logaritmo de las constantes de la catálisis básica específica en función de la permitividad dieléctrica.

En la Figura 27 se muestra una dependencia de la constante de rapidez de la catálisis básica específica con el valor de pK_w , es decir, una correlación de Brønsted. El valor de la pendiente resultante involucra un desarrollo intermedio de la carga en el estado de transición (en donde el complejo activado tiene un aspecto similar al producto) (Williams, 1988). En la gráfica, podemos ver que de 30 a 60% de acetonitrilo existe un efecto y se ajusta a una línea recta. El valor de la pendiente es -0.31, que indica que el estado de transición se parece más a los reactivos y que la etapa limitante de la reacción es el ataque del ion hidróxido al fósforo del DPPNPP.

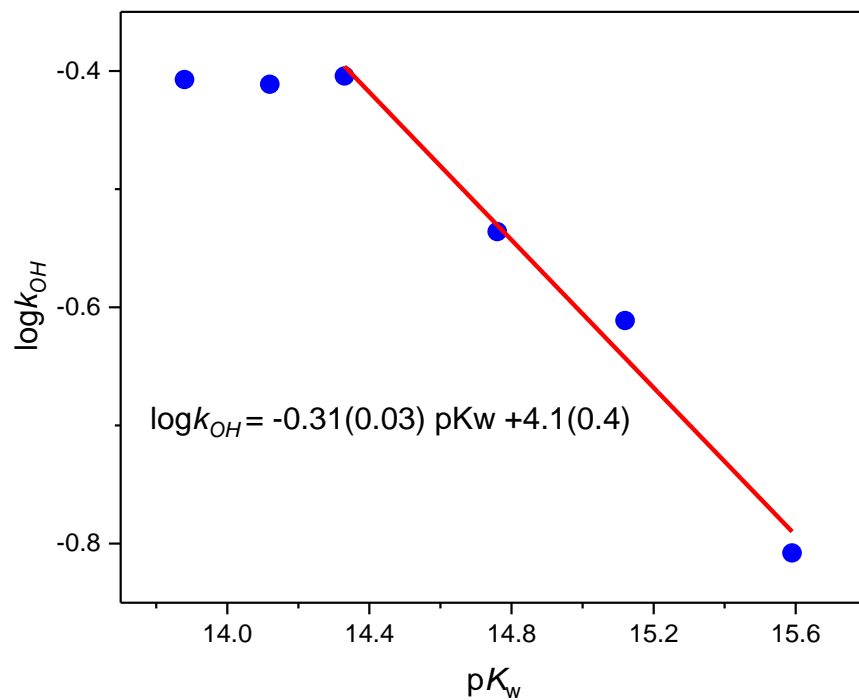


Figura 27. Relación de Brønsted para la catálisis básica específica en función del pK_w del medio.

Finalmente, en la Figura 28 se observa una dependencia casi lineal entre la forma logarítmica de la constante de rapidez, k_{OH} y la fracción molar de MeCN en la mezcla binaria con agua. En esta gráfica, podemos confirmar que el aumento de acetonitrilo en la mezcla no favorece la catálisis debida a los iones hidróxido, lo que puede ser evidencia de un mecanismo donde se desarrolla un estado de transición con carga y el tener una menor permitividad no lo favorece.

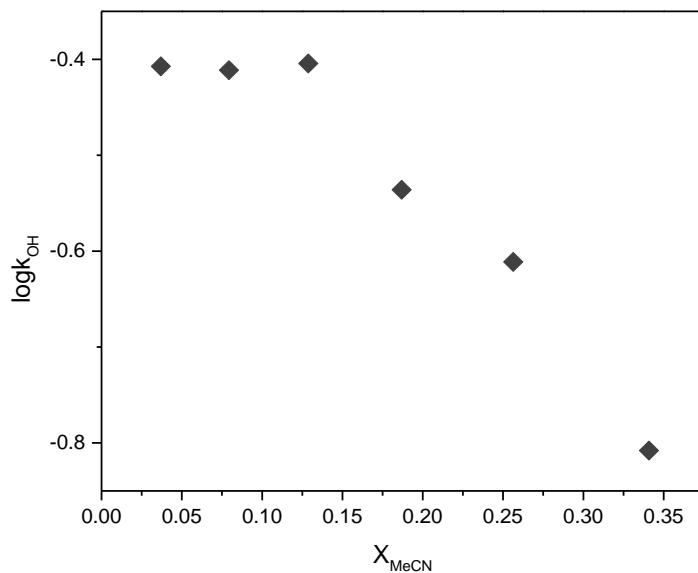


Figura 28. Dependencia de la catálisis básica específica en función del contenido de MeCN en la mezcla binaria.

Efecto de la Guanidina en la Ruptura del DPPNPP

Para saber si la guanidina fue capaz de participar en la catálisis ácido-base del DPPNPP, se evaluó el efecto de la concentración del amortiguador. En este, se varió la concentración de amortiguador en las mezclas acetonitrilo-agua estudiadas, la cual osciló en un intervalo de 0.002 a 0.045 mol L⁻¹, utilizando cloruro de guanidinio, manteniendo fija una proporción de neutralización del amortiguador de 20, 50 y 80 por ciento, utilizando hidróxido de tetrametilamonio. Esto se realizó para tener presentes las dos especies del amortiguador (HGu⁺/Gu), es decir, se mantuvo la proporción de la especie ácida y básica. Estos experimentos se realizaron a 37 °C manteniendo una fuerza iónica de 0.1 mol L⁻¹ utilizando cloruro de tetrametilamonio. La concentración de sustrato fue de 60 μmol L⁻¹, lo que origina una condición de pseudoprimer orden en el experimento. En la Tabla 4 se observan los valores obtenidos para las constantes de rapidez de los perfiles de concentración de cada mezcla acetonitrilo-agua estudiada, en su respectiva fracción de neutralización.

