

UNIVERSIDAD DE SONORA

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

Ruptura ácido-base con guanidina, en la hidrólisis del difenil
p-nitrofenilfosfato (DPpNPP), en mezclas DMSO-H₂O



TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Gloria Mariana Ramos Mayboca

Cd. Obregón Sonora a 05 de Enero del 2017

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 Gloria Mariana Ramos Mayboca, 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

Dra. María del Rosario Martínez Macias
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por el financiamiento del proyecto y la beca otorgada (proyecto: 243275, Becario: 24210)

A mis sinodales, Dr. Corona, M.C. Sandra Gonzáles, Dra. Rosario Martínez y Dr. Galvez; por su tiempo, consejos y correcciones para que este trabajo fuera realizado de la mejor manera.

A el Dr. Refugio Pérez González, la Dra. Carolina Godoy Alcantar y Dr Felipe Medrano Valenzuela por apoyar en la realización de los experimentos de RMN de ^1H y ^{31}P .

A el M.C. Ramón Valdéz y al M.C. Waldo Rodriguez, por su apoyo y disposición en mis necesidades en el laboratorio durante el proyecto.

A mis caballeros lomo plateado, Alan, Josué, Horacio, Rafael y Enrique, por su apoyo y amistad.

A mis Goyas y asociados, por formar parte de esta etapa, y hacer de esta, una de las mejores de mi vida. Por todas las sonrisas y comidas juntos; Daniela, Jeniffer y Cristina, gracias por las ensaladas coloridas.

A Carlos Ariel, por convertirse en un pilar importante en mi vida, y haber leído y escuchado mi trabajo "n" número de veces. Gracias por todo tu apoyo y cariño.

A la familia Corona Gonzáles, por por ser maestros, amigos, asesores, hermanos y hasta padres para mí.

A mi familia, en especial a mis padres; gracias por ayudarme a convertirme en la persona que soy, por ayudarme a cumplir con mis inquietudes y deseos. LOS AMO.

DEDICATORIA

Con mucho amor...

A mis padres.

CONTENIDO

	Página
FORMA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIA	4
CONTENIDO	5
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
OBJETIVOS	15
General	15
Específicos	15
ANTECEDENTES	16
Catálisis	16
Catálisis de la Ruptura de ésteres de fosfato	17
Efecto del Disolvente	23
Efecto en el mecanismo de reacción	23
Efecto del disolvente sobre el pK_a	24
Efecto cuantitativo del disolvente	25
$E_T(30)$	25
Escala de Catalán	26
Relaciones de Kirkwood	26
MATERIALES Y MÉTODO	28
Sustrato	28
Síntesis del sustrato	28
Disolventes	29
Reactivos	29
Equipo	31
Programas	31
Estudios cinéticos	31
Perfil de concentración y neutralización	33

Catálisis básica específica	35
Estudios potenciométricos	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
Determinación de los Valores de pK_w del Agua y del pK_a de Guanidinio en las Mezclas DMSO-Agua	38
Experimentos Cinéticos	42
Efecto de la concentración y neutralización del catalizador	43
Contribución de la Hidrolisis Básica Específica	47
Efecto del Disolvente	52
CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS	60
ANEXOS	65

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Constantes de rapidez observadas para la ruptura ésteres de fosfato con diferentes sistemas, utilizados por otros grupos de investigación.	20
2	Estructura y características principales de los reactivos utilizados.	29
3	Valores de pK_w en las diferentes mezclas de DMSO-agua a 37°C.	38
4	Valores obtenidos de pK_a para las diferentes mezclas de DMSO-Agua a 37°C.	41
5	Constantes de absortividad molar para el 4-nitrofenolato en las diferentes mezclas de disolvente a 37°C.	42
6	Valores de k_{GU} para las diferentes proporciones de neutralización en la mezcla con 80% DMSO.	46
7	Valores para k_{GU} a diferentes proporciones de neutralización de guanidina en mezclas DMSO-agua del 20 al 70 por ciento a 37°C.	46
8	Valor de k_B en la catálisis básica general del DPpNPP en las diferentes mezclas DMSO-agua a 37 °C.	47
9	Constantes de rapidez para la ruptura básica específica del DPpNPP a 37°C en las mezclas DMSO-agua.	49
10	Valores de pK_b para las distintas mezclas de DMSO, MeCN y Acetona acuosas con guanidina.	51
11	Valores de $k_{B,cor}$ en la ruptura básica general del DPpNPP para las diferentes mezclas de DMSO a 37°C.	52

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	a) Conversión de Glucosa a Glucosa-6-fosfato, b) Estructura de una cadena simple de ADN.	11
2	Estructura de: a) Paraoxón, b) Ciclosarín y c) VX.	12
3	Mecanismo de inhibición de la acetilcolinesterasa por agentes nerviosos.	12
4	Perfil de Energía de activación para una reacción sin catalizar (en negro), y una reacción catalizada por ácido (en rojo).	16
5	Interacciones posibles en la catálisis con guanidina. La activación de Brønsted a) ácida b) básica, de Lewis c) ácida y d) básica.	18
6	Interacción del grupo guanidinio con fosfodiésteres.	19
7	Efecto del disolvente sobre el mecanismo de reacción.	24
8	Estructura del DPpNPP.	28
9	Reacción de síntesis del DPpNPP.	29
10	Reacción de la ruptura catalítica del tipo ácido base del compuesto DPpNPP.	32
11	Ejemplo de un ajuste con la ecuación 1 para la ruptura catalítica del DPpNPP.	33
12	Perfiles posibles de la variación de las constantes de rapidez en función de la concentración del catalizador.	34
13	Perfil de neutralización, a) gráfico en campana característico de la catálisis bifuncional, b) recta con pendiente positiva correspondiente a una catálisis por la especie básica.	35
14	Perfil de catálisis básica específica.	36
15	Grafica de una determinación de pK_w ,	37
16	Efecto del DMSO sobre los valores de pK_w para las mezclas estudiadas, a 37°C, y con una fuerza iónica de 0.1 mol L ⁻¹ .	39
17	Relación del pK_w con el inverso de la permitividad dieléctrica en mezclas de DMSO-agua del 10 al 80% a 37°C.	39
18	Curva de titulación del ion guanidinio en 80% DMSO, a 37°C, $I = 0.1$ mol L ⁻¹ .	40

19	Relación del pK_a con el inverso de la permitividad dieléctrica en mezclas de DMSO-agua del 10 al 80% a 37°C	42
20	Efecto del contenido de DMSO en la catálisis con guanidina de la ruptura del DPpNPP a 37°C.	43
21	Perfil de concentración en ruptura ácido-base del DPpNPP catalizada con guanidina neutralizada al 20, 50 y 80% en 60% DMSO (v/v) a 37°C.	44
22	Perfil de concentración en ruptura del DPpNPP con guanidina neutralizada a diferentes proporciones en 80% DMSO a 37°C.	45
23	Efecto de la neutralización del amortiguador en la k_{Gu} para las mezclas de a) 80% DMSO y b) 60% DMSO.	47
24	Efecto de la concentración del ion hidróxido en la ruptura del DPpNPP en diferentes mezclas de DMSO a 37°C.	48
25	Dependencia de la constante de rapidez para la catálisis básica específica a 37 °C en la ruptura del DPpNPP, en función con: a) el porcentaje de DMSO y b) la fracción molar de DMSO en el medio.	49
26	Corrección por la contribución de la catálisis básica específica en el rompimiento del DPpNPP con guanidina en las mezclas de DMSO al: a) 20 y b) 80% con guanidina neutralizada al 50%..	50
27	Relación de Kirkwood para la catálisis básica general en la ruptura del DPpNPP en DMSO con guanidina.	52
28	Correlación con el parámetro de Dimroth-Reichardt normalizado (E_T^N) con las constantes de la catálisis básica general en DMSO para la ruptura del DPpNPP con guanidina.	53
29	Relación entre el logaritmo de las constantes de la catálisis básica general y logaritmo de la concentración de agua.	54
30	Relación de Brønsted para la catálisis básica específica del DPpNPP en DMSO.	55
31	Correlación entre las constantes de la catálisis básica específica de la ruptura del DPpNPP con el inverso de la permitividad dieléctrica.	56
32	Correlación con el parámetro de Dimroth-Reichardt normalizado (ETN) con las constantes de la catálisis básica específica en DMSO para la ruptura del DPpNPP.	56

33	Mecanismo probable para la catálisis básica general con guanidina en la ruptura del DPpNPP.	57
34	Mecanismo posible propuesto para la hidrolisis básica específica 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 de DMSO con agua en diferentes proporciones volumen/volumen, desde 20% hasta 80% de DMSO, a una temperatura de 37°C en presencia del amortiguador guanidina-guanidinio. En las mezclas estudiadas, se observó un aumento del pK_w y del pK_a , proporcional al aumento del contenido DMSO en el medio, el valor de pK_w aumento de 14.03 a 18.69, mientras que el aumento para el pK_a fue de 12.67 a 13.86, lo que favorece la catálisis por el amortiguador empleado. 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, 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 catálisis básica general con constante de velocidad k_B , y una catálisis básica específica con constante de velocidad k_{OH} . Esta última se ve abatida en las mezclas con mayor contenido de DMSO.

INTRODUCCIÓN

Los ésteres de fosfato son moléculas con las que tenemos contacto en nuestra vida diaria. Se encuentran presentes en las vías metabólicas como el catabolismo de carbohidratos, y en la señalización celular hay reacciones donde se forman (Mathews y col. 2013). Tal es el caso de la primera reacción de la glucólisis, la cual se ilustra en la figura 1, en donde se fosforila la glucosa para formar la glucosa 6-fosfato. De igual manera, los diésteres de fosfato son de suma importancia, puesto que de ellos están constituidos tanto el ADN como el ARN (Simon y col. 2016). Por lo tanto, la formación y ruptura de estos enlaces es indispensable para la transcripción y replicación (Chandar y Viselli, 2010).

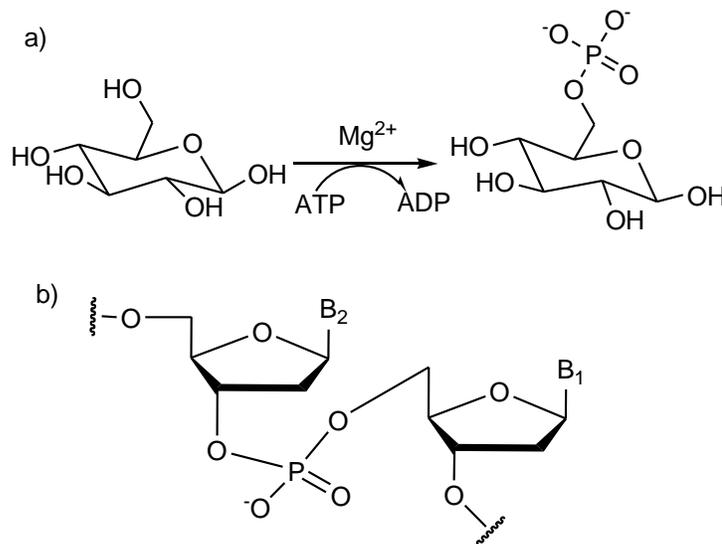


Figura 1. a) Conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato, b) Estructura de una cadena simple de ADN.

Existen, también los triésteres de fosfato, los cuales fueron utilizados como insecticidas en la década de 1930. Al ver que estos no eran selectivos hacia el tipo de organismo en el que actuaban, fueron sintetizados otros compuestos similares para ser usados en la segunda guerra mundial (Tarrat, 2010). A partir de entonces, se han utilizado para diversos motivos bélicos; algunos ejemplos de estos compuestos son el Sarín, el Somán, y los agentes VX y VR (ver figura 2). En el caso de los pesticidas, se han sintetizado compuestos como el paratión y el paraoxón (ver figura 2), que son más efectivos y ampliamente utilizados para el control de plagas en los cultivos.

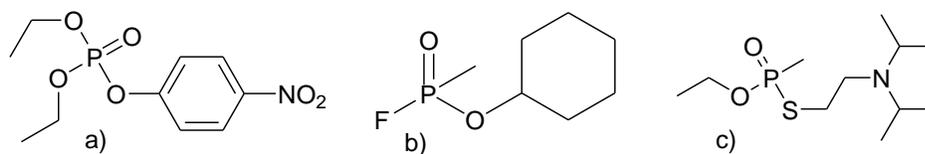


Figura 2. Estructura de: a) Paraoxón, b) Ciclosarín y c) VX.

El mecanismo de acción de los pesticidas organofosforados es la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), enzima que se encarga de hidrolizar la acetilcolina. Cuando esta enzima está en contacto con los triésteres de fosfato, resulta inhibida por la unión covalente de estos al sitio activo de la enzima (ver figura 3). Esta unión es irreversible, por lo que será necesaria la síntesis de nuevas enzimas para poder regular la función del sistema nervioso (Wiener y Hoffman, 2004). Esta inhibición enzimática provoca dolor de cabeza, sudoración, dificultad para respirar, náuseas, diarrea, fasciculaciones del pulso y musculares (Alewu y Nosir, 2011). Estudios recientes han demostrado que en exposiciones crónicas estos pesticidas pueden provocar anemias y enfermedades cardiovasculares, así como problemas de infertilidad por disminución de la viabilidad, aumento de aglutinación y cambios en la morfología espermática (Aldana y Col., 2013; Dong-Zong y col., 2015).

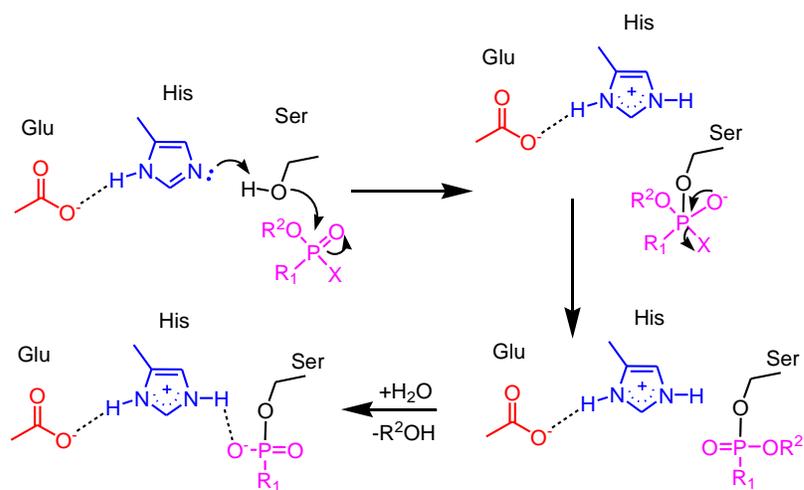


Figura 3. Mecanismo de inhibición de la acetilcolinesterasa por agentes nerviosos.

Adaptada de: (Jang y Cols. 2015).

Se ha demostrado que el uso de pesticidas organofosforados ha ocasionado contaminación de tierras y aguas (Gunther, 1977), ya que estos no se degradan rápidamente

(Racke y col.,1996). Además, se han encontrado cantidades pequeñas de compuestos organofosforados en hortalizas en las que fueron utilizados (Pérez y col., 2013), así mismo, se ha encontrado que triésteres de fosfato (como el trifenil fosfato, utilizado como retardante de fuego y plastificante) están presentes en el polvo dentro de los hogares en los Estados Unidos (D. Mitro y col., 2016).

Lo anterior motiva al estudio de la ruptura de tales compuestos, para conocer el mecanismo de reacción y diseñar catalizadores que puedan romperlos.

OBJETIVOS

General.

Estudiar la ruptura ácido-base con guanidina en la hidrólisis del triéster de fosfato difenil *p*-nitrofenil fosfato (DPpNPP) en mezclas de DMSO-agua para determinar la ley de rapidez y proponer el posible mecanismo de reacción.

Específicos

Determinar los valores de pK_a del ion guanidinio y de pK_w por potenciometría, en las diferentes mezclas de disolventes utilizadas.

Determinar los valores de las constantes de rapidez para la catálisis básica específica (OH^-) del DPpNPP a diferentes concentraciones de DMSO acuoso (10-80% v/v).

Determinar los valores de las constantes de rapidez para la catálisis con guanidina en la ruptura del DPpNPP en diferentes concentraciones de DMSO acuoso (10-80% v/v), con la variación de la concentración del catalizador y su neutralización.

Evaluar el efecto del disolvente sobre la ruptura ácido-base del DPpNPP.

Obtener la ley de rapidez en las mezclas de mayor actividad y proponer un mecanismo para la ruptura del DPpNPP.

ANTECEDENTES

Catálisis

Aumentar la rapidez de una reacción es fácil mediante el uso de catalizadores. Un catalizador es una sustancia que disminuye la energía de activación para una reacción, mediante el cambio del mecanismo, sin modificar el ΔG . El cambio en el mecanismo puede involucrar varios pasos extras, cuyas barreras energéticas son menores que las de las reacciones sin catalizar, esto repercute en la rapidez, acelerando la reacción. (Laidler, 1987).

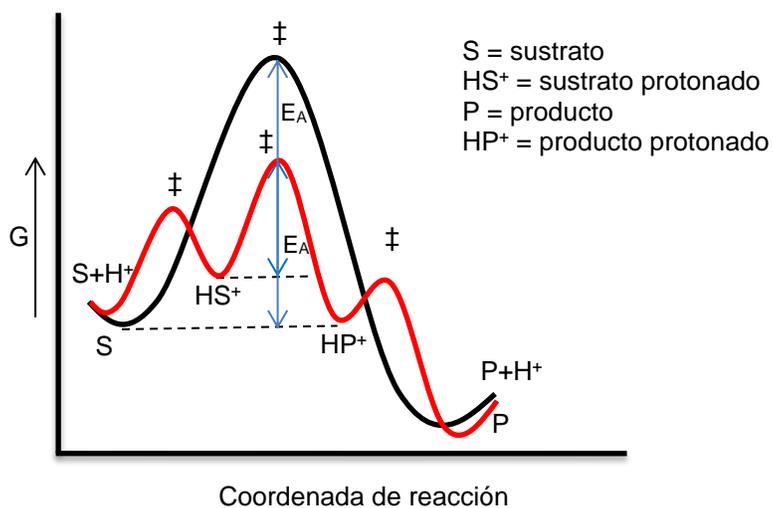


Figura 4. Perfil de energía de activación para una reacción sin catalizar (en negro), y una reacción catalizada por ácido (en rojo) (Corona, 2011).

