

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y
MATERIALES**

**Síntesis de Catalizadores Ditópicos (Fenol-guanidina)
para la Ruptura de Ésteres de Fosfato.**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA DE MATERIALES



Presenta:

Q. B.C. Andya Jhosephin Ramírez Irigoyen

Hermosillo, Sonora

Octubre del 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



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



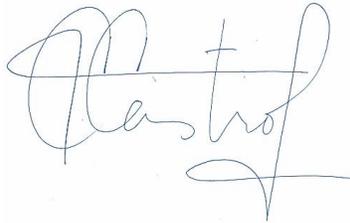
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Esta tesis se realizó en los laboratorios del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la universidad de Sonora, bajo la dirección de la Dra. Karen Lillian Ochoa Lara y el Dr. David O. Corona Martínez. Con el financiamiento del proyecto 243275 de Investigación Básica del CONACyT con nombre “Estudio del Mecanismo de la Hidrólisis Básica de Triésteres de Fosfato como Modelos de plaguicidas Organofosforados” y el proyecto “Síntesis, caracterización estructural, estudios fisicoquímicos e inmovilización en fase sólida, de nuevos receptores para el reconocimiento de aniones y sales de importancia biológica y ambiental” clave CB-239581.

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual de la Universidad de Sonora y del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del director de tesis, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director de la Tesis.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al DIPM, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

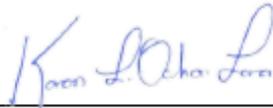
A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Castro', with a stylized flourish at the end.

Dra. Teresa del Castillo Castro

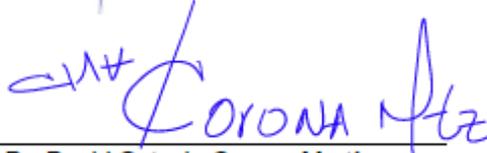
Jefe del Departamento

APROBACIÓN DE TESIS

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de maestría de Andya Jhosephin Ramírez Irigoyen, han dictaminado que el trabajo cumple satisfactoriamente como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencia de Materiales otorgado por la Universidad de Sonora.



Dra. Karen Lillian Ochoa Lara
Presidente



Dr. David Octavio Corona Martínez
Secretario



Dra. Hisila del Carmen Santacruz Ortega
Sinodal



Dra. Judith Celina Tanori Córdova
Sinodal



Dra. Silvia Elena Castillo Blum
Sinodal externo

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias de Materiales y a la UNISON.

A mis directores de tesis, el Dr. David Corona Martínez y la Dra. Karen Lillian Ochoa Lara por su gran apoyo, dedicación y profesionalismo durante la realización de este proyecto. Siempre presentes y con gran disponibilidad de apoyar a resolver mis dudas, gracias por todo.

Al CONACYT por el financiamiento con el proyecto 243275 de Investigación Básica con nombre “Estudio del Mecanismo de la Hidrólisis Básica de Triésteres de Fosfato como Modelos de plaguicidas Organofosforados”, el proyecto “Síntesis, caracterización estructural, estudios fisicoquímicos e inmovilización en fase sólida, de nuevos receptores para el reconocimiento de aniones y sales de importancia biológica y ambiental” clave CB-239581. Y por la beca otorgada durante mis estudios de maestría, número de becario: 851986

A los miembros de mi jurado, por la revisión y contribución a esta tesis. Al igual que por su gran apoyo y cooperación.

Al Dr. Herbert Höpfl por su apoyo en la difracción y resolución de la estructura cristalina del cristal obtenido.

DEDICATORIA

Gracias a todo y todos los que contribuyeron de manera directa o indirecta a que este trabajo se pudiera culminar. Principalmente a mi familia, a mis padres y mi pareja, que su apoyo constante es la piedra angular de mi esfuerzo y determinación.

Gracias por la confianza depositada en mí, tomo de las vivencias lo mejor para seguir creciendo y avanzar en el camino que me lleve a ser la persona que deseo ser, plena, agradecida y con el impulso constante de ser siempre mejor que ayer.

CONTENIDO	Pag.
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	9
RESUMEN	10
1. INTRODUCCION	11
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Química Supramolecular	14
2.2. Catálisis Supramolecular	16
2.3. Biomimética Enzimática	19
2.4. Aplicaciones de Compuestos Tipo Guanilhidrazonas	20
2.5. Ruptura de Ésteres de Fosfato	21
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo General	29
3.2. Objetivos Específicos	29
4. MATERIALES Y MÉTODOS	30
4.1. Reactivos	30
4.2. Programas	31
4.3. Equipos	31
4.4. Técnicas de Caracterización y Equipos Empleados	32
4.5. Técnicas de síntesis	33
4.5.1. Síntesis de SAG	33
4.5.2. Síntesis de MEG	34
4.5.3. Síntesis de NOG	35
4.6. Estudios cinéticos	35
4.7. Titulaciones Potenciométricas	37
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
5.1. Síntesis y Caracterización de Guanilhidrazonas.	39
5.1.1. Caracterización por RMN ¹ H	40
5.1.2. Caracterización por RMN ¹³ C	42
5.1.3. Caracterización por IR	43
5.1.4. Análisis elemental	44
5.1.5. Difracción de rayos x	44
5.2. Determinación de los Valores de pKa de los Compuestos	45
5.3. Estudios Cinéticos	48
5.3.1. Perfiles de concentración	48
5.3.2. Perfiles de neutralización	53
6. CONCLUSIONES	64
7. REFERENCIAS	65
8. APÉNDICES	71

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de varios sistemas supramoleculares, desde pequeños complejos anfitrión-huésped hasta grandes ensamblajes moleculares.	15
2	Estructura de la β -ciclodextrinilbisimidazol, sintetizada por el grupo de Breslow.	18
3	Estructura del fotocatalizador supramolecular con un complejo Rh como unidad catalizadora para la reducción de CO ₂ .	19
4	Esquema general de las guanilhidrazonas.	21
5	Películas de óxido de grafeno (material de soporte) funcionalizadas con imidazol.	25
6	Estructura del guanidinio.	25
7	Patrón de unión más común en la interacción de un grupo guanidinio con un fosfodiéster.	26
8	Esquema general de los compuestos ditópicos y nomenclatura usada en este trabajo.	33
9	Esquema de la síntesis de SAG.	34
10	Esquema de la síntesis de MEG.	34
11	Esquema de la síntesis de NOG.	35
12	Esquema general de la ruptura del NPDPP a 37°C en agua o DMSO:agua al 80% en volumen con los catalizadores usados en el trabajo.	36
13	Esquema general de la numeración y asignación de los protones en las moléculas.	40
14	Espectro de RMN ¹ H en DMSO- <i>d</i> ₆ y estructura química de SAG.	41
15	Espectro de RMN ¹³ C en DMSO- <i>d</i> ₆ y estructura química de SAG.	42
16	Espectro de infrarrojo en pastilla de KBr del SAG.	43
17	Estructura cristalina de MEG. Celda unitaria. Se muestran los puentes que se forman entre los carboxilos y los guanidinos, a través de los cloruros.	45
18	Curva de titulación de SAG 0.01mol/L con hidróxido de tetrametilamonio a 37°C en 80% de DMSO, I = 0.1 mol/L de cloruro de tetrametilamonio.	47
19	Perfil de concentración promedio en la ruptura del NPDPP catalizada por SAG a un valor de pH de 14.7 a 37°C en DMSO-agua al 80% en volumen	49

20	Perfil de concentración promedio en la ruptura del NPDPP catalizada por MEG a un valor de pH de 10.6 a 37°C en DMSO-agua al 80% en volumen.	50
21	Perfil de concentración promedio en la ruptura del NPDPP catalizada con SAG a un valor de pH de 11.2 a 37°C en agua.	52
22	Perfil de concentración promedio en la ruptura del NPDPP catalizada con MEG a un valor de pH de 11.2 a 37°C en agua	52
23	Diagrama general de especies en las distintas proporciones de desprotonación.	54
24	Perfil de variación de la constante de rapidez en la ruptura del NPDPP con el grado de desprotonación en 80% DMSO de SAG, A representa los equivalentes de base (hidróxido de tetrametilamonio).	56
25	Perfil de variación de la constante de rapidez en la ruptura del NPDPP con SAG en función del valor de pH en 80% DMSO acuoso a 37°C.	56
26	Perfil de variación de la constante de rapidez en la ruptura del NPDPP con MEG en función del valor de pH en 80% DMSO acuoso a 37°C.	58
27	Perfil de variación de la constante de rapidez en la ruptura del NPDPP con SAG 5 mmol/L en función del valor de pH en agua a 37°C.	59
28	Perfil de variación de la constante de rapidez en la ruptura del NPDPP con MEG 5 mmol/L en función del valor de pH en agua a 37°C.	61
29	Mecanismo propuesto para la catálisis básica general para la ruptura del DPPNPP.	63

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Constantes de rapidez observadas para la ruptura de ésteres de fosfato con diferentes sistemas reportados en la literatura.	27
2	Estructura y características principales de los reactivos utilizados	30
3	Resumen de condiciones de las síntesis realizadas para SAG, a partir de salicilaldehído con diferentes aminoguanidinos	39
4	Principales características de los compuestos sintetizados.	40
5	Asignación de señales de RMN ^1H (DMSO- d_6) de los compuestos sintetizados.	41
6	Asignación de señales de RMN ^{13}C (DMSO- d_6) de los compuestos sintetizados.	46
7	Análisis elemental de los compuestos sintetizados.	44
8	Tabla 8. Valores de pK_a obtenidos para los diferentes compuestos mediante titulaciones potenciométricas en agua y mezcla de 80% DMSO-agua a 37°C ($pK_w = 18.8$).	47
9	Dependencia de la constante de catalítica con el valor de pH en 80% en volumen de DMSO-agua de los compuestos ($pK_w = 18.8$).	51
10	Dependencia de la constante de catalítica con el valor de pH en agua de los compuestos ($pK_w = 13.7$).	53
11	Constantes de rapidez en la ruptura del NPDPP con el grado de desprotonación de SAG y MEG en 80% DMSO	55
12	Constantes de rapidez en la ruptura del NPDPP con el grado de desprotonación de SAG y MEG en agua.	60

RESUMEN

En el presente trabajo se muestra la síntesis y caracterización de catalizadores ditópicos con fragmentos de guanidinio y fenol. Así también los estudios de actividad catalítica de los compuestos en la reacción de ruptura de un sustrato modelo de pesticida, difenil *p*-nitrofenil fosfato (NPDPP). Los experimentos se hicieron en dos medios, en una mezcla de 80% DMSO-agua en volumen y en agua pura a 37°C. Para evaluar el efecto sobre la reacción se hicieron perfiles de la variación de la constante de rapidez observada con la concentración total del catalizador (a las proporciones de neutralización de 1, 1.5 y 2) y el grado de neutralización (con concentración constante de 5 mmol L⁻¹). A partir del perfil de concentración se confirmó la actividad catalítica por parte de los compuestos, SAG y MEG, en la ruptura del NPDPP. Se observó una dependencia lineal de las k_{obs} con la concentración del catalizador. En el perfil de neutralización observamos que conforme aumenta el grado de neutralización de las moléculas aumenta el valor de k_{obs} , lo que nos indica que las especies desprotonadas son las más activas. Se obtuvo la siguiente ecuación de ajuste de la catálisis en función de las especies presentes en cada valor de pH: $k_{obs} = k_1 [H_2A^+] + k_2 [HA] + k_3 [A^-]$. A partir de este ajuste se presume que en la catálisis por SAG la ruta que predomina es la que involucra la especie totalmente desprotonada ($k_3 = 0.727(0.045) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y que para MEG involucra una competencia entre las especies químicas [HA] y [A⁻], ambas catalíticamente activas (k_2 y k_3 de $1.18 (0.31) \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $9.10(0.30) \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$). En ambos compuestos, el nucleófilo podría ser el oxígeno del fenol que al estar desprotonado aumentaría su nucleofilia, lo que conlleva a una catálisis básica general. Es posible que este mecanismo pueda estar ocurriendo ya que en ambos tipos de perfiles se encontró que existía la participación de la especie con el fenol desprotonado. También la mejora catalítica al estar presente la especie [A⁻], implicaría que la guanidina podría estar fungiendo como un posible nucleófilo. SAG y MEG resultaron ser muy buenos catalizadores en agua ya que su eficiencia catalítica sube al menos 2 y 16 veces respectivamente, con respecto a la ruptura con iones hidróxido.

1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas son moléculas notablemente sofisticadas que catalizan reacciones esenciales para la vida, que de otro modo no podrían ocurrir. Después de la elucidación estructural, se ha podido entender cómo es que operan a un nivel molecular. La mayoría no se han caracterizado y sus mecanismos químicos siguen siendo un enigma. Lo que todos tienen en común es un complejo sitio de unión que se adecua a huéspedes moleculares y transformarlos en valiosos productos químicos (Cragg, 2010).

La química supramolecular, enfocada al desarrollo de sistemas supramoleculares puede ser considerada como nueva herramienta en el estudio de procesos catalíticos. Utilizar sistemas supramoleculares modelos pueden ayudar a explicar las mejoras observadas en las velocidades de reacción en términos de estructura y mecanismo (Van Leeuwen y cols, 2008). En ciertos casos, los sistemas modelos pueden proveer una simulación simplificada de la acción de una enzima y lograr una mayor comprensión de los distintos mecanismos por los cuales las enzimas son capaces de conseguir grandes aceleraciones de velocidad de reacción y números de recambio. Cuando se cuenta con información estructural, es posible entonces imitar la actividad de la enzima mediante el diseño de un análogo artificial (Rayna y col, 2014).

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

La solución a la paradoja entre la notable estabilidad química de monoésteres, diésteres y triésteres de fosfato y su fácil manipulación se encuentra en el poder catalítico de las enzimas que se encargan romper los enlaces P–O–C y

P–O–P rápidamente. Esto da algunas de los mayores incrementos de velocidad enzimática registradas en la literatura. La base química de esa catálisis está en el corazón de la selección natural de ésteres y anhídridos de fosfato para funciones centrales ubicuas en biología (Bowler y col., 2010).

Los triésteres de fosfato son en su mayoría tóxicos y se han utilizado en la elaboración de pesticidas y armas químicas a lo largo de la historia, por lo que existe un especial interés ambiental en el tratamiento y desactivación de estos compuestos mediante su hidrólisis, para eliminar grandes cantidades almacenadas de ellos en aguas y suelos y evitar que se formen subproductos tóxicos (Shneider y Yatsimirsky, 2003).

Existen dos caminos principales por los cuales la hidrólisis de los ésteres de fosfato se lleva a cabo. Uno es mediante el uso de iones metálicos como cofactores en el interior de las enzimas y el otro mediante una catálisis del tipo ácido-base general (Kamerlin y Wilkie, 2007). Ambas rutas proveen una estabilización de tipo electrostática del estado de transición aniónico (Yatsimirsky, 2005). La relevancia en la comprensión del mecanismo de hidrólisis de los ésteres de fosfato radica en que proveerá una base sólida para el diseño racional de fosfodiesterasas artificiales más eficientes que puedan funcionar como agentes terapéuticos, agentes desactivadores de armas químicas, antivirales y agentes de remediación en suelos contaminados con pesticidas organofosforados (Medeiros y col., 2008).

La síntesis de catalizadores que sean capaces de imitar a las enzimas involucra un diseño racional a partir del mecanismo de la reacción y las principales interacciones que se presentan en el sitio activo de la enzima. La catálisis puede verse desde el punto de vista de un reconocimiento molecular del complejo activado en el estado de transición por el catalizador (Yatsimirsky, 2005). Se conocen informes del uso de compuestos de tipo amino y guanidinio que han sido utilizados como catalizadores en la ruptura de diésteres de fosfato debido a las interacciones de tipo electrostático entre el grupo fosfato y el catión amonio o guanidinio, donde el último resulta ser mejor debido a la complementariedad y geometría (Salvio y cols, 2013).

Debido a lo anterior a continuación, en el presente proyecto de investigación se muestra la síntesis y caracterización de un sistema catalítico basado en compuestos ditópicos con un fragmento guanidinio y otro fenólico. Así también los estudios de actividad catalítica de los compuestos en la reacción de hidrólisis de un éster de fosfato sustrato modelo de pesticida, difenil, *p*-nitrofenil fosfato (NPDPP), en agua y en mezclas de DMSO:H₂O.

2. ANTECEDENTES

2.1. Química supramolecular

La química supramolecular se define como la química más allá de la molécula. Este campo de investigación fue iniciado en el siglo pasado por muchos investigadores en campos de investigación combinados, incluidos los ganadores del Premio Nobel Lehn, Cram y Pedersen (Ariga y Kunitake, 2006). Esta parte relativamente nueva de la química se ocupa de los ensamblajes moleculares que resultan de la asociación de dos o más especies químicas que se mantienen juntas mediante interacciones intermoleculares. El campo se desarrolló a partir de los primeros estudios de receptores sintéticos para cationes a mediados de los años sesenta. La química supramolecular se estableció firmemente y creció exponencialmente después de que el Premio Nobel de Química 1987 se otorgara a tres de los pioneros, Charles Pedersen, Jean-Marie Lehn y Donald Cram (Lehn, 1988). Las estructuras supramoleculares son el resultado de varias interacciones no covalentes que abarca una enorme gama de efectos atractivos y repulsivos, que incluyen la interacción de van der Waals, la interacción electrostática, el enlace de hidrógeno, la interacción hidrofóbica, la coordinación, entre otras. Algunas de las cuales a menudo funcionan de manera cooperativa en un complejo supramolecular (Steed y Atwood, 2009).

Dado que los complejos supramoleculares se basan en diversas interacciones, los tamaños de las supermoléculas difieren ampliamente de tamaño molecular a tamaño macroscópico (figura 1). La categoría más pequeña de supermoléculas es el llamado complejo anfitrión-huésped. Los complejos anfitrión-huésped son pares de moléculas y/o iones que están específicamente asociados a través del reconocimiento molecular. El reconocimiento molecular se descubrió en cierta medida a mediados del siglo XIX. Un claro hito para el origen del reconocimiento molecular se considera la propuesta de llave-cerradura de Emil Fischer en 1894. Del mismo modo, en la década de 1950 se sabía que los productos naturales pueden reconocer moléculas particulares, incluida la capacidad de

reconocimiento del oligosacárido cíclico ciclodextrina y oligopéptido cíclico valinomicina. Charles Pedersen descubrió que el éter corona era la primera molécula huésped artificial capaz de reconocimiento molecular en 1967. Donald Cram estableció un nuevo campo de la química, la química anfitrión-huésped, a través del desarrollo de este concepto para una amplia gama de sistemas moleculares. Finalmente, en 1978, Jean-Marie Lehn combinó campos químicos relacionados, incluida la química huésped-huésped y la química del ensamblaje molecular en la química supramolecular (Reinhoudt, 2013).