Tabla 5. Valores obtenidos para las constantes de rapidez de los porcentajes de neutralización de guanidina en mezclas acetonitrilo-agua del 10 al 60%.

| % MeCN | $k_{Gu}, L mol^{-1} s^{-1}$ | | |
|--------|-----------------------------|--------|--------|
| | X_{Gu}^* | | |
| | 0.2 | 0.5 | 0.8 |
| 10 | 0.0546 | 0.1936 | 0.2965 |
| 20 | 0.0698 | 0.1797 | 0.3736 |
| 30 | 0.0291 | 0.1075 | 0.2697 |
| 40 | 0.0312 | 0.1148 | 0.2104 |
| 50 | 0.0493 | 0.1309 | 0.1912 |
| 60 | 0.0542 | 0.1435 | 0.2147 |

*Error menor al 7.5%

Estos valores se obtuvieron mediante un ajuste no lineal utilizando la ecuación que se menciona en la metodología (Ec. 1). En todas las mezclas existe la catálisis por guanidina, apreciándose una dependencia de primer orden por la tendencia lineal que se forma. Sin embargo, aparentemente, solo se involucra una especie del catalizador guanidina, siendo esta la forma protonada o desprotonada la que participa en la reacción, obedeciendo la siguiente ecuación: $k_{obs} = k_{Gu}[Gu]_T + k_0$, donde $k_0 = 0$. Por lo tanto, mediante la pendiente de las gráficas, se obtuvo la constante de rapidez para la catálisis con guanidina k_{Gu} , descartando una catálisis bifuncional en las mezclas de MeCN-agua. En la Figura 29 se observa un ejemplo de este tipo de perfil en la mezcla con 10% de MeCN. En mezclas de DMSO-agua al 80%, se ha observado la catálisis ácido-base del DPPNPP a una temperatura de 37 °C con el amortiguador guanidinio-guanidina, donde se varia su concentración de 0.002 a 0.030 mol L⁻¹, manteniendo una fuerza iónica constante de 0.1 mol L⁻¹ utilizando cloruro de tetrametilamonio. De acuerdo con los resultados experimentales, aparentemente el rompimiento del triéster se lleva a cabo por la fracción básica del catalizador, es decir, la guanidina, por lo que se puede decir que existe una catálisis básica general dependiente de esta especie (Ramos, 2017).

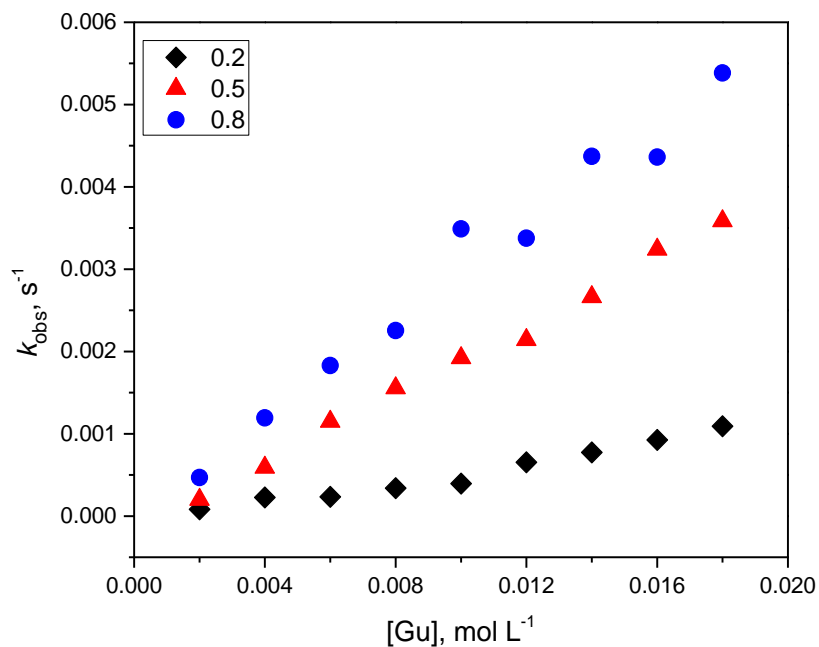


Figura 29. Perfil de concentración en la catálisis del DPPNPP con guanidina neutralizada al 20, 50 y 80% en MeCN al 10%.

Determinada la existencia de la catálisis por el amortiguador guanidinio/guanidina, y debido a los resultados obtenidos en el efecto de la concentración del amortiguador, se obtuvieron los valores de pendiente de cada perfil de neutralización del 20, 50 y 80% del catalizador. Los valores obtenidos en cada una de las pendientes de los perfiles de concentración se consideran como una constante de la catálisis básica general parcial (k_{Gu}), ya que no se considera el efecto de la neutralización. Para conocer el valor de la catálisis básica general se hicieron gráficos de los valores de las constantes de la catálisis básica general parcial en cada grado de neutralización (figura 30) y se obtuvo la pendiente. Con esto se determinó el valor de la k_{Gu} ; los valores de las constantes de cada mezcla se muestran en la Tabla 5.

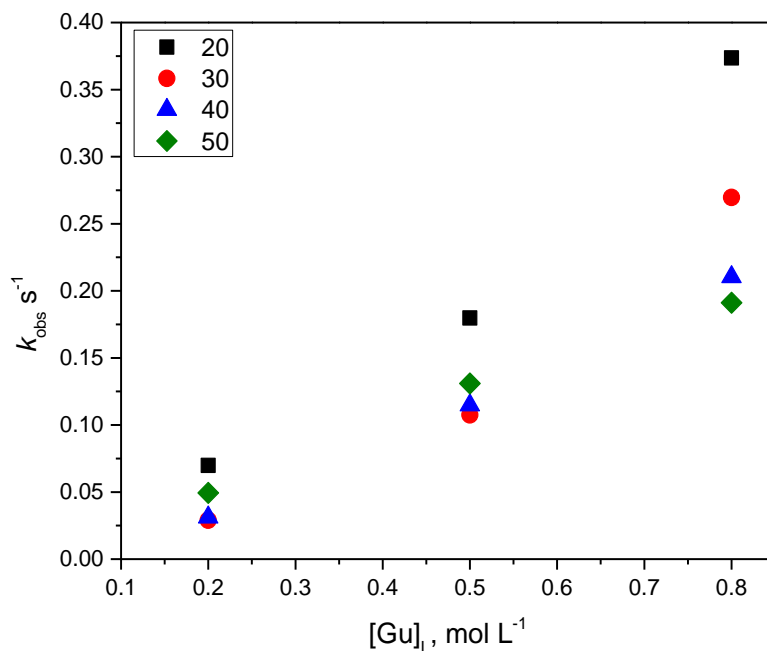


Figura 30. Efecto de la neutralización del amortiguador en la k_{Gu} para las mezclas de acetonitrilo del 20 al 50%.