Existen diversos tipos de catálisis, por ejemplo, catálisis heterogénea y homogénea. Esta última, es llevada a cabo en una sola fase, es decir, en disolución. Dentro de este tipo encontramos la catálisis enzimática, organometálica, ácido base, entre otras. De las anteriores la catálisis ácido-base (también llamada ácido-base de Brønsted) es el tipo más común en química orgánica (Anslyn, 2006), y se sustenta en que los sustratos serán más reactivos al ser protonados o desprotonados, de esa manera se favorece la reacción (Corona, 2011).

Este tipo de catálisis no es llevado a cabo sólo por ácidos y bases fuertes (catálisis ácido-base específica), sino también por débiles (catálisis ácido-base general); y es importante señalar que pueden ocurrir al mismo tiempo. La ecuación empírica para este tipo de reacciones es la siguiente:

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

Donde, HA y B representan un ácido y una base débil respectivamente y k_{HA} , k_B son sus constantes catalíticas (Anslyn, 2006). Dada la ecuación anterior, se puede asumir que, al modificar las condiciones de una reacción, tal como el pH, se pueden favorecer algunas de las contribuciones, así como desfavorecer otras.

Catálisis de la ruptura de ésteres de fosfato

Para la ruptura de triésteres de fosfato, algunos proyectos se han inspirado en la fosfotriesterasa (PTE), enzima proveniente de *Pseudomonas diminuta*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium radiobacter* y *Chryseobacterium balustinum*, que ha demostrado ser muy activa en la hidrólisis de los ésteres de fosfato (Sesha y Col., 2015). Ya que la PTE usa zinc como cofactor, intentos de mimetizarla se han basado en complejos cíclicos de nitrógeno y zinc. Para la degradación de paraoxón, se han utilizado complejos como el triazododecanozinc(II)(Zn^{2+} -[12]-anoN₃), con una $k_{obs} = 6.08 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$. (Kennedy, 2015). Metales libres también se utilizaron para catalizar la etanolisis del DPpNPP, las constantes observadas se muestran en la tabla 1. Se comparan también los grupos salientes 4-nitrofenolato y fenolato, dando como resultado que el fenolato es aproximadamente 250 veces más lento que el 4-nitrofenolato en dicho triéster (Nayel Kerke y col., 2003; Gellman y col., 1986). Un estudio hecho por Castro y colaboradores (2011) fue realizado con piperidina, 4-oxipiridina y 4-metoxifenolato para la ruptura del dietil *p*-nitrofenilfosfato (DEpNPP, también llamado paraoxón), en la mezcla etanol-agua 44%; las constantes de rapidez obtenidas en este trabajo se encuentran en la tabla 1 y el mecanismo sugerido fue una sustitución nucleofílica bimolecular. En 1968 Bunton y colaboradores estudiaron la hidrólisis ácida y básica del triéster DPpNPP en mezclas de agua-dioxano (95:5 v/v). Usaron ácidos como HClO₄, H₂SO₄ y HCl y bases como NaOH, LiOH, KOH y la mezcla de Me₄NOH y Me₄NCl. Esta última, con una constante de 0.418 L mol⁻¹ s⁻¹, 3 órdenes mayor que las constantes para la catálisis ácida (ver tabla 1). Tarrat en 2010, hizo un estudio teórico del mecanismo para la hidrólisis básica de triésteres, ya que, dependiendo del grupo saliente, el nucleófilo puede

atacar al fósforo y formar un intermediario pentavalente, llamado fosforano, o generar directamente a los productos de la reacción. En este estudio se evaluaron 6 ésteres con grupos salientes distintos y se concluye que, para los ésteres con grupos salientes con valor de $pK_{a_9} < 8$, ocurrirá un mecanismo concertado.

También se ha estudiado la catálisis ácido-base general. Este tipo de estudios se realiza con amortiguadores de pH, donde se puede encontrar una contribución tanto de la especie básica como de la ácida. Catalizadores a base de guanidina, aminoguanidina, acetamidina, benzamidina, metilamina y piperidina fueron utilizados por Corona y colaboradores en 2010 para la transesterificación del diéster de fosfato 2-hidroxiopropil 4-nitrofenil fosfato, HpNPP. La catálisis con guanidina mostró ser la más eficiente, donde tanto la parte protonada como la base libre, desarrollaban una parte de la catálisis. Este amortiguador favorece la reacción, ya que la guanidina puede extraer un protón del sustrato y el guanidinio, puede interaccionar con nucleófilos activándolos. En la figura 5 se ilustran las interacciones que puede presentar esta especie.

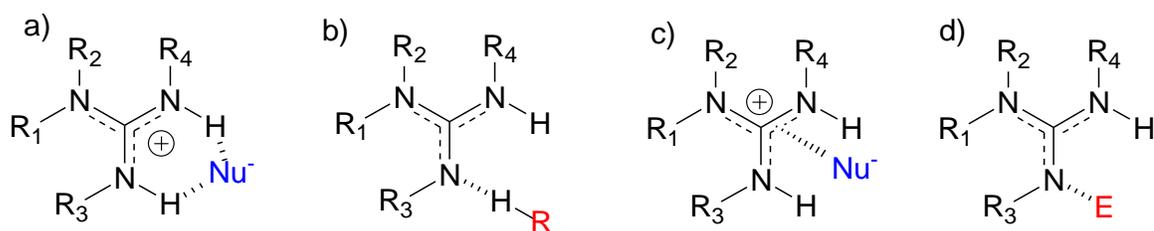


Figura 5. Interacciones posibles en la catálisis con guanidina. La activación de Brønsted a) ácida b) básica, de Lewis c) ácida y d) básica.

Imagen modificada de: Cho y Wah Wong, 2015.

Algunas de las características que hacen a las guanidinas tan buenos catalizadores son la capacidad de deslocalizar la carga positiva al protonarse (Taylor y col., 2012) y su estructura rígida y plana, que la hace complementaria geoméricamente a diversos oxoaniones, lo que permite la formación de enlaces de hidrógeno entre ellos. Tal es el caso de los fosfodiésteres y la interacción propuesta por Salvio en 2015 (Ver figura 6), misma interacción que sucede en los sitios hidrofóbicos de proteínas.

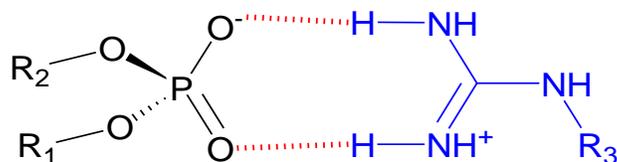


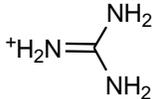
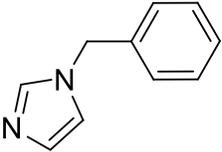
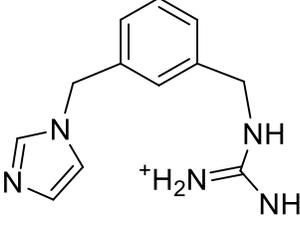
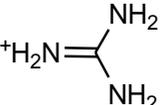
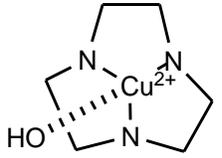
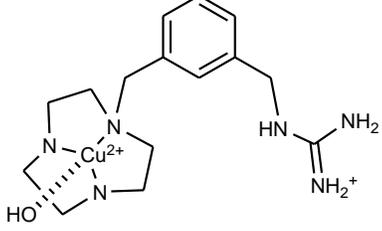
Figura 6. Interacción del grupo guanidinio con fosfodiésteres.

Modificada de: Salvio, 2015

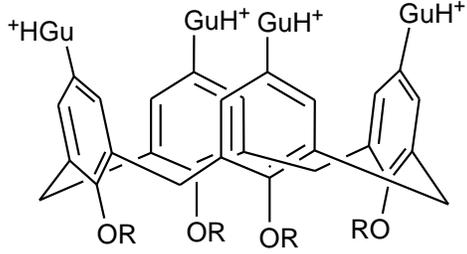
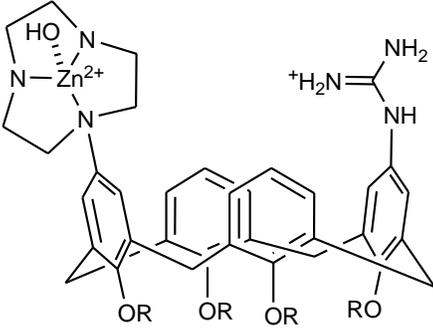
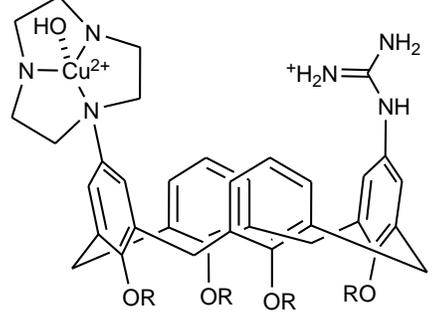
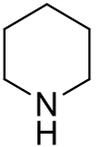
Se ha aprovechado la capacidad de modificar la estructura de la guanidina para sintetizar nuevas moléculas, como catalizadores que contienen un grupo guanidinio, o un guanidinio en conjunto con otra unidad activa como un centro metálico, un grupo hidroxilo, o alguna base libre en disolución, las cuales pudieran acelerar más la reacción (Ishikawa, 2009). Moléculas que contienen guanidinas en su estructura, como las biguanidas: metformina y moroxidina, demostraron realizar la catálisis del HpNPP en DMSO acuoso, con un mecanismo básico general (Grajeda, 2017). Así mismo, Salvio y colaboradores han sintetizado compuestos con espaciadores, calixarenos y complejos de metales con hidróxido, para utilizarlos como catalizadores en la ruptura de mono y diésteres. Sintetizaron fosfodiésteres artificiales a base de moléculas que unían a un grupo guanidinio ya sea con un grupo imidazol, o un complejo cíclico de nitrógeno unido a Zn^{2+} o Cu^{2+} ; la unión del guanidinio a estos se realizó mediante *m*-xilenos (Salvio, 2011), estos complejos mejoraron la catálisis en comparación con el guanidinio libre. Como ejemplo, el complejo con zinc mejoró la constante en 4 órdenes de magnitud. Usaron también calix[4]arenos sustituidos con 2, 3 y 4 grupos guanidinio (Baldini y col., 2012), donde el calixareno sustituido con 3 guanidinos fue ligeramente más eficiente, a pesar de que el tercer grupo guanidinio actuó solo como espectador. Calix[4]arenos sustituidos con dos guanidinos en posiciones 1,2 y 1,3 fueron utilizados para la ruptura de diribonucleósidos monofosfato (GpA, GpU, UpU, CpA), con mejores resultados que para la ruptura de HpNPP. y concluyó que estos calixarenos son plataformas útiles para el diseño de catalizadores bifuncionales (Salvio, 2014). Con base en eso, diseñaron catalizadores con cobre ligado a 1,4,7-triazociclononano (TACN), este unido a un calixareno en posición 1,3 con guanidinio. Este fue usado en la transesterificación de HpNPP y la ruptura de diribonucleósidos monofosfato, con mayor eficiencia para HpNPP (Salvio, y otros, 2015). El mecanismo propuesto por Salvio en sus trabajos es una catálisis bifuncional: activación electrostática del estado de transición por parte del ion guanidinio y catálisis básica, ya sea por guanidina o por cualquiera de las otras bases utilizadas. (En la tabla 1 se muestran las constantes obtenidas por este grupo). En contraste, Piatek (Piatek y col., 2004)

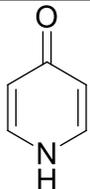
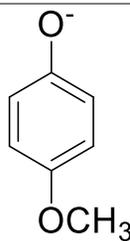
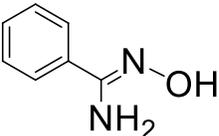
trabajó con un diéster de fosfato, el 2-hidroxiopropilfenil fosfato, al cual se le agregó guanidina como sustituyente en la posición orto. Esto provocó que el mecanismo que llevaba a cabo la guanidina protonada fuera el de un ácido general, y no la estabilización electrofílica. A continuación, se muestra en la tabla 1, un resumen de los catalizadores más destacados usados en la ruptura de ésteres de fosfato.

Tabla 1. Constantes de rapidez observadas para la ruptura ésteres de fosfato con diferentes sistemas, utilizados por otros grupos de investigación.

Sustrato	Catalizador	k_{obs} (s ⁻¹)	pH	Referencia
HpNPP DMSO agua (80:20)		9.6×10^{-9}		
		1.64×10^{-8}	7	
		1.04×10^{-7}		
		2.8×10^{-9}		
		2.6×10^{-5}	9	
		1.02×10^{-4}		

		1.6×10^{-8}	
		3.6×10^{-5}	9.8
		2×10^{-4}	
		6.3×10^{-6}	9.3
HpNPP DMSO agua (80:20)		2.3×10^{-5}	10.4
		3.8×10^{-5}	11.1

		1.06×10^{-5}	10.9	
HpNPP DMSO agua (80:20)		1.1×10^{-4}	9.9	
GpA*		1.3×10^{-3}		Salvio, 2015
GpU*		1.6×10^{-4}		
UpU*		8.5×10^{-5}		
CpA*		2.6×10^{-5}	8.8	
		1.2×10^{-6}		
	HClO ₄ ^b	6.04×10^{-4}	ND	
	H ₂ SO ₄ ^b	7.91×10^{-4}	ND	
DPpNPP agua dioxano(95:5 v/v)	HCl ^b	3.83×10^{-4}	ND	Bunton, 1968
	NaOH ^b	3.73	ND	
	(CH ₃) ₄ NOH ^b	3.8	ND	
	(CH ₃) ₄ NOH +(CH ₃) ₄ NCl ^b	4.18	ND	
	LiOEt ^b	1.36	ND	
DPpNPP Etanol	NaOEt ^b	1.03	ND	NayelKerke, 2003
	KOEt ^b	0.85	ND	
	CsOEt ^b	0.42	ND	
DEtpNPP Etanol agua 44%		0.9×10^{-4} ^b	ND	Castro,2011

		$0.43 \times 10^{-4}{}^b$	ND
		$0.34 \times 10^{-4}{}^b$	ND
Paraoxón Agua		$1.1 \times 10^{-3}{}^b$	López, 2017
Paratión Agua		$1.9 \times 10^{-4}{}^b$	

[Cat] = 1 mmol L⁻¹, 25 °C; ^b[Cat] = 1 mol L⁻¹; * DMSO-agua (80:20); ^x 50°C

Efecto del Disolvente

Las variaciones en el disolvente pueden cambiar drásticamente el progreso de una reacción y dado, a que las interacciones entre soluto y solvente son sensibles al medio, comprender este complejo fenómeno no es sencillo, a pesar de que ha sido investigado extensamente (Anslyn, 2006). Entre los posibles efectos de un disolvente, destacan el efecto en el mecanismo de reacción y el efecto sobre el valor de *pKa*. Además, existen relaciones cuantitativas para medir diversos efectos de los disolventes, tales efectos se describen brevemente a continuación.

Efecto en el mecanismo de reacción

La mayoría de las reacciones químicas se llevan a cabo en disolución, como consecuencia, el mecanismo de reacción depende del disolvente, ya que la interacción soluto-disolvente afecta las propiedades y la reactividad de los compuestos reaccionantes (Juaristi, 2015).

Un claro ejemplo de la influencia de un disolvente sobre una reacción son las sustituciones nucleofílicas. Al cambiar de un disolvente polar prótico a otro polar aprótico puede provocar un cambio de mecanismo de S_N1 al S_N2, tal es el caso de la reacción ilustrada en la figura 7, donde

se genera el mismo producto bajo dos diferentes mecanismos, provocados por el cambio del disolvente.

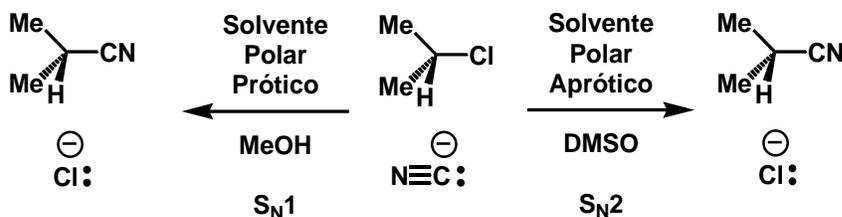


Figura 7. Efecto del disolvente sobre el mecanismo de reacción.

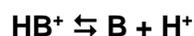
Los disolventes próticos polares favorecen los mecanismos del tipo S_N1. Esto se debe a que en este mecanismo se desarrolla y concentra una carga eléctrica en el estado de transición en relación con los reactivos de partida. La energía requerida para llevar a cabo el proceso se hace menor a medida que crece la constante dieléctrica ϵ del medio; el proceso también se ve facilitado al aumentar la solvatación del par iónico en desarrollo (Reichardt, 1982). En cambio, para las reacciones S_N2, se observa un aumento en la rapidez de las reacciones cuando se efectúan en disolventes polares apróticos (Sykes, 2002). Tal efecto resulta conveniente en el estudio de los mecanismos de reacción ya que puede emplearse como herramienta de diagnóstico mecanístico. Al conocer la influencia del disolvente sobre la rapidez de reacción, se puede conocer el mecanismo por el cual esta se lleva a cabo.

Efecto del disolvente sobre el *pK_a*

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



La razón por la cual los ácidos neutros se ionizan menos en disolventes de menor permitividad dieléctrica, es 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 (puesto 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).

Efecto cuantitativo del disolvente

El efecto que tiene un disolvente o una mezcla de disolventes en una reacción, depende de las interacciones que este tenga tanto con los reactivos como con las especies intermediarias. Por esta razón, a pesar de ser parámetros importantes, no es suficiente evaluar el efecto del disolvente sólo con la permitividad relativa y la polaridad. En las últimas décadas se han diseñado diferentes técnicas experimentales con el fin de investigar y esclarecer el rol que juegan los disolventes sobre una reacción (Audran y col., 2012).