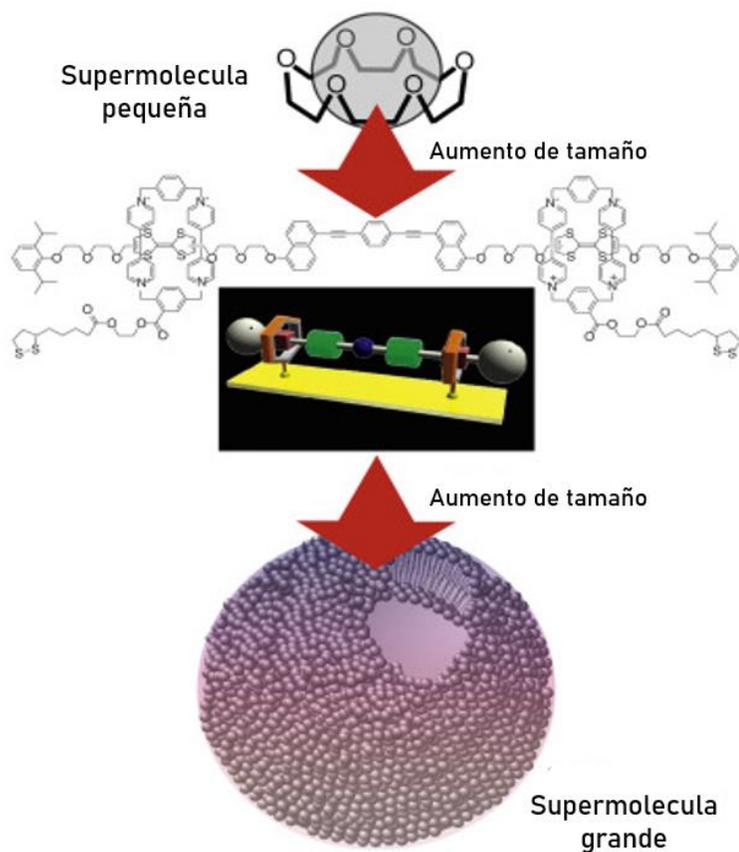


Figura 1. Esquema de varios sistemas supramoleculares, desde pequeños complejos anfitrión-huésped hasta grandes ensamblajes moleculares.

Fuente: Ariga, 2016.

La base de la síntesis de grandes estructuras supramoleculares es el autoensamblaje. Al contrario de la síntesis orgánica clásica en la que se forman fuertes enlaces covalentes permanentes, el autoensamblaje es una síntesis no covalente en la que se forman "supramoléculas" por la asociación de bloques de construcción en solución a través de interacciones específicas y en condiciones de equilibrio. Las "supramoléculas" resultantes tienen una integridad estructural única en la solución y propiedades que difieren de los componentes individuales. Los puentes de hidrógeno, las interacciones iónicas, efecto hidrofóbico y enlaces de coordinación proporcionan las fuerzas que gobiernan este tipo de estructuras (Ariga, 2016).

Desde el principio, la química supramolecular se ha asociado con posibles aplicaciones y nuevas tecnologías. Las primeras áreas donde se reconoció el potencial fueron las tecnologías de separación y detección. Es relativamente sencillo traducir un evento de reconocimiento molecular en separación o concentración de sales y convertir este evento en una señal eléctrica u óptica medible. También surgió la aplicación de la química supramolecular en el diseño de catalizadores supramoleculares, donde las moléculas desarrolladas cuentan con una actividad catalítica que puede mimetizar la acción catalítica de las enzimas. Estos sistemas pueden diseñarse con características particulares definidas, que les permitan estabilizar el estado de transición de una reacción y favorecer el curso de esta (Motherwell y col, 2001).

2.2. Catálisis supramolecular

El diseño de sistemas de catálisis supramolecular se ha inspirado en la observación y entendimiento de la catálisis enzimática. Sin embargo, los modelos usualmente contienen solo una o algunas de las características que están presentes en las enzimas en los sistemas biológicos (Raynal y col, 2014). En cambio, sistemas modelos de enzimas son más pequeños y simples estructuralmente comparados con las enzimas. El hecho de que los sistemas sintéticos son más simples que los

biológicos no limitan la información que puede ser obtenida, en cambio, usar sistemas más simples hace posible estimar la importancia relativa de diferentes parámetros que contribuyen a la catálisis (Kirby, 1996). Una ventaja adicional del uso de modelos supramoleculares para estudiar catálisis es que los compuestos pueden manipularse sintéticamente para estudiar una propiedad específica. En el ámbito biológico de la catálisis, el discernir un factor en particular responsable de la eficiencia catalítica de la enzima es una tarea muy compleja (Motherwell y col, 2001).

Los sistemas supramoleculares pueden ser considerados como nuevas herramientas de la fisicoquímica orgánica moderna. El estudio de procesos catalíticos utilizando sistemas supramoleculares modelos pueden ayudar a explicar las mejoras observadas en las velocidades de reacción en términos de estructura y mecanismo (Van Leeuwen y col, 2008). En ciertos casos, los sistemas modelos pueden proveer una simulación simplificada de la acción de una enzima y lograr una mayor comprensión de los distintos mecanismos por los cuales las enzimas son capaces de conseguir grandes aceleraciones de velocidad de reacción y números de recambio (Rayna y col, 2014).

La obtención de sistemas supramoleculares capaces de imitar la capacidad catalítica de las enzimas es uno de los objetivos finales de la investigación en sistemas de autoensamblaje. Los profesionales de la materia han abordado estos desafiantes esfuerzos desde diferentes perspectivas (Reek y Meeuwissen, 2010). Por otro lado, muchos sistemas modelo han sido diseñados de modo tal que logren un aprovechamiento de su energía de enlace para llevar a cabo la catálisis. Se han diferenciado dos tipos de sistemas que se basan en este principio: los primeros son receptores moleculares donde un sitio catalítico está ubicado cerca de un sitio de unión que ha sido diseñado para unirse selectivamente al reactivo, los segundos son receptores moleculares que promueven la reacción de dos reactivos acomplejados simultáneamente, formando un complejo multimolecular que se mantiene unido por interacciones débiles y reversibles (Van Leeuwen y col, 2008).

Los primeros ejemplos de catálisis supramolecular de dos sustratos surgieron del trabajo de Bender *et al.*, ellos estudiaron las hidrólisis del acetato de *m-ter*tbutil

fenilo en presencia de ácido 2-bencimidazol acético con α -ciclodextrina (Komiyama y col, 1977). Otros grupos de investigación como Breslow y Knowles ampliaron el uso de ciclodextrinas para el desarrollo de sistemas modelo de enzimas. Breslow sintetizó una β -ciclodextrina que contaba con dos grupos imidazol como sistema modelo de la ribonucleasa A, como se muestra en la figura 2 (Breslow y col, 1978).

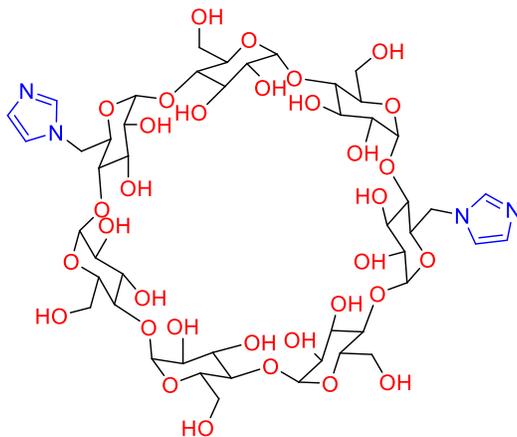


Figura 2. Estructura de la β -ciclodextrinilbisimidazol.

Fuente: Breslow y col, 1978.

En la actualidad se han generado diversos sistemas supramoleculares con fines catalíticos. La obtención de micelas con núcleos de Au que funcionan como metaloenzimas artificiales se ha diseñado para su uso en reacciones intramoleculares de carboxilación de alquinos. Obteniéndose catalizadores altamente activos y con una selectividad no observada en los catalizadores de oro convencionales (Lee y Zhao, 2014).

Sistemas supramoleculares funcionalizados con motivos que cuentan con una actividad catalítica es otra estrategia, y está estrechamente relacionada con el área que comprende el diseño de enzimas artificiales. Un grupo de investigación sintetizó un imizadol-pilar[5]areno como agente catalítico en la hidrólisis de diésteres de fosfato, que mostró buena actividad como fosfodiesterasa (Wanderlind y col, 2018).

El desarrollo de fotocatalizadores supramoleculares ha sido un objetivo importante en el campo de la fotosíntesis artificial debido a su eficiente reducción de CO_2 y oxidación y reducción de agua, especialmente para materiales sólidos,

catalítica que se asemeje a la actividad de la enzima o que muestre actividad sobre los sustratos de la enzima en cuestión y/o mostrar un alto grado de reconocimiento estructural y quiral de los sustratos. Un sistema artificial debe contar con estabilidad ante la manipulación en temperaturas elevadas, solubilidad en una gama de disolventes entre otras cualidades (Salvio y col., 2010; Raynal y col., 2014).

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

2.4. Aplicaciones de compuestos tipo Guanilhidrazonas

Una característica común de las guanilhidrazonas, así como de las biguanidas, es la presencia de grupos amidina unidos a las estructuras alifáticas o aromáticas (figura 4). Ya que las guanilhidrazonas prometen un potencial químico y biológico interesante han sido ampliamente estudiadas (Mitchell, 1998). Se ha informado una diversidad de propiedades biológicas deseables para las guanilhidrazonas, han sido usados exitosamente como antipertensivos, tripanocidal, antineoplásicos y antibacterianos (Borges y col, 2004). Una guanilhidrazona con una actividad muy atractiva farmacológicamente es la guanabenz, un receptor α_2 -adrenérgico utilizado como agente antihipertensivo (Holmes, 1983).

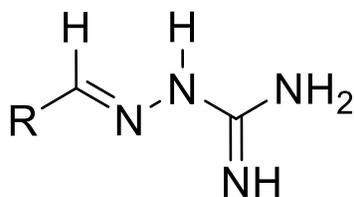


Figura 4. Esquema general de las guanilhidrazonas.

Dado que la síntesis de guanilhidrazonas es muy fácil y los costos de producción son relativamente bajos, la investigación y el desarrollo de agentes terapéuticos a base de guanilhidrazona son altamente atractivos (Martins y col, 2004). Además, estas sustancias desempeñan un papel importante como intermedios en la síntesis de compuestos heterocíclicos polifuncionales que contienen nitrógeno (Gossnitzer y col, 2002). En las últimas décadas, se han sintetizado una gran cantidad de derivados de guanilhidrazonas, y se ha evaluado la relación estructura-actividad de los mismos.

Los fármacos que contienen el grupo guanidina también han sido objeto de una evaluación clínica intensa para la terapia antitumoral debido a su actividad antiproliferativa. Un ejemplo es la metilglioxal-bis (guanilhidrazona) (MGBG), un potente inhibidor de la biosíntesis de poliaminas espermidina y espermina (Ekelund y col, 2001). Algunas bisguanilhidrazonas que son utilizadas como antibióticos bicatiónicos, han mostrado actividad contra *Trypanosoma cruzi*. Su mecanismo de acción no está claro aún, pero se ha sugerido que puede existir una interacción con el ADN parasitario y/o su membrana celular (Borges y col, 2004). Recientemente se ha sintetizado un derivado guanilhidrazona con potencial para el tratamiento del Alzheimer, ya que muestra una alta inhibición de la acetilcolinesterasa (Ferreira y col, 2017).

2.5. Ésteres de Fosfato

El ácido fosfórico puede esterificarse en una, dos o tres posiciones diferentes, dando paso a monoésteres, diésteres y triésteres respectivamente. Los monoésteres y los

diésteres cuentan con roles bien definidos en los sistemas biológicos, tales como: formar parte del material genético (el ADN y el ARN son diésteres de fosfato), fungen como reservorios de energía (ATP), muchos intermediarios en el metabolismo existen como monoésteres de fosfato, y también la fosforilación de proteínas es un importante mecanismo de control. Ya que muchas moléculas biológicas contienen fosfato, y las reacciones enzimáticas que transfieren estos grupos juegan un papel importante en el metabolismo (Westheimer, 1992).

Los monoésteres y diésteres cuentan con una gran estabilidad cinética a la ruptura de su enlace P–O, el tiempo de vida media estimado para el metilfosfato monoéster en agua sin efecto de catalizador alguno es de aproximadamente 1.1×10^{12} años ($k = 2 \times 10^{-20} \text{ s}^{-1}$) a 25°C (Lad y col, 2003). La intrínseca resistencia a la hidrólisis por parte del enlace P–O de los ésteres de fosfato es fácilmente resuelto por las enzimas, éstas pueden alcanzar impresionantes velocidades de reacción. Por ejemplo, la serina fosfatasa puede acelerar la ruptura del monoéster de fosfato alrededor de 10^{21} veces, mientras la nucleasa stafilococcica aumenta la velocidad de reacción de la hidrólisis del enlace P–O del ADN alrededor de 10^{17} veces. Estas mejoras en las velocidades de reacción se encuentran entre las más grandes reportadas y han generado un gran interés en el estudio del mecanismo de acción de estas enzimas y en el esclarecimiento de los detalles de la escisión espontánea no catalizada de ésteres de fosfato. El conocimiento de los mecanismos de ambas reacciones es relevante para comprender la fuente de la catálisis enzimática y para el diseño de análogos sintéticos (Cleland y Hengge, 2005).

Los triésteres de fosfato no existen de forma natural en los sistemas biológicos, e históricamente el interés en su química fue principalmente industrial, luego del descubrimiento de los compuestos organofosforados como el dietil 4-nitrofenil fosfato, presentan muy buenas propiedades herbicidas e insecticidas. Mediante el uso de la actividad anticolinérgica de estos compuestos se desarrollaron agentes nerviosos para su uso como armas químicas. Lo que generó la necesidad de generar antídotos contra los compuestos organofosforados. En la naturaleza existen enzimas capaces de hidrolizar a los triésteres de fosfato en subproductos menos tóxicos, las fosfotriesterasas, éstas se generaron como respuesta de los

sistemas biológicos al uso masivo de los compuestos organofosforados como pesticidas agrícolas a mediados del siglo XX. Estas enzimas se descubrieron mediante la resistencia de algunas especies de insectos, respuesta similar a la aparición de β -lactamasas desencadenadas por el uso masivo de antibióticos β -lactámicos. Así, en la década de 1970, se descubrió que ciertas bacterias del suelo hidrolizan una amplia gama de compuestos organofosforados (Raushel y Holden, 2000). Por ejemplo, la fosfotriesterasa de la bacteria *Pseudomona diminuta*, que es un microorganismo presente en el suelo, es capaz de hidrolizar una gran cantidad de triésteres de fosfato, sin embargo, se ha visto que el mejor sustrato es el paraoxón (dietil *p*-nitrofenil fosfato), la reacción de hidrólisis del paraoxón catalizada por la fosfotriesterasa bacteriana ocurre a una velocidad aproximadamente 10^{12} veces más rápida comparada con la reacción no catalizada (Donarski y col, 1989).

La escisión hidrolítica de los ésteres de fosfato y las reacciones de transferencia de fosfatos en general, se han estudiado durante más de 70 años. Los primeros estudios que se realizaron fueron por parte de Bunton, Kirby y Westheimer, los cuales se inspiraban en el rol ubicuo de los derivados de los ésteres de fosfato y reacción de transferencia de fosfatos en la naturaleza, se centraron en evaluar la reactividad de este grupo y el mecanismo de las diferentes reacciones (Todd, 1959). El enfoque de la investigación para el entendimiento de estos sistemas se basó fuertemente en el estudio de la catálisis enzimática, con la finalidad de desarrollar modelos biomiméticos que emulen de manera eficiente tanto al sustrato como al medio que lo rodea, de manera tal que el conocimiento generado a partir del estudio de estos sistemas lleve finalmente al diseño de enzimas artificiales. Se sabe que son varios los parámetros que influyen sobre el mecanismo y la velocidad de reacción. Tales parámetros incluyen la naturaleza del sustrato (grado de esterificación, grupo saliente), su estado de protonación, la naturaleza del nucleófilo y la interacción con el disolvente. Por esta razón, el número de parámetros que deben controlarse para lograr una catálisis eficiente es considerable, lo que ha sido un reto a la hora del diseño, síntesis y desarrollo de sistemas biomiméticos de fosfoesterasas (Diez y col, 2017).

2.5. Hidrólisis No Enzimática de Ésteres de Fosfato

En las fosfoesterasas la actividad mimética, en su mayoría, se logra utilizando cationes metálicos ligados a los sitios activos, se suele utilizar Cu^{II} y Zn^{II} ya que estos metales responden favorablemente en la reacción (Salvio, 2015). Sin embargo, los iones metálicos no son las únicas unidades activas que pueden jugar un rol central en el mimetismo de la enzima. Se han sintetizado diversos compuestos para su uso como catalizadores de distintos ésteres de fosfato como sustratos, que funcionan mediante catálisis libre de metales. La Pralidoxima, que es un antídoto contra el envenenamiento por compuestos organofosforados lleva a cabo este tipo de catálisis, fue el primero en ser aprobado para su uso clínico y se obtuvo en la década de 1950. Desde entonces se ha optado por el desarrollo de nuevas oximas que pueden ser efectivas en la hidrólisis de una gran gama de sustratos (Manfredi y col, 2016).

Otros compuestos nitrogenados también se han probado para la hidrólisis de estos sustratos tóxicos. Desde hace tiempo se tiene conocimiento de la actividad catalítica del imidazol en la ruptura de estos sustratos en especial (Orth y col, 2015). El imidazol forma parte del aminoácido esencial histidina, este aminoácido está presente en muchos sitios activos enzimáticos donde cuenta con actividad catalítica, cuya actividad se atribuye a su grupo funcional imidazol. Se han generado derivados de esta molécula, al igual que funcionalización de diferentes materiales y probado su eficiencia en la ruptura de triésteres de fosfato (Figura 5). Y se han alcanzado velocidades de reacción de hasta 10^6 veces más rápidas en comparación con la hidrólisis espontánea (Hostert y col, 2017; Ferreira y Orth, 2017).

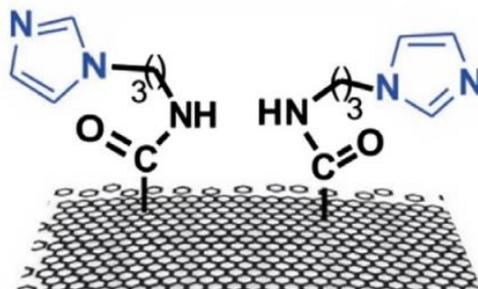


Figura 5. Películas de óxido de grafeno (material de soporte) funcionalizadas con imidazol. Fuente: Hostert y col, 2017.

Una serie de sistemas catalíticos basados en guanidinio capaces de promover eficazmente la escisión de ésteres de fosfato se han reportado en los últimos años.

La unidad de guanidinio (Figura 6), juega un papel clave en varias enzimas como la nucleasa staphylococcal. Donde este grupo forma parte del sitio activo enzimático e interacciona directamente con el sustrato para llevar a cabo la reacción. El grupo guanidinio se ha utilizado ampliamente como un activador y/o grupo de anclaje en el diseño de catalizadores hidrolíticos. Estos catalizadores contienen uno o más unidades de guanidinio, o una unidad de guanidinio en conjunción con otra unidad activa como un centro metálico, un grupo hidroxilo, o una base libre en solución (Salvio y col., 2011).

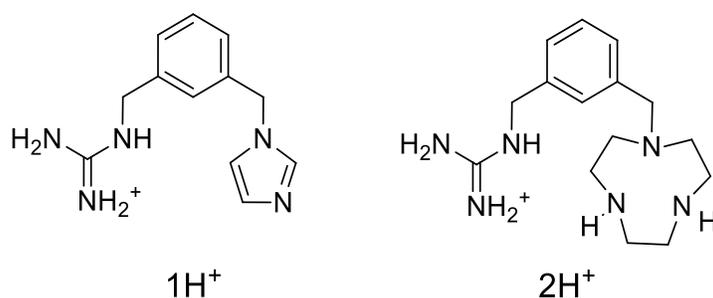


Figura 6. Estructura del guanidinio.