Tabla 6. Efecto del acetonitrilo en la catálisis básica general del DPPNPP a 37 °C.

| % MeCN (V/V) | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|--------------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|
| k_B^* | 0.371 | 0.433 | 0.401** | 0.299 | 0.245 | 0.274 |

*Error menor al 8%. **El valor de k_B en la mezcla de 30% tiene un error superior a 2 desviaciones estándar.

De acuerdo con las constantes catalíticas de cada mezcla de disolvente, podemos decir que su comportamiento tiende a ser lineal, con pendiente negativa, ya que disminuye el valor de k_{Gu} al incrementar la fracción de disolvente orgánico. De acuerdo con la Figura 30, la mezcla de 20% presenta el mayor valor de constante de rapidez, sin embargo, en el caso de la mezcla de 10% podría ser mayor, debido a que en este porcentaje se presenta en mayor proporción una nueva ruta catalítica, donde se forma además de 4-nitrofenol, el fenol, lo que puede originar una pequeña desviación en el valor obtenido. Existen trabajos donde se ha reportado esta nueva ruta catalítica, la cual genera los productos antes mencionados, tal es el caso del trabajo de Gellman

y colaboradores (Gellman et al, 1986), quienes reportaron la formación de dos productos de la hidrólisis del difenil-*p*-nitrofenilfosfato en mezclas de MeCN en agua al 50% a 25 °C, el ácido difenilfosfórico (DPPA) y el ácido fenil-*p*-nitrofenilfosfórico (PPNPPA) (Figura 31), utilizando hidróxido de sodio (NaOH) y en un medio micelar con el surfactante Brij 35. Destacan que el surfactante tiene un grupo hidróxido el cual pudiera intervenir en la hidrólisis generando esos productos en vez del 4-nitrofenolato. Esto pasa también al utilizar NaOH como agente hidrolítico en la mezcla.

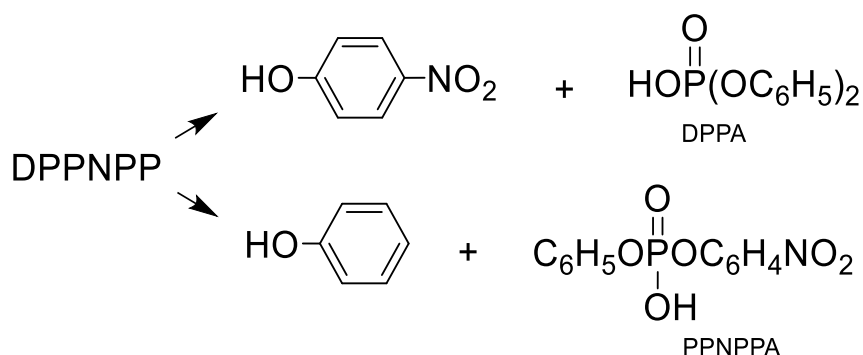


Figura 31. Productos alternos de la hidrólisis del DPPNPP.

Adaptado de: Gellman et al, 1986.

Sin embargo, mencionan que existe la posibilidad, aunque menos probable, de la fosforilación de Brij 35, resultando un éster, el cual se hubiese hidrolizado en los productos mencionados. De esta hidrólisis resultarían dos grupos fenólicos, los cuales deberían de perderse en cualquier proceso de hidrólisis subsecuente. Otra sugerencia que se menciona es que la formación de los productos inesperados indica que la gran capacidad del grupo saliente (4-nitrofenolato) con relación al fenolato no es muy fuerte en el estado de transición para la hidrólisis. En la Figura 32 se muestra el comportamiento con respecto al aumento de disolvente sobre la constante catalítica.

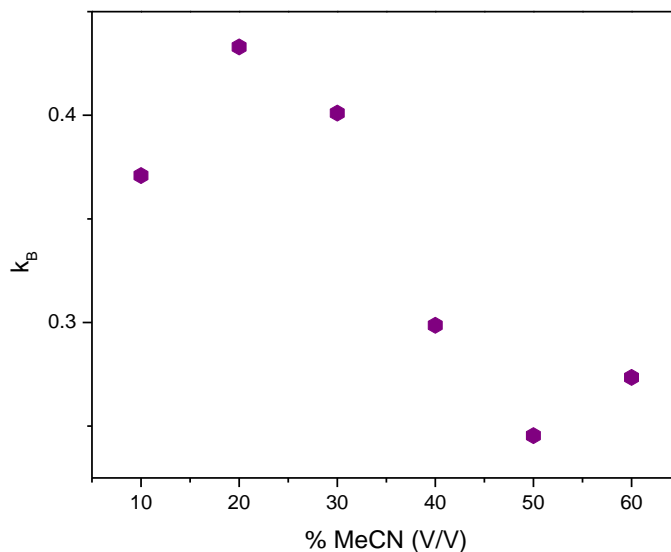


Figura 32. Efecto del acetonitrilo en la catálisis con guanidina para la ruptura del DPPNPP a 37 °C.

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

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

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

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

Con la concentración de hidrógeno y considerando el valor de Kw y su expresión, Kw = [H⁺][OH⁻], podemos calcular las concentraciones de iones hidrógeno. La resolución de la cúbica que se

empleó fue por el método algebraico, haciendo un algoritmo en Excel para poder hacer el cálculo más rápido. No se utilizó el método de Newton-Rapson por ser más elaborado para calcular tantos datos, al basarse en aproximaciones.