Si todas las interacciones posibles de soluto-solvente se toman en cuenta, entonces el intento de correlacionar la constante de velocidad con el medio generara ecuaciones tan complicadas que su verificación experimental sería imposible. Por eso las ecuaciones que se correlacionan con las constantes de velocidad son usualmente derivadas de modelos justificados teóricamente, permitidas solo para un número limitado de factores de interacción. Si el modelo adoptado refleja correctamente las interacciones dominantes de soluto-solvente, entonces una buena descripción cuantitativa de los datos experimentales derivada de una ecuación teórica puede ser obtenida (Reichardt, 2003). A continuación, se indican algunos de los parámetros más utilizados para correlacionar la reactividad en función del disolvente.

$E_T(30)$ o Energía de transición electrónica molar. Existen diferentes maneras de medir la polaridad de un disolvente, una de ellas es mediante el uso de indicadores solvatocrómicos. La energía de las transiciones electrónicas de los solutos depende de la polaridad del disolvente,

esto puede ser medido fácilmente con el máximo de absorción en el UV-visible. El indicador utilizado es el 2,6-difenil-4-(2,4,6-trifenilpiridinio-1-il) fenolato, betaína 30, propuesto por Reichardt y Dimroth. El valor de este parámetro para cada mezcla de disolventes o disolvente puro se puede calcular con la siguiente fórmula.

$$E_T(30) = hc\bar{\nu}N_A = 2.859 \times 10^{-3} \bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$$

Por definición, los valores obtenidos con la ecuación anterior están en unidades de kcal/mol; sin embargo, es recomendable el uso de estos valores normalizados, E_T^N , mediante el uso del valor de referencia de 0 para tetrametilsilano y de 1 para el agua (Ortega y col., 1996). Estos valores nos proveen información acerca de las interacciones soluto-disolvente y disolvente-disolventes presentes en mezclas. En la escala normalizada, un valor cercano a cero nos indica que el disolvente o la mezcla es poco polar y un valor cercano a 1 que la mezcla es polar. Una correlación lineal de este parámetro con el logaritmo de la constante de rapidez, indica que la reacción es dependiente de la polaridad del medio.

Escala de Catalán. Es usada para llevar a cabo un análisis multiparamétrico de varias escalas reportadas y datos experimentales de interés. Dicho análisis está dado por:

$$P = aSPP + bSA + cSB + P_0$$

Donde P es la cantidad por describir en algún solvente, o mezcla de ellos; SPP, SA y SB son los valores para la polarizabilidad, acidez y basicidad para dicho solvente, respectivamente; los coeficientes a, b y c hablan de la sensibilidad de P para dichos efectos, mientras que P_0 es el valor de P en el vacío (Wypych, 2011). En principio, cualquier propiedad molecular de una mezcla de disolventes, puede ser evaluada usando la ecuación anterior (Catalán y col., 2001).

Relaciones de Kirkwood. Este tipo de relación es útil para analizar el efecto del disolvente en reacciones que involucran especies neutras polares. La ecuación de Kirkwood se basa en que un cambio en la polaridad de las especies en el estado de transición puede verse afectado por la polaridad del medio. Para esto se utiliza el tratamiento de Eyring, en el cual se considera un equilibrio entre los reactivos y el complejo activado en el estado de transición:



Si consideramos dos moléculas dipolares A y B, con momentos μ_A y μ_B , para formar un complejo activado con un momento dipolar μ^\ddagger podemos obtener la siguiente ecuación:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{N_A}{4\pi \cdot \epsilon_0 \cdot R \cdot T} \cdot \left(\frac{\mu_A^2}{r_A^3} + \frac{\mu_B^2}{r_B^3} - \frac{\mu_{\ddagger}^2}{r_{\ddagger}^3} \right) \cdot \frac{\epsilon_r - 1}{2\epsilon_r + 1}$$

Donde k es la constante de rapidez en el medio de permitividad relativa ϵ_r y k_0 es la constante en un medio en fase gaseosa. Esta importante fórmula relaciona los cambios de energía de solvatación de Gibbs de un soluto dipolar, con la permitividad relativa del disolvente y el momento dipolar y radio del soluto, tomando en cuenta solo fuerzas de tipo electrostáticas entre soluto y solvente (tipo dipolo-dipolo). Con esta ecuación se puede predecir qué si el complejo activado es más dipolar que los reactivos, entonces la velocidad de reacción aumenta con la permitividad relativa del medio, en función del valor de la pendiente de la correlación (Reichardt, 2003). Además, si se cuenta con los radios de las moléculas reactantes y sus momentos dipolares, es posible determinar el tamaño del complejo activado.

MATERIALES Y METODOS

Sustrato

Para la realización de los estudios cinéticos se empleó como sustrato el triéster de fosfato, difenil *p*-nitrofenilfosfato (DPpNPP) $M = 371.28 \text{ g mol}^{-1}$ (ver figura 8). La reacción de hidrólisis de este sustrato es irreversible y uno de sus productos es el 4-nitrofenolato en condiciones alcalinas, lo que presenta la ventaja de ser fácilmente detectable por espectrofotometría de absorción electrónica, debido a que tiene una banda característica en la región del visible a 400 nm en agua y presenta muy poco efecto solvatocrómico.

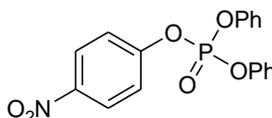


Figura 8. Estructura del DPpNPP.

Síntesis del Sustrato

Para la síntesis del DPpNPP se modificó la metodología descrita por Bunton y colaboradores (1968), Jones y colaboradores (2003) y Gulick y Geske (1966). En un matraz de 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). La reacción se ilustra en la figura 9. 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 recrystalizó con etanol. Al sólido obtenido se le determinó el punto de fusión ($T_f = 48\text{-}49 \text{ }^\circ\text{C}$) 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, d^6 -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, d^6 -DMSO) $\delta(\text{ppm})$: -16 ppm; los espectros se muestran en el anexo 1. Además, para confirmar la formación del compuesto se hizo una prueba de hidrólisis por

espectrofotometría de UV-Vis, donde se monitorizó 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 dimetilsulfóxido en concentración 10 mmol L⁻¹.

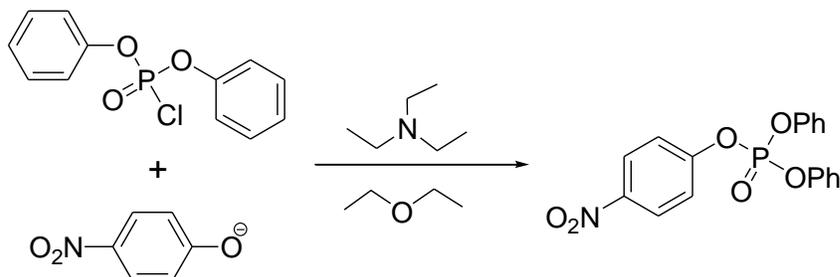


Figura 9. Reacción de síntesis del DPpNPP.

Disolventes

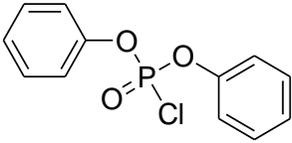
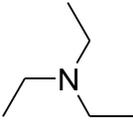
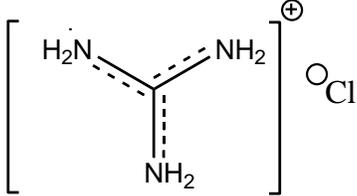
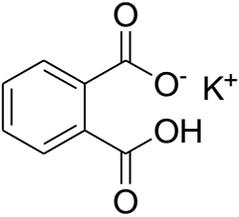
Para la realización de todos los experimentos se utilizó agua desionizada obtenida del equipo Barnstead Nanopure (modelo D11901). El dimetilsulfoxido (DMSO) que se utilizó fue adquirido de Sigma Aldrich con una pureza del 99.5% y se utilizó sin ningún tratamiento previo. En todos los ensayos se utilizaron mezclas de DMSO-Agua, donde varió el porcentaje de DMSO del 20% al 80% (v/v), con un incremento de 10% en 10%.

Reactivos

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma Aldrich y usados sin tratamiento previo. El amortiguador que se utilizó como catalizador se generó *in situ* con cloruro de guanidinio e hidróxido de tetrametilamonio.

Tabla 2. Estructura y características principales de los reactivos utilizados.

	4-nitrofenol $M = 139.11 \text{ g mol}^{-1}$ pureza > 99%
--	---

	Cloruro de difenil fosfato $M = 268.63 \text{ gmol}^{-1}$ pureza del 99%
	Trietilamina $M = 101.19 \text{ gmol}^{-1}$ pureza > 99%
	Éter etílico $M = 74.12 \text{ gmol}^{-1}$ pureza >99%
Me_4NCl	Cloruro de tetrametilamonio $M = 109.60 \text{ gmol}^{-1}$ pureza del 99%
$\text{Me}_4\text{NOH}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Hidróxido de tetrametilamonio pentahidratado $M = 181.23 \text{ gmol}^{-1}$ pureza > 97%
HCl	Ácido clorhídrico $M = 36.46 \text{ gmol}^{-1}$ pureza del 37%
	Cloruro de guanidinio $M = 95.53 \text{ gmol}^{-1}$ Pureza > 99%
DMSO	Dimetilsulfóxido $M = 78.13 \text{ gmol}^{-1}$ Pureza > 99.5%
	Biftalato de potasio $M = 204.22 \text{ gmol}^{-1}$ Pureza > 99.5%
NaOH	Hidróxido de sodio $M = 40.0 \text{ gmol}^{-1}$ Pureza > 98.6%

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 (aquatrodo) y una termosonda Pt 1000, con un intervalo de medición entre -50 y 100 °C, de acero inoxidable, 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 Julabo modelo FP45-HL.

Programas

El análisis de los datos obtenidos de los experimentos cinéticos y de las titulaciones potenciométricas para determinar las constantes de rapidez y las constantes de ionización del agua 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).

Estudios Cinéticos

La reacción de ruptura del DPpNPP (Figura 10) se siguió mediante el uso de un espectrofotómetro de UV/Vis, ya que durante la ruptura se genera el anión 4-nitrofenolato, el cual presenta una banda de absorción característica en la región del visible (400-420 nm, dependiendo de la proporción de disolvente). Debido a que las cinéticas se realizaron en distintas proporciones de DMSO-agua, se determinó la longitud de onda de los máximos de absorbancia del anión 4-nitrofenolato en las distintas mezclas, así como los valores de absortividad molar (ϵ).

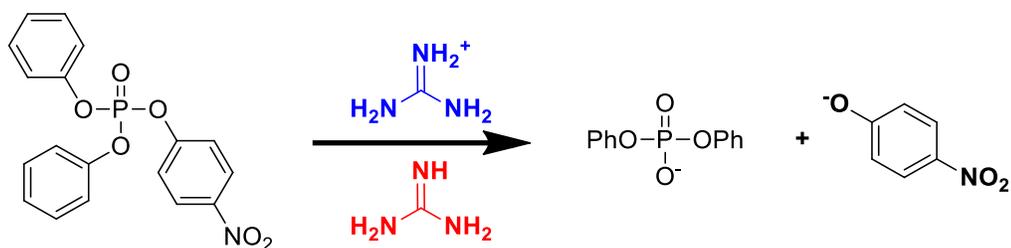


Figura 10. Reacción de la ruptura catalítica del tipo ácido base del compuesto DPpNPP.

Para los estudios cinéticos se utilizaron mezclas de DMSO con agua en una proporción variable volumen/volumen desde 20 hasta 80 % (con un incremento de 10 en 10) de DMSO para cada perfil. Todas las mediciones se llevaron a cabo en celdas de cuarzo de 1 cm de longitud de paso óptico, con un volumen final de la solución de 2.5 mL. La temperatura de todos los experimentos se mantuvo constante a 37° C, al igual que la fuerza iónica en un valor de 0.1 mol L⁻¹ con cloruro de tetrametilamonio. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de una alícuota de la disolución del DPpNPP a la celda. Todas las reacciones fueron realizadas en condiciones de pseudoprimer orden, es decir, la concentración del sustrato fue de 60 μmolL⁻¹ mientras que la del catalizador varió de 0.4 a 30 mmolL⁻¹. Las constantes de rapidez observadas fueron obtenidas en el programa OriginPro™ mediante un ajuste no lineal, correspondiente a la formación del producto mediante una cinética de primer orden, con la siguiente ecuación:

$$A = \Delta A_{\text{inf}}(1 - e^{-kt}) + A_0 \quad \text{Ec. 1}$$

Donde, A_0 , es la absorbancia al tiempo igual a 0, ΔA_{inf} es la diferencia entre la absorbancia en el infinito e inicial, k es la constante de rapidez, y t es el tiempo. En la figura 11, se muestra un ejemplo del ajuste de una cinética con la ecuación anterior.

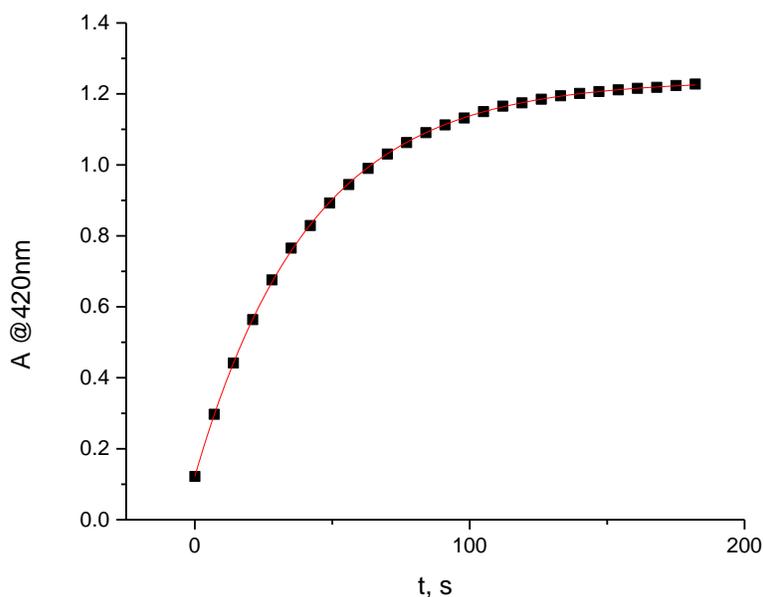


Figura 11. Ejemplo de un ajuste con la ecuación 1 para la ruptura catalítica del DPpNPP.

Perfiles de Concentración y Neutralización

El perfil de concentración se realizó para conocer si existe catálisis por parte del amortiguador (guanidina/guanidinio) y determinar el orden de la reacción del mismo. Mientras que el perfil de neutralización se hizo para conocer la especie del amortiguador que está realizando la catálisis. Para obtener el perfil de concentración, se hizo variar la concentración total del amortiguador desde 2 mmol L⁻¹ hasta 30 mmol L⁻¹, a una fracción de guanidina libre constante; el amortiguador se generó a partir de una solución de cloruro de guanidinio, e hidróxido de tetrametilamonio. La concentración del sustrato fue de 60 μmol L⁻¹ (concentración que origina el pseudoprimer orden). Estos experimentos se realizaron a 37° C, con una fuerza iónica constante de 0.1 mol L⁻¹. Para determinar el orden de reacción del catalizador (k_{Gu}), se hicieron gráficas de las constantes de rapidez observadas (k_{obs}) en función de la concentración de guanidina añadida.

Los posibles perfiles para dichos gráficos se ilustran en la figura 12. En la curva **a** se observa un comportamiento de orden cero respecto al catalizador, lo cual indica que no existe la catálisis. Esto se observa ya que no hay dependencia con la concentración del mismo y se ve reflejado en la pendiente de valor cero ($y = k_0$). En la curva **b** se observa un comportamiento lineal, es decir, una dependencia de orden uno con relación al catalizador ($y = k_{cat}[Cat]_T + k_0$).

Esto podría sugerir la participación de algunas de las especies del catalizador. Finalmente, en la curva **c** vemos un comportamiento cuadrático, característico de una reacción de segundo orden ($y = k_{\text{cat}}[\text{Cat}]^2_{\text{T}} + k_{\text{cat}}[\text{Cat}]_{\text{T}} + k_0$). Este tipo de perfiles puede deberse a una contribución de segundo orden de la base, del ácido o bien, de ambos al mismo tiempo.

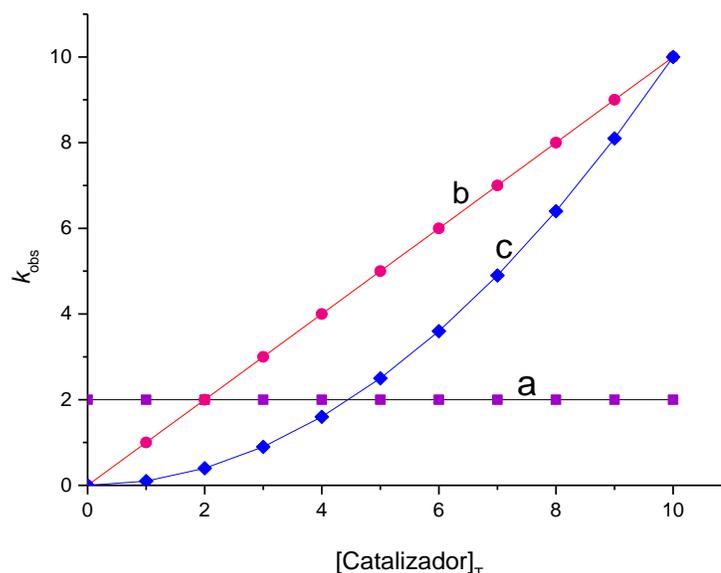


Figura 12. Perfiles posibles de la variación de las constantes de rapidez en función de la concentración del catalizador: a) perfil de orden cero, b) perfil de primer orden y c) perfil de segundo orden con respecto al catalizador.