Fuente: Salvio y col., 2011.

La habilidad del guanidinio para enlazar el grupo fosfato se puede atribuir a su estructura rígida y plana y a su complementariedad geométrica con este oxoanión. Esto permite la formación de uno de dos puntos patrón de unión posible de los puentes de hidrógeno (Figura 7), ya que hay otros sitios de unión de los enlaces de

hidrógeno que son posibles. Además, tiene un alto valor de pKa que asegura la protonación sobre un amplio intervalo de valores de pH (Salvio, 2015).

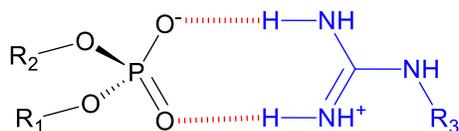
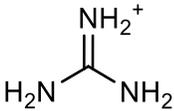
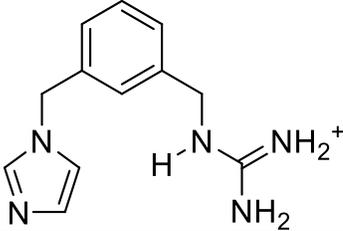
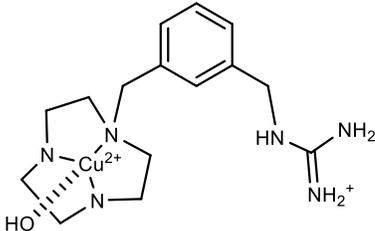
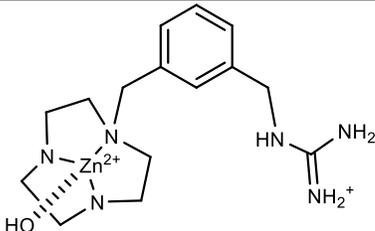
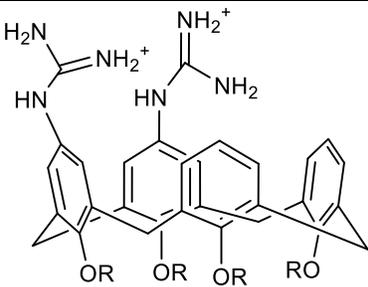
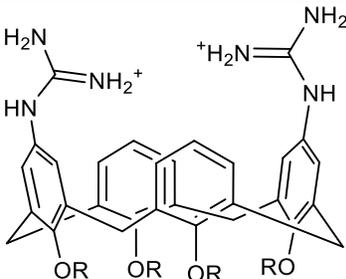
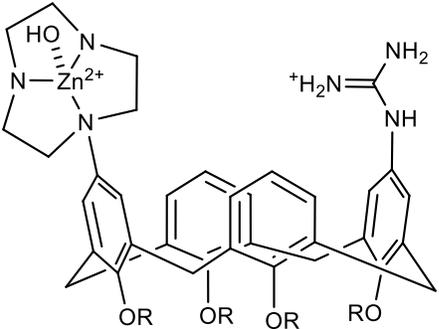
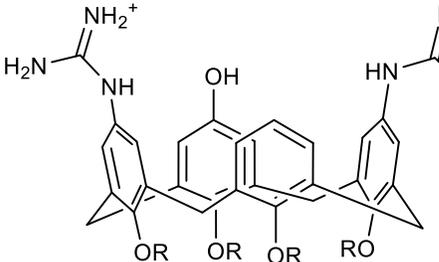
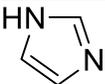
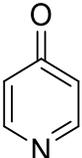
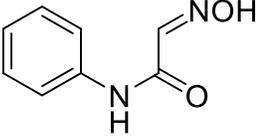
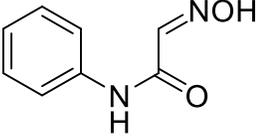


Figura 7. Patrón de unión más común en la interacción de un grupo guanidinio con un fosfodiéster. Fuente: Salvio, 2015.

El aducto formado entre fosfato y guanidinio, es resultado de una interacción electrostática y de puentes de hidrógeno. Esta interacción, particularmente si nos referimos a su constante de asociación en agua y otros disolventes polares no es muy fuerte, pero se presenta. En las proteínas de manera casi general, la interacción guanidinio-oxoanión normalmente se lleva a cabo en el interior de “huecos” hidrofóbicos, en donde se favorece y aumenta la fuerza de la interacción (Salvio, 2015). Además, se han informado de estudios en los que se muestra que la interacción del guanidinio con el fosfato mediante puentes de hidrógeno es más fuerte en mezclas de DMSO/agua que en agua pura. A continuación, se muestra en la tabla 1, un resumen de algunos de los catalizadores reportados para la ruptura de diversos ésteres de fosfato, y sus constantes de rapidez observadas bajo diferentes condiciones.

Tabla 1. Constantes de rapidez observadas para la ruptura de ésteres de fosfato con diferentes sistemas reportados en la literatura.

Sustrato	Catalizador	k_{obs} (s ⁻¹)	pH	Referencia
HpNPP (DMSO acuoso 80%)		9.6×10 ⁻⁹	7	(Salvio y col., 2011)
		2.8×10 ⁻⁹	9	
		1.6×10 ⁻⁸	9.8	
		5.7×10 ⁻⁷	7	
		5.1×10 ⁻⁴	9	
		1.0×10 ⁻³	9.8	
		1.9×10 ⁻⁵	9.3	
	3.3×10 ⁻⁵	10.4		
	2.0×10 ⁻⁵	11.5		
	4.6×10 ⁻⁵	9.3		
	6.9×10 ⁻⁵	10.4		
	5.0×10 ⁻⁵	11.5		

		1.1×10^{-4}	9.9	(Salvio y col., 2015)
BNPP (DMSO acuoso 80%)		8.5×10^{-6} 44×10^{-6} 42×10^{-6} 36×10^{-6}	8.8 9.5 10 10.5	(Salvio y col., 2016)
Paraoxón (agua)		2.5×10^{-6}	ND	(Orth y col., 2015)
DEtpNPP (Etanol acuoso al 44%)		0.43×10^{-3}	ND	(Castro y col., 2011)
DEDNPP (agua)		1.46	10.5	(Manfredi y col., 2016)
Metil-paraoxón (agua)		3.05×10^{-2}	10.5	

3. OBJETIVOS

3.1. General

Sintetizar diferentes compuestos ditópicos con los fragmentos guanidinio y fenol para utilizarlos como catalizadores en la ruptura de un triéster de fosfato modelo de pesticida, en agua y en mezclas de DMSO acuoso al 80% en volumen.

3.2. Específicos

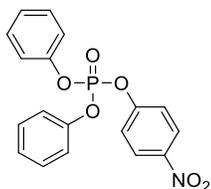
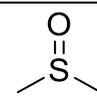
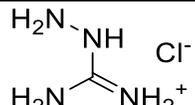
- 1) Sintetizar compuestos ditópicos de tipo fenol-guanidinio, mediante reacciones de formación de iminas.
- 2) Determinar la estructura de los compuestos sintetizados mediante técnicas de caracterización convencionales como análisis elemental, infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y masas.
- 3) Evaluar la actividad catalítica de los compuestos sintetizados con el éster de fosfato difenil *p*-nitrofenil fosfato en agua y en DMSO acuoso al 80% en volumen.

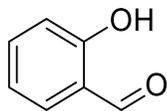
4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos

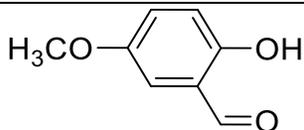
En la Tabla 2 se muestran los reactivos que se utilizaron en la parte experimental del presente proyecto. El agua desionizada se obtuvo del equipo Millipore modelo Advantage A10 marca Thermo Fisher Scientific. Para las cromatografías en placa fina se utilizó una mezcla de disolventes: metanol (Fermot, $M = 32.04 \text{ g mol}^{-1}$, grado ACS, $\rho = 0.7918 \text{ g/cm}^3$), diclorometano (Fermot, $M = 84.93 \text{ g mol}^{-1}$, grado ACS, $\rho = 1.33 \text{ g/cm}^3$) y acetona (Sigma, $M = 58.08 \text{ g mol}^{-1}$, grado reactivo, $\rho = 0.791 \text{ g/cm}^3$).

Tabla 2. Estructura y características principales de los reactivos utilizados

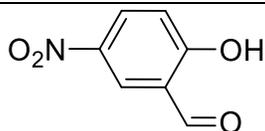
Reactivo	Características principales
$(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$	Cloruro de tetrametilamonio Sigma Aldrich, pureza $\geq 99\%$ Masa molar = 109.6 g mol^{-1}
$(\text{CH}_3)_4\text{NOH} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Hidróxido de tetrametilmonio pentahidratado Sigma Aldrich, pureza $> 97\%$ Masa molar = $181.23 \text{ g mol}^{-1}$
 (NPDPP)	Difenil <i>p</i> -nitrofenil fosfato Masa molar = $371.28 \text{ g mol}^{-1}$
	Dimetilsulfóxido Sigma Aldrich, pureza $> 99\%$ Masa molar = 78.13 g mol^{-1} , $\rho = 1.10 \text{ g/cm}^3$, grado GC.
	Cloruro de aminoguanidinio Sigma Aldrich, pureza $\geq 98\%$ Masa molar = $110.54 \text{ g mol}^{-1}$



Salicilaldehído
Sigma Aldrich, pureza 98%
Masa molar = 122.12 gmol⁻¹, ρ = 1.146 g/cm³



2-hidroxi-5-metoxibenzaldehído
Sigma Aldrich, pureza > 98%
Masa molar = 152.15 gmol⁻¹, ρ = 1.219 g/cm³



2-hidroxi-5-nitrobenzaldehído
Sigma Aldrich, pureza > 98%
Masa molar = 167.12 gmol⁻¹

4.2. Programas

El análisis de los datos obtenidos de los experimentos cinéticos para determinar las constantes de rapidez en los diferentes experimentos se hizo con el programa OriginPro™ versión 9.0 de 64 bits. Para el análisis de los espectros correspondientes de RMN de ¹H y ¹³C se utilizó el programa MestReNova 12.0. Los datos arrojados por las titulaciones potenciométricas se analizaron con ayuda del programa HYPERQUAD 2008, para la obtención de los pKa de cada compuesto.

4.3. Equipos

Las mediciones espectrofotométricas se hicieron en un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible marca Agilent 8435 (Agilent Technologies) de arreglo de diodos equipado con multicelda. Durante los experimentos se mantuvo constante la temperatura a 37 °C utilizando un baño de recirculación de agua modelo HAAKE A25 marca Thermo Scientific.

Para medir los valores de pKa de los compuestos, los valores de pH de las titulaciones se midieron con un electrodo de vidrio Metrohm (aquatrode plus, con medidor de temperatura integrado) conectado a un medidor de pH Metrohm 780. Durante las titulaciones se mantuvo constante la temperatura a 37°C con ayuda del recirculador de Julabo FP45-HL.

4.4. Técnicas de caracterización y equipos empleados

Se determinó el punto de fusión de los compuestos utilizando el equipo Buchi Melting point B-540 de 220W de potencia y termómetro electrónico.

Como parte de la caracterización por medio de técnicas espectroscópicas, se utilizó el equipo de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, Frontier marca Perkin Elmer. Los datos obtenidos se procesaron con el programa integrado al equipo. Las muestras fueron analizadas mediante preparación de pastillas de KBr. También se utilizó la técnica de Resonancia Magnética Nuclear como parte de la caracterización de los compuestos. Se utilizó un espectrómetro Bruker Avance 400 que opera a una frecuencia de 400 MHz. Las lecturas para ^1H fueron tomadas a una frecuencia de 400 MHz y para ^{13}C se sintonizó el equipo a 100 MHz. Todos los espectros obtenidos mediante esta técnica se realizaron en DMSO- d_6 como disolvente. Se realizó análisis elemental, donde se obtuvo información sobre los porcentajes de carbono, hidrógeno y nitrógeno de las moléculas. Se empleó la técnica de espectroscopia de masas, se obtuvieron los espectros de masas de los compuestos con un espectrómetro de masas Agilent 6100 series LC/MS single quad, las mediciones se realizaron en modo positivo en un intervalo de relación m/z de 40-400 con un detector de tipo ESI-MS. Los datos cristalográficos fueron colectados a temperatura ambiente en un equipo Bruker D8 Quest equipado con un detector APEX II CCD utilizando radiación de $\text{Cu-K}\alpha$, ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$). Las intensidades fueron medidas utilizando $\varphi + \omega$ scans. Se realizó una corrección por absorción utilizando el método Multi-Scan (Becker y Coppens, 1974). La resolución de la estructura molecular se realizó utilizando métodos directos con SHELXS, el refinamiento con SHELXL-2008 (Sheldrick, 2008), ambos procedimientos se realizaron en el programa OLEX2 (Dolomanov y col., 2009). Todos los átomos no hidrogenoides fueron refinados anisotrópicamente. Todos los hidrógenos fueron colocados geoméricamente. Los análisis elementales se determinaron en un analizador elemental FLASH 2000.

4.5. Técnicas de síntesis

Se sintetizó una serie de compuestos del tipo guanilhidrazona, se hizo variar el grupo R unido al anillo aromático en posición *para* respecto al fenol cambiándose el sustituyente por un grupo electroatractor y uno electrodonador.

Los compuestos sintetizados derivados del salicilaldehído y el diaminoguanidinio, son la sacililguanilhidrazona (R = H), la 5–metoxisalicilguanilhidrazona (R = OCH₃) y la 5–nitrosalicilguanilhidrazona (R = NO₂) y se hará referencia a ellos con las siguientes etiquetas: SAG, MEG y NOG respectivamente. En la figura siguiente se muestran los compuestos pertenecientes a esta serie.

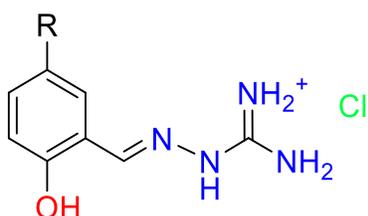


Figura 8. Esquema general de los compuestos ditópicos y nomenclatura usada en este trabajo.

4.5.1. Síntesis de SAG

La reacción se llevó mediante la adición de 1.05 g (9.54 mmol) de cloruro de aminoguanidinio (el cual se disolvió en agua mediante agitación), después se añadieron lentamente 10.36 mmol. Al finalizar la adición se dejó en agitación por 24 horas y a temperatura ambiente. En la figura 9 se muestra el esquema de la síntesis para el compuesto SAG.

Una vez finalizada la reacción se hicieron lavados con CH₂Cl₂. Se adicionó la solución acuosa de la reacción en un embudo de separación, y posteriormente se agregaron 15 mL de CH₂Cl₂, esto se hizo tres veces consecutivas, descartándose

la fase orgánica al final de cada lavado. La fase acuosa se recuperó, se filtró y se evaporó, obteniéndose un sólido blanco.

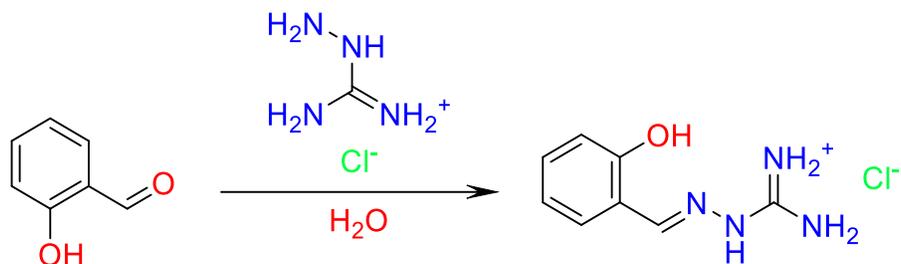


Figura 9. Esquema de la síntesis de SAG.

4.5.2. Síntesis de MEG

La síntesis partió de la adición de 1.055 g (9.54 mmol) de cloruro de aminoguanidinio, el cual se disolvió completamente en 5 mL de agua deionizada mediante agitación, posteriormente se añaden 1.3 mL (10.41 mmol) de 2-hidroxi-5-metoxibenzaldehído poco a poco. La reacción se dejó en agitación por 24 horas a temperatura ambiente. En la figura 10 se muestra el esquema de la síntesis para el compuesto MEG.

Como parte del proceso de purificación, se hizo una extracción líquido-líquido con CH_2Cl_2 y agua, tal como se describió con el compuesto SAG. La fase acuosa se recuperó, se filtró y se evaporó, y en este caso se obtuvo un sólido amarillo pálido.

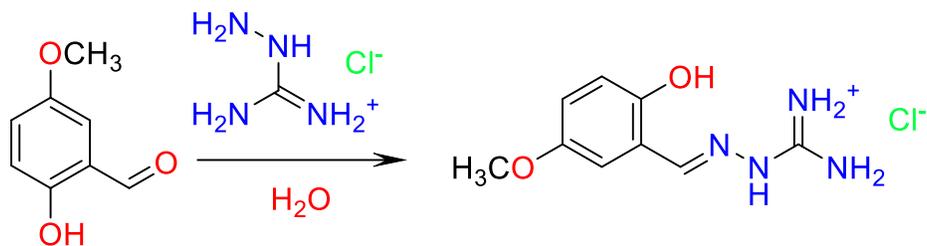


Figura 10. Esquema de la síntesis de MEG.

4.5.3. Síntesis de NOG

La reacción se llevó a cabo en un matraz pera, con la adición de 1.055 g (9.54 mmol) de cloruro de aminoguanidinio en 5 mL etanol y se disolvió completamente mediante agitación, posteriormente se agregaron 1.73 g (10.36 mmol) de 2-hidroxi-5-nitrobenzaldehido (previamente disueltos en CH_2Cl_2) poco a poco al matraz. Se dejó en agitación por 24 horas a temperatura ambiente.

El producto se purificó mediante lavados con acetona para retirar el exceso de 2-hidroxi-5-nitrobenzaldehido que no reaccionó. Se filtró y se evaporó, obteniéndose un sólido amarillo brillante. En la figura 11 se muestra el esquema de la síntesis para el compuesto NOG.

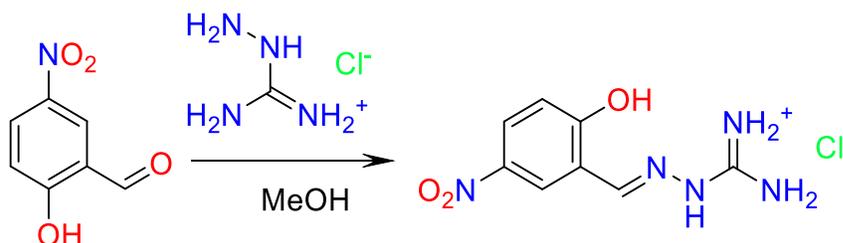


Figura 11. Esquema de la síntesis de NOG.