Con el valor calculado de la concentración para los iones hidróxido y los valores de la constante de la catálisis básica específica para cada porcentaje en volumen de MeCN (Tabla 5), se hizo la siguiente operación para el tratamiento de los datos obtenidos:

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

La ecuación anterior nos permitió descartar la contribución básica específica en cada una de las mezclas. La corrección permitió verificar si existe un efecto de los iones hidróxido sobre la catálisis básica general. En la Figura 33 se muestra la corrección de la mezcla de acetonitrilo al 50% en el perfil de concentración con guanidina neutralizada al 50%. Se puede observar en la gráfica que aún se conserva el comportamiento lineal con pendiente positiva, lo que nos indica que en la catálisis, solo participa una especie del amortiguador guanidinio-guanidina.

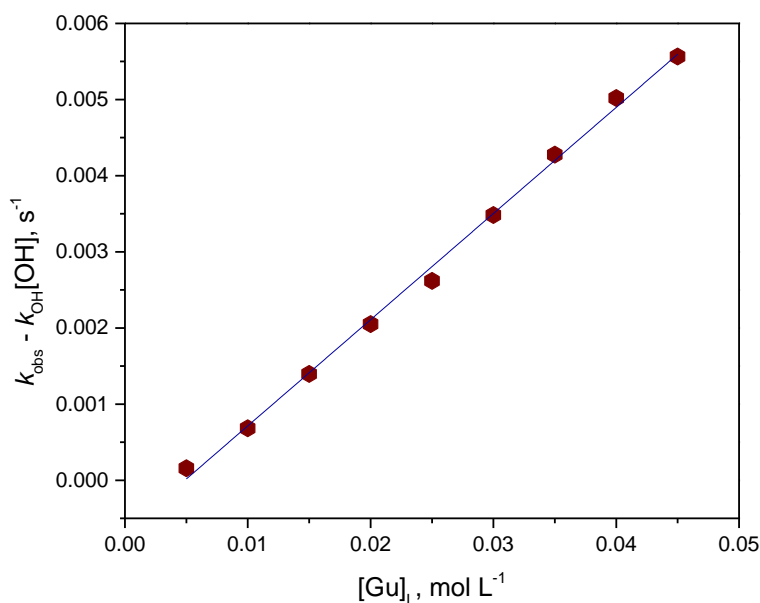


Figura 33. Ajuste en la mezcla de acetonitrilo al 50% en el perfil de concentración corregido con guanidina neutralizada al 50% para el rompimiento del DPPNPP.

Cuando se hizo la corrección de la constante de catálisis básica general por la contribución de la catálisis del ion hidróxido, se observa que, al incrementar el porcentaje de acetonitrilo en la mezcla binaria, la proporción de los iones OH⁻ disminuye. Sin embargo, en un porcentaje menor

del 30% de acetonitrilo las concentraciones de iones hidróxido son muy similares a las concentraciones de guanidina libre, sobre todo en concentraciones menores a 5 mmol/L de guanidina total. Debido a esto, en menos de 30% de acetonitrilo a bajas concentraciones de guanidina total, básicamente lo que se alcanza a medir es el efecto catalítico de los iones hidróxido. Sin embargo, en más de 40% de acetonitrilo la concentración de guanidina libre es mayor que la de los iones hidróxido y la corrección es mínima. En la Figura 34 se muestra una comparación de la corrección entre las mezclas de 40 y 60 por ciento de acetonitrilo.

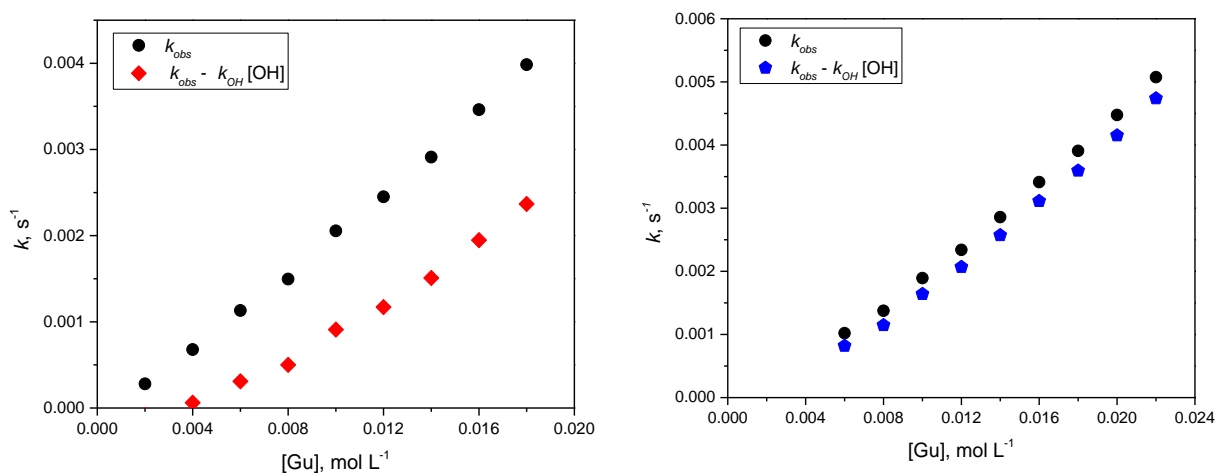


Figura 34. Corrección de la contribución de la catálisis básica específica para el rompimiento del DPPNPP en las mezclas de acetonitrilo al: a) 40 y b) 60% con guanidina neutralizada al 80%.

De las gráficas anteriores podemos obtener evidencia que en menores proporciones del disolvente orgánico hay una fuerte competencia entre los iones hidróxido y la guanidina libre. Por lo que ambas rutas catalíticas están presentes. Sin embargo, cuando el porcentaje de disolvente aumenta encontramos que la catálisis básica general, que se debe únicamente a la guanidina libre, se favorece. Esto puede explicarse en términos del abatimiento de la concentración de los iones hidróxido, debido a que al aumentar el porcentaje de acetonitrilo en las mezclas binarias el valor de pK_w aumenta mientras que el del pK_a no. Lo anterior se determinó experimentalmente y ha sido informado por García Moreno (2016) y Ramírez Irigoyen (2017), que al tener una diferencia considerable entre los valores de pK_a y pK_w es posible encontrar que la catálisis básica general predomine sobre la específica.