Para conocer las especies del amortiguador que participan en el mecanismo de la reacción en la hidrólisis del DPpNPP, se realizaron perfiles de neutralización en cada mezcla de DMSO–agua estudiada. 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 DMSO-agua, excepto para la mezcla con 80% DMSO donde se varió la fracción de neutralización desde 0.2 hasta 0.8 neutralizado con variaciones de 0.1. Para analizar los datos, se realizó un gráfico de las constantes obtenidas previamente 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 13. Una vez conocido el perfil de neutralización, se hizo un ajuste eliminando la contribución por la catálisis básica específica, la

cual se explicará a detalle más adelante. Con el ajuste ya corregido para cada medio, se obtuvo el valor de la constante de rapidez por la catálisis por guanidina (k_{Gu})

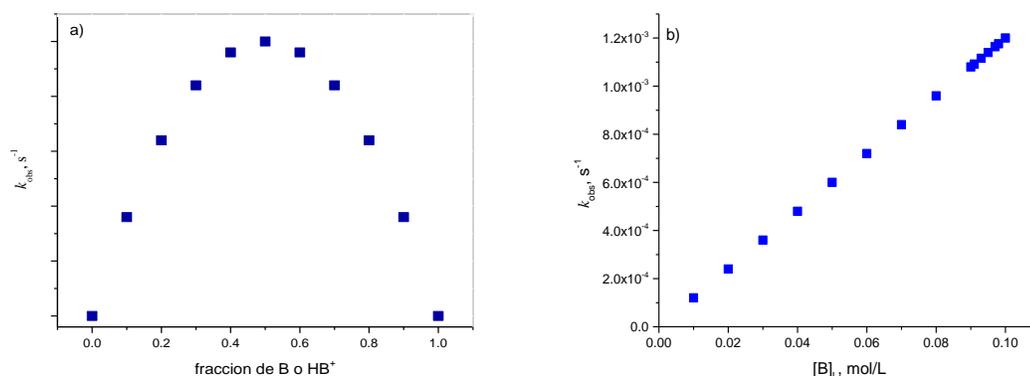


Figura 13. Perfil de neutralización, a) gráfico en campana característico de la catálisis bifuncional, b) recta con pendiente positiva correspondiente a una catálisis por la especie básica.

Catálisis Básica Específica

Para determinar la contribución de la catálisis básica específica en la hidrólisis del DPpNPP, se realizaron perfiles con variación en la concentración de hidróxido de tetrametilamonio en ausencia del amortiguador. Los experimentos se realizaron en cada una de las mezclas de DMSO-agua estudiadas (37° C, fuerza iónica de 0.1 mol L^{-1}), donde la concentración de hidróxido se hizo variar de 0.4 a 5 mmol L^{-1} . Para la obtención de la constante k_{OH} , se obtuvo la pendiente de la gráfica de k_{obs} en función de la concentración de hidróxido ($k_{obs} = k_{OH}[\text{OH}]$). Un ejemplo se muestra en la figura 14.

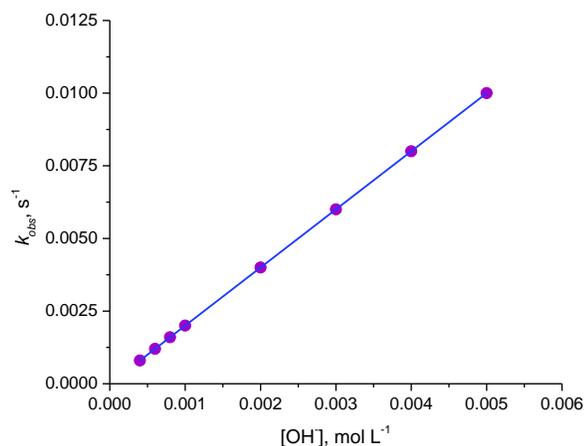


Figura 14. Perfil de catálisis básica específica.

Estudios Potenciométricos

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

Para la estandarización de las disoluciones se utilizó un patrón secundario, el cual fue hidróxido de sodio que fue normalizado con biftalato de potasio. En el caso de las disoluciones básicas, se estandarizaron con ácido clorhídrico que fue estandarizado con el hidróxido de sodio normalizado.

Para determinar el *pK_w* se utilizaron 20 mL de ácido clorhídrico 0.01 mol L⁻¹, el cual fue titulado con hidróxido de tetrametilamonio 0.1 mol L⁻¹ en cada una de las mezclas de DMSO-agua estudiadas. El valor de *pK_w* se obtiene mediante el ajuste no lineal con la ecuación 2 (Johansson y Johansson, 1978) de la gráfica de volumen de base añadido contra el pH.

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

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 la diferencia en el potencial de la interfase del electrodo (potencial de unión), pK_w es 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 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 ($pH_{corr} = pH_{obs} - \log f$) 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 15.

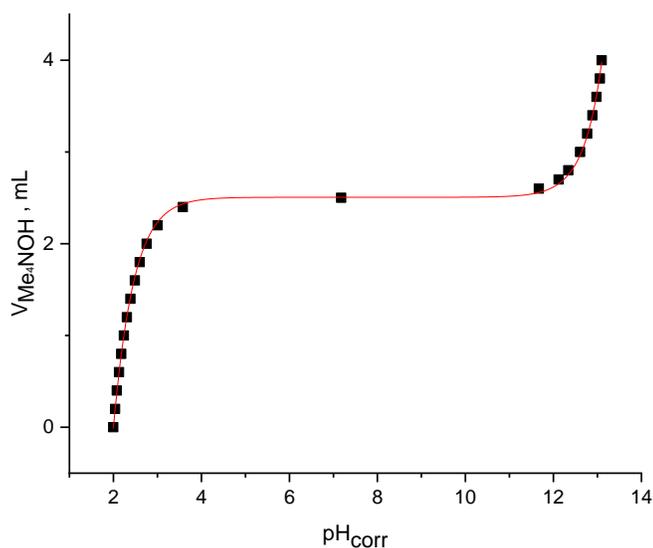


Figura 15. Gráfica de una determinación de pK_w .

Una vez obtenido el valor del pK_w , se determinó el pK_a , donde se valoró una disolución de cloruro de guanidinio de concentración 0.01 mol L^{-1} con hidróxido de tetrametilamonio 0.1 mol L^{-1} para cada mezcla de DMSO-agua estudiada. Después de las titulaciones potenciométricas, los valores de pK_a fueron obtenidos mediante el programa Hyperquad 2008.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de los Valores del pK_w del Agua y del pK_a de Guanidinio en las Mezclas DMSO- Agua

Los valores de pK_a y pK_w se determinaron para poder conocer las especies participantes en cada una de las mezclas de disolvente utilizadas. Lo anterior se debe a que al hacer los estudios de la catálisis con amortiguadores ácido-base de guanidina, es necesario conocer con mayor certidumbre la concentración de los iones hidróxido, la guanidina libre y el ion guanidinio. Los valores de pK_w obtenidos en cada una de las mezclas estudiadas (y medidos como se muestra en la sección de metodología), se encuentran en la tabla 3. De la tabla, se puede notar que los valores de pK_w aumentan con el contenido de DMSO, es decir, a mayor contenido de DMSO la autoionización del agua es menor. Este efecto puede deberse a que la permitividad relativa disminuye (anteriormente llamada constante dieléctrica, que es la capacidad del medio para separar las cargas), y esto repercute en la capacidad del medio para poder solvatar a los iones hidróxido y iones hidrógeno, por lo que no se favorecerá su generación a partir del agua.

Tabla 3. Valores de pK_w en las diferentes mezclas de DMSO-agua a 37°C.

Porcentaje de DMSO, v/v	10	20	30	40	50	60	70	80
pK_w	14.03	14.26	14.53	15.05	15.47	16.37	17.24	18.80

Error menor 0.1%

Otro efecto que es importante notar es que mientras que el porcentaje de DMSO no supere el 50%, el aumento en el valor del pK_w es pequeño, sin embargo, del 50 al 80% de DMSO los valores de pK_w tienen un aumento de casi una unidad logarítmica. En la figura 16 se muestra el efecto de la fracción molar del DMSO sobre el valor pK_w , en esta podemos observar una clara dependencia lineal. Debido a que se encontró esta dependencia, se buscó la correlación entre el valor de pK_w y el valor de la permitividad la cual se muestra en la figura 17.

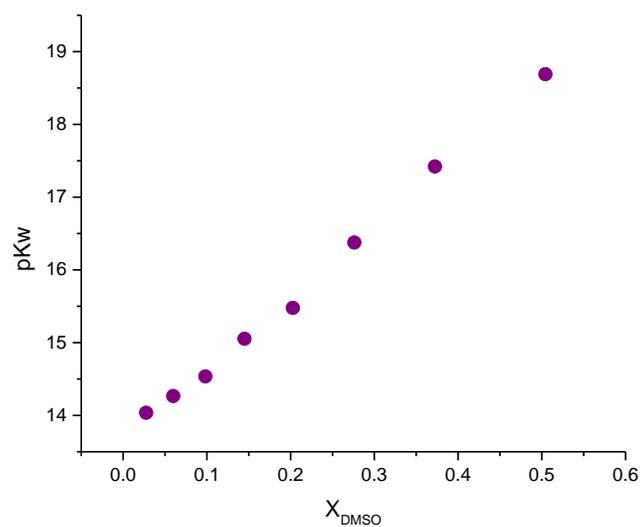


Figura 16. Efecto del DMSO sobre los valores de pK_w para las mezclas estudiadas a 37°C, con una fuerza iónica de 0.1 mol L⁻¹.

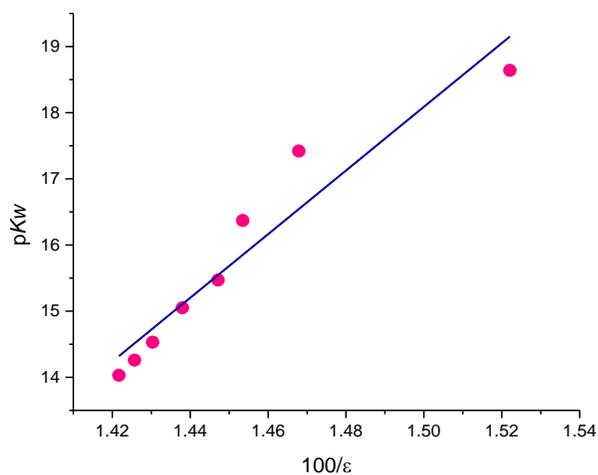


Figura 17. Relación del pK_w con el inverso de la permitividad dieléctrica en mezclas de DMSO-agua del 10 al 80% a 37°C.

Lo anterior es evidencia del efecto que tiene la permitividad del medio en la disociación del agua, además del análisis de los datos se obtuvo la ecuación de ajuste siguiente: $pK_w =$

4813(579)/ $\epsilon - 54.11(8)$, (8, 0.91), con la que se puede calcular el valor de pK_w de una mezcla de DMSO:agua a 37°C. Es importante mencionar, que la dispersión en los datos de la gráfica del pK_w en función de la permitividad del medio, se debe a que los datos utilizados fueron interpolados considerando los valores tomados de las tablas de Landolt (Wohlfart, 2008).

En la figura 18 se muestra la curva de titulación del cloruro de guanidinio con hidróxido de tetrametilamonio en 80% de DMSO a 37°C. Al igual que esta, se hicieron titulaciones del cloruro de guanidinio en las mezclas de DMSO con agua del 10 al 80% del primero, y después se analizaron con el programa Hyperquad 2008 para obtener los valores de pK_a del compuesto. Antes de analizar, siempre se hizo corrección del valor de pH como se menciona en la metodología. Los valores obtenidos de este análisis se encuentran en la tabla 4 y en estos resultados podemos observar que al aumentar el contenido del disolvente orgánico el valor del pK_a aumenta, sin embargo, este incremento es apenas mayor a una unidad logarítmica en el intervalo estudiado a diferencia de los valores de pK_w .

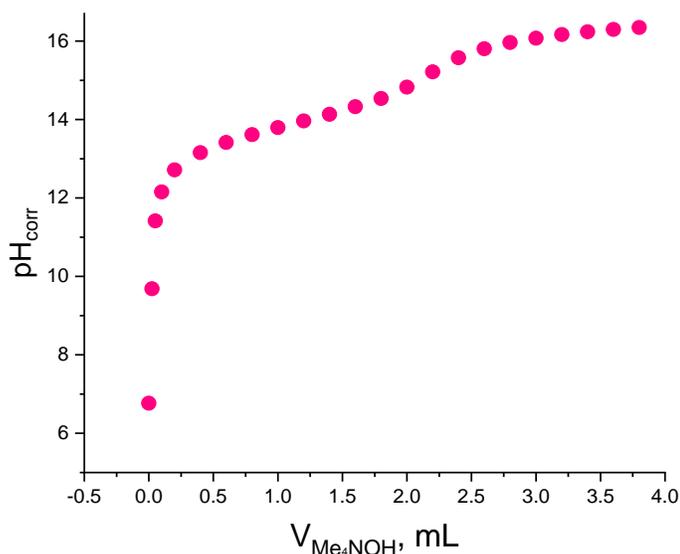


Figura 18. Curva de titulación del ion guanidinio en 80% DMSO, a 37°C, $I = 0.1 \text{ mol L}^{-1}$.

En 2011, Corona informó que el valor del pK_a del guanidinio es de 13.91(0.03) en la mezcla 4:1 de DMSO-agua a 37°, el cual es un valor similar al obtenido en el presente trabajo. Además, en ese mismo trabajo se determinó los valores de pK_a de diferentes ácidos catiónicos de tipo amidinio, amino y guanidinio y encontró que al cambiar de agua a la mezcla con DMSO-agua no

hay una variación mayor a una unidad en los valores de pK_a . Este efecto lo atribuye a que los ácidos catiónicos al disociarse generan una especie neutra y ion hidrógeno, lo que hace que no haya un cambio en la carga y, por tanto, el cambio en la permitividad relativa no afecta en el equilibrio, lo cual también se discute por Cox en 2013.

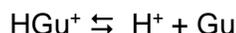


Tabla 4. Valores obtenidos de pK_a para las diferentes mezclas de DMSO-Agua a 37°C.

Porcentaje de DMSO (v/v)	10	20	30	40	50	60	70	80
pK_a	12.67	12.88	13.3	12.97	13.08	13.21	13.39	13.86

Error menor a 1.9%

En la figura 19 se muestra la gráfica que relaciona la permitividad relativa (valores tomados de Wohlfart, 2008) y el valor de pK_a determinado en este trabajo para el ion guanidinio. En esta figura se observa que existe una correlación entre la permitividad y los valores del pK_a , aunque existe una pequeña dispersión en un par de valores la tendencia es claramente lineal. El ajuste encontrado es el siguiente $pK_a = 1008(193)/\epsilon - 1.47(2.81)$, (8, 0.8), el cual nos permitirá obtener valores de pK_a estimados para otras mezclas, en caso de ser necesario, a partir de los valores de permitividad del medio.

Con estos resultados podemos concluir, de manera general, que en mezclas con mayor contenido de DMSO el pK_w aumenta en más de una unidad logarítmica y el pK_a del guanidinio no. Esto significa que, si se utiliza un amortiguador con guanidina en dichas mezclas, habrá menor cantidad de iones hidróxido en el medio que de guanidina libre (en concentración del amortiguador mayor a 1 mmol L⁻¹). En la catálisis con bases catiónicas esto es de gran ayuda, ya que permite observar la catálisis básica general, debido a que la concentración de iones hidróxido es pequeña en relación con la guanidina libre (100 veces menor en la mezcla 4:1 DMSO-agua).

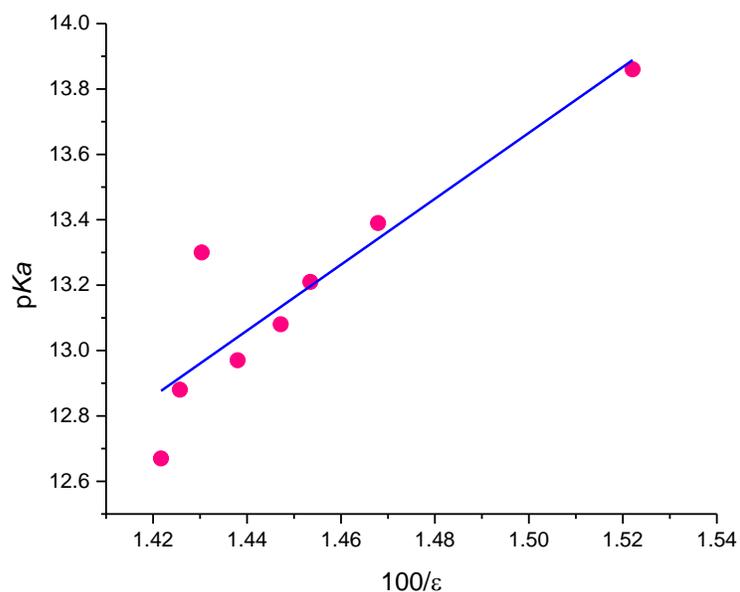


Figura 19. Relación del pK_a con el inverso de la permitividad dieléctrica en mezclas de DMSO-agua del 10 al 80% a 37°C.

Experimentos Cinéticos

Al comenzar con los experimentos cinéticos se determinaron las longitudes de onda para la banda de máxima absorción y las absorptividades molares (ϵ), del anión 4-nitrofenolato (producto de la reacción), en cada una de las mezclas de DMSO-Agua con las que se trabajaron. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Constantes de absorptividad molar para el 4-nitrofenolato en las diferentes mezclas de disolvente a 37°C.

%DMSO, v/v	10	20	30	40	50	60	70	80
ϵ , L mol ⁻¹ cm ⁻¹	19,588	20,091	21,415	22,394	23,716	25,412	27,586	29,000
λ , nm	405	406	408	411	414	416	418	420

Una vez determinados dichos valores, se eligió utilizar 410 nm para realizar un estudio del efecto del contenido de DMSO en la mezcla sobre la constante de rapidez de la reacción, de manera general, para conocer la tendencia. En este experimento se mantuvo constante la concentración del amortiguador de 6 mmol L⁻¹, así como la proporción de neutralización en 0.5 y la fuerza iónica a 0.1 mol L⁻¹. El porcentaje de DMSO se varió de 10 en 10 por ciento. El resultado preliminar es que en 80% la reacción es más rápida, como se muestra en la figura 20.

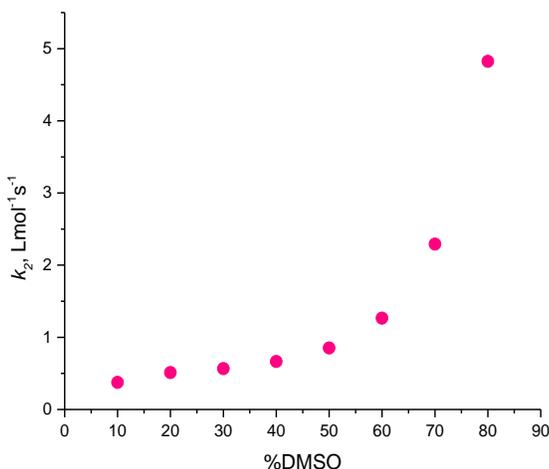


Figura 20. Efecto del contenido de DMSO en la catálisis con guanidina de la ruptura del DPpNPP a 37°C.