4.6. Estudios cinéticos

Los estudios cinéticos se realizaron en condiciones de pseudoprimer orden ($[\text{NPDPP}] = 1\text{--}5 \mu\text{mol/L}$), con temperatura constante de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y fuerza iónica de 0.01 mol/L de cloruro de tetrametilamonio. Se probó la reacción en dos medios diferentes, una prueba en agua y la otra en una mezcla de $\text{DMSO}:\text{H}_2\text{O}$ 80:20 v/v. Las mediciones se llevaron a cabo en celdas de cuarzo de 1 cm de longitud, donde el volumen total en la celda fue de 2.5 mL . Se evaluó el efecto del catalizador y el disolvente sobre la constante de rapidez de la reacción de transesterificación de un sustrato modelo de paraoxon, el NPDPP (Figura 12). Las reacciones se iniciaron mediante la adición de una alícuota de $25 \mu\text{L}$ de la disolución 1 mmol/L del sustrato en DMSO . Para seguir el transcurso de la reacción, los experimentos se monitorearon a diferentes longitudes de onda según el grado de neutralización de

los catalizadores (porcentaje de neutralización 1:1 a 440 nm y 460 nm; 1:1.5 a 440 nm, 470 nm y 600 nm, 1:2 a 470 nm), siguiendo la formación del 4-nitrofenolato que se forma como producto de la reacción.

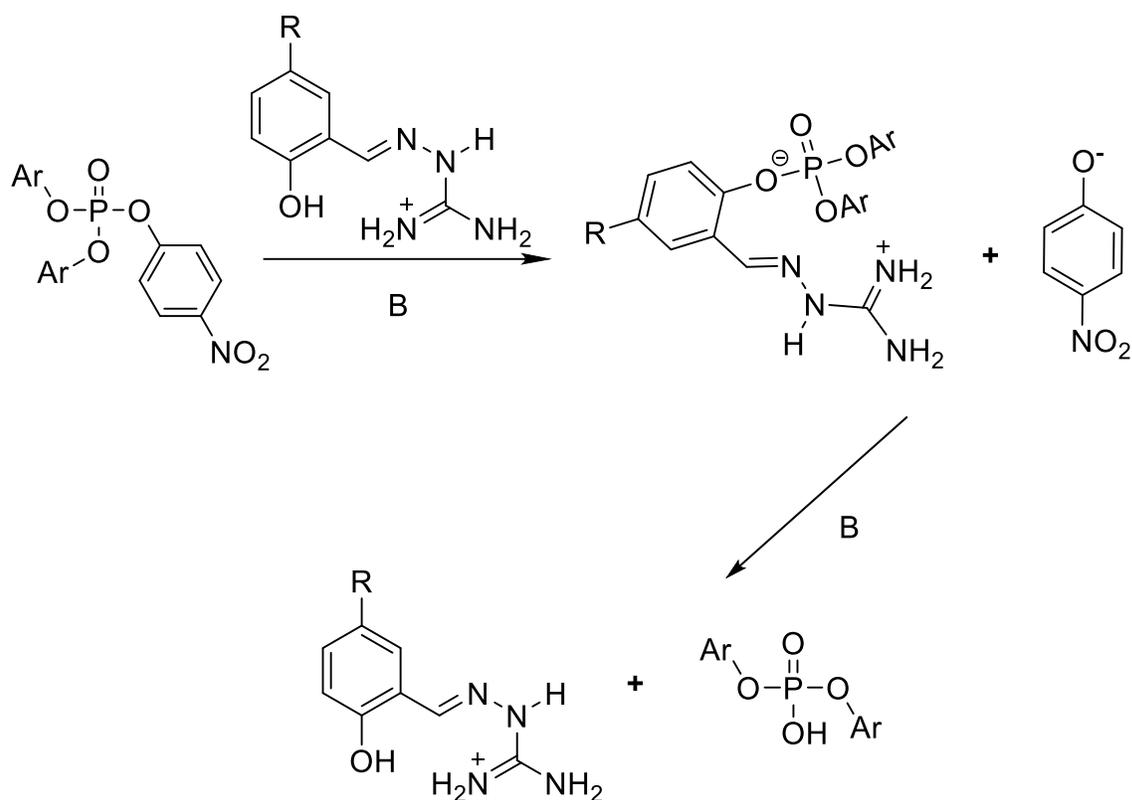


Figura 12. Esquema general de la ruptura del NPDPP a 37°C en agua o DMSO:agua al 80% en volumen con los catalizadores usados en el trabajo.

Para las cinéticas que completaron totalmente la reacción, las constantes de rapidez observadas se mantuvieron mediante el ajuste no lineal de la ecuación siguiente para la reacción de transesterificación del NPDPP:

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

La ecuación corresponde a la formación del producto mediante una cinética de primer orden. A es la absorbancia en cualquier momento, ΔA_{∞} es la diferencia

entre la absorbancia inicial y la infinita, A_0 es la absorbancia al inicio, k_{obs} es la constante de rapidez observada y t es el tiempo.

Cuando las reacciones eran lentas se usó el método de las rapidezces iniciales. El ajuste se realizó con la ecuación 2, la rapidez inicial se obtuvo de la pendiente de la gráfica de absorbancia del producto contra el tiempo. La absorbancia en el infinito se midió experimentalmente, las soluciones reacción se dejaron por un tiempo prolongado y posteriormente se hicieron mediciones para obtener la absorbancia en el infinito.

$$v_0 = \left[\frac{dA_{NF}}{dt} \right]_{t \rightarrow 0} = k_{obs} \epsilon_{NF} [NPDPP] = k_{obs} A_{\infty} \quad \text{Ec. 2}$$

Para conocer el efecto que tiene la concentración del catalizador sobre la hidrólisis del sustrato, se elaboraron perfiles donde se hizo variar la concentración del catalizador en un intervalo desde 1 a 5 mmol/L, a una determinada proporción de neutralización del catalizador (equivalentes de compuesto: equivalentes de OH^- ; 1:1, 1:1.5, 1:2.) para ambos medios. Con la finalidad de conocer si existe la catálisis o no por parte de los compuestos sintetizados.

Para conocer las especies del compuesto que participan en el mecanismo de reacción de la hidrólisis del sustrato, se realizaron perfiles de neutralización tanto en la mezcla de DMSO-agua 80:20 como en agua pura. Se mantuvo constante la concentración total del catalizador ($[\text{Cat}] = 5 \text{ mmol L}^{-1}$), se hizo variar la fracción de neutralización desde 0 hasta 3 equivalentes con incrementos de 0.25. Para el análisis de los datos se hizo la gráfica de k_{obs} en función del pH de fracción de neutralización.

4.7. Titulaciones potenciométricas

Las titulaciones se realizaron en una mezcla de DMSO:H₂O 4:1 en volumen y en agua pura a 37°C en una celda de vidrio, cerrada y de 30.0 mL; el volumen inicial de las disoluciones a titular fue de 25.0 mL. Las titulaciones se mantuvieron en atmósfera de nitrógeno para evitar la presencia de CO₂ en disolución ya que la presencia de carbonatos dificulta que se alcance el equilibrio en el electrodo

después de cada adición de titulante. El potenciómetro se calibró usando amortiguadores de referencia a 25°C, pH 4.00, 7.00, 9.00.

Para determinar los valores de pK_w , en una celda de vidrio se valoraron 20 mL de ácido clorhídrico 0.01 mol/L con hidróxido de tetrametilamonio 0.1 mol/L. La solución de la celda, al igual que la del titulante, se encontraba en las mismas condiciones de disolvente. El valor de pK_w se obtiene mediante el ajuste no lineal con la ecuación 3, de la gráfica de volumen de base añadido contra pH, obtenida experimentalmente.

$$V = \frac{V_0(C_A + 10^{(pH-pK_w)} - f10^{-pH})}{C_B + f10^{-pH} - 10^{(pH-pK_w)}} \quad \text{Ec. 3}$$

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

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

Una vez determinado el pK_w , se determinó el valor de pK_a del sistema amortiguador, donde se utilizó como electrolito soporte cloruro de tetrametilamonio para ajustar la fuerza iónica a una concentración 0.1 mol/L. Se utilizó una concentración de 0.01 mol/L de cada uno de los compuestos a valorar. Como titulante se usó hidróxido de tetrametilamonio cuya concentración fue de 0.1 mol/L tanto en agua pura como en la mezcla binaria de DMSO-agua. Después de las titulaciones potenciométricas, los valores de pK_a fueron calculados mediante el análisis de las curvas de titulación con el programa Hyperquad 2008.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Síntesis y caracterización de Guanilhidrazonas.

En el proceso de síntesis de SAG se probaron varias condiciones de síntesis con la finalidad de optimizar el rendimiento y condiciones de la reacción. En la tabla 3 se presentan las condiciones de reacción evaluadas. En las primeras dos síntesis se utilizó bicarbonato de aminoguanidinio. Esta reacción tuvo menor rendimiento y la solubilización del producto de la reacción es baja. En la segunda reacción se cambió el disolvente, por una mezcla H₂O/EtOH lo que mejoró el rendimiento de la reacción. En la 3^{ra} y 4^{ta} reacción se utilizó cloruro de aminoguanidinio. Esto generó una mejor solubilidad de reactivos y productos y mayores rendimientos.

Tabla 3. Resumen de condiciones de las síntesis realizadas para SAG, a partir de salicilaldehído con diferentes aminoguanidinos.

Disolvente	Reactivo	Rendimiento
H ₂ O	Bicarbonato de aminoguanidinio	60%
H ₂ O/EtOH	Bicarbonato de aminoguanidinio	76%
MeOH	Cloruro de aminoguanidinio	90%
H ₂ O	Cloruro de aminoguanidinio	90%

El análisis de los resultados obtenidos en el efecto del anión y del disolvente, podemos observar que hay diferencia en los rendimientos de reacción, además de la solubilidad de los productos. El mejor resultado se obtuvo en agua y metanol, por lo que se decidió utilizar agua como disolvente debido a que es un disolvente más amigable con el ambiente. Al igual que para la obtención de los compuestos con el grupo metoxi y nitro como sustituyente en posición para al fenol, etiquetados como MEG y NOG respectivamente. Se prefirió trabajar con el cloruro de aminoguanidinio como reactante.

La síntesis de los compuestos se llevó a cabo como se mencionó anteriormente en la sección de metodología. En la tabla siguiente (tabla 4) se muestran algunas de las características físicas principales obtenidas para SAG, MEG y NOG. Las masas molares presentadas fueron calculadas con el programa Chemdraw.

Tabla 4. Principales características de los compuestos sintetizados

Compuesto	Masa molar (g mol ⁻¹) esperada	Estado físico	Rendimiento (%)	Punto de Fusión (°C)
SAG	^a 214.65	Sólido, blanco	90	223.6–224.8
MEG	^a 244.68	Sólido, amarillo pálido	51	211.9–213.8
NOG	^a 259.65	Amarillo brillante	84	* 275.5–277.5

*Temperatura de descomposición
^a Las masas molares presentadas fueron calculadas con el programa Chemdraw.

5.1.1. Caracterización por RMN ¹H

De los espectros obtenidos en RMN ¹H en DMSO-*d*₆ para cada uno de los compuestos sintetizados, las asignaciones propuestas son las siguientes.

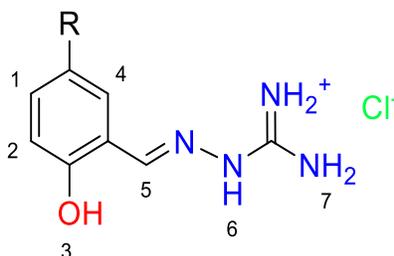


Figura 13. Esquema general de la numeración y asignación de los protones en las moléculas.

A partir del análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear de cada compuesto se observó el número de señales esperado acorde con su estructura, así como la correcta integración y multiplicidad. Los protones de la región aromática aparecen entre 8 y 7 ppm, los del guanidinio se muestran a 7.7 ppm aproximadamente, el correspondiente al fenol aparece a 12 ppm y el imínico a 8.4 ppm. La asignación del espectro de RMN ^1H y los desplazamientos químicos para el SAG se muestran en la figura 14 y tabla 5. En la tabla 5 también se muestran las asignaciones de las señales de los espectros obtenidos para MEG y NOG.

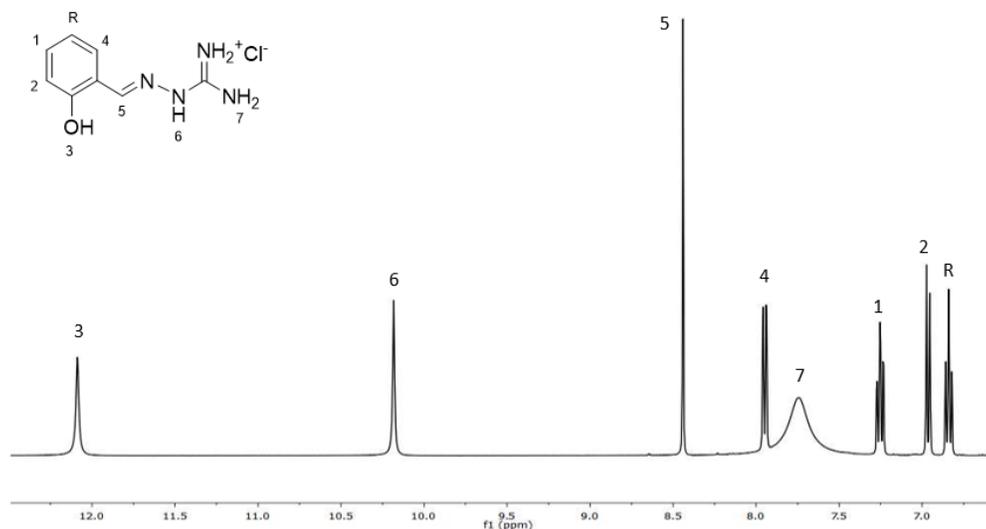


Figura 14. Espectro de RMN ^1H en $\text{DMSO-}d_6$ y estructura química de SAG.

Tabla 5. Asignación de señales de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) de los compuestos sintetizados.

Compuesto	SAG (R = H)	MEG (R = OCH_3)	NOG (R = NO_2)
RMN de ^1H (δ)	H1: 7.25 (t,1H)	H1: 6.87 (t,2H)	H1: 8.14 (dd,2H)
	H2: 6.96 (d,1H)	H2: 6.87 (s,2H)	H2: 8.14 (dd,2H)
	H3: 12.08 (s,1H)	H3: 12.01 (s,1H)	H3: 12.19 (s,1H)
	H4: 7.95 (d,1H)	H4: 7.51 (s,1H)	H4: 7.18 (d,1H)
	H5: 8.44 (s,1H)	H5: 8.41 (s,1H)	H5: 8.44 (s,1H)
	H6: 10.18 (s,1H)	H6: 9.73 (s,1H)	H6: 8.88 (s,1H)
	H7: 7.74 (s,4H)	H7: 7.76 (s,4H)	H7: 7.84 (s,4H)
	R: 6.84 (t,1H)	R: 3.73 (s,3H)	

400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$: δ (ppm).

5.1.2. Caracterización por RMN ^{13}C .

En la figura 15 se muestra el espectro de RMN de ^{13}C de SAG. Los espectros de MEG y NOG se muestran en el apartado de apéndices. Para comprobar la formación del enlace imínico es importante identificar la señal del carbono del enlace $\text{C}=\text{N}$ que apareció aproximadamente a 143 ppm para las tres moléculas, la cual es evidencia de la formación del compuesto ya que indica la condensación del grupo aldehído y la amina de los precursores. También se puede observar la presencia de las señales de los carbonos aromáticos en la zona de 110-130 ppm y el carbono del grupo guanidinio a 156 ppm. En la figura 15 se muestra la asignación del espectro de RMN ^{13}C y los desplazamientos químicos para SAG. En la tabla 6 también se muestran las asignaciones de las señales de los espectros obtenidos para MEG y NOG.

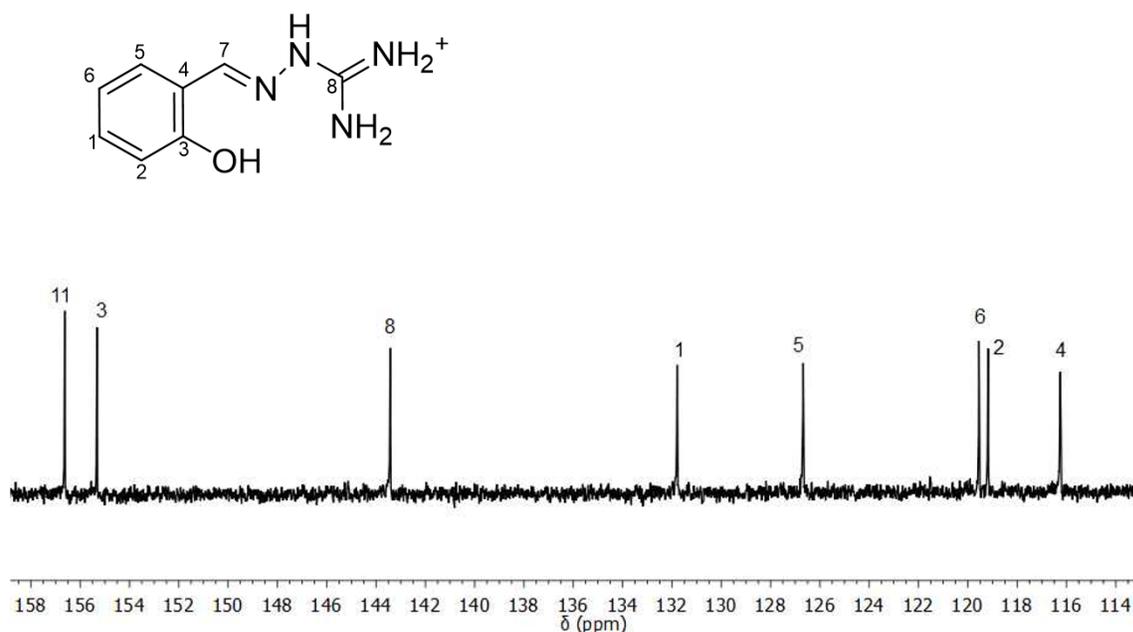


Figura 15. Espectro de RMN ^{13}C en $\text{DMSO-}d_6$ y estructura química de SAG.

Tabla 6. Asignación de señales de RMN ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$) de los compuestos sintetizados.

Compuesto	SAG (R = H)	MEG (R = OCH ₃)	NOG (R = NO ₂)
RMN de ^{13}C (δ)	C1: 131.79 (s)	C1: 155.72 (s)	C1: 162.67 (s)
	C2: 119.18 (s)	C2: 152.74 (s)	C2: 155.81 (s)
	C3: 155.32 (s)	C3: 151.37 (s)	C3: 141.65 (s)
	C4: 116.25 (s)	C4: 143.53 (s)	C4: 140.63 (s)
	C5: 126.68 (s)	C5: 120.19 (s)	C5: 127.47 (s)
	C6: 119.55(s)	C6: 119.40 (s)	C6: 122.93 (s)
	C7: 143.43 (s)	C7: 117.69 (s)	C7: 120.88 (s)
	C8: 156.63 (s)	C8: 110.10 (s)	C8: 117.24 (s)
		C9: 56.08 (s)	

100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ (ppm).

5.1.3. Caracterización por IR

En los espectros de IR generados para cada molécula la señal más representativa es la que indica la formación del enlace imínico alrededor de 1630 cm^{-1} (estiramiento enlace C=N). Otras de las señales que vale la pena identificar son las correspondientes al estiramiento del grupo O–H que se observaron alrededor de 3400 cm^{-1} y la señal de la flexión N–H alrededor de 1680 cm^{-1} . En la figura 16 se muestra el espectro de SAG. Los espectros de MEG y NOG se muestran en la sección de apéndices.