Para poder hacer un análisis más cuantitativo sobre el efecto del disolvente en las mezclas utilizadas en la reacción de ruptura del DPPNPP con guanidina, se obtuvieron los valores de la permitividad dieléctrica del medio a partir de las tablas de Landolt (2008) en las condiciones de nuestro experimento. Con los valores obtenidos se hizo un análisis mediante el uso de la ecuación de Kirkwood.

Uno de los parámetros analizados fue la permitividad del medio, en donde se evalúa el desarrollo de cargas durante el estado de transición mediante el uso de la ecuación de Kirkwood, la cual relaciona la permitividad del medio con el aumento o disminución en el tamaño del complejo activado en el estado de transición (Reichardt, 2003). Además, el tipo de pendiente (positiva o negativa) se relaciona con la formación de cargas en el estado de transición. La ecuación de Kirkwood se utiliza para el estudio de reacciones donde no se involucra iones, sino especies neutras polares. En el caso del presente trabajo el sustrato (DPPNPP) y el catalizador (guanidina) son neutros, por lo que este es el mejor parámetro para hacer el análisis del efecto de disolvente. En la Figura 35 se muestra el perfil del logaritmo de la constante de la catálisis básica general en función del parámetro de Kirkwood. La pendiente de este perfil es positiva, lo que implica que en el mecanismo hay desarrollo de carga en el estado de transición. Lo anterior se puede observar cualitativamente, ya que al evaluar las mezclas de mayor permitividad la rapidez aumenta, mientras que en las de menor permitividad la rapidez disminuye.

En la figura 35, podemos ver que el gráfico se divide en dos zonas, uno es lineal con una pendiente positiva que abarca la mayor parte de las mezclas evaluadas. Además, se presenta que en la mezcla de 60% de acetonitrilo hay un cambio de pendiente. Este hecho podría hacer suponer la posibilidad de un cambio de mecanismo, lo que puede implicar además de la formación de carga en el estado de transición, una estabilización de la misma por alguna interacción.

En estudios, donde utilizan diésteres de fosfato (HPNPP) en disolventes apróticos, como lo es la acetona (García, 2016), se intensifican las interacciones entre el sustrato y el catalizador, y, por ende, se obtienen mayores valores en las constantes de rapidez de la reacción estudiada. En tanto que en etanol (Ramírez, 2017), al ser un disolvente prótico, la magnitud de las interacciones podrían ser menores, ya que hay competencia con el sustrato y el catalizador por parte del disolvente. Esto puede también ocurrir en el sistema evaluado, ya que podría formarse el ion guanidinio al atacar a una molécula de agua que es la que podría realizar la sustitución sobre el fósforo del sustrato.

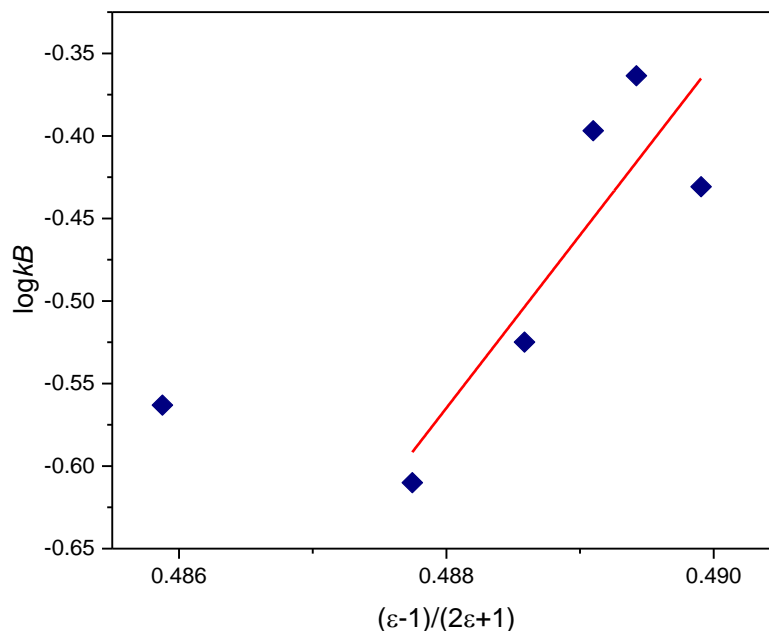


Figura 35. Relación entre el logaritmo de las constantes de la catálisis básica general y el parámetro de Kirkwood.

En el análisis de la correlación de Kirkwood, también podemos obtener información sobre el tamaño y la polaridad del complejo activado en relación con los reactivos. A partir de nuestros resultados encontramos que el complejo activado debe ser más polar y/o de menor tamaño (Reichardt, 2003) en comparación con los reactivos. Esto nos indica que en las mezclas de mayor permitividad el complejo activado estaría más solvatado, mientras que en las de menor permitividad, el disolvente podría ser sustituido por otra especie que interactuará con el complejo activado. Esto da evidencia que la permitividad del medio es de suma importancia para la catálisis en la ruptura de ésteres fosfato. Otro hecho relevante es que al tener evidencia que se desarrolla una carga en el estado de transición, podemos proponer que existe el ataque de un nucleófilo. Por estudios de RMN de ^{31}P , se encontró que los productos de la reacción son fosfatos, es decir, durante la reacción se une un átomo de oxígeno al fósforo. Lo anterior, posiblemente se debe a la desprotonación de una molécula de agua por parte de la guanidina, dando lugar a la formación del ion hidróxido que ataca al fósforo generando un estado de transición aniónico.