En la figura 20, se puede ver que al aumentar el contenido de DMSO en el medio, la constante catalítica aumenta con una tendencia exponencial. Debido a que la mezcla 4:1 DMSO-Agua, fue la de mayor rapidez, se seleccionó para hacer de manera más detallada el estudio de la reacción, sin embargo, para conocer el efecto del DMSO en la reacción se realizaron algunos experimentos en el resto de las mezclas.

Efecto de la Concentración y Neutralización del Catalizador

Para conocer si el amortiguador guanidinio/guanidina es capaz de efectuar la catálisis en la ruptura del DPpNPP, y qué efecto tiene la concentración del amortiguador sobre la constante de rapidez en la reacción, se realizaron cinéticas donde se varió la concentración total de guanidina

en cada celda. Estos experimentos se realizaron a una fracción de neutralización constante y se hizo variar la proporción de neutralización del 20 al 80%, entre cada experimento. Es decir, se mantuvo la proporción entre la especie ácida y la básica (HGu^+/Gu) en cada uno de los experimentos, pero difirió entre un experimento y otro. Las condiciones y concentraciones se especifican en metodología.

Para determinar el orden de reacción del catalizador y la constante catalítica (k_{Gu}), se hicieron gráficas de las constantes de rapidez observadas (k_{obs}) en función de la concentración total de guanidina añadida. Para todas las mezclas utilizadas de DMSO-agua, se realizó este perfil en las fracciones de 0.2, 0.5 y 0.8 de neutralización de la guanidina. En el gráfico de la figura 21 se muestran como ejemplo los perfiles generados en la mezcla con 60% DMSO.

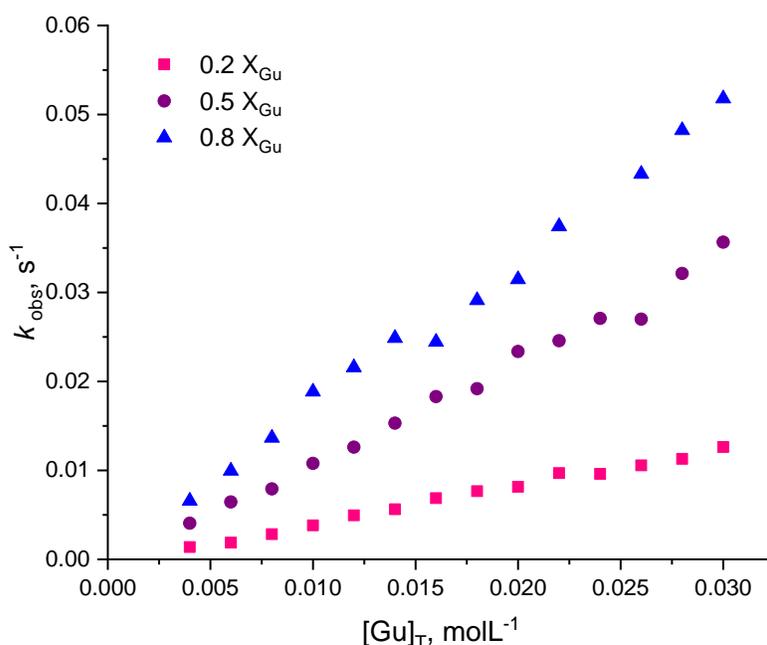


Figura 21. Perfil de concentración en ruptura ácido-base del DPpNPP catalizada con guanidina neutralizada al 20, 50 y 80% en 60% DMSO (v/v) a 37°C.

Debido a que en 80% de DMSO-agua se encontró mayor actividad catalítica en el estudio preliminar, además de las fracciones de neutralización mencionados anteriormente, se amplió la variación de 0.1 en 0.1, tal como se muestra en la figura 22.

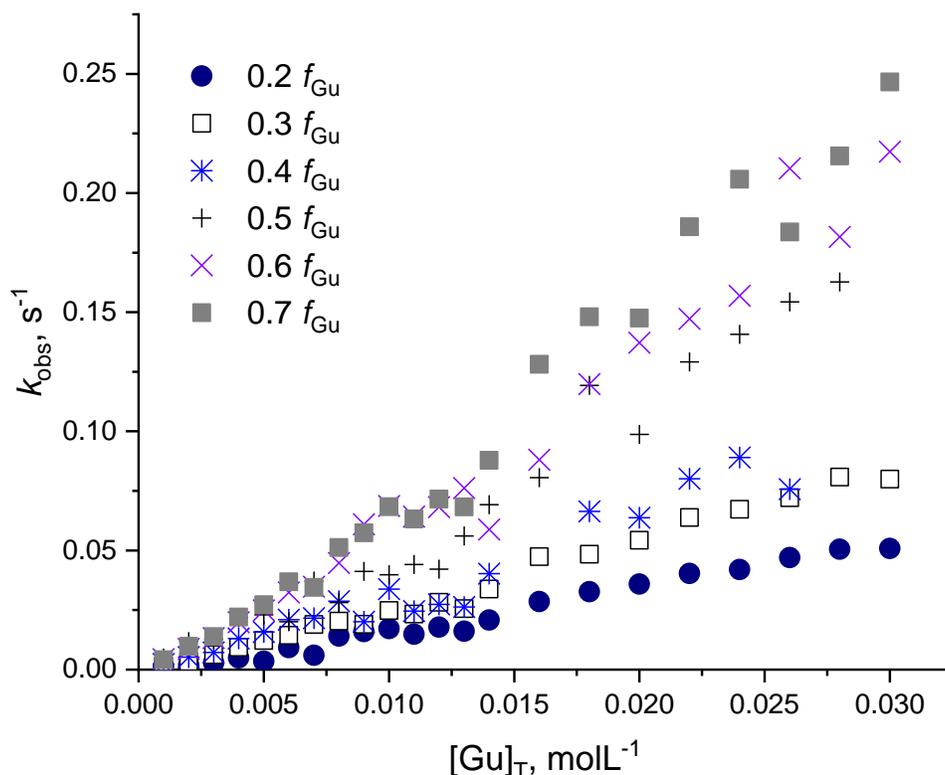


Figura 22. Perfil de concentración en ruptura del DPpNPP con guanidina neutralizada a diferentes proporciones en 80% DMSO a 37°C.

Tanto en la figura 21 como en la figura 22, se puede observar que la ruptura ácido-base del DPpNPP tiene una dependencia lineal en relación con la concentración total de guanidina. Esto significa que en estas concentraciones el mecanismo involucra, aparentemente, sólo una especie del amortiguador ya sea la forma protonada o la libre (aunque, por la tendencia en el perfil de neutralización, es más factible que la guanidina libre sea la fracción catalítica). Debido a la evidencia anterior, podemos descartar la posibilidad de una catálisis bifuncional y la ecuación general para la catálisis con guanidina seguirá la siguiente ecuación: $k_{obs} = k_{Gu}[Gu]_T + k_0$, donde k_0 es prácticamente cero en las condiciones del experimento. En la tabla 6 y 7 se muestran los valores obtenidos de las pendientes de cada uno de los perfiles hechos en este trabajo. La separación de ambas tablas se hizo para mayor claridad al lector.

Tabla 6. Valores de k_{Gu} para las diferentes proporciones de neutralización en la mezcla con 80% DMSO.

f_{Gu}	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
k_{Gu} , L mol ⁻¹ s ⁻¹	1.69	2.66	3.18	4.81	6.61	7.35	7.53

Error menor al 3.5%

Tabla 7. Valores para k_{Gu} a diferentes proporciones de neutralización de guanidina en mezclas DMSO-agua del 20 al 70 por ciento a 37°C.

%DMSO (v/v)	k_{Gu} , L mol ⁻¹ s ⁻¹		
	f_{Gu}	f_{Gu}	f_{Gu}
	0.2	0.5	0.8
20	0.16	0.45	0.75
30	0.18	0.48	0.78
40	0.20	0.54	0.85
50	0.31	0.74	1.17
60	0.41	1.12	1.71
70	0.76	2.21	3.54

Error menor al 6.5%

Los valores que se muestran en las tablas anteriores 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 constante de la catálisis básica general en la ruptura del DPpNPP se hicieron gráficos de los valores de las constantes de la catálisis básica general parcial en cada grado de neutralización (figura 23). En el caso de 80% de DMSO se hizo el análisis más detallado, con un mayor número de puntos, mientras que, en el resto de las mezclas, debido a que la tendencia era similar, no hubo necesidad de hacer más experimentos. De este análisis obtenemos evidencia de que la forma básica del amortiguador es la que lleva a cabo la ruptura del DPpNPP en las condiciones estudiadas. La constante catalítica por guanidina, k_B , obtenida de la ecuación: $k_{Gu} = k_B \cdot f_{Gu}$, se encuentran en la tabla 8. Sin embargo, los valores mostrados en dicha tabla son valores que aún no están corregidos, ya que no se han considerado todas las contribuciones, las cuales se analizarán más adelante.

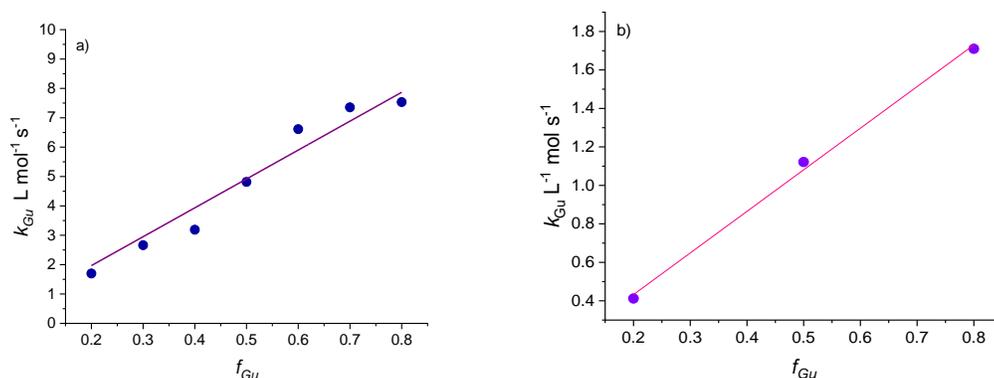


Figura 23. Efecto de la fracción de neutralización del amortiguador en la constante de la catálisis básica general, k_{Gu} para las mezclas de a) 80% DMSO y b) 60% DMSO.

Tabla 8. Valor de k_B en la catálisis básica general del DPpNPP en las diferentes mezclas DMSO-agua a 37 °C.

Porcentaje de DMSO (v/v)	20	30	40	50	60	70	80
k_B	0.92	0.97	1.07	1.47	2.16	4.35	9.83

Error menor al 4%

Contribución de la Hidrolisis Básica Específica

Como se vio anteriormente, en la catálisis ácido-base existen distintas contribuciones, de manera que las constantes observadas son un conjunto de estas contribuciones. En las condiciones anteriores, encontramos que además de la catálisis por guanidina, está la de los iones hidróxido. Para conocer solamente la contribución de la guanidina, es necesario, determinar y considerar la contribución de la catálisis básica específica. Mediante la obtención de la constante k_{OH} y de la concentración de los iones hidróxido en el medio, se puede realizar dicha corrección. Debido a esto, se realizaron perfiles de dependencia de las constantes de rapidez con la concentración de iones hidróxido. Los experimentos se realizaron como se describió en la sección de metodología, los valores obtenidos en cada una de las mezclas de DMSO-agua se ilustran en la figura 24.

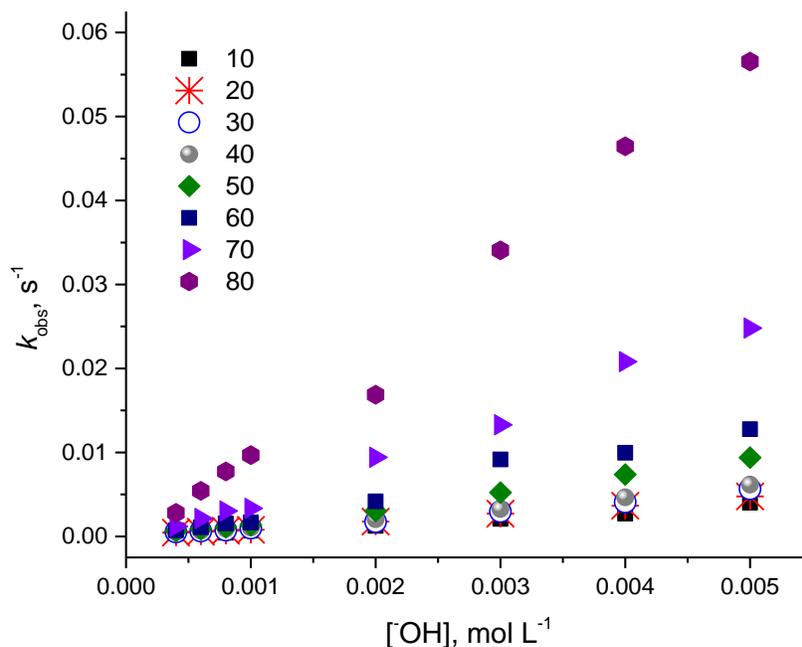


Figura 24. Efecto de la concentración del ion hidróxido en la ruptura del DPpNPP en diferentes mezclas de DMSO a 37°C.

Para obtener la constante de catálisis básica específica, k_{OH} , se obtuvo la pendiente de cada uno de los perfiles de concentración de iones hidróxido en cada mezcla de disolventes ($k_{obs} = k_{OH}[OH]$). Los valores de k_{OH} se muestran en la tabla 9, en la cual se puede observar que al aumentar el contenido de DMSO en el medio, los valores de k_{OH} aumentan. En la figura 25, se encuentran las gráficas para la dependencia de la constante de rapidez para la hidrólisis del DPpNPP con el ion hidróxido en función del contenido de DMSO. En el caso de las coordenadas $\log k_{OH}$ en función de la fracción molar del disolvente, se ve una tendencia lineal, lo que significa que es muy importante la participación del disolvente en la reacción. Lo anterior podría relacionarse con la solvatación del sustrato y del hidróxido, es decir, el aumentar el contenido de DMSO no se favorece la solvatación, lo que propicia un aumento de las interacciones entre ellos, ya que al haber menor cantidad de agua la reacción es más rápida. Las reacciones de sustitución nucleofílica bimolecular son un ejemplo donde se observa este tipo de efectos en la solvatación. Por lo que la reacción de hidrólisis del triéster con el hidróxido, podría involucrar un mecanismo asociativo en donde el ion puede unirse al fósforo para desplazar a uno de los grupos unidos.

Tabla 9. Constantes de rapidez para la ruptura básica específica del DPpNPP a 37°C en las mezclas DMSO-agua.

% DMSO, v/v	10	20	30	40	50	60	70	80
k_{OH^-} , L mol ⁻¹ s ⁻¹	0.82	0.92	1.05	1.17	1.80	2.55	4.90	11.20

Error menor al 6%

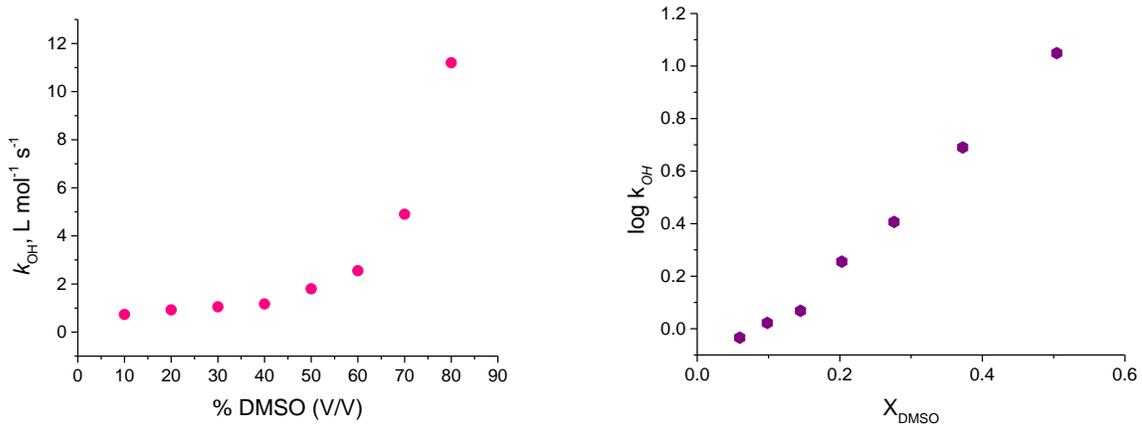


Figura 25. Dependencia de la constante de rapidez para la catálisis básica específica a 37 °C en la ruptura del DPpNPP, en función con: a) el porcentaje de DMSO y b) la fracción molar de DMSO en el medio.

Una vez determinada la constante de la catálisis básica específica, fue necesario conocer la3 concentración de hidróxido en cada uno de los perfiles de catálisis básica general, llamados anteriormente perfiles de concentración. Para hacer la corrección, y observar así la catálisis realizada por guanidina solamente; para conocer la concentración de iones hidróxido en cada una de las fracciones del amortiguador se recurrió a la ecuación sin aproximaciones de la constante de equilibrio ácido base. Esto es porque los valores de pK_a y del pK_w 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 en cada mezcla y su expresión, $Kw = [H^+][OH^-]$, podemos calcular las concentraciones de iones hidrógeno. La resolución de la ecuación cúbica que se empleó fue por el método algebraico (se realizó un algoritmo en Excel para facilitar el cálculo). Con las concentraciones de hidróxido determinadas, se realizó la corrección mediante la siguiente ecuación:

$$k_{obs} - k_{OH}[OH] = k_{corr}[Gu]$$

La contribución por hidróxido fue mayor para bajos porcentajes de DMSO, mientras que para los medios con alto contenido en DMSO, la contribución fue prácticamente nula. En la figura 29 se muestran los gráficos para 20 y 80 % DMSO, se observa que para 20% DMSO, hay un evidente cambio en la pendiente para k_{corr} ($k_{obs} - k_{OH}[OH]$) con respecto a la k_{obs} , mientras que en 80% DMSO los puntos se traslapan, porque la pendiente es la misma.