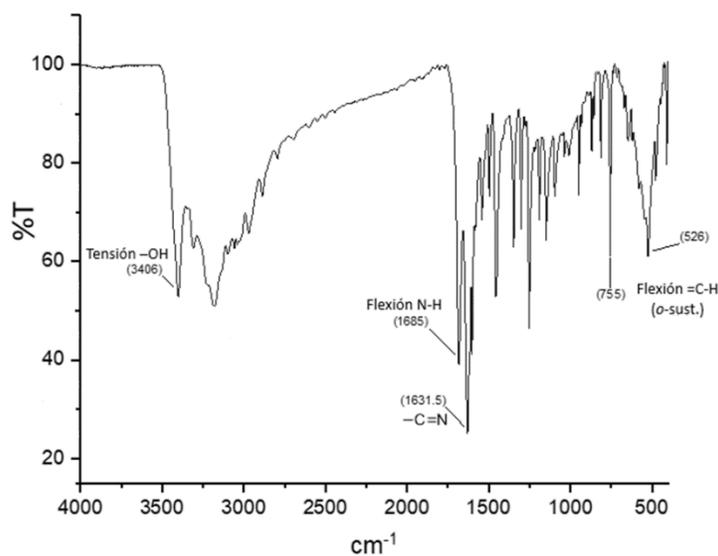


Figura 16. Espectro de infrarrojo en pastilla de KBr del SAG.

5.1.4. Análisis elemental

Los porcentajes de carbono, hidrógeno y nitrógeno se determinaron efectuando un análisis elemental de los compuestos sintetizados. En la tabla siguiente (tabla 7), podemos observar los porcentajes teóricos y experimentales calculados para cada compuesto. La diferencia observada entre los valores experimentales y teóricos se encuentra dentro del error aceptable para la esta técnica, en la cual se aceptan variaciones de aproximadamente 0.5 unidades, considerando también la contribución del átomo de cloro presente como contraión.

Tabla 7. Análisis elemental de los compuestos sintetizados

Compuesto	Experimental	Teórico
MEG	N: 23.97	N: 22.90
	C: 43.61	C: 44.18
	H: 5.29	H: 5.36
NOG	N: 26.41	N: 26.97
	C: 36.85	C: 37.01
	H: 3.68	H: 3.88
SAG	N: 25.61	N: 26.10
	C: 44.71	C: 44.76
	H: 4.72	H: 5.17

5.1.5. Difracción de Rayos X

La caracterización por Difracción de Rayos X de monocristal se realizó solamente para MEG, ya que fue del único que se obtuvo un cristal. Éste se obtuvo a partir de una solución metanólica saturada del mismo y por el método de evaporación lenta. Los monocristales tienen forma de estrella, de color amarillo y transparentes. Estos fueron adecuados para su colecta por Difracción de Rayos X de monocristal. MEG cristaliza en el grupo espacial monoclinico $P2_1$, formando una red que se mantiene unida por medio de puentes entre los cloruros y los grupos carboxilo (puentes de hidrógeno) y entre los cloruros y los grupos guanidinio (Van der Waals). $a = 5.22450$,

$b = 8.1493$, $c = 12.9917$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 97.6191^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 548.251 \text{ \AA}^3$, $Z = 2$. En la figura 17 se puede apreciar la estructura cristalina resuelta para MEG.

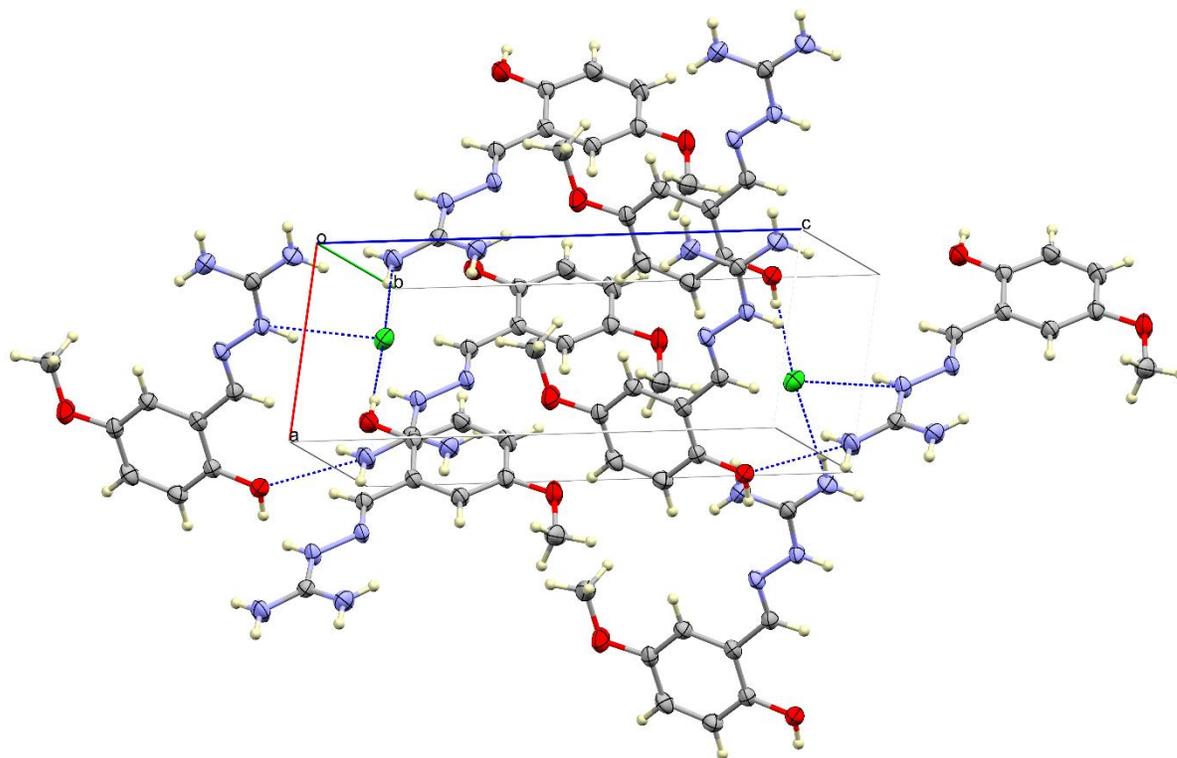


Figura 17. Estructura cristalina de MEG. Celda unitaria. Se muestran los puentes que se forman entre los carboxilos y los guanidinos, a través de los cloruros.

5.2. Determinación de los valores de pK_a de los compuestos.

Se determinaron los valores de pK_a de los diferentes grupos dissociables de los compuestos mediante titulaciones potenciométricas, en las condiciones mencionadas en el apartado de materiales y métodos. Se utilizó el cloruro de tetrametilamonio como electrolito de soporte, para facilitar las mediciones de pH del electrodo en este medio debido a su baja proporción de agua. Antes de hacer la

medición del pK_a se determinó la constante de ionización del agua en la mezcla DMSO-agua 80% en volumen, que dio un valor de 18.8 ± 0.1 .

Las titulaciones se realizaron agregando alícuotas de una solución 0.1 mol/L de hidróxido de tetrametilamonio, en 80% de DMSO acuoso. Cada vez que se añadía una alícuota se registraba el valor de pH medido por el potenciómetro. De la misma manera los compuestos se valoraron en agua pura y se determinaron los valores de pK_a . En la Figura 18 se muestra la curva de valoración de SAG obtenida mediante el procedimiento descrito anteriormente, en la cual se observaron 2 sitios protonables. Los valores de pH de las titulaciones fueron corregidos como se mencionó en materiales y métodos y con los datos obtenidos se hizo un análisis con el programa HYPERQUAD 2008 para obtener los valores de pK_a . En la tabla 8, se muestran los valores promedio obtenidos para los valores de pK_a de las moléculas tanto en agua como en la mezcla de DMSO acuoso al 80%, el valor de pK_{a2} es aproximadamente 13 para todas las moléculas y éste se asocia al grupo guanidinio, valor que concuerda con lo informado en la literatura (Corona y col, 2012). Y el valor del pK_{a1} es de 8 y pertenece al fenol para dos de los tres compuestos (SAG y MEG). A excepción del compuesto que tiene al grupo nitro como sustituyente en posición cuatro al fenol (NOG), los valores pK_a del guanidinio y del fenol bajaron considerablemente. Al comparar los resultados obtenidos en los dos medios se encontró que los valores son similares y presentan el mismo comportamiento, la diferencia en los valores se debe al efecto electroattractor por parte del grupo NO_2 y la gran conjugación existente en la molécula.

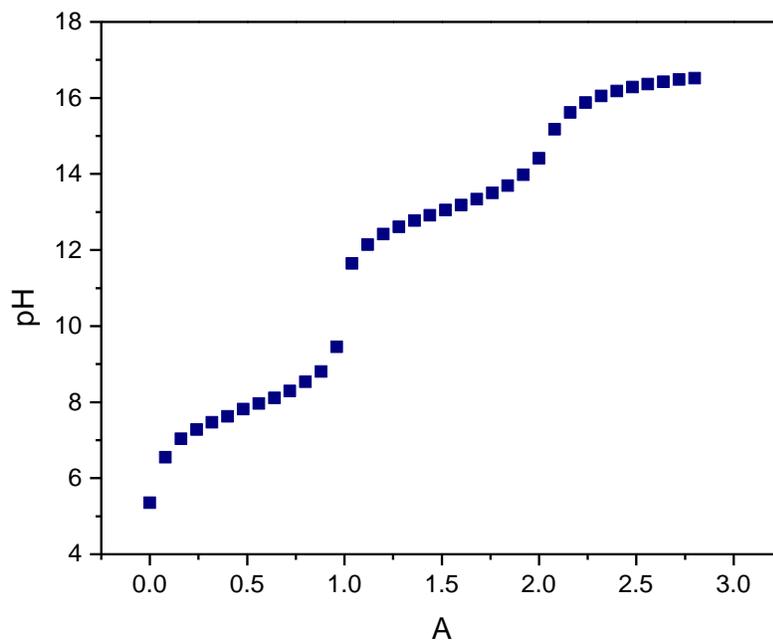


Figura 18. Curva de titulación de SAG 0.01mol/L con hidróxido de tetrametilamonio a 37°C en 80% de DMSO, fuerza iónica = 0.1 mol/L de cloruro de tetrametilamonio (A = equivalentes de base).

Tabla 8. Valores de pK_a obtenidos para los diferentes compuestos mediante titulaciones potenciométricas en agua y mezcla de 80% DMSO-agua a 37°C ($pK_w=18.8$)

		SAG	MEG	NOG
<i>DMSO al 80%</i>	pK_{a_1}	8.0	8.1	5.9
	pK_{a_2}	13.0	13.2	8.8
<i>Agua</i>	pK_{a_1}	7.6	7.8	*
	pK_{a_2}	12	12.2	*

*No fue posible determinarse por problemas de solubilidad

5.3. Estudios cinéticos

5.3.1. *Perfiles de concentración*

Para investigar si los compuestos sintetizados son capaces de efectuar una catálisis ácido-base en la reacción de ruptura del NPDPP se evaluó el efecto de la concentración del catalizador. Los experimentos se realizaron de la siguiente manera, se hizo variar la concentración del catalizador mientras que se mantenía fija una proporción de neutralización (pH constante). Las 3 proporciones utilizadas fueron 1:1, 1:1.5 y 1:2, con la finalidad de conocer si había un efecto sobre la posible catálisis al tener diferentes especies del catalizador. Los estudios se llevaron a cabo bajo condiciones de pseudoprimer orden respecto al sustrato ($[NPDPP] = 1 - 5 \mu\text{mol/L}$). La concentración total del catalizador se hizo variar desde 1 a 5 mmol/L y se mantuvo fuerza iónica constante con cloruro de tetrametilamonio a 0.01 mol/L. Las cinéticas se realizaron en dos medios, en una mezcla de DMSO-agua al 80% y en agua pura. Se eligió el medio de 80% DMSO-agua, ya que en esta mezcla es posible evaluar la ruptura catalítica por parte de los compuestos sin contribuciones de la catálisis básica específica, pues ésta se ve abatida por la baja concentración de iones hidróxido en el medio (Ramos, 2017). Los valores de las constantes de rapidez se obtuvieron mediante un ajuste no lineal, con la ayuda de la ecuación 1 mencionada en la sección de materiales y métodos, para las reacciones rápidas y para las lentas mediante el método de rapidezces iniciales (ecuación 2), también anteriormente mencionado.

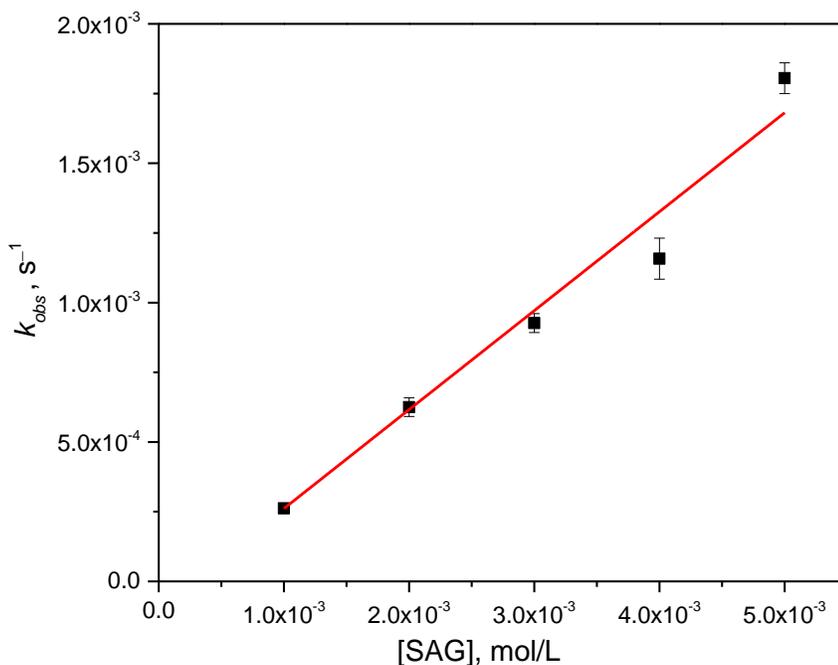


Figura 19. Perfil de concentración promedio en la ruptura del NPDPP catalizada por SAG a un valor de pH de 14.7 a 37°C en DMSO-agua al 80% en volumen.

De los valores obtenidos para las constantes de rapidez, se hicieron perfiles de concentración. En la figura 19 se muestra el perfil para SAG a un valor de pH calculado de 14.7, donde está completamente desprotonado el catalizador. En ella se muestra que existe una dependencia lineal de las constantes de rapidez con la concentración, lo que confirma que el compuesto cataliza la ruptura del NPDPP. Además, podemos observar que la ley de rapidez sólo depende de una especie, ya que la dependencia es lineal, lo que significa que sólo una molécula del catalizador participa en la ruptura del sustrato. Este tipo de perfiles se encontró en cada uno de los grados de neutralización del compuesto SAG, por lo que podemos confirmar la participación del compuesto como catalizador en la ruptura del NPDPP en DMSO al 80% en volumen. En el caso de MEG, en la figura 20 se muestra un perfil de concentración, donde el valor de pH se mantiene constante. Al igual que en el caso de SAG, el comportamiento es similar, es decir, tenemos una dependencia lineal entre la constante de rapidez para la ruptura con la concentración del catalizador,

por lo que también se confirma la actividad catalítica del compuesto. En el caso de los iones hidróxido, como en el perfil se mantiene constante su concentración, podemos atribuir únicamente al catalizador la capacidad esterolítica del sustrato.

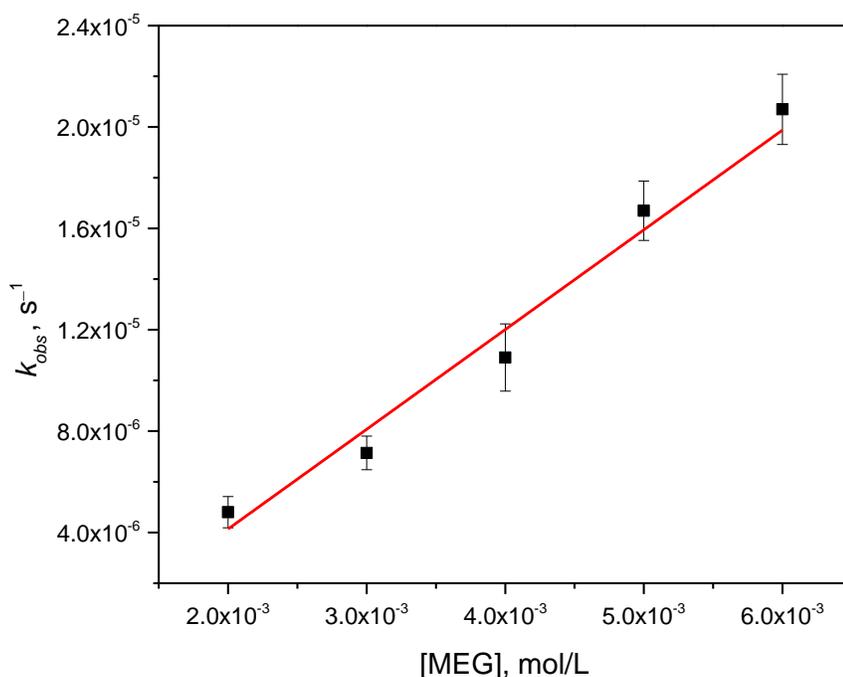


Figura 20. Perfil de concentración promedio en la ruptura del NPDPP catalizada por MEG a un valor de pH de 10.6 a 37°C en DMSO-agua al 80% en volumen.

En la tabla 10 se muestran valores obtenidos para las constantes de rapidez de los diferentes perfiles de concentración correspondiente a SAG y MEG en 80% DMSO-agua. Es decir, en la tabla 9 se muestra un breve resumen de las constantes catalíticas aparentes en cada grado de neutralización de los catalizadores SAG y MEG. Los valores de pH para cada grado de neutralización resultaron ser muy similares debido a que los valores de pKa también son similares, por lo que podemos comparar directamente la actividad de ambos compuestos. En términos generales, el compuesto SAG presentó mejores valores para la catálisis de la ruptura del sustrato. En el caso de cuando sólo el fenol está desprotonado, el valor de la constante catalítica es muy similar, pero conforme se comienza a desprotonar el fragmento guanidinio, la relación entre las constantes cambia notablemente. Para

poder analizar mejor estos resultados, además se probaron los catalizadores en agua y se evaluaron los perfiles de neutralización para la ruptura del NPDPP.

Tabla 9. Dependencia de la constante de catalítica con el valor de pH en 80% en volumen de DMSO-agua de los compuestos ($pK_w = 18.8$).