En la Figura 36 se muestran las dos principales rutas encontradas para la catálisis con guanidina en la ruptura del sustrato DPPNPP a 37°C en las mezclas de MeCN-agua. La catálisis

básica general sucede en conjunto con la ruptura por iones hidróxido. Estas dos rutas son las más probables con base en las evidencias encontradas en el presente trabajo. La coexistencia de los mecanismos mencionados anteriormente es algo muy común en las catálisis de tipo ácido-base. Sin embargo, regularmente, en ciertas condiciones predomina una ruta en particular sobre las demás.

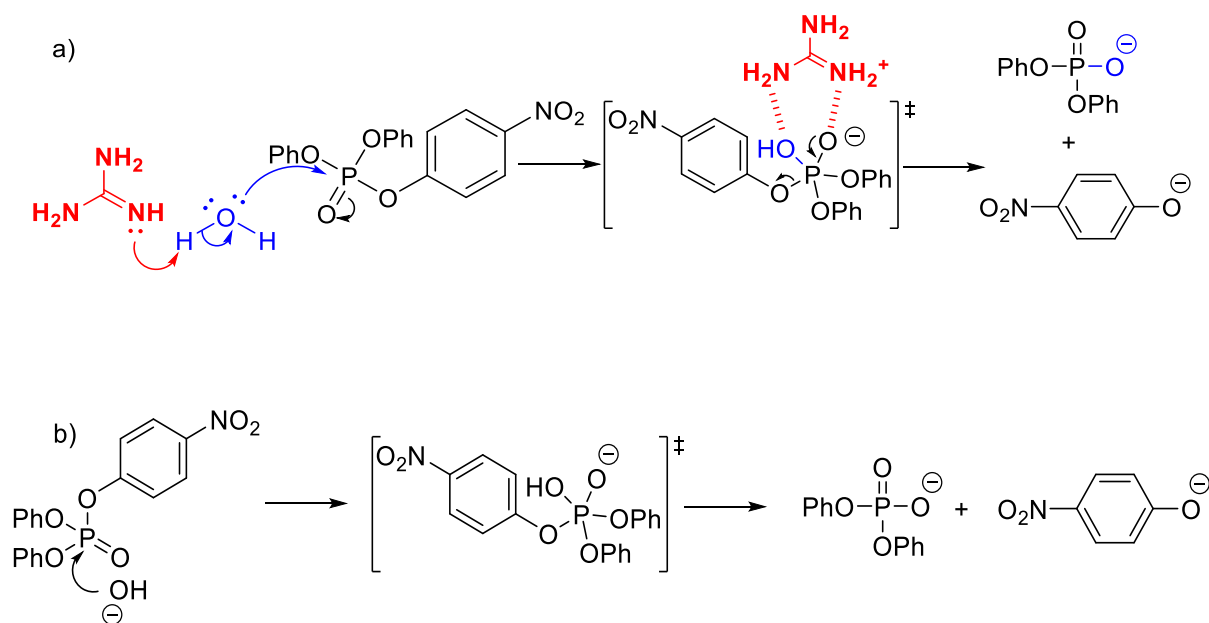


Figura 36. Mecanismos propuestos para la a) catálisis básica general y la b) catálisis básica específica para la ruptura del DPPNPP.

En la Figura 36 a), se ilustra el mecanismo donde la guanidina actúa desprotonando al agua, la cual ataca posteriormente al átomo de fósforo del sustrato, por lo que se forma una especie pentavalente de fósforo, esto mientras mantiene interacciones electrostáticas con el ion guanidinio mediante la formación de enlaces de hidrógeno. Lo anterior se favorece por la estructura plana, rígida y con carga deslocalizada del guanidinio y su complementariedad con el oxoanión. En la Figura 36 b), se observa la catálisis básica específica, donde ocurre el ataque nucleofílico de un grupo hidroxilo hacia el centro de fósforo del sustrato, generando un compuesto de fósforo pentavalente en el estado de transición. En esta ruta no existen moléculas que actúen como cooperadores para la ruptura del DPPNPP, como se ve en la catálisis básica general.

Del presente trabajo se puede extraer que al trabajar con catalizadores de tipo guanidina en la catálisis ácido base, se favorece la participación de la especie libre con los triésteres de fosfato. Esto es diferente en relación con los diésteres de fosfato que permiten la participación de ambas especies de la guanidina. Además, se encuentra que para favorecer la catálisis por guanidina hay que trabajar en condiciones de menor permitividad donde haya menor valor de pK_w . Lo anterior es importante ya que esto permitiría desarrollar catalizadores, mediante el diseño de moléculas más complejas o soportadas en resinas, para que pudieran funcionar en remediación. Esto debido a que no se puede usar simplemente iones hidróxido, debido a que podrían dañar más al medio, cuando el plan es el de usarlos para hidrolizar pesticidas.

CONCLUSIONES

Se determinaron los valores de pK_w del medio en las mezclas binarias de MeCN-agua a 37 °C, los cuales variaron de 13.87 en 10%, hasta 15.59 en 60%. Estos cálculos correlacionaron con la permitividad dieléctrica, obteniendo la siguiente ecuación: $pK_w = 325(44)/\epsilon + 9.6(0.7)$, (6, 0.92), pudiendo afirmar que el solvente empleado disminuye la permitividad dieléctrica en la mezcla binaria al aumentar su proporción, perjudicando la formación de especies iónicas.

En el caso del cálculo del pK_a de la guanidina, para la mezcla de 10%, su valor fue de 13.34, en comparación con la mezcla de 60%, el cual fue de 12.55, mostrando una disminución al aumentar la fracción de disolvente orgánico, lo que hace más ácida la mezcla. Esto favorece la donación del ion hidrógeno por parte del guanidinio para formar guanidina neutra.

Se midieron los valores de las constantes de rapidez para la catálisis básica específica en la ruptura del DPPNPP en mezclas de 10 a 60% de MeCN en agua a 37 °C. El valor de la constante catalítica en las mezclas varió de 0.391 a 0.156 $\text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$, lo que indica un fuerte efecto del medio en esta ruta en proporciones menores de MeCN. Al aumentar el contenido de solvente orgánico, no mejora la estabilización del estado de transición, por lo que la constante disminuye.