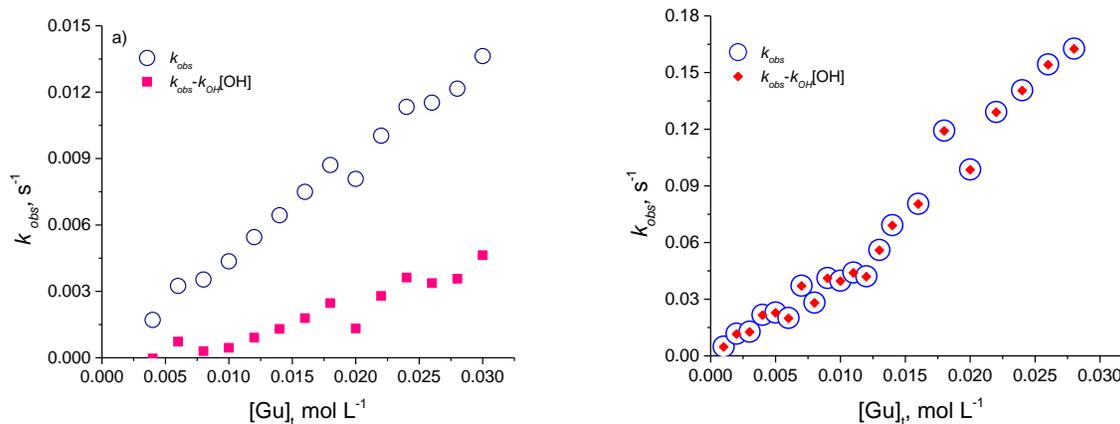


Figura 26. Corrección por la contribución de la catálisis básica específica en el rompimiento del DPpNPP con guanidina en las mezclas de DMSO al: a) 20 y b) 80% con guanidina neutralizada al 50%.

Para los porcentajes 20 y 30 de DMSO, con las concentraciones más bajas de guanidina (de 0.4 a 1 mmol L⁻¹), se notó una contribución mayor por parte de la catálisis básica específica,

ya que la concentración de iones hidróxido era muy similar a la de guanidina (parte del amortiguador que realiza la catálisis). Por otro lado, en los porcentajes de 70 y 80 de DMSO esta concentración se ve abatida por el cambio de pK_w , al mismo tiempo que la de guanidina se mantiene. Como ya se dijo anteriormente, la concentración de guanidina es al menos 100 veces mayor para estos últimos porcentajes.

Dentro del grupo de investigación, se ha trabajado la hidrólisis de diversos ésteres de fosfatos, en mezclas de DMSO acuoso, y se ha observado que la contribución de la catálisis básica específica es despreciable para las mezclas donde el valor de pK_b ($pK_w - pK_a$) es mayor a 4 (Grajeda, 2017; Corona, 2010). Mientras que para otros disolventes donde no se encuentra una mezcla con ese valor de pK_b , existe una competencia entre ambas rutas. (Ramírez Irigoyen, 2017; García Moreno, 2016; Coronado Valenzuela, 2017). Los datos obtenidos en este trabajo se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Valores de pK_b , para las distintas mezclas de DMSO, MeCN y Acetona acuosas con guanidina.

Porcentaje de DMSO (v/v)	10	20	30	40	50	60	70	80
DMSO	1.36	1.38	1.23	2.08	2.39	3.16	4.03	4.83
Acetona	0.67	0.82	1	0.93	1.18	2.2	2.22	2.6
MeCN	0.5	0.89	1.03	2.22	2.74	3.04	-	-

Al terminar con las correcciones, se determinaron nuevamente los valores de las constantes k_B , es decir, las constantes de rapidez para la catálisis en la ruptura del DPpNPP con guanidina (solo la especie libre), estas se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Valores de k_B en la ruptura básica general del DPpNPP para las diferentes mezclas de DMSO a 37°C.

Porcentaje de DMSO (v/v)	20	30	40	50	60	70	80
k_B	0.51	0.45*	0.67	0.85	1.94	4.29	10.04

Error menor al 12% *Error del 26%

Efecto del Disolvente

Una vez obtenidos los valores corregidos para la ruptura catalítica con el DPpNPP con guanidina, se buscó la correlación con diferentes escalas empíricas para las mezclas de disolvente utilizadas. Uno de los parámetros analizados fue la permitividad del medio, en donde se evalúa el desarrollo de cargas o el cambio en la polaridad durante el estado de transición, mediante el uso de la ecuación de Kirkwood (Reichardt, 2003). 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 30 se muestra el perfil del logaritmo de la constante de la catálisis básica general en función del parámetro de Kirkwood. Los valores de la permitividad fueron obtenidos de las tablas presentadas Wohlfart en 2008.

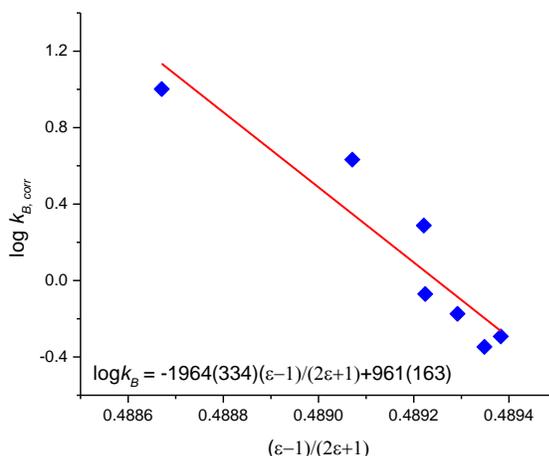


Figura 27. Relación de Kirkwood para la catálisis básica general en la ruptura del DPPNPP en DMSO con guanidina.

La ecuación de ajuste para la correlación de Kirkwood de la catálisis básica general en la ruptura del DPpNPP es $\log k_B = -1964(334) (\varepsilon-1)/(2\varepsilon+1) + 961(163); (7, 0.85)$. La pendiente en esta correlación muestra que la polaridad de los reactivos es mayor que la que se forma en el estado de transición. Sin embargo, también puede ser ejemplo de una disminución en la solvatación en el estado de transición en comparación con los reactivos. Esto también puede ser indicativo de un mecanismo asociativo, ya que una disminución en la solvatación en los reactivos podría favorecer la reacción. Además del análisis de Kirkwood se hicieron correlaciones con el parámetro de Dimroth-Reichardt normalizado (E_T^N) (Reichardt, 2003) y el logaritmo de la concentración de agua del medio. En el caso del parámetro de E_T^N , este está en concordancia con lo analizado con Kirkwood y, en este caso, la correlación es más lineal, como se observa en la figura 31.

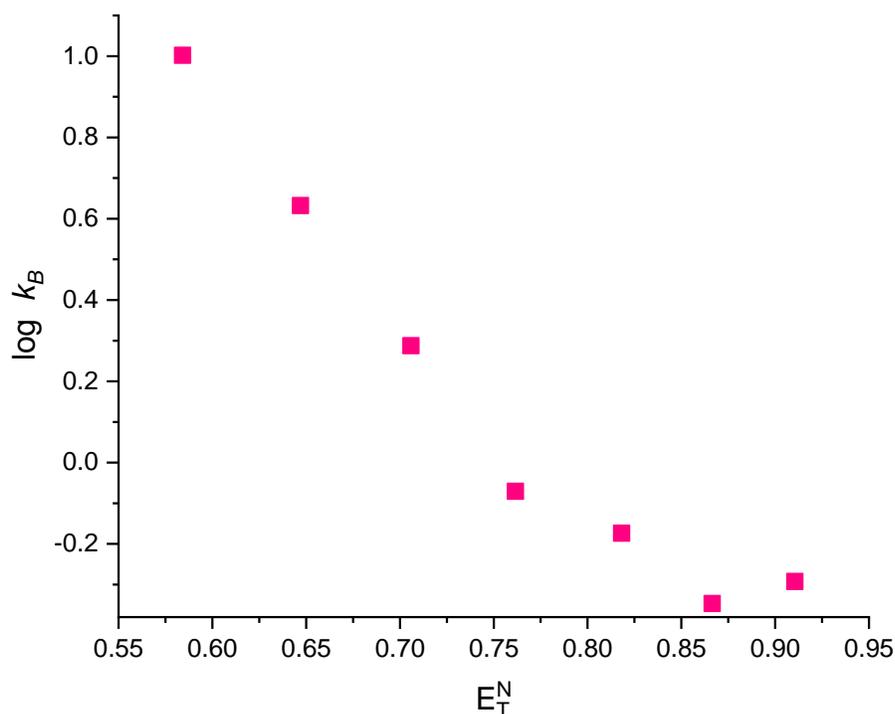


Figura 28. Correlación con el parámetro de Dimroth-Reichardt normalizado (E_T^N) con las constantes de la catálisis básica general en DMSO para la ruptura del DPpNPP con guanidina.

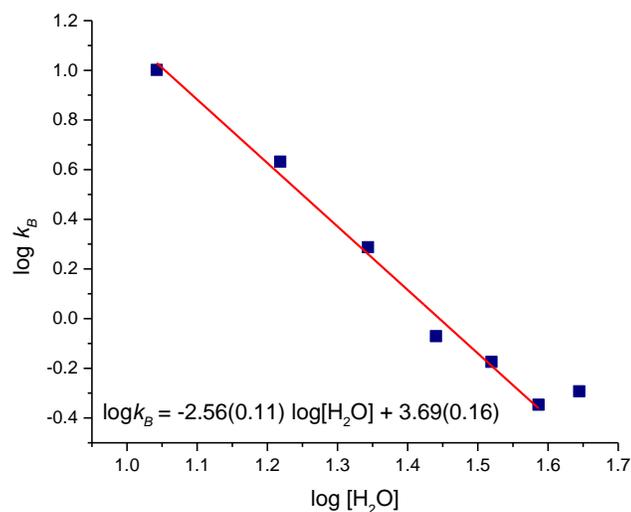


Figura 29. Relación entre el logaritmo de las constantes de la catálisis básica general con el logaritmo de la concentración de agua.

En el análisis de la dependencia de la constante de rapidez con la concentración molar del agua, encontramos evidencia de la participación de esta en el mecanismo ya que hay una dependencia lineal en la gráfica en coordenadas logarítmicas (Gomez-Tagle, 2006). Esto implica su participación en una etapa elemental, por lo que un mecanismo factible es la desprotonación por parte de la guanidina de una molécula de agua.

Con los resultados obtenidos en los diferentes porcentajes de DMSO para la catálisis básica específica, se realizó un gráfico del valor logarítmico de la constante k_{OH} , en función del pK_w del medio, conocida como relación de Brønsted (Ver figura 26). Estos datos se ajustan a una línea con pendiente de valor 0.25, la cual nos habla de un estado de transición temprano, lo que significa que el complejo activado en el estado de transición tiene un aspecto más similar a los reactivos que a los productos. Además, este valor de pendiente menor a 0.5 indica que los iones hidróxido pueden participar más como nucleófilos que como bases y esto es debido a que estos iones pueden interactuar directamente con el fósforo en lugar de desprotonar una molécula de agua del medio.

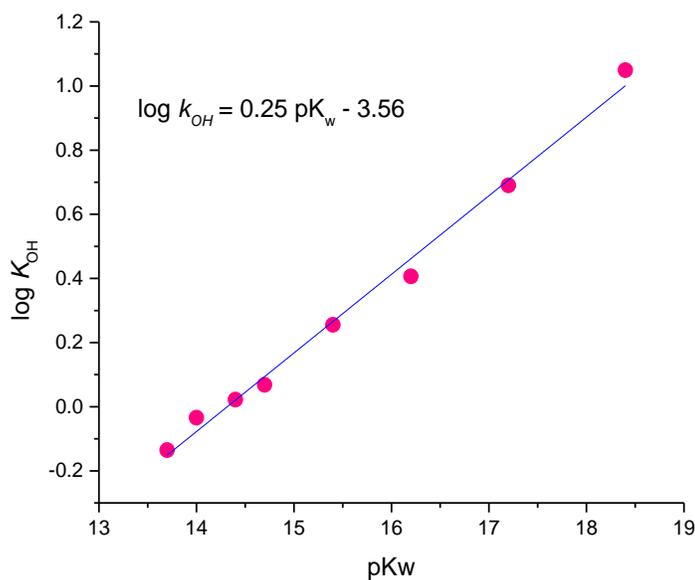


Figura 30. Relación de Brønsted para la catálisis básica específica del DPpNPP en DMSO.

Dentro del mismo análisis del efecto del disolvente en la reacción de hidrólisis del DPpNPP con iones hidróxido, se hizo un análisis en función de la permitividad del medio (los reactivos son una molécula neutra polar y un ion) y de la polaridad del medio (E_T^N). La figura 27 muestra el gráfico obtenido de la constante básica específica en función de la permitividad del medio. En ella encontramos una pendiente positiva, que es algo normal en mecanismos asociativos como el S_N2 y este parámetro indica que la solvatación del ion hidróxido es menor en medios con menor permitividad dieléctrica (lo que facilita su reactividad). Así mismo, indica que el tamaño del complejo activado es mayor que el de los reactantes, evidencia de un mecanismo asociativo (Reichardt, 2003). La correlación de la constante de rapidez para la catálisis básica específica no fue lineal con el parámetro de Dimroth-Reichardt normalizado, sin embargo, la tendencia indica que el aumento de polaridad del medio disminuye la rapidez de reacción, lo que está en acuerdo con el análisis de con la permitividad. Lo anterior indica que en el caso de la hidrólisis con hidróxido del sustrato DPpNPP es importante disminuir la polaridad del medio para que el ion hidróxido participe como nucleófilo.

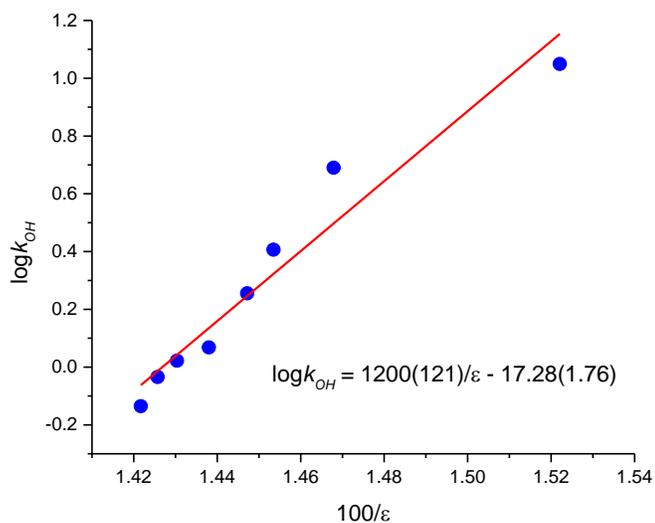


Figura 31. Correlación entre las constantes de la catálisis básica específica de la ruptura del DPpNPP con el inverso de la permitividad dieléctrica.

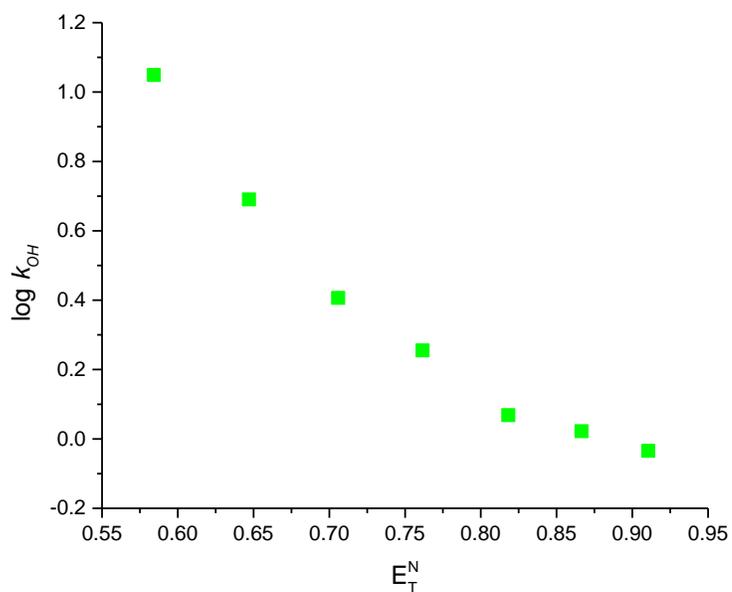


Figura 32. Correlación con el parámetro de Dimroth-Reichardt normalizado (E_T^N) con las constantes de la catálisis básica específica en DMSO para la ruptura del DPpNPP .

Por lo anterior, con base en las evidencias encontradas (la ley de rapidez, $k_{obs} = k_{Gu}[Gu] + k_{OH}[OH^-]$), en las mezclas estudiadas tenemos la participación principalmente de dos especies

en la ruptura, la guanidina libre y los iones hidróxido. En mayores proporciones de DMSO predomina la guanidina libre, mientras que, en alto contenido de agua, el ion hidróxido es el que predomina. En el caso del ion hidróxido, el mecanismo más probable es la unión del oxígeno al fósforo para formar un enlace, mediante un mecanismo asociativo como el S_N2 , tal como se muestra en la figura 34. En el caso de la guanidina, lo más probable es la desprotonación de una molécula de agua por parte de la base libre y el ataque de la molécula desprotonada del agua al fosfato mediante un mecanismo asociativo. Evidencia de este probable mecanismo es la dependencia de la constante de rapidez con la concentración molar del agua, la formación de fosfatos como productos de la ruptura (detectados por RMN de ^{31}P) y los efectos de disolvente. En la figura 33 se muestra un probable mecanismo para esa ruta. Ambos mecanismos concuerdan con lo propuesto por Tarrat (2010) y Kirby (2012, 2015).

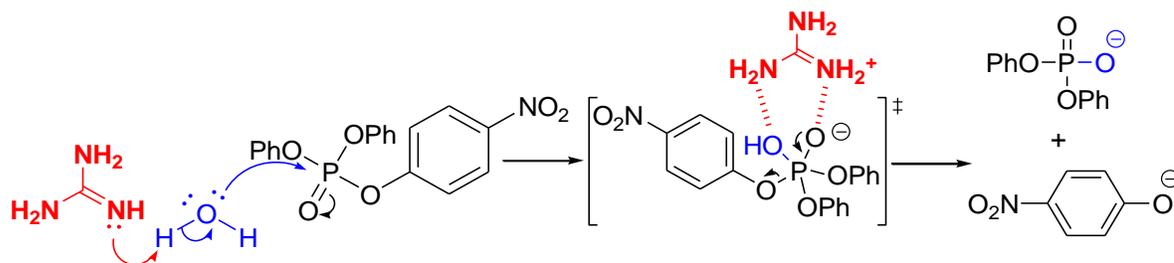


Figura 33. Mecanismo probable para la catálisis básica general con guanidina en la ruptura del DPpNPP.