SAG (R = H)		MEG (R = OCH₃)	
pH	$10^3 k_{cat}$, L mol⁻¹s⁻¹	pH	$10^3 k_{cat}$, L mol⁻¹s⁻¹
10.5	4(0.07)	10.6	4(0.4)
13	222(6)	13.2	13(0.5)
14.7	355(20)	14.8	40(1)

Para las pruebas en agua, se siguió el mismo esquema que en la mezcla de DMSO acuoso, es decir, se hicieron perfiles de concentración a grados de neutralización fijos. En la figura 21 se muestra el perfil de concentración de SAG en agua a un valor de pH de 11.2, que corresponde al valor de pH en el que toda la molécula se encuentra desprotonada. Este perfil se sigue en los demás perfiles para SAG y en todos hay una dependencia lineal entre las constantes de rapidez y la concentración del catalizador, por lo que, al permanecer el pH fijo podemos atribuir al compuesto SAG el efecto catalítico en la ruptura del NPDPP. En el caso de MEG, el perfil de la figura 22 muestra un ejemplo de los obtenidos para este compuesto. En la tabla 10, se enlistan todos los valores obtenidos para la ruptura catalítica del triéster en agua con los catalizadores. La dependencia de primer orden con los catalizadores en este tipo de perfil, nos indican que sólo participa una especie química en la reacción.

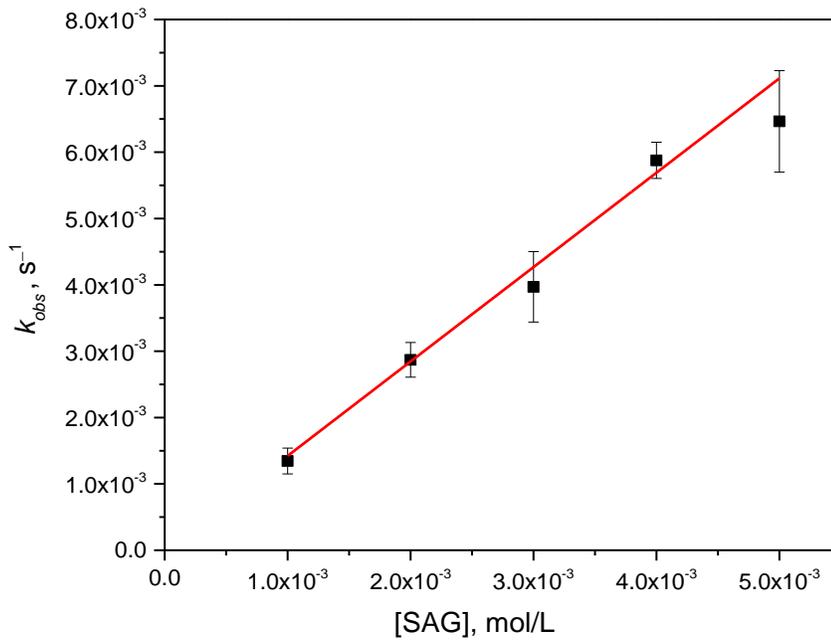


Figura 21. Perfil de concentración promedio en la ruptura del NPDPP catalizada con SAG a un valor de pH de 11.2 a 37°C en agua.

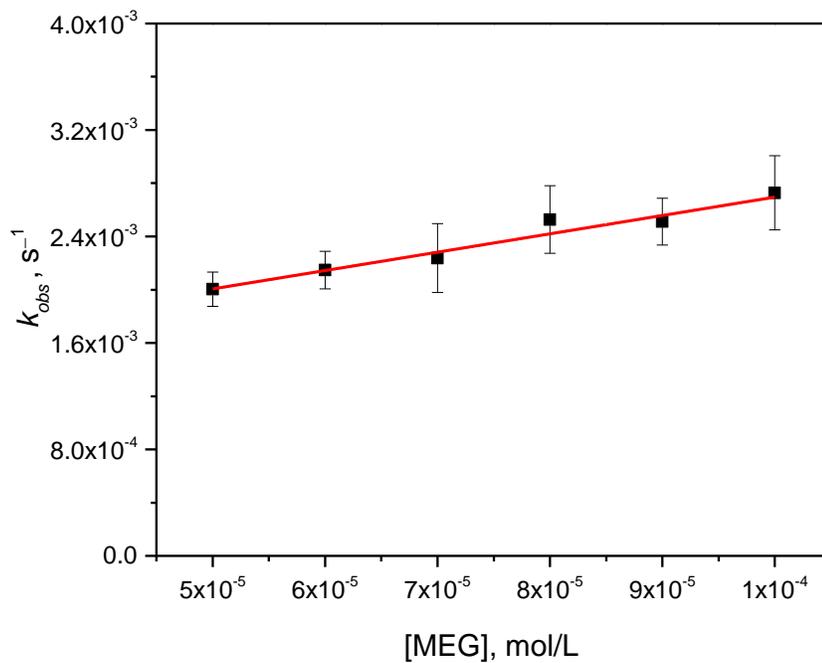


Figura 22. Perfil de concentración promedio en la ruptura del NPDPP catalizada con MEG a un valor de pH de 11.2 a 37°C en agua.

Tabla 10. Dependencia de la constante catalítica con el valor de pH en agua de los compuestos ($pK_w = 13.7$).

SAG (R = H)		MEG (R = OCH ₃)	
pH	$10^2 k_{cat}, \text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$	pH	$k_{cat}, \text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$
9.8	52.6(2.1)	10.0	4.11(2.01)
10.9	95.5(1.3)	10.9	7.12(0.46)
11.2	136.0(3.9)	11.2	13.79(1.16)

Al igual que en el comportamiento en la mezcla de DMSO con agua, en el caso de, agua vemos que hay preferencia por un catalizador, sólo que en este caso es para el MEG el cual presenta valores superiores en un orden de magnitud hasta que se desprotona completamente, en donde se alcanzan dos órdenes de magnitud de diferencia entre los compuestos. Esta preferencia de cada catalizador por un medio puede deberse a efectos electrónicos y estéricos que se analizarán en la siguiente sección en conjunto con el perfil de neutralización para tener un panorama más amplio en cuanto a la catálisis por especies. Finalmente, en el caso del derivado nitro de los compuestos sintetizados no fueron probados, debido a su baja solubilidad e interferencia para poder hacer las mediciones cinéticas por espectrofotometría.

5.3.2. Perfiles de neutralización

Debido a la confirmación de la ruptura catalítica del NPDPP por los compuestos, se hicieron los perfiles de neutralización para conocer que especie o especies del catalizador son las más activas en la reacción. El experimento se hizo con una concentración constante de los catalizadores (5 mmol/L) mediante la variación de los equivalentes de neutralización, los cuales se hicieron variar de 0 a 3. En la figura 23 se muestran las especies presentes por cada equivalente de neutralización. En la proporción de neutralización 0:1 se tiene a la especie H_2A^+ (ambos grupos están protonados), cuando la neutralización es de 1:1 se tendrá la especie HA

(fenolato/guanidina protonada) y en 2:1 la especie A⁻ donde ambos grupos están totalmente desprotonados (fenolato/guanidina neutra).

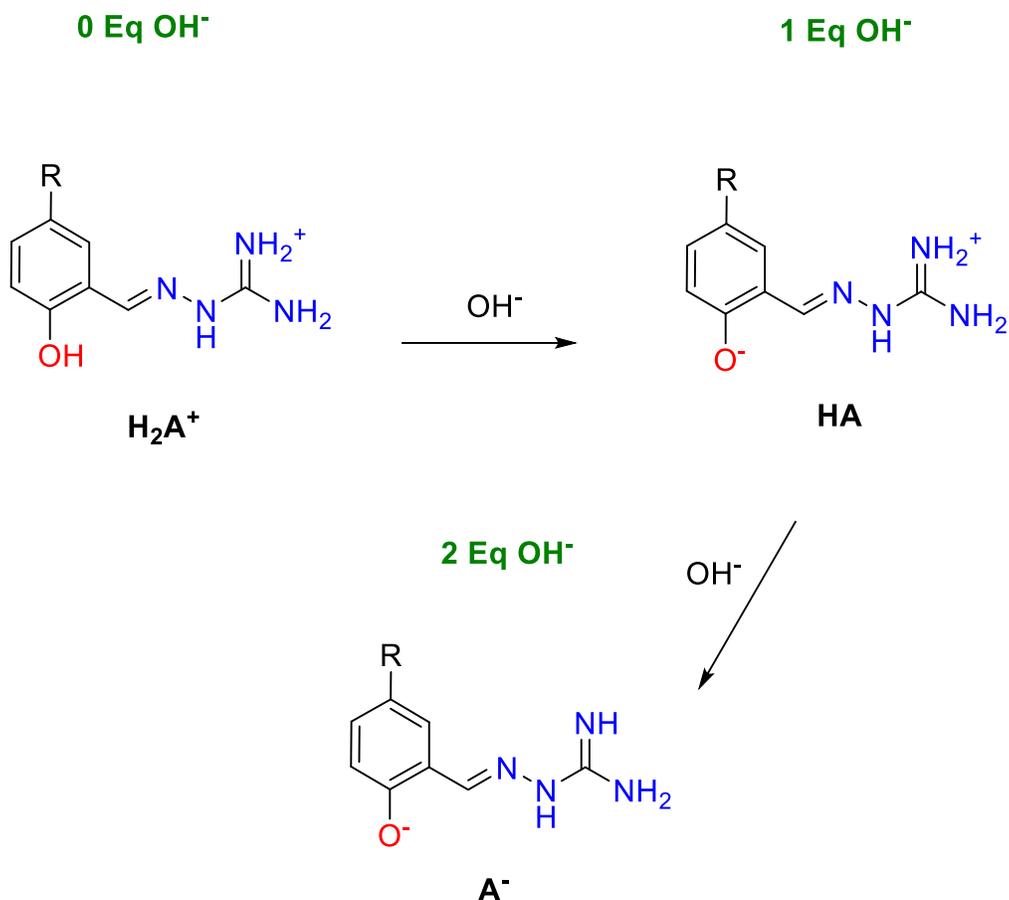


Figura 23. Diagrama general de especies de los catalizadores presentes en las distintas proporciones de desprotonación.

Los valores para las constantes de rapidez observadas obtenidas para ambos compuestos en la mezcla de 80% DMSO-agua se muestran en la tabla 11. Donde podemos observar que conforme aumenta el grado de neutralización de las moléculas aumenta el valor de la constante, lo que nos indica que las especies desprotonadas de los compuestos son las que son más efectivas en la ruptura catalítica. De nuevo el efecto catalítico en los perfiles de neutralización en la mezcla de DMSO con agua resultan ser más favorecidos hacia SAG. Así mismo, podemos ver que a mayor desprotonación más efectiva es la ruptura. Esto puede ser

indicativo que estén operando más de un tipo de mecanismo en la ruptura del sustrato.

Tabla 11. Constantes de rapidez en la ruptura del NPDPP con el grado de desprotonación de SAG y MEG en 80% DMSO. [Cat] = 5 mmol/L.

SAG		MEG	
Eq OH ⁻	10 ⁵ k _{obs} , s ⁻¹	Eq OH ⁻	10 ⁵ k _{obs} , s ⁻¹
0	0.02	0	0.01
0.23	0.05	0.23	0.02
0.5	0.2	0.5	0.07
0.75	0.4	0.75	0.27
1	21	1	0.95
1.25	67	1.25	1.2
1.5	129	1.5	2.7
1.75	231	1.75	3.9
2	353	2	4.3
2.25	437	2.25	4.4

En las figuras 24 y 25 se muestran los perfiles de neutralización de SAG en DMSO-agua al 80%. La primera muestra el gráfico en función de los equivalentes de hidróxido añadidos para tener las diferentes especies. En la segunda figura el gráfico se muestra en función del pH que se genera en cada grado de neutralización. En la primera figura vemos como después del punto 1:1 hay un aumento notable en los valores de las constantes de rapidez, aparentemente lineal, lo que es indicativo de una catálisis básica general. En la segunda figura vemos como ocurre un punto de inflexión cercano al valor de 1:1.5, desplazado un poco hacia 1:1.75 que corresponden al intervalo de pH de 13 a 14.

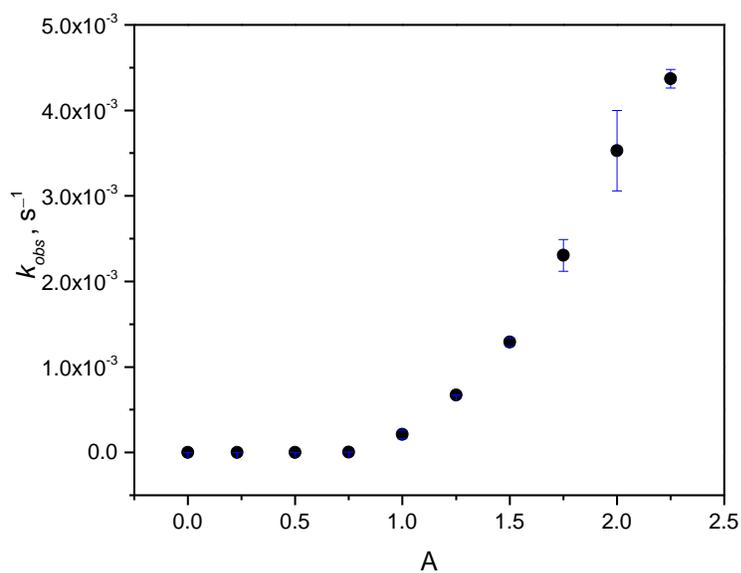


Figura 24. Perfil de variación de la constante de rapidez en la ruptura del NPDPP con el grado de neutralización en 80% DMSO de SAG, A representa los equivalentes de base (hidróxido de tetrametilamonio).

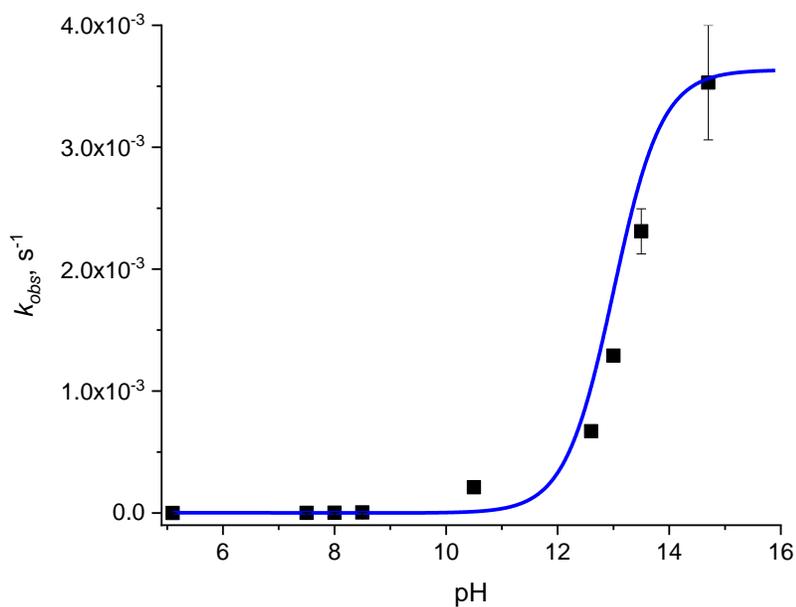


Figura 25. Perfil de variación de la constante de rapidez en la ruptura del NPDPP con SAG en función del valor de pH en 80% DMSO acuoso a 37°C. Ajuste realizado con ecuación 4.

Para hacer un mejor análisis del perfil de neutralización se ajustaron los perfiles a la ecuación:

$$k_{obs} = k_1 [H_2A^+] + k_2 [HA] + k_3 [A^-] \quad \text{Ec. 4}$$

Donde,

$$[H_2A^+] = \frac{[Cat]_T [H^+]^2}{[H^+]^2 + K_{a1} [H^+] + K_{a1} K_{a2}} \quad \text{Ec. 5}$$

Y

$$[HA^+] = \frac{[Cat]_T K_{a1} [H^+]}{[H^+]^2 + K_{a1} [H^+] + K_{a1} K_{a2}} \quad \text{Ec. 6}$$

Además

$$[A^-] = \frac{[Cat]_T K_{a1} K_{a2}}{[H^+]^2 + K_{a1} [H^+] + K_{a1} K_{a2}} \quad \text{Ec. 7}$$

En la figura 25 se muestra el ajuste con la ecuación 4, de la catálisis en función de las especies presentes en cada valor de pH. La ecuación de ajuste debido a los valores de constantes obtenidos sólo ajusta con la especie SAG de manera cuantitativa, ya que el valor de k_3 fue de $0.727(0.045) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, en el caso de los valores de k_1 y k_2 no se ajustaron al perfil, debido a su muy baja contribución en la ruptura catalítica, comparado con la especie completamente desprotonada. Lo anterior, lo podemos confirmar con los perfiles de concentración anteriormente obtenidos.

En el caso de MEG, el comportamiento es muy similar tal como se muestra en la figura 26, en ella podemos observar el mismo comportamiento sigmoideal. Sin embargo, en este compuesto las constantes de rapidez observadas son menores que a las observadas en SAG, por lo que se puede observar en el perfil de neutralización la contribución clara de dos especies, la completamente desprotonada y la que sólo tiene desprotonado el fenol. El ajuste de la curva a la ecuación 4, arroja los valores de las constantes catalíticas para la ruptura, k_2 y k_3

de $1.18(0.31) \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $9.10(0.30) \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. En el caso de MEG, a diferencia de SAG, se pudieron detectar las constantes catalíticas de ambas especies debido a que la ruta que domina la especie totalmente desprotonada no es tan favorecida como con SAG y compiten entre ellas, por lo que son detectables, situación que en SAG no ocurre. Es muy probable que este efecto pueda ser atribuido al grupo electrodonador metoxi que está en la posición *para* al fenol y *meta* al fragmento guanilhidrazona. Estos efectos se discutirán más adelante en conjunto con los resultados obtenidos en agua.

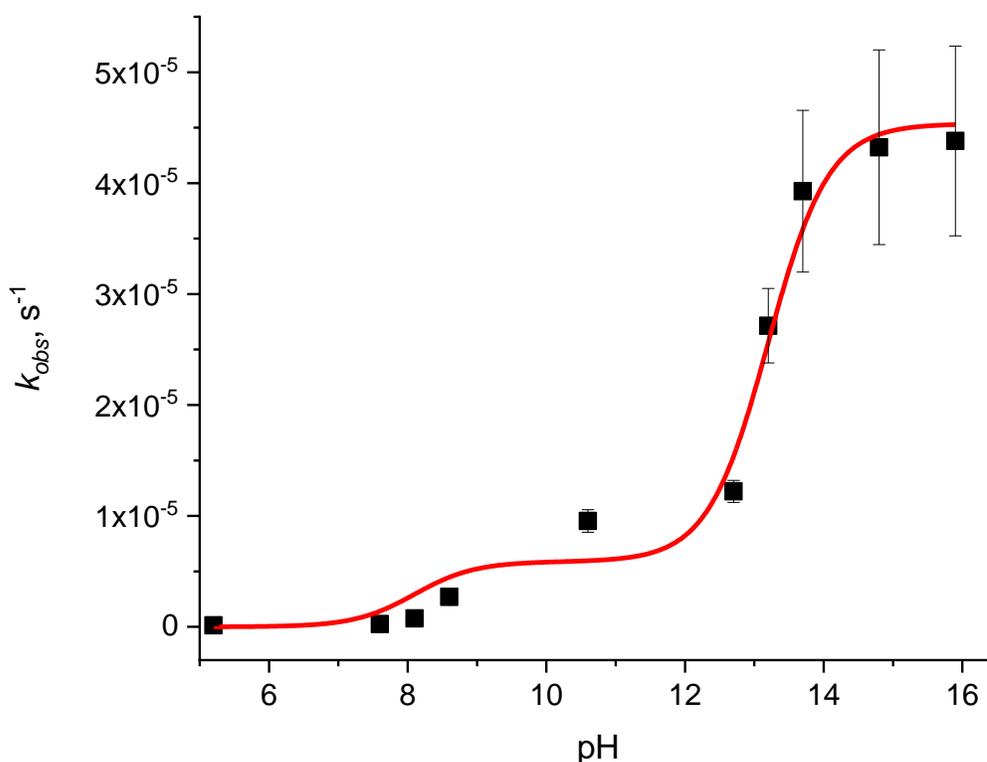


Figura 26. Perfil de variación de la constante de rapidez en la ruptura del NPDPP con MEG en función del valor de pH en 80% DMSO acuoso a 37°C.