La reacción de hidrólisis del difenil, *p*-nitrofenilfosfato en mezclas del 40 al 60% de MeCN-agua a 37 °C presenta una catálisis con guanidina libre, de acuerdo con los perfiles de concentración. Mantiene una línea recta con pendiente negativa conforme existe una fracción mayor de disolvente orgánico. En las mezclas de 10 al 30 por ciento de MeCN-agua existe una competencia entre catálisis por guanidina libre y la catálisis básica específica en estas mezclas, quizá debiéndose a la existencia de otra ruta catalítica en estas mezclas.

De los perfiles de concentración y del grado de neutralización, se obtuvo la siguiente ecuación cinética de rapidez para la hidrólisis del DPPNPP a 37°C: $k_{\text{obs}} = k_1[\text{Gu}] + k_{\text{OH}}[\text{OH}] + k_0$.

Del análisis de Kirkwood se encontró que la ruptura del DPPNPP mediante una catálisis ácido base presenta un desarrollo de carga en el estado de transición y se favorece en medios con mayor permitividad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arnett EM, Bentrude WG, Burke JJ, Duggleby, PM. 1965. Solvent Effects in Organic Chemistry. V. Molecules, Ions and Transition States in Aqueous Ethanol. Journal of the American Chemical Society. 87(7): 1541-1553.

Baeza Reyes A, García Mendoza AJ. 2011. Principios de Electroquímica Analítica. Colección de Documentos de Apoyo, UNAM.

Bailey PJ, Pace S. 2001. The coordination Chemistry of Guanidines and Guanidates. Coordination Chemistry Reviews. 214: 91-141.

Bethell D. 1989. Advances in Physical Organic Chemistry. Volume 25. Academic Press. 474 p.

Bretherick L, Pitt M. 1999. Bretherick's Handbook of Reactive Chemical Hazards. Butterworth-Heinemann.

Cardona Mena DM. 2008. Neurotoxicidad de los Organofosforados: Efectos a Corto y a Largo Plazo del Clorpirifos. Volumen 230 de Tesis Doctorales. 225 p.

Carey FA, Giuliano RM. 2014. Química Orgánica. 9a ed. McGraw Hill México. 1233 p.

Castellan GW. 1987. Fisicoquímica. Pearson Educación. 1057 p.

Catalán J. 1997. On the E_T (30), π^* , P_y , S' , and SPP Empirical Scales as Descriptors of Nonspecific Solvent Effects. Journal of Organic Chemistry. 62: 8231-8234.

Charlot G. 1980. Química Analítica General. Tomo 1a ed. Toray-Masson. New York. NY.

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

Corona D. 2008. Catálisis con Amortiguadores en la Hidrólisis de un Fosfodiéster Modelo del ARN en Mezclas DMSO- Agua. Tesis de Maestría, UNAM. Cd. de México, DF.

Corona D. 2011. Estudios de la Hidrolisis Biomimética por el Mecanismo Ácido Base de Sustratos Modelos del ARN. Tesis de Doctorado, UNAM. Cd. de México, D.F.

Corona D, Taran O, Yatsimirsky AK. 2010. Mechanism of General Acid-Base Catalysis in Transesterification of an RNA Model Phosphodiester Studied with Strongly Basic Catalysts. *Organic and Biomolecular Chemistry*. 8: 873-880.

Domingos JB, Longhinotti E, Machado VG, Nome F. 2003. A Química Dos Ésteres de Fosfato. *Química Nova*. Volume 26. 5: 745-753.

Engel T, Reid P, Hehre W. 2006. *Química Física*. Pearson Educación. 1063 p.

Fernández DG, Mancipe LC, Fernández DC. 2010. Intoxicación por Organofosforados. *Med*. 18 (1): 84-92.

Fersht A. 1980. *Enzyme Structure and Mechanism*. Editorial Reverté. Barcelona, España.

Freeman S. 2009. *Biología*. 3a ed. Pearson Educación. Madrid, España.

García Moreno A. 2016. Efecto del Disolvente en Mezclas Acetona-Agua para la Hidrólisis Biomimética de un Sustrato Modelo del ARN. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias de la Salud. Ciudad Obregón, Sonora

Garrido Pertierra A, Teijón Rivera JM. 2006. *Fundamentos de Bioquímica Metabólica*. 2a ed. Editorial Téhar, S.L. Madrid, España.

Gellman S, Petter E, Breslow R. 1986. Catalytic Hydrolysis of a Phosphate Triester by Tetracoordinated Zinc Complexes. *Journal of American Chemistry Society*. 108 (9): 2388-2394.

Ghosh KK, Tamrakar P, Thakur SS. 2001. Solvatochromic Parameters and Linear Solvation Energy Relationships for Hydrolysis of Hydroxamic Acids. *Indian Journal of Chemistry*. Volume 40A: 340-344.

Ishikawa T. 2009. *Superbases for Organic Synthesis: Guanidines, Amidines, Phosphazenes and Related Organocatalysts*. John Wiley and Sons.

Jang YJ, Kim K, Tsay O, Atwood D, Churchill D. 2015. Destruction and Detention of Chemical Warfare Agents. *Chemical Reviews*.

Johansson A, Johansson S. 1978. Automatic Titration by Stepwise Addition of Equal Volumes of Titrant. *The Analyst*. 103(1225): 305-316.

Lauwerys R. 1994. *Toxicología Industrial e Intoxicaciones Profesionales*. Elsevier España. 631 p.

Mahali K, Guin PS, Roy S, Dolui BK. 2016. Solubility and Solute Solvent Interaction Phenomenon of Succinic Acid in Aqueous Etanol Mixtures. *Journal of Molecular Liquids*. 229: 172-177.

McMurry J. 2012. *Química Orgánica*. 8a ed. Cengage Learning Editores. 1376 p.

Muñoz Quezada MT, Lucero B, Iglesias V, Pía Muñoz M, Achú E, Cornejo C, Concha C, Grillo A, Brito AM. 2016. Plaguicidas Organofosforados y Efecto Neuropsicológico y Motor en la Región del Maule, Chile. *Gac Sanit*. 30(3):227-231.