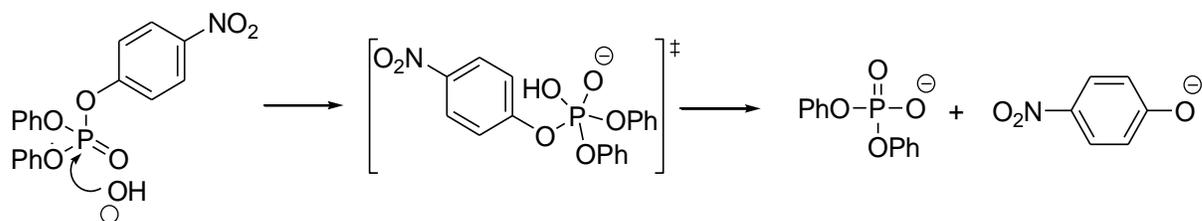


Figura 34. Mecanismo posible propuesto para la hidrólisis básica específica del DPpNPP.

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden servir para el diseño de catalizadores que pudieran catalizar la ruptura de ésteres de fosfato de importancia ambiental de manera más eficiente. Al igual que en el mecanismo de inhibición de la acetilcolinoesterasa, en el mecanismo probable, con las evidencias presentadas en este trabajo, en la ruptura del DPpNPP es necesaria la presencia de un nucleófilo que sea activado y este realiza la unión al fósforo mediante un

mecanismo asociativo. Por lo anterior, al diseñar un catalizador se debe tener en cuenta que debe tener un nucleófilo que pueda atacar y un fragmento tipo guanidinio para que pueda estabilizar el desarrollo de la carga en el estado de transición. Se necesitan más evidencias para poder tener una propuesta más sólida, como efectos isotópicos de disolvente y algunos estudios por masas o RMN de ^{31}P . Lo anterior, para poder saber cuántos iones hidrógenos se transfieren en la etapa limitante de la reacción y para conocer con mayor certidumbre las especies que se forman en el transcurso de la reacción.

CONCLUSIONES

Se determinaron los valores de pK_w y pK_a de la guanidina en las mezclas binarias de DMSO-agua a 37 °C, estos valores variaron de 14.03 hasta 18.69, y de 12.67 a 13.86 respectivamente. Además, ambos valores correlacionan muy bien con la permitividad, obteniéndose las ecuaciones: $pK_w = 4813(579)/\epsilon - 54.11(8)$, (8, 0.91); y $pK_a = 1008(193)/\epsilon - 1.47(2.81)$, (8, 0.8).

Los valores para la constante de la catálisis básica específica en la ruptura del DPpNPP en mezclas de 20 a 80 por ciento de DMSO en agua a 37 °C, va de 0.82 a 11.2 L mol⁻¹ s⁻¹. Para esta ruta, el mecanismo probable es del tipo asociativo, donde el ion hidróxido actúa como nucleófilo, lo que se ve favorecido fuertemente al disminuir la polaridad del medio.

La reacción de ruptura del difenil, *p*-nitrofenilfosfato en las mezclas del 20 al 80 por ciento de DMSO-agua a 37 °C con guanidina, presenta una dependencia lineal con la forma libre. Además, en porcentajes de DMSO mayores a 60% en volumen se abate la concentración de iones hidróxido, por lo que esta ruta predomina.

Al evaluar el efecto del disolvente en la ruptura con guanidina del DPpNPP se encontró que al aumentar la cantidad de DMSO la catálisis por guanidina se favorece. Así mismo, se encontró una dependencia con la concentración molar del agua, lo que indica su participación en el mecanismo de ruptura del sustrato.

Se obtuvo la siguiente ecuación cinética de rapidez para la hidrólisis del DPpNPP a 37°C: $k_{obs} = k_B[Gu] + k_{OH}[OH] + k_0$, la cual nos habla de la existencia de la contribución tanto de la catálisis básica específica como de la general.

REFERENCIAS

- Alewu, B., & Nosir, C. (2011). Pesticides and Human Health. En S. Margarita, *Pesticides in the modern World* (págs. 231-241).
- Anslyn Eric, D. D. (2006). *Modern Physical Organic Chemistry*. University Science Books.
- Audran, G., Brémond, P., Marque, S., & Obame, G. (2012). Chemically triggered C-ON bond homolysis of alkoxyamines. Part 4: Solvent effect. *Polymer Chemistry*, 2901-2908.
- Baldini, L., Cacciapaglia, R., Casnati, A., Mandolini, L., Salvio, R., Sansone, F., & Ungaro, R. (2012). Upper Rim Guanidinocalix[4]arenes as artificial phosphodiesterases. *The Journal of Organic Chemistry*, 3381-3389.
- Blondeau, P., Segura, M., Pérez Fernández, R., & de Mendoza, J. (2007). Molecular Recognition of Oxoanions Based on Guanidinium Receptors. *Chemical Society Review*, 198-210.
- Bunton, C., Farber, S., & Fendler, E. (1968). The hydrolysis of p-Nitrophenyl Diphenyl phosphate. *The Journal of Organic Chemistry*, 29-33.
- Campos, R., Santos, E., Oliveira, A., Marins Ocampos, F., Souza, B., Barison, A., & Orth, E. (2015). Reactivity of Imidazole Derivates toward Phosphate Triester in DMSO/Water Mixtures: A comprehensive Study on the Solvent Effect. *The Journal of Organic Chemistry*, 7572-7580.
- Castro, E., Ugarte, D., Rojas, M., Pavez, P., & Santos, J. (International Journal of Chemical Agents). Nucleophilic Substitution Reactions of Diethyl 4-Nitrophenyl Phosphate Triester: Kinetics and mechanism. 2011, 708-714.
- Catalán, J., Díaz, C., & García-Blanco, F. (2001). Characterization of Binary Solvent Mixtures of DMSO with Water and Other Cosolvents. *Journal of Organic Chemistry*, 5846-5852.
- Chandar, N., & Viselli, S. (2010). *Biología Molecular y Celular*. Wolters Kluwer Health México S.A. de C.V.
- Charlot, G. (1980). *Química Analítica General*. New York: Taray-Masson.

- Cho, B., & Wah Wong, M. (2015). Unconventional bifunctional Lewis-Bronsted Acid Activation Mode in Bicyclic Guanidine-Catalized Conjugate Addition Reactions. *molecules*, 108-121.
- Corona Martínez, D. O., Taran, O., & Yatsimirsky, A. K. (2010). Mechanism of General Acid-Base Catalysis in Transesterification of an RNA Model Phosphodiester Studied with Strongly Basic Catalyst. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 873-880.
- Corona, D. O. (2011). *Tesis "Estudios de la hidrólisis biomimética por el mecanismo ácido base de sustratos modelos del ARN"*. Universidad Autónoma de México.
- Coronado Valenzuela, H. (2017). *Estudio del Mecanismo de la Hidrólisis Ácido-Base de un triéster de Fosfato Modelo de Pesticidas Organofosforados en Mezclas de Acetonitrilo-Agua*. Ciudad Obregón, Sonora.: Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias de la Salud.
- Cox, B. (2013). *Solvent Effects on Acid-Base strength*. Reino Unido: 1ra Ed. Oxford University Press.
- D. Mitro, S., Dodson, R., Sinyla, L., Adamkiewicz, G., Elmi, A., Tilly, M., & Zota, R. (2016). Consumer Product Chemicals in Indoor Dust: a Quantitative metaanalysis of U.S. studies. *Environmental Science & Technology*, 10661-10672.
- Fersht, A. (1980). *Enzyme Structure and Mechanism*. Barcelona, España: Reverté.
- García Moreno, A. (2016). *Efecto del disolvente en Mezclas Acetona-Agua para la Hidrólisis Biomimética de un sustrato Modelo del ARN*. Ciudad Obregón, Sonora: Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias de la Salud.
- Gellman, S., Petter, R., & Breslow, R. (1986). Catalytic hydrolysis of a Phosphate Triester by Tetracoordinated Zinc Complexes. *Journal of American Chemical Society*, 2388-2394.
- Gomez-Tagle, P., Vargas-Zuñiga, I., Taran, O., & Yatsimirsky, A. (2006). Solvent Effects and Alkali Metal Ion Catalysis in Phosphodiester Hydrolysis. *Journal of Organic Chemistry*, 9713-9722.
- Grajeda, J. (2017). *Evaluación de Biguanidas como catalizadores en la ruptura de un sustrato modelo de ARN (2-hidroxipropil p-nitrofenilfosfato) en mezclas de DMSO-agua*.

- Gunther, F. (1977). *Residues of pesticides and other contaminants in the total environment*. New York: Springer-Verlag.
- Ishikawa, T. (2009). *Superbases for Organic Synthesis*. Gran Bretaña: Wiley.
- Juaristi, E. (2015). *Fisicoquímica orgánica*. México D.F.: El Colegio Nacional.
- Kennedy, D., Mayer, B., Baker, S., & Valdez, C. (2015). Kinetics and Speciation of Paraoxon Hydrolysis by Zinc(II)-azamacrocyclic catalysts. *Inorganica Chimica Acta*, 123-131.
- Kirby, A., & Nome, F. (2015). Fundamentals of Phosphate Transfer. *Accounts of Chemical Research*, 1806-1814.
- Kirby, A., Mora, J., & Nome, F. (2013). New Light on Phosphate Transfer from Triesters. *Biochimica et Biophysica Acta, Proteins and Proteomics*, 454-463.
- Laidler, J. K. (1987). *Chemical Kinetics*. United States of America: Pearson Education Company.
- Letort, S., Balieu, S., Erb, W., Gouhier, G., & Estour, F. (2016). Interactions of cyclodextrins and their derivatives with toxic organophosphorus compounds. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 204-228.
- López Pacheco, A. P. (2017). *Activación biomimética de amidoximas hidrólisis de ésteres de interés ambiental*. Cd. Universitaria, CDMX.: Universidad Autónoma de México.
- Mathews, C., Van Holde, K., Appling, D., & Anthony-Cahill, S. (2013). *Bioquímica*. Madrid: Pearson Educación.
- Nayelkerke, R., Thatcher, G. R., & Buncl, E. (2003). Alkali-Metal ion Catalysis and inhibition in Nucleophilic Displacement REactions at Carbon, Phosphorus and Sulfur Centres. IX. p-Nitrophenyl diphenyl phosphate. *Organic Biomolecular Chemistry*, 163-167.
- Ortega, J., Ráfol, C., Bosch, E., & Rosés, M. (1996). Solute-solvent and solvent-solvent interactions in binary solvent mixtures. Part 3. ET(30) polarity of binary mixtures of hydroxylic solvents. *Journal of Chemical Society*, 1497-1503.
- Parker, A. (1969). Protic-Dipolar Aprotic Solvent Effects on Rates of Bimolecular Reactions. *Chemical Reviews*, 1-32.
- Pérez, M., Navarro, H., & Miranda, E. (2013). Residuos de plaguicidas en hortalizas: Problemática y riesgo en México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 45-64.

- Piatek, A., Gray, M., & Anslyn, E. (2004). Guanidinium Groups Act as General-Acid Catalysts in Phosphoryl Transfer Reactions: A Two-Proton Inventory on a Model System. *Journal of American Chemistry Society*, 9878-9879.
- Ramírez Irigoyen, A. (2017). *Efecto del Disolvente en Mezclas Etanol-Agua para la Hidrólisis biomimética de un sustrato modelo de ARN*. Hermosillo, Sonora: Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas.
- Reichardt, C. (1982). Solvent Effects on Chemical Reactivity. *Pure & Applied Chemistry*, 1867-1884.
- Reichardt, C. (2003). *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. Alemania: Wiley.
- Salvio, R. (2015). The Guanidinium Unit in the Catalysis of Phosphoryl Transfer Reactions: From Molecular Spacers to Nanostructured Supports. *Chemical European Journal*, 10960-10971.
- Salvio, R., Cacciapaglia, R., & Mandolini, L. (2011). General Base-Guanidinium Cooperation in Bifunctional Artificial Phosphodiesterases. *Journal of Organic Chemistry*, 5438-5443.
- Salvio, R., Cacciapaglia, R., Mandolini, L., Sansone, F., & Casnati, A. (2014). Diguanidinocalix[4]arenes as effective and selective catalysts of the cleavage of diribonucleoside monophosphates. *Royal Society of Chemistry*, 412-416.
- Salvio, R., Moliterno, M., Caramelli, D., Pisciotanni, L., Antenucci, A., D'Amico, M., & Bella, M. (2015). Kinetic Resolution of Phosphoric Diester by Cinchona Alkaloid Derivates Provides With a Guanidinium Unit. *The royal society of Chemistry*, 5887-5893.
- Salvio, R., Volpi, S., Cacciapaglia, R., Casnati, A., Mandolini, L., & Sansone, F. (2015). Ribonuclease Activity of an Artificial Catalyst that Combines a Ligated Cu²⁺-ion and a Guanidinium Group at the Upper Rim of a cone-Calix[4]arene Platform. *The Journal of Organic Chemistry*, 5887-5893.
- Sesha Vemuri, R., Duncan Armatis, P., Rao Bontha, J., McGRail, P., & Kishan Motkuri, K. (2015). An Overview of Detection and Neutralization of Chemical Warfare Agents Using Metal Organic Frameworks. *Bioterrorism & Biodefense*.
- Simon, E., Dickey, J., Hogan, K., & Reece, J. (2016). *Campbell Essential Biology*. United States of America: Pearson Education.

- Tarrat, N. (2010). Alkaline Hydrolysis of Phosphate Triesters in Solution: Stepwise or Concerted? A Theoretical Study. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 56-60.
- Taylor, J. E., Bull, S. D., & Williams, J. M. (2012). Amidines, Isothioureas, and guanidines as nucleophilic catalysts. *The Royal Society of Chemistry*, 2109-2121.
- Wiener, S., & Hoffman, R. (2004). Nerve Agents: A Comprehensive Review. *Journal of Intensive Care Medicine*, 22-37.
- Wohlfart, C. (2008). *Landolt-Börnstein: Static Dielectric Constants of Pure Liquids and Binary Liquid Mixtures*. Berlin: Springer.
- Wypych, G. (2011). *Handbook of Solvents*. Toronto-New York: ChemTec Publishing-William Andrew Publishing.

ANEXOS

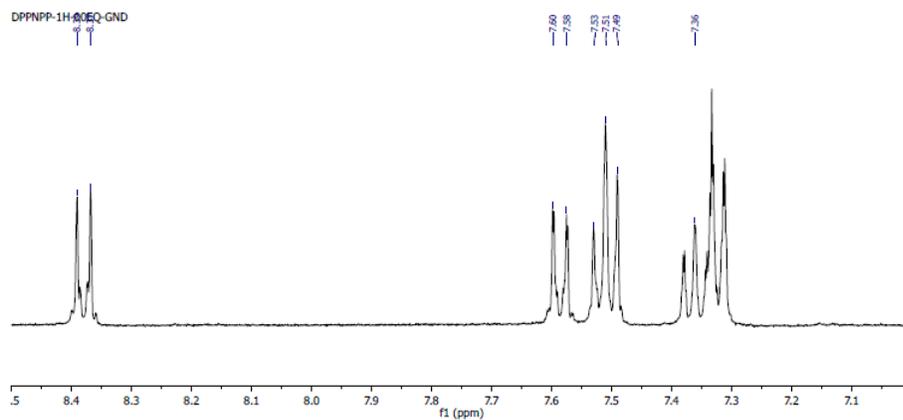


Figura A1. Espectro RMN ^1H del DPpNPP.

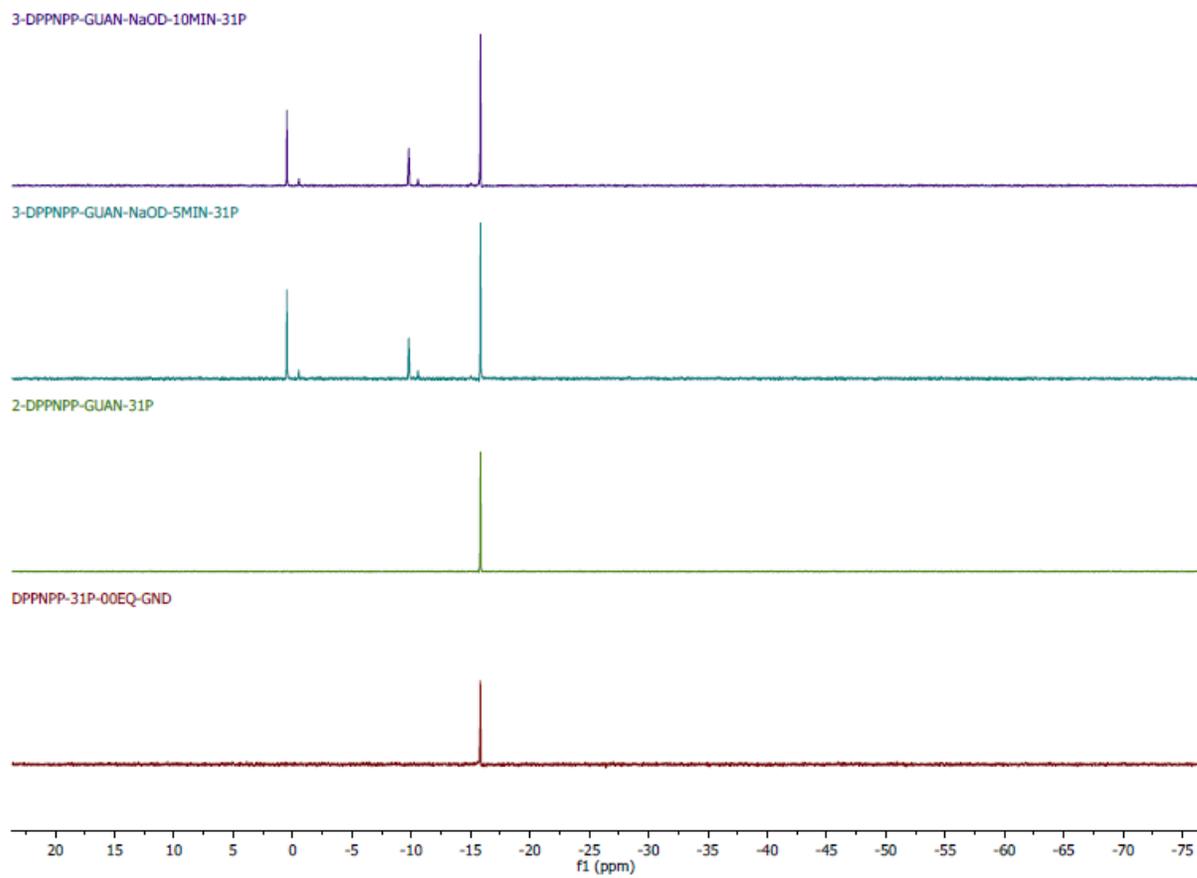


Figura A2. Espectro RMN ^{31}P de la reacción de ruptura del DPpNPP con guanidina.