Los perfiles de neutralización obtenidos para SAG y MEG en agua se muestran en las figuras 27 y 28, respectivamente. Estos perfiles tienen un comportamiento muy similar a los obtenidos en DMSO acuoso al 80% en volumen, salvo que, a valores de pH elevados, en donde termina la capacidad de amortiguamiento del catalizador

se dispara la constante de rapidez. Esta elevación en los valores de las constantes de rapidez observadas fuera de la zona amortiguada se debe a la competencia por la catálisis básica específica que en el caso del agua si es comparable debido a las constantes de rapidez obtenidas. Sin embargo, dentro de la zona de amortiguamiento del catalizador la catálisis básica específica no contribuye de manera significativa. En la tabla 12 se muestran los valores de las constantes de rapidez obtenidos con ambos catalizadores en diferentes grados de neutralización. Ambos perfiles de neutralización se ajustaron a la ecuación 4 y los valores para las constantes catalíticas obtenidas fueron k_2 y k_3 de $0.047(0.012) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $0.712(0.077) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente para SAG y k_3 de $6.19(0.19) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, para MEG. En el caso de MEG, debido a que el valor de la constante catalítica resultó ser elevada, es posible que esto enmascare la contribución de la catálisis por la especie que tiene el fenol desprotonado.

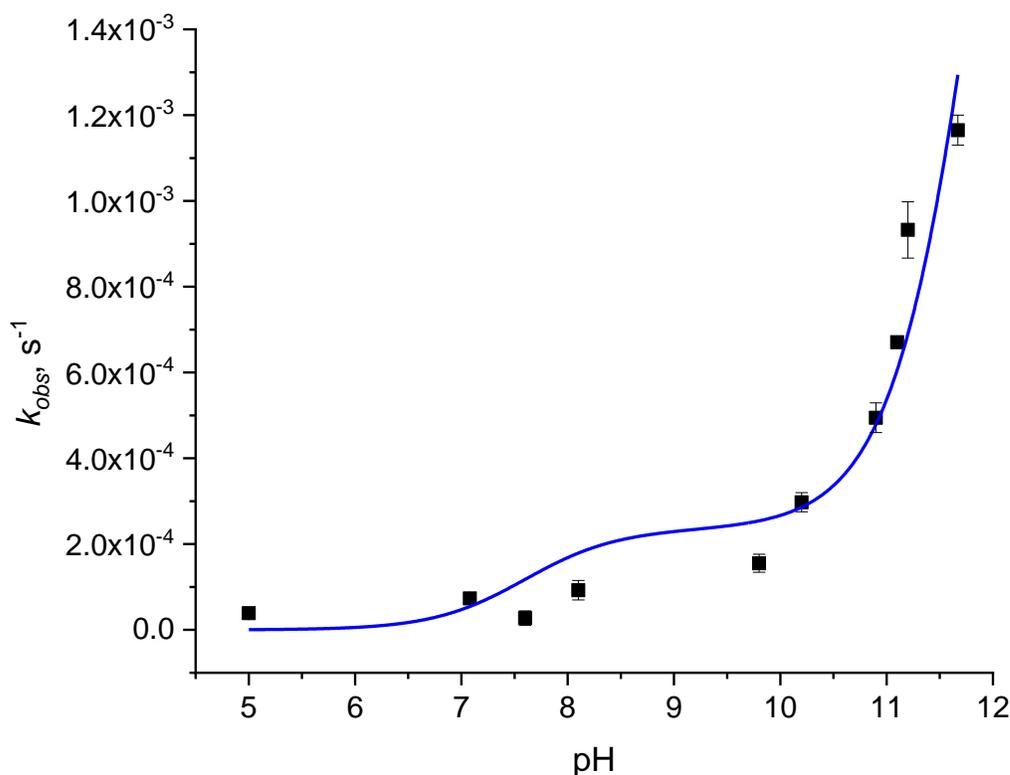


Figura 27. Perfil de variación de la constante de rapidez en la ruptura del NPDPP con SAG 5 mmol/L en función del valor de pH en agua a 37°C.

Tabla 12. Constantes de rapidez en la ruptura del NPDPP con el grado de desprotonación de SAG y MEG en agua.

SAG		MEG	
Eq OH⁻	$10^5 k_{obs}, s^{-1}$	Eq OH⁻	$10^5 k_{obs}, s^{-1}$
0	3.9	0	0.16
0.23	7.3	0.23	4.3
0.5	2.7	0.5	6.5
0.75	9.2	0.75	10
1	15.5	1	13.9
1.25	29.8	1.25	13.4
1.5	49.4	1.5	38
1.75	67.1	1.75	51
2	93.2	2	78
2.25	117	2.25	236
2.75	238	2.75	374
3	326	3	413

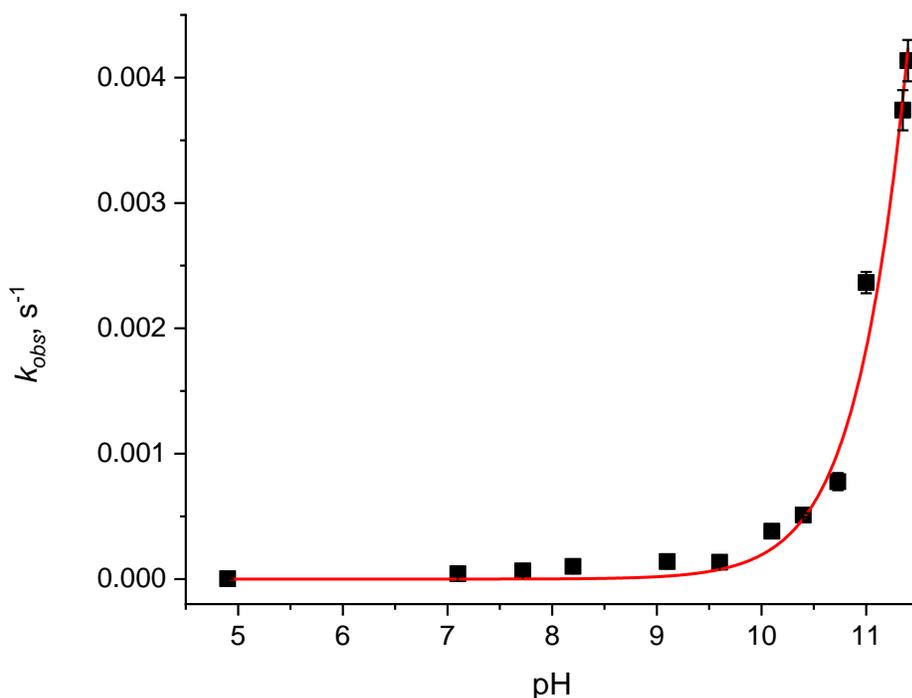


Figura 28. Perfil de variación de la constante de rapidez en la ruptura del NPDPP con MEG 5 mmol/L en función del valor de pH en agua a 37°C.

Los resultados encontrados en los perfiles de neutralización en cada medio son interesantes. Ya que en la mezcla de DMSO acuoso utilizada el compuesto SAG presenta una mejor actividad catalítica en la ruptura del NPDPP, mientras que en agua MEG es el más favorecido. Por lo que podemos hablar de la existencia de efecto de disolvente. En términos generales, el compuesto MEG resultó ser el mejor catalizador en agua, ya que incluso supera al valor de SAG en DMSO acuoso. En los perfiles analizados, tanto de concentración como de neutralización se encontró evidencia de una posible catálisis por la especie con el fenol desprotonado como por la molécula totalmente desprotonada (con la guanidina). En informes previos (Ramos, 2017) se ha encontrado que en el caso de los triésteres de fosfato es necesaria la participación de una especie que sea nucleofílica para que ocurra la ruptura.

En ambos compuestos, SAG y MEG, el nucleófilo podría ser el oxígeno del fenol el cual al desprotonarse aumentaría la nucleofilia (por lo que tendríamos la presencia de una catálisis básica general). Este posible mecanismo podría estar ocurriendo ya que en ambos tipos de perfiles se encontró que existía la participación de la especie con el fenol desprotonado (en el de concentración y de neutralización). Lo que llama la atención es que la especie completamente desprotonada (con el anión fenolato y la guanidina) sea mejor catalíticamente, ya que esto implicaría que la guanidina podría estar funcionando como un posible nucleófilo. Estudios en el grupo, sobre efectos cinéticos isotópicos del disolvente y de resonancia magnética nuclear de ^{31}P (aún sin publicarse), muestran que con el sustrato NPDPP ocurren de manera simultánea una catálisis básica general y una catálisis nucleofílica con guanidina. Donde por un lado la guanidina puede unirse directamente al fósforo formando un fosforamidato, pero también puede desprotonar una molécula de agua que actúa como nucleófilo y rompe al triéster. Esto mismo podría estar ocurriendo con los compuestos SAG y MEG y por eso la actividad catalítica sea considerablemente más elevada en la ruta que corresponde a la especie desprotonada. Ya que en ella podrían actuar de manera simultánea ambos fragmentos.

Para el compuesto SAG, los valores encontrados para la constante catalítica en ambos medios para la especie totalmente desprotonada es muy similar, sin embargo, en DMSO acuoso no se detecta en el ajuste a la especie con el guanidinio protonado y el fenolato (zwitterion), algo que si ocurre en agua. Esto puede deberse a que en DMSO se ve favorecida la ruta de la catálisis nucleofílica por la guanidina, mientras que en agua ambas rutas puedan estar operando. Un posible esquema del mecanismo de reacción que ocurra para la ruta del zwitterion se muestra en la figura 29, el cual corresponde a la ruta de la catálisis básica general.

Para MEG, la ruta del zwitterion compite con la otra mejor en DMSO acuoso, lo que podría deberse a que como electrónicamente por el efecto del grupo metoxi, una autoasociación en el estado de transición podría ayudar a la ruta catalítica a que

sea competitiva. Este mismo efecto electrónico, podría ser el responsable de que en agua, MEG suba casi 3 órdenes de magnitud en la ruta donde la molécula totalmente desprotonada rompa el NPDPP.

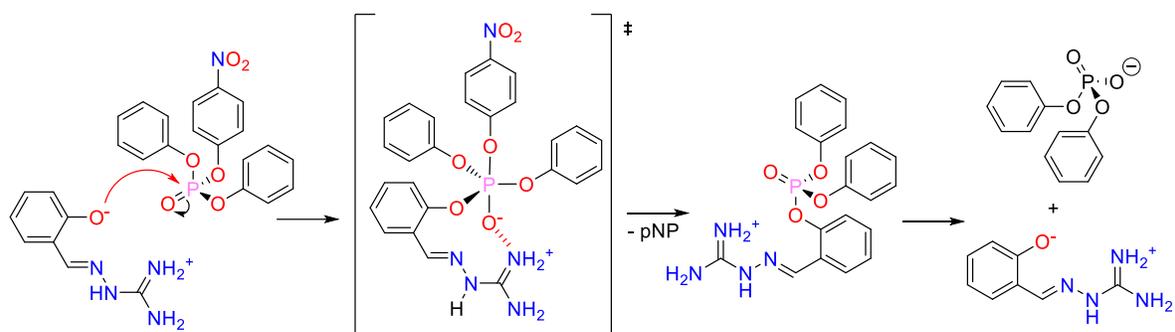


Figura 29. Mecanismo propuesto para la catálisis básica general para la ruptura del DPPNPP.

Estos resultados son alentadores, ya que estas moléculas relativamente sencillas pudieron romper el sustrato modelo de paraoxón, el NPDPP. Además, algo sorprendente fue que en agua resultó ser muy buen catalizador ya que sube al menos 2 (SAG) y 16 (MEG) veces la eficiencia catalítica respecto a la ruptura con iones hidróxido. En el presente trabajo, los objetivos solo fueron probar a las moléculas como posibles candidatos para romper triésteres de fosfato, por lo que faltarían más experimentos para poder proponer un mecanismo. Entre estos experimentos se podrían probar moléculas con otros sustituyentes para evaluar mejor los efectos electrónicos, cinéticas en RMN de ^{31}P , efectos isotópicos de disolvente y hacer perfiles de neutralización en diferentes concentraciones para observar el efecto.

5. CONCLUSIONES

Las moléculas sintetizadas y caracterizadas (SAG y MEG) tienen actividad catalítica para la reacción de transesterificación del difenil *p*-nitrofenil fosfato (NPDPP) en agua y en DMSO acuoso al 80%. Conforme aumenta la concentración de los catalizadores, el valor de las constantes de rapidez obtenidas aumenta.

La especie con mayor actividad catalítica según lo observado en los perfiles de neutralización es aquella donde ambos motivos (fenol/guanidina) están completamente desprotonados.

El compuesto SAG presentó una mejor actividad en el medio de 80% DMSO acuoso y mientras que MEG lo presentó en agua, esta preferencia de cada catalizador por un medio puede deberse a efectos electrónicos y estéricos.

Se obtuvo la siguiente ecuación del ajuste de la catálisis de la ruptura del NPDPP a 37°C, en función de las especies presentes en cada valor de pH: $k_{obs} = k_1 [H_2A^+] + k_2 [HA] + k_3 [A^-]$.

A partir del ajuste de los perfiles de neutralización se calcularon los valores de las constantes catalíticas para la ruptura del NPDPP, k_2 y k_3 de $1.18(0.31) \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $9.10(0.30) \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para SAG y MEG respectivamente. Y se presume que la ruta de catálisis por SAG predominante es la que involucra la especie totalmente desprotonada ($[A^-]$) y que para MEG involucra una competencia entre las especies químicas $[HA]$ y $[A^-]$.

El mejor catalizador fue MEG en agua, puesto que su constante de rapidez supera incluso al valor de SAG en DMSO acuoso.

La ruptura del NPDPP con los compuestos SAG y MEG es superior a la que presentan los iones hidróxido (2 y 16 veces respectivamente) debido a la formación de carga negativa en el estado de transición y la cual se ve favorecida por la mejor solvatación de un solvente prótico polar.

7. REFERENCIAS

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

Ariga, K. 2016. Supermolecules. In *Biomaterials Nanoarchitectonics*. William Andrew Publishing. pp. 25-40.

Ariga, K. y Kunitake, T. 2006. *Supramolecular Chemistry: Fundamentals and Applications*. Springer-Verlag, Berlin.

Baldini L., Cacciapaglia R., Casnati A., Mandolini L., Salvio R., Sansone F. y Ungaro R. 2012. Upper Rim Guanidinocalix[4]arenes as Artificial Phosphodiesterases. *The Journal of Organic Chemistry*, 77(7), 3381–3389.

Becker P. J. y Coppens P. 1974. *Acta Cryst.* A30, 129–147.

Breslow R., Doherty J.B., Guillot G. y Lipsey, C. 1978. β -Cyclodextrinylbisimidazole, a model for ribonuclease. *J. Am. Chem. Soc.*, 100: 3227–3229.

Bowler M.W., Cliff M.J., Waltho J.P. y Blackburn, G.M. 2010. Why did Nature select phosphate for its dominant roles in biology? *New Journal of Chemistr* 34:784–794.

Bruice TC. y Benkovic SJ. 2000. Chemical basis for enzyme catalysis. *Biochem.* 21: 5267-6274.

Castro E., Ugarte D., Rojas M., Pavez P. y Santos J. 2011. Nucleophilic substitution reactions of diethyl 4-nitrophenyl phosphate triester: Kinetics and mechanism. *International Journal of Chemical Kinetics*, 43(12), 708–714.

Cleland W. y Hengge A. 2005. Enzymatic Mechanism of Phosphate and Sulfate Transfer.

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

Cragg P.J. 2010. *Supramolecular Chemistry: From Biological Inspiration to Biomedical Applications*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.

Diez M., Martinez A. y Mancin F. 2017. Phosphate Ester Hydrolysis: The Path From Mechanistic Investigation to the Realization of Artificial Enzymes. *Advances in Physical Organic Chemistry*. 4:127-151.

Donarski W., Dumas D., Heitmeyer D., Lewis V., Raushel F. 1989. Structure-activity relationships in the hydrolysis of substrates by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biochemistry*.11:4650-5.

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

Dolomanov O. V., Bourhis L. J., Gildea R. J., Howard, J. A. y Puschmann H. 2009. OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. *Journal of applied crystallography*, 42(2), 339-341.

Ferreira J. y Orth E. 2017. Degrading Pesticides with Waste Product: Imidazole-Functionalized Rice Husk Catalyst for Organophosphate Detoxification. *J. Braz. Chem. Soc.* 28:1760-1767.

Ghosh D., Takeda H., Fabry D., Tamaki Y. y Ishitani O. 2019. A new supramolecular photocatalyst with a Rh(III)-complex catalyst unit for CO₂ reduction. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*.

Hostert L., Blaskiewicz S.F., Fonsaca J., Domingues S., Zarbin A. y Orth E.S. 2017. Imidazole-derived graphene nanocatalysts for organophosphate destruction: Powder and thin film heterogeneous reactions. *Journal of catalysis*. 356:75-84.

karmelin S.C.L y Wilkie J. 2007. The role of metal ions in phosphate ester hydrolysis. *Organic and biomolecular chemistry*. 5:13.

Kirby A. J.1996. Enzyme Mechanisms, Models, and Mimics. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 7: 706–724.

Komiyama M., Breaux E.J. y Bender M.L. 1977. The use of cycloamylose to probe the charge-relay system. *Bioorg. Chem*. 6:127–136.

Lad, C., Williams, N.H. y Wolfenden R. 2003. The rate of hydrolysis of phosphomonoester dianions and the exceptional catalytic proficiencies of protein and inositol phosphatases. *Proc. Natl. Acad.*10: 5607-5610.

Lee L. y Zhao Y. 2014. Metalloenzyme-Mimicking Supramolecular Catalyst for Highly Active and Selective Intramolecular Alkyne Carboxylation. *Journal of the American Chemical Society*, 136(15), 5579–5582.

Lehn J-M. 1988. Supramolecular chemistry – scope and perspectives. *Molecules, supermolecules and molecular devices*. *Angew Chem Int Ed Engl*. 89-112.

Manfredi A., Demos W., Wanderlind E., Silva B., Pinto A., Souza B. y Nome F. 2016. Rapid cleavage of phosphate triesters by the oxime 2-(hydroxyimino)-N-phenylacetamide. *J. Phys. Org. Chem*.

Medeiros M., Wanderlind E., Mora J.R., Moreira R., Kirby A. y Nome F. 2013. Major mechanistic differences between the reactions of hydroxylamine with phosphate di- and tri-esters. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 11(37):6272.

Motherwell W.B., Bingham M.J. y Six, Y. 2001. Recent progress in the design and synthesis of artificial enzymes. *Tetrahedron*. 57, 4663-4686.