Nag S, Datta D. 2007. Determination of Acid Dissociation Constants of Some Monobasic Organic Acids in Acetonitrile from Molar Conductance. *Indian Journal of Chemistry*. 46A (8): 1263-1265.

Orth ES, Almeida TG, Silva VB, Oliveira AR, Marins Ocampos FM, Barison A. 2015. Mechanistic Insight on the Catalytic Detoxification of Paraoxon Mediated by Imidazole: Furnishing Optimum Scaffolds for Scavenging Organophosphorus Agents. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 403: 93-98.

Pabis A, Duarte F, Kamerlin SC. 2016. Promiscuity in the Enzymatic Catalysis of Phosphate and Sulfate Transfer. American Chemical Society. *Biochemistry*. 55: 3061-3081.

Pillai L, Boss RD, Greenberg MS. 1979. On the Role of Solvent in Complexation Equilibria II. The Acid-Base Chemistry of Some Sulfhydryl and Ammonium Containing Amino Acids in Water-Acetonitrile Mixed Solvents. *Journal of Solution Chemistry*. 8 (9): 635-646.

Raczynska ED, Cyranski MK, Gutowski M, Rak J, Gal JF, Maria PC, Darowska M, Duczmal K. 2003. Consequences of Proton Transfer in Guanidine. *Journal of Physical Organic Chemistry*. 16: 91-106.

Ramírez Irigoyen AJ. 2017. Efecto del Disolvente en Mezclas Etanol-Agua para la Hidrólisis Biomimética de un Sustrato Modelo del ARN. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Hermosillo, Sonora.

Ramos Mayboca GM. 2017. Ruptura Ácido-Base del Difenil, *p*-Nitrofenilfosfato, Modelo de Paraoxón, con Guanidina en Mezclas DMSO-H₂O. Tesis de Licenciatura en proceso. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias de la Salud. Ciudad Obregón, Sonora.

Rebello dos Santos VM, Donnici CL, Neves DaCosta JB, Rogrigues Caixeiro JM. 2007. Compostos Organofosforados Pentavalentes: Histórico, Métodos Sintéticos de Preparação e Aplicações como Inseticidas e Agentes Antitumorais. *Química Nova*. 30 (1): 159-170.

Reichardt C. 1982. Solvent Effects on Chemical Reactivity. *Pure and Applied Chemistry*. 54(10): 1867-1884.

Reichardt C. 2003. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. 3rd ed. WILEY-VCH. Weinheim, Germany.

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

Robles Sanmartín JA, Hernández TJ, Luque Díez V, Luque Díez G. 2007. Tratamiento de la Intoxicación por Organofosforados en Aves Rapaces. Departamento de Toxicología y Farmacología. Facultad de Veterinaria. UCM. RCCV Volumen 1 (2).

Rueda CM, Velilla PA, Rojas M, Rugeles MT. 2012. AMPc: Una Molécula Clave en los Eventos de Regulación Inmune y en el Control de la Replicación del VIH. *Infect (online)*. 16(1): 59-71.

Salvio R, Cacciapaglia R, Mandolini L. 2011. General Base-Guanidinium Cooperation in Bifunctional Artificial Phosphodiesterases. *The Journal of Organic Chemistry*. 76: 5438–5443.

Salvio, R. 2015. The Guanidinium Unit in the Catalysis of Phosphoryl Transfer Reactions: From Molecular Spacers to Nanostructured Supports. *Chemistry European Journal*. 21: 10960-10971.

Sanli S, Altun Y, Guven G. 2014. Solvent Effects on pKa Values of Some Anticancer Agent in Acetonitrile-Water Binary Mixtures. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 59 (12): 4015-4020.

Say R, Erdem M, Ersöz A, Türk H, Denizli A. 2005. Biomimetic Catalysis of an Organophosphate by Molecular Surface Imprinted Polymers. *Applied Catalysis A: General*. 286: 221-225.

Sharma R, Gupta B, Yadav T, Sinha S, Sahu AK, Karpichev Y, Gathergood N, Marek J, Kuca K, Ghosh KK. 2016. Degradation of Organophosphate Pesticides Using Pyridinium Based Functional Surfactants. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. 4 (12): 6962-6973.

Silverthorn DU. 2008. *Fisiología Humana. Un enfoque integrado*. 4a ed. Editorial Médica Panamericana. 860 p.

Taran O, Medrano F, Yatsimirsky AK. 2008. Rapid Hydrolysis of Model Phosphate Diesters by Alkaline-Earth Cations in Aqueous DMSO: Speciation and Kinetics. *Dalton Transactions*. 6609-6618.

Tarrat N. 2010. Alkaline Hydrolysis of Phosphate Triesters in Solution: Stepwise or Concerted? A Theoretical Study. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 941: 56-60.

Taylor JE, Bull SD, Williams JMJ. 2012. Amidines, Isothioureas, and Guanidines as nucleophilic catalyst. *Chemical Society Reviews*. 41: 2109-2121.

Tjioe L, Joshi T, Graham B, Spiccia L. 2016. Synthesis and Phosphate Ester Cleavage Properties of Copper (II) Complexes of Guanidinium-Bridged *bis*(1, 4, 7-triazacyclononane) Ligands. *Polyhedron*.

Wong KY, Gao J. 2007. The Reaction Mechanism of Paraoxon Hydrolysis by Phosphotriesterase from Combined QM/MM Simulations. *Biochemistry*. 46 (46): 13352-13369.

Williams A, Davis AM, Regan AC. 1988. Experimental Charge Measurement at Leaving Oxygen in the Bovine Ribonuclease a Catalyzed Cyclization of Uridine 3'-Phosphate Aryl Esters. *Biochemistry*. 27: 9042-9047.

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

Yanggen D, Crissman CC, Espinosa P. 2003. *Los Plaguicidas: Impactos en Producción, Salud y Medio Ambiente en Carchi, Ecuador*. 198 p.

Yang Y. 2015. *Side Reactions in Peptide Synthesis*. Academic Press. 376 p.