Tabla A1. Valores promedio para la k_{obs} para la reacción de ruptura del DPpNPP con guanidina a diferentes concentraciones totales de guanidina y fracciones de neutralización en la mezcla de 80% DMSO a 37°C.

[Gu] _T	$k_{obs} \times 10^3, s^{-1}$						
	$f_{Gu,L}$						
	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
0.001	1.3	1.0	2.3	4.9	4.4	4.1	6.1
0.002	1.9	3.5	5.2	11.7	8.7	9.8	13.0
0.003	2.8	6.3	7.2	12.8	13.2	13.9	19.4
0.004	4.9	9.4	13.1	21.8	19.9	22.0	42.5
0.005	3.5	12.2	15.8	23.0	24.8	27.2	--
0.006	9.2	14.4	20.9	20.1	32.4	36.8	47.0
0.007	6.0	18.9	21.6	37.2	34.8	34.5	--
0.008	14.1	20.3	28.7	28.2	44.8	51.2	64.3
0.009	15.9	19.0	20.1	41.3	61.0	57.4	62.9
0.010	17.2	24.8	33.8	39.8	68.7	68.4	73.6
0.011	14.9	23.3	24.6	44.1	64.2	63.2	65.1
0.012	17.8	28.2	27.4	42.1	68.2	71.6	96.3
0.013	16.1	25.6	26.2	56.1	76.2	68.3	76.2
0.014	20.8	33.8	40.3	69.2	58.8	87.9	123.7
0.016	28.5	47.4	--	80.6	88.0	128.1	165.5
0.018	32.7	48.4	66.4	1192.3	119.8	148.1	136.0
0.020	35.9	54.3	63.8	98.7	137.2	147.5	147.6
0.022	40.4	63.8	80.1	129.1	147.2	185.8	176.84
0.024	42.0	67.3	89.0	140.7	156.9	205.8	192.8
0.026	47.0	72.1	75.7	154.3	210.3	183.7	185.6
0.028	50.6	80.8	--	162.7	181.6	215.5	221.9
0.030	50.8	80.0	--	--	217.4	246.6	187.3

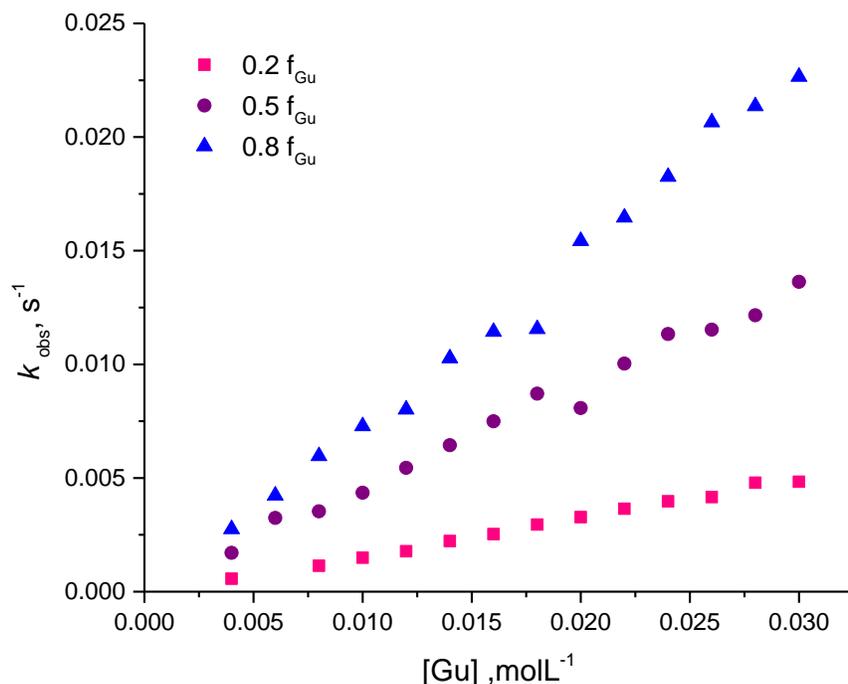


Figura A3. Perfiles de concentración en la ruptura del DPpNPP catalizado con guanidina neutralizada al 20, 50 y 80% en 20% DMSO (v/v) a 37°C.

Tabla A2. Valores de las constantes observadas para la reacción de ruptura del DPpNPP con guanidina a diferentes concentraciones totales de guanidina y fracciones de neutralización en la mezcla de 20% DMSO a 37°C.

[Gu] _T , molL ⁻¹	<i>k_{obs}</i> × 10 ⁴ , s ⁻¹		
	0.2	0.5	0.8
0.004	5.67	17.1	27.5
0.006	-	32.5	42.3
0.008	11.4	35.4	59.7
0.01	14.9	43.5	72.8
0.012	17.8	54.5	80.1
0.014	22.3	64.4	102.7
0.016	25.3	74.9	114.3
0.018	29.5	87.1	115.5
0.02	32.8	80.8	154.3
0.022	36.5	100.3	164.6
0.024	39.7	113.3	182.6
0.026	41.6	115.3	206.5
0.028	47.9	121.6	213.6
0.03	48.4	136.3	226.5

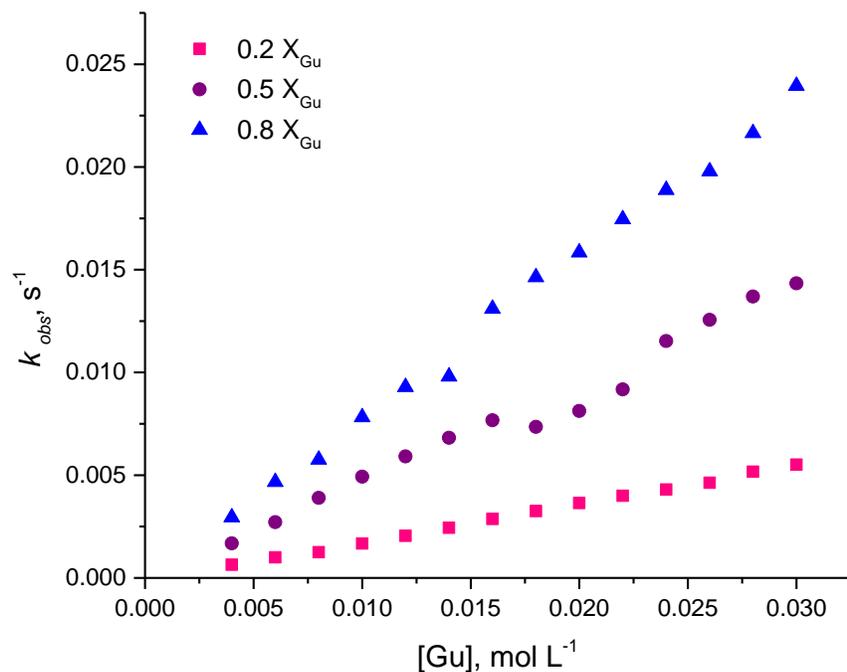


Figura A4. Perfil de concentración en la ruptura del DPpNPP catalizado con guanidina neutralizada al 20, 50 y 80% en 30% DMSO (v/v) a 37°C.

Tabla A3. Valores de las constantes observadas para la reacción de ruptura del DPpNPP con guanidina a diferentes concentraciones totales de guanidina y fracciones de neutralización en la mezcla de 30% DMSO.

[Gu] _T , mol L ⁻¹	$k_{obs} \times 10^4, s^{-1}$		
	0.2	0.5	0.8
0.004	6.4	16.8	29.5
0.006	10	27.1	46.7
0.008	12.5	38.9	57.5
0.01	16.8	49.3	78.2
0.012	20.5	59.1	92.9
0.014	24.4	68.2	98
0.016	28.7	76.7	131
0.018	32.6	73.5	146.3
0.02	36.4	81.2	158.4
0.022	40	91.8	174.6
0.024	43	115.3	188.8
0.026	46.3	125.6	197.9
0.028	51.7	136.9	216.5
0.03	55.1	143.4	239.5

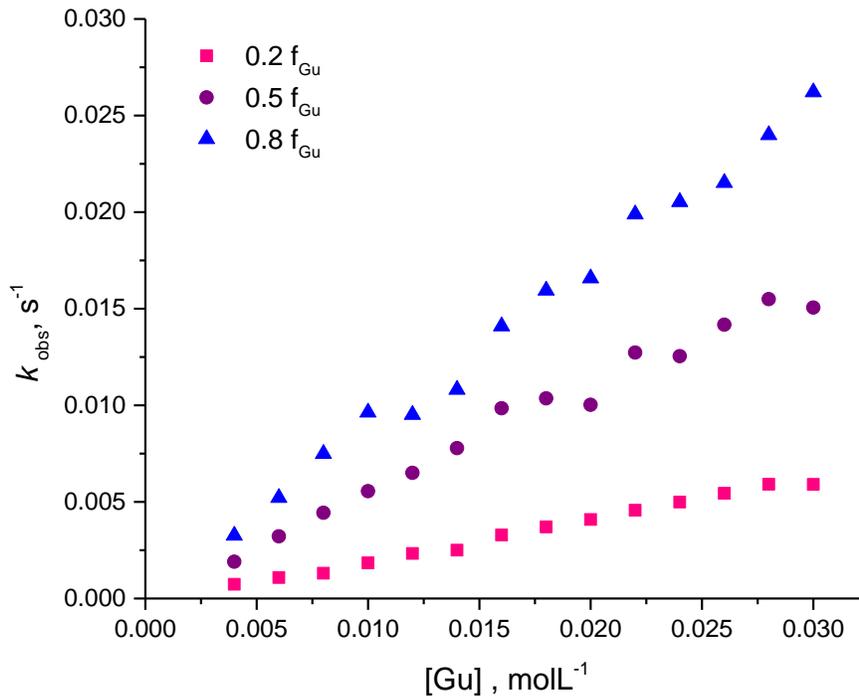


Figura A5. Perfil de concentración en la ruptura del DPpNPP catalizado con guanidina neutralizada al 20, 50 y 80% en 40% DMSO (v/v) a 37°C.

Tabla A4. Valores de las constantes observadas para la reacción de ruptura del DPpNPP con guanidina a diferentes concentraciones totales de guanidina y fracciones de neutralización en la mezcla de 40% DMSO a 37°C.

[Gu] _T , molL ⁻¹	<i>k_{obs}</i> × 10 ⁴ , s ⁻¹		
	0.2	0.5	0.8
0.004	7.3	19	32.6
0.006	10.8	32.2	52.1
0.008	13	44.3	74.9
0.01	18.5	55.6	96.4
0.012	23.3	65	95.1
0.014	25	77.8	108.1
0.016	32.9	98.4	141
0.018	37.1	103.6	159.5
0.02	40.8	100.3	165.8
0.022	45.7	127.3	198.9
0.024	49.9	125.4	205.3
0.026	54.4	141.7	215.2
0.028	59.2	155	239.9
0.03	59.1	150.6	262.1

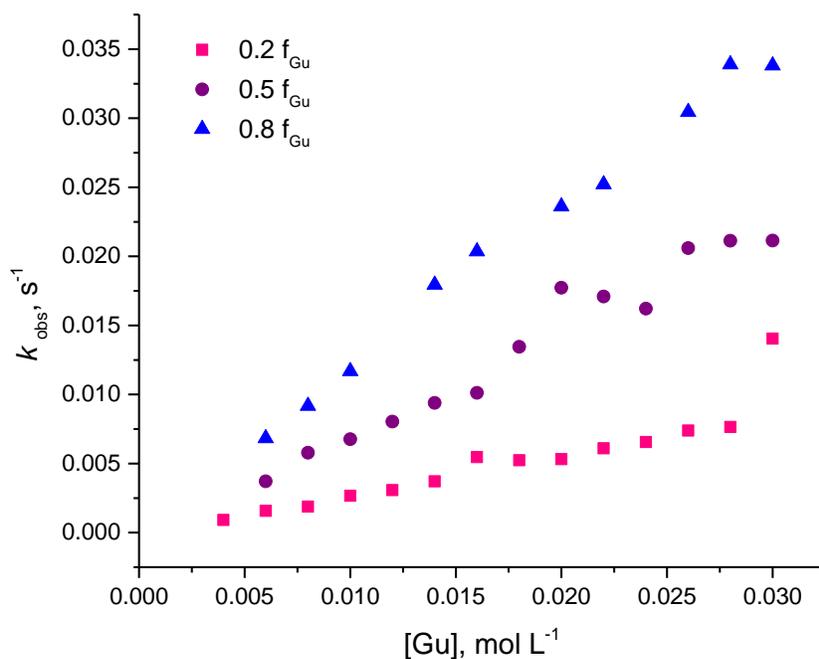


Figura A6. Perfil de concentración en la ruptura del DPpNPP catalizado con guanidina neutralizada al 20, 50 y 80% en 50% DMSO (v/v) a 37°C.

Tabla A5. Valores de las constantes observadas para la reacción de ruptura del DPpNPP con guanidina a diferentes concentraciones totales de guanidina y fracciones de neutralización en la mezcla de 50% DMSO a 37°C.

[Gu] _T , mol L ⁻¹	$k_{obs} \times 10^4, s^{-1}$		
	0.2	0.5	0.8
0.004	9.1	-	-
0.006	15.8	37.1	68.3
0.008	18.9	57.8	91.7
0.01	26.6	67.6	116.9
0.012	30.7	80.3	-
0.014	37.2	93.9	179.5
0.016	54.6	101.2	203.6
0.018	52.3	134.5	--
0.02	53.2	177.2	236.1
0.022	61	170.9	252.1
0.024	65.6	162.1	-
0.026	73.9	205.9	304.4
0.028	76.5	211.3	338.9
0.03	140.4	211.4	338.2

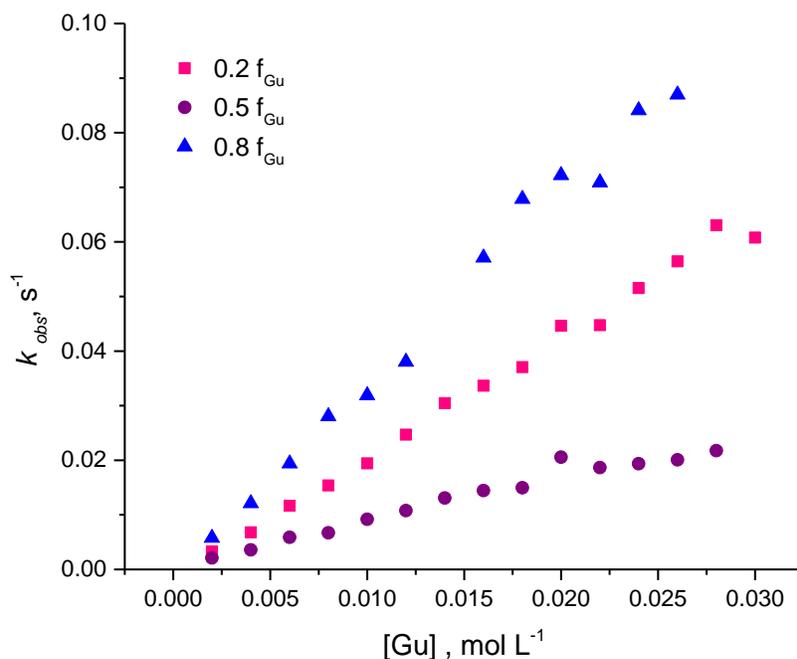


Figura A7. Perfil de concentración en la ruptura del DPpNPP catalizado con guanidina neutralizada al 20, 50 y 80% en 70% DMSO (v/v) a 37°C.

Tabla A6. Valores de las constantes observadas para la reacción de ruptura del DPpNPP con guanidina a diferentes concentraciones totales de guanidina y fracciones de neutralización en la mezcla de 70% DMSO.

[Gu] _T , mol L ⁻¹	<i>k_{obs}</i> × 10 ⁴ , s ⁻¹		
	<i>f_{Gu}</i>		
	0.2	0.5	0.8
0.004	33	20.9	57.8
0.006	68	36	121.1
0.008	116.7	59	194
0.010	153.9	67.1	280.6
0.012	194.3	91.8	318.7
0.014	246.9	107.7	380.4
0.016	304.5	130.8	--
0.018	336.5	144.6	571.2
0.020	370.5	149.6	678.5
0.022	446.1	205.7	722.3
0.024	447.3	186.6	708.6
0.026	515.4	193.6	841.1
0.028	564.1	200.9	869.8
0.030	630.6	217.6	--

Tabla A7. Valores de las constantes observadas en el perfil de concentración de iones OH.

[OH ⁻] _T , molL ⁻¹	$k_{obs} \times 10^4, s^{-1}$							
	% (v/v) DMSO							
	10	20	30	40	50	60	70	80
4×10^{-4}	3.2	4.6	5.0	5.2	6.3	7.3	12	28
6×10^{-4}	--	5.6	6.2	6.7	8.6	10.8	21.4	54.3
8×10^{-4}	4.4	6.7	7.4	9.2	10.9	15.6	30.3	77.3
1×10^{-3}	6.7	7.8	9.6	10	13.7	16.6	33.3	96.8
2×10^{-3}	12	17	17	20	30.3	41.7	94.2	168.8
3×10^{-3}	20	27	29	32	52.2	91.6	132.8	340.7
4×10^{-3}	27	36	40	46	73.8	99.6	208.1	464.5