Orth E., Almeida T., Silva V. y Oliveira A. 2015. Mechanistic insight on the catalytic detoxification of Paraoxon mediated by imidazole: Furnishing optimum scaffolds for scavenging Organophosphorus agents. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 403:93-98.

Raushel F.M. y Holden H.M. 2000. Phosphotriesterase: an enzyme in search of its natural substrate. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 74: 51-93.

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

Ramos G. 2017. Ruptura ácido-base con guanidina, en la hidrólisis del difenil p-nitrofenilfosfato (DPpNPP), en mezclas DMSO-H₂O (tesis licenciatura). Universidad de Sonora, Cd. Obregón , Sonora.

Reek J.N.H. y Meeuwissen J. 2010. Supramolecular catalysis beyond enzyme mimics. *Nature Chemistry* volume 2, pp 615–62.

Reinhoudt D.N. 2013. *Supramolecular Chemistry and Heterocycles*. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering.

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

1–13.

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

Salvio R., Mandolini L. y Savelli C. 2013. Guanidine-guanidinium cooperation in bifunctional artificial phosphodiesterases based on diphenylmethane spacers; gem-dialkyl effect on catalytic efficiency. *J. Org. Chem.* 78: 7259-63.

Salvio R., Volpi S., Cacciapaglia R., Sansone F., Mandolini L. y Casnati, A. 2016. Phosphoryl Transfer Processes Promoted by a Trifunctional Calix[4]arene Inspired by DNA Topoisomerase I. *The Journal of Organic Chemistry*, 81(19), 9012–9019.

Sheldrick G. M. 2008. A short history of SHELX. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography*, 64(1), 112-122.

Steed, J.W. y Atwood J.L. 2009. *Supramolecular Chemistry*. Wiley. 2nd Ed.

Todd A. 1959. Some aspects of phosphate chemistry. *Proc Natl Acad Sci.* 45:1389–1397.

Van Leeuwen, P., Ballester, P. y Vidal-Ferran, A. 2008. *Supramolecular Catalysis*. WILEY. 1:1-24pp.

Wanderlind E., Liz D., Gerola A., Affeldt R., Nascimento V., Bretanha L., Montecinos R., Garcia-Rio L., Fiedler H. y Nome F. 2018. Imidazole-Functionalized Pillar[5]arenes: Highly Reactive and Selective Supramolecular Artificial Enzymes. *ACS Catalysis*, 8(4), 3343–3347.

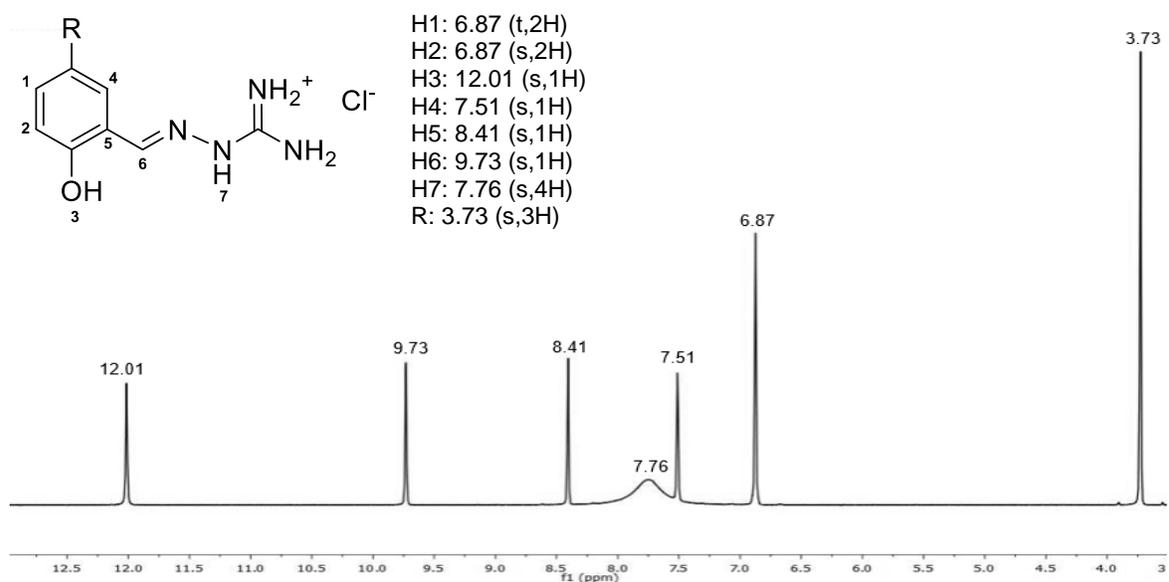
Westheimer FH. 1992. The role of phosphorus in chemistry and biochemistry: an overview. American Chemical Society. 486:1–17.

Yatsimirsky A. 2005. Metal ion catalysis in acyl and phosphoryl transfer: Transition states as ligands. Coordination Chemistry Reviews.

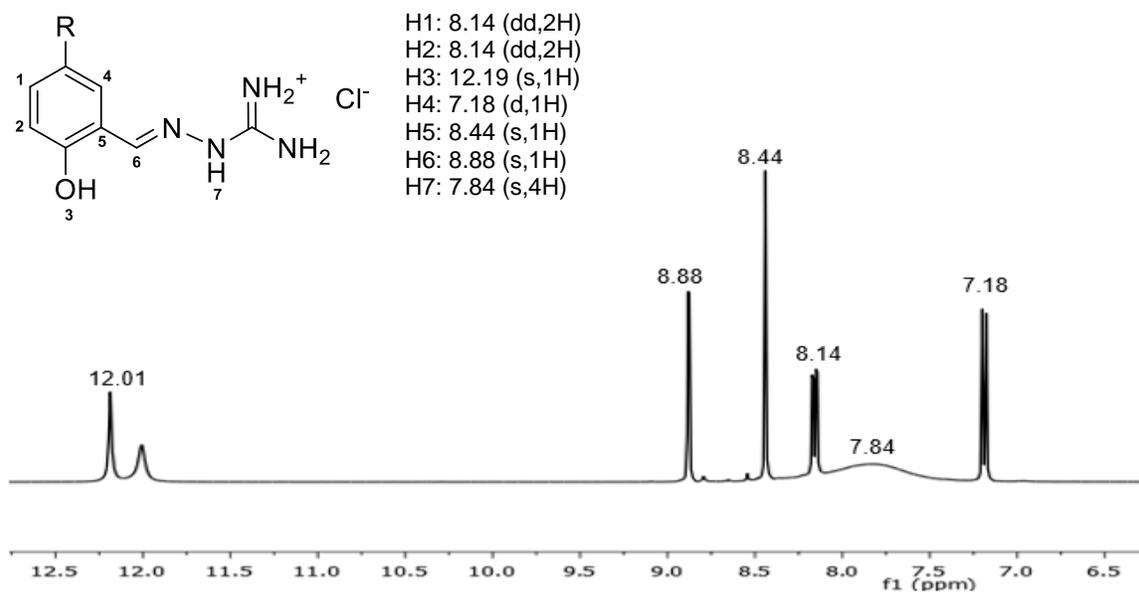
9. APÉNDICES

APÉNDICE A.1

Conjunto de espectros de RMN ^1H adquiridos como parte de la caracterización de los compuestos sintetizados en este proyecto de tesis.



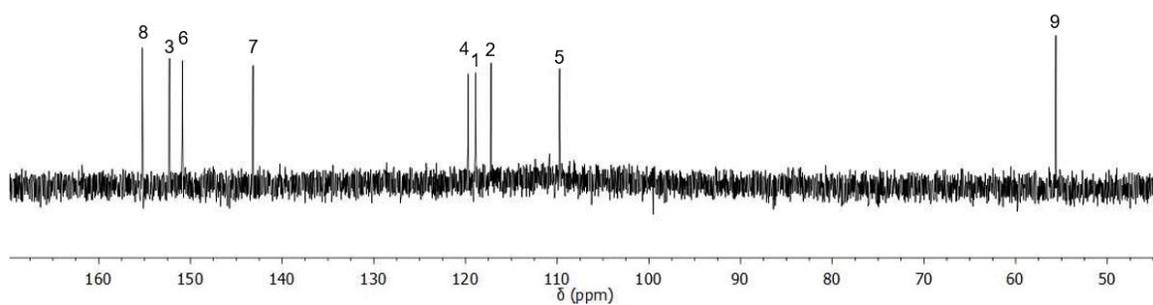
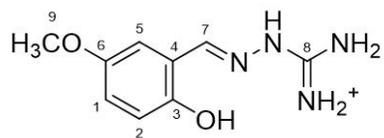
A.1.1. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz) de MEG en DMSO- d_6 .



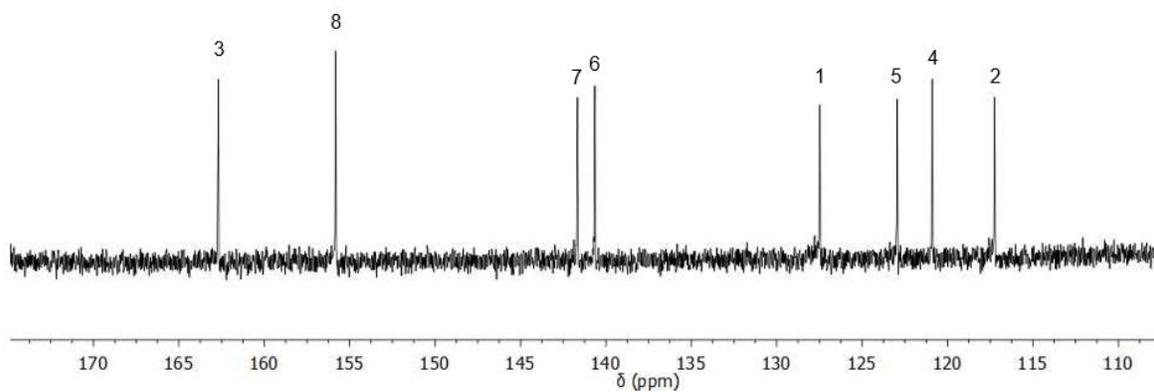
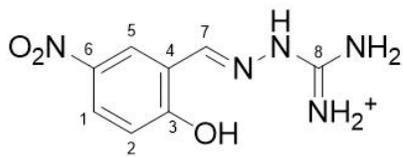
A.1.2. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz) de NOG en DMSO- d_6 .

APENDICE A.2

Conjunto de espectros de RMN ^{13}C adquiridos como parte de la caracterización química de los compuestos sintetizados.



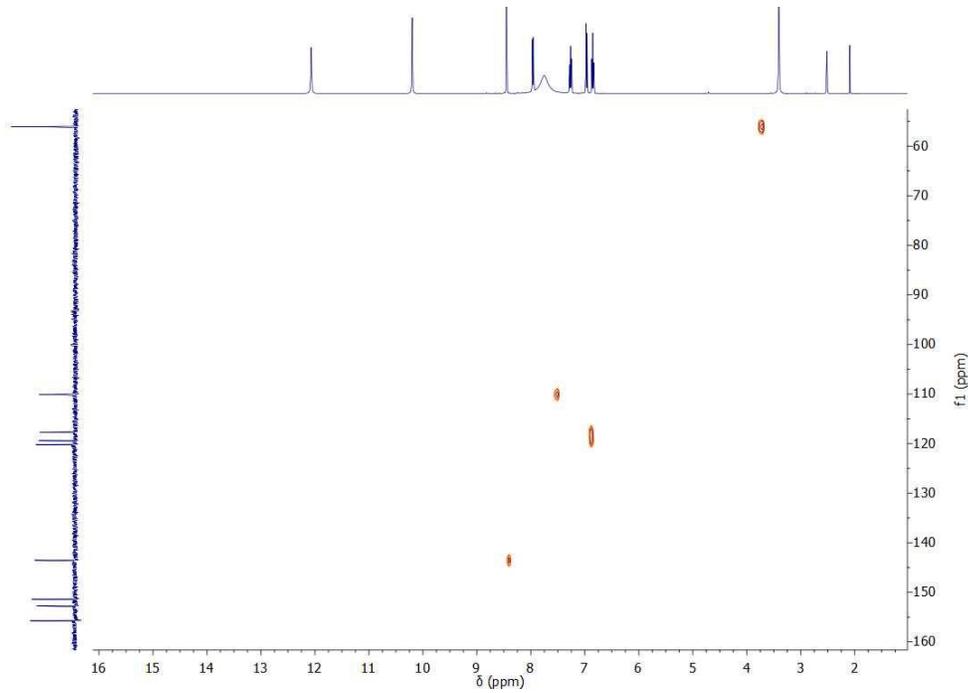
A.2.1. Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz) de MEG en DMSO- d_6 .



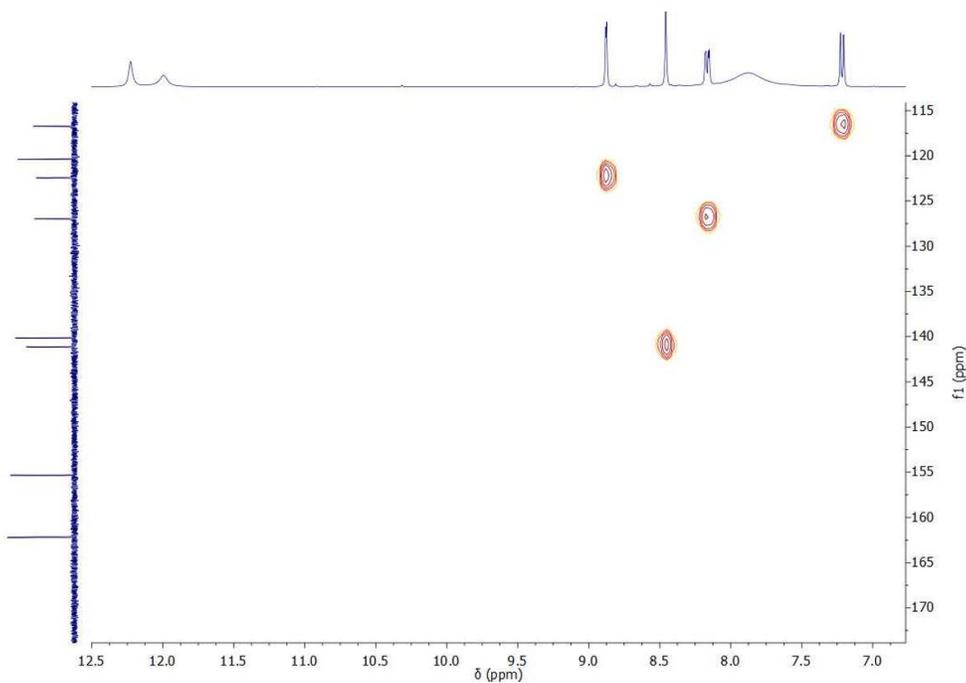
A.2.2. Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz) de NOG en DMSO- d_6 .

APENDICE A.3

Conjunto de espectros HSQC obtenidos, para observar los acoplamientos C-H en las moléculas como parte de la caracterización química parcial de los compuestos sintetizados.



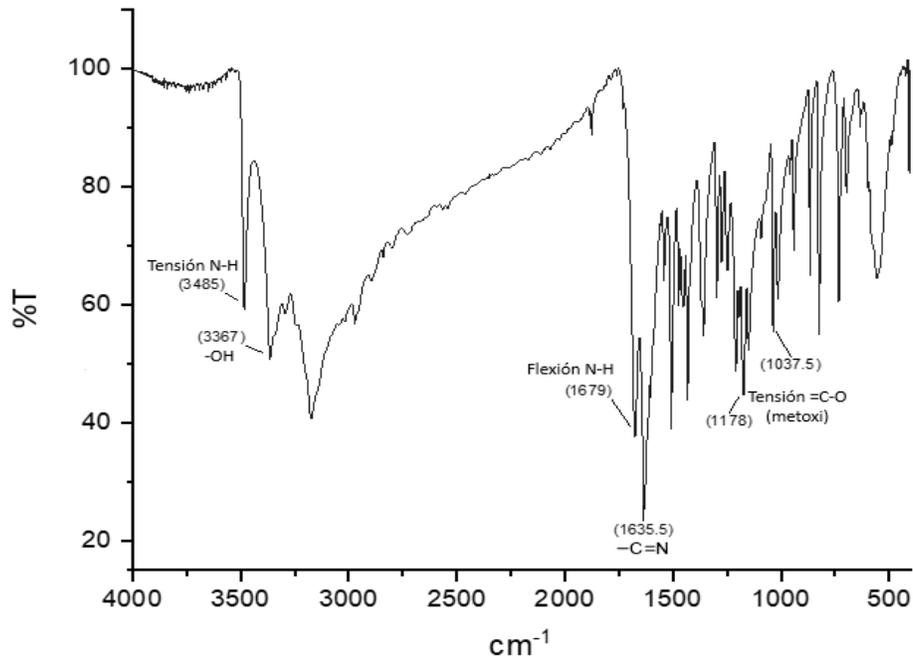
A.3.1. Espectro HSQC de MEG en DMSO- d_6 .



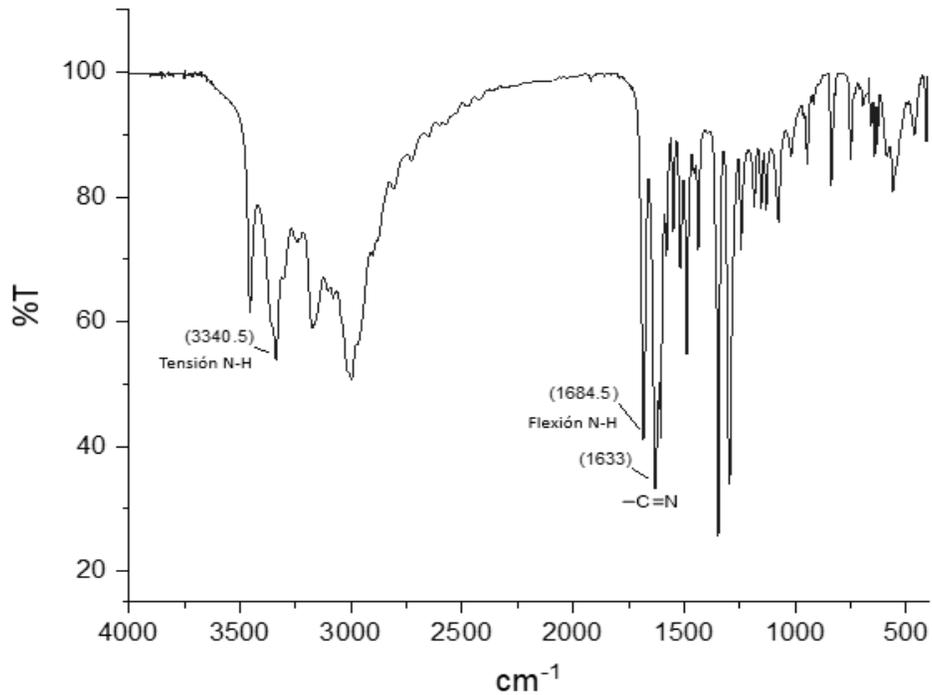
A.3.2. Espectro HSQC de NOG en DMSO- d_6 .

APENDICE A.4

Conjunto de espectros de IR obtenidos como parte de la caracterización química parcial de los compuestos sintetizados.



A.4.1. Espectro de infrarrojo en pastilla de KBr de MEG.



A.4.2. Espectro de infrarrojo en pastilla de KBr de NOG.